·实验研究·

基于 c-JNK/CXCL1 信号通路研究杜仲腰痛丸对腰椎间盘突出症大鼠脊髓背角组织炎症的抑制作用

刘俊豪[1],赵继荣[1,2*],湛　洋[1],殷红年[1],蒋　鹏[2],王化省[1],马　东[1],赵　瑞[1],马伯骞[1]
(1 甘肃中医药大学,兰州 730000; 2 甘肃中医药大学附属医院,兰州 730000)

[摘要] **目的**:分析杜仲腰痛丸调节 c-Jun 氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase,c-JNK)/趋化因子配体 1[chemokine(C-X-C motif)ligand 1,CXCL1]信号通路对腰椎间盘突出症(lumbar intervertebral disc protrusion,LDH)大鼠脊髓背角组织炎症的影响。**方法**:将 75 只大鼠随机分为假手术组,模型组,杜仲腰痛丸低、中、高剂量组。模型复制 2 h 后,杜仲腰痛丸剂量组灌胃给予杜仲腰痛丸溶液,假手术组和模型组灌胃给予生理盐水。干预后观察各组大鼠一般情况,痛觉过敏实验测定机械刺激缩足反射阈值(paw withdrawal mechanical threshold,PWMT)和热刺激缩足反射潜伏期(paw withdrawal thermal latency,PWTL),ELISA 检测大鼠脊髓背角组织白细胞介素 6(interleukin-6,IL-6)和 IL-1β 水平,HE 染色法观察大鼠背根神经节组织病理学变化,TUNEL 染色检测脊髓细胞凋亡情况,qRT-PCR 检测离子钙结合接头分子 1(ion calcium binding junction molecule 1,Iba-1)、c-JNK、p-c-JNK、CXCL1 mRNA 表达,Westernblot 检测 Iba-1、c-JNK、p-c-JNK、CXCL1 通路蛋白表达。**结果**:与假手术组相比,模型组大鼠神经细胞萎缩,细胞核和尼氏小体减少,细胞凋亡率明显升高,IL-6、IL-β、Iba-1、p-c-JNK、CXCL1 mRNA 表达及蛋白表达升高,PWMT、PWTL 下降($P<0.05$);与模型组相比,杜仲腰痛丸低、中、高剂量组神经细胞形态恢复,核仁清晰,尼氏小体增加,细胞凋亡率明显下降,IL-6、IL-β、Iba-1、p-c-JNK、CXCL1 mRNA 表达及蛋白表达下降,PWMT、PWTL 升高($P<0.05$)。c-JNK 的 mRNA 表达及蛋白表达相对表达水平组间比较差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论**:杜仲腰痛丸能够抑制 LDH 大鼠脊髓背角组织炎症反应,作用机制可能与抑制 c-JNK/CXCL1 信号通路有关。

[关键词] 腰椎间盘突出症;杜仲腰痛丸;脊髓炎症;c-JNK/CXCL1 信号通路
[中图分类号] R965　　[文献标志码] A　　[文章编号] 1003-3734(2026)13-1417-09

Inhibitory effect of Duzhong Yaotong Pill on inflammation of spinal dorsal horn in rats with lumbar discs herniation based on c-JNK/CXCL1 signal pathway

LIU Jun-hao[1], ZHAO Ji-rong[1,2*], ZHAN Yang[1], YIN Hong-nian[1], JIANG Peng[2], WANG Hua-sheng[1], MA Dong[1], ZHAO Rui[1], MA Bo-qian[1]
(1 *Gansu University of Chinese Medicine*, *Lanzhou* 730000, *China*; 2 *Affiliated Hospital of Gansu University of Chinese Medicine*, *Lanzhou* 730000, *China*)

[**Abstract**] **Objective**: To investigate the effect of Duzhong Yaotong Pill on spinal dorsal horn inflammation in rats with lumbar disc herniation (LDH) by regulating the c-Jun N-terminal kinase (c-JNK)/chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (CXCL1) signaling pathway. **Methods**: Seventy-five rats were randomly divided into a sham operation group, a model group, and low-, medium-, and high-dose Duzhong Yaotong Pill groups. Two hours after model establishment, the Duzhong Yaotong Pill groups were gavaged with Duzhong Yaotong Pill solution, while the sham operation group and the model group were gavaged with normal saline. The general condition of the rats in each

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(82460940);兰州市科技计划资助项目(2023-2-60);甘肃省自然科学基金资助项目(23JRRA1248)
[作者简介] 刘俊豪,男,硕士研究生,研究方向:中医药防治脊柱退行性疾患的临床与基础研究。E-mail:1596695819@qq.com。
[通讯作者] *赵继荣,男,一级主任医师,博士生导师,研究方向:中医药防治脊柱退行性疾患的临床与基础研究。E-mail:359973018@qq.com。
[DOI]10.20251/j.cnki.1003-3734.2026.13.011

group was observed. The paw withdrawal mechanical threshold (PWMT) and paw withdrawal thermal latency (PWTL) were measured by hyperalgesia testing. The levels of interleukin-6 (IL-6) and interleukin-1β (IL-1β) in the spinal dorsal horn tissue were detected by ELISA. Histopathological changes in the dorsal root ganglion were observed by HE staining. Spinal cord cell apoptosis was detected by TUNEL staining. The mRNA expression of ionized calcium-binding adapter molecule 1 (Iba-1), c-JNK, p-c-JNK and CXCL1 was detected by qRT-PCR, and the protein expression of Iba-1, c-JNk, p-d-JNK and CXCL1 was detected by Westernblot. **Results**: Compared with the sham operation group, the model group showed neuronal atrophy, reduced nuclei and Nissl bodies, a significantly increased apoptosis rate, increased levels of IL-6, IL-β, Iba-1, p-c-JNK, and CXCL1, and decreased PWMT and PWTL (all $P<0.05$). Compared with the model group, the low-, medium-, and high-dose Duzhong Yaotong Pill groups showed recovery of neuronal morphology, distinct nucleoli, increased Nissl bodies, a significantly decreased apoptosis rate, decreased levels of IL-6, IL-β, decreased mRNA expression and protein expression of Iba-1, p-c-JNK, and CXCL1, and increased PWMT and PWTL (all $P<0.05$). There were no significant differences in the mRNA and protein expression levels of c-JNK among groups ($P>0.05$). **Conclusion**: Duzhong Yaotong Pill can inhibit spinal dorsal horn inflammation in LDH rats, and its mechanism may be related to the inhibition of the c-JNK/CXCL1 signaling pathway.

[**Key words**] lumbar disc herniation; Duzhong Yaotong Pill; spinal cord inflammation; c-Jun N-terminal kinase/CXCL1 signal pathway

腰椎间盘突出症(lumbar disc herniation,LDH)是指腰椎间盘退行性病变或外力作用下,纤维环破裂,髓核突出,刺激和压迫脊神经及神经根,引起的以腰腿痛为主要症状的综合征[1-2],这种疼痛与炎性介质经传入脊髓背角神经元、激活胶质细胞并诱导炎症因子和趋化因子释放有关[3-4]。LDH 是常见疾病,具有病程长、患病率高、致残率高、易复发等特点[5],是当今世界的医疗难题之一[6],根据 LDH 三大病理疼痛机制衍生的非甾体抗炎药物、中枢性止痛药、麻醉止痛药虽然在短期内效果显著,但因不良反应、价格等问题,难以长期治疗[7-8];现代各种微创手术或开放手术虽可暂时解除压迫,但仍存在创伤大、费用高、复发率高等问题[9-10]。中药治疗 LDH 历史悠久,具有不良反应少、价廉、疗效显著等优势,近年来多数研究表明,中医药在治疗 LDH 方面发挥的作用越来越大[11-12]。

杜仲腰痛丸为甘肃省中医院院内制剂,由甘肃省名中医赵继荣根据中医理论及长期临床经验总结而成。该方由杜仲、川牛膝、狗脊、酒萸肉、槲寄生、赤芍、红花、三七粉、醋乳香、醋没药、土鳖虫、川芎、当归、毛细辛、木香、醋元胡及炙甘草共 17 味药材组成,具有补肾强腰、活血祛瘀、理气止痛之功效,临床实践可用于 LDH、骨质增生、腰椎管狭窄等导致的腰腿痛[13-14]。前期动物实验及临床研究显示,杜仲腰痛丸治疗 LDH 的作用机制可能包括减轻神经根受压后的组织水肿、促进炎症介质清除、改善局部微循环、降低外周神经敏感性并提高痛阈,同时还具有一定的免疫调节效应;前期生物信息学和网络药理学结果显示,杜仲腰痛丸可通过槲皮素、甘草查尔酮 a、木犀草素等成分作用于 JUN、MAPK1、MAPK14 等多种基因靶标。然而,该方在 LDH 所致脊髓炎症反应中的具体机制尚不明确。基于此,本研究通过构建 LDH 大鼠模型,观察杜仲腰痛丸对大鼠脊髓背角组织炎症的影响,并进一步探究 c-Jun 氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase,c-JNK)/趋化因子配体 1[chemokine(C-X-C motif) ligand 1,CXCL1]信号通路在其干预过程中的作用,为该药临床应用提供实验依据。

材料与方法

1 动物

SD 雄性大鼠 75 只,SPF 级,8 周龄,体质量(220 ± 20) g,购于甘肃中医药大学实验动物中心,动物实验伦理审批号:2023-502,动物生产许可证号:SYXK(甘)2021-0004,动物质量合格证号 NO.62001000000824。本实验所有大鼠于术前均在控温(23 ~ 25 ℃)、控湿(60% ~ 65%)及 12 h 光/暗循环的条件下饲养,并允许自由饮食饮水。

2 药物及试剂

杜仲腰痛丸(甘肃省中医院,批号:231073,规格:220 丸/瓶,生药 0.18 g/粒)、异氟烷麻醉剂(深圳市瑞沃德生命科技有限公司,批号:R510-22-10)、大鼠白细胞介素-1β(interleukin-1β,IL-1β)ELISA 定

量检测试剂盒(上海酶联生物公司,批号:F2923-A)、大鼠 IL-6 ELISA 定量检测试剂盒(上海酶联生物公司,批号:F3066-B)、无水乙醇(天津市德恩化学试剂有限公司,批号:GB/T678-2002)、异丙醇(上海湿壹试剂有限公司,批号:67-63-0)、YF® 488TUNEL 细胞凋亡试剂盒(苏州优逸兰迪生物科技有限公司,批号:T6013L)、TRIzonPal(康为世纪公司,批号:CW3166M)、反转录试剂盒(康为世纪公司,批号:CW2020)、PVDF 膜(上海雅酶生物技术有限公司,批号:02881019)、SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液(苏州优逸兰迪生物科技有限公司,批号:230330G03-01)、HRP-conjugatedGoatAnti-RabbitIgG(武汉三鹰生物科技有限公司,批号:SA00001-2)、灵敏化学发光检测试剂盒(苏州优逸兰迪生物科技有限公司,批号:250303G01-02)等。

3 仪器

动物麻醉机(深圳市瑞沃德生命科技有限公司,型号:R540IE)、电子 VonFrey 测痛仪(美国 IITCLifeScience 公司,型号:IITC2500 系列)、热板痛觉测试仪(美国 IITCLifeScience 公司,型号:8390 系列)、高速冷冻型微量离心机(美国 SCILOGEX 公司,型号:CF1524R)、电热恒温箱(北京科伟永兴仪器有限公司,型号:DH－360AS)、酶标仪(美国 MolecularDevices 公司,型号:CMaxPlus)、研磨仪(武汉赛维尔生物科技有限公司,型号:SWE-FP)、实时荧光定量 PCR 仪(苏州雅睿生物技术服务有限公司,型号:MA－6000)、化学发光成像系统(武汉赛维尔生物科技有限公司,型号:IC01360224)、电泳仪(北京六一生物科技有限公司,型号:DYY－6C)、水平摇床(美国 SCILOGEX 公司,型号:SLK-O3000-S)等。

4 大鼠分组与模型复制

75 只大鼠适应性饲养 1 周后按随机数字表法随机分出 15 只为假手术组,其余 60 只为手术造模组,大鼠于造模前禁食不禁水约 8 h。手术造模组大鼠采用自体髓核(nucleus pulposus,NP)移植方法[15－17]复制 LDH 大鼠模型,采用异氟烷对大鼠进行麻醉后,用剃毛器剃除腰椎至尾椎约 6 cm×4 cm 范围毛发进行备皮,将大鼠俯卧位固定于解剖台上,消毒后无菌洞巾暴露 L4～L6 手术区域,手术刀沿后正中线取纵切约 3 cm(L4～L6),依次切开皮肤、皮下组织,暴露棘突(见图 1),钝性分离肌肉暴露 L5 左侧椎体(椎板、乳状突及横突)并用咬骨钳去除,暴露 L5 神经根,然后于距离大鼠肛门 1 cm 处切断尾部并快速结扎止血、缝合,切开尾椎皮肤及周围软组织,暴露两尾椎椎体间髓核(见图 2)并用眼科镊取出 4～5 个尾椎髓核并放置于 L5 神经根旁,注意避免造成明显压迫,逐层缝合。造模后将其随机分为模型组、杜仲腰痛丸低剂量组、杜仲腰痛丸中剂量组、杜仲腰痛丸高剂量组,每组样本量 15 只。假手术组大鼠接受相同手术,但神经根上不移植 NP。造模后大鼠后足出现热痛觉反应,且出现步态不稳、足态变化、瘫痪等行为,提示造模成功。

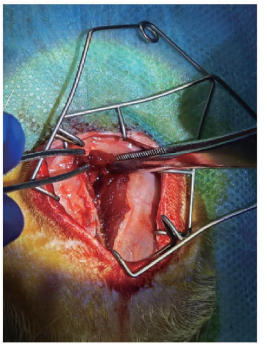


图 1 逐层暴露



图 2 取椎体间髓核

5 大鼠灌胃

将 5.76 g 杜仲腰痛丸粉末溶解于 20 mL 生理盐水,配制成均匀混悬液。给药剂量参照实验动物体表面积等效剂量换算表确定。低、中、高剂量组大鼠分别灌胃 0.29、0.58 和 1.16 $g\cdot kg^{-1}$ 的杜仲腰痛丸药液;假手术组与模型组则灌胃生理盐水。造模成功后 2 h 灌胃给药,1 次·d^{-1},连续灌胃 21 d。

6 一般状态评价

干预期间检测并记录各组大鼠的毛发和爪甲颜色、爪态、步态、饮食饮水情况、体重变化、精神状况。

7 机械痛阈值检测

将大鼠放置于底部为金属网格状有机玻璃箱中适应环境后,使用 VonFrey 纤维丝穿过玻璃箱底部网

格刺激大鼠左侧足底皮肤,大鼠出现快速缩足、嘶叫、舔舐等行为视为阳性反应,在不存在阳性反应的情况下施加较强的刺激,当发生阳性反应时,改为较弱的刺激,采用 Dixon'sup-down 法计算 50% 机械缩爪阈值(paw withdrawal mechanical threshold,PWMT)用于评估机械性异常性疼痛[18],每只大鼠测定 5 次,每次间隔 2 ~3 min,分别于造模前 0 d,造模后 1 周、2 周、3 周进行 PWMT 测定,所有测定分析均在盲法下进行。

8 热痛阈值检测

将大鼠放置于热辐射检测仪上方玻璃板盖上透明塑料罩,适应环境后开启红外辐射热源照射大鼠左侧下肢足底,大鼠出现快速缩足、嘶叫、舔舐等行为视为阳性反应,辐射自动停止,从开始照射到出现阳性反应的时间为热刺激缩足潜伏期(paw withdrawal thermal latency,PWTL),用于评价热痛敏感阈值[19],每只大鼠测定 5 次,每隔 5 min 测定 1 次,分别于造模前 0 d,造模后 1 周、2 周、3 周进行 PWTL 测定,所有测定分析均在盲法下进行。

9 组织取材

大鼠完成灌胃与机械痛阈、热痛阈测定后,予以麻醉后处死,逐层剥离大鼠腰椎脊柱肌肉(见图 3),用咬骨钳破坏腰椎脊柱后取其 L4 ~ L6 节段脊髓背角组织和背根神经节(见图 4)。



图 3 暴露脊髓背角组织

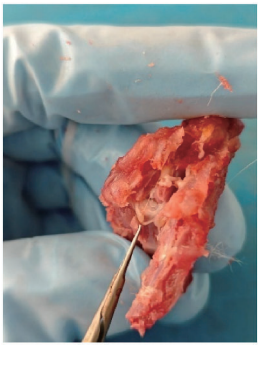


图 4 暴露背根神经节

10 ELISA 检测脊髓背角组织 IL-6、IL-1β 水平变化

组织经预冷 PBS 冲洗、剪碎后,按比例加入含蛋白酶抑制剂的 PBS 进行冰上匀浆,裂解后离心取上清。ELISA 检测中,标准品(3 复孔)和样品(4 复孔)依次进行样本孵育、生物素化抗体孵育、酶标孵育(各步均含洗涤),随后加入底物显色并终止反应,最后于 450 nm 波长下测定吸光度。

11 HE 染色法观察大鼠背根神经节组织病理学变化

新鲜组织样本经固定后,依次经不同浓度乙醇脱水、二甲苯透明化处理、石蜡浸渍及包埋。采用石蜡切片机制备厚度为 3 ~ 5 μm 的组织切片,经温水展平并烘干后,进行 HE 染色。切片首先经二甲苯及梯度乙醇处理进行脱蜡与水化,随后以苏木精染液染色 5 ~ 10 min,盐酸乙醇分化后以流水返蓝,再以 HE 染液复染 1 ~ 3 min。最后经乙醇梯度脱水及二甲苯透明处理,中性树胶封固,于光学显微镜下观察组织结构。

12 TUNEL 染色检测脊髓细胞凋亡情况

石蜡切片后 60 ℃烘烤 60 min,通风橱中二甲苯Ⅰ/Ⅱ各脱蜡 10 min,梯度乙醇(100% ×2、95%、90%、80%、70%)各 5 min 水化,ddH_2O 冲洗 2 次 × 5 min。吸干液体,免疫组化笔圈画样本。用 PBS 稀释 ProteinaseK 至 40 $\mu g \cdot mL^{-1}$(100 $\mu L \cdot 样本^{-1}$),37 ℃通透 30 min。PBS 漂洗 3 次 ×5 min,吸干后置湿盒保湿。按比例混合 TdT 酶与反应缓冲液,每样本加 50 μL 反应液,37 ℃避光孵育,弃液后 PBS 洗涤 2 次 ×5 min,封片时滴加 50 μL 抗淬灭封片剂,盖片排泡。吸干多余液体,加 100 μL PBS 保湿,立即荧光镜检。

13 qRT-PCR 检测离子钙结合接头分子 1(ion calcium binding junction molecule 1,Iba-1)、c-JNK、p-c-JNK、CXCL1 mRNA 表达

取 75 mg 组织加入 Trizol 研磨,室温静置 5 min;加氯仿振荡后离心,取上清加异丙醇沉淀 RNA;经 75% 乙醇洗涤、干燥后,用 RNase-free 水溶解。使用 gDNAdigestermix 于 42 ℃处理 2 min 去除基因组 DNA(见表 1)。以 4xHifairⅡSuperMixplus 为试剂,在 25 ℃ 5 min,55 ℃ 15 min,85 ℃ 5 min 条件下反转录合成 cDNA(见表 2)。以所得 cDNA 为模板,采用 SYBRGreenMix 及特异性引物进行 qPCR 反应,程序为:95 ℃ 5 min、95 ℃ 10 s、60 ℃ 20 s、72 ℃ 20 s,40 个循环,最后采集溶解曲线(见表 3 和表 4)。所有反应设 3 个复孔。

表 1 RNA 去 DNA 反应体系

试剂	使用量
模板 RNA	10 pg ~ 5 μL
gDNAdigestermix	3 μL
RNase-FreeddH2O	15 μL

表 2 cDNA 合成反应体系

试剂	使用量/μL
Reactionsolutionfromstep1	15
4xHifair Ⅱ SuperMixplus	5

表 3 引物序列

引物名称	引物序列
Iba-1-F	TGAGCCAGAGCAAGGATTTG
Iba-1-R	GGGATCATCGAGGAAGTGCT
JNK-F	CAAGGACTGCAGGAACGAGT
JNK-R	TAGCCCATGCCGAGAATGAC
CXCL1-F	CCACACTCAAGAATGGTCGC
CXCL1-R	ACTTGGGGACACCCTTTAGC
β-actin-F	TGAACCCTAAGGCCAACCGTG
β-actin-R	CACAGCCTGGATGGCTACG

表 4 PCR 反应体系(20 μL)

试剂	使用量/μL
HieffTMqPCRSYBRGreenMix	10
模板 DNA	2
ForwardPrimer(10 μmol·L^{-1})	0.4
ReversePrimer(10 μmol·L^{-1})	0.4
RNaseFreedH20upto	20

14 WesternBlot 检测脊髓背角组织 Iba-1、c-JNK、p-c-JNK、CXCL1 蛋白表达

组织经液氮研磨后,按 20 mg:150 ~ 250 μL 比例加入含苯甲基磺酰氟(phenylmethylsulfonyl fluoride,PMSF)(100∶1)的 RIPA 裂解液,冰裂解 30 min,离心取上清得蛋白原液;二喹啉甲酸(bicinchoninic acid,BCA)法测定浓度,稀释后加 5 × 上样缓冲液(4∶1),98 ℃变性 5 min;制备 12.5% SDS-PAGE 胶,上样 5 ~ 15 μL·孔$^{-1}$,80 V→120 V 电泳至条带分离;PVDF 膜甲醇活化后 100 V 转膜 75 min;10 mL 封闭液室温封闭 1.5 h,5% 脱脂牛奶—抗 4 ℃过夜,TBST 洗 3 次;HRP 二抗(1∶5 000)室温孵育 1 h,TBST 洗后增强化学发光(enhanced chemiluminescence,ECL)显影。

15 统计学分析

本研究所有统计分析均通过 SPSS 25.0 完成,统计图表由 GraphPad Prism 8.0 绘制。计量数据以均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,本实验组间符合方差齐性及正态分布的均数比较采用单因素方差分析的统计学方法处理,不符合方差齐性及正态分布的均数比较采用非参数检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结　果

1 大鼠一般情况

假手术组大鼠行为活动及摄食均正常,被毛整洁有光泽;模型组大鼠则表现为精神萎靡、活动减少、进食量下降、被毛杂乱失去光泽、行动迟缓、步态异常,并伴有体质量下降;而不同剂量(低、中、高)的杜仲腰痛丸干预组大鼠,随着给药进行,其被毛状态、食欲、活动量均逐步改善,体质量也较前显著回升。

2 对 LDH 大鼠机械性撤足阈值的影响

如表 5 所示,术前各组大鼠的 PMWT 未见统计学差异,表明各组大鼠初始状态基本一致。造模完成后 1 周及 2 周时,与正常组相比,模型组与模型治疗组的 PMWT 均显著下降($P < 0.05$)。在整个观察期内,模型组 PMWT 虽呈逐渐回升趋势,说明模型动物存在一定的自发恢复现象,但在术后 21 d 趋于稳定,提示疼痛状态持续存在。相比之下,模型治疗组在杜仲腰痛丸干预下 PMWT 回升更为迅速,与模型组及自身前期相比均存在显著差异($P < 0.05$)。结果表明,杜仲腰痛丸对 LDH 模型大鼠具有明确的镇痛作用,且在一定给药剂量范围内,其疗效随用药时间延长而逐渐增强。

表 5 各组大鼠 PMWT 比较　　$\bar{x} \pm s, n = 15$

时间点	假手术组	模型组	低剂量组	中剂量组	高剂量组
手术前	38.45 ± 0.30	38.44 ± 0.29	38.45 ± 0.27	38.54 ± 0.29	38.45 ± 0.23
手术后	38.29 ± 0.20	12.06 ± 0.64[a]	11.55 ± 0.53	11.51 ± 0.55	11.80 ± 0.38
给药 7 d	38.45 ± 0.22	13.83 ± 0.51[b]	23.46 ± 0.73[c]	27.06 ± 0.62[c]	29.10 ± 0.68[c]
给药 14 d	38.49 ± 0.23	14.63 ± 0.29[b]	26.08 ± 0.64[c]	28.73 ± 0.36[c]	30.43 ± 0.54[c]
给药 21 d	38.37 ± 0.21	16.66 ± 0.30[b]	28.71 ± 0.35[c]	30.62 ± 0.40[c]	33.61 ± 0.39[c]

与手术后假手术组比较,a:$P < 0.01$;与本组给药 7 d、14 d、21 d 假手术组比较,b:$P < 0.01$;与本组给药 7 d、14 d、21 d 模型组比较,c:$P < 0.01$

3 对 LDH 大鼠热撤足反应期阈值的影响

如表 6 所示,术前各组大鼠的 PWTL 均维持在约 18 s,且组间差异无统计学意义。给药当天,模型组与模型治疗组的 PWTL 均出现一定程度升高,但增幅较小。在给予杜仲腰痛丸治疗后,模型治疗组在各时间点(给药 7、14、21 d)的 PWTL 均显著长于模型组及自身给药前水平($P<0.05$)。随着治疗时间的延长,该组 PWTL 逐渐恢复,数值趋近于正常组。上述结果说明,杜仲腰痛丸能有效改善 LDH 模型大鼠的机械痛敏,在设定剂量范围内,其疗效呈时间依赖性的增强趋势。

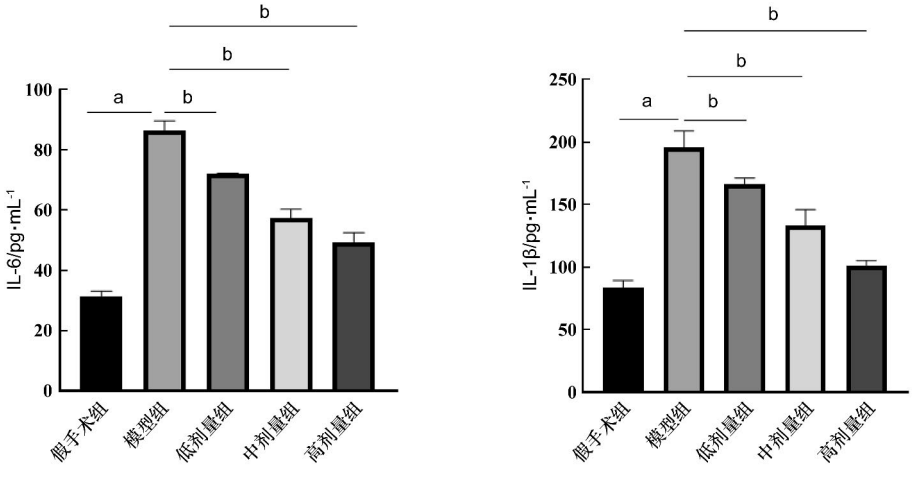
表 6 各组大鼠 PWTL 比较 $\bar{x}\pm s, n=15$

时间点	假手术组	模型组	低剂量组	中剂量组	高剂量组
手术前	18.22 ± 0.37	18.42 ± 0.27	18.43 ± 0.31	18.43 ± 0.30	18.36 ± 0.26
手术后	18.34 ± 0.40	4.70 ± 0.31[a]	5.36 ± 0.28	5.43 ± 0.30	5.45 ± 0.24
给药 7 d	18.37 ± 0.43	6.25 ± 0.44[b]	10.29 ± 0.42[c]	11.47 ± 0.38[c]	13.11 ± 0.38[c]
给药 14 d	18.26 ± 0.37	8.50 ± 0.30[b]	11.93 ± 0.33[c]	12.96 ± 0.48[c]	14.85 ± 0.35[c]
给药 21 d	18.27 ± 0.36	8.72 ± 0.35[b]	12.57 ± 0.28[c]	13.75 ± 0.17[c]	16.69 ± 0.31[c]

与手术后假手术组比较,a:$P<0.01$;与本组给药 7 d、14 d、21 d 假手术组比较,b:$P<0.01$;与本组给药 7 d、14 d、21 d 模型组比较,c:$P<0.01$

4 大鼠脊髓背角组织病理学变化

如图 5 所示,与假手术组相比,模型大鼠脊髓背角组织中 IL-6 和 IL-1β 的含量显著上升($P<0.01$),表明炎症反应明显增强;而经杜仲腰痛丸低、中、高剂量干预后,上述炎性因子的表达均较模型组显著下降($P<0.01$)。结果表明,杜仲腰痛丸可有效降低 LDH 模型大鼠脊髓中 IL-6 与 IL-1β 的表达,进而发挥抗炎作用。

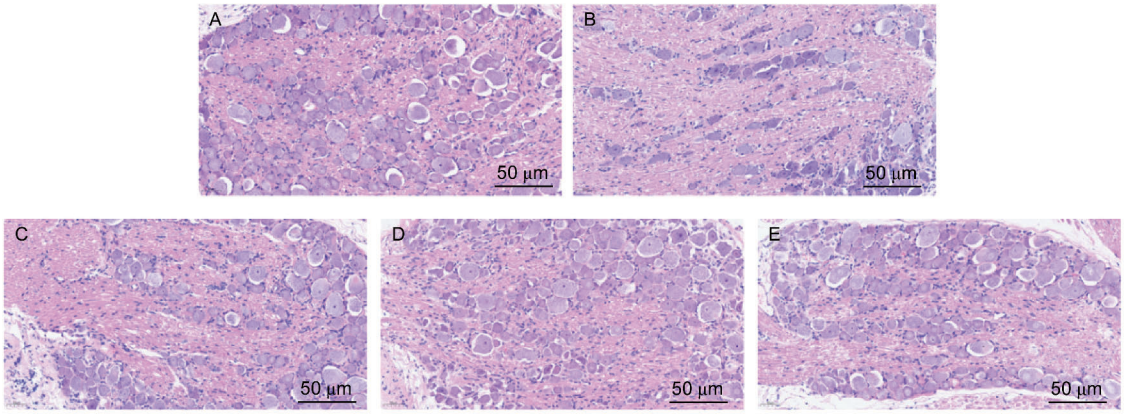


与假手术组相比,a:$P<0.000\ 1$;与模型组相比,b:$P<0.000\ 1$

图 5 各组大鼠脊髓背角组织中 IL-6 和 IL-1β 水平

5 大鼠背根神经节组织病理学形态观察

如图 6 所示,HE 染色结果显示,假手术组大鼠背根神经节神经元结构正常,细胞核居中,核仁清晰,胞质内尼氏小体分布均匀,神经纤维排列规则,无肿胀或炎性浸润。相比之下,模型组神经元损伤显著,表现为细胞核不规则、核仁模糊、尼氏小体排列紊乱,并伴有细胞肿胀、胞浆空泡样变及神经根水肿,神经纤维排列紊乱,可见核膜破裂和胞浆坏死。而杜仲腰痛丸各低、中、高剂量治疗组均能不同程度地改善这些病理变化,表现为细胞核形态较规则、核仁较清晰、尼氏小体分布趋于均匀,且神经根水肿减轻、排列紊乱程度下降,其中杜仲腰痛丸高剂量组的神经保护作用最为显著,接近假手术组的正常组织结构。这些结果表明,杜仲腰痛丸能够有效减轻背根神经节的病理损伤,并呈剂量依赖性改善神经元和神经纤维的形态学异常。



A:假手术组;B:模型组;C:杜仲腰痛丸低剂量组;D:杜仲腰痛丸中剂量组;E:杜仲腰痛丸高剂量组

图 6 各组大鼠背根神经节组织病理学变化(HE 染色,×200)

6 大鼠脊髓细胞凋亡情况

如图 7 和图 8 所示,与假手术组相比,模型组大鼠脊髓背角组织细胞凋亡指数明显增加($P < 0.05$)。与模型组相比,杜仲腰痛丸低、中、高剂量组大鼠脊髓背角组织细胞凋亡指数明显降低($P < 0.05$),其中以杜仲腰痛丸高剂量组降低最为明显。

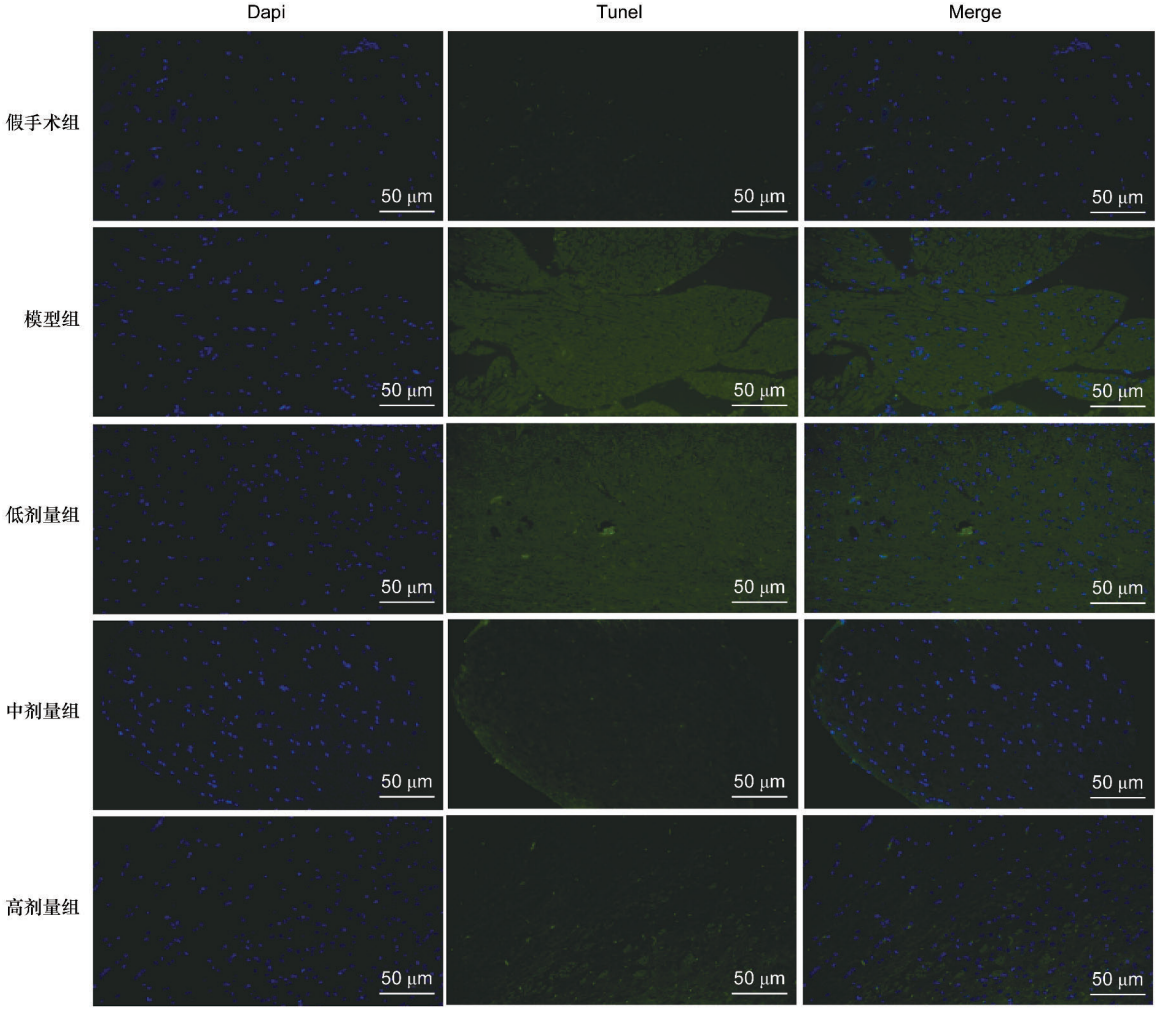
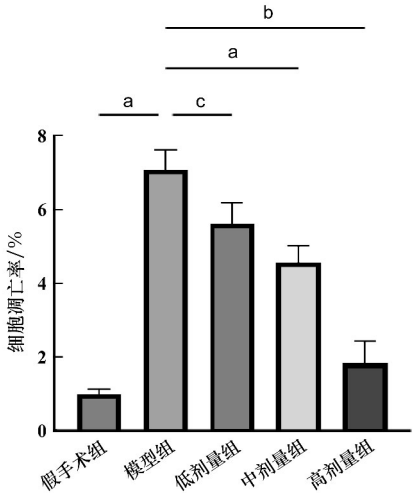


图 7 各组大鼠脊髓背角组织细胞凋亡情况(Tunel 染色,×200)



与假手术组相比，a：$P<0.05$；与模型组相比，a：$P<0.05$，b：$P<0.000\ 1$，c：无统计学差异

图 8 各组大鼠脊髓背角组织细胞凋亡指数

7 实时免疫荧光定量 PCR 检测结果

如表 7 所示，与假手术组相比，模型组 Iba-1、JNK、CXCL1 mRNA 相对表达水平均明显升高（$P<0.01$）；与模型组相比，杜仲腰痛丸低、中、高剂量组 Iba-1、JNK、CXCL1 的 mRNA 相对表达水平均降低（$P<0.05$，$P<0.01$）。由此可见，杜仲腰痛丸可以下调 Iba-1、JNK 和 CXCL1 的表达，从而调控 c-JNK/CXCL1 通路，发挥镇痛消炎作用。

表 7 各组大鼠 Iba-1、JNK、CXCL1 的 mRNA 表达水平

组别	Iba-1	JNK	CXCL1
假手术组	1.00 ± 0.10	1.00 ± 0.07	1.00 ± 0.05
模型组	2.05 ± 0.14[a]	2.26 ± 0.04[a]	1.98 ± 0.09[a]
低剂量组	1.82 ± 0.03[a]	1.62 ± 0.04[ab]	1.53 ± 0.03[ab]
中剂量组	1.57 ± 0.05[ab]	1.45 ± 0.06[ab]	1.39 ± 0.02[ab]
高剂量组	1.15 ± 0.08[b]	1.17 ± 0.05[ab]	1.12 ± 0.02[b]

a：与假手术相比，$P<0.05$；b：与模型组相比，$P<0.05$

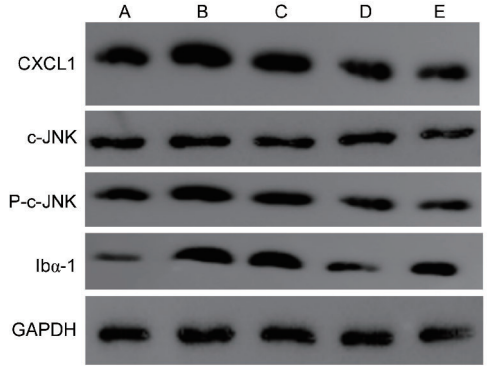
8 大鼠脊髓背角组织 Iba-1、c-JNK、p-cJNK、CXCL1 蛋白相对表达水平

如表 8 及图 9 所示，与假手术组相比，模型组大鼠脊髓组织中 Iba-1、p-c-JNK 及 CXCL1 的蛋白表达量均显著上升（$P<0.01$）；而与模型组相比，杜仲腰痛丸低、中、高剂量组上述蛋白的表达均出现不同程度下降（$P<0.05$）。各组间 c-JNK 总蛋白的表达水平未见统计学差异（$P>0.05$）。以上结果表明，杜仲腰痛丸可能通过抑制 Iba-1、p-c-JNK 和 CXCL1 蛋白的表达，调控 c-JNK/CXCL1 信号通路，进而产生镇痛消炎效应。

表 8 各组大鼠脊髓组织 Iba-1、c-JNK、P-c-JNK、CXCL1 蛋白相对表达水平

组别	Iba-1	c-JNK	P-c-JNK	CXCL1
假手术组	0.55 ± 0.23	1.00 ± 0.27	1.36 ± 0.63	0.71 ± 0.27
模型组	1.92 ± 0.12[a]	1.00 ± 0.21	2.72 ± 0.86[b]	1.90 ± 0.30[b]
低剂量组	1.33 ± 0.11[c]	1.00 ± 0.43	1.89 ± 0.94[d]	1.34 ± 0.24[d]
中剂量组	0.95 ± 0.11[d]	1.00 ± 0.36	1.55 ± 0.95[d]	0.86 ± 0.26[d]
高剂量组	0.80 ± 0.10[d]	1.00 ± 0.36	1.50 ± 0.94[d]	0.76 ± 0.24[d]

与假手术组比较，a：$P<0.01$，b：$P<0.05$；与模型组比较，c：$P<0.01$，d：$P<0.05$



A：假手术组；B：模型组；C：杜仲腰痛丸低剂量组；D：杜仲腰痛丸中剂量组；E：杜仲腰痛丸高剂量组

图 9 各组大鼠脊髓背角组织 Iba-1、c-JNK、p-c-JNK、CXCL1 蛋白表达条带

讨 论

LDH 中髓核的机械压迫和释放的炎症因子是引起下腰痛和神经根性疼痛的重要病理机制[20]。LDH 的炎性化学性刺激机制最早由 Lindahl 和 Rexed 在腰椎椎板切除术中发现[21]。近年来，关于 LDH 中炎症介质致痛机制的研究更加深入，并发现炎症刺激致痛机制与小胶质细胞的活化密切相关[22]，小胶质细胞作为中枢神经系统的核心免疫调节者，其介导中枢敏化导致痛觉信号通路的异常放大和持久化是 LDH 疼痛产生和维持的主要原因。小胶质细胞在受到损伤或炎症刺激时，可极化为促炎（M1）和抗炎（M2）2 种表型[23]，通过抑制小胶质

细胞的 M1 极化或促进 M2 极化,可有效缓解慢性疼痛[24]。负责炎症持续地分泌促炎细胞因子(如 TNF-α、IL-6、IL-1β、Iba-1 等)和趋化因子(如 CXCL1、CXCL9、CXCL10 等),负责募集免疫细胞可以作为 M1 小胶质细胞标志物[25-26]。JNK 是丝裂原活化蛋白激酶的成员,MAPK 信号通路是脂多糖(lipopolysaccharide,LPS)刺激小胶质细胞中促炎细胞因子的主要调节因子[27]。Wu 等研究发现,神经营养素可以降低 LDH 大鼠炎症因子 IL-1β、IL-6 的浓度,抑制痛觉过敏,本研究与以上研究结果一致,杜仲腰痛丸低、中、高剂量组 IL-6、IL-1β 水平降低,痛反应阈值降低,背根神经节组织病理学变化明显改善。徐昕等[28]发现,鞘内注射氯胺酮可降低大鼠脊髓角背组织中 Iba-1、CXCL1 蛋白表达量。牛辉等[29]研究发现,用椎间盘丸对 LDH 模型大鼠灌胃后可降低 Iba-1、p-c-JNK、CXCL1 蛋白相对表达水平,本研究结果与以上结果相符,杜仲腰痛丸高、中、低剂量组 Iba-1、p-c-JNK 和 CXCL1 蛋白相对表达水平明显低于模型组,提示杜仲腰痛丸可以通过调控 c-JNK/CXCL1 通路发挥镇痛作用。

综上所述,杜仲腰痛丸能够抑制 LDH 大鼠脊髓背角组织炎症反应,作用机制可能与抑制 c-JNK/CXCL1 信号通路有关。本研究为杜仲腰痛丸在 LDH 模型中的保护作用和临床治疗潜力提供依据,但杜仲腰痛丸抑制 LDH 炎症的其他信号通路以及小胶质细胞与 c-JNK/CXCL1 信号通路之间的关系尚需进一步探究。

[参 考 文 献]

[1] LIU YM, FENG Y, LIU YQ, *et al*. Chinese association for the study of pain: expert consensus on chronic postsurgical pain[J]. *World J Clin Cases*, 2021, 9(9): 2090-2099.

[2] 崔学军, 梁倩倩. 腰椎间盘突出症中西医结合诊疗专家共识[J]. 世界中医药, 2023, 18(7): 945-952.

[3] SHENOY K, STEKAS N, DONNALLY CJ 3rd, *et al*. Retrolisthesis and lumbar disc herniation: a postoperative assessment of outcomes at 8-year follow-up[J]. *Spine J*, 2019, 19(6): 995-1000.

[4] 张晓琳, 赵丽娜, 孔令磊. 姜黄素调节 CXCL12/CXCR4 信号通路对腰椎间盘突出症大鼠脊髓背角组织炎症及小胶质细胞活化的影响[J]. 免疫学杂志, 2025, 41(5): 312-317.

[5] TAŞKAYA B, TAŞKENT İ, ÇAK? LL? M, *et al*. The effect of manual therapy on psychological factors and quality of life in lumbar disc herniation patients: a single blinded randomized clinical trial[J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2024, 21(9): 1234.

[6] CIEZA A, CAUSEY K, KAMENOV K, *et al*. Global estimates of the need for rehabilitation based on the global burden of disease study 2019: a systematic analysis for the global burden of disease study 2019[J]. *Lancet*, 2021, 396(10267): 2006-2017.

[7] ZHU LG, YU CS, ZHANG XF, *et al*. The treatment of intervertebral disc degeneration using Traditional Chinese Medicine[J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 263: 113117.

[8] KIM CH, CHOI Y, CHUNG CK, *et al*. Nonsurgical treatment outcomes for surgical candidates with lumbar disc herniation: a comprehensive cohort study[J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 3931.

[9] KÖGL N, PETR O, LÖSCHER W, *et al*. Lumbar disc herniation: the significance of symptom duration for the indication for surgery[J]. *Dtsch Arztebl Int*, 2024, 121(13): 440-448.

[10] HEIDER FC, SIEPE CJ. [Lumbar disc herniation][J]. *Orthopadie(Heidelberg, Germany)*, 2025, 54(1): 3-17.

[11] 秦晓宽, 孙凯, 徐卫国, 等. 腰椎间盘突出症中医循证实践指南[J]. 西部中医药, 2024, 37(5): 1-15.

[12] 葛龙, 李镜, 尚文茹, 等. 非手术疗法治疗腰椎间盘突出症的循证实践指南[J]. 中国循证医学杂志, 2024, 24(2): 125-148.

[13] 薛旭, 赵继荣, 李婧婧, 等. 杜仲腰痛丸干预腰椎间盘突出症临床疗效与药理作用的研究进展[J]. 中成药, 2025, 47(7): 2272-2278.

[14] 陈祁青, 马东, 赵继荣, 等. 基于网络药理学及动物实验的杜仲腰痛丸治疗腰椎间盘突出症慢性下肢痛的作用研究[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2023, 25(5): 1702-1713.

[15] 尹浩, 吉美奇, 胡志祥, 等. 三种腰椎间盘突出症大鼠模型制备方法的比较与评价[J]. 中国组织工程研究, 2025, 29(14): 2930-2936.

[16] TANG Q, HUANG YL, ZHU LR, *et al*. The effect of melatonin on radicular pain in a rat model of lumbar disc herniation[J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2022, 47(10): 754-763.

[17] HUANG ZY, TAN HB, FU YF, *et al*. Neurotransmitter imbalance and amygdala synaptic plasticity in lumbar disc herniation-induced chronic pain and related emotional Disturbances: a multi-omics analysis[J]. *Neuropharmacology*, 2025, 271: 110405.

[18] MA LL, DENG DL, ZHANG TH, *et al*. STING-IFN-I pathway relieves incision induced acute postoperative pain via inhibiting the neuroinflammation in dorsal root ganglion of rats[J]. *Inflamm Res*, 2023, 72(8): 1551-1565.

[19] CHANG L, YE F, LUO QH, *et al*. Increased hyperalgesia and proinflammatory cytokines in the spinal cord and dorsal root ganglion after surgery and/or fentanyl administration in rats[J]. *Anesth Analg*, 2018, 126(1): 289-297.

[20] HORNUNG AL, BAKER JD, MALLOW GM, *et al*. Resorption of lumbar disk herniation: mechanisms, clinical predictors, and future directions[J]. *JBJS Rev*, 2023, 11(1): e22.

[21] LINDAHL O, REXED B. Histologic changes in spinal nerve roots of operated cases of sciatica[J]. *Acta Orthop Scand*, 1951, 20(3): 215-225.

[22] LU X, CHEN LH, JIANG C, *et al*. Microglia and macrophages contribute to the development and maintenance of sciatica in lumbar disc herniation[J]. *Pain*, 2023, 164(2): 362-374.

[23] ŚLUSARCZYK J, TROJAN E, GŁOMBIK K, *et al*. Targeting the NLRP3 inflammasome-related pathways via tianeptine treatment-suppressed microglia polarization to the M1 phenotype in lipopolysaccharide-stimulated cultures[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(7): 1965.

[24] RIFAT A, OSSOLA B, BÜRLI RW, *et al*. Differential contribution of THIK-1 K^+ channels and P2X7 receptors to ATP-mediated neuroinflammation by human microglia[J]. *J Neuroinflammation*, 2024, 21(1): 58.

[25] ATTA AA, IBRAHIM WW, MOHAMED AF, *et al*. Microglia polarization in nociplastic pain: mechanisms and perspectives[J]. *Inflammopharmacology*, 2023, 31(3): 1053-1067.

[26] GAO L, ZHANG AP, FU L, *et al*. Huangqin decoction attenuates spared nerve injury (SNI)-induced neuropathic pain by modulating microglial M1/M2 polarization partially mediated by intestinal nicotinamide metabolism[J]. *Phytomedicine*, 2024, 129: 155594.

[27] CHEN HL, YANG L, ZHANG XLN, *et al*. Scutellarin acts via MAPKs pathway to promote M2 polarization of microglial cells[J]. *Mol Neurobiol*, 2023, 60(8): 4304-4323.

[28] 徐昕, 唐丽玮, 金丹, 等. 氯胺酮对腰椎间盘突出根性痛大鼠脊髓炎症因子的影响及机制[J]. 中国临床药理学杂志, 2019, 35(18): 2119-2121.

[29] 牛辉, 鲍朝辉, 张文明, 等. 基于 c-JNK/CXCL1 信号通路研究椎间盘丸对腰椎间盘突出症大鼠脊髓炎症的抑制作用[J]. 中药新药与临床药理, 2021, 32(5): 655-660.

编辑:毕晓帆/接受日期:2025-10-30