

·实验研究·

独活寄生汤水提物对退变大鼠椎间盘软骨细胞功能的影响

刘伯龄¹, 陈齐勇¹, 刘少强¹, 叶小伟¹, 梁珪清¹, 叶锦霞², 李西海²

(1. 厦门大学附属福州第二医院, 福建 福州 350007; 2. 福建中医药大学中西医结合研究院, 福建 福州 350122)

摘要: 目的 探究独活寄生汤水提物对经 IL-1 β 诱导退变的大鼠椎间盘软骨细胞中 Wnt4、GSK-3 β 、 β -catenin、DKK-1 的影响。方法 采用机械-酶消化法分离大鼠椎间盘软骨组织, 进行软骨细胞体外培养、镜下观察与鉴定, 分为正常组、模型组(经 10 ng/mL 浓度 IL-1 β 造模)、实验 1 组(独活寄生汤水提物组 200 μ g/mL 干预 24 h)、实验 2 组(独活寄生汤水提物组 200 μ g/mL 干预 48 h)。观察 4 组大鼠椎间盘软骨细胞中 Wnt4、GSK-3 β 、 β -catenin、DKK-1 mRNA 与蛋白的表达及上清液中 Sox 9 表达。结果 ① 第 2 代大鼠椎间盘软骨细胞增殖速度快, 呈现多边形, 胞核清晰, 且含有 1~2 个核仁, 融合后出现“铺路石”状, 经 Ⅱ型胶原法染色后, 阳性对照细胞浆区域浸染为棕黄色; ② 与正常组比较, 模型组中软骨细胞 Wnt 4、GSK-3 β 、 β -catenin mRNA 与蛋白表达及上清液 Sox 9 含量明显提高($P < 0.05$), DKK-1 mRNA 与蛋白表达明显降低($P < 0.05$); 与模型组比较, 实验 1 组、实验 2 组中软骨细胞 Wnt 4、GSK-3 β 、 β -catenin mRNA 与蛋白表达及上清液 Sox 9 含量明显降低($P < 0.05$), DKK-1 mRNA 与蛋白表达明显提高($P < 0.05$), 以实验 2 组变化最为显著($P < 0.05$)。结论 独活寄生汤水提物组可调控退变椎间盘软骨细胞的功能, 下调 Wnt 4、GSK-3 β 、 β -catenin 和上调 DKK-1 mRNA 与蛋白表达, 进而延缓大鼠椎间盘软骨细胞的退变。

关键词: 椎间盘软骨细胞; 独活寄生汤; 水提物; 软骨退变

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1000-338X(2018)01-0017-04

DOI: 10.13260/j.cnki.jfjtc.011551

椎间盘的退变是引起椎间盘退变性疾病的重要原因之一, 而软骨终板作为椎间盘的重要组成部分, 在椎间盘负荷重新分配和应力传导中发挥重要作用^[1-2]。现代医学提出椎间盘退变重要因素之一是纤维软骨板细胞数量减少, 软骨基质增多^[3]。祖国医学认为椎间盘退变性疾患属于中医学“腰痛”“腰腿痛”范畴。益气补肾是中医治疗腰痛的基本方略之一, 独活寄生汤具有祛风湿、止痹痛、益肝肾、补气血之功效^[4], 发挥“从本治痿, 从标治痹”作用。该方长期用于临床, 治疗椎间盘退变性疾病有较好疗效^[5-6]。前期实验研究表明其能延缓软骨退变^[7-8], 但其确切作用机制有待进一步研究。因此, 本研究拟从 Wnt/ β -catenin 信号通路探讨独活寄生汤水提物调控大鼠椎间盘退变软骨细胞功能的影响, 有目的地调控其功能, 对延缓软骨终板以及椎间盘退变有着重要的基础与应用价值。

1 实验材料

1.1 实验动物 SPF 级 SD 雄性大鼠 30 只, 体重为 (95 \pm 5) g, 由福建中医药大学实验动物中心提供, 许可号: SCXK2014-0001 (闽)。

1.2 实验药物 独活寄生汤药物组成: 独活 9 g, 桑寄生 6 g, 杜仲 6 g, 茯苓 6 g, 肉桂心 6 g, 细辛 6 g, 防风 6 g, 川芎 6 g, 牛膝 6 g, 当归 6 g, 人参 6 g, 秦艽 6 g, 白芍 6 g, 熟地黄 6 g, 甘草 6 g, 购自福建中医药大学附属第三人民医院。

1.3 实验试剂 磷酸盐缓冲液、低糖 DMEM 培养

基(美国 HyClone 公司); 逆转录试剂盒(北京全式金生物有限公司); TRIZOL(美国 Life 公司); 异丙醇、无水乙醇(中国医药集团总公司); 琼脂糖(西班牙 Biowest Agarose 公司); 核酸染料(Solarbio 生物有限公司); DNA Marker (北京全式金生物有限公司); Wnt 4、GSK-3 β 、 β -catenin、GAPDH 引物(上海生工生物工程股份有限公司); 一抗(兔抗): Wnt 4、GSK-3 β 、 β -catenin、DDK-1(美国 Abcan 公司); β -actin、二抗(羊抗兔)(美国 CST 公司); 1-Step Transfer Buffer(美国 Thermo 公司); ECL 高效显影液(美国 Thermo 公司)。

1.4 实验仪器 DNA 扩增仪(9600 型, 美国 PE 公司); 低温高速离心机(64R 型, 美国 BECKMAN 公司); 超纯水装置(MILLI-Q 型, 美国 MILIPORE 公司); 荧光倒置相差显微镜(Olympus, 日本 TKO 公司); 无菌操作台(AIRTECH 型, 苏州安泰); 超净工作台(SW-CJ-1F 型, 苏州安泰); 凝胶成像系统(GELDOC2000 型, 美国 BIO-RAD 公司); 全自动酶标仪(BIO-TEK ELX800 型, 美国 BIO-Tek 公司); CO₂ 恒温培养箱(BB16/BB5060 型, 德国 Heraus 公司)。

2 实验方法

2.1 独活寄生汤水提物提取 独活寄生汤水回流提取 2 次, 每次 2 h, 合并提取液, 抽滤, 浓缩成浸膏, 60 $^{\circ}$ C 水浴蒸干至恒重; 在低温下研磨成粉末状, 精确称量浸膏 50 mg, 加入 5% FBS 培养基 5 mL 溶解, 超声 10 min, 再经 0.22 μ m 无菌滤嘴滤过后配成 10 mg/mL 独活寄生汤水提物母液, 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。

2.2 软骨细胞的分离、培养与鉴定 麻醉下脱颈椎处死 SD 大鼠, 分离颈、腰椎椎间盘软骨终板, 收

收稿日期: 2017-11-25

基金项目: 福建省自然科学基金项目(2017J01224); 福建中医药大学校级课题资助(X2015034)

作者简介: 刘伯龄(1976—), 男, 副主任医师, 主要从事中西医结合骨关节炎研究。

集后经剪碎至 1 mm³/单位体积, PBS 缓冲液冲洗至少 3 次后移至无菌小培养皿中, 按 2.5 mL/皿的体积加入 0.2% 型胶原酶进行消化, 15 mL 离心管收集消化后的上清液(2 h/次), 1500 r/min 离心后弃上清液, 使用移液器吸取含 10% 胎牛血清的 DMEM, 缓慢吹匀沉淀, 经计数板计数(2×10^5 /mL)后接种原代软骨细胞于培养瓶进行培养, 经 48 h 后初次换液, 镜下观察细胞汇合度达 80% 时, 经胰酶消化进行细胞传代, 本实验使用第 2 代软骨细胞。

采用 型胶原免疫组织化学染色法进行鉴定, 软骨细胞(经计数 2 500 个/mL)爬片后, 经 PBS 冲洗 3 次, 4% 多聚甲醛进行固定 30 min, 再经冲洗、裂解(0.1% 破膜剂 50 μ L) 20 min, 冲洗后加入 50 μ L 3% H₂O₂ 反应 20 min, 再次冲洗后经 5% BSA 封闭 30 min, 阳性组加入含 型胶原 1:200 的一抗反应过夜, 阴性组加入 PBS 作为对照, 后经 PBS 冲洗 3 遍后加入 50 μ L 体积二抗(1:200)反应 30 min, 再次冲洗后以每张玻片 50 μ L DAB 体积进行浸润 10 min, 再依次经过漂洗、苏木素复染、冲洗(PBS)、返蓝 2 s、常温晾干、梯度酒精、二甲苯进行脱水与透明后封片与观察^[6]。

2.3 实验分组 本实验使用第 2 代软骨细胞, 经鉴定后共分 4 组: 正常组、模型组(经 10 ng/mL 浓度 IL-1 β 造模), 实验组经 10 ng/mL 浓度 IL-1 β 造模后根据干预方式不同, 又分为实验 1 组(独活寄生汤水提物组 200 μ g/mL 干预 24 h)、实验 2 组(独活寄生汤水提物组 200 μ g/mL 干预 48 h)。

2.4 软骨细胞 Wnt 4、GSK-3 β 、 β -catenin、DDK-1 mRNA 表达 使用 Trizol 试剂进行 Total RNA 提取, 并使用核酸蛋白检测仪进行浓度检测; 逆转录后进行 PCR, 反应体系: Mix 10 μ L、上游引物 1 μ L、下游引物 1 μ L、DEPC 水 7 μ L、cDNA 1 μ L。PCR 反应条件为 94 $^{\circ}$ C, 4 min; 94 $^{\circ}$ C, 30 s; 58 $^{\circ}$ C, 30 s; 72 $^{\circ}$ C, 45 s; 共循环 35 次, 后置于 72 $^{\circ}$ C 10 min, 并于 4 $^{\circ}$ C 保存; 制备 1.5% 琼脂糖凝胶, 上样后, 在 100 V、70 mA、15 min 条件下电泳, 使用 BIO-RAD Fluor-S TM MultiImager 图象分析仪下扫描, 经分析后拍照存档。Wnt 4: 上游 5'-GGTCAGCCCACAGGGTTTCCA-3', 下游 5'-ACCGCTCGCCAGCATGTCTTT-3'; GSK-3 β : 上游 5'-TAGTCCGATTGCGGTATTT-3', 下游 5'-CTCCCTTGTGGTGTTCCT-3'; β -catenin: 上游 5'-TCCGCATGGAGGAGATAGTTG-3', 下游 5'-GCTGGAGAACCCATGAGGT-3'; DKK-1: 上游 5'-GCCTCCGATCATCAGACGGT-3', 下游 5'-GCAGGTGTGGAGCCTAGAAG-3'; GAPDH: 上游 5'-ACGGCAAGTTCAACGGCACAG-3', 下游 5'-GAAGACGCCAGTAGACTCCACGAC-3'。

2.5 软骨细胞 Wnt 4、GSK-3 β 、 β -catenin、DDK-1 蛋白表达 采用 Western Blot 法检测, 提取各组软骨细胞总蛋白, 并进行 BCA 蛋白定量。将蛋白变性后进行电泳、转膜, 取封闭后的膜依次放入预先

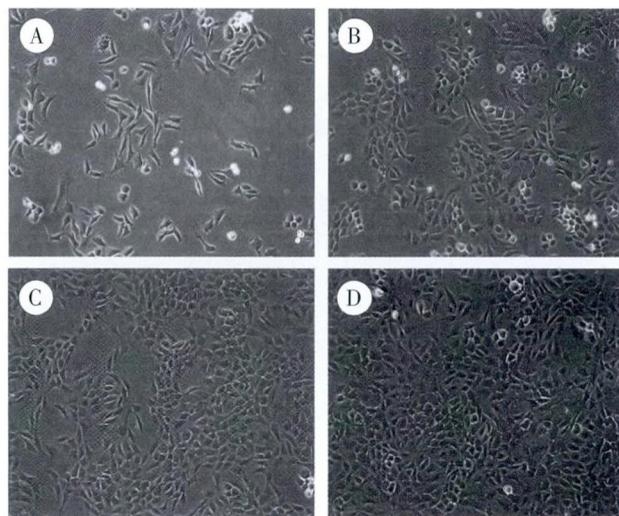
配置好的 β -actin(1:1000)、Wnt 4(1 μ g/mL)、GSK-3 β (1:5000)、 β -catenin(1:4000)、DDK-1(1:5000)一抗中 4 $^{\circ}$ C 冰箱摇床震荡过夜, 漂洗后置于二抗(1:5000)封闭袋中室温反应 1 h, 再次漂洗, 最后配制 ECL 发光液进行显影, 在凝胶成像仪下曝光成像并分析储存。

2.6 软骨细胞 Sox9 表达 在微孔中将各个浓度标准品按 50 μ L/每孔依次加入; 将处理后的待测样品按每孔各 25 μ L 依次加入, 并在样品孔中依次加入 25 生物素标记抗体, 在标准溶液孔及待测样品孔中分别加入 100 辣根过氧化物酶标记抗体, 充分混匀, 将包被微孔板覆膜平稳放置在 37 $^{\circ}$ C 温箱中孵育反应 60 min 后, 充分弃尽孔内液体并扣干孔内剩余残液, 用预先稀释好的清洗液反复冲洗 5 次后, 每孔依照次序加入 50 μ L TMB, 再加入 TMB 50 μ L 进行充分混匀, 终止反应, 并使用酶标仪在 450 nm 下读取各孔吸光度值。

2.7 统计学方法 采用 SPSS 19.0 统计软件进行数据分析。计量资料符合正态分布以($\bar{x} \pm s$)表示, 采用 *t* 检验; 计数资料采用 χ^2 检验。

3 实验结果

3.1 软骨细胞观察与鉴定 第 2 代大鼠椎间盘软骨细胞增殖速度快, 呈现多边形, 胞核清晰, 且含有 1~2 个核仁, 融合后出现“铺路石”状(图 1D); 鉴定如图 2 示, 经 型胶原法染色后, 阳性对照组胞浆区为棕黄色(图 2A), 阴性对照组胞浆区颜色透明(图 2B)。



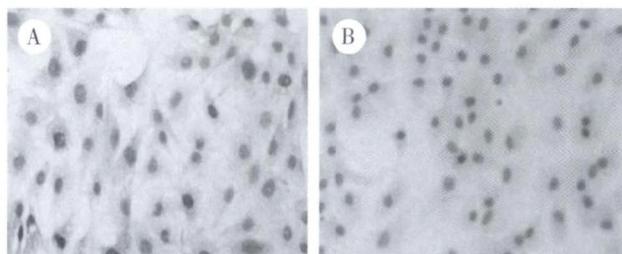
注: A 大鼠椎间盘软骨细胞原代第 2 天; B 大鼠椎间盘软骨细胞原代第 4 天; C 大鼠椎间盘软骨细胞第 1 代; D 大鼠椎间盘软骨细胞第 2 代。

图 1 大鼠椎间盘软骨细胞形态图($\times 200$)

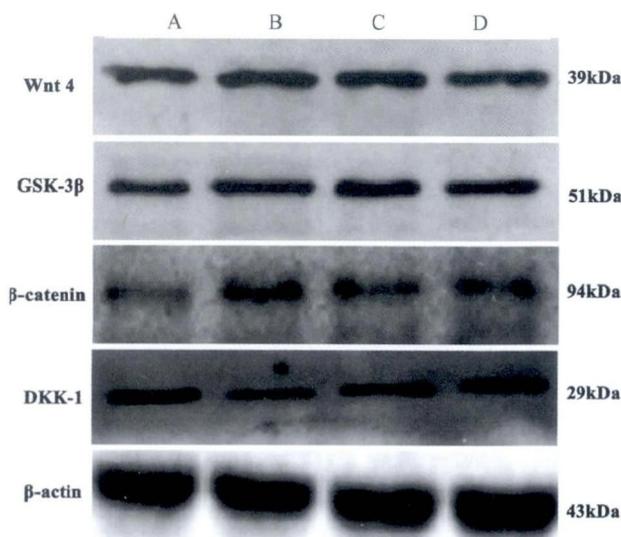
3.2 4 组软骨细胞 Wnt 4、GSK-3 β 、 β -catenin、DDK-1 mRNA 表达比较 见图 3、表 1。

3.3 4 组软骨细胞 Wnt 4、GSK-3 β 、 β -catenin、DDK-1 蛋白表达比较 见图 4、表 2。

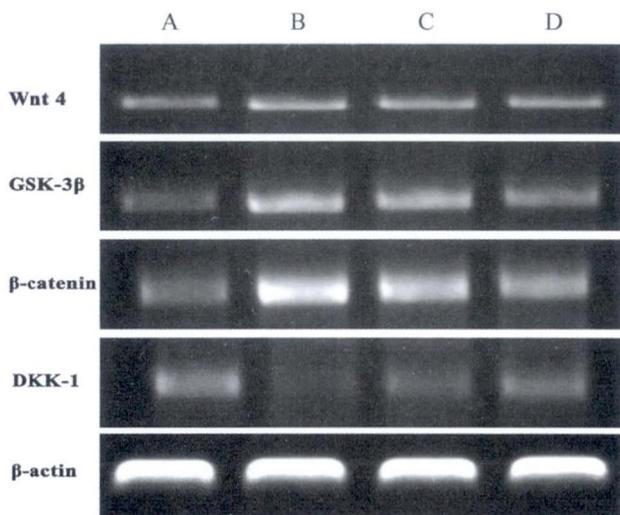
3.4 4 组软骨细胞 Sox 9 含量比较 见表 3。



注:A 阳性对照组;B 阴性对照组。
图 2 大鼠椎间盘软骨细胞免疫组化图(×200)



注:A 正常组;B 模型组;C 实验 1 组;D 实验 2 组。
图 4 4 组软骨细胞 Wnt 4、GSK-3β、β-catenin、DKK-1 蛋白电泳图



注:A 正常组;B 模型组;C 实验 1 组;D 实验 2 组。
图 3 4 组软骨细胞 Wnt 4、GSK-3β、β-catenin、DKK-1 电泳图

4 讨论

Wnt 通路是一个在生物进化过程中高度保守的信号转导通路网络,在细胞生存、增殖、分化、极化、凋亡等过程中起着至关重要的调控作用。Wnt/β-catenin 信号通路作为 Wnt 信号通路的经典通路之一,其动态激活与椎间盘形态形成、生长和退变过程密切相关^[9]。研究还发现 Wnt/β-catenin 信号参与软骨损伤后修复也具有反向调控关系,抑制该

表 1 4 组软骨细胞 Wnt 4、GSK-3β、β-catenin、DKK-1 mRNA 表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	Wnt 4/β-actin	GSK-3β/β-actin	β-catenin/β-actin	DKK-1/β-actin
正常组	0.378 ± 0.071	0.287 ± 0.033	0.326 ± 0.025	0.408 ± 0.043
模型组	0.540 ± 0.028 ¹⁾	0.561 ± 0.015 ¹⁾	0.618 ± 0.035 ¹⁾	0.261 ± 0.047 ¹⁾
实验 1 组	0.444 ± 0.028 ¹⁾²⁾	0.442 ± 0.021 ¹⁾²⁾	0.524 ± 0.024 ¹⁾²⁾	0.333 ± 0.004 ¹⁾²⁾
实验 2 组	0.438 ± 0.001 ¹⁾²⁾	0.394 ± 0.047 ¹⁾²⁾	0.431 ± 0.009 ¹⁾²⁾	0.398 ± 0.033 ¹⁾²⁾

注:与正常组比较,1) $P < 0.05$;与模型组比较,2) $P < 0.05$ 。

表 2 4 组软骨细胞 Wnt 4、GSK-3β、β-catenin、DKK-1 蛋白表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	Wnt 4/β-actin	GSK-3β/β-actin	β-catenin/β-actin	DKK-1/β-actin
正常组	0.329 ± 0.015	0.235 ± 0.023	0.228 ± 0.019	0.341 ± 0.017
模型组	0.536 ± 0.022 ¹⁾	0.386 ± 0.023 ¹⁾	0.349 ± 0.020 ¹⁾	0.234 ± 0.022 ¹⁾
实验 1 组	0.445 ± 0.027 ¹⁾²⁾	0.321 ± 0.001 ¹⁾²⁾	0.303 ± 0.027 ¹⁾²⁾	0.361 ± 0.030 ¹⁾²⁾
实验 2 组	0.385 ± 0.019 ¹⁾²⁾	0.264 ± 0.001 ¹⁾²⁾	0.242 ± 0.025 ¹⁾²⁾	0.404 ± 0.037 ¹⁾²⁾

注:与正常组比较,1) $P < 0.05$;与模型组比较,2) $P < 0.05$ 。

表 3 4 组软骨细胞 Sox 9 含量比较($\bar{x} \pm s$) ng/mL

组别	Sox 9
正常组	10.451 ± 0.558
模型组	44.057 ± 2.312 ¹⁾
实验 1 组	28.616 ± 1.915 ¹⁾²⁾
实验 2 组	20.107 ± 0.794 ¹⁾²⁾

注:与正常组比较,1) $P < 0.05$;与模型组比较,2) $P < 0.05$ 。

信号通路能够促进软骨的修复^[11-12]。鉴于 Wnt/β-

catenin 信号途径在软骨生成中的重要作用,其是否也在椎间盘软骨终板退变过程中发挥重要的调控作用,如促进软骨细胞钙化等是我们关注的焦点。因此,阐明椎间盘软骨细胞内 Wnt/β-catenin 信号通路的具体作用机理,有目的的调控软骨细胞的钙化,增加椎间盘营养供应,将是预防软骨终板乃至整个椎间盘退变的关键环节。

Dickkopf 族(DKK-1)可通过间接减少可利用的辅助受体 LRP 的数量来间接抑制 Wnt 与膜受体结

合而发挥作用,常被作为 Wnt/ β -catenin 信号通路的抑制剂,因此本实验采用 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度的 DKK-1 来影响 Wnt/ β -catenin 信号通路^[12-13]。研究表明 IL-1 β 抑制软骨终板细胞的细胞活性、蛋白聚糖和型胶原基因表达,并促进细胞外基质蛋白酶、炎症因子和 NO 产物产生,因此本实验使用 10 ng/mL 浓度 IL-1 β 来塑造椎间盘软骨细胞退变模型^[14-15]。

前期研究发现,独活寄生汤水提取物 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 可显著促进正常软骨细胞内 Cyclin D1,CDK4,CDK6 及 P21 mRNA 的表达^[16],故本实验在前期基础上,进一步探究独活寄生汤水提取物 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 分别作用于经 IL-1 β 诱导退变的椎间盘软骨细胞 24 h、48 h 后对大鼠椎间盘软骨细胞中 Wnt4、GSK-3 β 、 β -catenin、DKK-1 的影响,结果发现独活寄生汤水提取物可下调 Wnt 4、GSK-3 β 、 β -catenin,上调 DKK-1 mRNA 与蛋白含量表达,且以干预 48 h 后变化显著 ($P < 0.05$),同时降低大鼠椎间盘软骨细胞上清液中 Sox 9 水平 ($P < 0.05$)。

综上,独活寄生汤水提取物延缓大鼠椎间盘软骨细胞退变的机制为下调软骨细胞 Wnt 4、GSK-3 β 、 β -catenin,上调 DKK-1 mRNA 与蛋白含量表达,并可降低大鼠椎间盘软骨细胞上清液中 Sox 9 水平发挥作用,其发挥调控作用的内在机制,如是否通过相关长链非编码 RNA 进行靶点调控仍需深入研究。

参考文献:

- [1] 曹旺烽,陈长贤. 椎间盘软骨终板退变的研究进展[J]. 中国中医骨伤科杂志,2016,24(10):70-74.
- [2] 赵亮,闫广华,瞿东滨,等. 腰椎间盘退变对软骨终板生物力学特性影响的有限元分析[J]. 中国临床解剖学杂志,2015,33(4):455-460.
- [3] 吴国华,高山凤,狄勇,等. 六味地黄丸对兔退变椎间盘软骨终板细胞的保护作用[J]. 临床合理用药,2015,8(1A):63-64.

- [4] 刘发元,李西海,叶蕪芝,等. 独活寄生汤干预骨关节炎软骨细胞凋亡的机制[J]. 中华中医药杂志,2014,29(7):2165-2168.
- [5] 黄翊峰,罗大海,刘波,等. 独活寄生汤加减治疗腰椎间盘突出症 70 例疗效观察[J]. 湖南中医杂志,2014,30(3):69-71.
- [6] 黄臻,何敬,徐无忌,等. 独活寄生汤对肝肾亏虚型腰椎间盘突出症患者外周血中 Fas/APO-1 的影响[J]. 中医药导报,2014,20(10):32-34.
- [7] LIU F, WENG X, LIN P, et al. Duhuo Jisheng decoction inhibits endoplasmic reticulum stress in chondrocytes induced by tunicamycin through the downregulation of miR-34a [J]. Int J Mol Med, 2015, 36(5):1311-1318.
- [8] LIU F, LIU G, LIANG W, et al. Duhuo Jisheng decoction treatment inhibits the sodium nitroprussiate-induced apoptosis of chondrocytes through the mitochondrial-dependent signaling pathway [J]. Int J Mol Med, 2014, 34(6):1573-1580.
- [9] 梁广胜,殷明,刘玉亮,等. Wnt 信号通路在椎间盘的发展[J]. 中国矫形外科杂志,2014,22(5):441-444.
- [10] CHUNG R, WONG D, MACSAI C, et al. Roles of Wnt/ β -catenin signalling pathway in the bony repair of injured growth plate cartilage in young rats [J]. Bone, 2013, 52(2):651-658.
- [11] VORONKOV A, KRAUSS S. Wnt/ β -catenin signaling and small molecule inhibitors [J]. Curr Pharm Des, 2013, 19(4):634-664.
- [12] SASSI N, LAADHAR L, ALLOUCHE M, et al. Wnt signaling and chondrocytes: from cell fate determination to osteoarthritis pathophysiology [J]. J Recept Signal Transduct Res, 2014, 34(2):73-80.
- [13] DUESTERDIECK-ZELLMER K, SEMEVOLOS S, KINSLEY M, et al. Age-related differential gene and protein expression in postnatal cartilage canal and osteochondral junction chondrocytes [J]. Gene Expr Patterns, 2015, 17(1):1-10.
- [14] LIANG Q Q, ZHANG M, ZHOU Q, et al. Muscone protects vertebral end-plate degeneration by antiinflammatory property [J]. Clin Orthop Relat Res, 2010, 468(6):1600-1610.
- [15] 张宇,赵永见,周泉,等. 羟基红花黄素 A 拮抗 IL-1 β 诱导软骨终板细胞凋亡的作用机制[J]. 中国药理学通报,2011,27(12):1704-1709.
- [16] 陈加守,李西海,李会婷,等. 独活寄生汤水提取物对软骨细胞 G1 期调控因子 mRNA 表达的影响[J]. 中国中药杂志,2013,38(22):3949-3952.

Mechanism Research on Duhuo Jisheng Decoction Water Extract Delay The Degeneration of Intervertebral Disc Chondrocytes Mediated by Wnt/ β -catenin Signaling Pathway

LIU Boling¹, CHEN Qiyong¹, LIU Shaoqiang¹, YE Xiaowei¹, LIANG Guiqing¹, YE Jinxia¹, LI Xihai²

¹ Fuzhou Second Hospital, Xiamen University, Fuzhou, Fujian 350007, China;

² Fujian Academy of Integrative Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, Fujian 350122, China

ABSTRACT Objective: To explore the effects on Duhuo Jisheng Decoction (DHJSD) water extract delay the Intervertebral disc chondrocytes mediated by Wnt/ β -catenin signaling pathway. **Methods:** Establishment and Identification of Intervertebral disc chondrocytes system cultured in vitro isolated from Intervertebral disc cartilage of 4-week old SD rats; Morphological changes were observed by inverted phase contrast microscope. The expression of related mRNA and protein on proliferation were tested by RT-PCR and Western Blot. **Results:** The cytoplasm of chondrocytes was identified in brownish yellow stained by immunohistochemical staining in positive group; RT-PCR and Western Blot suggested that compared to the normal group, the expression of mRNA and protein in Wnt4、GSK-3 β 、 β -catenin were significant increased in model group ($P < 0.01$); DHJSD water extract (100、200、400 $\mu\text{g}/\text{mL}$) alleviated the expression of mRNA and protein in Wnt4、GSK-3 β 、 β -catenin, as compared to the model group, especially given significant difference from the 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ group ($P < 0.01$). **Conclusion:** Duhuo Jisheng Decoction water extract inhibits the degeneration of Intervertebral disc chondrocytes mediated by Wnt4、GSK-3 β 、 β -catenin signaling pathway.

KEY WORDS intervertebral disc chondrocytes; Duhuo Jisheng decoction; water extract; Wnt/ β -catenin signaling pathway.