

益气活血利水方及拆方对大鼠破裂型突出椎间盘 Col- II 和 Aggrecan 的影响

陈梦菲¹ 俞振翰² 马智佳² 李晓春² 钱祥² 俞振翰^{通讯作者}

¹ 苏州市立医院北区中医伤科, 中国·江苏 苏州 215000;

² 苏州市中医医院骨科, 中国·江苏 苏州 215000

【摘要】目的: 探讨益气活血利水方对 SD 大鼠破裂型退变髓核细胞中 II 型胶原 (Col- II)、聚集蛋白聚糖 (Aggrecan) mRNA 的表达的影响。方法: 选择 SPF 级雄性 SD 大鼠尾椎椎间盘建立破裂型退变椎间盘模型; 制备实验用药, 将 SD 大鼠分为模型组、益气活血利水方组、益气方组、活血方组、利水方组, 每组各 5 只。造模术后第二天给药, 每日灌胃 1 次。1 周末和 4 周末, 分别对模型组, 实验组大鼠取材。采用 RealTime-PCR 方法检测 5 组大鼠的椎间盘中的 Col- II 和 Aggrecan 的 mRNA 表达。结果: 与模型组比较, 各实验组均可上调破裂型退变髓核细胞中 Col- II、Aggrecan mRNA 的表达 ($P < 0.05$)。结论: 益气活血利水方可能通过影响破裂型髓核细胞中 Col- II、Aggrecan 含量, 进而发挥防止破裂型髓核细胞的退变作用。

【关键词】 益气活血利水方; 破裂型症; 退变髓核细胞; Col- II; Aggrecan; mRNA

【基金项目】 苏州市科教兴卫青年科技项目 (KJXW2018042); 苏州市科技发展计划项目 (SYSD2019220)。

引言

腰椎间盘突出症 (Lumbar intervertebral disc herniation, LDH) 是一种腰椎退变性疾病, 以腰椎椎间盘退变为主要病理基础, 变性的髓核引起周围纤维环等软组织结构的退变, 最终压迫神经根或者马尾, 表现出腰腿痛等临床症状和体征。根据后纵韧带的完整与否, 可将 LDH 分为破裂型和非破裂型^[1]。20 世纪末以来, 许多学者已经成功培养退变椎间盘细胞^[2-4], 为体外研究 LDH 奠定了基础。

益气活血利水方为苏州市中医医院骨伤科主任姜宏教授治疗腰椎间盘突出症的基础方药。前期已从临床观察及通过体外诱导的腰椎间盘突出退变细胞模型开展了广泛而深入的研究^[5-7], 在此基础上我们观察益气活血利水方血清对非破裂型 LDH 患者退变髓核细胞中 Col- II、Aggrecan mRNA 表达的影响, 旨在探讨其疗效机理。

1 实验材料

1.1 模型制作

参考: ① Andrea Geiss, Karin Larsson, Bjorn Rydevik, et al. Autoimmune Properties of Nucleus Pulposus an Experimental study in pigs. Spine, 2007, 32:168~173. ② 大鼠破裂型椎间盘突出模型的建立及其重吸收机理的研究, 中国骨伤, 2010, 23(5):370~372。

1.1.1 实验动物

清洁级 SD 雄性大鼠, 180~200g, 购于昭衍 (苏州) 新药研究中心有限公司, 许可证号: SCXK (苏) 2017-0043。实验大鼠在标准实验室条件: 清洁级, 温度: 22~25℃, 相对湿度: 65%, 12 h 明暗交替照明, 自由进食?饮水适应性饲养 5 天后用于研究, 整个实验过程中严格按照动物伦理学标准对动物的处置。

1.1.2 椎间盘的获取

SD 大鼠经戊巴比妥钠 (50mg/kg) 腹腔注射麻醉成功后, 剃去背部体毛, 橡皮筋扎住尾部, 常规消毒, 无菌条件下每只大鼠切取第 3、4 尾椎椎间盘一个 (包含上下软骨终板)。椎间盘用 10ml 注射器针头刺破所取椎间盘正中纤维环暴露髓核。

1.1.3 椎间盘的埋植

碘伏常规消毒背部, 后正中线切开皮肤?肌肉, 将取出的椎间盘植入肌肉层, 随后逐层缝合, 伤口处涂以红霉素眼膏。造模成

功后将大鼠放入笼中常规饲养。

1.2 药物与试剂

1.2.1 中药饮片

生黄芪 (产地: 内蒙古包头, 批号: 190307); 川芎 (产地: 四川, 批号: 20181111); 地龙 (产地: 广东, 批号: 190305015); 当归 (产地: 甘肃岷县, 批号: 190216); 防己 (产地: 浙江, 批号: 180607); 木瓜 (产地: 安徽, 批号: 190114010)。

1.2.2 试剂

戊巴比妥钠购于 Sigma 公司, SYBR Green PCR 试剂盒购于 Thermo 公司, 逆转录试剂盒购于 Fermentas, 无水乙醇购于国药集团, 氯仿购于国药集团, 异丙醇购于国药集团, Trizol 购于 Invitrogen 公司, RIPA 组织细胞快速裂解液购于北京索莱宝公司, BCA 蛋白定量试剂盒购于 Thermo 公司, Tris-HCl, pH=6.8 电泳缓冲液购于北京索莱宝公司, 10% SDS 购于北京索莱宝公司, 10% 过硫酸铵购于北京索莱宝公司, TEMED 购于北京索莱宝公司, 4* 蛋白上样缓冲液购于北京索莱宝公司, 蛋白预染 Marker 购于 Fermentas 公司, NC 膜购于 Millipore 公司, 脱脂奶粉购于北京索莱宝公司, PBS 磷酸盐缓冲液购于北京索莱宝公司, Tween-20 (吐温 -20) 购于北京索莱宝公司, 发光液购于 Millipore 公司, 引物购于上海捷瑞生物工程有限公司。

1.3 仪器与器械

Thermo HEPA CLASS100 细胞培养箱? SW-CJ-1FD 超净工作台? XSP-17C 倒置生物显微镜? Eppendorf 可调式移液器? TDL-60B 型低速台式离心机? TL-18M 台式高速冷冻离心机? SBE6003 电泳仪? UV7500 紫外 / 可见分光光度计? Bio-Rad PCR 基因扩增仪, Bio-Rad Cycler 荧光定量 PCR 仪。

2 实验方法

2.1 药物配置

(1) 益气活血利水方 (生黄芪 20g, 川芎 15g, 地龙 15g, 当归 10g, 防己 10g, 木瓜 10g); 按组方比例准确称取 8 倍量, 水煎 2 次合并浓缩成膏, 根据实验要求应用时以双蒸水稀释至相当于 0.8g 生药 / ml。

(2) 益气方 (生黄芪 20g, 川芎 15g); 按组方比例准确称取 8 倍量, 水煎 2 次合并浓缩成膏, 根据实验要求应用时以双蒸水稀释

至相当于 0.35g 生药 /ml。

(3)活血方(地龙15g, 当归10g): 按组方比例准确称取8倍量, 水煎2次合并浓缩成膏, 根据实验要求应用时以双蒸水稀释至相当于 0.30g 生药 /ml。

(4)利水方(防己10g, 木瓜10g): 按组方比例准确称取8倍量, 水煎2次合并浓缩成膏, 根据实验要求应用时以双蒸水稀释至相当于 0.20g 生药 /ml。

2.2 模型的分组

以 50 只 SPF 级雄性 SD 大鼠为研究对象, 适应性饲养 1 周后, 按体重随机分为 5 组: 模型组、益气活血利水方组、益气方组、活血方组、利水方组, 每组各 10 只。按上述方法复制模型后第二天开始给予对应的药液, 给药体积均为 10ml/kg, 模型组给予同体积的双蒸水。各给药组剂量分别为益气活血利水方组: 8.0g 生药/kg; 益气方组 3.5 g 生药 /kg; 活血方组 3.0g 生药 /kg; 利水方组 2.0 g 生药 /kg。在给药后 1 周末和 4 周末, 分别对各组按要求进行取材, 每个时间点取 5 只。取出髓核组织后使用 Trizol 提取 Total-RNA。

2.3 RealTime-PCR 检测椎间盘中 Col- II、Aggrecan mRNA 表达

2.3.1 目的基因标准品引物设计每个基因 mRNA 序列使用 NCBI 数据库寻找, 引物采用 Primer 5 软件设计并由上海捷瑞生物工程有限公司合成。引物序列见表 1。

表 1 大鼠 Col-II、Aggrecan 引物序列及长度

Primer sequences	Probes	Sizes of PCR products
Col- II Forward primer	5' ACGCTCAAGTCGCTGAAC 3'	122bps
Col- II Reverse primer	5' TAGTCTCCGCTCTTCCACTC 3'	
Aggrecan Forward primer	5' CAAGTGAGCCGTGTTTC 3'	212bps
Aggrecan Reverse primer	5' CTCGCTGCCTCAATGC 3'	

2.3.2 Real-timePCR 法检测目的基因相对表达量

经反转录获得 cDNA, 并经 PCR 扩增 GAPDH 验证提取成功 (见图 1)。用 Bio-RadiCycler 型荧光定量基因扩增仪采用两步法 PCR 扩增程序进行扩增。反应程序: 95°C, 10min (95°C, 15 秒; 55°C, 45 秒) × 40; 95°C, 15 秒; 60°C, 1min; 95°C, 15 秒; 60°C, 15 秒; PCR 反应体系见表 2。测定各样品 CT 值后计算出各个基因的相对表达量。

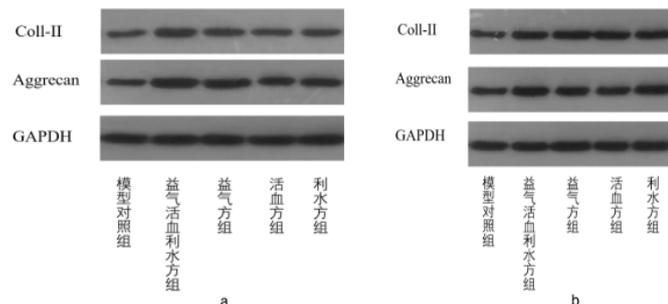


图 1 1 周 (a) 和 4 周 (b) PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳图

表 2 Real-timePCR 反应体系

Content	Volume (μl)
SYBRPremix Ex Taq II	10
ForwardPrimer	1
ReversePrimer	1
cDNA	2
dH2O	11
Total	25

2.4 统计学分析

数据的统计分析采用 SPSS 22.0 统计软件, 计量资料以均数 ± 标准差来表示, 两两比较使用 T 检验, 组间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), P < 0.05 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对大鼠破裂型突触椎间盘细胞基质中 Col- II mRNA 表达量的影响

药物作用 1 周后, 益气活血利水组、益气组均可上调退变髓核细胞中 Col- II mRNA 的表达量, 差异具有统计学意义 (P < 0.05); 活血组及利水组与模型组无明显差异。药物作用 4 周后, 益气活血利水组可上调退变髓核细胞中 Col- II mRNA 的表达量, 差异具有统计学意义 (P < 0.05); 益气组、活血组及利水组与模型组无明显差异。见图 2。

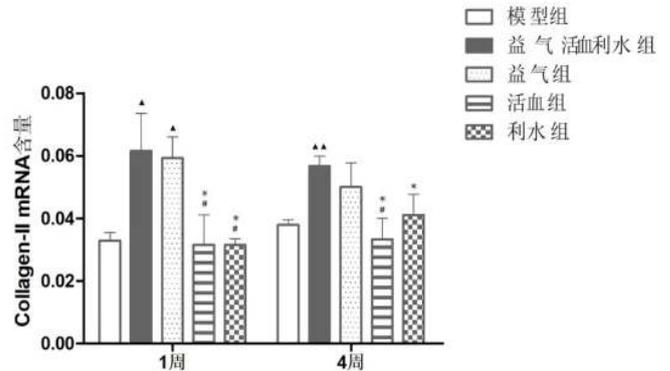


图 2 相同时间段内与模型组比较 ▲ P < 0.05, ▲▲ P < 0.01, ▲▲▲ P < 0.001; 与益气活血利水方组比较 *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001; 与益气组比较 #P < 0.05。

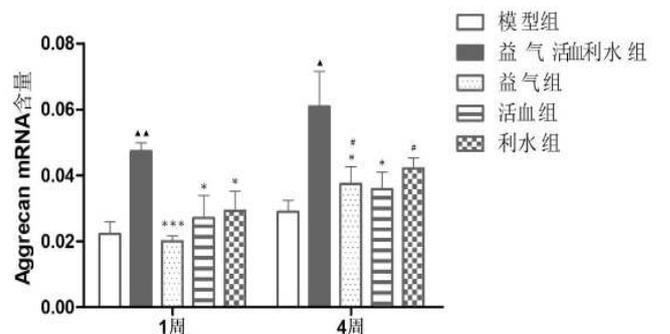


图 3 组内与第 1 周比较 #P < 0.05; 相同时间段内与模型对照组比较 ▲ P < 0.05, ▲▲ P < 0.01, ▲▲▲ P < 0.001; 与益气活血利水方组比较 *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001。

2.2对破裂型退变髓核细胞中Aggrecan mRNA表达量的影响
药物作用1周及4周后,益气活血利水组可上调退变髓核细胞中Col-Ⅱ mRNA的表达量,差异具有统计学意义($P < 0.05$);益气组、活血组及利水组与模型组无明显差异。见图3。

3 讨论

胶原和蛋白聚糖作为椎间盘基质内最主要的蛋白质,髓核中的Col-Ⅱ和Aggrecan具有维持结构、保持弹性、减少压力等作用。Smith等研究表明,Col-Ⅱ退变椎间盘髓核中的Col-Ⅱ表达随着退变加重而减少^[8]。而Aggrecan作为蛋白聚糖中的主要类型,其损耗是持椎间盘退变的重要表现^[9]。因此Col-Ⅱ及Aggrecan的含量增加能够延缓椎间盘退变,维持椎间盘有效功能,也是研究药物起效的指标之一。本实验将中药复方进行拆方,通过观察益气活血利水组、益气组、活血组、利水组及模型组对大鼠破裂型腰椎间盘突出模型中椎间盘体积、重量、Col-Ⅱ及Aggrecan的变化,发现益气活血利水方对比拆方组和对照组,能增加Col-Ⅱ及Aggrecan的mRNA及蛋白的表达。

腰椎间盘突出在中医传统疾病分类中,属于“腰腿痛”“痹症”“萎证”等范畴。其发病机理根据常见病案可分为气滞血瘀、气虚血瘀、寒湿痹阻、湿热痹阻、肝肾亏虚等证型。现代病理分型尚无一致的分类意见,常用的有MacNab分类、AAOS&ISSLS分类,国内周秉文教授1986年提出了突起型、破裂型、游离型的分类^[10]。姜宏教授在椎间盘突出临床治疗中,采用传统中药口服方式对明确手术禁忌,或者不愿意手术治疗的患者进行治疗,尤其是在破裂性腰椎间盘突出的治疗方面积累了二十余年的经验。他根据吴门医派“络病理论”和石氏伤科“以气为主、以血为先”的思想理念,认为突出物为“痰”、“湿”、“瘀”三种病理因素相互干扰所产生^[11],提出了益气活血、化湿通络的治则,以益气活血利水方为基础,通过辨病、辨证、辩型、辩期进行治疗^[12],取得了显著的临床治疗效果。方中重用黄芪为君药,补脾益气,利水消肿;当归为臣药,活血行瘀,散寒止痛;佐药为川芎、地龙、防己、木瓜,助健脾除湿,活血散结之功。

陈文认为中药方剂是根据复杂证候的需要,将不同药物有序组合,药物之间既有协同又有制约,需要用现代系统理论分析指导^[13]。本实验通过拆分益气活血利水方为三个拆方药对进行分组研究,结果表明益气活血利水方在增加Col-Ⅱ和Aggrecan方面均优于各拆方组,体现了方剂优化配伍后的合理性和整体实现性。

实验中复方组和各拆方组的数据,对进一步实验研究药物与方剂相关性起到了重要作用。临床用药需求随诊配伍,灵活加减,该实验结果也为临床用药甄选药味、优化配伍起到了重要参考。在将来的研究中,应进一步研究药物之间的相互关系,探寻药物的作用途径,优化方剂配伍,为临床诊疗提供理论依据。

参考文献:

- [1]Macnab I, McCulloch J. Disc ruptures[M]. Baltimore: Williams & Wilkins, 1990:130-134
- [2]Gruber HE, Stasky AA, Hanley EN Jr. Characterization and phenotypic stability of human disc cells in vitro[J]. Matrix Biology, 1997, 16(5):285-288
- [3]Gruber HE, Fisher EC Jr, Desai B, et al. Human intervertebral disc cells from the annulus: three-dimensional culture in agarose or alginate and responsiveness to TGF- β 1[J]. Exp Cell Res, 1997, 235(1):13-21
- [4]Kluba T, Niemeyer T, Gaismaier C, et al. Human annulus fibrosus and nucleus pulposus cells of the intervertebral disc: Effect of degeneration and culture system on cell phenotype[J]. Spine, 2005, 30(24):2743-2748
- [5]姜宏,刘锦涛.破裂型椎间盘突出动物模型重吸收过程中自身免疫反应的研究[J]. 颈腰痛杂志, 2009, 30(1):21-23
- [6]李晓春,姜宏,刘锦涛,等. TNF- α 抑制剂对破裂性腰椎间盘突出重吸收的实验研究. 颈腰痛杂志, 2011, 32(4):264-267
- [7]钱祥,姜宏,王拥军,等. MMP-3/MMP-7在腰椎间盘突出组织中的表达及其临床意义[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2012, 20(8):1-3
- [8]Smith LJ, Fazzalari NL. The elastic fibre network of the human lumbar annulus fibrosus: architecture, mechanical function and potential role in the progression of intervertebral disc degeneration. Eur Spine J, 2009, 18(4):439-448.
- [9]熊晓芊,邵增务,杨述华. 聚集蛋白聚糖与椎间盘退变的研究进展[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2005, 01:54-57.
- [10]周秉文,胡有谷,孙进修,张磊. 腰椎间盘突出症的分期及突出椎间盘组织摘除术名称商榷[J]. 青岛医学院学报, 1986, 02:43-46.
- [11]吴黎明,俞鹏飞,刘锦涛,姜宏. 姜宏辨治破裂性腰椎间盘突出症经验[J]. 江苏中医药, 2017, 11:19-22.
- [12]王志强,姜宏,姜宏教授中药治疗破裂性腰椎间盘突出症临床经验总结[J]. 颈腰痛杂志, 2017, 06:528-530.
- [13]陈文,凤良元,鄢顺琴. 论方剂配伍理论和方法创新[J]. 安徽中医学院学报, 2008, 05:9-11.