

· 基础研究 ·

独活寄生汤对腰椎间盘突出纤维环细胞 P38 信号转导通路的影响

周江涛¹, 王庆来¹, 赵依娜¹, 吴惠明¹, 王维佳², 王鹏²

(1. 浙江省温州市中医院, 浙江 温州 325000; 2. 浙江中医药大学, 浙江 杭州 310053)

摘要 **目的:**从 P38 细胞信号转导通路的角度探讨独活寄生汤治疗腰椎间盘突出源性腰痛的作用机制。**方法:**将 20 只 3 月龄雄性新西兰大白兔随机分为正常对照组、模型组、独活寄生汤组及 P38 阻断剂组, 每组 5 只。除正常对照组外, 其余 3 组均采用纤维环体表穿刺法建立兔腰椎间盘突出退变模型。造模 8 d 后提取各组实验兔血清低温保存备用, 于造模 8 周后分别用这些血清刺激培养的椎间盘纤维环细胞, 并采用 Western Blot 法检测各组细胞的 P38 丝裂原活化蛋白激酶磷酸化水平。**结果:**各组纤维环细胞 P38 丝裂原活化蛋白激酶总量比较, 差异无统计学意义 ($F=1.819, P=0.085$)。各组纤维环细胞磷酸化 P38 丝裂原活化蛋白激酶/P38 丝裂原活化蛋白激酶总量比较, 差异有统计学意义 ($F=5.437, P=0.007$), 进一步两两比较: 模型组大于独活寄生汤组、P38 阻断剂组及正常对照组 ($P=0.009, P=0.005, P=0.003$); 独活寄生汤组大于 P38 阻断剂组及正常对照组 ($P=0.007, P=0.004$); P38 阻断剂组大于正常对照组 ($P=0.007$)。**结论:**独活寄生汤可通过降低纤维环细胞 P38 丝裂原活化蛋白激酶磷酸化水平, 抑制炎症因子的产生, 减缓由 P38 丝裂原活化蛋白激酶信号转导通路介导的软骨细胞凋亡进程, 从而达到治疗腰椎间盘突出源性腰痛的目的。

关键词 腰痛 椎间盘 独活寄生汤 P38 丝裂原活化蛋白激酶类 动物实验

Empirical study of the effect of DUHUO JISHENG decoction on p38 signal transduction pathway in annulus fibrosus cells isolated from lumbar intervertebral disc ZHOU Jiang-tao*, WANG Qing-lai, ZHAO Yi-na, WU Hui-ming, WANG Wei-jia, WANG Peng. * Traditional Chinese Medical Hospital of Wenzhou City, Wenzhou 325000, Zhejiang, China

ABSTRACT **Objective:** To explore the mechanism of action of DUHUO JISHENG decoction in the treatment of low back pain caused by intervertebral disk disease from the standpoint of p38 signal transduction pathway. **Methods:** Twenty male New Zealand white rabbits, 3 months old, were randomly divided into four groups, 5 cases in each group: normal control group-normal saline (7 ml/kg/day gavage); model group-normal saline (7 ml/kg/day gavage); DUHUO JISHENG decoction group-DUHUO JISHENG decoction (7 ml/kg/day gavage); p38 blocking agent group-p38 blocking agent (7 ml/kg/day gavage). The rabbit models of lumbar intervertebral disk cataplasia were built by puncturing the annular fibrosus through body surface except the normal control group. Eight days after modeling, blood sera containing drug of rabbits were extracted and preserved in low temperature. Eight weeks after modeling, the annulus fibrosus cells isolated from lumbar intervertebral disc were stimulated with the blood sera containing drug, and the phosphorylation level of p38 mitogen-activated protein kinases (MAPK) in cells were detected by western blot. **Results:** There were no statistical differences in the total amount of p38 MAPK in annulus fibrosus cells among these groups ($F=1.819, P=0.085$). There were statistical differences in the ratio of phosphorylated p38 MAPK to total p38 MAPK in annulus fibrosus cells among these groups ($F=5.437, P=0.007$); further comparison indicated that the ratio of model group was higher than that of DUHUO JISHENG decoction group, p38 blocking agent group and normal control group ($P=0.009, P=0.005, P=0.003$), the ratio of DUHUO JISHENG decoction group was higher than that of p38 blocking agent group and normal control group ($P=0.007, P=0.004$), the ratio of p38 blocking agent group was higher than that of normal control group ($P=0.007$). **Conclusion:** DUHUO JISHENG decoction can inhibit the production of inflammatory factors and slow down the process of apoptosis of cartilage cells induced by p38 MAPK signal transduction pathway by depressing the phosphorylation of p38 MAPK of annulus fibrosus cells, for the purpose of treatment of low back pain caused by intervertebral disk disease.

Key words Low back pain; Intervertebral disk; DUHUO JISHENG decoction; p38 mitogen-activated protein kinases; Animal experimentation

椎间盘纤维环软骨的损伤和退变会引起椎间盘

突出、髓核压力降低及髓核相对密闭的容积体压力平衡被打破, 可启动椎间盘退变的级联反应^[1]。丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase,

MAPK)可将细胞外刺激信号转导至细胞核内,并引起细胞的增殖、分化、转化和凋亡,以及炎症的发生、发展和细胞炎性因子的生成等生物学反应^[2-4]。据此我们推测,P38MAPK 信号转导通路可能参与纤维环细胞退变、凋亡的信号转导过程。独活寄生汤在临床上对风寒湿痹兼有体虚的腰痛疾病有较好的临床疗效。本实验从 P38MAPK 信号转导通路的角度对独活寄生汤治疗腰椎间盘突出性腰痛的作用机制进行了研究,现总结报告如下。

1 材料与仪器

1.1 实验动物 清洁级 3 月龄雄性新西兰大白兔 20 只,体质量 2.5 kg 左右,由浙江中医药大学动物实验中心提供,实验动物合格证号:浙实动单字第 2006131 号。

1.2 实验药物及试剂 独活寄生汤,由浙江省中医院中药房提供并煎制。药物组成:独活 9 g、细辛 6 g、防风 6 g、秦艽 6 g、肉桂 6 g、桑寄生 6 g、牛膝 6 g、杜仲 6 g、当归 6 g、川芎 6 g、地黄 6 g、芍药 6 g、人参 6 g、茯苓 6 g、甘草 6 g。SB203580 (Promega 公司);兔抗 P38MARK、兔抗 GAPDH (Santa cruz 公司);Ⅱ型胶原酶、0.25% 胰蛋白酶 + 0.02% EDTA、DMEM/F-12 细胞培养液 (Gibco 公司)。

1.3 实验仪器 超净工作台、CO₂ 恒温培养箱、分光倒置显微镜、台式离心机、超低温冰箱、培英 DSHZ-300A 旋转式恒温振荡仪、Western blot 灌胶模具 (Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 分组及造模 将 20 只大白兔随机分为正常对照组、模型组、独活寄生汤组及 P38 阻断剂组,每组 5 只。除正常对照组外,其余 3 组均采用纤维环体表穿刺法^[5-7]建立兔腰椎间盘突出退变模型,术后以庆大霉素 20 万单位肌注,每天 1 次,连续 3 d。

2.2 含药血清制备 独活寄生汤组和 P38 阻断剂组分别按 7 mL·kg⁻¹体质量以独活寄生汤和 SB203580 灌胃 (根据动物实验人兔有关比例,本实验 10 倍于临床给药剂量给药),每日 1 次,连续 8 d;正常对照组和模型组分别以等体积生理盐水灌胃。在末次给药 2 h 后,在实验兔耳中动脉取血静置 30 min 后取上清液,经离心、分离血清、水浴灭活及滤器除菌后于 -20 ℃ 环境下保存备用。

2.3 细胞分离培养 造模 8 周后,处死各组实验兔,

用咬骨钳分别咬断并取出 L₃ ~ L₅ 节段,剥除软组织,用双抗 D-Hanks 液冲洗至无明显血渍。仔细切下纤维环,用双抗 D-Hanks 液漂洗后,剪成 1 mm³ 的颗粒,再漂洗、离心,收集沉淀物。将沉淀物通过 0.25% 胰蛋白酶和 0.25% Ⅱ型胶原酶进行消化,离心,然后以 200 目不锈钢网过滤细胞,并在镜下计算细胞总数。再将细胞接种到 100 mL 塑料培养瓶中,加入生长培养液,镜下观察细胞生长情况,当细胞接近 90% 汇合时进行传代。通过洗涤、消化、吹打细胞悬液,完成原代培养。

2.4 细胞鉴定及染色 在细胞接种前取适量细胞悬液,按细胞活力 = 未蓝染细胞 / (蓝染 + 未蓝染细胞) × 100% 计算,待达到符合实验要求的细胞活力比值后,将原代细胞接种在盖玻片上行纤维环细胞 I、Ⅱ型胶原免疫荧光染色。每个盖玻片上的细胞加 1:100 稀释的山羊抗 I 型胶原多克隆抗体或 Ⅱ型胶原抗体 50 μL 孵育,用 PBS 液洗 3 次,每次 5 min。然后用 1:50 稀释的 FITC 荧光标记的羊抗兔 IgG 于 37 ℃ 避光孵育 45 min。最后以 50% 缓冲甘油封片,在镜下观察,绿色荧光表示 I 型胶原或 Ⅱ型胶原呈阳性表达。

2.5 含药血清干预及磷酸化 P38MAPK 水平测定 以胰酶消化吹打细胞,使贴壁细胞脱落。用 DMEM 将各组含药血清分别配置成浓度为 10% 的含药血清,然后分别刺激各组细胞,作用时间 60 min:模型组以空白血清刺激细胞,独活寄生汤组以独活寄生汤含药血清刺激细胞,P38 阻断剂组以 2.0 μL 浓度为 20 mg·mL⁻¹ 的 SB203580 刺激细胞,正常对照组细胞不作处理。刺激完成后将各组细胞离心,D-Hanks 液冲洗 3 遍,离心吸出液体于 -20 ℃ 冰箱保存。最后采用 Western Blot 法检测磷酸化 P38MAPK 表达情况。

2.6 统计学方法 采用 SPSS16.0 统计软件对所得数据进行统计学处理,各组实验兔纤维环细胞 P38MAPK 总量及磷酸化 P38MAPK/P38MAPK 总量比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-t 检验,检验水准 α = 0.05。

3 结果

3.1 细胞体外培养及观察 组织块进行胰酶消化时,可见少量组织被消化,纤维环组织呈絮状,加入 Ⅱ型胶原酶消化过夜后组织块大部分已消化。在刚分离完成后细胞活力可达 95% 左右。原代培养时,高密度接种的原代纤维环细胞在镜下表现为大小不等

的圆形细胞。原代纤维环细胞培养悬浮 12 h 后逐渐开始贴壁,48 h 后大部分细胞贴壁,细胞的两侧或三边均可伸出生长突,呈圆形或多角形,单层生长,且扇形生长突不断扩大(图 1),15 d 时纤维环细胞呈片状贴附,密度不均、形态各异,开始生长汇合(图 2)。镜下观察见原代和第 1 代细胞呈圆形或多角形,细胞核呈卵圆形,第 1 代细胞生长速度加快,大约 1 周可生长汇合,后续实验使用第 1 代细胞完成。

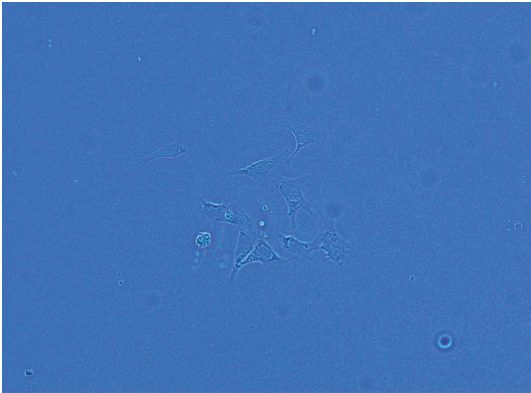


图 1 原代培养第 3 天的细胞甲苯胺蓝染色(×20)

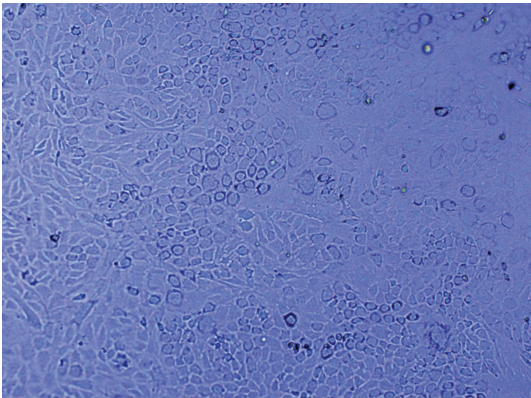


图 2 原代培养第 15 天的细胞甲苯胺蓝染色(×20)

3.2 细胞鉴定 原代细胞和第 1 代细胞在倒置显微镜下呈圆形或多角形,活力强,细胞核大而完整,呈卵圆形。原代和第 1 代细胞甲苯胺蓝染色见胞核蓝染,胞浆染为紫红色,呈异染性(图 3、图 4);第 1 代细胞 I 型胶原和 II 型胶原免疫荧光染色均见阳性表达(图 5、图 6)。

3.3 纤维环细胞 P38MAPK 磷酸化水平 各组纤维环细胞 P38MAPK 总量比较,差异无统计学意义。各组纤维环细胞磷酸化 P38MAPK/P38MAPK 总量比较,差异有统计学意义,进一步两两比较:模型组大于独活寄生汤组、P38 阻断剂组及正常对照组($P=0.009, P=0.005, P=0.003$);独活寄生汤组大于 P38 阻断剂组及正常对照组($P=0.007, P=0.004$);P38 阻断剂组大于正常对照组($P=0.007$)。(表 1)

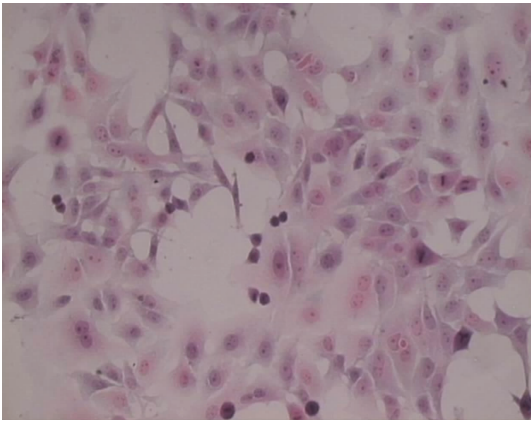


图 3 原代细胞甲苯胺蓝染色(×40)

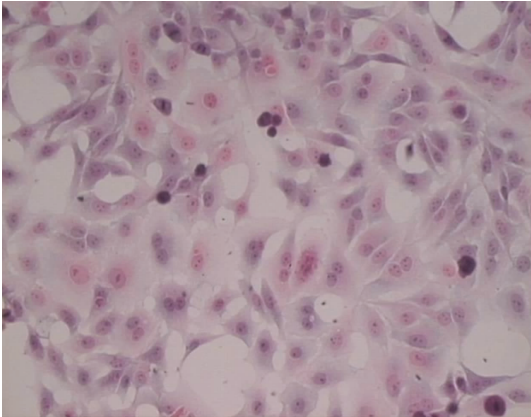


图 4 第 1 代细胞甲苯胺蓝染色(×40)

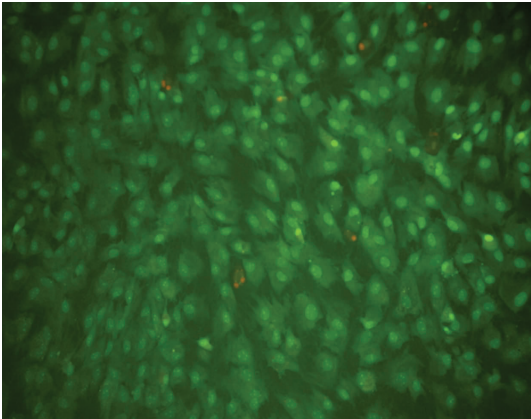


图 5 第 1 代细胞 I 型胶原免疫荧光染色(×20)

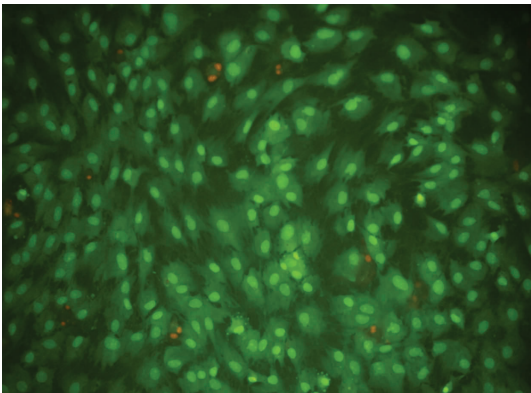


图 6 第 1 代细胞 II 型胶原免疫荧光染色(×20)

表 1 各组纤维环细胞 P38MAPK 磷酸化水平比较

组别	P38MAPK 总量	磷酸化 P38MAPK/ P38MAPK 总量
正常对照组	0.993 ± 0.001	0.232 ± 0.006
模型组	0.995 ± 0.002	0.582 ± 0.011
独活寄生汤组	0.992 ± 0.006	0.483 ± 0.007
P38 阻断剂组	0.990 ± 0.003	0.299 ± 0.007
F 值	1.819	5.437
P 值	0.085	0.007

4 讨 论

独活寄生汤中的桑寄生、牛膝、杜仲、当归、川芎、地黄、芍药、人参、茯苓、甘草可补气血、益肝肾，独活、细辛、防风、秦艽、肉桂能祛风湿、止痹痛。从本实验结果来看，独活寄生汤组和 P38 阻断剂组的纤维环细胞磷酸化 P38MAPK/P38MAPK 总量均小于模型组，且独活寄生汤组大于 P38 阻断剂组，说明二者均对 P38 转导通路有抑制作用，且前者作用小于后者。结合独活寄生汤的临床功效及其降低肿瘤坏死因子、白细胞介素(interleukin, IL)及 NO 等炎症因子的作用，故而推断独活寄生汤可以通过抑制 P38MAPK 磷酸化水平，抑制 IL-1 为首的细胞因子，从而有效阻止 IL-1 及其下游分子 NO、基质金属蛋白酶、前列腺素 E2 等对椎间盘纤维环的损伤；另外，通过抑制 P38MAPK 磷酸化水平，还可减缓由 P38MAPK 信号转导通路介导的细胞凋亡过程。

模型组纤维环细胞磷酸 P38MAPK/P38MAPK 总量大于正常对照组，说明退变的纤维环细胞 P38MAPK 信号转导通路被激活。P38MAPK 信号通路的激活可促进软骨破坏，引发多种复杂的生物学效应：①促进软骨细胞凋亡；②影响软骨基质合成；③加快软骨细胞肥大化及钙化进程；④促进基质金属蛋白合成及基质破坏；⑤增加环氧化酶-2、前列腺素 E2 的表达而致痛；⑥通过诱导一氧化氮合酶、NO、IL-1、IL-6、转化生长因子-α等致炎因子的产生而使软

骨的内环境产生恶性循环^[8]。
独活寄生汤主要包括补气血、益肝肾和祛风湿、止痹痛两大类药物。本实验已证实独活寄生汤复方制剂对 P38MAPK 信号转导通路有抑制作用，但其是对上游启动因子的作用，还是单纯作用于 P38MAPK 本身，以及独活寄生汤中具体是哪一类药物在起主导作用，这些问题将在后续研究中做进一步探索。

5 参考文献

[1] 陈岩,胡有谷,刘勇.椎间盘细胞培养过程中的反分化研究[J].中国脊柱脊髓杂志,2000,10(3):188-189.

[2] Jiménez-Sánchez M, Cid VJ, Molina M. Retrophosphorylation of Mkk1 and Mkk2 MAPKKs by the Slit2 MAPK in the yeast cell integrity pathway[J]. J Biol Chem, 282(43): 31174-31185.

[3] Kyriakis JM, Avruch J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation[J]. Physiol Rev, 2001, 81(2): 807-869.

[4] Pereda J, Sabater L, Cassinello N, et al. Effect of simultaneous inhibition of TNF-alpha production and xanthine oxidase in experimental acute pancreatitis: the role of mitogen activated protein kinases[J]. Ann Surg, 2004, 240(1): 108-116.

[5] 吕浩然,刘尚礼,丁悦,等.兔腰椎间盘退变模型的建立及影像学分析[J].中国临床解剖学杂志,2005,23(6): 643-647.

[6] 林鸿宽,叶君健.纤维环损伤诱导兔椎间盘退变模型[J].解剖学杂志,2008,31(5):699-702.

[7] Lotz JC. Animal models of intervertebral disc degeneration: lessons learned[J]. Spine, 2004, 29(23): 2742-2750.

[8] Anderson DG, Izzo MW, Hall DJ, et al. Comparative gene expression profiling of normal and degenerative discs: analysis of a rabbit annular laceration model[J]. Spine, 2002, 27(12): 1291-1296.

(2011-11-06 收稿 2012-04-05 修回)

· 作者须知 ·

论文中“平均年龄”要用“中位数”表示

中位数是指将数据按大小顺序排列起来,形成一个数列,居于数列中间位置的那个数据(或最中间两个数据的平均数)。中位数是样本数据所占频率的等分线,它不受少数几个极端值的影响,用它代表全体数据的一般水平更合适。因此,论文中使用中位数表示年龄的平均水平比使用算术平均数更为合适,计算起来也更为简便。