

补肾壮筋汤对腰椎间盘突出大鼠椎间盘及行为学特征影响的实验研究

赵赫¹, 高誉珊², 胡振国¹, 陈思学¹, 刘涛¹, 杨永栋¹, 俞兴¹

(1. 北京中医药大学东直门医院, 北京 100700; 2. 北京中医药大学, 北京 100029)

摘要 目的: 观察补肾壮筋汤对腰椎间盘突出大鼠椎间盘及行为学特征的影响, 并观察其安全性。方法: 选取 40 只清洁级 8 周龄雌性 SD 大鼠, 随机分为假手术组、模型组、补肾壮筋汤组、吡罗昔布组, 每组 10 只。应用椎间盘穿刺法对模型组、补肾壮筋汤组、吡罗昔布组大鼠 L₅₋₆ 椎间盘进行椎间盘退变造模, 假手术组充分暴露 L₅₋₆ 椎间盘前缘, 不进行穿刺干预。造模后 24 h, 补肾壮筋汤组大鼠以补肾壮筋汤 (1.5 g · kg⁻¹) 灌胃, 吡罗昔布组大鼠以吡罗昔布水溶液 (7.5 mg · kg⁻¹) 灌胃, 假手术组、模型组大鼠均以生理盐水 (10 mL · kg⁻¹) 灌胃, 每天 1 次, 连续给药 7 周。分别于造模前及药物干预开始后 1、3、5、7 周时进行机械痛阈实验和斜板实验。最后一次行为学特征测定结束后, 从眼底静脉丛取血测定血清丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, AAT)、天冬氨酸氨基转移酶 (aspartate aminotransferase, AST)、肌酐 (creatinine, CRE)、尿素氮 (urea nitrogen, UN) 的水平; 取 L₅₋₆ 椎间盘、肝脏及肾脏, 椎间盘组织分别进行 HE 染色、改良番红 O - 固绿染色后观察组织形态变化, 肝脏及肾脏组织进行 HE 染色、Masson 染色后观察组织病理改变。结果: ①机械痛阈实验痛阈。造模前及药物干预开始后不同时间点痛阈值的差异有统计学意义, 即存在时间效应 ($F=36.245, P=0.000$)。假手术组痛阈随时间变化趋势不明显; 模型组痛阈随时间变化逐渐降低; 补肾壮筋汤组和吡罗昔布组的痛阈于药物干预开始后 1 周时降至最低, 后期变化不明显。4 组大鼠痛阈总体比较, 差异有统计学意义, 即存在分组效应 ($F=54.170, P=0.000$)。除造模前外 ($F=1.375, P=0.266$), 药物干预开始后各时点 4 组大鼠痛阈比较, 组间差异均有统计学意义 ($F=30.059, P=0.000; F=34.117, P=0.000; F=33.454, P=0.000; F=35.617, P=0.000$); 药物干预开始后各时点假手术组痛阈均高于模型组 ($P=0.000; P=0.000; P=0.000; P=0.000$); 除药物干预开始后 1 周时外 ($P=0.197, P=0.191$), 其余各时点模型组的痛阈均低于补肾壮筋汤组和吡罗昔布组 ($P=0.010, P=0.013; P=0.000, P=0.000; P=0.000, P=0.000$); 药物干预开始后各时点补肾壮筋汤组和吡罗昔布组痛阈比较, 组间差异均无统计学意义 ($P=0.100; P=0.067; P=0.108; P=0.097$)。时间因素和分组因素存在交互效应 ($F=16.490, P=0.000$)。②斜板实验角度。造模前及药物干预开始后不同时间点斜板实验角度的差异有统计学意义, 即存在时间效应 ($F=3.746, P=0.019$)。假手术组、补肾壮筋汤组和吡罗昔布组斜板实验角度随时间变化整体呈上升趋势; 模型组斜板实验角度随时间变化整体呈下降趋势。4 组大鼠斜板实验角度总体比较, 差异有统计学意义, 即存在分组效应 ($F=7.640, P=0.000$)。造模前及药物干预开始后 1 周和 3 周时, 4 组大鼠斜板实验角度比较, 组间差异均无统计学意义 ($F=0.575, P=0.635; F=2.664, P=0.063; F=0.994, P=0.407$)。药物干预开始后 5 周和 7 周时, 4 组大鼠斜板实验角度比较, 组间差异均有统计学意义 ($F=9.666, P=0.000; F=2.685, P=0.006$); 假手术组斜板实验角度均大于模型组 ($P=0.000; P=0.026$), 模型组斜板实验角度均小于补肾壮筋汤组和吡罗昔布组 ($P=0.000, P=0.007; P=0.000, P=0.042$), 补肾壮筋汤组斜板实验角度均大于吡罗昔布组 ($P=0.000; P=0.047$)。时间因素和分组因素存在交互效应 ($F=2.934, P=0.012$)。③血清学检测结果。药物干预结束后 4 组大鼠血清中 AAT、AST、CRE、UN 含量比较, 组间差异均无统计学意义 ($F=1.023, P=0.398; F=0.237, P=0.869; F=0.629, P=0.602; F=1.141, P=0.350$)。④组织学检测结果。HE 染色及改良番红 O - 固绿染色显示, 与模型组相比, 补肾壮筋汤组和吡罗昔布组大鼠腰椎间盘组织退变程度较轻, 3 组中补肾壮筋汤组椎间盘组织退变程度最轻; 肝、肾组织 HE 染色和 Masson 染色显示, 模型组、补肾壮筋汤组及吡罗昔布组未见肝、肾组织纤维化。结论: 补肾壮筋汤在延缓腰椎间盘突出大鼠椎间盘退变及改善其行为学特征方面具有一定作用, 效果略优于吡罗昔布, 短期应用不会对肝肾组织及肝肾功能造成损伤。

关键词 椎间盘退行性变; 动物行为学; 补肾壮筋汤; 大鼠, Sprague - Dawley; 动物实验

Effect of Bushen Zhuangjin Tang (补肾壮筋汤) on intervertebral disc and behavioral characteristics of rats with lumbar intervertebral disc degeneration

ZHAO He¹, GAO Yushan², HU Zhenguo¹, CHEN Sixue¹, LIU Tao¹, YANG Yongdong¹, YU Xing¹

1. Dongzhimen hospital of Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 101121, China

2. Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100029, China

ABSTRACT Objective: To observe the effect of Bushen Zhuangjin Tang (补肾壮筋汤, BSZJT) on intervertebral disc and behavioral characteristics of rats with lumbar intervertebral disc degeneration and its safety. **Methods:** Forty 8-week-old clean – grade female SD rats were selected and randomly divided into sham – operated group, model group, BSZJT group and indometacin group, 10 cases in each group. The models of L₅/L₆ intervertebral disc degeneration (IVDD) were built in rats in model group, BSZJT group and indometacin group by using intervertebral disc puncture method, while the rats in sham – operated group were treated with sham – operation to adequately expose the anterior border of L₅/L₆ intervertebral disc without any puncture intervention. At 24 hours after the modeling, the rats in BSZJT group and indometacin group were intragastric administrated with BSZJT (1.5 g/kg) and indometacin solution (7.5 mg/kg) respectively, while the rats in sham – operated group and model group were intragastric administrated with normal saline (10 mL · kg⁻¹), once a day for consecutive 7 weeks. The mechanical paw withdrawal threshold (MPWT) test and the tiltboard test were carried out before modeling and at 1, 3, 5 and 7 weeks after the beginning of drug intervention respectively. The blood were fetched out from fundus oculi venous plexus after the last behavioral characteristics measurement, and the serum levels of alanine aminotransferase (AAT), aspartate aminotransferase (AST), creatinine (CRE) and urea nitrogen (UN) were measured. The L₅/L₆ intervertebral discs, livers and kidneys were fetched out. The intervertebral disc tissues were received HE staining and improved safranin O – fast green staining respectively and the hepatic tissues and nephridial tissues were received HE staining and Masson staining for observing the histopathological changes. **Results:** There was statistical difference in the pain threshold values between different timepoints before modeling and after the beginning of drug intervention, in other words, there was time effect ($F = 36.245, P = 0.000$). The pain threshold value changed unobviously with time in sham – operated group and the pain threshold value decreased gradually with time in model group. The lowest pain threshold value was found at 1 week after the beginning of drug intervention and the pain threshold value changed unobviously with time in later period in BSZJT group and indometacin group. There was statistical difference in the pain threshold values between the 4 groups in general, in other words, there was group effect ($F = 54.170, P = 0.000$). There was not statistical difference in the pain threshold values between the 4 groups before the modeling ($F = 1.375, P = 0.266$), and there was statistical difference in the pain threshold values between the 4 groups at each timepoint after the beginning of drug intervention ($F = 30.059, P = 0.000; F = 34.117, P = 0.000; F = 33.454, P = 0.000; F = 35.617, P = 0.000$). The pain threshold values were higher in sham – operated group compared to model group at each timepoint after the beginning of drug intervention ($P = 0.000; P = 0.000; P = 0.000; P = 0.000$). The pain threshold values were lower in model group compared to BSZJT group and indometacin group ($P = 0.010, P = 0.013; P = 0.000, P = 0.000; P = 0.000, P = 0.000$) except at 1 week after the beginning of drug intervention ($P = 0.197, P = 0.191$). There was no statistical difference in the pain threshold values between BSZJT group and indometacin group at each timepoint after the beginning of drug intervention ($P = 0.100; P = 0.067; P = 0.108; P = 0.097$). There was interaction between time factor and grouping factor ($F = 16.490, P = 0.000$). There was statistical difference in the tiltboard test angle between different timepoints before modeling and after the beginning of drug intervention, in other words, there was time effect ($F = 3.746, P = 0.019$). The tiltboard test angle increased with time in general in sham – operated group, BSZJT group and indometacin group, while the tiltboard test angle decreased with time in general in model group. There was statistical difference in the tiltboard test angle between the 4 groups in general, in other words, there was group effect ($F = 7.640, P = 0.000$). There was no statistical difference in the tiltboard test angle between the 4 groups before modeling and at 1 and 3 weeks after the beginning of drug intervention ($F = 0.575, P = 0.635; F = 2.664, P = 0.063; F = 0.994, P = 0.407$). There was statistical difference in the tiltboard test angle between the 4 groups at 5 and 7 weeks after the beginning of drug intervention ($F = 9.666, P = 0.000; F = 2.685, P = 0.006$). The tiltboard test angle was larger in sham – operated group compared to model group ($P = 0.000; P = 0.026$) and was smaller in model group compared to BSZJT group and indometacin group ($P = 0.000, P = 0.007; P = 0.000, P = 0.042$) and was larger in BSZJT group compared to indometacin group ($P = 0.000; P = 0.047$). There was interaction between time factor and grouping factor ($F = 2.934, P = 0.012$). There was no statistical difference in the serum contents of AAT, AST, CRE and UN between the 4 groups after the end of drug intervention ($F = 1.023, P = 0.398; F = 0.237, P = 0.869; F = 0.629, P = 0.602; F = 1.141, P = 0.35$). HE staining results and improved safranin O – fast green staining results showed the degeneration degree of lumbar intervertebral disc tissue was slighter in BSZJT group and indometacin group compared to model group and the degeneration degree was slightest in BSZJT group. HE staining results and Masson staining results showed that no fibrosis were found in hepatic tissues and nephridial tissues in model group, BSZJT group and indometacin group. **Conclusion:** BSZJT can delay intervertebral disc degeneration and improve the behavioral char-

acteristics to some extent in rats with lumbar intervertebral disc degeneration, and it slightly surpasses indometacin in the effect. Moreover, short-term application of BSZJT can not cause damage to hepatorenal tissues and hepatorenal function.

Key words intervertebral disc degeneration; ethology; Bushen Zhuangjin Tang; rats, Sprague-Dawley; animal experimentation

椎间盘退变是颈椎病与椎间盘源性腰痛的主要原因^[1]。从分子病理学角度可将椎间盘退变的机制概括为椎间盘内部分解合成代谢失衡所引起的以分解代谢为主要方面的退行性改变。补肾壮筋汤首载于《伤科补要》^[2], 著者钱秀昌在骨伤内治法上秉承了温补派代表薛己的用药原则, 主张以治肝肾经为主, 宜疏肝、调血、行经、补肾、强骨^[3-4]。方中熟地黄、山茱萸补益肝肾、填精益髓, 为君药; 续断、杜仲、五加皮辅君药补肝肾、强筋骨、祛风湿, 为臣药; 当归补血活血, 白芍敛阴和营、柔肝止痛, 茯苓健脾和胃、化痰祛湿, 青皮行气疏肝, 共为佐药; 牛膝补肝肾、强筋骨、活血通经、引血下行, 为使药。诸药合用共奏补益肝肾、强壮筋骨之效。目前, 对补肾壮筋汤的研究主要集中在防治膝骨关节炎方面^[5-7], 在基础实验与临床研究中取得了较好的效果。椎间盘细胞因在组织学方面具有与软骨细胞相类似的特征而被称为类软骨细胞。本研究旨在通过实验探索补肾壮筋汤对腰椎间盘突出大鼠退变椎间盘及行为学特征的影响, 发掘其治疗椎间盘退行性疾病中的应用价值。

1 材料与仪器

1.1 实验动物 健康清洁级 8 周龄雌性 SD 大鼠 40 只, 体质量 220 ~ 250 g, 购自北京维通利华实验动物公司, 合格证编号: SCXK(京)2013-0005。在北京中医药大学实验动物中心饲养, 实验室温度 22 ℃, 相对湿度 60%, 12 h 明暗循环, 自由饮水。实验动物的处置按照 2006 年科技部《关于善待实验动物的指导性意见》规定执行。实验方案通过医学伦理委员会审查批准。

1.2 药物与试剂 补肾壮筋汤, 药物组成包括熟地黄 12 g、当归 12 g、川牛膝 10 g、酒萸肉 12 g、茯苓 12 g、续断 12 g、炒杜仲 10 g、白芍 10 g、醋青皮 5 g、五加皮 10 g, 药物均选用北京康仁堂药业有限公司生产的免煎颗粒; 水合氯醛(北京索莱宝科技有限公司, 批号: 20170117); 吡啶美辛胶囊(河北康泰药业有限公司, 国药准字 H13022105); 苏木精-伊红染色液(北京索莱宝科技有限公司, 批号: 20170125); 改良番红 O-固绿软骨染色液(北京索莱宝科技有限公司, 批

号: 20170123); 改良 Masson 三色染色液(北京索莱宝科技有限公司, 批号: 20170118); Perenyi's 脱钙液(北京百奥莱博科技有限公司, 批号: 20170128); 丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, AAT)测定试剂盒(中生北控生物科技股份有限公司, 批号: 208232E); 天冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)测定试剂盒(中生北控生物科技股份有限公司, 批号: 301222A); 肌酐(creatinine, CRE)测定试剂盒(中生北控生物科技股份有限公司, 批号: 303271C); 尿素氮(urea nitrogen, UN)测定试剂盒(中生北控生物科技股份有限公司, 批号: 303292B)。

1.3 实验仪器 BME-404 型电子式机械测痛仪(天津市协昆隆兴仪器仪表销售有限公司); PRO360 数显水平尺(上海精帛仪器设备有限公司)。

2 方法

2.1 分组及造模 采用随机区组设计将 40 只大鼠随机分为假手术组、模型组、补肾壮筋汤组、吡啶美辛组, 每组 10 只。禁食 12 h 后造模, 采用质量分数为 10% 的水合氯醛按照 300 mg · kg⁻¹ 剂量进行腹腔注射, 以角膜反射及夹捏尾部判断大鼠是否麻醉成功。麻醉后将大鼠仰卧固定在解剖台, 以大鼠双侧髂棘为体表标志, 确定以腹中线与两髂棘垂直连线中点上下各 1 cm 为拟手术切口。定位完成后腹部消毒, 沿腹正中线纵向切开约 2 cm, 暴露腹腔后将腹膜及空回肠组织移向左侧, 继续纵向深入可见腹膜、下腔静脉及腹主动脉、腰大肌, 其中腰大肌前方可见一条较为典型的横行粗大静脉。剪开腹后膜并钝性分离腰大肌可见 L₅₋₆ 椎间盘, 将 2 mL 注射器针头夹持在血管钳上, 留取约 4 mm 长度针头, 将针头平行于上下终板间纤维环正中处垂直全层刺入, 反复刺入 5 次, 每次留针约 10 s 后拔出, 逐层缝合切口。假手术组充分暴露 L₅₋₆ 椎间盘前缘, 不进行穿刺干预, 即逐层缝合切口。切口涂抹红霉素软膏, 常规饲养。为避免术后低体温休克, 造模后对大鼠进行保暖, 温度维持在 25 ~ 30 ℃。

2.2 药物干预 造模后 24 h 按照以下方案进行药物干预: 补肾壮筋汤组大鼠按 1.5 g · kg⁻¹ 剂量以补

肾壮筋汤颗粒水溶液灌胃, 吡啶美辛组大鼠按 $7.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量以吡啶美辛胶囊水溶液灌胃, 假手术组、模型组大鼠均按 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量以生理盐水灌胃, 每天 1 次, 连续给药 7 周。

2.3 行为学检测

2.3.1 机械痛阈实验 分别于造模前及药物干预开始后 1、3、5、7 周应用电子机械测痛仪测量大鼠后足痛阈。每次测定均选择在当日 18:00—21:00 大鼠较活跃的时间进行。测量前将大鼠后肢用清水擦拭干净, 适应环境 5~10 min 后用测量手柄上的测量针针刺大鼠右足足底正中肉际, 注意避开足垫不敏感区域, 以大鼠右足产生躲避行为时的值作为大鼠右后足痛阈。每只大鼠重复测量 6 次, 取平均值。

2.3.2 斜板实验 分别在造模前及药物干预开始后 1、3、5、7 周进行斜板实验行为学评分。按改良 Rivlin 法制作倾斜板, 通过铰链将 2 块矩形合金板的一端相连, 一块作为水平固定板, 另一块为移动板, 移动板表面铺约 6 mm 厚的橡胶垫, 移动板从水平位置起绕轴旋转, 根据电子水平仪可以测量出斜面角度。在室温、安静状态下, 适应环境 5 min 后, 将大鼠身体纵轴与斜板纵轴平行放置, 缓慢将斜板一端升起, 以大鼠停留 5 s 而不跌落的角度作为最终结果。每只大鼠重复测量 5 次, 取平均值。

2.4 血清学和组织学检测 在药物干预开始后 7 周, 最后一次行为学特征测量结束后在大鼠目内眦进行眼底静脉丛取血, 测定大鼠血清中 AAT、AST、CRE、UN 的水平, 具体操作按照试剂盒说明书标注的步骤进行。取血后用 10% 水合氯醛麻醉各组大鼠, 取出大鼠 L₅₋₆ 椎间盘、肝脏及肾脏, 在 4% 的中性多聚甲醛溶液中固定, 椎间盘组织固定后再放入 Penny 脱钙液中脱钙 2 周。常规洗涤、脱水、透明、浸蜡、包埋、切

片后, 椎间盘组织分别进行 HE 染色和改良番红 O—固绿染色, 观察组织形态的变化; 肝、肾组织进行 HE 染色和 Masson 染色, 观察组织病理改变。

2.5 数据统计分析 采用 SPSS 19.0 软件对所得数据进行统计分析。4 组大鼠造模前及药物干预开始后各时点的痛阈、斜板实验角度的比较采用重复测量资料的方差分析; 药物干预结束后 4 组大鼠血清中 AAT、AST、CRE、UN 含量的组间整体比较均采用单因素方差分析, 组间两两比较均采用 LSD-*t* 检验。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

3 结果

3.1 行为学检测结果

3.1.1 机械痛阈实验痛阈 造模前及药物干预开始后不同时点痛阈值的差异有统计学意义, 即存在时间效应。假手术组痛阈随时间变化趋势不明显; 模型组痛阈随时间变化逐渐降低; 补肾壮筋汤组和吡啶美辛组的痛阈于药物干预开始后 1 周时降至最低, 后期变化不明显。4 组大鼠痛阈总体比较, 差异有统计学意义, 即存在分组效应。除造模前外, 药物干预开始后各时点 4 组大鼠痛阈比较, 组间差异均有统计学意义; 药物干预开始后各时点假手术组痛阈均高于模型组 ($P = 0.000$; $P = 0.000$; $P = 0.000$; $P = 0.000$); 除药物干预开始后 1 周时外 ($P = 0.197$, $P = 0.191$), 其余各时点模型组的痛阈均低于补肾壮筋汤组和吡啶美辛组 ($P = 0.010$, $P = 0.013$; $P = 0.000$, $P = 0.000$; $P = 0.000$, $P = 0.000$); 药物干预开始后各时点补肾壮筋汤组和吡啶美辛组痛阈比较, 组间差异均无统计学意义 ($P = 0.100$; $P = 0.067$; $P = 0.108$; $P = 0.097$)。时间因素和分组因素存在交互效应。见表 1、图 1。

表 1 4 组大鼠造模前及药物干预开始后各时点的机械痛阈比较 $\bar{x} \pm s, g$

组别	样本量 (只)	造模前机械 痛阈	药物干预开始后机械痛阈				合计	F 值	P 值
			1 周	3 周	5 周	7 周			
假手术组	10	38.59 ± 0.98	39.10 ± 1.09	39.22 ± 0.98	38.60 ± 0.77	38.71 ± 0.76	38.84 ± 0.33	1.030	0.402
模型组	10	37.90 ± 1.39	35.39 ± 1.39	33.50 ± 0.85	32.72 ± 1.35	31.42 ± 1.76	34.19 ± 0.33	33.739	0.000
补肾壮筋汤组	10	38.36 ± 1.06	34.67 ± 1.00	35.57 ± 1.50	35.83 ± 1.93	35.26 ± 1.41	35.93 ± 0.33	10.055	0.000
吡啶美辛组	10	38.40 ± 1.42	36.77 ± 0.98	36.82 ± 1.67	36.62 ± 1.00	36.80 ± 2.30	37.20 ± 0.33	4.275	0.005
合计	40	38.46 ± 1.24	36.48 ± 2.02	36.28 ± 2.44	35.94 ± 2.50	35.55 ± 3.14	36.54 ± 0.16	36.245 ¹⁾	0.000 ¹⁾
F 值		1.375	30.059	34.117	33.454	35.617	54.170 ¹⁾	$F = 16.490^{2)}$,	
P 值		0.266	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000 ¹⁾	$P = 0.000^{2)}$	

1) 主效应的 F 值和 P 值; 2) 交互效应的 F 值和 P 值

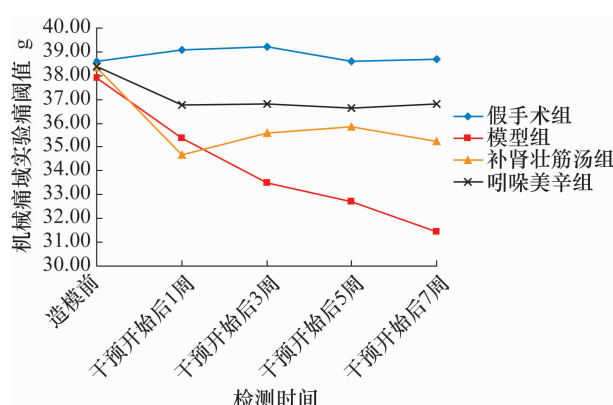


图1 4组大鼠造模前及药物干预开始后不同时间点机械痛域实验痛阈值变化趋势图

3.1.2 斜板实验角度 造模前及药物干预开始后不同时间点斜板实验角度的差异有统计学意义,即存在时

间效应。假手术型组、补肾壮筋汤组和吡啶美辛组斜板实验角度随时间变化整体呈上升趋势;模型组斜板实验角度随时间变化整体呈下降趋势。4组大鼠斜板实验角度总体比较,差异有统计学意义,即存在分组效应。造模前及药物干预开始后1周和3周时,4组大鼠斜板实验角度比较,组间差异均无统计学意义。药物干预开始后5周和7周时,4组大鼠斜板实验角度比较,组间差异均有统计学意义;假手术组斜板实验角度均大于模型组($P=0.000$; $P=0.026$),模型组斜板实验角度均小于补肾壮筋汤组和吡啶美辛组($P=0.000$, $P=0.007$; $P=0.000$, $P=0.042$),补肾壮筋汤组斜板实验角度均大于吡啶美辛组($P=0.000$; $P=0.047$)。时间因素和分组因素存在交互效应。见表2、图2。

表2 4组大鼠造模前及药物干预开始后各时点的斜板实验角度比较 $\bar{x} \pm s, ^\circ$

组别	样本量 (只)	造模前斜板 实验角度	药物干预开始后斜板实验角度				合计	F 值	P 值
			1 周	3 周	5 周	7 周			
假手术组	10	47.65 ± 0.93	48.29 ± 0.80	47.84 ± 1.16	48.57 ± 1.01	48.61 ± 1.51	48.19 ± 0.33	1.218	0.316
模型组	10	47.47 ± 0.89	47.13 ± 0.80	47.43 ± 1.40	46.32 ± 1.15	46.87 ± 4.11	47.04 ± 0.33	0.516	0.724
补肾壮筋汤组	10	47.03 ± 1.23	47.87 ± 1.44	48.18 ± 1.51	49.52 ± 1.72	49.90 ± 1.29	48.49 ± 0.33	6.651	0.000
吡啶美辛组	10	47.34 ± 1.07	48.40 ± 1.28	48.40 ± 1.26	48.10 ± 1.49	48.96 ± 1.54	48.24 ± 0.33	1.857	0.135
合计	40	47.37 ± 1.07	47.92 ± 1.18	47.96 ± 1.34	48.13 ± 1.77	48.57 ± 2.57	47.86 ± 1.03	3.746 ¹⁾	0.019 ¹⁾
F 值		0.575	2.664	0.994	9.666	2.685	7.640 ¹⁾	$F=2.934^{2)}$, $P=0.012^{2)}$	
P 值		0.635	0.063	0.407	0.000	0.006	0.000 ¹⁾		

1) 主效应的 F 值和 P 值; 2) 交互效应的 F 值和 P 值

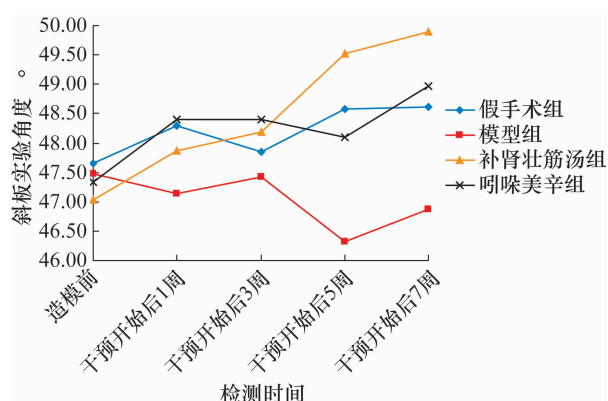


图2 4组大鼠造模前及药物干预开始后不同时间点斜板实验角度变化趋势图

3.2 血清学检测结果 药物干预结束后4组大鼠血清中 AAT、AST、CRE、UN 含量比较,组间差异均无统计学意义(表3)。

3.3 组织学检测结果

3.3.1 大鼠椎间盘组织 HE 染色结果显示:假手术组椎间盘大体形态完好,髓核、纤维环、上下终板轮廓

清晰,结构完整,髓核细胞形态完好、排列整齐、均匀有序,纤维环排列整齐,均匀一致,与髓核及终板交界处清晰明显;模型组椎间盘结构基本消失,髓核、纤维环、上下终板被肉芽组织代替,髓核细胞及纤维环消失,可见少量残存终板细胞,椎间隙变小;补肾壮筋汤组椎间盘结构大致完好,髓核细胞不同程度丢失、排列紊乱、欠均匀,髓核与纤维环交界处模糊,纤维环结构存在不同程度断裂,排列较紊乱,上下终板结构较完整;吡啶美辛组椎间盘结构破坏严重,髓核细胞及纤维环结构丢失,上下软骨终板结构均有不同程度破坏,椎间高度降低(图3)。

改良番红 O-固绿染色结果显示:假手术组椎间盘结构形态完整,髓核、纤维环及上下软骨终板轮廓清晰,髓核、纤维环及上下软骨终板呈嗜碱性,骨组织呈嗜酸性;模型组可见椎间盘结构基本消失,整体结构破坏,髓核及纤维环结构丢失,残存上下软骨终板,椎间隙被肉芽组织及纤维结缔组织代替;补肾壮筋汤

组可见相对完整、退变的椎间盘结构,髓核明显退变,纤维环结构紊乱,髓核与纤维环交界处模糊,结构不可辨,上下软骨终板结构相对完整,轮廓清晰;吡啶美

辛组可见不完整的椎间盘结构,髓核及纤维环结构丢失、上下软骨终板相对完整(图 4)。

表 3 4 组大鼠药物干预结束后血清学指标检测结果 $\bar{x} \pm s$

组别	丙氨酸氨基转移酶($\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$)	天冬氨酸氨基转移酶($\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$)	肌酐($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	尿素氮($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)
假手术组	50.89 ± 1.93	94.44 ± 12.01	66.50 ± 3.87	6.57 ± 1.20
模型组	47.33 ± 7.31	90.88 ± 10.69	67.22 ± 3.41	5.81 ± 1.17
补肾壮筋汤组	49.32 ± 2.63	94.65 ± 9.89	68.59 ± 3.11	6.79 ± 1.30
吡啶美辛组	49.68 ± 3.38	92.23 ± 8.04	68.32 ± 3.34	6.43 ± 1.16
<i>F</i> 值	1.023	0.237	0.629	1.141
<i>P</i> 值	0.398	0.869	0.602	0.350

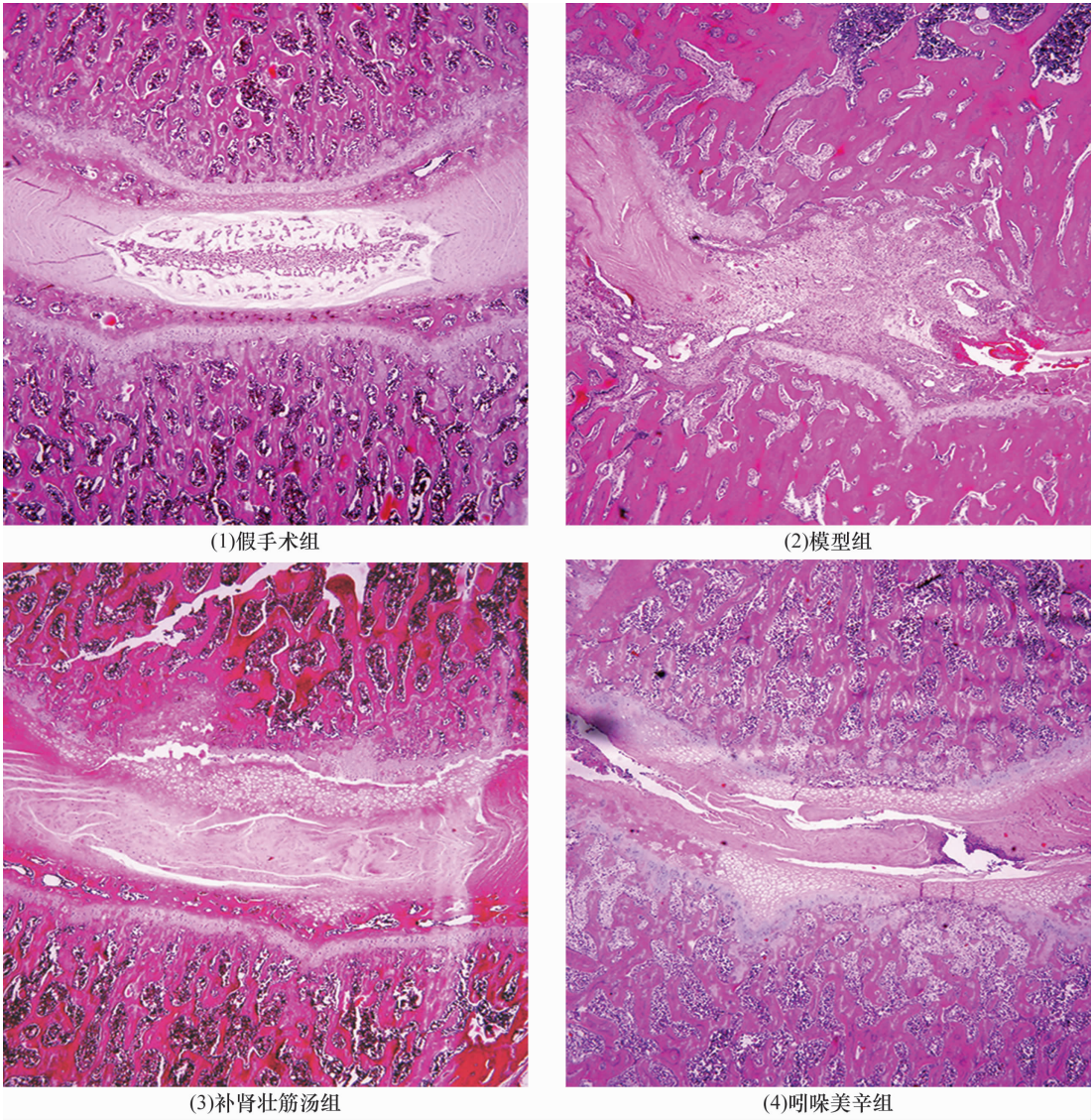


图 3 大鼠椎间盘组织 HE 染色结果($\times 40$)

3.3.2 大鼠肝脏组织 HE 染色结果显示:模型组、补肾壮筋汤组及吡啶美辛组大鼠肝小叶结构完整、界限清晰,肝细胞索以中央静脉为中心向四周呈放

射状排列,肝细胞间联系紧密、核大而圆、核仁明显,细胞质丰富均匀,无炎性细胞浸润,结构清晰可见(图 5)。

Masson 染色结果显示:模型组、补肾壮筋汤组及
 吡啶美辛组肝小叶中央静脉壁纤维染色,汇管区及小

叶间隔有少量纤维沉积,未见肝组织出现纤维增生表
 现(图 6)。

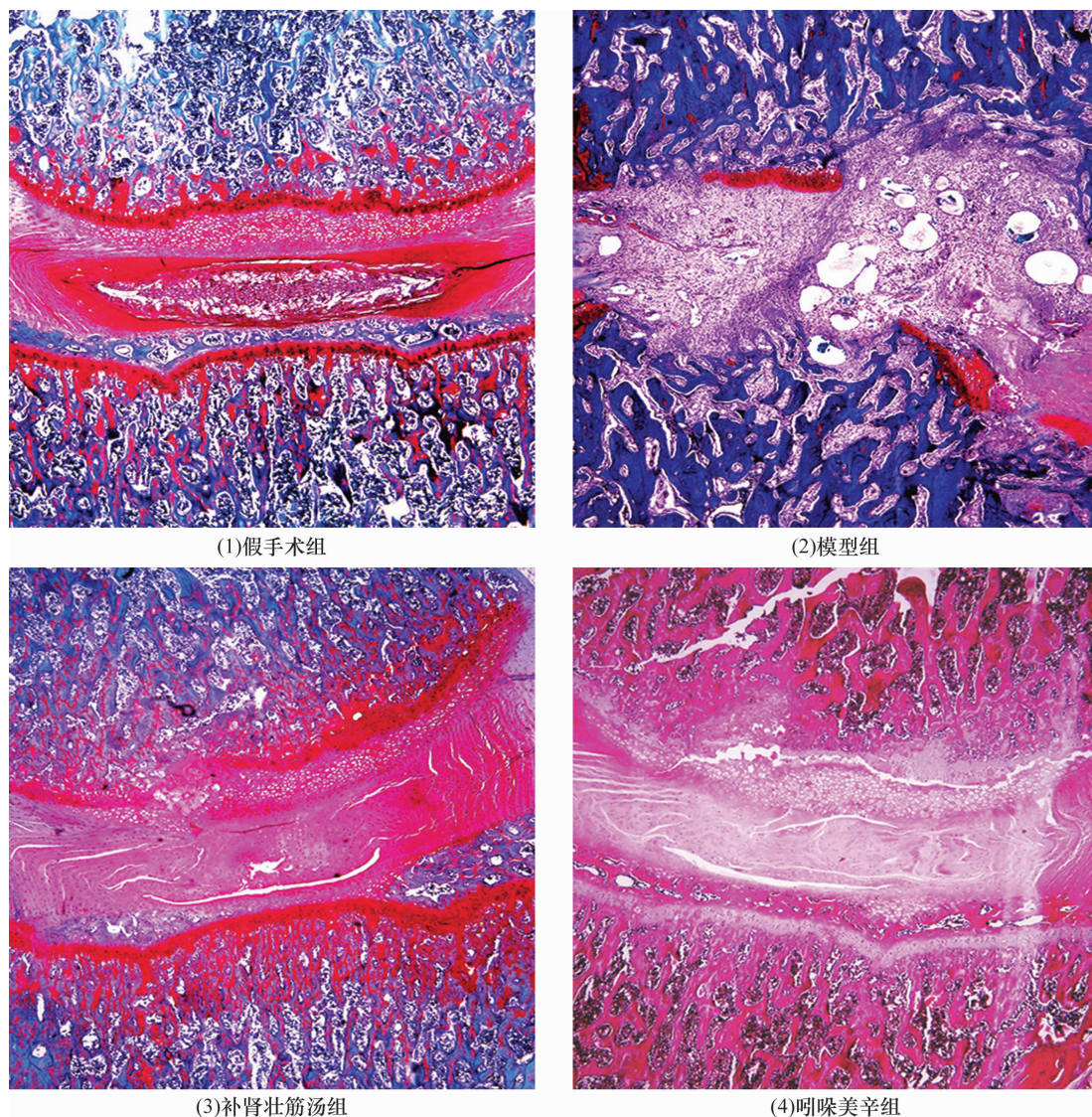


图 4 大鼠椎间盘组织改良番红-O 固绿染色结果(×40)

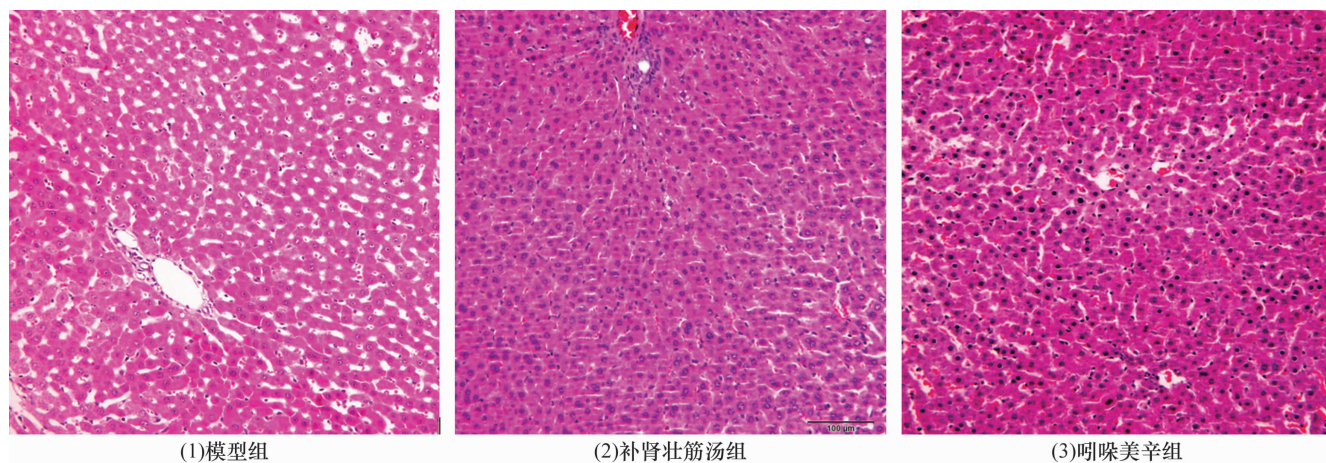


图 5 大鼠肝脏组织 HE 染色结果(×40)

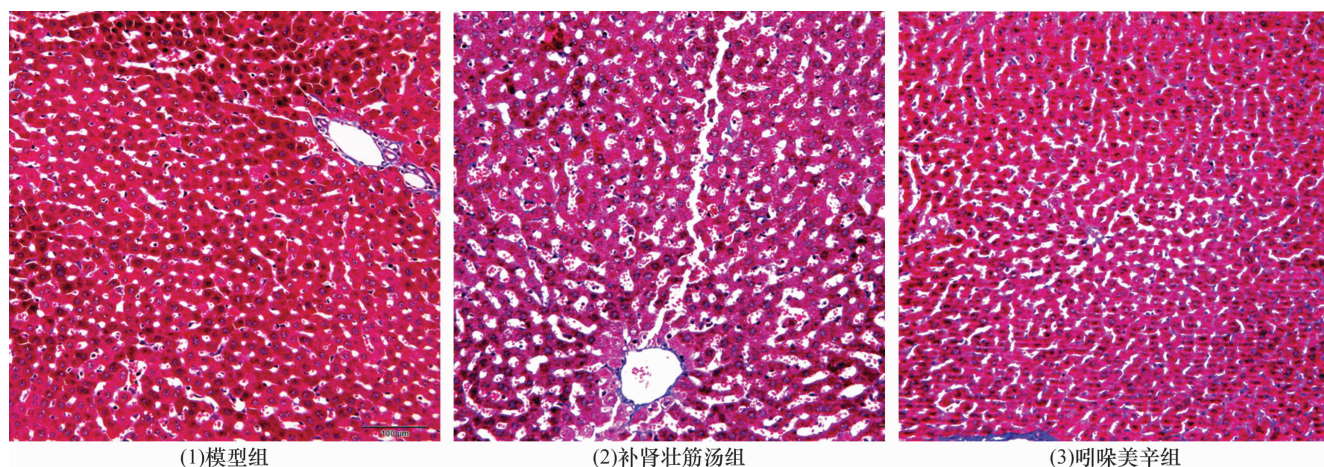


图 6 大鼠肝脏组织 Masson 染色结果 (×40)

3.3.3 大鼠肾脏组织 HE 染色结果显示:模型组、补肾壮筋汤组及诃梨美辛组大鼠肾组织未见明显病变,肾小球、近端小管、远端小管和集合管的大小、形态正常,未见小管扩张,间质水肿、炎症细胞浸润及间质纤维化改变(图 7)。

Masson 染色结果显示:模型组、补肾壮筋汤组及诃梨美辛组大鼠肾脏标本中肾小球基底膜、肾小管基底膜、系膜基质呈蓝色,肾间质无明显胶原纤维,未见肾组织出现纤维增生表现(图 8)

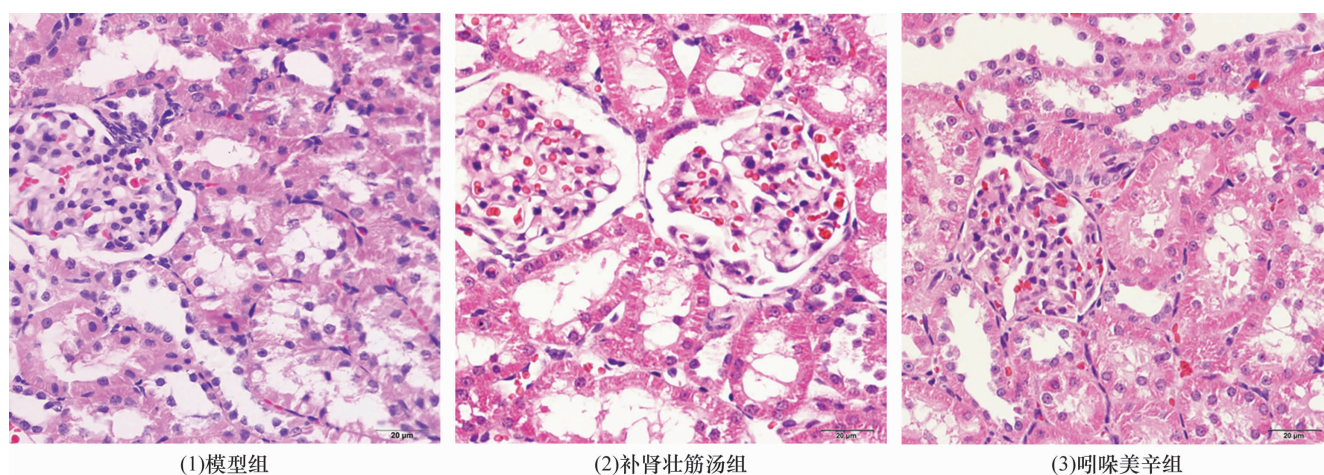


图 7 大鼠肾脏组织 HE 染色结果 (×100)

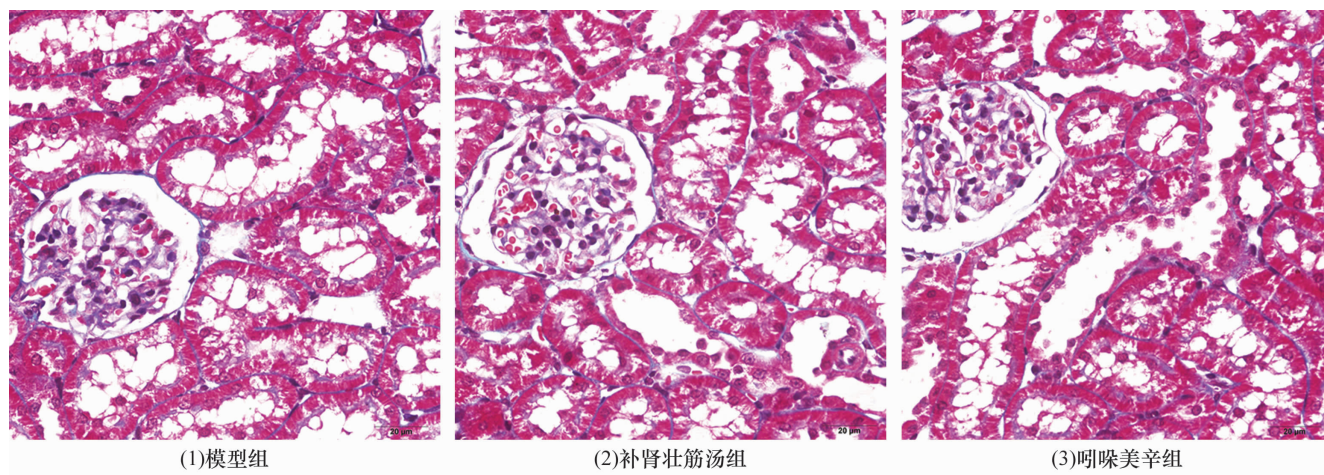


图 8 大鼠肾脏组织 Masson 染色结果 (×100)

4 讨 论

在疼痛与镇痛的神经理物学研究中,痛阈值的测量是必要的。机械痛阈测量通常采用经典的 Von Frey 纤毛机械痛阈刺激法^[8],但 Von Frey 的测量值是间断的,且操作较为复杂,因此我们选用了精度更高、操作简单的电子式机械测痛仪进行测量。大鼠椎间盘退变引起疼痛的原因主要有 2 个方面^[1,9]:①退变椎间盘释放炎性因子与趋化因子到周围组织引起退变局部炎症反应。在此过程中,背根神经节中伤害感受纤维会伴随免疫细胞的浸润而附着于退变间盘周围,而椎间盘周围炎症的聚集又逆行刺激背根神经节中的疼痛因子(如扩血管物质降钙素基因相关肽或 P 物质)的表达引起椎间盘源性疼痛。②随着椎间盘退变的进一步加剧,纤维环破裂,髓核突出,椎体间隙高度下降等系列变化,加之周围炎性浸润肉芽组织增生使得椎间孔内空间变窄,神经结构受到压迫,在化学刺激与物理压迫的双重作用下引起神经根痛症状。实验结果表明,补肾壮筋汤和吡哌美辛均能改善椎间盘退变大鼠的疼痛过敏症状,二者的效果相当。补肾壮筋汤可能是通过减少退变间盘中炎性因子的表达从而降低了炎症依赖性伤害感受纤维的输入与异常感觉的输出,从而缓解了痛觉过敏症状的产生。

改良 Rivlin 法斜板实验在脊髓损伤修复及再生^[10]、坐骨神经损伤及修复^[11]等运动系行为学评价中应用较多,故本次研究也进行了相关检测。结果显示,补肾壮筋汤和吡哌美辛均能提高椎间盘退变大鼠的斜板实验角度,至药物干预后 5 周时开始补肾壮筋汤的作用效果优于吡哌美辛。

组织学检查一直是评估各种组织病变的“金标准”。本研究中椎间盘 HE 染色及改良番红 O 固绿染色显示,模型组退变最为严重,补肾壮筋汤组与吡哌美辛组也均存在退变,3 组中补肾壮筋汤组退变程度最轻。肝肾组织学检测及肝肾功能血清学检测说明补肾壮筋汤并未对大鼠肝肾组织及肝肾功能产生明显的损伤。现代药理学研究显示,补肾壮筋汤能够抑制 IL-1 β 、TNF- α 等炎性因子表达,从而延缓骨关节炎软骨退变^[6-7]。从分子病理学角度可将椎间盘退变的机制概括为椎间盘内部分解合成代谢失衡所引起的以分解代谢为主的退行性改变。在此,由椎间盘退变而最终导致腰痛的过程大致可分为以下 3 个阶段^[12]:①椎间盘细胞受到外界刺激后自身合成以

TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 及趋化因子等为代表的炎症因子,炎症因子通过椎间盘细胞的自分泌及旁分泌作用反作用于自身,进一步促进细胞分泌基质分解酶(MMPs 及 ADAMTS4)分解细胞外基质,造成椎间盘退变并最终引起纤维环破裂,髓核突出;②在趋化因子与炎症因子的协同作用下,募集免疫细胞从周围循环趋化至病变部位,进一步引起炎症级联放大反应;③由免疫细胞及突出的间盘细胞产生的神经发生因子如 NGF 与 BDNF 诱导背根神经节产生疼痛相关阳离子通道如 ASIC3 与 Trpv1,并最终引起腰痛。由此可推断,补肾壮筋汤在延缓椎间盘退变及改善大鼠行为学评分的作用机制可能是抑制椎间盘中 IL-1 β 、TNF- α 等炎性因子表达,并通过抑制 NF- κ B 与 MAPK 信号通路的激活从而延缓了上述椎间盘退变 3 个阶段的进展速率。

本次研究表明,补肾壮筋汤在延缓腰椎间盘突出大鼠椎间盘退变及改善其行为学特征方面具有一定作用,效果略优于吡哌美辛,短期应用不会对肝肾组织及肝肾功能造成损伤,但长期应用的安全性仍需要进一步基础实验与临床试验来验证。

5 参考文献

- [1] VERGROESEN PP, KINGMA I, EMANUEL KS, et al. Mechanics and biology in intervertebral disc degeneration: a vicious circle[J]. Osteoarthritis and Cartilage, 2015, 23(7): 1057-1070.
- [2] 钱秀昌. 伤科补要[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1981: 19-45.
- [3] 蔚晓慧, 刘桂荣, 张成燕. 薛己外科学术思想及诊疗特点探析[J]. 时珍国医国药, 2013, 24(1): 184-185.
- [4] 王利群. 《伤科补要》特色探析[J]. 中医文献杂志, 2013, (2): 30-31.
- [5] 刘浩. 补肾壮筋汤治疗膝关节骨性关节炎疗效观察[J]. 实用中医药杂志, 2013, 29(7): 543.
- [6] 梁杰, 柳维林, 韩平, 等. 补肾壮筋汤对兔膝关节炎软骨形态学和骨架蛋白 ROCK, Cofilin, Phospho-Cofilin, LIMK1 和 Phospho-LIMK1 的影响[J]. 中华中医药杂志, 2015, 30(10): 3732-3735.
- [7] 李西海, 梁文娜, 党传鹏, 等. 补肾壮筋汤抑制炎性细胞因子表达延缓骨关节炎软骨退变的研究[J]. 风湿病与关节炎, 2014, 3(5): 20-25.
- [8] DIOCHOT S, ALLOUI A, RODRIGUES P, et al. Analgesic effects of mambalgin peptide inhibitors of acid-sensing ion channels in inflammatory and neuropathic pain[J]. Pain, 2016, 157(3): 552-559.

(下转第 26 页)

(上接第 20 页)

- [9] FENG C, LIU H, YANG M, et al. Disc cell senescence in intervertebral disc degeneration: Causes and molecular pathways[J]. Cell Cycle, 2016, 15(13): 1674 – 1684.
- [10] FÜHRMANN T, TAM RY, BALLARIN B, et al. Injectable hydrogel promotes early survival of induced pluripotent stem cell – derived oligodendrocytes and attenuates longterm teratoma formation in a spinal cord injury model[J]. Biomaterials, 2016, 83: 23 – 36.
- [11] DONG HY, JIANG XM, NIU CB, et al. Cerebrolysin improves sciatic nerve dysfunction in a mouse model of diabetic peripheral neuropathy [J]. Neural Regen Res, 2016, 11(1): 156 – 162.
- [12] RISBUD MV, SHAPIRO IM. Role of cytokines in intervertebral disc degeneration: pain and disc content[J]. Nat Rev Rheumatol, 2014, 10(1): 44 – 56.
- (2017-05-30 收稿 2017-06-20 修回)