

伸筋活血汤对低氧诱导因子-1 α 缺失小鼠椎间盘退变的影响

许勇, 薛彬, 孟祥超, 李中伟, 奚小冰, 李飞跃

(上海交通大学医学院附属瑞金医院, 上海 200025)

摘要 目的:观察伸筋活血汤对低氧诱导因子(hypoxia-inducible factor, HIF)-1 α 缺失小鼠椎间盘退变的影响。**方法:**通过杂交繁殖获得同窝 HIF-1 α 缺失小鼠和正常小鼠。取 2、4、8 周龄 HIF-1 α 缺失小鼠及正常小鼠, 每个时间点 2 种小鼠各取 5 只, 处死后取 L₃~L₅ 节段腰椎组织制备切片, 分别进行 HE 染色和番红-固绿染色。取 16 只 4 周龄 HIF-1 α 缺失小鼠, 随机分为 2 组, 每组 8 只, 分别以伸筋活血汤和生理盐水灌胃。灌胃每次 0.12 mL, 每天 1 次, 共 30 d。处死小鼠取 L₃~L₅ 节段腰椎组织制备切片, 分别进行 HE 染色、番红-固绿染色及免疫组化染色后观察。**结果:**HE 染色显示, 与正常小鼠相比, 2 周龄 HIF-1 α 缺失小鼠髓核占整个椎间盘组织的比例减少, 髓核中的细胞仍以含有大液泡的脊索细胞为主, 但已有大量髓核细胞变小, 髓核内细胞结构排列稍紊乱; 4 周龄 HIF-1 α 缺失小鼠椎间盘内的细胞种类和数量迅速下降, 髓核细胞排列紊乱; 8 周龄 HIF-1 α 缺失小鼠髓核细胞数量减少十分明显, 纤维组织填充于髓核中, 细胞外基质增加。番红-固绿染色显示, 与正常小鼠相比, 2 周龄 HIF-1 α 缺失小鼠椎间盘中聚集蛋白聚糖减少, 4 周龄 HIF-1 α 缺失小鼠椎间盘中聚集蛋白聚糖减少更加明显, 8 周龄 HIF-1 α 缺失小鼠髓核出现裂痕及钙化, 髓核骨化明显。4 周龄 HIF-1 α 缺失小鼠经药物干预 30 d 后, HE 染色结果显示, 伸筋活血汤组小鼠椎间盘终板无明显破损和骨化, 髓核细胞数量较多, 排列较整齐; 生理盐水组小鼠椎间盘髓核内细胞呈梭形, 体积变小, 数量明显减少, 排列严重紊乱, 细胞外基质增加, 髓核中出现裂痕, 纤维组织填充于髓核中, 甚至出现终板破坏。番红-固绿染色结果显示, 伸筋活血汤组小鼠骨和软骨终板染色明显, 椎间盘髓核内细胞数量较多, 椎间盘骨化现象不明显; 生理盐水组骨和软骨终板染色较浅, 出现裂痕及钙化, 细胞数量极少。免疫组化染色结果显示, 伸筋活血汤组聚集蛋白聚糖阳性染色的细胞数量明显较多, 阳性信号多分布在细胞内; 生理盐水组聚集蛋白聚糖阳性染色的细胞数量较少, 阳性信号多分布在细胞外。生理盐水组聚集蛋白聚糖阳性染色细胞的灰度值小于伸筋活血汤组(129.889 \pm 9.839, 154.333 \pm 9.622, $t=0.200$, $P=0.000$)。**结论:**HIF-1 α 缺失可导致小鼠椎间盘退变, 伸筋活血汤能够延缓 HIF-1 α 缺失小鼠的椎间盘退变。

关键词 椎间盘退行性变; 缺氧诱导因子 1; 伸筋活血汤; 小鼠; 动物实验

Effect of Shenjin Huoxue Tang(伸筋活血汤) on intervertebral disc degeneration in mice with hypoxia-inducible factor-1 α deficiency

XU Yong, XUE Bin, MENG Xiangchao, LI Zhongwei, XI Xiaobing, LI Feiyue

Ruijin Hospital affiliated to Shanghai Jiaotong University medical college, Shanghai 200025, China

ABSTRACT Objective:To observe the effect of Shenjin Huoxue Tang(伸筋活血汤, SJHXT) on intervertebral disc degeneration in mice with hypoxia-inducible factor(HIF)-1 α deficiency. **Methods:**The littermate HIF-1 α deficiency mice and normal mice were obtained through crossbreeding. Two-, 4- and 8-week-old HIF-1 α deficiency mice and normal mice were fetched, and 5 cases were randomly selected from each kind of mice at each time point and were executed, and then their vertebral tissues of L₃-L₅ were fetched out and were sectioned for HE staining and safranin O-fast green staining. Sixteen 4-week-old HIF-1 α deficiency mice were fetched and were randomly divided into 2 groups, 8 cases in each group, and they were intragastric administrated with SJHXT(SJHXT group) and normal saline(NS group) respectively, 0.12 mL at a time, once a day for consecutive 30 days. Then the mice were executed, and their vertebral tissues of L₃-L₅ were fetched out and were sectioned for HE staining, safranin O-fast green staining and immunohistochemical staining. **Results:**The HE staining results showed that, compared to normal mice, (1) the proportion of nucleus pulposus to whole intervertebral disc of 2-week-old HIF-1 α deficiency mice decreased, and the cells in nucleus pulposus were still dominated by notochord cells containing large vacuoles, and a large number of nucleus pulposus cells shrunk and their intracellular structure was slightly disorganized; (2) the cell type

基金项目:上海市中医药传承和创新项目(ZY3-CCCX-1-1014);上海市名老中医学术经验研究工作室建设项目(SHGZS-2017010);2017年全国名老中医专家传承工作室建设项目(MLZJGZS-2017001)

通讯作者:李飞跃 E-mail:sklifeiyue@163.com

and number decreased rapidly in intervertebral disc and nucleus pulposus cells were disorganized in 4-week-old HIF-1 α deficiency mice; (3) the nucleus pulposus cells decreased obviously and the extracellular matrix increased and the nucleus pulposus was filled with fibrous tissues in 8-week-old HIF-1 α deficiency mice. The safranin O-fast green staining results showed that, compared to normal mice, the aggrecan in intervertebral disc decreased in 2-week-old HIF-1 α deficiency mice and decreased more obviously in 4-week-old HIF-1 α deficiency mice; and cracks, calcifications and obvious ossification appeared in nucleus pulposus in 8-week-old HIF-1 α deficiency mice. After 30-day drug intervention on 4-week-old HIF-1 α deficiency mice, the HE staining results showed that (1) no obvious damage and ossification were found in intervertebral disc endplate and a large number of nucleus pulposus cells arranged in order in mice of SJHXT group; (2) the cells in intervertebral disc nucleus pulposus of mice in NS group decreased in volume and number and presented with fusiform cells and arranged in great disorder, moreover, the extracellular matrix increased and cracks and a large amount of fibrous tissues were found in nucleus pulposus and the destroyed endplate was also found. The safranin O-fast green staining results showed that (1) the stains in bony and cartilaginous endplates were obvious in mice of SJHXT group, moreover, there were abundant cells in intervertebral disc nucleus pulposus, and the intervertebral disc ossification was not so obvious; (2) the stains presented with light colour in bony and cartilaginous endplates of mice in NS group, moreover, cracks, calcifications and few cells appeared in bony and cartilaginous endplates. The immunohistochemical staining results showed that many cells with positive aggrecan staining were found in SJHXT group and few cells with positive aggrecan staining were found in NS group; and the positive signals mainly distributed inside the cells in SJHXT group and outside the cells in NS group. The gray values of cells with positive aggrecan staining were less in NS group compared to SJHXT group (129.889 \pm 9.839, 154.333 \pm 9.622, $t=0.200$, $P=0.000$). **Conclusion:** HIF-1 α deficiency can lead to intervertebral disc degeneration in mice, and SJHXT can delay intervertebral disc degeneration in mice with HIF-1 α deficiency.

Keywords intervertebral disc degeneration; hypoxia-inducible factor-1; Shenjin Huoxue Tang; mice; animal experimentation

伸筋活血汤是瑞金医院已故名老中医魏指薪教授经长期临床实践总结出的经验方,作为院内制剂已使用 30 余年。方中包含伸筋草、木瓜、白芍、甘草、当归、川牛膝、秦艽、桑寄生、狗脊、续断、制乳香、制没药共 12 味中药^[1-2],具有伸筋活络、活血镇痛的功效,主治跌打损伤、劳损、寒湿入络、腰膝顽痛、麻木不利等症,而且该方对于腰椎间盘突出症等脊柱退行性疾病也有良好的疗效^[3]。低氧诱导因子(hypoxia-inducible factor, HIF)-1 α 在椎间盘组织细胞中明显表达,对椎间盘退变发展起重要调节作用。本研究观察了伸筋活血汤对 HIF-1 α 缺失小鼠椎间盘退变的影响,现总结报告如下。

1 材料与仪器

1.1 实验动物 雌性 HIF-1 α -FLOX 纯合子小鼠、野生型 C57BL6 清洁级小鼠,由上海市伤骨科研究所提供;雄性 Shh-Cre 杂合小鼠,购自 Jackson Laboratory。实验方案通过医学动物实验伦理委员会批准。

1.2 实验药物与试剂 伸筋活血汤(上海交通大学医学院附属瑞金医院院内制剂,批准文号:沪药制字 Z05100655),药物组成包括伸筋草 6 g、木瓜 6 g、白芍 9 g、甘草 3 g、当归 9 g、川牛膝 9 g、秦艽 4.5 g、桑寄生 9 g、狗脊 9 g、续断 9 g、制乳香 9 g、制没药 9 g; EDTA、多聚甲醛、戊巴比妥钠、BSA(Sigma 公司); PBS 缓冲

液、梯度酒精、二甲苯、苏木素-伊红染液、番红-固绿染液(上海市伤骨科研究所提供);石蜡、中性树脂[生工生物工程(上海)股份有限公司];鼠尾 DNA 快速提取试剂盒(QIAGEN 公司);引物合成(上海 Invitrogen 公司);兔抗鼠 anti-AggreCAN 抗体(Abcam 公司);山羊抗兔 IgG、Super Sensitive TMIHC 试剂盒(Thermo 公司)。

1.3 实验仪器 ASP 200S 自动脱水机、EG1150H 石蜡包埋机、RM2235 石蜡切片机、HI1220 烘片机(Leica 公司),GP10 水浴箱、THM51005691 电热恒温鼓风干燥箱(Thermo 公司),CX22 普通光学显微镜(Olympus 公司),载玻片、湿盒(上海市伤骨科研究所提供),1.5 mL 离心管、0.2 mL 聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)管、DNA Engine PCR 仪、琼脂糖凝胶电泳槽(Bio-Rad 公司),Tanon 2500 全自动数码凝胶图像分析系统(上海天能科技有限公司)。

2 方法

2.1 构建 HIF-1 α 缺失小鼠模型 雌性纯合子 HIF-1 $\alpha^{\text{flox/flox}}$ 小鼠与雄性杂合子 Shh-CRE $^{+/-}$ 小鼠杂交,繁殖出“Shh-CRE $^{+/-}$, HIF-1 $\alpha^{\text{flox/+}}$ ”和“Shh-CRE $^{-/-}$, HIF-1 $\alpha^{\text{flox/+}}$ ”2 种基因型小鼠,对小鼠进行基因型鉴定,选择基因型为“Shh-CRE $^{+/-}$, HIF-1 $\alpha^{\text{flox/+}}$ ”的雄性小鼠与雌性纯合子 HIF-

$1\alpha^{\text{flox/flox}}$ 小鼠杂交, 采用 PCR 法进行基因型鉴定, 最终确定基因型为“Shh - CRE^{+/+}, HIF - $1\alpha^{\text{flox/flox}}$ ”的小鼠为 HIF - 1α 缺失小鼠。将此基因型小鼠与雌性纯合子 HIF - $1\alpha^{\text{flox/flox}}$ 小鼠杂交, 从而不断获得 HIF - 1α 缺失小鼠和正常小鼠。

2.2 观察 HIF - 1α 缺失对小鼠椎间盘退变的影响

取 2、4、8 周龄 HIF - 1α 缺失小鼠及正常小鼠, 每个时间点 2 种小鼠各取 5 只, 以戊巴比妥钠麻醉, 颈椎脱臼法处死, 取 L₃ ~ L₅ 节段腰椎组织制备切片, 分别进行 HE 染色和番红 - 固绿染色。

2.2.1 切片制备 将所取得的小鼠 L₃ ~ L₅ 节段椎体标本置于 4% 多聚甲醛中, 于 4 ℃ 浸泡 48 h, PBS 液冲洗 10 min, 置于 10% EDTA 脱钙液中脱钙, 3 d 更换 1 次脱钙液, 约 5 ~ 8 周, 待骨组织发生软化时, 终止脱钙。将标本冲洗过夜, 经过梯度脱水后以石蜡包埋, 矢状位连续切片 (厚度 5 μm)。

2.2.2 组织化学染色 HE 染色时, 切片常规脱蜡至水, 苏木精染色 5 min, 盐酸分化, 蓝化 15 min, 伊红染液染 1 min; 番红 - 固绿染色时, 切片常规脱蜡至水, 固绿染色 30 min, 1% 醋酸冲洗, 然后番红染色 3 min。染色后切片冲洗脱水透明, 中性树胶封片, 光镜下观察。

2.3 观察伸筋活血汤对 HIF - 1α 缺失小鼠椎间盘退变的影响 取 16 只 4 周龄 HIF - 1α 缺失小鼠, 随机分为生理盐水组和伸筋活血汤组, 每组 8 只。按照成年人的体质量 60 kg, 伸筋活血汤每天 40 mL 计算, 伸筋活血汤组小鼠伸筋活血汤用量约为 0.12 mL (按照体质量 20 g 计算), 灌胃给药, 每天 1 次; 生理盐水组以等量生理盐水灌胃。共干预 30 d, 第 31 天以戊巴比妥钠麻醉, 颈椎脱臼法处死小鼠, 取各组小鼠 L₃ ~ L₅ 节段腰椎组织制备切片, 分别进行 HE 染色、番红 - 固绿染色及免疫组化染色后观察。制备切片、HE 染色、番红 - 固绿染色方法同上。免疫组化染色方法如下: 将切片常规脱蜡至水, 在柠檬酸盐修复液中加热煮沸 15 min, 取出后缓慢冷却至室温, PBS 冲洗晾干。首先去除内源性过氧化物酶干扰, 蛋白酶 K 消化 10 min, 5% BSA 封闭, 伸筋活血汤组滴加兔抗鼠 anti - Aggrecan (1:200) (一抗), 生理盐水组滴加等剂量的一抗稀释液。4 ℃ 过夜, 滴加生物素标记的山羊抗兔 IgG (二抗), 37 ℃ 孵育 15 min, 抗生物素链菌素 - HRP 37 ℃ 孵育 1 h, DAB 显色剂显色 5 ~ 8 min, 苏木精复染, 常规脱水透明, 中性树胶封固。应用 Image J 图

片分析软件, 每个样本取 3 个视野范围进行统计分析。

2.4 统计分析数据 采用 SPSS15.0 软件进行数据统计分析。2 组聚集蛋白聚糖阳性染色细胞灰度值的比较采用 *t* 检验。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

3 结 果

3.1 HIF - 1α 缺失对小鼠椎间盘退变的影响 HE 染色显示: 与正常小鼠相比, 2 周龄 HIF - 1α 缺失小鼠髓核占整个椎间盘组织的比例减少, 髓核中的细胞仍以含有大液泡的脊索细胞为主, 但已有大量髓核细胞变小, 髓核内细胞结构排列稍紊乱; 4 周龄 HIF - 1α 缺失小鼠椎间盘内的细胞种类和数量迅速下降, 髓核细胞排列紊乱; 8 周龄 HIF - 1α 缺失小鼠髓核细胞数量减少十分明显, 纤维组织填充于髓核中, 细胞外基质增加 (图 1)。番红 - 固绿染色显示: 与正常小鼠相比, 2 周龄 HIF - 1α 缺失小鼠椎间盘中聚集蛋白聚糖减少, 4 周龄 HIF - 1α 缺失小鼠椎间盘中聚集蛋白聚糖减少更加明显, 8 周龄 HIF - 1α 缺失小鼠髓核出现裂痕及钙化, 髓核骨化明显 (图 2)。

3.2 伸筋活血汤对 HIF - 1α 缺失小鼠椎间盘退变的影响 HE 染色结果显示: 伸筋活血汤组小鼠椎间盘终板无明显破损和骨化, 髓核细胞数量较多, 排列较整齐; 生理盐水组小鼠椎间盘髓核内细胞呈梭形, 体积变小, 数量明显减少, 排列严重紊乱, 细胞外基质增加, 髓核中出现裂痕, 纤维组织填充于髓核中, 甚至出现终板破坏 (图 3)。番红 - 固绿染色结果显示: 伸筋活血汤组小鼠骨和软骨终板染色明显, 椎间盘髓核内细胞数量较多, 椎间盘骨化现象不明显; 生理盐水组骨和软骨终板染色较浅, 出现裂痕及钙化, 细胞数量极少 (图 4)。免疫组化染色结果显示: 伸筋活血汤组聚集蛋白聚糖阳性染色的细胞数量明显较多, 阳性信号多分布在细胞内; 生理盐水组聚集蛋白聚糖阳性染色的细胞数量较少, 阳性信号多分布在细胞外 (图 5)。生理盐水组聚集蛋白聚糖阳性染色细胞的灰度值小于伸筋活血汤组 ($129.889 \pm 9.839, 154.333 \pm 9.622, t = 0.200, P = 0.000$)。

4 讨 论

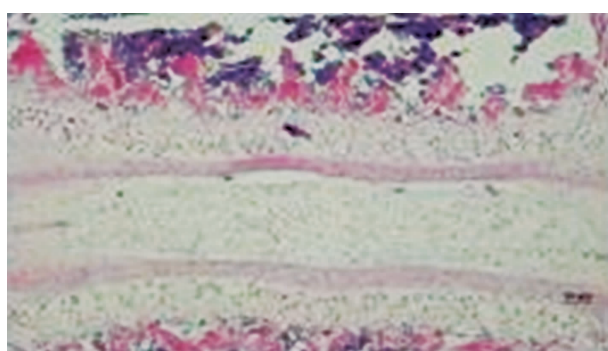
随着老龄化社会的到来, 和年龄相关的脊柱退行性疾病日益普遍^[4]。电脑、智能手机等数码电子产品的长时间不恰当使用, 使得脊柱退行性疾病发病日益年轻化。椎间盘发生退变是许多脊柱退行性疾病的基础始动环节^[5-6]。HIF - 1α 是一种介导哺

乳动物细胞内低氧反应的核转录复合体,对细胞增殖、迁移及凋亡等有重要调节作用,且在椎间盘细胞中明显表达。在低氧环境中髓核细胞可表达 HIF-1 α ,而 HIF-1 α 参与了髓核细胞增殖、新陈代谢、细胞外基质合成及椎间盘组织钙化等活动,对椎间盘退变发展起重要调节作用^[7-9]。

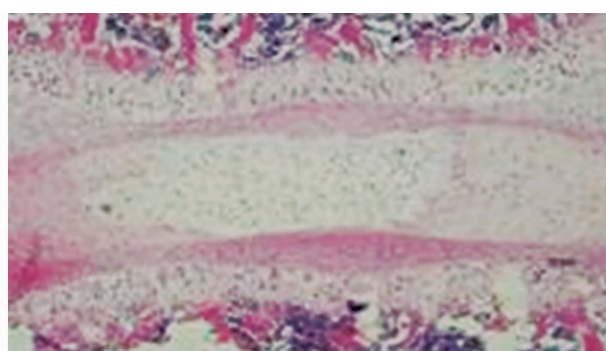
慢性脊柱退变属于中医“痹证”范畴。中医学理论认为,该病的发生发展与外力损伤、素体虚弱、先天肾气不足、外感风寒湿邪的侵袭及肾气衰退有直接关联。主要病机是气血痹阻不通,筋脉关节失于濡养。其治则为祛风除湿、活血通络,同时补益肝肾、强壮筋骨^[10]。伸筋活血汤是瑞金医院已故名老中医魏指薪教授总结出的经验方。方中君药伸筋草有舒筋活血、祛风散寒止痛的作用;配合桑寄生、狗脊、续断可强筋骨、补肝肾、祛风湿、通行血脉;木瓜、白芍、甘草可酸

甘化阴,舒筋解肌;制乳没、当归可活血化瘀止痛;川牛膝、秦艽合用祛风化湿通络。诸药合用,共奏祛风通络、活血止痛、舒筋解肌、补肝肾、强筋骨之效。

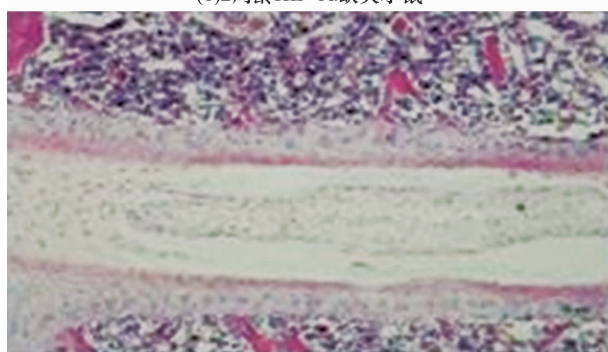
本实验中条件性敲除小鼠髓核细胞 HIF-1 α 基因后,小鼠椎间盘发生明显退变,这与 Merceron 等^[11]的报道一致。伸筋活血汤干预 30 d 后,与生理盐水组比较,小鼠髓核细胞数量增多,排列较整齐,髓核中裂痕减少,终板破损和骨化延缓,表明伸筋活血汤能够延缓 HIF-1 α 缺失小鼠的椎间盘退变。中药治疗颈腰痛的作用是多途径的,中药对椎间盘退变的影响亦是通过作用于多个环节或靶点来实现的^[12],主要包括抑制细胞凋亡、增加椎间盘营养供应、抑制椎间盘组织细胞外基质降解及抑制炎症介质释放^[13-15]。伸筋活血汤影响椎间盘退变的具体作用靶点及机制还需大量的研究来进一步阐明。



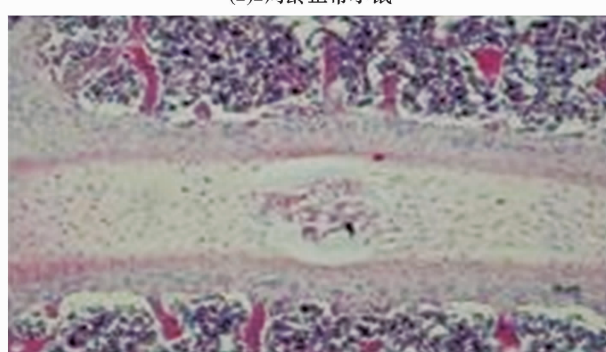
(1)2周龄HIF-1 α 缺失小鼠



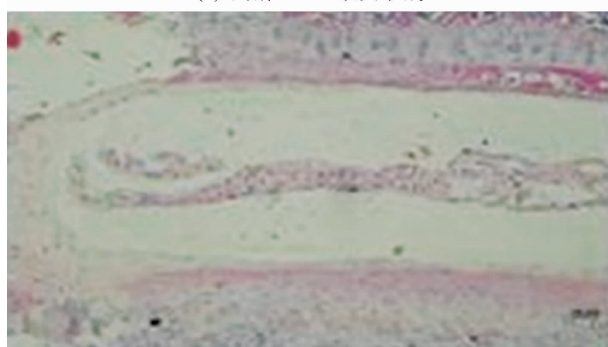
(2)2周龄正常小鼠



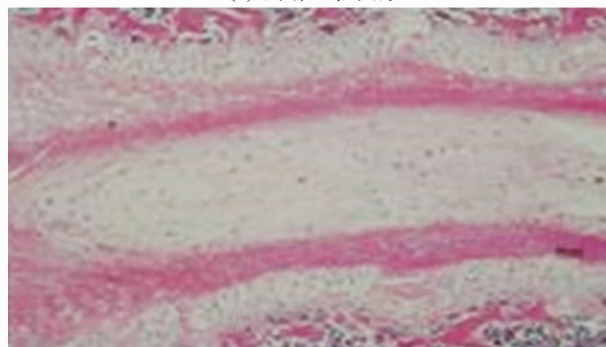
(3)4周龄HIF-1 α 缺失小鼠



(4)4周龄正常小鼠



(5)8周龄HIF-1 α 缺失小鼠



(6)8周龄正常小鼠

图1 HIF-1 α 缺失小鼠和正常小鼠椎间盘组织 HE 染色结果(×100)

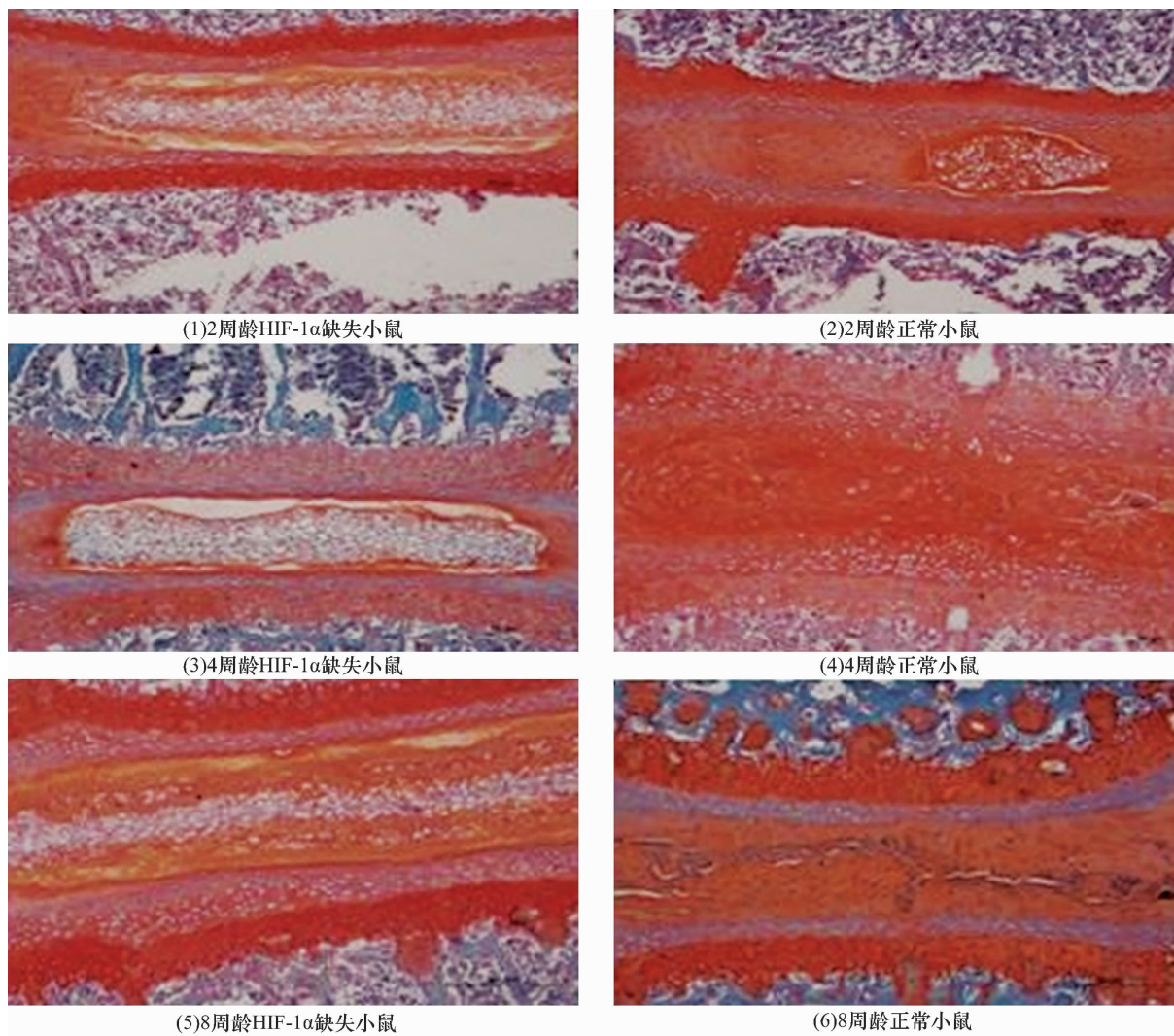


图2 HIF-1 α 缺失小鼠和正常小鼠椎间盘组织番红-固绿染色结果(×100)

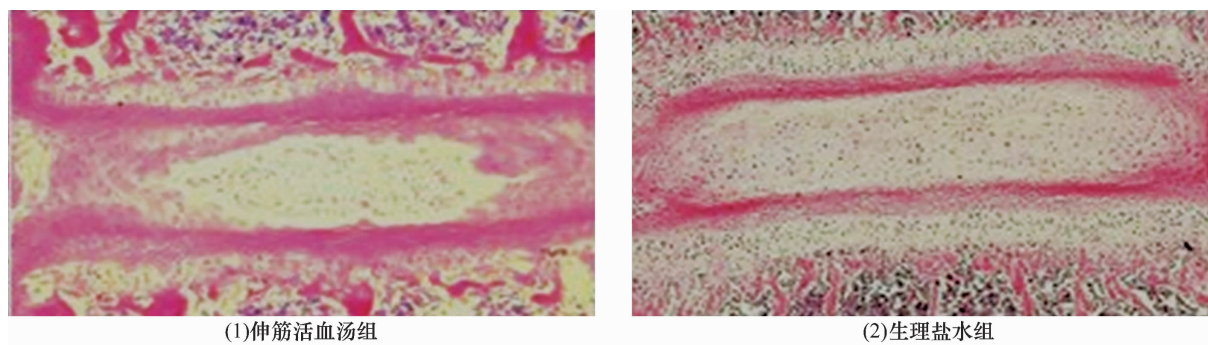


图3 2组 HIF-1 α 缺失小鼠椎间盘组织 HE 染色结果(×100)

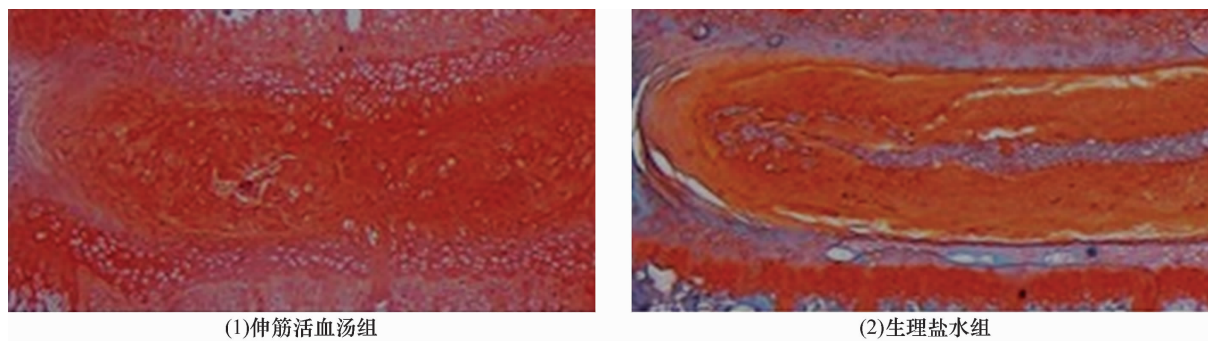
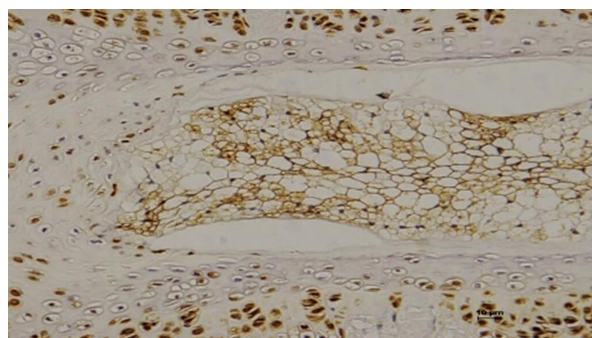
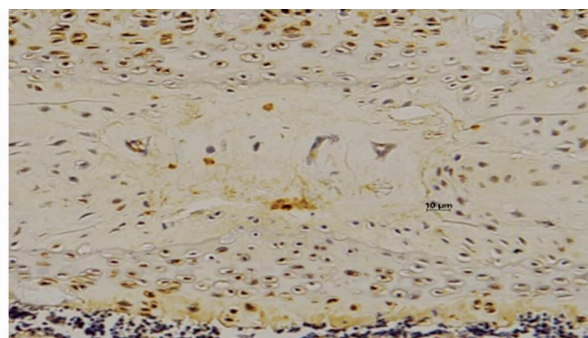


图4 2组 HIF-1 α 缺失小鼠椎间盘组织番红-固绿染色结果(×100)



(1)伸筋活血汤组



(2)生理盐水组

图 5 2 组 HIF-1 α 缺失小鼠椎间盘组织免疫组化染色结果 (×200)

本研究的结果提示, HIF-1 α 缺失可导致小鼠椎间盘退变, 伸筋活血汤能够延缓 HIF-1 α 缺失小鼠的椎间盘退变。

5 参考文献

- [1] 于建华. 二十世纪中医药最佳处方——骨伤科卷[M]. 北京:学苑出版社, 2002:236.
- [2] 杨婉花, 林兰, 李娟, 等. 伸筋活血合剂安全性评价实验[J]. 药学服务与研究, 2010, 10(6):465-467.
- [3] 刘涛, 张昊. 伸筋活血汤治疗腰椎间盘突出症疗效观察[J]. 陕西中医, 2014, 35(11):1533-1534.
- [4] 胥少汀. 脊柱退变性疾病相关问题[J]. 脊柱外科杂志, 2003, 1(2):124-126.
- [5] 李峰, 新燕, 霍洪军, 等. 退变性椎间盘疾病的遗传学研究现状[J]. 北方药学, 2012, 9(3):44-46.
- [6] 罗常, 杨大志. 椎间盘再生组织工程的研究进展[J]. 山东医药, 2017, 57(21):107-109.
- [7] 孟祥超, 王君, 张兴凯. 低氧诱导因子-1 α 与椎间盘退变[J]. 国际骨科学杂志, 2015, 36(4):264-268.
- [8] 陈涛, 杨建东, 黄泽楠, 等. 低氧诱导因子在调节椎间盘髓核细胞功能中的研究进展[J]. 中华临床医师杂志(电子版), 2016, 10(19):2898-2902.
- [9] 杨哲, 李树文. 脊索细胞维持椎间盘髓核软骨样细胞增殖与表型的研究进展[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(2):261-266.
- [10] 施杞, 王拥军. 慢性筋骨病与中医药防治研究[J]. 老年医学与保健, 2015, 21(2):65-67.
- [11] MERCERON C, MANGIAVINI L, ROBLING A, et al. Loss of HIF-1 α in the notochord results in cell death and complete disappearance of the nucleus pulposus[J]. PLoS One, 2014, 9(10):110768.
- [12] 许敬人, 詹红生. 椎间盘退变机制及中药对其的干预作用[J]. 临床和实验医学杂志, 2015, 14(19):1657-1660.
- [13] 陈祁青, 赵继荣, 李红专. 中药干预椎间盘退变的实验研究概况[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2011, 19(3):65-67.
- [14] LIANG QQ, XI ZJ, BIAN Q, et al. Herb formula "Fufang-qishe - Pill" prevents upright posture - induced intervertebral disc degeneration at the lumbar in rats[J]. J Pharmacol Sci, 2010, 113(1):23-31.
- [15] 李靖, 宋晓凯. 近年来国内外中药抗炎作用机制研究概况[J]. 实用药物与临床, 2012, 15(3):171-173.

(收稿日期:2017-10-09 本文编辑:李晓乐)