

腰腿痛胶囊对髓核移植型腰椎间盘突出症 大鼠模型背根神经节中 P 物质和降钙素基因 相关肽含量的影响

姜劲挺¹, 安文博²

(1. 甘肃中医学院附属医院, 甘肃 兰州 730020;

2. 甘肃中医学院 2009 级硕士研究生, 甘肃 兰州 730000)

摘要 目的:观察腰腿痛胶囊对髓核移植型腰椎间盘突出症大鼠模型背根神经节中 P 物质和降钙素基因相关肽含量的影响, 探讨腰腿痛胶囊治疗腰椎间盘突出症的作用机理。**方法:**将 48 只成年 SD 大鼠随机分为空白对照组、模型组、中药对照组及腰腿痛胶囊组, 每组 12 只。采用髓核移植的造模方法将除空白对照组外的其余各组大鼠制成腰椎间盘突出症大鼠模型。自造模后第 2 天开始, 腰腿痛胶囊组每日灌服腰腿痛胶囊与生理盐水配置的悬浊液, 中药对照组每天灌服腰腿痛丸与生理盐水配置的悬浊液, 空白对照组和模型组灌服等体积的生理盐水。连续灌胃 2 周后, 取各组大鼠尾段髓核移植于 L₄ ~ L₆ 邻近支脊神经背根神经节, 采用免疫组化法测定各组大鼠背根神经节中 P 物质和降钙素基因相关肽的含量。**结果:**①P 物质平均灰度。4 组大鼠 P 物质平均灰度比较, 差异有统计学意义 ($F = 19.912, P = 0.000$)。进一步两两比较, 模型组平均灰度大于空白对照组、中药对照组及腰腿痛胶囊组 ($P = 0.000; P = 0.000; P = 0.000$); 腰腿痛胶囊组平均灰度小于中药对照组 ($P = 0.000$)。②降钙素基因相关肽平均灰度。4 组大鼠降钙素基因相关肽平均灰度比较, 差异有统计学意义 ($F = 16.367, P = 0.000$)。进一步两两比较, 模型组平均灰度大于空白对照组 ($P = 0.000$); 腰腿痛胶囊组与模型组比较, 差异无统计学意义 ($P = 0.749$); 中药对照组大于模型组和腰腿痛胶囊组 ($P = 0.033, P = 0.000$)。**结论:**腰腿痛胶囊通过降低实验性腰椎间盘突出症大鼠背根神经节中 P 物质含量, 减轻由髓核组织对背根神经节的损伤和刺激而引起的疼痛, 这可能是腰腿痛胶囊治疗腰椎间盘突出症的作用机理之一。

关键词 腰腿痛 椎间盘移位 腰椎 神经节, 脊 P 物质 降钙素基因相关肽 动物实验

Effect of capsules for lumbago-leg pain on the contents of substance P and calcitonin gene-related peptide in dorsal root ganglia of rats models with lumbar disc herniation in nucleus pulposus transplantation type JIANG

Jin-ting*, AN Wen-bo. * University Hospital of Gansu Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, Gansu, China

ABSTRACT Objective: To observe the effect of capsules for lumbago-leg pain (CLLP) on the contents of substance P (SP) and calcitonin gene-related peptide (CGRP) in dorsal root ganglia of rats models with lumbar disc herniation (LDH) in nucleus pulposus transplantation type, and to explore the mechanism of capsules for lumbago-leg pain in the treatment of LDH. **Methods:** Forty-eight adult SD rats were randomly divided into blank control group, model group, traditional Chinese medicine (TCM) control group and CLLP group, 12 cases in each group. All the rats were administrated with modeling method of nucleus pulposus transplantation to build LDH rats models except those in the blank control group. From the second day after modeling, rats in CLLP group were administrated with suspension composed of CLLP and normal saline per day, cases in TCM control group were administrated with suspension composed of pills for lumbago-leg pain and normal saline per day, while the others in blank control group and model group were administrated with normal saline in the same volumes. After continuous 2 weeks of intragastric administration, caudal nucleus pulposus of rats were transplanted in dorsal root ganglia of spinal nerve near the L₄ ~ L₆, then SP and CGRP contents in dorsal root ganglia for all the rats were measured through using immunohistochemistry. **Results:** There were statistical differences in average gray scale of SP among the 4 groups ($F = 19.912, P = 0.000$). Average gray scale of SP in model group was higher than that of blank control group, TCM control group and CLLP group respectively ($P = 0.000; P = 0.000; P = 0.000$); and the average gray scale of SP in CLLP group was lower than that of TCM control group ($P = 0.000$). There were statistical differences in average gray scale of CGRP among the 4 groups ($F = 16.367, P = 0.000$). Average gray scale of CGRP of model group was

基金项目: 兰州市科技计划项目 (2004-1-62)

通讯作者: 安文博 E-mail: anwenbo200418@yahoo.com.cn

higher than that of blank control group ($P=0.000$); and there was no statistical difference between CLLP group and model group ($P=0.749$); and the average gray scale of CGRP of TCM control group was higher than that of model group and CLLP group respectively ($P=0.033, P=0.000$). **Conclusion:** The capsule for lumbago-leg pain can relieve the pain caused by the injuries and stimulations of dorsal root ganglia from nucleus pulposus through reducing SP contents in dorsal root ganglia of experimental LDH rats. It may be one of the mechanisms of action of the capsule for lumbago-leg pain in the treatment of LDH.

Key words Lumbago-leg pain; Intervertebral disk displacement; Lumbar vertebrae; Ganglia, spinal; Substance P; Calcitonin gene-related peptide; Animal experimentation

目前国内腰腿痛病人约占骨科门诊量的 70%，而腰椎间盘突出症病人占腰腿痛门诊病人量的 20% 左右^[1]。腰腿痛胶囊是治疗腰椎间盘突出症的中药制剂，临床疗效显著。为进一步研究其作用机理，笔者进行了相应的实验研究，现总结报告如下。

1 材料与仪器

1.1 实验动物 选用 SPF 级成年 SD 大鼠 48 只，雌雄各半，体质量 250 ~ 300 g，由中国科学院上海斯莱克实验动物中心提供，实验动物许可证号：SCXK(沪)2003-0003。

1.2 实验药物及试剂 腰腿痛胶囊，甘肃中医学院附属医院药剂科生产(科研批号：GQ2000B-19，院内生产批号：200308026)；腰腿痛丸，大连中药厂生产(国药准字 Z21022052)；即用型 ABC 法免疫组化试剂盒及 P 物质(substance P, SP)、降钙素基因相关肽(calcitonin gene-related peptide, CGRP)免疫组化试剂盒，均由武汉博士德公司提供。

1.3 实验仪器 LEICA TP1020 全自动组织脱水机、LEICA RM2135 精密切片机、OLYMPUS BX60 显微镜、WLJY-9000 伟力彩色精子分析系统及 CIAS-1000 型细胞图像分析系统。

2 方法

2.1 分组方法 采用随机数字表将 48 只大鼠分成空白对照组、模型组、中药对照组及腰腿痛胶囊组，每组 12 只。

2.2 造模方法 适应性喂养 1 周后，除空白对照组外，其余各组大鼠均用 $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 戊巴比妥钠腹腔内注射麻醉，麻醉起效后于尾根部距肛门约 1 cm 处切断尾椎，再缝合切口。将尾椎的髓核取出，用扭力天平称重后取 10 mg。然后将大鼠背部由正中切开，切除 $L_4 \sim L_6$ 的棘突及右侧椎板，于解剖显微镜下暴露右侧硬膜外腔，将取出的自体髓核轻轻放于硬膜外腔相当于 $L_4 \sim L_6$ 神经根的部位，注意勿压迫脊髓及神经根，最后逐层缝合切口。

2.3 药物干预方法 造模成功后，所有大鼠在 SPF 实验室雌雄分笼喂养，自由摄食，饮消毒纯净水。自造模后第 2 天开始，腰腿痛胶囊组每日灌服腰腿痛胶囊与生理盐水配置的悬浊液，每次 1 mL(含成药 0.107 g)，每日 1 次；中药对照组每日灌服腰腿痛丸与生理盐水配置的悬浊液 1 mL(含成药 0.042 g)。空白对照组和模型组灌服等体积的生理盐水。连续灌胃 1 周后停药 2 d，然后继续灌胃 1 周。

2.4 标本制作方法 药物干预结束后，采用乙醚吸入麻醉，经大鼠心脏升主动脉插管，先以 250 mL 生理盐水冲净血液，随即灌注含 4% 多聚甲醛的 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液 400 mL。取 $L_4 \sim L_6$ 节段髓核移植邻近支脊神经背根节，4℃ 固定 6 h，移入含 30% 蔗糖的 PBS 液中过夜至组织块沉底。然后经梯度酒精脱水→二甲苯透明→浸蜡→包埋等程序后切片，厚度 $4 \mu\text{m}$ 。

2.5 SP 和 CGRP 平均灰度测定 采用免疫组织化学 ABC 法将切片染色后随机抽取空白对照组、模型组、中药对照组及腰腿痛胶囊组切片各 8 张，用 CIAS-1000 型细胞图像分析系统对背根神经节内 SP 和 CGRP 阳性染色神经元的平均灰度进行测定。

2.6 统计学方法 采用 SPSS17.0 统计软件对所得数据进行统计处理，各组大鼠背根神经节神经元中 SP 和 CGRP 平均灰度比较采用方差分析，组间两两比较采用 LSD-t 检验，检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 实验动物死亡情况 实验过程中共有 7 只大鼠死亡，详细记录见表 1。

3.2 SP 和 CGRP 平均灰度 ①SP 平均灰度。4 组大鼠 SP 平均灰度比较，差异有统计学意义($F=19.912, P=0.000$)。进一步两两比较，模型组平均灰度大于空白对照组、中药对照组及腰腿痛胶囊组($P=0.000; P=0.000; P=0.000$)；腰腿痛胶囊组 SP 平均灰度小于中药对照组($P=0.000$)。②CGRP 平

均灰度。4 组大鼠 CGRP 平均灰度比较,差异有统计学意义($F = 16.367, P = 0.000$)。进一步两两比较,模型组 CGRP 平均灰度大于空白对照组($P = 0.000$);腰腿痛胶囊组与模型组比较,差异无统计学意义($P = 0.749$);中药对照组 CGRP 平均灰度大于模型组和腰腿痛胶囊组($P = 0.033, P = 0.000$)。(表 2)

表 1 实验动物死亡情况

组别	数量(只)	死亡原因
空白对照组	1	解剖见左前腿附近包块内均为未消化食物,考虑为灌胃损伤胃所致。
模型组	0	
中药对照组	3	2 只解剖后发现肝脏呈紫黑色,小肠上段极度膨胀,粪便干硬;其中 1 只大鼠尿潴留,考虑为腰腿痛丸毒性所致。
腰腿痛胶囊组	3	2 只为麻醉药剂量过大所致;1 只解剖发现肝呈紫黑色,小肠上段膨胀,胃周围无中药药迹,考虑因肠梗阻死亡。

表 2 各组大鼠背根神经节神经元中 SP 和 CGRP 平均灰度比较

组别	SP 平均灰度	CGRP 平均灰度
空白对照组	107.04 ± 8.20	108.00 ± 5.37
模型组	134.02 ± 7.63	128.92 ± 4.97
中药对照组	107.86 ± 14.71	139.35 ± 12.27
腰腿痛胶囊组	96.15 ± 8.59	130.42 ± 11.84
<i>F</i> 值	19.912	16.367
<i>P</i> 值	0.000	0.000

4 讨 论

腰椎间盘突出症属中医“腰痛”或“腰腿痛”范畴,古代医家对此多有论述,或归于风寒,或归于湿痹,或归于瘀血,或归于七情,必总归于肾虚。基于以上病机,根据《内经》“谨守病机,各司其属”的处方原则,我们研制出了具有益气活血、通络止痛功效的腰腿痛胶囊。腰腿痛胶囊由黄芪、当归、杜仲等组成,方中黄芪补肺健脾;黄芪、当归益气活血,补血养肝;杜仲补肾壮筋,祛风除湿通络。诸药合用,补而不燥,攻而不损,共和五脏之气。

背根神经节神经膜是十分敏感的机械伤害感受器,可被压迫和机械刺激所激活^[2]。同时它也是多种痛觉神经递质的合成场所,如 SP、CGRP 及血管活性肽等,而 SP 和 CGRP 是痛觉传导的经典性神经递质^[3]。SP 是一种由 11 个氨基酸组成的多肽,属速激肽家族,主要传递锐痛,是非肾上腺素能非胆碱能神经末梢所释放的一种神经肽。它广泛分布于细的初

级传入神经纤维内,在神经受到刺激后,可在传入神经的中枢和外周端末梢释放,因此被认为作为一种神经递质或调质在中枢和外周起作用。韩学哲等^[4]在大鼠腰椎小关节囊纤维层及其侧前方的黄韧带上均发现 SP 和 CGRP 能神经纤维。在本研究中,腰腿痛胶囊组大鼠背根神经节中 SP 含量明显低于中药对照组和模型组,表明腰腿痛胶囊可有效减少或清除背根神经节中 SP,从而减轻疼痛反应。周知等^[5]的研究结果显示,CGRP 既有血管调节作用,也有疼痛感受作用。CGRP 扩血管的作用是胆碱能神经递质、三磷酸腺苷、5-羟色胺和 SP 的 1 000 倍,是异丙肾上腺素的 10~100 倍^[6]。沈为栋等^[7]报道了腰椎间盘突出症患者手术后疼痛明显缓解时,血浆 CGRP 反而较术前疼痛剧烈时升高,据此推测 CGRP 可能是促进损伤修复的因子之一。本研究中腰腿痛胶囊组大鼠背根神经节中 CGRP 含量低于中药对照组,而与模型组含量比较,差异无统计学意义,对于这一问题我们将进一步研究。

因此,笔者认为腰腿痛胶囊通过降低实验性腰椎间盘突出症大鼠背根神经节中 SP 含量,减轻由髓核组织对背根节的损伤和刺激而引起的疼痛,这可能是腰腿痛胶囊治疗腰椎间盘突出症的作用机理之一。

5 参考文献

[1] 鲁玉来,蔡钦林. 腰椎间盘突出症[M]. 北京:人民军医出版社,2001:189-193.

[2] 岳寿伟,刘庆. 腰腿痛发病机制研究[J]. 中国临床康复, 2002,6(12):1724-1725,1733.

[3] 姜劲挺. 腰腿痛胶囊对髓核移植型腰椎间盘突出症大鼠模型背根节及坐骨神经中 SP 和 CGRP 的影响[D]. 兰州:甘肃中医学院,2005.

[4] 韩学哲,刘森,王民,等. 大鼠腰椎 P 物质和降钙素基因相关肽能神经纤维的分布[J]. 颈腰痛杂志,2002,23(1):25-27.

[5] 周知,李元建. 降钙素基因相关肽抗高血压内皮祖细胞衰老作用和机制的研究[D]. 长沙:中南大学,2009.

[6] 关新民. 医学神经生物学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2002:157-163.

[7] 沈为栋,李康华. 腰椎间盘突出症患者手术前后血浆内皮素及降钙素基因相关肽的变化[J]. 中华实验外科杂志,2003,20(11):1041-1042.