

五福饮对大鼠尾部退变椎间盘的影响及其作用机制

夏炳江¹, 侯明生¹, 张磊², 韦金忠¹, 胡松峰¹

(1. 浙江省绍兴市中医院, 浙江 绍兴 312000; 2. 浙江中医药大学, 浙江 杭州 310053)

摘要 目的:观察五福饮对大鼠尾部退变椎间盘的影响及其作用机制。**方法:**将 48 只 12 周龄健康雄性清洁级 SD 大鼠随机分成空白对照组、模型组、五福饮组, 每组 16 只。针刺模型组、五福饮组大鼠尾部椎间盘并向椎间盘内注入肿瘤坏死因子- α , 空白对照组大鼠不做任何处理。造模成功后(造模开始后 4 周)五福饮组以 $20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量的五福饮灌胃, 空白对照组和模型组给予等量生理盐水灌胃, 每日 1 次, 连续灌胃 8 周。分别于造模成功后及药物干预 8 周后从各组随机抽取 8 只大鼠, 采用麻醉过量法处死后, 完整取下 $\text{Co}_5\text{--}\text{Co}_6$ 椎间盘及其相邻两侧椎体, 行 Micro-CT 扫描测量椎间相对高度, 采取 HE 染色观察椎间盘组织形态, 采用逆转录-聚合酶链式反应法检测椎间盘 β -连环蛋白(β -catenin)和含 I 型血小板结合蛋白基序的解聚蛋白样金属蛋白酶(a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type I motifs, ADAMTS)-5 基因的表达。**结果:**①椎间隙相对高度。造模成功后, 3 组大鼠 $\text{Co}_5\text{--}\text{Co}_6$ 椎间隙相对高度比较, 差异有统计学意义 [100% , $(56.37 \pm 11.32)\%$, $(55.63 \pm 12.76)\%$, $F = 22.148$, $P = 0.000$]; 空白对照组 $\text{Co}_5\text{--}\text{Co}_6$ 椎间隙相对高度高于模型组和五福饮组 ($P = 0.000$, $P = 0.000$); 模型组 $\text{Co}_5\text{--}\text{Co}_6$ 椎间隙相对高度与五福饮组比较, 差异无统计学意义 ($P = 0.203$)。药物干预 8 周后, 3 组大鼠 $\text{Co}_5\text{--}\text{Co}_6$ 椎间隙相对高度比较, 差异有统计学意义 [100% , $(50.35 \pm 10.72)\%$, $(80.84 \pm 9.43)\%$, $F = 31.492$, $P = 0.000$]; 空白对照组 $\text{Co}_5\text{--}\text{Co}_6$ 椎间隙相对高度高于模型组和五福饮组 ($P = 0.000$, $P = 0.000$), 模型组 $\text{Co}_5\text{--}\text{Co}_6$ 椎间隙相对高度低于五福饮组 ($P = 0.001$)。②椎间盘组织形态。造模成功后, 模型组和五福饮组大鼠 $\text{Co}_5\text{--}\text{Co}_6$ 椎间盘均明显退变, 表现为髓核细胞数量减少, 纤维环排列紊乱且出现裂隙, 纤维环与髓核交界区变窄。药物干预 8 周后, 模型组大鼠 $\text{Co}_5\text{--}\text{Co}_6$ 椎间盘退变更明显, 而五福饮组大鼠 $\text{Co}_5\text{--}\text{Co}_6$ 椎间盘退变情况明显改善, 可见较多髓核细胞, 细胞排列尚均匀, 纤维环胶原走向清楚, 纤维环与髓核交界区较宽。③椎间盘组织 β -catenin 基因的表达。造模成功后, 3 组大鼠 $\text{Co}_5\text{--}\text{Co}_6$ 椎间盘组织 β -catenin 基因表达量比较, 差异有统计学意义 (1.32 ± 0.21 , 2.87 ± 0.41 , 2.73 ± 0.42 , $F = 18.806$, $P = 0.001$); 空白对照组 $\text{Co}_5\text{--}\text{Co}_6$ 椎间盘组织 β -catenin 基因表达量低于模型组和五福饮组 ($P = 0.000$, $P = 0.001$); 模型组 $\text{Co}_5\text{--}\text{Co}_6$ 椎间盘组织 β -catenin 基因表达量与五福饮组比较, 差异无统计学意义 ($P = 0.457$)。药物干预 8 周后, 3 组大鼠 $\text{Co}_5\text{--}\text{Co}_6$ 椎间盘组织 β -catenin 基因表达量比较, 差异有统计学意义 (1.01 ± 0.17 , 2.64 ± 0.33 , 1.51 ± 0.31 , $F = 26.616$, $P = 0.000$); 空白对照组 $\text{Co}_5\text{--}\text{Co}_6$ 椎间盘组织 β -catenin 基因表达量低于模型组和五福饮组 ($P = 0.000$, $P = 0.002$), 模型组 $\text{Co}_5\text{--}\text{Co}_6$ 椎间盘组织 β -catenin 基因表达量高于五福饮组 ($P = 0.001$)。④椎间盘组织 ADAMTS-5 基因的表达。造模成功后, 3 组大鼠 $\text{Co}_5\text{--}\text{Co}_6$ 椎间盘组织 ADAMTS-5 基因表达量比较, 差异有统计学意义 (1.18 ± 0.14 , 2.34 ± 0.25 , 2.42 ± 0.28 , $F = 47.786$, $P = 0.000$); 空白对照组 $\text{Co}_5\text{--}\text{Co}_6$ 椎间盘组织 ADAMTS-5 基因表达量低于模型组和五福饮组 ($P = 0.000$, $P = 0.000$); 模型组 $\text{Co}_5\text{--}\text{Co}_6$ 椎间盘组织 ADAMTS-5 基因表达量与五福饮组比较, 差异无统计学意义 ($P = 0.530$)。药物干预 8 周后, 3 组大鼠 $\text{Co}_5\text{--}\text{Co}_6$ 椎间盘组织 ADAMTS-5 基因表达量比较, 差异有统计学意义 (1.21 ± 0.27 , 2.45 ± 0.29 , 1.38 ± 0.13 , $F = 6.053$, $P = 0.022$); 空白对照组和五福饮组 $\text{Co}_5\text{--}\text{Co}_6$ 椎间盘组织 ADAMTS-5 基因表达量低于模型组 ($P = 0.000$, $P = 0.027$); 空白对照组 $\text{Co}_5\text{--}\text{Co}_6$ 椎间盘组织 ADAMTS-5 基因表达量与五福饮组比较, 差异无统计学意义 ($P = 0.205$)。**结论:**五福饮可缓解大鼠尾部椎间盘组织退变, 恢复椎间隙相对高度, 其作用机制可能与其能下调椎间盘组织中 β -catenin 和 ADAMTS-5 的表达有关。

关键词 椎间盘退行性变; 五福饮; β 连环素; 蛋白聚糖类; 含 I 型血小板结合蛋白基序的解聚蛋白样金属蛋白酶; 大鼠; 动物实验

Effects of Wufu Yin (五福饮) on caudal degenerative intervertebral disc in rats and its mechanism of action

XIA Bingjiang¹, HOU Mingsheng¹, ZHANG Lei², WEI Jinzhong¹, HU Songfeng¹

1. Shaoxing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shaoxing 312000, Zhejiang, China

2. Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, Zhejiang, China

基金项目: 浙江省中医药科技计划项目 (2017ZB091); 浙江省绍兴市科技计划项目 (2015B70060)

通讯作者: 夏炳江 E-mail: xiajb2006@163.com

ABSTRACT Objective: To study the effects of Wufu Yin (五福饮, WFY) on caudal degenerative intervertebral disc in rats and its mechanism of action. **Methods:** Forty - eight 12 - week - old healthy clean - grade male SD rats were randomly divided into blank control group, model group and WFY group, 16 cases in each group. The tumor necrosis factor - α (TNF - α) were injected into caudal intervertebral disc of rats in model group and WFY group, while the rats in blank control group were not given any surgical intervention. After successful modeling, the rats in WFY group were intragastric administrated with WFY (20 mL/kg), while the rats in blank control group and model group were intragastric administrated with same dose of normal saline, once a day for 8 consecutive weeks. Eight rats were randomly selected from each group and were executed by overdose anesthesia after successful modeling and 8 - weeks drug intervention respectively. Their Co₅₋₆ intervertebral discs and bilateral adjacent vertebral bodies were fetched out completely for measuring the intervertebral relative height by Micro - CT scanning. The intervertebral disc tissue morphology was observed through HE staining and the genetic expressions of β - catenin and a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type I motifs (ADAMTS) - 5 in intervertebral discs were detected by using reverse transcription - polymerase chain reaction (RT - PCR) assays. **Results:** After successful modeling, there was statistical difference in the relative height of Co₅/Co₆ intervertebral space between the 3 groups (100%, 56.37 \pm 11.32%, 55.63 \pm 12.76%, $F = 22.148$, $P = 0.000$). The relative height of Co₅/Co₆ intervertebral space was higher in blank control group compared to model group and WFY group ($P = 0.000$, $P = 0.000$), and there was no statistical difference in the relative height of Co₅/Co₆ intervertebral space between model group and WFY group ($P = 0.203$). After 8 - week drug intervention, there was statistical difference in the relative height of Co₅/Co₆ intervertebral space between the 3 groups (100%, 50.35 \pm 10.72%, 80.84 \pm 9.43%, $F = 31.492$, $P = 0.000$). The relative height of Co₅/Co₆ intervertebral space was higher in blank control group compared to model group and WFY group ($P = 0.000$, $P = 0.000$) and was lower in model group compared to WFY group ($P = 0.001$). After successful modeling, the Co₅/Co₆ intervertebral discs of rats in model group and WFY group degenerated significantly. The degeneration presented with decreased nucleus pulposus cells, disorderly and cracked fibrous ring and narrow junctional zone of fibrous ring and nucleus pulposus. After 8 - week drug intervention, more obvious degeneration of Co₅/Co₆ intervertebral discs of rats was found in model group; while the degeneration of Co₅/Co₆ intervertebral discs was significantly improved in rats of WFY group, presented with increasing nucleus pulposus cells arranged in order, clear fibrous ring collagen and wide junctional zone of fibrous ring and nucleus pulposus. After successful modeling, there was statistical difference in genetic expressions of β - catenin in Co₅/Co₆ intervertebral disc tissues between the 3 groups (1.32 \pm 0.21, 2.87 \pm 0.41, 2.73 \pm 0.42, $F = 18.806$, $P = 0.001$). The genetic expressions of β - catenin in Co₅/Co₆ intervertebral disc tissues were lower in blank control group compared to model group and WFY group ($P = 0.000$, $P = 0.001$), and there was no statistical difference in genetic expressions of β - catenin in Co₅/Co₆ intervertebral disc tissues between model group and WFY group ($P = 0.457$). After 8 - week drug intervention, there was statistical difference in genetic expressions of β - catenin in Co₅/Co₆ intervertebral disc tissues between the 3 groups (1.01 \pm 0.17, 2.64 \pm 0.33, 1.51 \pm 0.31, $F = 26.616$, $P = 0.000$). The genetic expressions of β - catenin in Co₅/Co₆ intervertebral disc tissues were lower in blank control group compared to model group and WFY group ($P = 0.000$, $P = 0.002$), and were higher in model group compared to WFY group ($P = 0.001$). After successful modeling, there was statistical difference in genetic expressions of ADAMTS - 5 in Co₅/Co₆ intervertebral disc tissues between the 3 groups (1.18 \pm 0.14, 2.34 \pm 0.25, 2.42 \pm 0.28, $F = 47.786$, $P = 0.000$). The genetic expressions of ADAMTS - 5 in Co₅/Co₆ intervertebral disc tissues were lower in blank control group compared to model group and WFY group ($P = 0.000$, $P = 0.000$), and there was no statistical difference in genetic expressions of ADAMTS - 5 in Co₅/Co₆ intervertebral disc tissues between model group and WFY group ($P = 0.530$). After 8 - week drug intervention, there was statistical difference in genetic expressions of ADAMTS - 5 in Co₅/Co₆ intervertebral disc tissues between the 3 groups (1.21 \pm 0.27, 2.45 \pm 0.29, 1.38 \pm 0.13, $F = 6.053$, $P = 0.022$). The genetic expressions of ADAMTS - 5 in Co₅/Co₆ intervertebral disc tissues were lower in blank control group and WFY group compared to model group ($P = 0.000$, $P = 0.027$), and there was no statistical difference in genetic expressions of ADAMTS - 5 in Co₅/Co₆ intervertebral disc tissues between blank control group and WFY group ($P = 0.205$). **Conclusion:** WFY can relieve the degeneration of rat's caudal intervertebral disc tissue and restore the relative height of intervertebral space, and its mechanisms of action may be that it can down - regulate the expression of β - catenin and ADAMTS - 5 in intervertebral disc tissues.

Keywords intervertebral disc degeneration; Wufu Yin; beta Catenin; proteoglycans; a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type I motifs; rats; animal experimentation

腰痛是临床上的常见疾病,发病率较高^[1]。椎间盘退变被认为是腰痛发生的主要原因^[2]。目前已有

多种包括手术在内的治疗方法被用于治疗椎间盘退变性疾病,但尚无一种方法可保留椎间盘的正常功能。研究表明 Wnt / β -连环蛋白(β -catenin)信号通路可通过上调含 I 型血小板结合蛋白基序的解聚蛋白样金属蛋白酶(a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type I motifs, ADAMTS)-5 而诱发椎间盘退变^[3],而 ADAMTS-5 是蛋白聚糖的主要降解酶,蛋白聚糖对椎间盘抗压力和张力等特性起着重要的作用。五福饮由人参、熟地黄、当归、白术、炙甘草组成,具有补益肝肾、益气养血、扶正固本的作用^[4]。本研究以大鼠尾部退变椎间盘为模型,观察五福饮对大鼠尾部退变椎间盘的影响,并探讨其作用机制,为临床上应用五福饮防治椎间盘退变性疾病提供实验依据。

1 材料与仪器

1.1 实验动物 12 周龄健康雄性清洁级 SD 大鼠 48 只,体质量 200 ~ 250 g,由浙江中医药大学动物实验中心提供,实验动物许可证号:SYXK(浙)2008-0115)。实验方案通过医学实验动物伦理委员会批准。

1.2 实验药物 五福饮由人参、熟地黄、当归、白术、炙甘草组成。将上述 5 味中药饮片按 2:3:3:2:1 的比例混合后,用蒸馏水浸泡 1 h,加入 12 倍量的水回流提取 3 次,每次 1.5 h。水提物减压浓缩至相对密度为 1.05,再加入 95% 乙醇至含醇量为 60%,醇沉 24 h,回收含药乙醇,减压浓缩至含生药量为 2 g · mL⁻¹ 的药液,置于 -20 °C 环境下保存备用。

1.3 实验试剂与仪器 DEPC 水(北京康为世纪生物科技有限公司),Trizol 提取液[生工生物工程(上海)股份有限公司],TaKaRa 反转录试剂盒、TaKaRa 荧光定量试剂盒[宝生物工程(大连)有限公司],荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司),核酸分光光度计(Thermo scientific 公司),小动物活体 Micro-CT 影像系统(Bruker Microct NV 公司),光学显微镜(德国 Leica 公司)。

2 方法

2.1 分组与造模 适应性喂养 1 周后将 48 只 12 周龄健康雄性清洁级 SD 大鼠随机分为空白对照组、模型组和五福饮组,每组 16 只。造模手术前 6 h 禁食,以 10% 水合氯醛(3 mL · kg⁻¹)行腹腔注射麻醉。麻醉成功后,将模型组和五福饮组大鼠仰卧位固定于手

术台上;在 X 线透视下,用直径 0.6 mm 的穿刺针刺入 Co₅ ~ Co₆ 椎间隙,当穿刺针进至椎间盘中心后,停留约 10 s 后出针;同时利用微量注射器向椎间盘内注入 25 μ L 浓度为 10 ng · μ L⁻¹ 的肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor, TNF- α)^[5-6];术后每天肌肉注射青霉素 1 × 10⁴ 单位 · kg⁻¹ 预防感染,持续注射 3 d。空白对照组大鼠不做任何处理。

2.2 药物干预 造模成功后(造模开始后 4 周^[6])大鼠给药剂量按人和动物药物等效剂量换算公式^[7]计算,五福饮组以 20 mL · kg⁻¹ 剂量的五福饮灌胃,空白对照组和模型组给予等量生理盐水灌胃,每日 1 次,连续灌胃 8 周。

2.3 椎间隙相对高度测量 分别于造模成功后及药物干预 8 周后从各组随机抽取 8 只大鼠,采用麻醉过量法处死后,完整取下 Co₅₋₆ 椎间盘及其相邻两侧椎体,行 Micro-CT 扫描(扫描电压:55 kV;扫描电流:455 μ A;扫描曝光时间:250 ms)后,收集相关数据,应用相应配套图像处理软件进行三维重建,并计算椎间隙相对高度,其测量方法^[5]:在矢状位重建 CT 图像上,沿两椎体纵轴方向作 3 条直线将其均分,并将 3 条直线经过椎体的长度分别记为 A、B、C、G、H、I,经过椎间隙的长度记为 D、E、F。椎间隙高度指数(disc height index, DHI) = 椎间高度平均值/椎体高度平均值,即 $DHI = 2(D + E + F) / (A + B + C + G + H + I)$ 。见图 1。椎间隙相对高度用 DHI 百分比表示,即 $DHI\% = \text{干预后 DHI} / \text{造模前 DHI} \times 100\%$ 。

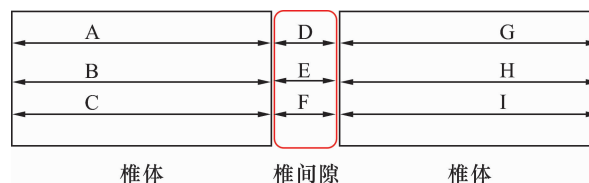


图 1 椎间隙高度指数计算方法示意图

2.4 椎间盘组织形态观察 将取下的 Co₅₋₆ 椎间盘,利用 4% 多聚甲醛固定 48 h 后,14% 乙二胺四乙酸二钠脱钙液脱钙 4 周,常规脱水、石蜡包埋、连续切片,液氮保存备用。HE 染色后,光镜下观察椎间盘组织形态学改变。

2.5 椎间盘组织 β -catenin 和 ADAMTS-5 基因表达检测 采用逆转录-聚合酶链式反应法检测椎间盘 β -catenin 和 ADAMTS-5 基因表达。将切下的大鼠 Co₅₋₆ 椎间盘加入液氮迅速冷冻后,研磨成粉。利用 Trizol 法提取总 RNA,逆转录成 cDNA,再以合成的

cDNA 作为模板进行 PCR 扩增,其中引物序列见表 1。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)为内参基因,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各组间 β -catenin 和 ADAMTS-5 基因表达差异(Ct 值为每个反应管内的荧光信号到达所设定的阈值时所经历的循环数)。

表 1 大鼠 $Co_5 \sim Co_6$ 椎间盘组织 β -catenin 和 ADAMTS-5 基因引物

基因名称	引物序列(5' to 3')
β -catenin ¹⁾	正向 TGGTGGGCTGCAGAAAATGGTT
	反向 ACGATGGCCGGCTTGTTC
ADAMTS-5 ²⁾	正向 AGCCCCTCGGTGCACAGTAGTTCTA
	反向 GATGCCGTCACACCCCGTTCTCA
GAPDH ³⁾	正向 AGCCGCATCTTCTTGTGCAGTG
	反向 TGGTAACCAGGCGTCCGATACG

1) β -连环蛋白;2) 含 I 型血小板结合蛋白基序的解聚蛋白样金属蛋白酶-5;3) 甘油醛-3-磷酸脱氢酶

2.6 数据统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件对所得数据进行统计学分析,3 组大鼠 $Co_5 \sim Co_6$ 椎间隙相对高度、 $Co_5 \sim Co_6$ 椎间盘组织 β -catenin 基因表达、 $Co_5 \sim Co_6$ 椎间盘组织 ADAMTS-5 基因表达的组间比较采用方差分析,组间两两比较采用 LSD- t 检验,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

3 结果

3.1 椎间隙相对高度 造模成功后,3 组大鼠 $Co_5 \sim Co_6$ 椎间隙相对高度比较,差异有统计学意义;空白对照组 $Co_5 \sim Co_6$ 椎间隙相对高度高于模型组和五福饮组($P = 0.000, P = 0.000$);模型组 $Co_5 \sim Co_6$ 椎间隙相对高度与五福饮组比较,差异无统计学意义($P = 0.203$)。见图 2、表 2。药物干预 8 周后,3 组大鼠 $Co_5 \sim Co_6$ 椎间隙相对高度比较,差异有统计学意义;空白对照组 $Co_5 \sim Co_6$ 椎间隙相对高度高于模型组和五福饮组($P = 0.000, P = 0.000$),模型组 $Co_5 \sim Co_6$ 椎间隙相对高度低于五福饮组($P = 0.001$)。见图 3、表 2。

3.2 椎间盘组织形态 造模成功后,模型组和五福饮组大鼠 $Co_5 \sim Co_6$ 椎间盘均明显退变,表现为髓核细胞数量减少,纤维环排列紊乱且出现裂隙,纤维环与髓核交界区变窄(图 4)。药物干预 8 周后,模型组大鼠 $Co_5 \sim Co_6$ 椎间盘退变更明显,表现为髓核细胞明显减少,纤维环排列不规整,出现明显的裂隙及断裂,纤维环与髓核交界区明显变窄;五福饮组大鼠 $Co_5 \sim Co_6$ 椎间盘退变情况明显改善,可见较多髓核细胞,细胞排列尚均匀,纤维环胶

原走向清楚,纤维环与髓核交界区较宽(图 5)。

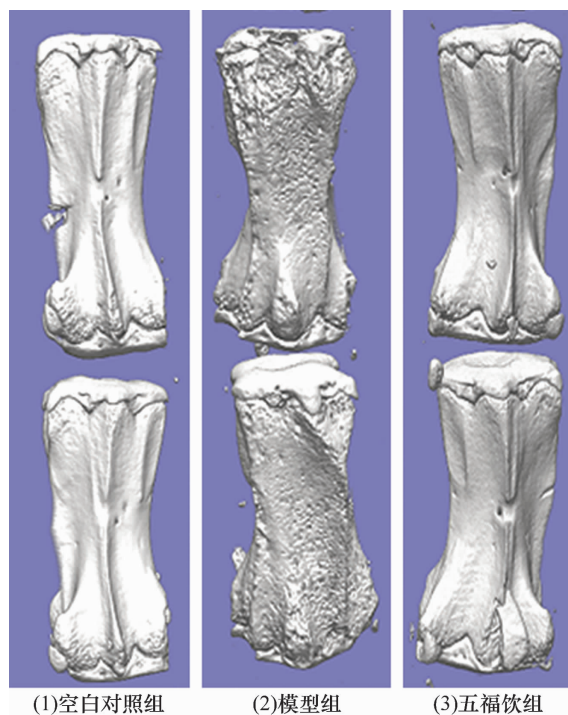


图 2 造模成功后 3 组大鼠 $Co_5 \sim Co_6$ 节段 Micro-CT 扫描结果 (1)椎间隙正常,椎体周缘无骨赘增生;(2)椎间隙狭窄,椎体周缘有骨赘增生;(3)椎间隙狭窄,椎体周缘有骨赘增生

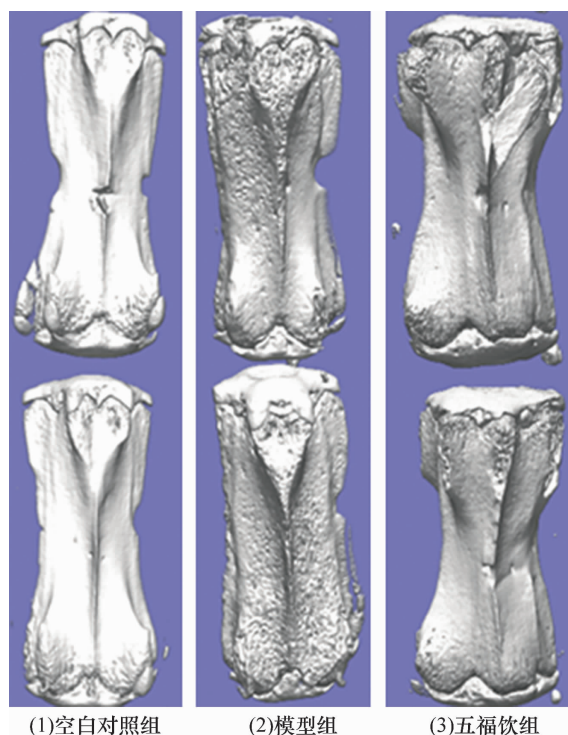
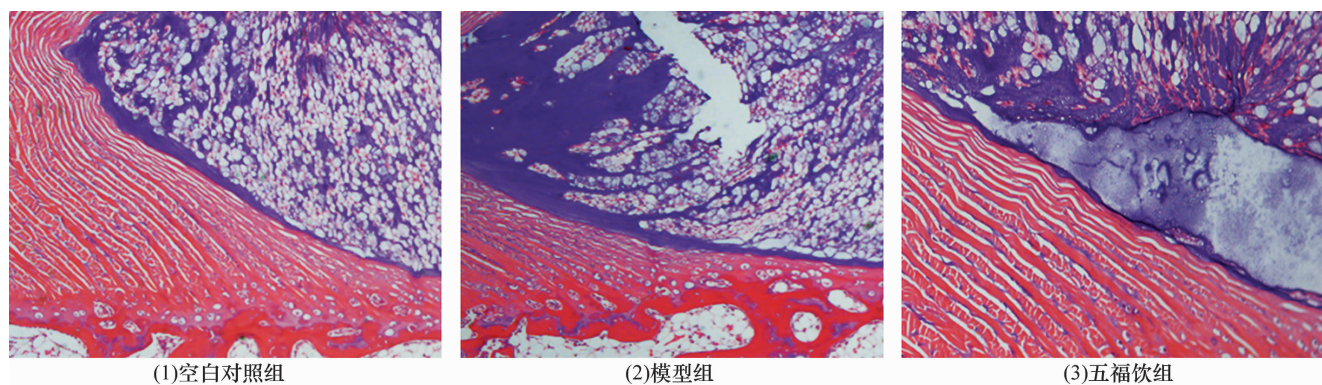


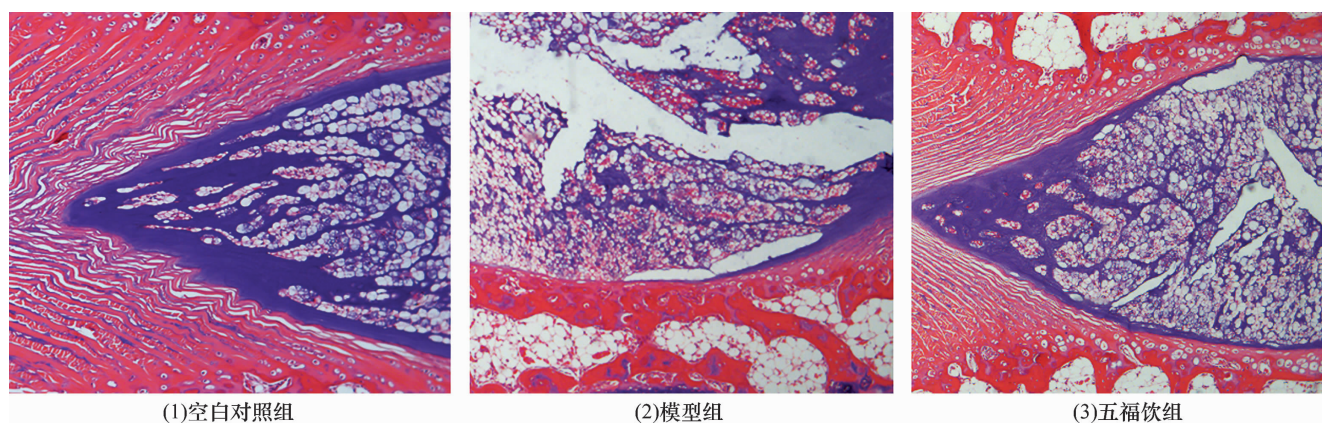
图 3 药物干预 8 周后 3 组大鼠 $Co_5 \sim Co_6$ 节段 Micro-CT 扫描结果 (1)椎间隙正常,椎体周缘无骨赘增生;(2)椎间隙狭窄,椎体周缘有骨赘增生;(3)椎间隙轻度狭窄,椎体周缘无明显骨赘增生

表 2 3 组大鼠 $Co_5 \sim Co_6$ 椎间隙相对高度比较

组别	样本量(只)	造模成功后	药物干预 8 周后
空白对照组	8	100%	100%
模型组	8	$(56.37 \pm 11.32)\%$	$(50.35 \pm 10.72)\%$
五福饮组	8	$(55.63 \pm 12.76)\%$	$(80.84 \pm 9.43)\%$
<i>F</i> 值		22.148	31.492
<i>P</i> 值		0.000	0.000

图 4 造模成功后 3 组大鼠 $Co_5 \sim Co_6$ 椎间盘组织形态(HE 染色 $\times 50$)

(1)正常椎间盘组织;(2)明显退变的椎间盘组织;(3)明显退变的椎间盘组织

图 5 药物干预 8 周后 3 组大鼠 $Co_5 \sim Co_6$ 椎间盘组织形态(HE 染色 $\times 50$)

(1)正常椎间盘组织;(2)明显退变的椎间盘组织;(3)轻度退变的椎间盘组织

3.3 椎间盘组织 β -catenin 基因的表达 造模成功后,3 组大鼠 $Co_5 \sim Co_6$ 椎间盘组织 β -catenin 基因表达量比较,差异有统计学意义;空白对照组 $Co_5 \sim Co_6$ 椎间盘组织 β -catenin 基因表达量低于模型组和五福饮组 ($P=0.000, P=0.001$);模型组 $Co_5 \sim Co_6$ 椎间盘组织 β -catenin 基因表达量与五福饮组比较,差异无统计学意义 ($P=0.457$)。药物干预 8 周后,3 组大鼠 $Co_5 \sim Co_6$ 椎间盘组织 β -catenin 基因表达量比较,差异有统计学意义;空白对照组大鼠 $Co_5 \sim Co_6$ 椎间盘组织 β -catenin 基因表达量低于模型组和五福饮组 ($P=0.000, P=0.002$),模型组 $Co_5 \sim Co_6$ 椎间盘组织 β -catenin 基因表达量高于五福饮组 ($P=0.001$)。见表 3。

表 3 3 组大鼠 $Co_5 \sim Co_6$ 椎间盘组织 β -catenin

基因表达量的比较

组别	样本量(只)	造模成功后	药物干预 8 周后
空白对照组	8	1.32 ± 0.21	1.01 ± 0.17
模型组	8	2.87 ± 0.41	2.64 ± 0.33
五福饮组	8	2.73 ± 0.42	1.51 ± 0.31
<i>F</i> 值		18.806	26.616
<i>P</i> 值		0.001	0.000

 β -catenin; β -连环蛋白

3.4 椎间盘组织 ADAMTS-5 基因的表达 造模成功后,3 组大鼠 $Co_5 \sim Co_6$ 椎间盘组织 ADAMTS-5 基因表达量比较,差异有统计学意义;空白对照组 $Co_5 \sim Co_6$ 椎间

盘组织 ADAMTS-5 基因表达量低于模型组和五福饮组 ($P=0.000, P=0.000$); 模型组 Co_{5-6} 椎间盘组织 ADAMTS-5 基因表达量与五福饮组比较, 差异无统计学意义 ($P=0.530$)。药物干预 8 周后, 3 组大鼠 Co_{5-6} 椎间盘组织 ADAMTS-5 基因表达量比较, 差异有统计学意义; 空白对照组和五福饮组 Co_{5-6} 椎间盘组织 ADAMTS-5 基因表达量低于模型组 ($P=0.000, P=0.027$); 空白对照组 Co_{5-6} 椎间盘组织 ADAMTS-5 基因表达量与五福饮组比较, 差异无统计学意义 ($P=0.205$)。见表 4。

表 4 3 组大鼠 Co_{5-6} 椎间盘组织 ADAMTS-5 基因表达量的比较

组别	样本量 (只)	造模成功后	药物干预 8 周后
空白对照组	8	1.18 ± 0.14	1.21 ± 0.27
模型组	8	2.34 ± 0.25	2.45 ± 0.29
五福饮组	8	2.42 ± 0.28	1.38 ± 0.13
F 值		47.786	6.053
P 值		0.000	0.022

ADAMTS-5: 含 I 型血小板结合蛋白基序的解聚蛋白样金属蛋白酶-5

4 讨 论

目前有研究认为, 由椎间盘内蛋白水解酶表达升高而引起的细胞外基质降解, 在椎间盘退变中起着关键性作用^[8-9]。Seguin 等^[8-9]研究发现, 通过上调基质降解酶表达, 促进椎间盘细胞外基质丢失、蛋白聚糖降解, 可以诱发椎间盘退变。聚集蛋白聚糖是椎间盘中蛋白聚糖的主要类型, 其降解被认为是椎间盘退变早期的重要指标^[10]。负责降解聚集蛋白聚糖的降解酶主要包括基质金属蛋白酶和聚集蛋白聚糖酶。ADAMTS-5 是重要的聚集蛋白聚糖酶, 在降解软骨聚集蛋白聚糖的过程中起重要作用^[11]。TNF- α 可通过上调 ADAMTS-5 表达而诱发椎间盘退变, 这说明上调 ADAMTS-5 表达可以促使椎间盘细胞外基质发生降解, 其在椎间盘退变发生发展中发挥着重要作用^[12]。

Wnt/ β -catenin 信号通路对椎间盘退变的发生发展具有重要调控作用。王晶^[13]研究发现, β -catenin 在人退变椎间盘及 TNF- α 诱导的兔退变椎间盘髓核组织中表达增高; 若利用 Dickkopf-1 阻断 Wnt/ β -catenin 通路, 则能起到保护椎间盘退变的作用。Wang 等^[3]研究发现, 激活 β -catenin 信号, 能上调椎间盘组织 ADAMTS-5 的表达, 从而导致蛋白聚糖和 II 型胶原合成下降, 这说明 Wnt/ β -catenin 通路对椎

间盘细胞外基质合成的负调控作用, 可能与激活下游靶基因 ADAMTS-5 表达有关。

目前, 治疗椎间盘退变性疾病的常用方法包括非手术治疗及手术治疗, 其中常用的非手术疗法包括卧床休息、理疗、针灸、中西药物内服等。若非手术治疗无效, 可考虑采用手术治疗, 其方法主要包括射频髓核成形术、人工椎间盘置换术、椎体间融合术等, 但由于该病的病因及其发病机制尚未完全明确, 所以临床治疗效果仍欠理想^[14-15]。中医学从其发病和临床表现将其归属于“项强”“腰痛”“痹证”“腰脚痛”“腰股痛”等范畴, 治疗常以益气补血、扶正固本为主。五福饮来源于明代名医张景岳的《景岳全书·卷五十》, 由人参(入心)、熟地黄(入肾)、当归(入肝)、白术(入肺)、炙甘草(入脾)组成, 主治五脏气血亏损, 是张景岳治疗“五脏虚损”的代表方, 具有补益肝肾、益气养血、扶正固本的作用^[16-17]。我们在临床实践中也发现应用五福饮治疗椎间盘退变相关的颈椎病及腰椎间盘突出症等疾病能取得满意的疗效。

本研究结果表明, 五福饮可缓解大鼠尾部椎间盘组织退变, 恢复椎间隙相对高度, 其作用机制可能与其能下调椎间盘组织中 β -catenin 和 ADAMTS-5 的表达有关。

5 参考文献

- [1] PHILLIPS K, CH' IEN AP, NORWOOD BR, et al. Chronic low back pain management in primary care [J]. Nurse Pract, 2003, 28(8): 26-31.
- [2] LUOMA K, RIIHIMÄKI H, LUUKKONEN R, et al. Low back pain in relation to lumbar disc degeneration [J]. Spine (Phila Pa 1976), 2000, 25(4): 487-492.
- [3] WANG MN, TANG D, SHU B, et al. Conditional activation of β -catenin signaling in mice leads to severe defects in intervertebral disc tissue [J]. Arthritis Rheum, 2012, 64(8): 2611-2623.
- [4] 张红玉, 杨锋, 王波波, 等. 五福饮增强化疗药抗肿瘤作用及保护骨髓造血功能的实验研究 [J]. 浙江中医药大学学报, 2014, 38(6): 682-685.
- [5] KEOROCHANA G, JOHNSON JS, TAGHAVI CE, et al. The effect of needle size inducing degeneration in the rat caudal disc: evaluation using radiograph, magnetic resonance imaging, histology, and immunohistochemistry [J]. Spine Journal, 2010, 10(11): 1014-1023.
- [6] 夏炳江, 张磊, 胡松峰, 等. 纤维环穿刺结合 TNF- α 注射构建大鼠尾椎间盘退变模型的实验研究 [J]. 中国中医急症, 2017, 26(7): 1167-1171.

- [7] GAO Y, LIU S, HUANG J, et al. The ECM - cell interaction of cartilage extracellular matrix on chondrocytes [J]. Biomed Res Int, 2014, (2): 648459.
- [8] SEGUIN CA, PILLIAR RM, ROUGHLEY PJ, et al. Tumor necrosis factor alpha modulates matrix production and catabolism in nucleus pulposus tissue [J]. Spine (Phila Pa 1976), 2005, 30(17): 1940 - 1948.
- [9] SÉGUIN CA, BOJARSKI M, PILLIAR RM, et al. Differential regulation of matrix degrading enzymes in a TNF alpha - induced model of nucleus pulposus tissue degeneration [J]. Matrix Biol, 2006, 25(7): 409 - 418.
- [10] HIDEAKI N, MASAHIRO K. Aggrecanases and cartilage matrix degradation [J]. Arthritis Res Ther, 2003, 5(2): 94 - 103.
- [11] STANTON H, ROGERSON FM, EAST CJ, et al. ADAMTS5 is the major aggrecanase in mouse cartilage in vivo and in vitro [J]. Nature, 2005, 434(733): 648 - 652.
- [12] CHEN S, HUANG Y, ZHOU ZJ, et al. Upregulation of tumor necrosis factor α and ADAMTS - 5, but not ADAMTS - 4, in human intervertebral cartilage endplate with modic changes [J]. Spine (Phila Pa 1976), 2014, 39(14): E817 - E825.
- [13] 王晶. 经典 Wnt/ β - catenin 信号通路在椎间盘退变中的作用及机制研究 [D]. 武汉: 华中科技大学, 2009.
- [14] 张一鸣, 张沂, 唐萌芽. 补肾活血中药薰蒸治疗盘源性下腰痛疗效观察 [J]. 中医正骨, 2013, 25(5): 35 - 36.
- [15] 刘国岩, 徐展望, 郝延科, 等. 补肾活血汤治疗腰椎间盘突出症临床研究 [J]. 新中医, 2013, 45(11): 56 - 58.
- [16] 叶正从, 沈钦荣, 王敏龙. 五福饮治疗膝骨性关节炎的疗效观察 [J]. 中国中医药科技, 2016, 23(5): 608 - 609.
- [17] 王国庆, 朱晓峰. 加味五福饮联合培美曲塞和顺铂治疗晚期肺腺癌 20 例临床观察 [J]. 江苏中医药, 2014, 46(11): 27 - 28.

(收稿日期: 2017-10-06 本文编辑: 时红磊)

《中医正骨》第三届编辑委员会名单

一、学术委员会

主编、主任委员 郭维淮

名誉主编、名誉主任委员 孙树椿

副主编、副主任委员 (以姓氏汉语拼音为序)

董福慧 杜天信 樊粤光 高书图 郭艳幸 李无阴 (常务) 刘献祥 秦克枫 沈冯君 石印玉 童培建 王和鸣
王拥军 肖鲁伟 朱立国

编委、委员 (以姓氏汉语拼音为序)

鲍铁周 曹亚飞 常存库 陈久毅 陈小刚 程春生 董建文 杜进林 杜志谦 方 坚 方苏亭 冯 峰 冯 坤
郝胜利 何 伟 黄桂成 黄有荣 姜 宏 冷向阳 李保泉 李慧英 李金松 李 雷 李盛华 李先樑 李义凯
李逸群 李振宇 李郑林 林定坤 林燕萍 刘安平 刘德玉 刘 军 刘元禄 娄玉铃 卢 勇 彭太平 沈 霖
石关桐 史晓林 孙 捷 孙永强 谭明生 谭远超 唐镇江 田 民 田伟明 仝允辉 王爱国 王培民 王 平
王庆甫 王义生 王战朝 王智勇 谢心军 熊 辉 徐福东 徐展望 杨 斌 杨海韵 杨 豪 姚太顺 曾一林
翟明玉 詹红生 张建福 张进川 张 军 张 俐 张 敏 张同君 张晓峰 张银刚 张永红 张作君 赵庆安
赵文海 郑 稼 朱太咏 庄 洪

二、管理委员会

名誉主任委员 (以姓氏汉语拼音为序)

李俊德

主任委员 杜天信

委员 (以姓氏汉语拼音为序)

郭艳幸 韩文朝 何清湖 姜 猛 李振吉 连鸿凯 廖怀章 付 伟 于兰先 张玉柱 周奉皋

三、顾问委员会

主任委员 施 杞

委员 (以姓氏汉语拼音为序)

曹贻训 段庚辰 高子范 郭焕章 胡兴山 黎君若 李同生 梁克玉 刘柏龄 刘建民 娄多峰 毛天东 孟宪杰
阙再忠 茹润芳 时光达 宋一同 苏宝恒 孙炳烈 王芳轩 王克祥 王清义 韦贵康 闻善乐 吴诚德 肖劲夫
许鸿照 张传礼 张 茂 张善才 张天健 周福贻 诸方受 朱惠芳