

◆实验研究论著◆

补肝健腰方对腰椎退变大鼠椎间盘组织 AQP1 表达的影响

仇湘中, 张信成, 蒋盛昶, 严敏, 唐皓

湖南省中医药研究院附属医院, 湖南 长沙 410006

[摘要] 目的: 观察补肝健腰方对腰椎退变大鼠椎间盘组织水通道蛋白 1 (AQP1) 表达的影响。方法: 将 60 只大鼠随机分成 3 组, 造模组 35 只、假手术组 15 只、正常对照组 10 只。造模成功后分组, 分别给予补肝健腰方、腰腿痛丸或生理盐水喂养。分别于术后 20 天、40 天和 60 天收集造模节段椎间盘组织, RT-PCR 检测 AQP1 在椎间盘组织中的表达, 免疫组化试剂检测 AQP1 表达与分布。结果: 各组 AQP1 表达比较, 假手术组与正常对照组比较无差异 ($P > 0.05$), 模型组、腰腿痛丸组、补肝健腰方组与正常对照组比较均有差异 ($P < 0.05$), 在术后 20 天、40 天、60 天补肝健腰方组与腰腿痛丸组比较, 差异均有显著性意义 ($P < 0.05$), 术后 40 天腰腿痛丸组、补肝健腰方组与同组术后 20 天比较, 差异均有显著性意义 ($P < 0.05$)。结论: 大鼠腰椎间盘退变后, AQP1 的表达明显下降。在补肝健腰方的干预下, 退变椎间盘细胞 AQP1 的表达有明显上调, 推测 AQP1 的表达增减在椎间盘退变过程中起着重要的作用, 补肝健腰方对腰椎间盘退变有预防及治疗作用。

[关键词] 补肝健腰方; 腰椎; 椎间盘退变; 水通道蛋白 1 (AQP1)

[中图分类号] R681.5+3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2014) 12-0191-03

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2014.12.091

Effect of *Bugan Jianyao* Recipe on AQP1 Expression in Intervertebral Discs of Rats with Lumbar Disc Degeneration

QIU Xiangzhong, ZHANG Xincheng, JIANG Shengxu, et al

Abstract: Objective: To explore the effect of *Bugan Jianyao* recipe (BJR) on the expression of aquaporin (AQP)1 in the intervertebral discs of rats with lumbar disc degeneration. Methods: Sixty rats were randomly divided into three groups, namely operation group with 35 rats, sham operation group with 15 rats and normal group with 10 rats. After successful establishment of the model, rats in the operation group were divided into model group, BJR group and the Lumbocrurol Pain Pills (LPP) group, which were treated with normal saline, BJR, LPP, respectively. The level of AQP1 mRNA was detected by Rt-PCR method and the expression of AQP1 was observed by immunohistochemical reagents 20, 40 and 60 days after operation. Results: No statistical significant difference was found in the expression of AQP1 between the sham operation group and the normal group ($P > 0.05$). The difference of AQP1 expression between the normal group and the operation group was significant after treatment ($P < 0.05$). The difference of AQP1 expression was also significant between BJR group and LPP group 20, 40 and 60 days after operation ($P < 0.05$). AQP1 expression in BJR group and LPP group 40 days after operation differed from that in the same group 20 days after operation ($P < 0.05$). Conclusion: AQP1 expression shows obvious decrease in rats with lumbar disc degeneration, and the intervention of BJR has an up-regulation of AQP1, indicating that AQP1 plays an important role in the development of intervertebral disc degeneration, and BJR has preventive and therapeutic effect on lumbar disc degeneration.

Keywords: *Bugan Jianyao* recipe; Lumbar; Intervertebral disc degeneration; Aquaporin 1

[收稿日期] 2014-04-21

[基金项目] 湖南省中医药科研基金项目 (编号: 2010055); 湖南省科学技术厅项目 (编号: 2014SK3049)

[作者简介] 仇湘中 (1961-), 男, 主任医师, 教授, 研究方向: 脊柱骨关节疾病的临床及科研。

[通讯作者] 张信成, E-mail: zxc0556@163.com。

腰椎间盘突出引发的腰腿痛在临床十分常见,每年因腰腿疼痛所致的经济与人力资源损失巨大。腰椎间盘突出退变的原因一直是国内外学者关注的热点,腰椎间盘突出退变的一个重要特征表现是含水量的减少,因此,可以从含水量的丢失这方面探讨椎间盘退变的机制,研究水的代谢对于了解椎间盘组织退变的始动因素有着非常重要的意义,水通道蛋白(aquaporin, AQP)的基本功能是介导自由水分子的跨生物膜转运,本课题旨在通过补肝肾健腰方对腰椎间盘突出大鼠椎间盘细胞 AQP1 改变的影响,明确补肝肾健腰方对腰椎间盘突出症的疗效及其作用机理,结果报道如下。

1 材料与方

1.1 实验动物 10 月龄 SD 大鼠 60 只,雌雄各半,体重 300 g 左右,实验动物由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供,实验动物许可证号:SCXK(湘)2012-0027。

1.2 主要试剂和仪器 常规化学试剂(北京化学试剂公司);逆转录试剂盒(Fermentas); EDTA、Tris、DEPC(Sigma); Trizol (Invitrogen); Taq 酶、dNTP (Genstar); 引物(上海生工); DL2000 DNA Marker(Genstar); SABC 免疫组化试剂盒(博士德生物技术公司); 台式冷冻离心机(eppendorf); 荧光定量 RCP 仪(Thermo); 荧光 PCR 板(Thermo); 旋涡混合器(其林贝尔); 电泳仪(北京六一); 水平琼脂糖电泳槽(北京六一); 精密 pH 计(雷磁); 电动玻璃匀浆器(新芝)。BX41 奥林巴斯显微镜, Motic6.0 图文分析系统。

1.3 实验药品 补肝肾健腰方:当归、杜仲各 15 g,川芎 12 g,白芍 30 g,熟地黄 25 g,炒酸枣仁、延胡索各 10 g,蜈蚣 1 条,全蝎 3 g,甘草 5 g。5 剂。选用道地药材,煎液,冰箱内冷藏 48 h,将冷藏液离心,上清液滤过,得药液约 300 mL,灌装灭菌,备用。浓度约为含生药 2.16 g/mL。药物制备由湖南中医药研究院附属医院煎药室按操作规程完成。腰腿痛丸(国药准字 ZZZ25094,大连海洋药业有限公司生产,批号 20031103,每 100 粒重 11.3 g),具有舒筋活血、强筋骨、提高机体免疫的作用。

1.4 实验方法

1.4.1 椎间盘退变模型的建立 选择 10 月龄 SD 大鼠,单个饲养并将温度控制在 25℃左右,饲养 1 周。将大鼠随机分成 3 组:造模组 35 只、假手术组 15 只、正常对照组 10 只,参照《纤维环穿刺法与腰椎失稳法建立椎间盘退变模型》^[1]制作椎间盘退变模型。

1.4.2 动物分组及处理方法 将造模完成后生存的大鼠随机分为补肝肾健腰方组(15 只),腰腿痛丸组(15 只)及模型组(5 只)。加上正常对照组(10 只)和假手术组(15 只),共分 5 组。

1.4.3 给药方案 造模成功后 2 周,开始给药。正常对照组、假手术组和模型组给予生理盐水 8 mL/kg 灌胃,每天 2 次,连续 60 天。腰腿痛丸组:制成浓度为 1 g/mL 药液备用,3.24 mg/kg(按大鼠体表面积换算,4 倍于等效剂量)灌胃,每天 2 次,连续 60 天。补肝肾健腰方组:参照《医用实验动物

学》^[2]按人体体表面积与大鼠体表面积之比例换算,药量 81 mg/kg,灌胃每天 2 次,连续 60 天。

1.4.4 取材方法 分别于给药开始后 20、40 和 60 天,正常对照组、假手术组、模型组、腰腿痛丸组、补肝肾健腰方各分别处死 3、3、1、2、3 只动物(剩余动物做其他实验检测)。以 10%的水合氯醛腹腔过量注射麻醉处死后,迅速取出完整椎间盘组织,用 4%多聚甲醛固定,备做免疫组化切片;其余部分保存备用。所取髓核标本立即放入 10%中性甲醛溶液内固定 24 h,用 Jenkins 固定脱钙液脱钙 36 h,经清水漂净 1 h 后,放置梯度乙醇逐渐脱水、浸蜡、石蜡包埋切片(5 μm),常规 HE 染色观察组织学变化。

1.5 检测指标及方法

1.5.1 RT-PCR 检测 AQP1 在椎间盘组织中的表达 标本取出后于研钵中加入液氮磨碎,放入 1 mL EP 管中,加入 1 mL Tripure 分离试剂(Roch 公司),具体操作按说明书操作。数据分析结果本实验结果采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法,计算目的基因 mRNA 转录水平的差异。

1.5.2 免疫组化试剂检测 AQP1 表达 石蜡切片脱蜡,3%的过氧化氢室温孵育 10 min;蒸馏水冲洗,用 PBS 浸洗 5 min;切片转至 pH 为 6.0 的枸橼酸盐缓冲液中,95 度加热 10 min。冷却至室温;蒸馏水冲洗, PBS 冲洗 3 min × 3 次,5%的正常山羊血清封闭 15 min,倾去血清,分别滴加肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1(IL-1)(1:50),室温下 1 h; PBS 冲洗 5 min × 3 次;滴加二抗,37℃孵育 20 min; PBS 冲洗 5 min × 3 次;滴加辣根过氧化物酶标记链霉素,室温孵育 20 min; PBS 冲洗 5 min × 3 次;显色剂(DAB)显色,蒸馏水冲洗,滴加苏木素 30 秒,用 PBS 反蓝,梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树脂封片,阴性对照实验:以抗体稀释液代替一抗,染色结果为阴性。免疫组化观察标准:(-)免疫组化显色颗粒为 0,(+)免疫组化显色颗粒小于 30%,(++)免疫组化显色颗粒 30%~50%,(+++免疫组化显色颗粒 50%~70%。

1.6 统计学方法 使用 SPSS16.0 统计软件进行处理。计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,以多因素方差分析方法比较在不同的干预措施应用后不同时间点的变化,若总体比较具有统计学意义,则进一步用单因素方差进行分析比较各组间的差异。不符合方差齐性和正态性时采用秩和检验。

2 结果

2.1 各组 AQP1 表达比较 见表 1。假手术组与正常对照组比较无差异($P > 0.05$),模型组、腰腿痛丸组、补肝肾健腰方组与正常对照组比较均有差异($P < 0.05$),在术后 20 天、40 天、60 天补肝肾健腰方组与腰腿痛丸组比较,差异均有显著性意义($P < 0.05$),术后 40 天腰腿痛丸组、补肝肾健腰方组同组术后 20 天比较,差异均有显著性意义($P < 0.05$)。

2.2 各组 AQP1 免疫组化观察 见表 2。每组大鼠每次随机采集 4 组切片进行免疫组化观察,结果用免疫组化观察标准表示。

表 1 各组 AQP1 表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	术后 20 d	术后 40 d	术后 60 d
正常对照组	9	2.057 1±0.189 5	2.221 3±0.436 4	2.106 1±0.514 7
假手术组	9	2.080 3±0.345 5	2.261 1±0.182 0	2.063 6±0.316 8
模型组	3	0.683 4±0.062 7	0.652 1±0.095 9	0.643 3±0.095 2
腰腿痛丸组	6	0.725 3±0.137 2	0.953 1±0.235 7	0.932 8±0.635 7
补肝健腰方组	9	0.839 0±0.438 2	1.251 4±0.170 2	1.226 4±0.168 3

与正常对照组比较, ① $P < 0.05$; 与腰腿痛丸组同期比较, ② $P < 0.05$; 与同组术后 20 d 比较, ③ $P < 0.05$

表 2 各组 AQP1 免疫组化观察

组别	术后 20 d	术后 40 d	术后 60 d
正常对照组	- - - -	- - - -	- - - -
假手术组	- - - -	- - - -	- - - +
模型组	+++ ++ +	+++ ++ ++	+++ ++ ++ +++
腰腿痛丸组	+ ++ + ++	++ + + +	++ ++ + +
补肝健腰方组	+ + ++ ++	+ + + +	++ + + +

2.3 光镜显示 见图 1、图 2。图 1：造模后见纤维板断裂，髓核部分水肿。周边有软骨细胞反应性增生。图 2：60 天补肝健腰方组可见残存的纤维板结构，纤维板局灶性不规则软骨增生，髓核结构模糊可见。

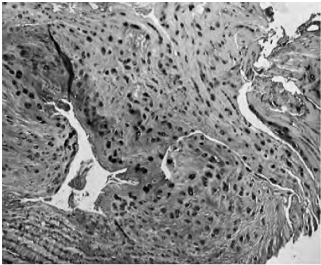


图 1 光镜×200 倍

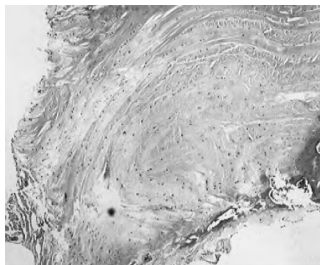


图 2 光镜×200 倍

3 讨论

椎间盘的退变主要表现在构成椎间盘基础的 3 种重要物质——多糖、蛋白和水的改变，而这些变化的出现主要是由于椎间盘组织中细胞的功能和结构的变化而引起的，并且在症状产生的前一段较长时间内已经开始出现^[9]。椎间盘组织营养供给途径主要有 2 条，一是纤维环周围血管的渗透，二是终板的渗透^[4]。髓核的主要营养供给是由营养物质通过终板的渗透来完成的^[9]。髓核含水量的下降是椎间盘发生退变后所出现的特征性表现，研究水的代谢对于了解椎间盘组织退变的始动因素有着非常重要的意义。

AQP 是一种属于膜主体内在的蛋白(major internal protein, MIP)，它的基本功能是介导自由水分子的跨生物膜转运^[6]。研究表明，AQP1 在纤维环细胞、软骨终板和髓核细胞都有表达，且软骨终板中心位置的表达尤强，其空间的分布表明它对椎间盘组织的水分的出入过程有着重要的作用^[7]。AQP1 的表达出现下降，则会出现纤维环和软骨终板对水的通

透性发生改变，就会导致椎间盘水分含量的下降。深入研究 AQP1 在椎间盘组织退变中的作用及其调节因素，有助于增加对腰椎间盘突出退变的机理的认识。

中医学治疗腰腿痛多以肾为主论治，而很少有以肝为主论治者。本院仇湘中教授根据中医理论和多年临床经验提出“腰椎间盘突出退变引起的腰腿痛从肝论治”的观点，并以“补肝汤”（《医宗金鉴》）为基础组方“补肝健腰方”应用于临床，取得良好的效果。方中熟地黄长于滋阴养血，当归补血养肝，和血调经，白芍养血柔肝和营，川芎活血行气，调畅气血，其中熟地黄、白芍为阴柔之品，与辛温之当归、川芎相配，则补血而不滞血，和血而不伤血；杜仲甘温补益，为平补肝肾之要药，既能补肾阳又能益肾阴，润肝燥，强腰脊；蜈蚣辛温走窜，通经逐邪，有调达肝经、通络止痛之功，为镇痛、散结之要药；全蝎味辛，能行风药直达病所，与蜈蚣配伍则通络止痛之效倍增；延胡索活血、理气、止痛；酸枣仁“补中益肝，坚筋骨，助阴气”，有养肝、宁心安神之效；甘草调和诸药。综观全方，具有养血柔肝、活血化痰、通络止痛之效，从而使腰部疼痛及患肢麻木疼痛诸症得以缓解。

通过实验研究可以看出，大鼠椎间盘退变造模后椎间盘组织 AQP1 的表达较椎间盘未退变组织 AQP1 的表达明显降低，而在药物干预下，AQP1 的表达又有明显提升，补肝健腰方对腰椎间盘突出后大鼠椎间盘组织 AQP1 表达的增强作用更为明显，说明补肝健腰方中药对于治疗椎间盘退变有更大的意义，明确了补肝健腰方对椎间盘退变的疗效极其作用机理，丰富了临床治疗椎间盘退变的方法和药物。

【参考文献】

- [1] 胡有谷. 腰椎间盘突出症[M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 1995: 72-98.
- [2] 施新猷. 医用实验动物学[M]. 西安: 陕西科学出版社, 1985: 35.
- [3] 孙荣国, 赵群, 周永德. 腰椎间盘突出症的诊治特点[J]. 中国医科大学学报, 2005, 34(4): 363-364.
- [4] 刘海飞, 王德春, 胡有谷. 椎间盘的营养与退变[J]. 中国矫形外科杂志, 2006, 14(11): 863.
- [5] Ogata K, Whiteside LA. Nutritional pathways of the intervertebral disc: An experimental study using hydrogen washout technique [J]. Spine, 1981, 6: 211-216.
- [6] Agre P, Sasaki S, Chrispeels MJ. Aquaporins: a family of water channel proteins [J]. AM J Physiol, 1992, 265(3): 461.
- [7] 曹国永, 周跃, 滕海军, 等. 水通道蛋白在正常大鼠椎间盘组织中的表达与分布[J]. 中国矫形外科杂志, 2005, 13(13): 996-999.

(责任编辑: 马力)