

强筋壮骨祛风合剂对腰椎间盘突出 AQP1 和 AQP5 表达的干预作用

唐成坤¹ 潘浩¹ 王栋¹ 林士明¹ 陶其杰¹ 贾高永¹ 朱杭^{1△}

[摘要] 目的:观察强筋壮骨祛风合剂对腰椎间盘突出水通道蛋白 1(AQP1)和水通道蛋白 5(AQP5)表达的干预作用。方法:将新西兰大白兔腰椎穿刺建立腰椎间盘突出模型,用 RT-PCR 及免疫组化检测 AQP1 和 AQP5 在椎间盘组织中的表达,观察模型大白兔给药 6 周后的变化。结果:1)RT-PCR 检测:(1)各组 AQP1 表达比较,假手术组与空白对照组差异无统计学意义($P>0.05$),模型空白组、腰痛宁组、强筋壮骨祛风合剂组与空白对照组差异有统计学意义($P<0.05$),空白对照组、假手术组、腰痛宁组、强筋壮骨祛风合剂组与模型空白组差异有统计学意义($P<0.05$)。 (2)各组 AQP5 表达比较,假手术组与空白对照组差异无统计学意义($P>0.05$),模型空白组、腰痛宁组、强筋壮骨祛风合剂组与空白对照组差异有统计学意义($P<0.05$),空白对照组、假手术组、腰痛宁组、强筋壮骨祛风合剂组与模型空白组差异有统计学意义($P<0.05$)。 2)免疫组化试剂检测:(1)各组 AQP1 表达比较,造模成功后,模型空白组椎间盘上 AQP1 阳性面积与空白对照组、假手术组差异有统计学意义($P<0.05$),空白对照组和假手术组差异无统计学意义($P>0.05$),其余组之间差异均有统计学意义($P<0.05$)。 (2)各组 AQP5 表达比较,造模成功后,模型空白组椎间盘上 AQP5 阳性面积与空白对照组、假手术组差异有统计学意义($P<0.05$),空白对照组和假手术组差异无统计学意义($P>0.05$),其余组之间差异均有统计学意义($P<0.05$)。结论:强筋壮骨祛风合剂对 AQP1 及 AQP5 的调节作用是其疗效机制之一,具有改善腰椎间盘突出退变的作用。

[关键词] 腰椎间盘突出;强筋壮骨祛风合剂;水蛋白通道 1;水蛋白通道 5

[中图分类号] R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2017)03-0001-05

Effect of Qiangjinzhuangguqufeng Mixture on the Expression of AQP1 and AQP5 in Lumbar Intervertebral Disc Degeneration

TANG Chengkun¹ PAN Hao¹ WANG Dong¹ LIN Shiming¹

TAO Qijie¹ JIA Gaoyong¹ ZHU Hang^{1△}

¹Guangxing Hospital, Affiliated to Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310007, China.

Abstract Objective: To observe the intervention mechanism of Qiangjinzhuangguqufeng mixture on the expression of aquaporin1 (AQP1) and aquaporin5 (AQP5) in lumbar intervertebral disc degeneration. **Methods:** The lumbar intervertebral disc degeneration model was established by lumbar puncture in New Zealand white rabbits. The expression of AQP1 and AQP5 in intervertebral disc was detected by RT-PCR and immunohistochemistry. The changes of the model rabbits were observed 6 weeks after the administration. **Results:** 1) RT-PCR detection: (1) The expression of AQP1 in each group was compared. There was no difference in the expression of AQP1 between the sham operation group and the blank control group ($P>0.05$). There were difference in the expression of AQP1 among the model blank group, the Yaotongning group, the Qiangjinzhuangguqufeng mixture group and the blank control group ($P<0.05$). (2) And there were difference among the blank control group, the sham operation group, the Yaotongning group, the Qiangjinzhuangguqufeng mixture group and the model blank group ($P<0.05$). The expression of AQP5 in each group was compared. There was no difference in the expression of AQP5 between the sham operation group and the blank control

group ($P>0.05$). There were difference among the model blank group, the Yaotongning group, the Qiangjinzhuangguqufeng mixture group and the blank control group ($P<0.05$), and there were differences among the blank control group, the sham operation group, the Yaotongning group, the Qiangjinzhuangguqufeng mixture group and the model control group ($P<0.05$). 2) Immu-

基金项目:杭州市科技计划引导项目(2014KJJ01)

浙江省中医药科技计划 A 类项目(20152A157)

杭州市卫生科技计划重点项目(20150733Q60)

¹ 浙江中医药大学附属广兴医院(杭州,310007)

[△]通信作者 E-mail:13958015488@163.com

nohistochemically detection; (1) The expression of AQP1 in each group was compared. After successful modeling, the positive area of AQP1 in intervertebral discs in the model blank group was different from that in the blank control group and the sham operation group ($P < 0.05$), but there was no difference between the blank control group and the sham operation group ($P > 0.05$), the rest had statistically significant difference ($P < 0.05$). The expression of AQP5 in each group was compared. Compared with blank control group and the sham operation group, the positive area of AQP5 in intervertebral discs in model control group was different ($P < 0.05$), but there was no significant difference between the blank control group and the sham operation group ($P > 0.05$), the rest had statistical significance ($P < 0.05$). **Conclusion:** Qiangjinzhuangguqufeng mixture on the regulation of AQP1 and AQP5 is one of the therapeutic mechanisms, which can improve the degeneration of lumbar intervertebral disc.

Keywords: lumbar disc degeneration; Qiangjinzhuangguqufeng mixture; aquaporin1 (AQP1); aquaporin5 (AQP5)

由于椎间盘退变,髓核压迫神经根引发的坐骨神经痛及腰痛是一种常见的肌肉骨骼系统性疾病,在全世界范围内大约有 5% 的患者受其困扰^[1],其病理生理机制仍然存在较大争议。腰椎间盘突出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。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^[2]。研究表明,AQP1 和 AQP5 在纤维环细胞、软骨终板和髓核细胞都有表达,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^[3,4]。在椎间盘退变的保守治疗上,祖国医学一直存在一定的优势,针对不同的分型采用不同施药方法^[5-7]。强筋壮骨祛风合剂为本院经验制剂,对于慢性下腰痛和坐骨神经痛具有显著疗效^[8],但其具体干预机制目前尚不明确。因此本研究假设可以通过增加椎间盘 AQP1 及 AQP5 的表达,从而增加椎间盘水分含量,进而改善其退化。本研究利用椎间盘穿刺腰椎退化为模型,术后给予口服强筋壮骨祛风合剂进行干预,并以其他组为对照,探讨强筋壮骨祛风合剂对椎间盘退变 AQP1 及 AQP5 表达的干预作用,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物

普通级别 32 只成年体健新西兰大白兔,雌雄不限,0.5~1.0 兽龄,体质量 2.0~2.5 kg,由浙江中医药大学实验动物中心提供。12 h 明/暗循环,实验室温度 20~26 °C,湿度 55%~65%,气流速度 0.15 m/s,实验前分笼喂养 1 周,以适应新的环境,并观察实验动物的健康状况。

1.2 实验仪器与试剂

常规试剂(国药集团),Real-time 检测仪(ABI 公司),低温冷冻离心机(上海卢湘仪离心机仪器有限公司),移液枪(吉尔森 P 型移液器公司),旋涡振荡器(青浦),电动匀浆机(FLUKO),BX41 奥林巴斯显微镜,Motic6.0 图文分析系统,等。

1.3 实验药品

强筋壮骨祛风合剂,由黄芪 30 g,当归 30 g,川牛

膝 30 g,防风 15 g,广木香 10 g,菟丝子 15 g,女贞子 15 g,穿山甲 6 g,全蝎 6 g,桃仁 12 g 纯中药浓缩制剂。腰痛宁丸(国药准字 Z13020898,承德中药集团有限责任公司生产,批号 2001377,每 100 粒重 30 g),具有消肿止痛、舒筋活血、强筋骨、温经通络的作用。

1.4 实验方法

1.4.1 模型建立 将 32 只新西兰大白兔随机分为 3 组:即造模组 20 只、假手术组 6 只、空白对照组 6 只。首先用 10% 浓度的水合氯醛,按兔子体质量以 3 mL/kg 的剂量从腹腔注入,诱导兔处于麻醉状态。麻醉后将兔以仰卧位固定于试验平台中心,再将左下腹部的毛剔除并用生理盐水清洗干净,进行手术前的常规消毒并铺好大小适中的无菌孔巾。手术切口取左下腹纵行切口,长度 8 cm 左右,经腹膜外穿过皮下脂肪组织到达腰椎前筋膜后,对组织进行钝行剥离以显露 L₄~L₆ 前方椎体及椎间盘。再取 7 号髓穿针刺入椎间盘,穿刺深度大约 3 mm,选择确定好部位,然后在 L₄₋₅, L₅₋₆ 椎间盘内分别缓慢注入 0.2 mL 无菌生理盐水,注入完毕后再逐层进行组织缝合。假手术组仅作剥离显露处理,不做椎间盘穿刺。将腹部手术伤口缝合好,再逐个分笼自由活动。造模后有 2 只出现足外翻及足趾背屈,将其余 18 只白兔随机分为强筋壮骨祛风合剂组(6 只),腰痛宁组(6 只)及模型空白组(6 只),加上假手术组(6 只)和空白对照组(6 只),共 5 组。

1.4.2 给药方案 空白对照组、假手术组和模型空白组予饲料喂养,自由饮水,连续 60 d。腰痛宁组:制成浓度为 1 g/mL 药液备用,6.48 mg/kg(按白兔体表面积换算,8 倍于等效剂量)灌胃,术后第 1 天开始,2 次/d,连续 60 d。强筋壮骨祛风合剂组:10 mL/kg,中药给药剂量参照《医用实验动物学》按人与动物给药剂量换算得到,术后第 1 天开始,2 次/d,连续 60 d。

1.5 检测指标及方法

1.5.1 RT-PCR 检测 AQP1 和 AQP5 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),具体按说明书操作。本实验结果采用 2^{-ΔΔC_t} 法数据分析,计算目的基因 mRNA 转录水平的差异。

1.5.2 免疫组化 组织块的厚度约为 0.2 cm,组织块置于 10%福尔马林中固定 48 h,洗涤、脱水、透明、浸蜡、包埋,以 4~7 μm 厚度切片,采用双抗后,进行苏木精染色,透明和封片后,通过显微镜拍照,采集样本部位,计算阳性面积。

1.6 统计学方法

数据用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析,计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示。各组白兔 AQP1,AQP5 变化比较,采用独立样本 *t* 检验进行统计分析,不同用药组间比较采用单因素方差分析进行统计分析,方差齐时多重比较采用 LSD-*t* 法检验;方差不齐时,用近似方差分析的 Welch 法,多重比较采用 Dunnett T3 法检验。 $P<0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 AQP1 表达量比较

空白对照组、假手术组、模型空白组、腰痛宁组、强筋壮骨祛风合剂组的 mRNA 水平差异有统计学意义($F=48.430,P<0.001$,见表 1)。组间多重比较,假手术组与空白对照组差异无统计学意义($P=0.230$),模型空白组、腰痛宁组、强筋壮骨祛风合剂组与空白对照组差异均有统计学意义(P 值分别为 $<0.001,0.001,0.012,0.009$),模型空白组、腰痛宁组、强筋壮骨祛风合剂组间比较,差异均有统计学意义(P 值分别为 $<0.001,<0.001,0.001$),腰痛宁组、强筋壮骨祛风合剂组间比较,差异有统计学意义(P 值分别为 $0.004,0.006$)。

表 1 各组 AQP1 表达比较($\bar{x}\pm s$)

组别	样本数	AQP1 表达
空白对照组	6	0.004 50 \pm 0.000 35 ²⁾
假手术组	6	0.003 60 \pm 0.000 52 ²⁾
模型空白组	6	0.000 90 \pm 0.000 14 ¹⁾
腰痛宁组	6	0.002 10 \pm 0.000 19 ¹⁾²⁾
强筋壮骨祛风合剂组	6	0.002 90 \pm 0.000 37 ¹⁾²⁾

注:1)与空白对照组比较, $P<0.05$;2)与模型空白组比较, $P<0.05$ 。

2.2 各组 AQP5 表达比较

空白对照组、假手术组、模型空白组、腰痛宁组、强筋壮骨祛风合剂组的 mRNA 水平差异有统计学意义($F=48.536,P<0.001$,见表 2),组间多重比较,假手术组与空白对照组差异无统计学意义($P=0.364$),模型空白组、腰痛宁组、强筋壮骨祛风合剂组与空白对照组差异均有统计学意义(P 值分别为 $<0.001,0.001,0.003,0.004$),模型空白组、腰痛宁组、强筋壮骨祛风合剂组间比较,差异均有统计学意义(P 值分别为 $<0.001,0.012,0.001$),腰痛宁组、强筋壮骨祛风合剂组间比较,差异有统计学意义(P 值分别为 $<0.001,0.006$)。

表 2 各组 AQP5 表达比较($\bar{x}\pm s$)

组别	样本数	AQP5 表达
正常对照组	6	0.007 80 \pm 0.000 102 ²⁾
假手术组	6	0.005 90 \pm 0.000 79 ²⁾
模型空白组	6	0.001 50 \pm 0.000 11 ¹⁾
腰痛宁组	6	0.003 70 \pm 0.000 26 ¹⁾²⁾
强筋壮骨祛风合剂组	6	0.004 10 \pm 0.000 13 ¹⁾²⁾

注:1)与空白对照组比较, $P<0.05$;2)与模型空白组比较, $P<0.05$ 。

2.3 免疫组化试剂检测 AQP1 表达

造模成功后,模型空白组椎间盘上 AQP1 阳性面积与空白对照组、假手术组比较差异有统计学意义($F=8.625 5,P=0.004$),空白对照组和假手术组差异无统计学意义($P=0.96$),其余差异均有统计学意义($P=0.004,P=0.013$)。免疫阳性物质集中在胞浆,呈暗蓝细胞。模型空白对照组与腰痛宁组、强筋组比较,三组间 AQP1 阳性细胞面积差异仍有统计学意义($F=9.115,P=0.027$);进一步,腰痛宁与强筋祛风组比较,差异有统计学意义($P=0.034,P=0.001$),见图 1。

2.4 免疫组化试剂检测 AQP5 表达

造模成功后,模型空白对照组椎间盘上 AQP5 阳性面积与空白对照组、假手术组差异有统计学意义($F=9.603,P=0.006$),空白对照组和假手术组差异无统计学意义($P=0.543$),其余组之间差异均有统计学意义($P=0.012,P=0.022$)。免疫阳性物质集中在胞浆,呈暗蓝细胞。模型空白组与腰痛宁组、强筋祛风组比较,三组间 AQP5 阳性细胞面积差异有统计学意义($F=7.763,P=0.037$);进一步,腰痛宁组与强筋祛风组比较,差异有统计学意义($P=0.012,P=0.001$),见图 2。

3 讨论

椎间盘退变所引起的腰背痛是全球范围内最常见的疾病之一,可见于各年龄段的人群。椎间盘是一种特殊的器官,保持脊柱的生物力学功能正常。每个椎间盘包含一个外部纤维软骨纤维环(AF)及中间凝胶状的髓核(NP)。椎间盘是一个富含水分的器官,髓核细胞外基质含水量高达 80%^[9,10]。水通道蛋白(AQPs)的主要功能是转运水。AQP1 是水通道蛋白家族中第一个成员,1987 年被首次发现,许多组织中均能鉴定出水通道蛋白^[11]。根据 AQPs 对水和其他溶质的通透性,Ishibashi 将 AQPs 家族分为两个亚族:AQP0,AQP1,AQP2,AQP4,AQP5,AQP6,AQP8 为一个亚族;AQP3,AQP7,AQP9,AQP10 属于另一亚族^[12]。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。

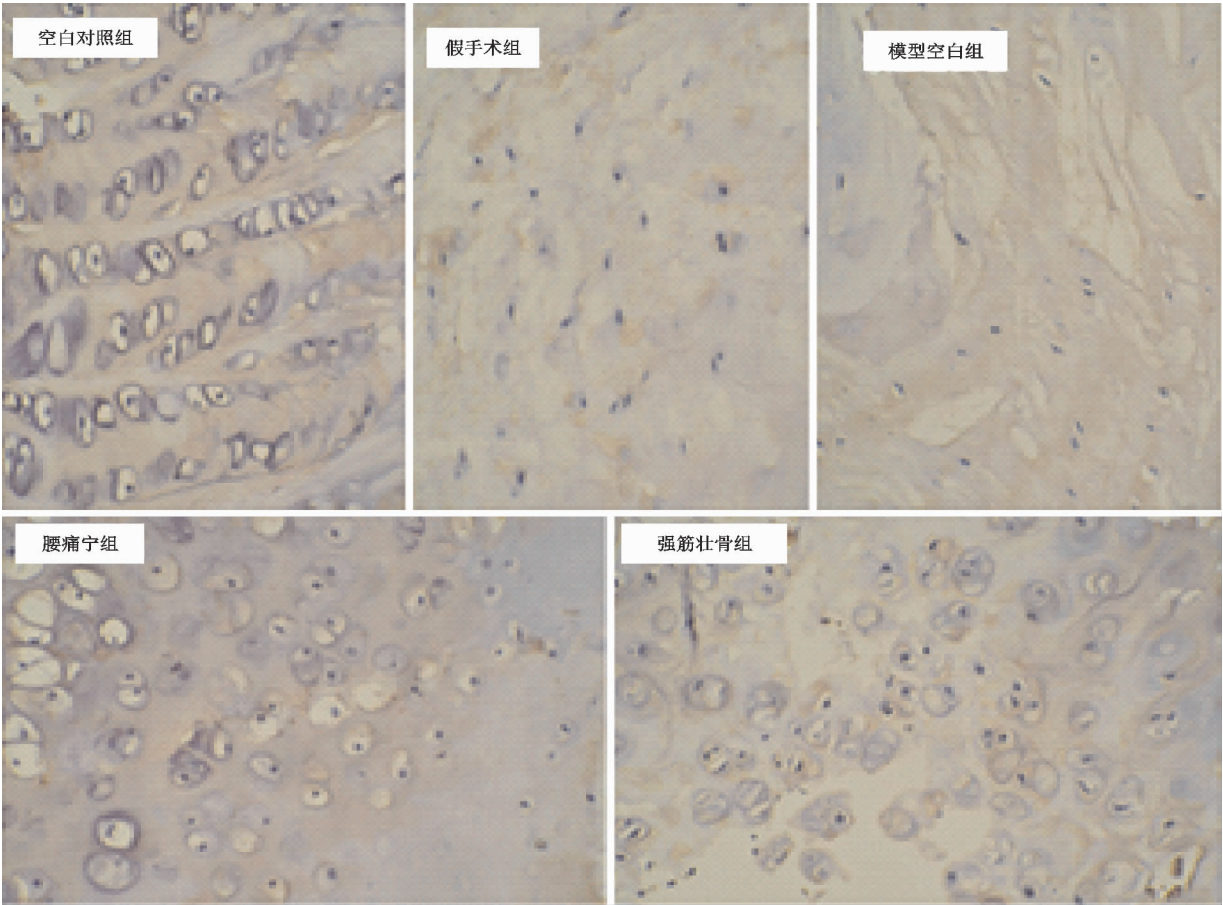


图 1 光镜下 AQP1 阳性细胞表现(×200 倍)

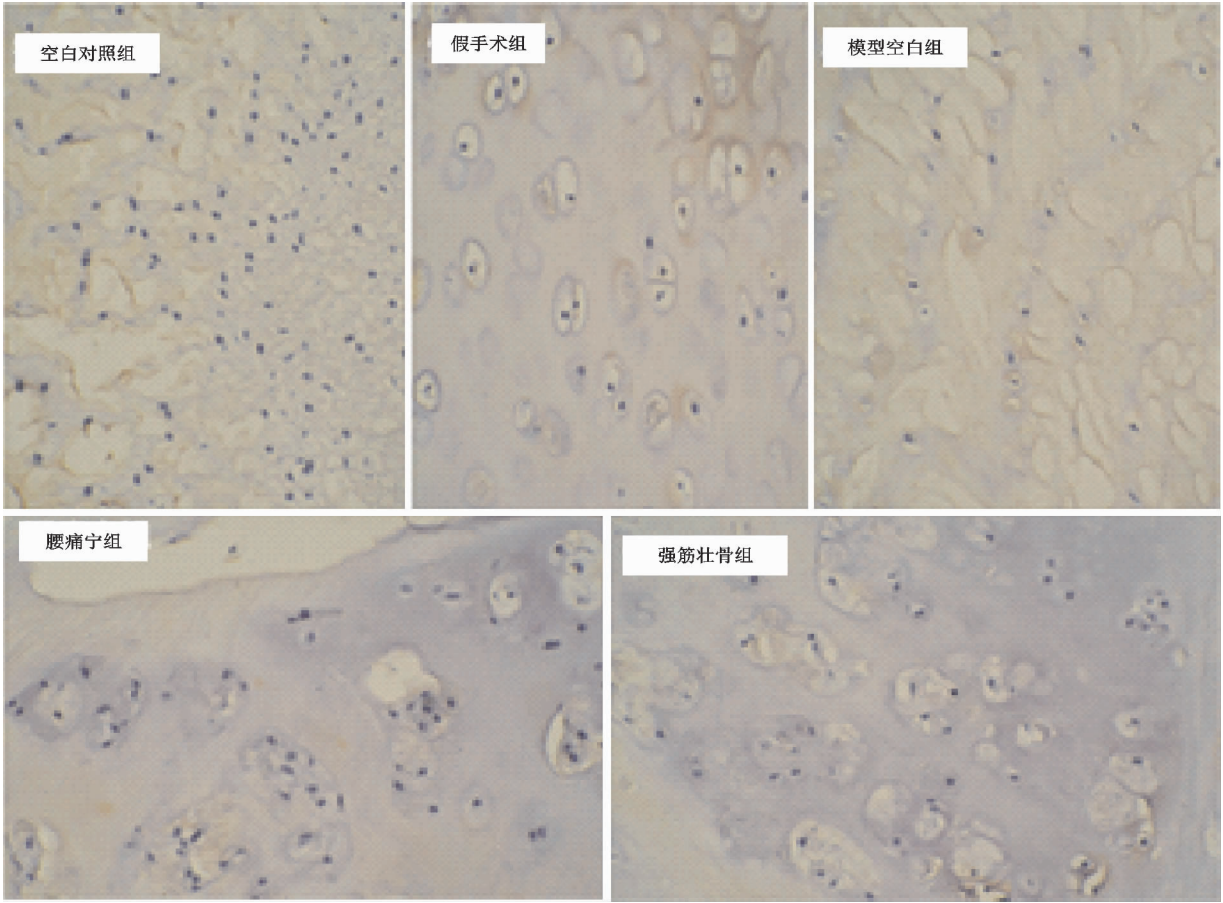


图 2 光镜下 AQP5 阳性细胞表现(×200 倍)

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^[3]。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。AQP5 被发现在 NP 和视网膜血管内皮细胞,Schwann 和肺上皮细胞组织,目前在腰椎间盘方面表达涉及较少,其对于椎间盘组织的缺氧诱导及代谢产物的动态渗透有着重要作用^[4]。AQP5 的表达水平与人类椎间盘疾病的严重程度相关,有研究显示 AQP5 表达水平的减退会引起椎间盘组织及细胞的减少,进而引起腰椎退变^[13,14]。深入研究 AQP1 及 AQP5 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退变机理的认识。

《景岳全书》“腰痛之虚症十居八九…或以年衰,或以劳苦…则悉属真阴虚证。”由此可见肾为先天之本,肾虚与衰老之间关系密切,椎间盘既与“肾”密切相关,亦有老化的过程,久劳伤肾可致椎间盘早衰,椎间盘退变以肾虚为根本病因病机的认识与现代医学对本病发病机理的认识是比较一致的。在慢性下腰痛的保守治疗上,祖国传统医学一直存在一定的优势,针对不同的分型采用不同施药方法,目前主要有三种治疗方法(补肾强腰、活血化瘀和祛风除湿),对此已有较多报道^[15-17]。强筋壮骨祛风合剂从古方挖掘,结合多年临床施药辨证观察,采用黄芪、当归、怀牛膝、巴戟天、穿山甲、防风、蜈蚣、全蝎等配伍而成,使该合剂具备活血化瘀、补肾强腰、祛风除湿等功效于一身。经多年临床运用证实,对于慢性下腰痛和坐骨神经痛有着显著疗效^[8]。

通过实验研究可以看出,强筋壮骨祛风合剂在治疗腰椎间盘退变病变上有一定的积极作用。造模成功后,模型空白组、腰痛宁组及强筋壮骨祛风组与空白对照组差异有统计学意义,说明其 AQP1 及 AQP5 的表达明显下降。药物干预后,腰痛宁组及强筋壮骨祛风组与模型空白组差异有统计学意义,说明其 AQP1 及 AQP5 的表达明显上升。而腰痛宁组及强筋壮骨祛风组之间比较,又存在差异,表明跟同类药物相比,强筋壮骨祛风组的疗效更优,对于治疗椎间盘退变有更好的效果。通过免疫组化方法得出的结果进一步证实结论一致。

综合以上:1)水通道蛋白表达量的降低一直伴随着整个腰椎间盘退变过程,意味着在维持、巩固腰椎间盘的正常功能与形态方面,水通道蛋白发挥着相应的生理作用;作为应对、治疗腰椎间盘退变的对策,增强并维持腰椎间盘中水通道蛋白的表达值得在临床工作中加以考虑。2)强筋壮骨祛风合剂作为一种治疗腰椎间盘退变的中药制剂,发挥其治疗效果的机制之一可能是通过上调腰椎间盘中水通道蛋白 AQP1 及 AQP5 的表达,从而使得水通道蛋白 mRNA 的活性增高并进一步通过翻译转录,从而增加与转运及营养代谢密切

相关的蛋白质的含量,最终促进了腰椎间盘中营养物质的输入以及代谢废物的输出,进而为退变的椎间盘修复创造更有利的条件,有效缓解椎间盘的退变。

参考文献

- [1] 舒剑臣,唐小穗,赵京元. 腰椎间盘退变引起腰腿痛的相关化学因素研究进展[J]. 中华临床医师杂志,2012,6(6):1534-1536.
- [2] Agre P,Sasaki S,Chrispeels MJ. Aquaporins:a family of water channel proteins [J]. AM J Physiol,1992,265(3):461.
- [3] 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.
- [4] Johnson ZL,Gogate SS,Day R. Aquaporin 1 and 5 expression decreases during human intervertebral disc degeneration:novel HIF-1-mediated regulation of aquaporins in NP cells[J]. Oncotarget,2015,6(14):11945-11958.
- [5] 任博文,杨豪. 口服桂葛藜汤加减配合功能锻炼治疗寒湿型腰椎间盘突出症[J]. 中医正骨,2015,27(8):53-55.
- [6] 冷锦红,于世家. 不同通路中药对糖尿病大鼠坐骨神经中 NF- κ B 活性的影响[J]. 中华中医药学刊,2014,13(3):611-613.
- [7] 郑晓东,陈建良,许勇,等. 补阳还五汤加味配合康复训练治疗椎间盘源性下腰痛[J]. 中医正骨,2011,23(2):57-58.
- [8] 王栋,潘浩,贾高永,等. 强筋壮骨祛风合剂对于 Coflex 术后功能及症状的影响[J]. 陕西中医学院学报,2015,37(5):52-58.
- [9] Humzah MD,Soames RW. Human intervertebral disc:structure and function[J]. Anat Rec,1988,220(4):337-356.
- [10] Iatridis JC,Mac Lean JJ,Orrien M,et al. Measurements of proteoglycan and water content distribution in human lumbar intervertebral discs [J]. Spine (Phila Pa 1976),2007,32(14):1493-1497.
- [11] Agre P,Preston GM,Smith BL,et al. Aquaporin CHIP:the archetypal molecular water channel[J]. Am J Physiol,1993,265(2):463-476.
- [12] Ishibashi K,Koike S,Kondo S,et al. The role of a group III AQP, AQP11 in intracellular organelle homeostasis [J]. J Med Invest,2009,56:312-317.
- [13] Richardson SM,Knowles R,Marples D,et al. Aquaporin expression in the human intervertebral disc [J]. J Mol Histol,2008,39(3):303-309.
- [14] Gajghate S,Hiyama A,Shah M,et al. Osmolarity and intracellular calcium regulate aquaporin2 expression through Ton EBP in nucleus pulposus cells of the intervertebral disc[J]. J Bone Miner Res,2009,24(6):992-1001.
- [15] 杨廷智,罗兵,杨明庭. 加味独活寄生汤配合手法治疗腰椎间盘突出症 100 例[J]. 陕西中医学报,2012,33(12):1606-1607.
- [16] 李国强. 身痛逐瘀汤加味电针,牵引治疗腰椎间盘突出症 93 例临床观察[J]. 四川中医,2009,26(12):117-118.
- [17] 王久瑞. 补肾化痰法治疗腰椎间盘突出症临床观察[J]. 中医学报,2013,28(8):1239-1240.