

补肝健腰方对腰椎间盘突出大鼠椎间盘 TNF- α 及 NF- κ B 表达的影响

仇湘中^{1△} 朱承勋¹ 张信成¹ 谭旭仪¹ 唐皓¹ 蒋盛昶¹

[摘要] 目的:观察补肝健腰方对腰椎间盘突出大鼠椎间盘 TNF- α (Tumor Necrosis Factor- α)及 NF- κ B (Nuclear Factor-Kappa B)表达的影响。方法:SD 大鼠 75 只,随机分为假手术组、模型组、腰痹通组、芬必得组、补肝健腰组,每组各 15 只,成功制备大鼠腰椎间盘突出模型,分别给予腰痹通胶囊、芬必得、补肝健腰方药物灌胃,检测各组干预前、干预第 20 天和第 40 天时椎间盘 TNF- α 及 NF- κ B 表达,进行对比。结果:干预第 20 天和第 40 天,腰痹通组、芬必得组、补肝健腰组椎间盘 TNF- α 及 NF- κ B 表达较模型组下降,差异有统计学意义($P<0.05$),腰痹通组、芬必得组、补肝健腰组在干预第 20 天和第 40 天时椎间盘 TNF- α 及 NF- κ B 表达水平,分别与本组干预前比较,差异有统计学意义($P<0.05$),补肝健腰组在以上各时间点与腰痹通组、芬必得组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。结论:补肝健腰方能降低腰椎间盘突出模型大鼠椎间盘 TNF- α 及 NF- κ B 表达,这可能为该方可以防治椎间盘退变疾病的作用机理。

[关键词] 补肝健腰方;大鼠;椎间盘;退变;肿瘤坏死因子 α ;核因子 κ B

[中图分类号] R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2017)09-0009-03

Effects of Bujanjianyao Decoction on Expression of TNF- α and NF- κ B in Intervertebral Disc of Rats with Lumbar Disc Degeneration

QIU Xiangzhong^{1△} ZHU Chengxun¹ ZHANG Xincheng¹ TAN Xuyi¹
TANG Hao¹ JIANG Shengchang¹

¹ Affiliated Hospital of Hunan Academy of Chinese Medical Science, Changsha 410006, China.

Abstract Objective: To observe the effects of Bujanjianyao decoction on the expression of TNF- α and NF- κ B in the intervertebral disc of rats with lumbar disc degeneration. **Methods:** All 75 SD rats were randomly divided into the sham-operated group, the model group, the Yaobitong group, the Ibuprofen sustained-release capsule group, and the Bujanjianyao group, with 15 rats in each group. After the rat model of lumbar disc degeneration was prepared successfully, the groups were given Yaobitong capsule, Ibuprofen sustained-release capsule, Bujanjianyao decoction by gavage, respectively. The expression of TNF- α and NF- κ B in the intervertebral discs were observed and compared before, and at the 20th day and the 40th day after intervention. **Results:** At the 20th day and the 40th day after intervention, compared with the control group, the expression of TNF- α and NF- κ B in the Yaobitong group, the Ibuprofen sustained-release capsule group and the Bujanjianyao group were decreased significantly ($P<0.05$). There were significant differences when the expression of TNF- α and NF- κ B on in the Yaobitong group, the Ibuprofen sustained-release capsule group, the Bujanjianyao group at the 20th day, the 40th day after intervention compared with before intervention, respectively ($P<0.05$). There was no significant difference when the Bujanjianyao group compared with the Yaobitong group, the Ibuprofen sustained-release capsule group at the above three times ($P>0.05$). **Conclusions:** Bujanjianyao decoction could effectively lower the expression of TNF- α and NF- κ B in intervertebral disc of rats with lumbar disc degeneration, which may be the mechanism of prevention and treatment of disc degeneration.

Keywords: Bujanjianyao decoction; rat; intervertebral disc; degeneration; TNF- α ; NF- κ B

基金项目:湖南省中医药科研计划重点项目(201710)

湖南省中医药管理局课题项目(201507)

湖南省教育厅科学研究项目(14C0865)

湖南省中医药研究院重点课题(201503)

¹ 湖南省中医药研究院附属医院(长沙,410006)

[△]通信作者 E-mail:qihu330@sina.com

补肝健腰方系本院治疗腰椎退行性疾病的有效经验方,前期实验研究发现该方对腰椎间盘突出退变的损伤具有较好的修复作用^[1-3]。近年来,研究表明核因子-

κ B(Nuclear Factor-Kappa B, NF- κ B)信号通路在腰椎退行性疾病发病机制中处于重要的地位,激活后可导致炎性细胞因子和细胞凋亡基因表达,诱导终板软骨细胞、椎间盘髓核细胞的大量凋亡,进而引起椎间盘退变^[4-6]。本实验拟观察补肝肾腰方对椎间盘退变大鼠椎间盘肿瘤坏死因子- α (Tumor Necrosis Factor- α , TNF- α)及 NF- κ B 表达的影响,进一步探讨其作用机制,现总结报告如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物

10月龄SD大鼠75只,雌雄各半,体质量250~300g,实验动物均购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司,由湖南省中医药研究院实验动物中心提供。动物许可证:SCXK(湘)2015-0008。

1.2 实验药物

补肝肾腰方,功效为补肝肾腰,通络止痛。药物组成:当归15g,川芎12g,白芍30g,熟地25g,炒枣仁10g,杜仲15g,延胡索10g,蜈蚣1条,全蝎3g,甘草5g。由湖南省中医药研究院附属医院药剂科提供。腰痹通胶囊(江苏康缘弘道医药有限公司生产,产品批号15090101405,规格为0.42g/粒)具有舒筋活血、强筋骨、提高机体免疫的作用。布洛芬缓释胶囊(商品名为芬必得,葛兰素史克公司生产),国药准字9908,规格为0.4g/粒。

1.3 实验试剂

TNF- α 免疫组织化学检测试剂(美国Santa Cruz有限公司,批号Sc-8301),NF- κ B免疫组织化学检测试剂(武汉博士德公司,批号为BA0610)。

1.4 实验方法

1.4.1 药物制备 取补肝肾腰方10剂加水5000mL,煎煮2次,每次1h,合并煎液,静置24h,离心,上清液水浴浓缩至600mL,灌装灭菌,备用,得到含补肝肾腰方生药浓度约为2.08g/mL。

1.4.2 分组方法 大鼠适应性喂养1周后,按照体质量进行排序,随机分为假手术组、模型组、腰痹通组、芬必得组、补肝肾腰组,每组各15只。

1.4.3 造模方法 参考崔力扬等^[7]实验方法进行模型制备。将造模组大鼠腹腔注射10%水合氯醛(3mL/kg)麻醉。麻醉成功后取仰卧位,腹部备皮,固定四肢,用碘伏消毒后铺巾。取右侧旁正中切口,长约1.5~2.0cm,远端略过髂嵴2~3mm。将肠管及大网膜用湿纱布向头侧、对侧推移,暴露腹后壁,剪开腹后膜,保护好下腔静脉,将腰大肌从脊柱附着点上节段性剥离(髂嵴平对L₆椎体或L_{5~6}椎间盘)暴露L_{4~5}椎间盘,针刺角度与椎间盘矢状面呈0°~60°,平行于软骨终板进针。针刺成功后,缝合腹膜层、肌层,关闭皮肤。

假手术组在暴露L_{4~5}椎间盘后,不进行针刺。术后观察步态、进食,有无尿潴留、伤口感染等。参照该方法,在造模2周后即可成功制备大鼠椎间盘退变模型。

1.4.4 药物干预 造模成功后,参照不同动物等效剂量的折算系数^[8],计算得出大鼠补肝肾腰方灌胃11.25g/kg,腰痹通胶囊灌胃0.34g/kg,芬必得0.072g/kg。腰痹通组、芬必得组大鼠灌胃之前,取对应质量的腰痹通胶囊或芬必得药物,加1mL温水溶解后灌胃。假手术组和模型组则给予生理盐水灌胃,1mL/200g,1次/d。

1.5 观察指标及方法

在实验造模成功(即实验干预前)、灌胃第20天及第40天时,各组随机选取5只大鼠,水合氯醛腹腔麻醉后,取出完整L_{4~5}椎间盘组织,制备石蜡切片,在200倍光镜下观察各组椎间盘显微组织形态。同时,采用免疫组织化学检测法检测各组椎间盘细胞TNF- α 及NF- κ B表达情况,即观察同一组动物同一部位切片,选择5个不重复视野进行观察,测出每张切片中TNF- α 及NF- κ B染色平均光密度和染色面积率,进行对比。

1.6 统计学方法

采用SPSS17.0统计软件进行处理,计量资料先进行正态性和方差齐性检验,满足正态性和方差齐性时,采用单因素方差分析,组间比较若方差齐时采用方差分析中LSD检验,不满足正态性时选择秩和检验, $P<0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

各组给予对应药物干预后,均无死亡动物,在实验造模成功(即实验干预前)、灌胃第20天及第40天时,检测椎间盘TNF- α 及NF- κ B表达情况,结果如下。

2.1 各组三个时间点椎间盘TNF- α 表达比较

在干预前,模型组、腰痹通组、芬必得组、补肝肾腰组分别与假手术组比较,差异有统计学意义($P<0.05$),该四组互相比,差异无统计学意义($P>0.05$)。干预第20天及第40天,模型组、腰痹通组、芬必得组、补肝肾腰组分别与假手术组比较,差异有统计学意义($P<0.05$);腰痹通组、芬必得组、补肝肾腰组分别与模型组比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。腰痹通组、芬必得组、补肝肾腰组互相比,差异无统计学意义($P>0.05$)。干预第20天及第40天,腰痹通组、芬必得组、补肝肾腰组分别与干预前比较,差异有统计学意义($P<0.05$),而模型组则差异无统计学意义($P>0.05$)。提示在造模成功、灌胃干预第20天及第40天,椎间盘退变模型大鼠椎间盘TNF- α 均较正常椎间盘增高,经腰痹通胶囊、补肝肾腰方、芬必得灌胃干预后,各组TNF- α 表达较模型组下降,且较干预前也得到下降,见表1。

表 1 各组三个时间点 TNF-α 表达比较(̄x±s)

组别	n	剂量(g/kg)	干预前	第 20 天	第 40 天
假手术组	5		0.058±0.009	0.062±0.011	0.053±0.007
模型组	5		0.549±0.022	0.550±0.024	0.561±0.013
腰痹通组	5	0.34	0.564±0.032	0.432±0.012	0.368±0.011
芬必得组	5	0.072	0.552±0.035	0.444±0.012	0.378±0.014
补肝健腰组	5	11.25	0.548±0.024	0.434±0.014	0.379±0.035

2.2 各组三个时间点 NF-κB 表达比较

在干预前,模型组、腰痹通组、芬必得组、补肝健腰组分别与假手术组比较,差异有统计学意义($P<0.05$),该四组互相比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。干预第 20 天及第 40 天,模型组、腰痹通组、芬必得组、补肝健腰组分别与假手术组比较,差异有统计学意义($P<0.05$);腰痹通组、芬必得组、补肝健腰组分别与模型组比较,差异有统计学意义($P<0.05$);腰痹通组、芬必得

组、补肝健腰组互相比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。干预第 20 天及第 40 天,腰痹通组、芬必得组、补肝健腰组分别与干预前比较,差异有统计学意义($P<0.05$),而模型组则差异无统计学意义($P>0.05$)。提示在造模成功、灌胃干预第 20 天及第 40 天,腰椎间盘突出模型大鼠椎间盘 NF-κB 均较正常椎间盘增高,经腰痹通胶囊、补肝健腰方、芬必得灌胃干预后,各组 NF-κB 表达较模型组下降,且较干预前也得到下降,见表 2。

表 2 各组三个时间点 NF-κB 表达比较(̄x±s)

组别	n	剂量(g/kg)	干预前	第 20 天	第 40 天
假手术组	5		0.096±0.009	0.103±0.008	0.101±0.010
模型组	5		0.731±0.017	0.742±0.019	0.736±0.033
腰痹通组	5	0.340	0.737±0.023	0.544±0.020	0.357±0.022
芬必得组	5	0.072	0.740±0.033	0.533±0.029	0.365±0.018
补肝健腰组	5	11.25	0.747±0.030	0.550±0.025	0.350±0.022

3 讨论

众多研究表明,椎间盘退变是多因素、多机制参与的复杂过程,而 NF-κB 信号通路在椎间盘退变的发生、发展过程中发挥重要的作用^[9,10]。核因子 κB(Nuclear Factor-Kappa B, NF-κB)是 1986 年由 Bltimore(美国麻省理工学院癌症研究中心)和 Rwiansen(麻省 Whitehead 生物医学研究所)发现的,之后的研究进一步发现,NF-κB 作为信号传导途径中的枢纽,在感染、炎症反应、氧化应激、细胞增生、细胞凋亡等过程中发挥作用^[8]。大量的文献报道退变椎间盘中 NF-κB 常处于激活状态,信号通路中相关炎性因子 TNF-α,聚集蛋白聚糖酶水平提高,而这些被认为是 NF-κB 典型的靶基因^[11,12]。通过免疫组织化学研究表明,与正常的椎间盘组织相比,大量激活的 NF-κB 出现在退变的椎间盘组织中,促使信号通路中 TNF-α,IL-1 和 MMP 等下游产物表达。因此,检测椎间盘 TNF-α 及 NF-κB 的表达水平,能了解 NF-κB 是否激活,反映椎间盘退变程度,评价药物疗效。

祖国医学中并没有“腰椎间盘突出”病名,根据本病特征,常被划归“痹证”“腰腿痛”等病范畴。“腰为肾之府”“肾主骨”,故多以肾为主论治。笔者根据中医理论和积累的多年临床经验提出“腰椎间盘突出引起的腰腿痛从肝论治”的观点,临床上常以补肝健腰方进行治疗,取得了比较满意的临床疗效^[13]。该方以《医宗金鉴》中“补肝汤”为基础,药物组成为当归、川芎、白芍、熟地、炒枣仁、杜仲、延胡索、蜈蚣、全蝎、甘草,功效为补肝健腰、通络止痛。肝藏血,血虚则肝失所养。方

中熟地甘温味厚,而质柔润,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,其中枣仁“补中益肝,坚筋骨,助阴气”,有养肝、宁心安神之效,熟地、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,蜈蚣、全蝎辛温走窜,通经逐邪,有调达肝经、通络止痛之功,为镇痛、散结之要药,延胡索活血、理气、止痛,甘草调和诸药。综观整个组方,具有养血柔肝、活血化瘀、通络止痛之效,从而改善腰部疼痛及患肢麻木疼痛的症状。

在前期实验研究中发现,补肝健腰方具有抗炎、镇痛和调节免疫的作用,对腰椎间盘突出退变的损伤具有较好的修复作用^[1-3,14]。本研究结果表明,造模成功、灌胃干预第 20 天及第 40 天,腰椎间盘突出退变模型大鼠椎间盘 TNF-α 及 NF-κB 均较正常椎间盘增高,提示 NF-κB 信号通路在腰椎间盘突出退变中处于激活状态,经补肝健腰方灌胃干预后,TNF-α 及 NF-κB 表达较模型组下降,且较干预前也得到下降,进一步提示补肝健腰方可能通过降低 TNF-α 及 NF-κB 表达,阻断 NF-κB 信号通路,达到延缓椎间盘退变过程的作用。

参考文献

[1] 仇湘中,蒋盛昶,张信成,等.补肝健腰方治疗椎间盘突出症疗效及对血清 TNF-α 的影响[J].中医导报,2015,21(14):35-37.

- [2] 仇湘中,张信成,严敏,等.补肝肾腰方对腰椎间盘突出大鼠髓核超微结构的影响[J].中医药导报,2015,21(19):19-22.
- [3] 仇湘中,蒋盛昶,张信成,等.补肝肾腰方对腰椎间盘突出大鼠髓核组织 TNF- α 、IL-1 β 干预作用的研究[J].湖南中医药大学学报,2015,35(4):17-23.
- [4] Wang J, Markova D, Anderson DG, et al. TNF- α and IL-1 β promote a disintegrin like and metalloprotease with thrombospondin type I motif-5-mediated aggrecan degradation through syndecan-4 in intervertebral disc[J]. J Biol Chem, 2011, 286(46):39738-39749.
- [5] 陈岩,王拥军,徐浩,等.川芎嗪对白介素-1 β 诱导退变的椎间盘终板软骨细胞的保护作用[J].中华中医药杂志,2015,30(5):1437-1442.
- [6] Nasto LA, Seo HY, Robinson AR, et al. Inhibition of NF- κ B activity ameliorates age-associated disc degeneration in a mouse model of accelerated aging[J]. Spine, 2012, 21: 1819-1825.
- [7] 崔力扬,刘尚礼,丁悦,等.大鼠腰椎间盘突出针刺退变模型的建立[J].中国矫形外科杂志,2007,15(13):1008-1011.
- [8] 魏伟,吴希美,李元建.药理实验方法学[M].4版.北京:人民卫生出版社,2010:1698.
- [9] 梁鹤,董双海,夏天,等.NF- κ B 信号通路的激活与椎间盘退变的关系[J].中国矫形外科杂志,2015,23(5):458-462.
- [10] Wang X, Wang H, Yang H, et al. Tumor necrosis factor- α and interleukin-1 β -dependent matrix metalloproteinase-3 expression in nucleus pulposus cells requires cooperative signaling via syndecan 4 and mitogen-activated protein kinase-NF- κ B axis: implications in inflammatory disc disease[J]. Am J Pathol, 2014, 184(9):2560-2572.
- [11] Zhao CQ, Zhang YH, Jiang SD, et al. ADAMTS-5 and intervertebral disc degeneration: the results of tissue immunohistochemistry and in vitro cell culture[J]. J Orthop Res, 2011, 29(5):718-725.
- [12] 梁鹤,董双海,夏天,等.氧化应激介导的 NF- κ B 信号转导通路在椎间盘退变中的作用[J].现代生物医学进展,2015,14(14):2777-2779.
- [13] 仇湘中,黎玉林.腰椎间盘突出症的中西药治疗对比观察[J].中国骨伤,1998,11(3):71.
- [14] 仇湘中,张信成,蒋盛昶,等.补肝肾腰方对腰椎退变大鼠椎间盘组织 AQP1 表达的影响[J].新中医,2014,46(12):191-193.