

扶阳宣痹汤对大鼠椎间盘退变及基质金属蛋白酶表达的影响

杨光露^{1,2} 郭杨^{1,2△} 马勇^{1,2} 涂鹏程^{1,2} 孙杰^{1,2} 许炜民^{1,2} 吴承杰^{1,2}

[摘要] **目的:**观察扶阳宣痹汤对退变椎间盘组织病理及相关因子 MMP9 和 MMP13 表达的影响,探讨改善椎间盘退变的作用机制。**方法:**选择大鼠尾椎间盘穿刺 Co5/6/7 建立椎间盘退变模型,随机分为空白组、模型组、腰痹通组(腰痹通 0.34 g/(kg·d))、扶阳宣痹汤低剂量组(8.19 g/(kg·d))、中剂量组(16.38 g/(kg·d))、高剂量组(32.76 g/(kg·d)),制备大鼠椎间盘退变模型,模型制备成功后对各组大鼠进行灌胃给药,给药 4 周后行磁共振成像(MRI)复查各组大鼠尾椎间盘退变情况,处死大鼠提取尾椎间盘髓核组织,使用苏木精-伊红(HE)染色检测椎间盘退变程度,免疫组化检测椎间盘组织 COL2A1 和 AggreCan 的表达,蛋白免疫印迹法(Western Blot)检测椎间盘组织 MMP9 和 MMP13 的蛋白表达,实时聚合酶链式反应(RT-PCR)检测椎间盘组织 COL2A1、AggreCan、MMP9 和 MMP13 的 mRNA 表达。**结果:**术后 4 周与模型组相比,扶阳宣痹汤低、中、高剂量组椎间盘 T₂ 加权信号强度高,高剂量组 MRI 的 Piffmann 椎间盘评分明显降低,差异有统计学意义($P<0.01$);HE 染色的 Masuda 评分明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$);对椎间盘 COL2A1 和 AggreCan 的免疫组化染色更强,差异有统计学意义($P<0.01$);显著下调 MMP9 和 MMP13 的 mRNA 表达及蛋白表达,差异有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$);同时上调 COL2A1 和 AggreCan 的 mRNA 表达,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论:**扶阳宣痹汤可以通过抑制 MMP9 和 MMP13 表达促进 COL2A1 及 AggreCan 的合成,改善椎间盘退行性病变,并存在一定剂量依赖性。本研究为扶阳宣痹汤改善椎间盘退变提供了实验依据。

[关键词] 扶阳宣痹汤;椎间盘退变;基质金属蛋白酶 9;基质金属蛋白酶 13;髓核基质

[中图分类号] R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2021)04-0001-07

Effect of Fuyang Xuanbi Decoction on Intervertebral Disc Degeneration and the Expression of Matrix Metalloproteinase in Rats

YANG Guanglu^{1,2} GUO Yang^{1,2△} MA Yong^{1,2} TU Pengcheng^{1,2}
SUN Jie^{1,2} XU Weimin^{1,2} WU Chengjie^{1,2}

¹ Department of Traumatology & Orthopedics, Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China;

² Laboratory of New Techniques of Restoration & Reconstruction of Orthopedics and Traumatology, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China.

Abstract Objective: To observe the effect of Fuyang Xuanbi decoction on histopathology of degenerative intervertebral disc and expression of related factors MMP9 and MMP13, and to explore the mechanism of improving intervertebral disc degeneration. **Methods:** The rat model of intervertebral disc degeneration was established by Co5/6/7 puncture of caudal intervertebral disc. The rats were randomly divided into blank group, model group, Yaobitong group (Yaobitong 0.34 g/(kg·d)), low dose group (Fuyang Xuanbi decoction 8.19 g/(kg·d)), middle dose group (Fuyang Xuanbi decoction 16.38 g/(kg·d)) and high dose group (Fuyang Xuanbi decoction 32.76 g/(kg·d)). After all the models were successfully

established, rats in each group were given intragastric administration of the drug. Magnetic resonance imaging (MRI) was performed to reexamine the degeneration of rats caudal intervertebral disc after 4 weeks of administration, and rats were sacrificed to extract the nucleus pulposus of caudal intervertebral disc. The degree of intervertebral disc degener-

基金项目:江苏省南京市研究生教育创新计划资助项目立项课题(SJCX18_0570)

¹ 南京中医药大学附属医院骨伤科(南京,210029)

² 南京中医药大学骨伤修复与重建新技术实验室

△通信作者 E-mail: drguoyang@126.com

ation was detected by Hematoxylin eosin (HE) staining, the expression of COL2A1 and aggrecan in intervertebral disc tissue was detected by immunohistochemistry, and the protein expression of MMP9 and MMP13 were detected by Western Blot. Realtime-polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to detect the mRNA expression of COL2A1, aggrecan, MMP9 and MMP13 in intervertebral disc tissue. **Results:** The T_2 -weighted signal intensities of intervertebral disc in the low, middle and high dose groups of Fuyang Xuanbi decoction were higher than that in the model group at 4 weeks after operation. Additionally, the piffmann intervertebral disc score of MRI and the Masuda score of HE staining in the high dose group were significantly lower than those in the model group, but the immunohistochemical staining of COL2A1 and Aggrecan of the intervertebral disc were stronger. The mRNA expression and protein expression of MMP9 and MMP13 were significantly down-regulated, while the mRNA expression of COL2A1 and Aggrecan was up-regulated. **Conclusion:** Fuyang Xuanbi decoction can promote the synthesis of COL2A1 and MMP13 by inhibiting the expression of COL2A1 and MMP13, and improve intervertebral disc degeneration in a dose-dependent manner. This study provides some experimental basis for Fuyang Xuanbi decoction to improve intervertebral disc degeneration.

Keywords: fuyang xuanbi decoction; intervertebral disc degeneration; MMP9; MMP13; nucleus pulposus matrix

椎间盘退行性病变(Intervertebral Disc Degeneration, IDD)是腰椎间盘突出症、盘源性腰痛等骨科常见疾病发生发展的重要病理过程^[1-2],一般多发于中老年人^[3],但随着互联网应用的普及和生活节奏的加快,IDD越来越多在中青年人群中发现,加重了社会经济负担^[4]。研究表明 IDD 的进展受到多种因素如椎体力学失衡、炎症、代谢疾病等的影响^[5-8]。退变椎间盘在炎症因子及降解酶(如白细胞介素 1(Interleukin-1, IL-1)、基质金属蛋白酶(Matrix Metalloproteinase, MMP)等)的浸润下,使二型胶原(Collagen II, COL2A1)、蛋白多糖(Aggrecan)等髓核基质大分子分解增加,最终造成椎间盘基质的生物力学特性不断丧失^[9-12]。因此抑制炎症因子及降解酶的生成,促进基质合成对改善 IDD 尤为重要。

1 材料与方法

1.1 实验动物

成年健康 SPF(无特定病原体)级 SD 大鼠 60 只,雌雄各半,体质量 180~220 g,由南京青龙山动物中心提供,动物许可证号 SCXK(浙)2019-0002。

1.2 实验药物及试剂

扶阳宣痹汤,国家发明专利 ZL201711188654.1。组合:黄芪 30 g,桂枝 30 g,白芍 30 g,附子 12 g,薏苡仁 12 g,甘草 10 g,干姜 6 g 等。饮片购自南京中医药大学附属医院药剂科。腰痹通胶囊(中国康缘公司,401206);苏木精-伊红(HE)染色液(中国雷根公司, DH0006);MMP9、MMP13、GAPDH 抗体(美国 Proteintech 公司, 10375-2-AP, 18165-1-AP, 10494-1-AP);Aggrecan 及 COL2A1 抗体、羊抗兔二抗(美国 Abcam 公司, ab36861, ab188570, ab205718);ReverTraAce qPCR 反转录试剂盒、SYBR Green Realtime PCR Master Mix 定量试剂盒(日本 TaKaRa 公司,批号 RR036A 及 RR820A)。

1.3 实验仪器

PharmaScan 7.0T 小动物磁共振成像系统(德国 Bruker 公司);PerkinElmer 酶标仪(美国 Bio-Tek 公司),聚合酶链式反应(PCR)自动系列化分析仪(美国 ABI 公司),化学发光成像仪(美国 GE Healthcare 公司),蛋白半干转印仪及电泳仪(美国 Bio-Rad 公司),微孔板离心机及各量程移液器(德国 Eppendorf 公司),生物显微镜-图像分析系统(德国 Leica 公司),全自动硬组织切片机(德国 Leica 公司)。

1.4 方法

1.4.1 造模方法 除空白组外均需要采用尾椎纤维环穿刺法制备椎间盘退变模型。模型制备:按 Bian^[13]的方法,大鼠腹腔注射 3%戊巴比妥钠(40 mg/kg)麻醉后,消毒大鼠尾部,29G 针头行尾椎穿刺,穿刺节段为 Co5/6/7,避开大鼠尾动静脉,向椎间盘中心,穿刺深度为 5 mm,刺入椎间隙后针头旋转 360°留置 10 s,碘伏消毒并标记位置后给予创可贴保护。

1.4.2 分组方法 将大鼠随机分为空白组,模型组,腰痹通组,扶阳宣痹汤低剂量组、中剂量组、高剂量组,每组 10 只。

1.4.3 干预方法 造模成功后,根据不同动物等效剂量的折算系数表^[14],空白组、模型组均给予生理盐水(10 mL/(kg·d));腰痹通组给予腰痹通溶液(0.34 g/(kg·d)),扶阳宣痹汤低、中、高剂量组分别给予扶阳宣痹汤低剂量(8.19 g/(kg·d))、中剂量(16.38 g/(kg·d))、高剂量(32.76 g/(kg·d)),连续给药 4 周。

1.4.4 标本制作方法 大鼠给药治疗 4 周后,腹腔注射 3%戊巴比妥钠(40 mg/kg)麻醉,脱颈处死,取整条尾椎于冰上,分离 Co5/6/7 椎间盘组织,预冷生理盐水冲洗后,Co5 置于 4%多聚甲醛中固定,用于 HE 染色和免疫组化观察椎间盘退变;Co6 及 Co7 置于 -80 °C 保存,用于蛋白免疫印迹法(Western Blot)及

PCR 检测。

1.5 实验指标测定

磁共振成像(MRI)检测椎间盘退变:给药 4 周后,每组大鼠随机抽取 3 只,利用小动物磁共振成像系统(7.0T)扫描大鼠脊柱尾椎椎间盘组织形态,获取尾椎间盘及髓核信号变化并采用 Piffimann 椎间盘评分系统进行评估,计算椎间盘的退变率^[15]。

HE 染色检测椎间盘病理变化:每组大鼠随机抽取 3 只,大鼠处死后取标记位置的 Co5 椎间盘组织,经 4%多聚甲醛中固定 24 h,甲酸脱钙液脱钙 72 h,再经梯度乙醇脱水,二甲苯透明处理,浸蜡,常规包埋,石蜡切片,厚度约 6 μm;依次烤片过夜,二甲苯脱蜡,梯度乙醇水化,苏木素染色,盐酸乙醇分化,再经伊红染色,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,最后显微镜下观察,各组椎间盘组织进行病理学 Masuda 评分^[16]。

免疫组化检测 COL2A1 及 Aggrecan 表达:取各组 3 只大鼠进行椎间盘石蜡切片,二甲苯脱蜡、梯度乙醇水化同 HE 染色,化后切片浸于柠檬酸缓冲液中沸水浴 25 min 进行抗原修复,滴加 2%过氧化氢溶液灭活内源性过氧化物酶,再向切片滴加 10%山羊血清,室温封闭 1 h,漂洗后滴加一抗(1:200),4℃孵育过夜,漂洗后滴加辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗(1:1 000),室温孵育 2 h,再经二氨基联苯胺(DAB)染色液染色 10 min,苏木素浸染 1 min,流水冲洗 5 min 后依次脱水、透明、封片,显微镜观察每组取 3 张切片,每张切片随机选取 3 个不重叠的高倍视野并利用 Image-Pro Plus 5.0 软件对图像进行分析。

实时聚合酶链式反应(RT-PCR)检测 COL2A1、Aggrecan、MMP9 及 MMP13 的 mRNA 表达:各组大鼠随机抽取 3 只,从 Co6/7 椎间盘中提取髓核组织,柱提法提取总 RNA,使用 ReverTraAce qPCR 逆转录试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA,反应条件为 37℃ 15 min,85℃ 5 s,利用 SYBR Green Realtime PCR Master Mix 定量试剂盒配制 20 μL 体系进样,反应条件为 95℃ 30 s,95℃ 5 s,60℃ 30 s。以 GAPDH 作为内参进行分析,根据公式 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 进行半定量计算分析,检测目标分子引物序列(见表 1)。

Western Blot 检测 MMP9 及 MMP13 蛋白的表达:随机抽取 3 只大鼠,将取出的 Co6/7 椎间盘加入 RIPA 裂解液充分研磨后冰上裂解,离心收集总蛋白,经二辛可宁酸(BCA)法定量后,取等量蛋白样品加入等体积缓冲液,煮沸 10 min 后,进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)凝胶电泳(90 min),转膜(60 min),5%奶粉室温封闭(2 h),一抗(1:1 000) 4℃过夜孵育,二抗(1:10 000)室温孵育

(2 h),滴加电化学发光(ECL)液显色,凝胶成像系统成像检测 MMP9 及 MMP13 蛋白的表达,用 Image J 图像分析系统进行蛋白条带灰度分析。

表 1 目标分子引物序列

基因	引物序列
GAPDH	上游:GATGCTGGTGCCGAGTAC
	下游:GCTGAGATGATGACCCTTTTG
Aggrecan	上游:CAACTACCCGGCCATCC
	下游:GATGGCTCTGTAATGGAACAC
COL2A1	上游:AGGGCCAGGATGTCCGGCA
	下游:GGGTCCCAGGTTCTCCATCT
MMP9	上游:CATGCGCTGGGCTTAGATCA
	下游:GAGGCCTTGGGTCAGGTTTAGAG
MMP13	上游:GGAGCATGGCGACTTCTAC
	下游:GAGTGCTCCAGGGTCCTT

1.6 统计学方法

采用 GraphPad Prism 8.0 软件对所得数据进行统计处理,所有实验数据计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差别比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

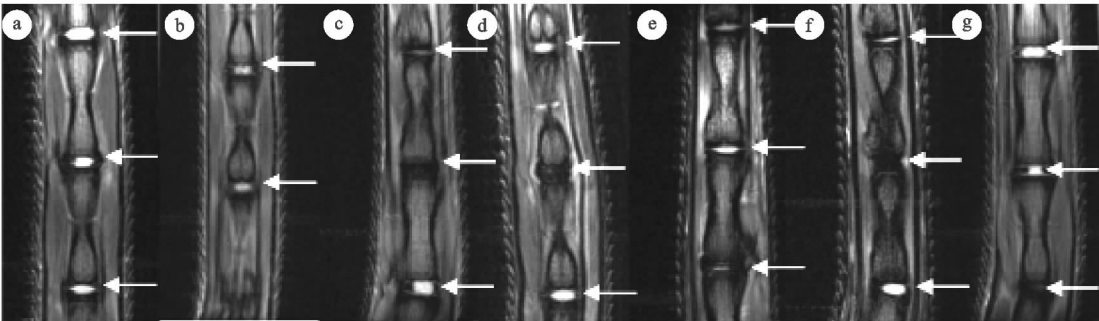
2 结果

2.1 椎间盘退变的 MRI 检查及 Piffimann 椎间盘评分

模型制备 4 周后行 MRI 影像学检查,空白组的尾椎间盘 T₂ 加权像下呈明显的高信号,而模型组的尾椎间盘信号强度降低,其 Piffimann 椎间盘评分(7.333±1.211)与空白组(4.667±1.366)相比明显升高($P=0.018$),表示尾椎间盘退变模型制备成功。给药 4 周后,MRI 结果显示:与模型组(10.000±1.789)相比,扶阳宣痹汤低剂量组(8.667±3.141)、中剂量组(7.667±1.367)、高剂量组(5.333±0.516)大鼠椎间盘信号强度均有不同程度地增强,其中扶阳宣痹汤高剂量组的 Piffimann 椎间盘评分明显下降($P=0.006$),高剂量组与腰痹通组(5.667±1.033)之间差异无统计学意义,见图 1。

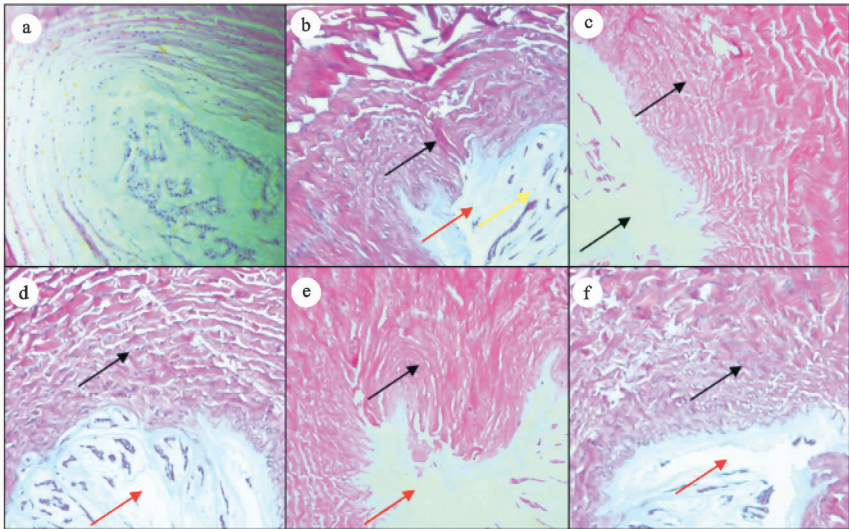
2.2 椎间盘组织病理学变化及 Masuda 评分

HE 染色结果显示:与空白组比较,模型组椎间盘纤维环排列紊乱,与 NP 界限模糊,髓核基质凝结、NP 细胞减少,其 Masuda 评分(9.800±0.837)较空白组(5.600±1.140)明显增高($P < 0.001$);与模型组比较,扶阳宣痹汤低、中、高剂量组及腰痹通组椎间盘组织病理状态均有改善,其中高剂量组与腰痹通组髓核基质轻微凝结、与纤维环界限清晰、纤维环纹理较正常,中剂量组(7.200±1.483)、高剂量组(5.800±0.837)与腰痹通组(6.000±1.581)的 Masuda 评分均明显降低,差异有统计学意义($P < 0.01$),见图 2。



注：(a) 空白组；(b) 造模4周后；(c) 造模8周后；(d) 扶阳宣痹汤高剂量组；(e) 扶阳宣痹汤中剂量组；(f) 扶阳宣痹汤低剂量组；(g) 腰痹通组 (白色箭头所指位置为大鼠尾椎间盘)

图 1 大鼠尾椎间盘的核磁共振检查



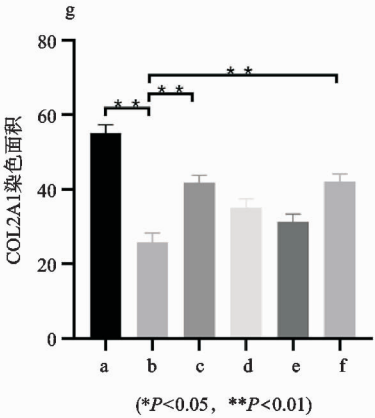
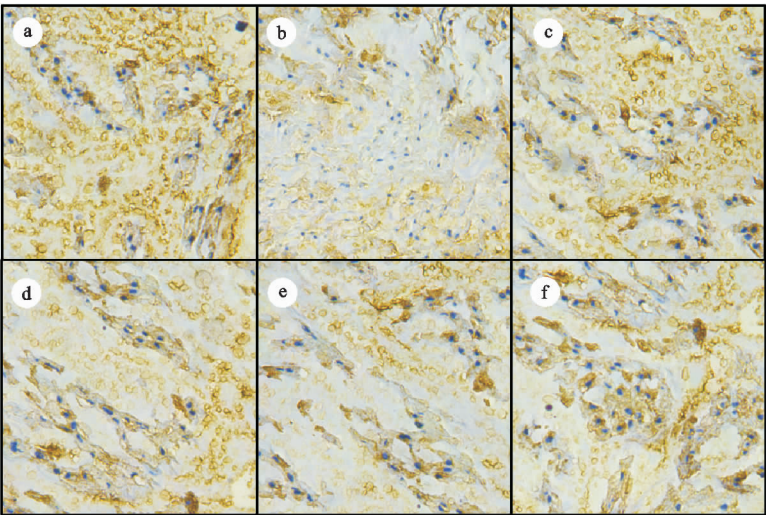
注：(a) 空白组；(b) 模型组；(c) 扶阳宣痹汤高剂量组；(d) 扶阳宣痹汤中剂量组；(e) 扶阳宣痹汤低剂量组；(f) 腰痹通组 (图中黑色箭头所指为纤维环，红色箭头所指为髓核基质，黄色箭头所指为NP细胞)

图 2 各组大鼠尾椎间盘的组织病理学表现 (HE, ×100)

2.3 椎间盘 COL2A1 及 Aggrecan 的免疫组化染色

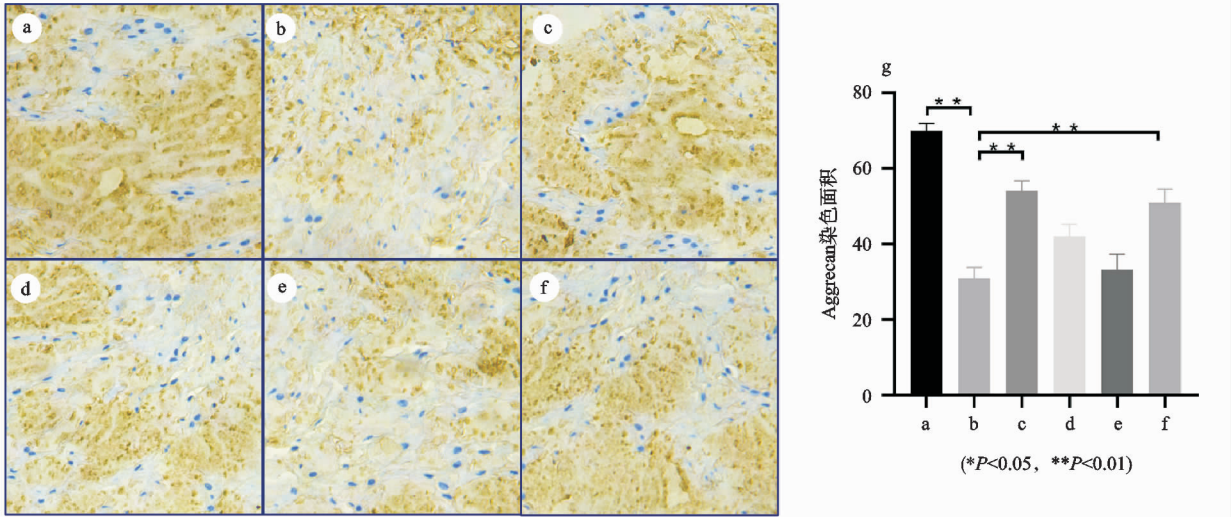
应用 Image J 分析各组 COL2A1 及 Aggrecan 平均灰度值,结果显示:与空白组相比,模型组大鼠椎间盘 COL2A1 及 Aggrecan 表达显著降低,差异有统计

学意义 ($P<0.01$);与模型组相比,扶阳宣痹汤高剂量组及腰痹通组椎间盘 COL2A1 和 Aggrecan 表达上调,差异有统计学意义 ($P<0.01$),高剂量组与腰痹通组差异无统计学意义,见图 3-图 4。



注：(a) 空白组；(b) 模型组；(c) 扶阳宣痹汤高剂量组；(d) 扶阳宣痹汤中剂量组；(e) 扶阳宣痹汤低剂量组；(f) 腰痹通组；(g) 各组染色面积比较

图 3 椎间盘二型胶原的免疫组化染色 (×400)



注: (a) 空白组; (b) 模型组; (c) 扶阳宣痹汤高剂量组; (d) 扶阳宣痹汤中剂量组; (e) 扶阳宣痹汤低剂量组; (f) 腰痹通组; (g) 各组染色面积比较

图 4 椎间盘蛋白多糖的免疫组化染色(×400)

2.4 椎间盘髓核 COL2A1、Aggrecan、MMP9 及 MMP13 的 mRNA 表达

与空白组相比,模型组髓核基质 COL2A1 及 Aggrecan mRNA 表达明显降低,差异有统计学意义 ($P<0.01$),MMP9 及 MMP13 mRNA 表达明显上调,差异有统计学意义 ($P<0.01$);与模型组相比,扶

阳宣痹汤高剂量组与腰痹通组的髓核基质 COL2A1 及 Aggrecan mRNA 表达明显升高,差异有统计学意义 ($P<0.01, P<0.01$),中、高剂量组和腰痹通组的 MMP9 及 MMP13 mRNA 表达明显下调,差异有统计学意义 ($P<0.01, P<0.05$),其中高剂量组与腰痹通组之间差异无统计学意义,见表 2。

表 2 COL2A1、Aggrecan、MMP9 及 MMP13 的 mRNA 表达($\bar{x}\pm s$)

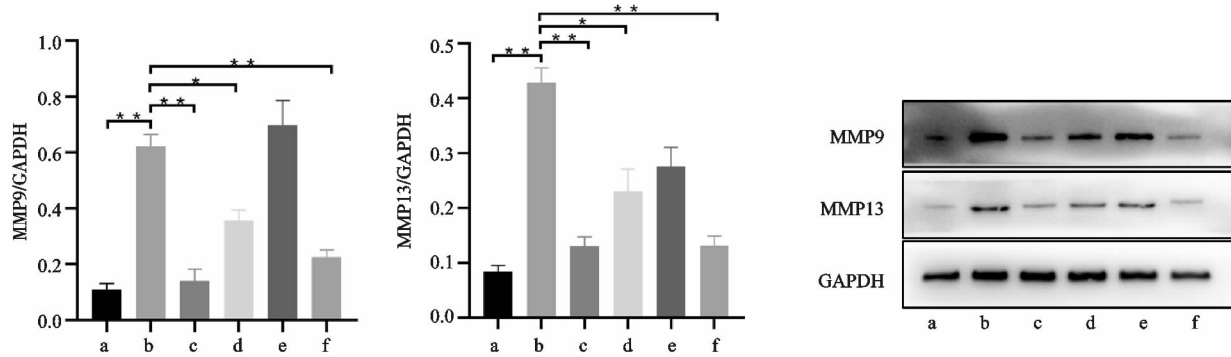
组别	COL2A1	Aggrecan	MMP9	MMP13
空白组	1.000	1.000	1.000	1.000
模型组	0.297±0.050 ¹⁾	0.300±0.050 ¹⁾	1.740±0.105 ¹⁾	1.667±.090 ¹⁾
扶阳宣痹汤高剂量组	0.663±0.051 ²⁾	0.686±0.049 ²⁾	1.177±0.090 ²⁾	1.160±0.098 ²⁾
扶阳宣痹汤中剂量组	0.452±0.087	0.417±0.045	1.450±0.070 ²⁾	1.440±0.072 ³⁾
扶阳宣痹汤低剂量组	0.350±0.040	0.308±0.067	1.730±0.053	1.657±0.091
腰痹通组	0.738±0.105 ²⁾	0.659±0.055 ²⁾	1.183±0.038 ²⁾	1.173±0.060 ²⁾

注:1)与空白组相比, $P<0.01$;与模型组相比,2) $P<0.01$,3) $P<0.05$ 。

2.5 椎间盘髓核组织 MMP9 及 MMP13 的蛋白表达

Western Blot 结果显示:与空白组相比,模型组髓核组织 MMP9 及 MMP13 蛋白表达显著上调 ($P<$

0.01);与模型组相比,扶阳宣痹汤中、高剂量组及腰痹通组 MMP9 和 MMP13 表达显著降低 ($P<0.05, P<0.01$),扶阳宣痹汤中、高剂量组与腰痹通组之间无统计学差异,见图 5。



注: (a) 空白组; (b) 模型组; (c) 扶阳宣痹汤高剂量组; (d) 扶阳宣痹汤中剂量组; (e) 扶阳宣痹汤低剂量组; (f) 腰痹通组($*P<0.05, **P<0.01$)

图 5 椎间盘髓核基质金属蛋白酶 9、13 的蛋白表达

3 讨论

椎间盘是由髓核(Nucleus Pulposus,NP)、纤维环

(Annulus Fibrosus,AF)和软骨终板组成。髓核组织是一种高水分凝胶状组织,除 NP 细胞外,还有富含

COL2A1 和 Aggrecan 的细胞外基质 (Extracellular Matrix, ECM)。研究表明随着退行性变的增加,促炎因子大量产生,髓核组织水合作用降低,NP 细胞由于营养不足开始衰老凋亡或表型改变^[17],细胞凋亡会减少 ECM 产生,而促炎因子和 MMPs 又会进一步降解现有的 ECM,特别是 COL2A1 和 Aggrecan^[18],基质成分的改变又使椎间盘的力学特性不断丧失,最终形成 IDD 环^[19]。尽管确切的退变机制尚存争议,但 COL2A1 和 Aggrecan 等髓核基质大分子在维持椎间盘结构与功能完整性方面发挥着核心作用^[20]。笔者已知 MMPs 能降解 ECM 中的各种蛋白成分,是组织重塑和胶原降解的主要成分^[21]。研究表明暴露于 NP 细胞的 ECM 蛋白水解片段可以导致 MMP9、MMP13 和 Fas 基因上调,COL2A1 和 Aggrecan 基因下调,进而加重 IDD^[22-23]。另一项研究也发现 IL-1 β 诱导的 IDD 在低氧条件下可以通过上调 MMP9、MMP13、ADAMTS4 及 ADAMTS5 的表达,下调 COL2A1 及 Aggrecan 的表达来协同促进 NP 细胞的分解代谢^[24],这说明 MMP9 和 MMP13 与髓核基质中的 COL2A1 及 Aggrecan 在 IDD 的退变过程中可能存在密切联系。

本实验通过 MRI 观察椎间盘髓核组织及信号变化,发现模型组信号强度明显降低,扶阳宣痹汤低、中、高剂量组与模型组相比,信号强度及改良 Piffimann 椎间盘评分均有改善,其中高剂量组改善明显。通过 HE 染色观察髓核组织,结果显示模型组椎间盘纤维环排列紊乱,与 NP 界限模糊,NP 细胞减少,而扶阳宣痹汤低、中、高剂量组的椎间盘组织病理学变化及 Masuda 评分均有改善,其中、高剂量组改善明显。以上结果说明 NP 细胞的凋亡可能是加速 IDD 的重要环节,而扶阳宣痹汤在椎间盘退变过程中具有一定的改善作用,并且存在剂量依赖性。另外,与空白组相比,模型组髓核基质 COL2A1 及 Aggrecan 的 mRNA 表达明显降低,MMP9 及 MMP13 的 mRNA 及蛋白表达均明显上调;与模型组相比,扶阳宣痹汤高剂量组及腰痹通组髓核基质 COL2A1 及 Aggrecan 的 mRNA 表达明显升高,MMP9 及 MMP13 的 mRNA 表达及蛋白表达均明显下调。以上结果表明扶阳宣痹汤可能通过抑制 MMP9 和 MMP13 表达,上调 COL2A1 及 Aggrecan 表达来稳定基质合成代谢和分解代谢的平衡,从而缓解或改善退变的椎间盘组织。

中医并无“椎间盘退变”这一病名,它所导致的腰椎间盘突出、盘源性腰痛常被归为“痹症”“腰痛”等疾病。马勇教授认为“阳气者,抗力之枢也”,阳气不足而寒从中生,风寒湿邪留滞而气血凝滞,久而成痹,故临床常以温肾阳、除痹痛为治疗原则治疗此类疾病,并在

长期的临床实践中形成了扶阳宣痹汤^[25],临床疗效显著^[26-27]。方中附子、桂枝、干姜温扶一身之阳气,黄芪补气实表以行精血津液,鸡血藤活血舒筋除痹,川芎、桃仁、当归以行血分,再添之茯苓、生薏苡仁、木香顾护胃气,以后天滋先天,共奏扶阳散寒、温经通络、通痹止痛之功。现代药理学研究表明附子、黄芪、川芎等具有改善炎性微环境、改善微循环、镇痛、免疫调节等作用^[28-30]。

综上所述,本实验研究初步发现扶阳宣痹汤可能通过抑制 MMP9 及 MMP13 的生成,上调 COL2A1 和 Aggrecan 的表达,从而维持椎间盘基质合成分解代谢平衡,改善大鼠尾椎间盘退行性病变。但是本实验中动物模型制备不够精准,药物化合物成分复杂,且仅从 IDD 角度探讨扶阳宣痹汤的治疗作用尚有不足,还有待进一步深入研究。

参考文献

- [1] SUN D, LIU P, CHENG J, et al. Correlation between intervertebral disc degeneration, paraspinal muscle atrophy, and lumbar facet joints degeneration in patients with lumbar disc herniation[J]. BMC Musculoskelet Disord, 2017, 18(1):167-175.
- [2] POURAHMADI M R, TAGHIPOUR M, EBRAHIMI T I, et al. Motor control exercise for symptomatic lumbar disc herniation: protocol for a systematic review and meta-analysis[J]. BMJ Open, 2016, 6(9):e12426.
- [3] VO N, NIEDERNHOFER L J, NASTO L A, et al. An overview of underlying causes and animal models for the study of age-related degenerative disorders of the spine and synovial joints[J]. J Orthop Res, 2013, 31(6):831-837.
- [4] VASSILAKI M, HURWITZ E L. Insights in public health: perspectives on pain in the low back and neck: global burden, epidemiology, and management [J]. Hawaii J Med Public Health, 2014, 73(4):122-126.
- [5] ADAMS M A, ROUGHLEY P J. What is intervertebral disc degeneration, and what causes it? [J]. Spine (Phila Pa 1976), 2006, 31(18):2151-2161.
- [6] VERGROESEN P P, KINGMA I, EMANUEL K S, et al. Mechanics and biology in intervertebral disc degeneration: a vicious circle[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2015, 23(7):1057-1070.
- [7] WANG F, CAI F, SHI R, et al. Aging and age related stresses: a senescence mechanism of intervertebral disc degeneration[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2016, 24(3):398-408.
- [8] CANNATA F, VADALA G, AMBROSIO L, et al. Intervertebral disc degeneration: A focus on obesity and type 2 diabetes[J]. Diabetes Metab Res Rev, 2020, 36(1):e3224.
- [9] WANG S, LIU C, SUN Z, et al. IL-1 β increases asporin

- expression via the NF- κ B p65 pathway in nucleus pulposus cells during intervertebral disc degeneration[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1):4112.
- [10] WANG C, YU X, YAN Y, et al. Tumor necrosis factor- α : a key contributor to intervertebral disc degeneration[J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2017, 49(1):1-13.
- [11] PAUL C, SMIT T H, DE GRAAF M, et al. Quantitative MRI in early intervertebral disc degeneration: T_1 rho correlates better than T_2 and ADC with biomechanics, histology and matrix content [J]. *PLoS One*, 2018, 13 (1): e191442.
- [12] LIU S, YANG S D, HUO X W, et al. 17 β -Estradiol inhibits intervertebral disc degeneration by down-regulating MMP-3 and MMP-13 and up-regulating type II collagen in a rat model[J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2018, 46(sup2):182-191.
- [13] BIAN Q, MA L, JAIN A, et al. Mechanosignaling activation of TGF β maintains intervertebral disc homeostasis[J]. *Bone Res*, 2017, 5:17008-17019.
- [14] 汤家铭, 陈民利. 医学实验动物学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2012: 209-211.
- [15] PFIRRMANN C W, METZDORF A, ZANETTI M, et al. Magnetic resonance classification of lumbar intervertebral disc degeneration[J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2001, 26 (17):1873-1878.
- [16] KIM K S, YOON S T, LI J, et al. Disc degeneration in the rabbit: a biochemical and radiological comparison between four disc injury models[J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2005, 30(1):33-37.
- [17] DOWDELL J, ERWI M, CHOMA T, et al. Intervertebral disk degeneration and repair[J]. *Neurosurgery*, 2017, 80(3S):S46-S54.
- [18] WANG W J, YU X H, WANG C, et al. MMPs and ADAMTSs in intervertebral disc degeneration[J]. *Clin Chim Acta*, 2015, 448:238-246.
- [19] VERGROESEN P P, KINGMA I, EMANUEL K S, et al. Mechanics and biology in intervertebral disc degeneration: a vicious circle[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2015, 23 (7):1057-1070.
- [20] DENG Y, TAN X T, WU Q, et al. Correlations between COL2A and aggrecan genetic polymorphisms and the risk and clinicopathological features of intervertebral disc degeneration in a Chinese Han population: a case-control study[J]. *Genet Test Mol Biomarkers*, 2017, 21(2):108-115.
- [21] PANWAR P, BUTLER G S, JAMROZ A, et al. Aging-associated modifications of collagen affect its degradation by matrix metalloproteinases[J]. *Matrix Biol*, 2018, 65: 30-44.
- [22] XIA M, ZHU Y. Fibronectin fragment activation of ERK increasing integrin α (5) and β (1) subunit expression to degenerate nucleus pulposus cells[J]. *J Orthop Res*, 2011, 29(4):556-561.
- [23] ANDERSON D G, LI X, BALIAN G. A fibronectin fragment alters the metabolism by rabbit intervertebral disc cells in vitro[J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2005, 30(11): 1242-1246.
- [24] SUN Z Y, LIU Y T, LIANG H, et al. Interleukin-1 β exacerbates the catabolic effects of human nucleus pulposus cells through activation of the nuclear factor κ B signaling pathway under hypoxic conditions[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(21):7129-7139.
- [25] 马勇. 一种治疗中老年寒湿型腰椎间盘突出症的中药复方及其应用[P]. 中国专利: 107715100A, 2018-02-23.
- [26] 司誉豪, 马勇, 郭杨, 等. 扶阳宣痹汤治疗中老年寒湿型腰椎间盘突出症临床疗效观察[J]. *中华中医药杂志*, 2018, 33(12):5726-5730.
- [27] 孙杰, 马勇, 郭杨, 等. 扶阳宣痹汤治疗腰椎间盘突出术后残留症状的临床观察[J]. *时珍国医国药*, 2019, 30(3): 638-640.
- [28] LIU Z K, NG C F, SHIU H T, et al. A traditional Chinese formula composed of Chuanxiong Rhizoma and Gastrodiae Rhizoma (Da Chuanxiong Formula) suppresses inflammatory response in LPS-induced RAW 264. 7 cells through inhibition of NF- κ B pathway[J]. *J Ethnopharmacol*, 2017, 196:20-28.
- [29] ZHANG H, GUO M, ZHANG L, et al. Anti-inflammatory effect and mechanisms of Huangqi glycoprotein in treating experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. *Folia Neuropathol*, 2017, 55(4):308-316.
- [30] WU J, LI C, YUAN W. Effects of Shenfu injection on macrocirculation and microcirculation during cardiopulmonary resuscitation[J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 180: 97-103.

(收稿日期: 2020-08-11)