

# 腰痹颗粒治疗新西兰兔腰椎管狭窄症 运动功能障碍机制初探

贺志亮<sup>1</sup> 王德成<sup>1</sup> 李金学<sup>2△</sup> 顾骥<sup>2</sup> 赵敏<sup>2</sup> 靳骄<sup>2</sup> 彭卓龙<sup>2</sup>

**[摘要]** 目的:通过对新西兰兔腰椎管狭窄动物模型 BBB 评分,血清软骨寡聚基质蛋白(COMP)、白介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )、肿瘤坏死因子(TNF- $\alpha$ )和关节突及椎板病理形态学观察,探讨腰痹汤治疗腰椎管狭窄症的作用机制。方法:取 3 月龄清洁级新西兰兔 48 只,体质量(2.80 $\pm$ 0.75)kg,按体质量分层随机分组的方法将新西兰大兔分为空白组(A 组)、模型组(B 组)、实验药物组(C 组)及阳性药物对照组(D 组),每组 12 只,采用椎板间开窗、自体骨回填和加压缝合的方式制作腰椎管狭窄症动物模型。于术后 2,4,8 及 12 周采用 BBB 运动功能评分法进行行为学观察,各组各时间点分别处死 1,1,4 及 6 只新西兰兔,并取 L<sub>4</sub> 和 L<sub>5</sub> 左侧关节突关节,L<sub>5</sub> 椎板行病理学观察。术后 8 周确认手术成功,A 组和 B 组给予蒸馏水灌胃,C 组和 D 组分别给予腰痹颗粒、丹鹿通督片混悬液灌胃,于术后 8 周和 12 周分别取兔耳缘血,观察用药前后血清 COMP,IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  浓度变化。结果:BBB 评分显示,各时间点 A 组差异均无统计学意义( $P>0.05$ ),B,C 及 D 3 组于术后 2,4 及 8 周呈逐渐下降趋势,3 组各时间点组间差异无统计学意义( $P>0.05$ ),但与 A 组相比,3 组各时间点组间差异有统计学意义( $P<0.05$ );术后 12 周,除 B 组外,C 组和 D 组较术后 8 周均有提高,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),但组间差异无统计学意义( $P>0.05$ );关节突关节和椎板病理切片显示,术后 2,4 及 8 周,B,C 及 D 3 组显示关节突软骨不平整,伴有缺损和溃疡面,大量软骨细胞坏死,胶原纤维增生明显,椎板骨小梁破坏,椎板与硬膜囊粘连,伴有大量炎症细胞浸润;术后 12 周,C 组和 D 组可见较多新生的骨小梁形成且成骨活跃,炎症细胞浸润减少;血清学示,术后 8 周,B,C 及 D 3 组血清 COMP,IL-1 $\beta$  及 TNF- $\alpha$  浓度均高于 A 组,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),但组间差异无统计学意义( $P>0.05$ );术后 12 周与术后 8 周相比,除 B 组差异无统计学意义( $P>0.05$ ),C 组和 D 组血清 COMP,IL-1 $\beta$  及 TNF- $\alpha$  浓度均有降低,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),组间比较 C 组 COMP 浓度低于 D 组,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),而 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  浓度则差异无统计学意义( $P>0.05$ )。结论:通过降低血清中 COMP 的浓度,从而改善关节突软骨功能,抑制 IL-1 $\beta$  及 TNF- $\alpha$  炎性表达可能是腰痹汤治疗腰椎管狭窄症的机制之一。

**[关键词]** 腰痹颗粒;腰椎管狭窄症;运动功能障碍;作用机制;动物实验

**[中图分类号]** R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2018)04-0005-07

## Mechanism of Yaobitong Granule for Treating the Motor Dysfunction of Lumbar Spinal Canal Stenosis in New Zealand Rabbits

HE Zhiliang<sup>1</sup> WANG Decheng<sup>1</sup> LI Jinxue<sup>2△</sup> GU Qi<sup>2</sup>  
ZHAO Min<sup>2</sup> JIN Jiao<sup>2</sup> PENG Zhuolong<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Beijing Tongzhou District Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Beijing 101149, China;

<sup>2</sup> Wangjing Hospital of Chinese Academy of Chinese Medicine, Beijing 100102, China.

**Abstract Objective:** Based on the observing the BBB score, serum bone oligomeric matrix protein(COMP), interleukin 1 beta(IL-1 $\beta$ ), tumor necrosis factor alpha(TNF- $\alpha$ ), and the pathomorphology of the articular process and vertebral lamina in animal model of lumbar spinal canal stenosis in New Zealand rabbits, to detect the mechanism of Yaobitong decoction for which disease. **Methods:** Forty-eight 3 months old clean New Zealand rabbits were weighted(2.80 $\pm$ 0.75)kg. They were divided into 4 groups according to weight stratification random grouping method: control group(A group), model group(B group), experimental group(C group), positive control group(group D), 12 rats in each group. The animal model of lumbar spinal stenosis was established by the methods of interlaminar opening, autogenous bone backfilling and pressure suture. The behavioral assessment was performed by BBB motor function score method at time point of 2nd, 4th, 8th and

12th weeks after surgery. And at this time point, 1, 1, 4 and 6 rabbits were sacrificed. The L<sub>4-5</sub> facet joints and L<sub>5</sub> laminae were taken for pathological observation. The model was conformed 8 weeks after operation. The animal in A, B groups

<sup>1</sup> 北京市通州区中西医结合医院(北京, 101149)

<sup>2</sup> 中国中医科学院望京医院

were gavage with distilled water, and C, D group were given Yaobitong granule and Danlutongdu tablet suspension respectively. The blood of rabbit ears was collected at 8th and 12th weeks after surgery, and the changes of serum COMP, IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  were observed before and after treatment. **Results:** There was no statistically significant difference in group A at different time point in BBB score ( $P > 0.05$ ), but there showed reduced trend in B, C, and D group at time point of 2nd, 4th, and 8th weeks after surgery, and there was significant difference compared with group A ( $P < 0.05$ ). The BBB score in C and D group were increased at 12th weeks after surgery ( $P < 0.05$ ), and there was no significant difference between the two groups ( $P > 0.05$ ). The pathological section of facet joints and laminae showed the joint cartilage was defected, with a large number of ulcer surface, cartilage necrosis, collagen fiber hyperplasia, vertebral trabecular bone destruction, lamina and epidural adhesion, accompanied by inflammatory cell infiltration in B, C, and D group at time point of 2nd, 4th, and 8th weeks after surgery. The pathological section in C and D group showed more new bone formation, less infiltration of inflammatory cells at 12th weeks after surgery. The concentration of COMP, IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in B, C and D group were significantly higher than group A ( $P < 0.05$ ), but there was no statistical difference between each the three groups ( $P > 0.05$ ). The concentration of COMP, IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in C and D group were decreased at 12th weeks after surgery ( $P < 0.05$ ), and the concentration of COMP in group C was lower than group D ( $P < 0.05$ ), the concentration of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in C and D group were no significant difference ( $P > 0.05$ ). **Conclusion:** By decreasing the concentration of COMP in serum and improving the function of articular cartilage, inhibiting the inflammatory expression of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  may be one of the mechanisms of Yaobitong decoction for treating the lumbar spinal stenosis.

**Keywords:** yaobitong decoction; lumbar spinal stenosis; dyskinesia; mechanism; animal experiment

随着国人平均寿命的延长和老龄化社会的到来, 脊柱退行性疾病的发病率呈增高趋势, 腰椎管狭窄症 (Lumbar Spinal Stenosis, LSS) 已成为困扰我国中老年人健康的常见病、多发病。据统计原发性椎管狭窄约占 3%, 继发性椎管狭窄约占 97%, 其中退行性腰椎管狭窄高达 70%<sup>[1]</sup>。至于其发病机理, 国内外文献较为认同的观点是 LSS 的形成与滑膜、软骨退变而引起的骨质增生、韧带肥厚有关, 如关节突关节增生, 黄韧带肥厚及椎板肥厚等<sup>[2]</sup>。间歇性跛行所致的下肢运动功能障碍为 LSS 的主要临床表现, 腰痹颗粒系中国中医科学院望京医院长期用于治疗 LSS 的方剂<sup>[3]</sup>, 前期一项多中心中央随机对照的研究显示腰痹颗粒能有效改善间歇性跛行症状, 总有效率为 86.8%, 优良率为 54.5%<sup>[4]</sup>。但腰痹颗粒的作用机制不详, 影响了其疗效的进一步提高。目前尚无血清软骨寡聚基质蛋白 (COMP) 在 LSS 实验中表达的研究报道。基于此, 本课题组自 2014 年 7 月至 2015 年 6 月, 采用椎板间开窗、自体骨回填和加压缝合的术方法, 将 48 只成年新西兰兔, 随机分为空白组, 模型组, 实验组和对照组各 12 只, 造模成功后, 分别予以蒸馏水 (空白组和模型组), 腰痹颗粒及丹鹿通督片混悬液灌胃给药 (实验组和对照组), 分析用药前后血清中 COMP, TNF- $\alpha$  及 IL- $\beta$  浓度变化, 新西兰兔运动功能变化 (BBB 评分), 结合苏木精-伊红染色观察用药前后关节突软骨, 椎板病理形态变化, 旨在探讨腰痹汤治疗 LSS 的作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物及主要实验试剂、仪器

选用 3 月龄成年健康、新西兰兔 48 只 (雌雄不限), 清洁级, 体质量 ( $2.80 \pm 0.75$ ) kg, 由北京金牧阳

实验动物技术有限公司提供。适应性喂养 7 d 后, 按体质量分层随机分组的方法将新西兰大白兔分为 4 组: 空白组 (A 组), 模型组 (B 组), 实验药物组 (C 组, 采用腰痹颗粒), 对照组 (D 组, 采用丹鹿通督片混悬液), 每组 12 只, 分笼饲养。

软骨寡聚基质蛋白 (COMP) ELISA 试剂盒; 白介素 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) ELISA 试剂盒; 肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) ELISA 试剂盒 (以上均购买于北京睿基恒生物科技发展有限公司); 兔二抗体、DAB 显色剂 (以上均购买于北京市北京中杉金桥生物技术有限公司)。

显微镜, 日本奥林巴斯 (BX51T-PHD-J11); 切片机, 德国徕卡 (RM2016); 离心机, 美国 Thermo (Fresco17); 电子天平, 瑞士 METTER (AE100); 移液器, 德国 EPPENDORF (3120 000. 216); 干燥箱, 日本三洋公司生产 (MIR-153); 低温冰箱, 日本三洋 (MDF-382E); 低温冷冻离心机, 美国 Thermo (Fresco); 酶标仪, 美国 Therm (MULTISKAN MK3); 恒温水浴箱, 江苏太仓 (DSHZ-300)。

### 1.2 实验药品与制备

腰痹颗粒: 独活 15 g, 狗脊 10 g, 牛膝 10 g, 木瓜 10 g, 熟地 10 g, 龟板 8 g, 鳖甲 8 g, 川芎 10 g, 当归 15 g, 白芍 15 g (选用中国中医科学院望京医院颗粒剂药房配伍的颗粒, 等比例浓缩)。给药前用蒸馏水溶解配置成每毫升药液含生药量 0.78 g 的溶液。以成人用药总量 111 g/d 为参照; 丹鹿通督片 (河南羚锐制药股份有限公司, 国药准字 Z20050085, 36 片/盒, 0.6 g/片) 将药片在研钵中研磨成粉末状, 蒸馏水配置成每毫升药液含生药药量 0.054 g 的混悬液。以成人用量 7.2 g/d 为参照, 新西兰大白兔每千克体质量用药量均按照标准动物剂量折算表<sup>[5]</sup> 计算后确定, 相当于临

床等效用量。

1.3 造模方法

新西兰兔术前一夜禁食,经 0.3%戊巴比妥钠(1 mL/kg)耳缘静脉注射麻醉,以两侧髂嵴最高点连线定位 L<sub>6</sub>,向上依次找到 L<sub>5</sub> 和 L<sub>4</sub> 棘突,以 L<sub>4</sub> 棘突为中心作纵形切口,显露 L<sub>4</sub> 和 L<sub>5</sub> 的棘突与左侧椎板。咬骨钳咬除 L5 左侧上关节突起突备用(不能损伤 L<sub>4~5</sub> 关节突关节),手术区域局部用注射器喷洒肾上腺数 0.3 mg,椎板咬骨钳咬除 L<sub>5</sub> 椎板成约 1.0 cm×0.5 cm 骨缺损,将咬除的椎板剪碎紧密填入椎板缺损处,咬除的 L<sub>5</sub> 关节突突起修整成略小于椎板缺损的薄骨块,覆盖回填的碎骨粒,并齐根部剪断 L<sub>4</sub> 和 L<sub>5</sub> 棘突,修剪成略小于椎板缺损的椭圆形骨块,压在薄骨块外侧,加压缝合深层肌肉,局部喷洒青霉素 1×10<sup>5</sup> U 后,缝合切口。术后待大白兔完全清醒后放入原笼饲养,并大腿肌注射青霉素钠盐 2×10<sup>5</sup> U/kg,1 次/d,连续 5 d。

1.4 动物饲养及给药

清洁级条件下给予标准饲料喂养,自由采食和饮水;术后 8 周术成功后,开始给试验大白兔灌胃给药,1 次/d,连续 4 周。A 组和 B 组给予蒸馏水 10 mL/kg;C 组用腰痹颗粒溶液(10 mL/kg,0.78 g/mL),D 组用丹鹿通督片悬浊液(10 mL/kg,0.54 g/mL)。公式<sup>[5]</sup>:每只新西兰兔用药容积(mL)=[大白兔体质量(kg)/kg]×10 mL。

1.5 取材及标本处理

1)血清:于术后 2,4,8 及 12 周将各组新西兰兔按处死,安 1,1,4 及 6 只的顺序分别行耳正中动脉取血,取血量不得少于 1.5 mL,置于采血管,配重平衡后放入离心机,以 2 000 r/min 的速度离心 30 min,取上清液装入血清子弹头中,-20℃保存。

2)关节突关节,椎板:截取 L<sub>4~5</sub> 左侧关节突关节,L<sub>5</sub> 左侧椎板,置于 4%多聚甲醛溶液中固定。

1.6 观察项目和方法

1.6.1 行为学观察(BBB 评分表评定)各组动物在术后 2,4 及 8 周对其行为学进行观察,确定术效果。术后 12 周(即用药后第 4 周)进行用药后行为学观察。

行为学(间歇性跛行)的观察:以 BBS<sup>[6]</sup> 评分为指标对新西兰兔下肢运动功能。所有观察评分均采用双盲法进行评定(由两名研究人员分别在不同地点进行,相同时段,前后不超过 2 min),最后取两次观察结果平均数作为最终评定结果。

1.6.2 新西兰兔血清 COMP,TNF-α 及 IL-β 浓度应用 ELISA 法检测各组新西兰兔血清中 COMP,IL-1β 及 TNF-α 浓度。血清分别经样品处理-样品稀释与加样-温育-配液-洗涤-显色-终止-测定 8 个步骤,各步骤严格按照试剂盒操作规程。

1.6.3 新西兰兔关节突病理学观察 将固定后的关节突,椎板脱钙后进行石蜡包埋切片,每个切片 4 μm 厚度,常规用二甲苯脱蜡,经各级乙醇至水洗,将切片苏木精-伊红染色 5 min,自来水冲洗,盐酸乙醇分化 30 s,自来水浸泡 5 min,返蓝,置伊红液 2 min 后,常规脱水,透明,封片。光镜下进行病理组织形态学观察,观察结果照相保存。

1.7 统计学方法

应用 SPASS19.0 进行统计分析。计量资料均采用  $\bar{x}\pm s$  进行描述,采用双侧检验, $P<0.05$  差异有统计学意义。组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),两两比较用 LSD 检验法(方差齐性)或 Dunnett's 法(方差不齐),治疗前后各组比较,数据采用配对样本 *t* 检验(数据符合正态分布)或 Wilcoxon 秩和检验(数据不符合正态分布),相关性分析采用 Pearson 检验。

2 结果

2.1 新西兰兔运动功能评分

四组术后 2,4 及 8 周,除 A 组外,B,C 及 D 3 组 BBB 评分呈逐渐下降趋势,各观测点 3 组与 A 组相比组间差异有统计学意义( $P<0.05$ ),各观测点 B,C 及 D 3 组组间比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ ),见表 1。术后第 12 周(即用药后第 4 周),B 组较术后第 8 周,差异无统计学意义(见表 2);而 C 组和 D 组较术后第 8 周 BBB 评分均有提高,差异有统计学意义( $P<0.05$ );C 和 D 两组组间比较时差异无统计学意义( $P>0.05$ ),见表 3。

表 1 术后 2,4 及 8 周各组 BBB 评分组间比较( $\bar{x}\pm s$ )

组别	2 周		4 周		8 周	
	兔数	BBB 评分	兔数	BBB 评分	兔数	BBB 评分
A 组	12	17.58±0.42	11	17.46±0.35	10	17.65±0.34
B 组	12	15.83±1.26 <sup>1)</sup>	11	14.60±0.35 <sup>1)</sup>	10	12.70±0.715 <sup>1)</sup>
C 组	12	15.58±2.15 <sup>1)2)</sup>	11	14.15±1.22 <sup>1)2)</sup>	10	12.10±1.22 <sup>1)2)</sup>
D 组	12	15.46±2.03 <sup>1)2)3)</sup>	11	14.18±1.42 <sup>1)2)3)</sup>	10	11.70±1.69 <sup>1)2)3)</sup>
<i>F</i>		20.204		19.622		62.002
<i>P</i>		<0.01		<0.01		<0.01

注:1)与 A 组比, $P<0.01$ ;2)与 B 组比, $P>0.05$ ;3)与 C 组比, $P>0.05$ 。

表 2 术后 12 周 BBB 评分组间比较( $\bar{x}\pm s$ )

组别	兔数	BBB 评分
A 组	6	17.13±0.76
B 组	6	11.83±1.72 <sup>1)</sup>
C 组	6	14.083±1.110 <sup>1)2)</sup>
D 组	6	15.167±0.752 <sup>1)2)3)</sup>
<i>F</i>		10.316
<i>P</i>		<0.01

注:1)与 A 组比, $P<0.01$ ;2)与 B 组比, $P>0.05$ ;3)与 C 组比, $P>0.05$ .

表 3 术后 12 周和 8 周 BBB 评分组间比较( $\bar{x}\pm s$ )

组别	兔数	第 8 周 BBB 评分	兔数	第 12 周 BBB 评分	<i>t</i>	<i>P</i>
B 组	10	12.700±0.715	6	11.83±1.72	1.431	0.061
C 组	10	11.700±1.687	6	14.083±1.114	2.144	0.008
D 组	10	12.100±1.220	6	15.167±0.752	2.220	<0.01

2.2 新西兰兔组织病理学

苏木精-伊红染色见 A 组椎板及关节软骨基质基本完好,未见新生血管化、肉芽组织和炎症细胞(图 1A 组)。椎板组织,术后第 2、4 及 8 周,B、C 及 D 3 组椎板可见上皮细胞明显增生,小血管充血,胶原纤维增生明显,并突入椎管与硬膜囊粘连,并随着术时间的延长,硬膜囊粘连加重,术后破骨细胞聚集在椎板边缘并清除死骨,术后 4 周和 8 周有新生骨小梁形成,表现为软骨内成骨和膜内成骨,炎症细胞浸润明显(图 1B~D)椎板;关节突软骨组织,B、C

及 D 3 组术后 2 周即显示软骨层状结构被破坏,细胞排列紊乱,大量软骨细胞坏死现象,表面明显不平整,出现缺损和溃疡面,有血痂形成;术后 4 周少量软骨形成,外周有少量纤维组织增生,并有炎症细胞浸润现象;术后第 8 周软骨周边部可见薄层致密结缔组织,细胞核溶、核缩,出现新生血管化、肉芽组织形成和炎性细胞浸润。术后第 12 周,相对于 B 组,C 和 D 两组可见较多新生的骨小梁形成且成骨活跃,部分有钙盐沉积,炎症细胞浸润明显减少,C 组炎性细胞浸润最少(图 1B~D 关节突软骨)。

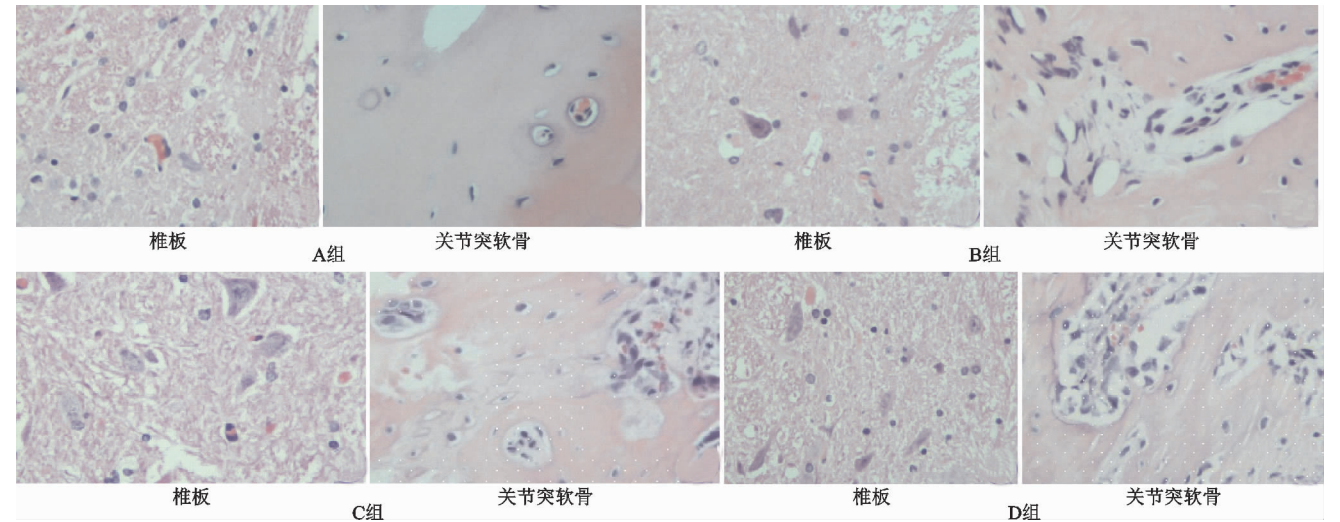


图 1 A、B、C 及 D 各组术后 12 周椎板和关节突软骨苏木精-伊红染色( $\times 100$ )

2.3 新西兰兔 COMP、IL-1 $\beta$  及 TNF- $\alpha$  浓度比较

术后 8 周,B、C 及 D 3 组 COMP、IL-1 $\beta$  及 TNF- $\alpha$  浓度均高于 A 组,比较差异具有统计学意义( $P<0.05$ ),组间比较差异无统计学意义( $P>0.05$ ),见表 4;术后 12 周与 8 周 3 组组内比较,B 组 COMP、IL-1 $\beta$  及 TNF- $\alpha$  浓度较术后 8 周均无明显降低,差异无统计学意义( $P>0.05$ ),C 和 D 两组较术后第 8 周则明显降低,差异有统

计学意义( $P<0.05$ ),见表 5;术后 12 周 3 组组间比较,C 和 D 两组血清 COMP、IL-1 $\beta$  及 TNF- $\alpha$  浓度均低于 B 组,差异有统计学意义( $P<0.01$ ),C 和 D 两组组间比较,C 组 COMP 浓度低于 D 组,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),但 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  浓度则差异无统计学意义( $P>0.05$ ),见表 6;相关性分析说明 BBB 评分与 COMP、IL-1 $\beta$  及 TNF- $\alpha$  呈负相关性,见表 7。

表 4 术后 8 周各组 COMP,IL-1β 及 TNF-α 浓度组间比较(̄x±s,ng/L)

组别	兔数	COMP	IL-1β	TNF-α
A 组	10	23.540±5.645	8.720±1.793	21.47±5.10
B 组	10	36.930±5.240 <sup>1)</sup>	15.790±3.920 <sup>1)</sup>	24.22±15.68 <sup>1)</sup>
C 组	10	35.880±5.030 <sup>1)2)</sup>	15.250±2.110 <sup>1)2)</sup>	37.49±13.01 <sup>1)2)</sup>
D 组	10	34.830±3.980 <sup>1)2)3)</sup>	13.780±2.180 <sup>1)2)3)</sup>	33.18±5.24 <sup>1)2)3)</sup>
F		6.180	5.965	10.241
P		0.009	0.010	0.001

注:1)与 A 组比,P<0.01;2)与 B 组比,P>0.05;3)与 C 比,P>0.05.

表 5 术后 12 周与术后 8 周 3 组 COMP,IL-1β 及 TNF-α 组内比较(̄x±s,ng/L)

组别	COMP				IL-1β				TNF-α			
	8 周	12 周	t	P	8 周	12 周	t	P	8 周	12 周	t	P
B 组	36.93±5.24	34.50±6.17	0.65	0.54	15.79±3.92	11.45±3.58	1.81	0.108	24.22±15.68	35.24±6.88	0.72	0.49
C 组	35.88±5.03	16.83±3.97	6.71	0.00	15.25±2.11	5.71±1.86	7.55	0.00	37.49±13.01	21.30±5.60	2.75	0.03
D 组	34.83±3.98	25.02±4.65	3.56	0.01	13.78±2.18	6.53±1.74	5.86	0.00	33.18±5.24	23.17±1.16	3.96	0.04

表 6 术后 12 周 3 组 COMP,IL-1β 及 TNF-α 组间比较(̄x±s,ng/L)

组别	兔数	COMP	IL-1β	TNF-α
B 组	6	34.50±6.17	11.45±3.58	35.24±6.88
C 组	6	16.83±3.97 <sup>1)</sup>	5.71±1.86 <sup>1)</sup>	21.30±5.60 <sup>1)</sup>
D 组	6	25.02±4.65 <sup>2)</sup>	6.53±1.74 <sup>1)3)</sup>	23.17±1.160 <sup>1)3)</sup>
F		18.648	8.983	11.883
p		<0.001	0.003	0.001

注:1)与 B 组比,P<0.01;2)与 C 组比,P<0.05;3)与 C 比,P>0.05.

表 7 术后 12 周 C 组和 D 组 COMP,IL-1β 及 TNF-α 与 BBB 评分相关性分析

组别	COMP		IL-1β		TNF-α	
	r	P	r	P	r	P
C 组	-0.253	0.040	-0.044	<0.001	-0.433	0.022
D 组	-0.021	0.007	-0.301	<0.001	-0.360	0.016

3 讨论

3.1 基于三关节动态平衡理论建立 LSS 动物模型

目前 LSS 动物模型主要分为急性腰椎管狭窄模型及慢性腰椎管狭窄模型,慢性腰椎管狭窄模型的制备方法主要有骨粒回填法<sup>[7]</sup>和环扎法<sup>[8]</sup>。本实验在总结骨粒回填法经验的基础上,通过椎板间开窗、自体骨回填和加压缝合的方式制造了腰椎管狭窄症模型。与龚炎培等<sup>[9]</sup>骨粒回填法不同,本实验动物为新西兰兔,相较于大鼠,新西兰兔椎板宽大,操作相对容易,在椎板咬除过程中,因意外导致动物瘫痪或者死亡的概率相对更低,这也是前期实验中果断放弃大鼠作为实验对象的原因之一,本实验共造模 52 只,成功 48 只,成功率达 92.30%。

尽量保留椎板的完整性,是较理想的 LSS 动物模型应具备的条件之一<sup>[10]</sup>,本实验对椎板的处理未进行全椎板切除,只进行开窗植骨回填,一定程度上降低了因创伤过大,瘢痕粘连等非预期效应对术结果的影响<sup>[11]</sup>。通过切除 L<sub>5</sub> 椎体及相邻 L<sub>4</sub> 椎体的棘突,部分咬除椎板及关节突突起,间接营造椎板及关节突关节受力变化,从而模拟出人体腰椎退变后,关节突软骨退变粗糙,骨赘增生,关节囊松弛失稳,椎板肥厚等病理改变<sup>[12]</sup>。这与本实验中兔关节突,椎板病理学变化类

似,本实验中伴随造模时间的延长,模型组、实验组、对照组三组关节突软骨逐渐出现退变、溃疡、纤维组织增生、椎板骨小梁形成及成骨细胞活跃等改变。椎板的这些再生方式,与周磊等<sup>[13]</sup>运用骨粒回填法造成椎板增生等病理学改变类似,他们发现术后 4 周椎板的软骨内成骨和骨膜内成骨就已经表现明显。

3.2 腰痹颗粒的组方依据

腰椎管狭窄症属于“痹症”范畴。杨仁轩等<sup>[14]</sup>对 1 335 例 DLSS 住院患者进行回顾性研究,发现气滞血瘀型患者占 44.3%,认为本病病机以肝肾亏虚为本,气滞血瘀为标。DLSS 起病缓慢,多发于 50 岁以后,这个阶段,人体处于逐渐衰老的过程中,肾气日渐不足,筋骨失其所养,《素问·上古天真论》云“七八,肝气衰,筋不能动,天癸竭,精少,肾藏衰,形体皆极;八八,则齿发去”,再加上反复的劳役、外伤、慢性劳损以及风寒湿邪的侵袭而发病,由于本病病程迁延,病情反复,久病成瘀,久虚成瘀,往往逐渐形成瘀结顽症,因此治疗上仅活血通络,益肾强筋之药恐有病重药轻之势,还需软坚散结方能对症。方中鳖甲具有软坚散结的作用,现代药理研究证实本品能抑制结缔组织增生,消除结块的作用<sup>[15]</sup>。白芍具有酸甘收敛的作用,其含有芍

药具有抗炎、调节免疫、扩张血管等作用。现代研究表明木瓜中含有皂苷、酒石酸等,对动物实验性关节炎具有明显消肿、缓和四肢痉挛作用。三药合用,配伍活血化瘀药川芎、当归、牛膝、独活,补益肝肾药熟地黄、狗脊,共奏活血通络、养阴柔筋和软坚散结之功。软坚散结有助于疏通血脉,畅通经络,而助活血化瘀之功,活血化瘀可消癥瘕,除瘀滞而助软坚散结之用,两者相辅相成,共同作用能达到消淤积,除痹痛的目的。

### 3.3 COMP反映了关节突关节的退变程度,预示腰椎管退变狭窄

COMP是细胞外基质蛋白的一种,主要由软骨细胞和滑膜细胞分泌<sup>[16]</sup>,是透明软骨的重要组成部分,但其生物功能尚不明确<sup>[17]</sup>。Gagarina等<sup>[18]</sup>发现COMP突变可以阻碍软骨细胞正常的分泌过程,可以上调凋亡蛋白抑制因子,保护软骨细胞,阻止细胞凋亡发生。血清和关节液中COMP水平可以反映关节软骨的降解破坏程度和滑膜炎的炎症程度<sup>[19]</sup>,与软骨组织学上的破坏高度相关<sup>[20]</sup>。虽然目前并没有针对腰椎管狭窄症COMP的研究报道,但既往对OA的研究发现,COMP可以作为OA的一个预后指标,通过对血清中COMP的检测来反映炎症性OA的治疗效果应该是有价值的<sup>[21]</sup>。OA与LSS作为两种不同的关节类疾病,但发病机制上却存在部分相似的病理表现。有研究表明,LSS常常伴有不同程度的关节突关节炎性改变<sup>[22]</sup>。OA的发病机制源于关节软骨的退变、骨性增生,同样,关节突软骨退变后可继发腰椎骨性增生,以此来代偿腰椎动态失衡,表现为关节突关节增生肥大,椎板及黄韧带增生肥厚,而关节突增生肥大可继发椎间孔狭窄,引起侧隐窝狭窄,而椎板及黄韧带增生肥厚可造成中央管狭窄。本实验中,术后8周苏木精-伊红染色显示L<sub>4-5</sub>关节突软骨出现缺损、溃疡、软骨细胞数量减少,L<sub>5</sub>椎板破骨细胞活跃,周缘胶原纤维增生,炎性细胞浸润明显。同期,B、C及D3组血COMP的浓度远高A组,BBB评分低于A组。而用药干预后,术后12周关节突软骨表现为成骨细胞活跃,椎板伴有新生骨小梁,炎性细胞浸润减少等病理学改变。C和D组COMP浓度较治疗前均有明显下降,BBB评分较前均有明显上升,说明在同等造模条件下,新西兰兔下肢运动功能的变化和COMP,关节突关节,椎板的病理学变化密切相关。血清中COMP浓度的高表达客观上反映了关节突关节软骨退变的程度,也预示着腰椎管退变狭窄的渐进过程,单纯作为评价椎管狭窄的客观依据还是具有可行性的。

### 3.4 COMP,IL-1 $\beta$ 及TNF- $\alpha$ 与下肢行走功能障碍的关系

炎性因子在LSS患者腰腿痛的发生发展的过程

中起着重要作用<sup>[23]</sup>,IL-1 $\beta$ 和TNF- $\alpha$ 是其中重要的两种炎性细胞因子<sup>[24]</sup>,因椎管狭窄后马尾神经受压、局部血流量降低<sup>[25]</sup>而产生。在腰椎管狭窄症患者的椎间盘、黄韧带及腰椎小关节中均存在高表达,其含量与患者腰腿痛及神经功能障碍存在相关性<sup>[26]</sup>。吴德升等<sup>[27]</sup>通过对LSS和腰椎爆裂骨折患者椎管内静脉血和外周静脉血致炎因子IL-1 $\alpha$ 和TNF- $\alpha$ 的对比研究发现,LSS组椎管静脉血IL-1 $\alpha$ 水平高于腰椎爆裂骨折组和LSS外周静脉血,且LSS组椎管静脉血IL-1 $\alpha$ 水平与腰腿痛及功能障碍评分呈负相关性。本实验的结果也印证了这一点,本实验中,术后12周实验组和对照组血清COMP,IL-1 $\beta$ 及TNF- $\alpha$ 浓度较术后8周明显下降,BBB评分则明显升高,且相关性分析表明BBB评分与血清COMP,IL-1 $\beta$ 及TNF- $\alpha$ 浓度呈负相关性,说明三种细胞因子浓度的降低有利于改善新西兰兔运动功能障碍。那么IL-1 $\beta$ ,TNF- $\alpha$ 和COMP是如何具体介导腰腿痛、引起运动功能障碍呢?可能与以下机制有关:IL-1 $\beta$ 与TNF- $\alpha$ 能协同参与关节软骨的破坏,而软骨的破坏会释放COMP<sup>[28]</sup>,IL-1 $\beta$ 能介导PG-E<sub>2</sub>及5-HT的合成,激活PLA<sub>2</sub>的活性,而TNF- $\alpha$ 作为始动因子启动级联反应,可以促进IL-1 $\beta$ 和IL-6等其他细胞因子的分泌,使神经发生炎症改变而变得敏感,并直接作用于神经细胞膜而使神经变得敏感,从而造成明显腰腿痛症状,引起功能障碍<sup>[29]</sup>。

综上所述,本实验初步探讨了腰痹汤对LSS治疗的作用机制,分析作用机制可能为降低血清COMP含量从而改善软骨关节基质,通过抑制致炎因子IL-1 $\beta$ 和TNF- $\alpha$ 的释放从而改善下肢运动功能障碍。下一步研究将通过动物腰椎CT或核磁等影像学检查的方式,协同印证造模的可行性和适用性,从分子生物学角度进一步探求COMP对关节突软骨的作用机制,以期中医药治疗LSS提供借鉴。

### 参考文献

- [1] Szpalski MG, Gunzburg R. Lumbar spinal stenosis in the elderly, an overview[J]. Eur Spine J, 2003, 12: S17, 1-5.
- [2] 何元诚. 退变性腰椎管狭窄症的中医药治疗进展[J]. 广西中医学院学报, 2007, 10(4): 92-94.
- [3] 李金学, 曹勇, 赵敏. 中西药物优化组合治疗退行性腰椎管狭窄症的疗效观察[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2007, 15(12): 21-24.
- [4] 李金学, 朱立国, 罗杰. 腰痹颗粒治疗退行性腰椎管狭窄症的疗效观察[J]. 世界中医药, 2013, 8(11): 1305-1308.
- [5] 黄继汉, 黄晓晖, 陈志扬, 等. 药理实验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9(9): 1069-1072.
- [6] Wootla B, Denic A, Watzlawik JO, et al. A single dose of a neuron binding human monoclonal antibody improves



- brainstem NAA concentrations, a biomarker for density of spinal cord axons, in a model of progressive multiple sclerosis[J]. *Neuroinflammation*, 2015, 12: 83.
- [7] 周磊, 李明, 刘培来, 等. 椎板切除碎骨粒回植法制作腰椎管狭窄动物模型[J]. *中国临床解剖学杂志*, 2007, 25(6): 660-664.
- [8] Iwamoto H, Matsuda H, Noriage A, et al. Lumbar spinal canal stenosis examined electrophysiologically in a rat model of chronic cauda equina COMP resion[J]. *Spine*, 1997, 22(22): 2636-2640.
- [9] 龚炎培, 高井宏明. 腰椎管狭窄动物模型的实验研究[J]. *南通医学院学报*, 2003, 23(4): 412-413.
- [10] 高松, 刘海鹰, 钱亚龙. 腰椎管狭窄症动物模型研究进展[J]. *中国脊柱脊髓杂志*, 2010, 20(1): 66-68.
- [11] 梁益建, 孙普全, 汪克建, 等. 大鼠脊髓慢性压迫性损伤实验模型的建立[J]. *中国临床解剖学杂志*, 2006, 24(3): 320-340.
- [12] 贾连顺, 杨立利. 退变性腰椎管狭窄症的现代外科学概念[J]. *中华骨科杂志*, 2002, 22(8): 509-512.
- [13] 周磊, 李明, 刘培来, 等. 椎板切除碎骨粒回植法制作腰椎管狭窄动物模型[J]. *中国临床解剖学杂志*, 2007, 25(6): 660-664.
- [14] 杨仁轩, 陈志强, 郭庆斌, 等. 1 335 例腰椎管狭窄症住院患者中西医结合诊疗疗效观察[J]. *新中医*, 2012, 44(5): 44-46.
- [15] 温欣, 周洪雷. 鳖甲化学成分和药理药效研究进展[J]. *西北药学杂志*, 2008, 23(2): 122-123.
- [16] Lee JH, Choi CB, Chung DJ, et al. Development of an improved canine model of percutaneous spinal cord compression injury by balloon catheter[J]. *J Neurosci Methods*, 2008, 167(2): 310-316.
- [17] 白伦浩, 王瑜, 张田鹏. 骨性关节炎生物学标记物软骨寡聚基质蛋白的研究进展[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2010, 24(6): 714-717.
- [18] Gagarina V, Carlberg AL, Pereira-Mouries L, et al. Cartilage oligomeric matrix protein protects cells against death by elevating members of the IAP family of survival proteins[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(1): 648-659.
- [19] Wisowska M, Jabońska B. Serum cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in rheumatoid arthritis and knee osteoarthritis[J]. *Clin Rheumatol*, 2005, 24(3): 278-284.
- [20] Larsson E, Erlandsson Harris H, Larsson A, et al. Corticosteroid treatment of experimental arthritis retards cartilage destruction as determined by histology and serum COMP[J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2004, 43(4): 428-434.
- [21] 朱台航, 蔡春元, 张雷. 骨关节炎生物标记物 COMP 的研究进展[J]. *中国骨伤*, 2010, 23(12): 959-961.
- [22] Honore P, Luger NM, Sabino MA, et al. Osteoprotegerin blocks bone cancer-induced skeletal destruction, skeletal pain and pain-related neurochemical reorganization of the spinal cord[J]. *Nat Med*, 2000, 6(5): 521-528.
- [23] Omair A, Holden M, Lie BA, et al. Treatment outcome of chronic low back pain and radiographic lumbar disc degeneration are associated with inflammatory and matrix degrading gene variants: a prospective genetic association study[J]. *BMC Musculoskelet Disord*, 2013, 14: 105-109.
- [24] 陈海, 龚凯, 罗卓荆, 等. 退变性腰椎管狭窄中小关节源性炎性因子作用的初步探讨[J]. *中国矫形外科杂志*, 2010, 18(7): 148-151.
- [25] 任炳旭, 马正良, 靳艳卿, 等. 身痛逐瘀汤对骨癌痛小鼠痛行为及脊髓星形胶质细胞活化的影响[J]. *中国中西医结合杂志*, 2011, 10(1): 381-385.
- [26] Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Abramson SB. Osteoarthritis, an inflammatory disease: potential implication for this selection of new therapeutic targets[J]. *Arthritis Rheum*, 2001, 44: 1237-1247.
- [27] 吴德升, 张琰, 孟阳. 腰椎管内静脉血清中炎性因子与腰椎管狭窄的关系[J]. *中国组织工程研究*, 2014, 18(26): 4229-4235.
- [28] Wisowska M, Jabońska B. Serum cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in rheumatoid arthritis and knee osteoarthritis[J]. *Clin Rheumatol*, 2005, 24(3): 278-284.
- [29] Jimbo K, Park JS, Yokosuka K, et al. Positive feedback loop of interleukin-1 beta upregulating production of inflammatory mediators in human intervertebral disc cells in vitro[J]. *J Neurosurg Spine*, 2005, 2(5): 589-595.

(收稿日期: 2017-09-11)