

益肾养髓方对脊髓型颈椎病大鼠脊髓中细胞凋亡的影响

张典^{1,2} 朱立国^{2,3,4} 尹逊路² 杨博文² 秦晓宽²
金哲峰² 许博² 张博宇² 陈忻^{2△} 银河^{2△}

[摘要] 目的:观察益肾养髓方对脊髓型颈椎病大鼠脊髓中细胞凋亡及 Fas/FasL-Caspase-8/-3 通路的影响。方法:将大鼠随机分配至假手术组、模型组及益肾养髓方高、中、低浓度组,采用吸水膨胀材料压迫脊髓的方法建立脊髓型颈椎病动物模型,术后 2 周分别给予生理盐水或相应中药水煎剂灌胃。采用 Basso Beattie Bresmahan (BBB)评分法测量大鼠运动功能,TUNEL 染色评估细胞凋亡,RT-qPCR 和 Western Blot 检测 Fas、FasL、Caspase-8 及 Caspase-3 表达情况。结果:造模术后 2 周,益肾养髓方各组及模型组 BBB 评分显著低于假手术组($P<0.05$)。术后 6 周,益肾养髓方中浓度组 BBB 评分均显著优于模型组($P<0.05$)。TUNEL 染色显示,益肾养髓方各组细胞凋亡率均显著低于模型组($P<0.05$)。术后 6 周,RT-qPCR 检测显示,益肾养髓方高、中、低浓度组 Caspase-3 mRNA 表达水平均低于模型组($P<0.05$),中、低浓度组 Caspase-8 mRNA 表达水平均低于模型组($P<0.05$),高、中浓度组 Fas mRNA 表达水平均低于模型组($P<0.05$),低浓度组 FasL mRNA 表达水平低于模型组($P<0.05$)。Western Blot 检测显示,益肾养髓方高、中、低浓度组 Caspase-3 蛋白相对表达量低于模型组($P<0.05$),益肾养髓方中浓度组 Caspase-8 蛋白相对表达量低于模型组($P<0.05$),中、低浓度组 Fas 及 FasL 蛋白相对表达量低于模型组($P<0.05$)。结论:益肾养髓方可通过抑制 Fas/FasL-Caspase-8/-3 信号通路减少受损脊髓区域的细胞凋亡,进而改善脊髓型颈椎病。

[关键词] 益肾养髓方;脊髓型颈椎病;退行性颈脊髓病;神经炎症;细胞凋亡

[中图分类号] R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2024)01-0001-06

DOI:10.20085/j.cnki.issn1005-0205.240101

Effect of Yishen Yangsui Formula on Apoptosis in the Spinal Cord of Rats with Cervical Spondylotic Myelopathy

ZHANG Dian^{1,2} ZHU Ligu^{2,3,4} YIN Xunlu² YANG Bowen² QIN Xiaokuan²
JIN Zhefeng² XU Bo² ZHANG Boyu² CHEN Xin^{2△} YIN He^{2△}

¹ Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China;

² Department of Spine, Wangjing Hospital of China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100102, China;

³ Beijing Institute of Orthopedics of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Beijing 100700, China;

⁴ Beijing Key Laboratory of Bone Setting Technology of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100700, China.

Abstract Objective: To investigate the effects of Yishen Yangsui formula on apoptosis and Fas/FasL-Caspase-8/-3 pathway in spinal cord of rats with cervical spondylotic myelopathy (CSM). **Methods:** Rats were randomly assigned to sham operation group, model group, high, middle and low dosage groups of Yishen Yangsui formula. The CSM rat model was established by the chronic compression of spinal

基金项目:国家自然科学基金项目(82205151)

中国中医科学院望京医院基础研究苗圃培育计划
课题(WJYY-YJKT-2022-02)

中国中医科学院望京医院自主选题专项课题
(WJYY-ZZXT-2022-08)

中国中医科学院基本科研业务费优秀青年科技人
才培养专项(ZZ16-YQ-025)

¹ 北京中医药大学(北京,100029)

² 中国中医科学院望京医院脊柱二科

³ 北京市中西医结合骨伤研究所

⁴ 中医正骨技术北京市重点实验室

△通信作者 E-mail:15101161150@139.com(陈忻)

milkwaymoom@163.com(银河)

cord with water swelling material. 2 weeks after the operation, normal saline or corresponding chinese herbal decoction were given for gavage. Basso Beattie Bresnahan (BBB) score was used to evaluate the spinal cord function of rats. TUNEL staining was used to evaluate apoptosis. RT-qPCR and Western Blot were used to detect the expression of Fas, FasL, Caspase-8 and Caspase-3. **Results:** 2 weeks after modeling, the BBB score of each group given Yishen Yangsui formula and model group were significantly lower than those of sham operation group ($P < 0.05$). 6 weeks after surgery, the BBB score of middle-dosage group of Yishen Yangsui formula was higher than that of model group, with statistical differences ($P < 0.05$). TUNEL staining showed that the apoptosis rate of groups of Yishen Yangsui formula was lower than that of model group, with statistical differences ($P < 0.05$). 6 weeks after modeling, RT-qPCR showed that the expression levels of Caspase-3 mRNA in the high, middle and low dosage groups of the Yishen Yangsui formula were lower than those in the model group ($P < 0.05$), the expression levels of Caspase-8 mRNA in the middle- and low-dosage groups were lower than those in the model group ($P < 0.05$), the expression levels of Fas mRNA in the high and middle dosage groups were lower than those in the model group ($P < 0.05$), and the expression levels of FasL mRNA in the low dosage group were lower than those in the model group ($P < 0.05$). The Western Blot showed that the relative expression of Caspase-3 in the high, middle and low dosage groups of the Yishen Yangsui formula was lower than that of the model groups ($P < 0.05$), the relative expression of Caspase 8 in the middle dosage group of Yishen Yangsui formula was lower than that of the model group ($P < 0.05$), and the relative expression of Fas and FasL in the middle and low dosage groups was lower than that of the model group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Yishen Yangsui formula can reduce apoptosis of damaged spinal cord by inhibiting Fas/FasL-Caspase-8/-3 signaling pathway, and thus improve CSM.

Keywords: Yishen Yangsui formula; cervical spondylotic myelopathy; degenerative cervical myelopathy; neuroinflammation; apoptosis

脊髓型颈椎病 (Cervical Spondylotic Myelopathy, CSM) 是成人非创伤性脊髓损伤的最常见原因^[1-2], 其治疗包括手术治疗和非手术治疗, 对于轻中度脊髓型颈椎病, 手术治疗长期结局并不优于保守治疗^[3], 因此发展脊髓型颈椎病非手术治疗方式具有重要意义。前期临床研究表明, 在名方“地黄饮子”基础上化裁而成的“益肾养髓方”可缓解轻中度脊髓型颈椎病患者术后临床症状, 总有效率高达 85.7%^[4], 在这一背景下, 多项研究对益肾养髓方的作用机制展开了探索, 发现其可改善微循环、减轻神经炎症及促进神经修复。除炎症及微循环损伤外, 细胞凋亡作为脊髓型颈椎病神经元和少突胶质细胞死亡以及临床神经功能缺损的直接原因, 也在脊髓型颈椎病病理过程中发挥了重要作用, 但益肾养髓方能否通过抑制细胞凋亡发挥神经保护作用尚不清楚。因此, 本研究在前期研究基础上, 采用吸水膨胀材料致颈脊髓慢性受压的方法建立脊髓型颈椎病大鼠模型^[5], 进一步探索益肾养髓方对脊髓慢性损伤后细胞凋亡的影响及其分子机制, 以期为临床应用提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物

选取 SD 大鼠 96 只, 雌雄各半, 体重为 270 ~ 280 g, 所有大鼠均购自中国食品药品检定研究院实验动物供应室, 动物许可证号为 SCXK(京)2014-0013。

1.2 造模及分组

通过吸水膨胀材料聚乙烯醇丙烯酰胺互穿网络水

凝胶对颈脊髓施加慢性压迫, 进行脊髓型颈椎病大鼠造模。手术过程如下: 采用 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉, 在大鼠颈椎后部正中皮肤做一 3 cm 左右切口, 逐层切开, 暴露 C₅ ~ C₇ 椎板, 切除黄韧带和部分椎板, 在 C₅ ~ C₇ 椎板下植入水凝胶 (1.5 mm × 0.7 mm × 0.3 mm)。逐层缝合后肌注射青霉素 8 × 10⁴ U 预防感染。假手术组植入同体积吸水膨胀材料后立即取出, 不造成脊髓压迫。术后每日早晚人工挤压膀胱辅助排尿, 直至其自主排尿。分组: 设置假手术组 16 只, 为保证灌胃前模型组及中药各组中大鼠脊髓损伤程度的一致性, 术后 2 周根据 Basso Beattie Bresnahan (BBB) 评分将造模大鼠随机分为益肾养髓方高、中、低浓度组及模型组, 每组各 16 只。3 个中药组按照对应浓度以 1 mL/100 g 进行灌胃, 假手术组和模型组均灌服等量 0.9% 氯化钠注射液。

1.3 中药及试剂

益肾养髓方组成如下: 黄芪 15 g、熟地黄 12 g、鹿角霜 12 g、白芍 12 g、鬼箭羽 12 g、丹参 9 g、巴戟天 9 g、羌活 6 g、桂枝 6 g, 由中国中医科学院望京医院药剂科主任药师王景红进行鉴定。中药煎煮及浓缩严格遵照 2020 版《中国药典》规定执行, 随后加入纯净水进行等比例稀释。中药灌胃剂量 (生药质量) 采用体表面积系数换算, 得出高、中、低浓度分别为 16.74 g/(kg · d)、8.37 g/(kg · d) 和 4.19 g/(kg · d)。实验试剂: 0.9% 氯化钠注射液, 10% 水合氯醛, 注射用青霉素钠 (哈药集团制药总厂), 4% 多聚甲醛溶液, 柠檬酸钠抗原修复

液,中性树胶,苏木精-伊红(HE)染液(索莱宝生物),TUNEL 试剂盒(美国罗氏公司),Western Blot 二抗(Jackson ImmunoResearch, 111-035-003), Western Blot 二抗(Jackson ImmunoResearch, 115-035-003),死亡受体(Fas)兔单抗(CST, 3180),死亡配体(FasL)兔多抗(美国Abcam公司, ab15285),Caspase-8 兔多抗(美国NOVUS公司, NB100-56116),Caspase-3 兔单抗(美国 Abcam 公司, ab184787)。

1.4 仪器及设备

电热恒温水浴锅(上海一恒科技有限公司, KH-5000E),电子天平(瑞士梅特勒公司, AE100),离心机(Eppendorf, 5427R), PCR 仪(Thermo, 4375786), QPCR 仪(Roche, Lightcycler 480 II),凝胶成像显影仪(BIO-RAD, Universal Hood III),生物显微镜(德国 Leica 公司, DM1000),组织脱水机(德国 Leica 公司, ASP200S),组织包埋机(德国 Leica 公司, EG1150C),石蜡切片机(德国 Leica 公司, RM2245)。

1.5 方法

1.5.1 饲养及取材 造模并标准化喂养 2 周后进行灌胃,分 2 次取材,首次取材于术后 2 周(灌胃前)进行,每组随机选取 8 只大鼠,第 2 次取材于术后 6 周(灌胃后)进行,选取各组剩下的 8 只大鼠。取材手术过程如下:10%水合氯醛腹腔注射麻醉,剪开大鼠胸腔,暴露心脏,插入针头后用 0.9%氯化钠溶液及 4%多聚甲醛溶液依次进行灌注,出现全身强直和尾巴僵硬时停止灌注。病理检测样本处理:取 C_{5~7} 节段固定、脱水、透明、浸蜡、包埋,用于脊髓组织苏木精-伊红染色及 TUNEL 染色。RT-qPCR 及 Western Blot 检测样本处理:于冰上迅速取出 C_{5~7} 节段,置于液氮中速冻,随后转移至-80℃冰箱中冷藏备用。

1.5.2 运动功能评分 采用 BBB 评分法测量大鼠运动功能:将大鼠置于平台上,观察其后肢活动并进行评分,正常大鼠满分 21 分。

1.5.3 苏木精-伊红染色 脊髓组织切片脱蜡后进行 HE 染色,并于镜下观察脊髓中神经元、胶质细胞及间质的形态学特征。

1.5.4 脊髓组织 TUNEL 染色 取脊髓组织切片,严格遵照 TUNEL 试剂盒说明书执行染色操作,TUNEL 阳性细胞呈现棕褐色或棕黄色,胞核固缩,染色质浓缩,采用 Image J 软件计算细胞凋亡率。

1.5.5 RT-qPCR 检测 采用 Trizol 法提取总 RNA,在此基础上进行 cDNA 合成,并以其为模板,用 RT-qPCR 方法测定 Caspase-3、Caspase-8、Fas 及 FasL mRNA 表达水平。采用 SYBR® Premix ExTaq™(Tli RNaseH Plus)进行 PCR 定量反应。引物由北京索莱宝设计,由擎科生物合成,引物序列信息表 1。选取 β-

actin 作为内参基因,采用 2^{-ΔΔCt} 计算 Caspase-3、Caspase-8、Fas 及 FasL 基因相对于内参基因的表

表 1 目的基因及内参基因的引物序列		
名称	引物序列 (5'-3')	长度 /bp
Rat-beta actin-F	TAAGGCCAACCGTGAAAAGAT	109
Rat-beta actin-R	GGTACGACCAGAGGCATACA	
Rat-CASP3-F	TTAGAACTTGAATCCACGAG	
Rat-CASP3-R	TGGTAGCCTTCAACAAGC	230
Rat-CASP8-F	GACATACCCAAACTCAGCAAC	
Rat-CASP8-R	GGACACGATCTCAAAATGAAGC	
Rat-Fas-F	AATCCAGGGTCTCAGAAAAGC	102
Rat-Fas-R	CCGAGGTAGTTTTCTACTCCAG	
Rat-FasL-F	CCAACCACAGCCTTAGAGTATC	
Rat-FasL-R	TCCATATGTGTCTTCCCATTCC	139
		149

1.5.6 Western Blot 检测 脊髓组织经 RIPA 裂解、离心后,取上清采用 BCA 法测定蛋白浓度。按顺序加入总蛋白上样液进行电泳,随后转印至 PVDF 膜上,在室温条件下封闭 1 h 后,加入相应一抗,4℃孵育过夜,次日 TBST 润洗 1 次,加入二抗 37℃孵育 1 h,再经洗涤后进行成像,并通过 Image J 软件计算相应条带的相对灰度值。

1.6 统计学方法

用 SPSS21.0 统计软件进行数据分析。正态性检验采用 Shapiro-Wilk 检验,符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示,两组间比较采用两独立样本 *t* 检验。多组间比较采用单因素方差分析,若方差齐则使用 LSD 分析法,方差不齐则使用 Dunnett *T* 法,*P*<0.05 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BBB 评分

术后 2 周(灌胃前),模型组和益肾养髓方各浓度组 BBB 评分低于假手术组,差异有统计学意义(*P*<0.05);术后 6 周(灌胃后),模型组大鼠四肢运动功能恢复不明显,益肾养髓方中浓度组四肢运动功能恢复明显,BBB 评分显著高于模型组(*P*<0.05),见表 2。

表 2 各组大鼠 BBB 评分比较($\bar{x} \pm s$,分)		
组别	术后 2 周	术后 6 周
假手术组	21.00±0.00 ¹⁾	21.00±0.00 ¹⁾
模型组	10.78±1.03 ²⁾	11.33±1.11 ²⁾
益肾养髓方高浓度组	10.21±0.54 ²⁾	11.14±1.25 ²⁾
益肾养髓方中浓度组	10.35±1.25 ²⁾	14.57±0.90 ¹⁾²⁾
益肾养髓方低浓度组	10.95±0.67 ²⁾	12.71±1.03 ²⁾

注:各组同时时间点比较,1)与模型组比较,*P*<0.05;2)与假手术组比较,*P*<0.05。

2.2 苏木精-伊红染色

苏木精-伊红染色可见假手术组细胞形态基本无

改变,神经元未见胞体肿胀、胞核固缩、坏死等病理表现(图 1a)。模型组呈现大量瘢痕组织及大空泡样改变,并可见部分神经元损伤,神经元胞体膨大、结构模糊、胞核固缩(图 1b),表明慢性压迫可导致大鼠脊髓

组织损伤。而益肾养髓方各浓度组空洞及瘢痕较模型组明显减少,胞核固缩散在或游离分布,细胞形态逐渐恢复(图 1c),表明益肾养髓方可改善脊髓型颈椎病大鼠的组织病理损伤。

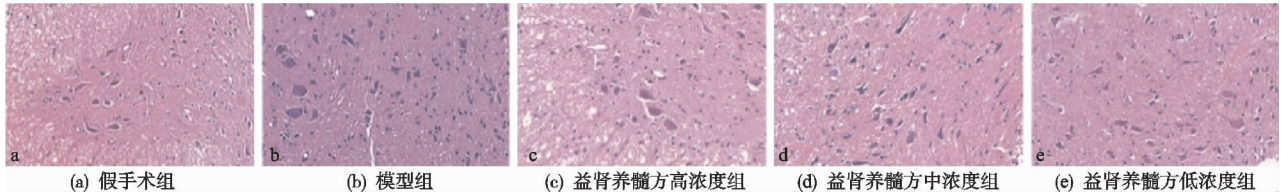


图 1 益肾养髓方对脊髓型颈椎病大鼠脊髓组织病理的影响(HE, ×400)

2.3 TUNEL 染色

TUNEL 结果显示凋亡细胞呈棕褐色或棕黄色,胞核固缩颗粒深染,形态不规则。模型组细胞凋亡较明显(图 2b),而益肾养髓方各浓度组凋亡细胞显著减少(图 2c)。术后 2 周,模型组和益肾养髓方各浓度组细胞凋亡率均显著高于假手术组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。术后第 6 周,假手术组细胞凋亡率较低,模型组凋亡率较高,两组相比差异有统计学意义($P < 0.05$),益肾养髓方各浓度组凋亡率显著低于模型组,

差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 3。

表 3 各组大鼠细胞凋亡率对比($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	术后 2 周	术后 6 周
假手术组	$2.50 \pm 0.08^{1)}$	$2.53 \pm 0.09^{1)}$
模型组	$21.62 \pm 0.13^{2)}$	$19.60 \pm 0.06^{2)}$
益肾养髓方高浓度组	$21.47 \pm 0.04^{2)}$	$15.36 \pm 0.05^{1)2)}$
益肾养髓方中浓度组	$21.34 \pm 0.07^{2)}$	$13.51 \pm 0.04^{1)2)}$
益肾养髓方低浓度组	$21.42 \pm 0.06^{2)}$	$14.55 \pm 0.02^{1)2)}$

注:1)与模型组比较, $P < 0.05$;2)与假手术组比较, $P < 0.05$ 。

2.4 RT-qPCR 结果

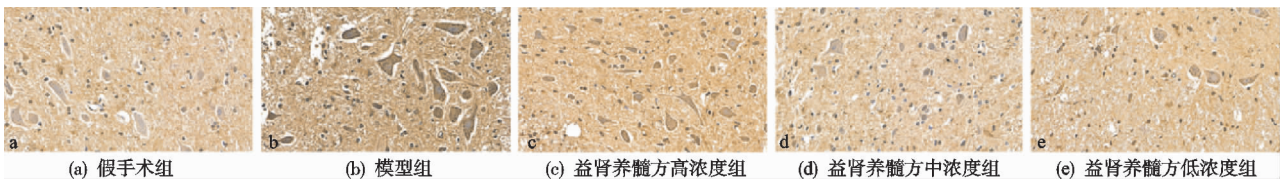
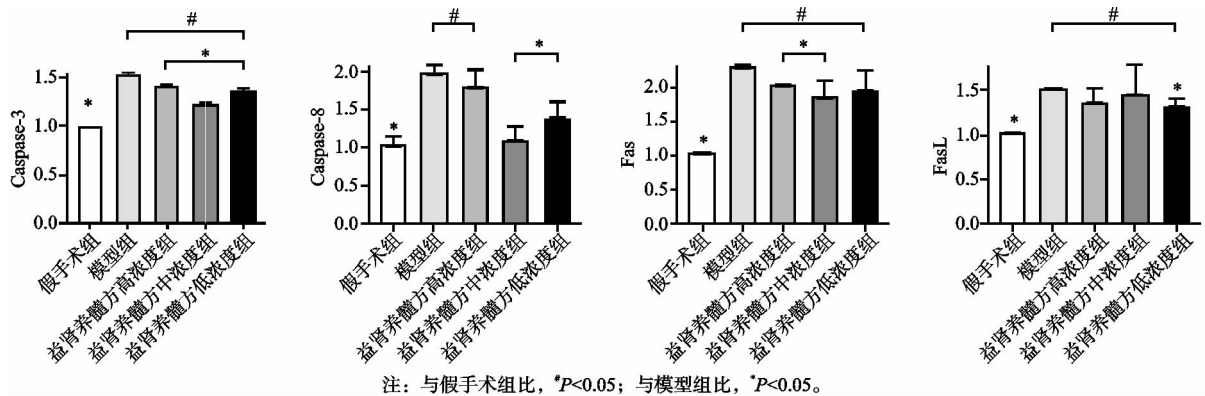


图 2 益肾养髓方对脊髓型颈椎病大鼠脊髓组织病理的影响(TUNEL, ×400)

术后 2 周,模型组和益肾养髓方各浓度组 Caspase-3 及 Fas mRNA 表达水平均显著高于假手术组,差异有统计学意义($P < 0.05$);模型组和益肾养髓方各浓度组 Caspase-8 及 FasL mRNA 表达水平均高于假手术组,但与假手术组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。术后 6 周,益肾养髓方高、中、低浓度组 Caspase-3 mRNA 表达水平均低于模型组,差异有统

计学意义($P < 0.05$);益肾养髓方中、低浓度组 Caspase-8 mRNA 表达水平均低于模型组,差异有统计学意义($P < 0.05$);益肾养髓方高、中浓度组 Fas mRNA 表达水平均低于模型组,差异有统计学意义($P < 0.05$);益肾养髓方低浓度组 FasL mRNA 表达水平低于模型组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 3。



注:与假手术组比,* $P < 0.05$;与模型组比,# $P < 0.05$ 。

图 3 RT-qPCR 法检测大鼠脊髓组织中 Caspase-3、Caspase-8、Fas 及 FasL mRNA 表达

2.5 Western Blot 结果

术后 2 周,模型组 Caspase-3 蛋白相对表达量显著高于假手术组($P < 0.05$),模型组及益肾养髓方各

浓度组 Caspase-8、Fas 及 FasL 蛋白相对表达量高于假手术组,但与假手术组比较差异无统计学意义($P > 0.05$);术后 6 周,益肾养髓方高、中、低浓度组

Caspase-3 蛋白相对表达量低于模型组 ($P<0.05$), 益肾养髓方中浓度组 Caspase-8 蛋白相对表达量低于模

型组 ($P<0.05$), 益肾养髓方中、低浓度组 Fas 及 FasL 蛋白相对表达量低于模型组 ($P<0.05$), 见图 4。

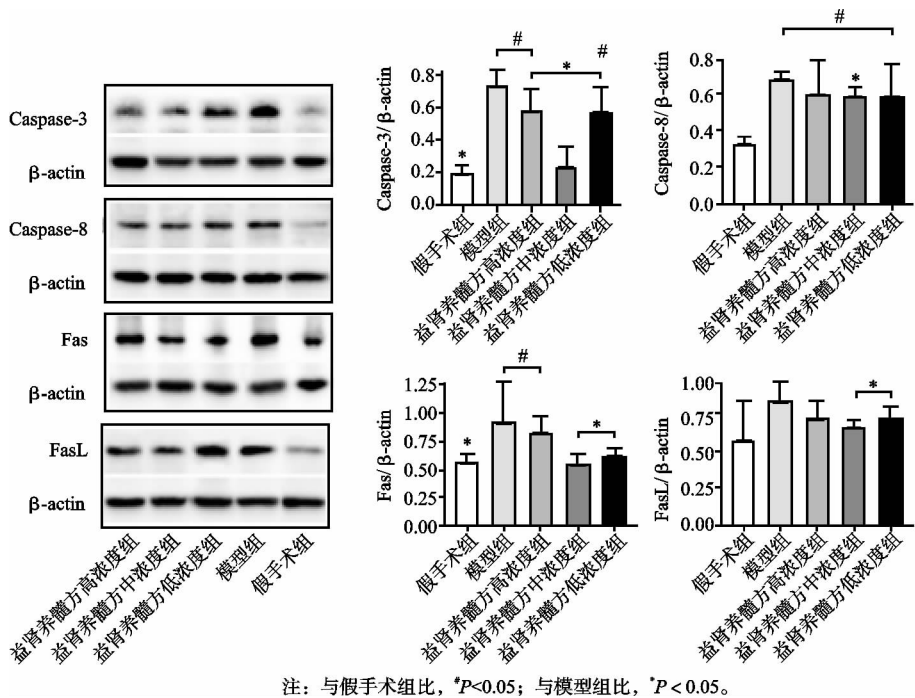


图 4 Western Blot 法检测大鼠脊髓组织中 Caspase-3、Caspase-8、Fas 及 FasL 蛋白表达

3 讨论

脊髓型颈椎病主要影响中老年群体^[6], 随着人口老龄化逐渐加剧, 脊髓型颈椎病患者群体将逐渐增多, 又由于脊髓型颈椎病危害较大, 可导致患者失去行走能力和尿道括约肌控制能力, 无法工作和生活自理, 因此探索脊髓型颈椎病有效干预方式至关重要。脊髓型颈椎病始于动静态因素造成的颈椎管狭窄及脊髓慢性压迫^[7-8], 慢性压迫可引起血脊髓屏障破坏、区域灌注不良及局部穿支血管变形^[9], 造成缺血缺氧和神经炎症, 进而激活细胞凋亡通路^[10-11], 导致神经元和少突胶质细胞进行性死亡, 上述过程是脊髓型颈椎病的标志性病理特征, 而脊髓慢性压迫模型能够模拟这些特征。基于此, 本研究在体内通过吸水膨胀材料压迫脊髓方式建立了脊髓型颈椎病大鼠模型, 发现慢性压迫可导致脊髓组织慢性炎症、细胞凋亡、神经功能损伤及 Fas/FasL-Caspase-8/-3 通路上调, 而益肾养髓方可显著逆转这些病理改变。

益肾养髓方源于经典名方“地黄饮子”, 已被临床研究证明可有效改善轻、中度脊髓型颈椎病患者临床症状^[4]。该方针对脊髓型颈椎病肝肾亏虚为本、血瘀湿阻为标的根本病机, 以巴戟天补肾阳、强筋骨, 熟地黄益精填髓, 两药合用为君, 臣以鹿角霜温肾、白芍养阴。佐使黄芪、桂枝、鬼箭羽、丹参、羌活等药, 发挥益气活血、温经通络及引经报使的作用。其作用机制可能为改善微循环障碍^[12], 促进 M1 型小胶质细胞向 M2 型分化并减轻炎症^[13], 减少胶质瘢痕形成^[14], 促

进神经修复^[15]等。细胞凋亡是脊髓型颈椎病进行性细胞凋亡及临床神经功能缺损的直接原因, 因此抑制细胞凋亡、减缓神经元丢失成为重要的神经保护治疗策略^[11,16]。本研究进一步探索了益肾养髓方改善细胞凋亡的作用, 发现益肾养髓方对比模型组可显著改善脊髓型颈椎病大鼠 BBB 评分, 促进脊髓组织中细胞形态恢复, 降低细胞凋亡率, 提示益肾养髓方可通过抑制细胞凋亡改善脊髓型颈椎病大鼠神经功能损伤。

细胞凋亡涉及内源性凋亡和外源性凋亡两条分子途径, 在脊髓型颈椎病病理过程中起主要作用的是外源性途径^[8], 其由死亡受体信号诱发, 随后受体尾部发生构象变化, 引起 Fas 相关死亡结构域和 Caspase-8 前体的募集, 从而激活半胱天冬酶 (Caspase-3 或 Caspase-7), 后者可切割许多底物并引起细胞凋亡的标志性特征^[17], 例如细胞器降解、DNA 片段化和磷脂酰丝氨酸暴露。Fas/FasL 是脊髓型颈椎病细胞凋亡调控的关键分子, 在脊髓中 Fas 由神经元和少突胶质细胞表达, 既往研究发现慢性脊髓压迫可诱导 Fas/FasL 的高表达^[10,17], 驱动 Caspase 介导的细胞凋亡, 而 Fas 配体的中和或删失可显著减轻细胞凋亡及神经炎症, 促进轴突修复并改善神经功能^[11]。本研究通过 Western Blot 及 RT-qPCR 对比检测了脊髓中相关分子表达情况, 发现在经过不同剂量益肾养髓方治疗后, 慢性压迫所致的 Caspase-3、Caspase-8、Fas 和 FasL 蛋白及 mRNA 表达上调得到显著改善 (见图 3 和图 4), 提示益肾养髓方改善脊髓型颈椎病大鼠细胞凋亡及脊

髓损伤的作用,可能是通过抑制受损脊髓区域 Fas/FasL-Caspase-8/-3 信号通路实现的,另一方面也表明 Fas/FasL 确实是干预脊髓型颈椎病的重要靶点。

综上所述,益肾养髓方可以改善脊髓型颈椎病大鼠脊髓细胞形态及神经功能损伤,其神经保护作用可能是通过抑制 Fas/FasL-Caspase-8/-3 通路、减少细胞凋亡实现的。这一发现表明靶向 Fas 死亡受体通路是可行的神经保护策略,并为益肾养髓方后续的临床应用及进一步药物开发奠定了基础。既往对脊髓型颈椎病干预的研究主要集中在手术技术(如前、后路之争),但这些研究并未带来过多的临床获益。近年来,药物治疗逐渐成为国内外脊髓型颈椎病领域的研究热点,但一直进展缓慢,近期 Fehlings 等率先取得了突破,其团队发现利鲁唑可通过抑制 DNA 氧化性损伤、拮抗谷氨酸释放等机制改善脊髓型颈椎病减压手术所致的神经组织破坏,并促进脊髓型颈椎病功能恢复^[18],但遗憾的是,在评估该药物治疗脊髓型颈椎病疗效的Ⅲ期研究中,并未取得改良日本骨科协会(mJOA)评分改善的阳性结果^[19]。与利鲁唑不同的是,本研究是在益肾养髓方已被证明具有一定临床疗效的基础上^[4],因此进一步探索其作用机制具有重要意义。本课题组后续将进一步明确益肾养髓方多种作用机制的相互关系,为脊髓型颈椎病治疗提供新的可能。

参考文献

- [1] NEW P W, CRIPPS R A, BONNE LEE B. Global maps of non-traumatic spinal cord injury epidemiology: towards a living data repository[J]. *Spinal Cord*, 2014, 52(2): 97-109.
- [2] WU J C, KO C C, YEN Y S, et al. Epidemiology of cervical spondylotic myelopathy and its risk of causing spinal cord injury: a national cohort study[J]. *Neurosurg Focus*, 2013, 35(1): E10.
- [3] KADANKA Z, BEDNAÍK J, NOVOTN O, et al. Cervical spondylotic myelopathy: conservative versus surgical treatment after 10 years[J]. *Eur Spine J*, 2011, 20(9): 1533-1538.
- [4] 朱立国, 唐彬, 银河, 等. 益肾养髓方治疗脊髓型颈椎病 35 例[J]. *中国中医骨伤科杂志*, 2018, 26(6): 56-58.
- [5] 银河, 陈琳, 陈忻, 等. 脊髓型颈椎病动物模型的研究现状[J]. *中华中医药杂志*, 2021, 36(1): 354-357.
- [6] KOVALOVA I, KERKOVSKY M, KADANKA Z, et al. Prevalence and imaging characteristics of nonmyelopathic and myelopathic spondylotic cervical cord compression[J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2016, 41(24): 1908-1916.
- [7] KARADIMAS S K, ERWIN W M, ELY C G, et al. Pathophysiology and natural history of cervical spondylotic myelopathy[J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2013, 38(22 Suppl 1): S21-S36.
- [8] BADHIWALA J H, AHUJA C S, AKBAR M A, et al. Degenerative cervical myelopathy-update and future directions[J]. *Nat Rev Neurol*, 2020, 16(2): 108-124.
- [9] KUROKAWA R, MURATA H, OGINO M, et al. Altered blood flow distribution in the rat spinal cord under chronic compression[J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2011, 36(13): 1006-1009.
- [10] YU W R, BAPTISTE D C, LIU T, et al. Molecular mechanisms of spinal cord dysfunction and cell death in the spinal hyperostotic mouse: implications for the pathophysiology of human cervical spondylotic myelopathy[J]. *Neurobiol Dis*, 2009, 33(2): 149-163.
- [11] YU W R, LIU T, KIEHL T R, et al. Human neuropathological and animal model evidence supporting a role for Fas-mediated apoptosis and inflammation in cervical spondylotic myelopathy [J]. *Brain*, 2011, 134 (Pt 5): 1277-1292.
- [12] 唐彬, 朱立国, 陈忻, 等. 益肾养髓方对脊髓型颈椎病大鼠受损脊髓微血管再生的影响[J]. *中国中医药信息杂志*, 2022, 29(5): 51-55.
- [13] 杨博文, 朱立国, 陈忻, 等. 益肾养髓方对脊髓型颈椎病大鼠小胶质细胞极化的影响[J]. *中国中医骨伤科杂志*, 2023, 31(3): 1-5.
- [14] 秦晓宽, 银河, 杨博文, 等. 益肾养髓方对脊髓型颈椎病大鼠脊髓中星形胶质细胞过度增殖的影响[J]. *中药新药与临床药理*, 2022, 33(2): 173-179.
- [15] 唐彬, 银河, 杨博文, 等. 益肾养髓方对脊髓型颈椎病大鼠脊髓中神经营养因子表达的影响及其神经修复作用研究[J]. *中国全科医学*, 2021, 24(3S): 4447-4456.
- [16] DOLAN R T, BUTLER J S, O'BYRNE J M, et al. Mechanical and cellular processes driving cervical myelopathy [J]. *World Journal of Orthopedics*, 2016, 7(1): 20-29.
- [17] LETELLIER E, KUMAR S, SANCHE-MARTINEZ I, et al. CD95-ligand on peripheral myeloid cells activates Syk kinase to trigger their recruitment to the inflammatory site[J]. *Immunity*, 2010, 32(2): 240-252.
- [18] MOON E S, KARADIMAS S K, YU W R, et al. Riluzole attenuates neuropathic pain and enhances functional recovery in a rodent model of cervical spondylotic myelopathy[J]. *Neurobiol Dis*, 2014, 62: 394-406.
- [19] FEHLINGS M G, BADHIWALA J H, AHN H, et al. Safety and efficacy of riluzole in patients undergoing decompressive surgery for degenerative cervical myelopathy (CSM-Protect): a multicentre, double-blind, placebo-controlled, randomised, phase 3 trial [J]. *Lancet Neurol*, 2021, 20(2): 98-106.

(收稿日期: 2023-04-06)