

葛根汤、桂枝汤对家兔颈椎间盘组织白介素 1 β 、诱导型一氧化氮合酶 mRNA 表达的调节作用

施 杞¹ 王拥军¹ 周重建¹ 侯宝兴² 刘 梅¹ 莫 文²

摘要 目的:观察葛根汤、桂枝汤对颈椎间盘组织白介素 1 β (IL-1 β)、诱导型一氧化氮合酶(iNOS)mRNA 表达的调节作用。方法:选择 8 月龄雄性新西兰大白兔 36 只,随机平均分为正常对照组、风寒湿刺激组、低头位组、风寒湿加低头位组、葛根汤组和桂枝汤组。通过建立风寒湿痹证型、低头位、风寒湿加低头位颈椎间盘退变家兔模型,采用 RT-PCR 技术检测颈椎间盘细胞因子 IL-1 β 、iNOS mRNA 的表达情况。结果:各个模型组与对照组比较,IL-1 β 、iNOS mRNA 的表达上调($P<0.01$),葛根汤、桂枝汤组与风寒湿刺激组比较,IL-1 β 、iNOS mRNA 表达均下调,有显著性差异($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结论:椎间盘退变中 IL-1 β 、iNOS mRNA 的表达上调,葛根汤下调 IL-1 β 、iNOS mRNA 表达,桂枝汤调节作用低于葛根汤。

主题词 葛根汤/药理学;桂枝汤/药理学;椎间盘移位/代谢

Regulative Actions of Gegen Decoction and Guizhi Decoction on Expressions of IL-1 β and iNOS mRNA in Cervical Intervertebral Disc of the Rabbit

Shi Qi, Wang Yongjun, Zhou Chongjian, et al.

(Institute of Spine Diseases, Shanghai University of TCM, Shanghai 200032)

Objective: To investigate regulative actions of Gegen Decoction, Guizhi Decoction on expressions of interleukin-1 β (IL-1 β) and inducible nitric oxide synthase(iNOS) mRNA in the cervical intervertebral disc. **Methods:** 36 male New Zealand rabbits, aged 8 months, were randomly divided into a normal group, wind-cold-damp stimulation group, low head position group, wind-cold-damp plus low head position group, Gegen Decoction group and Guizhi Decoction group, and the cervical intervertebral disc retrograde degeneration rabbit models of wind-cold-damp arthralgia-syndrome type, low head position, wind-cold-damp plus low head position were established. Expressions of IL-1 β and iNOS mRNA in cervical intervertebral disc were detected by RT-PCR technique. **Results:** The expressions of IL-1 β and iNOS mRNA in the all model groups were up-regulated as compared with the control group ($P<0.01$); the expressions in the Gegen decoction and the Guizhi Decoction groups were down-regulated as compared with the wind-cold-damp stimulation group ($P<0.05$ or $P<0.01$). **Conclusion:** Expressions of IL-1 β and iNOS mRNA in the cervical intervertebral disc of retrograde degeneration are up-regulated, and Gegen Decoction can down-regulate the expressions of IL-1 β and iNOS mRNA, and the regulative action of Guizhi Decoction is lower than that of Gen Gen Decoction.

Key Words Gegen Decoction/pharmacology; Guizhi Decoction/pharmacology; Displacement of intervertebral disc/metabolism

葛根汤源自张仲景《伤寒杂病论》。原文第 31 条曰:“太阳病,项背强几几,无汗恶风者,葛根汤主之”。原文第 14 条曰:“太阳病,项背强几几,反汗出恶风者,桂枝加葛根汤主之”。“项背强几几”就是风寒湿刺激颈背部,出现颈背肌肉酸重的“痹证”表现。本文依据上述思路立论,研究葛根汤和桂枝汤调控颈椎间盘组织中白介素 1 β (IL-1 β)、诱导型一氧化氮合酶(iNOS)mRNA 表达的调节作用。

1 材料与方法

1.1 动物分组:8 月龄雄性新西兰大白兔 36 只,体重 2.5 $\pm$ 0.2kg,由上海中医药大学实验动物中心提供。将

36 只新西兰大白兔随机分为 6 组,即正常对照组(正常组)、风寒湿刺激组(风寒湿组)、低头位组、风寒湿加低头位组(复合组)、葛根汤组、桂枝汤组,每组 6 只。

1.2 造模方法:正常组剃除颈部兔毛,不作其它处理。风寒湿组剃除颈部兔毛,固定动物于人工气候造模箱内,调节造模箱内环境为温度 6 $^{\circ}$ C,湿度 95%,风力 6 级。每日连续刺激 4 小时,共 128 小时。低头位组以自制特殊支架将家兔固定于低头 45 度,每日 2 次,每次 2 小时,连续 1 个月。复合组按风寒湿加低头位方法同时进行,连续 1 个月。

1.3 药物与制剂:葛根汤组成:葛根 12g,麻黄 9g,桂枝 6g,芍药 6g,炙甘草 6g,生姜 9g,大枣 3 枚;桂枝汤方组成:桂枝 9g,芍药 9g,炙甘草 6g,生姜 9g,大枣 3 枚。按千克体重换算方法,上述药物水煎浓缩至 250ml,与 15kg 兔饲料混合均匀,制备成颗粒,烘干后按每兔每日 83.33g 给予药物。葛根汤组在风寒湿组造

基金项目:国家自然科学基金(39970917),国家中医药管理局基金(00-01LQ11)

1 上海中医药大学中医骨伤修复研究所,上海市宛平南路 725 号(200032)

2 上海中医药大学龙华医院伤骨科

收稿日期:2003-04-17;修回日期:2003-06-16

表1 目的基因及 GAPDH 引物序列设计

引物名称, 片段(bp)	引物序列
IL-1 β (305bp)	正向 5' GGATGACGGCCTGAGAACTT 3'
	反向 5' TCACGCAGGACAGGTACAGA 3'
iNOS(231bp)	正向 5' GAGACGCACAGGCAGAGGTT 3'
	反向 5' GGTGACCACAGCCACAGTGA 3'
β -actin(660bp)	正向 5' ACGATGCTCCAAGAGCTGTT 3'
	反向 5' TCAGGCAGCTCATAGCTCTT 3'

表2 各组家兔颈椎间盘组织 IL-1 β , iNOS mRNA 光密度值比较($\bar{x} \pm s$)

组别	兔数	IL-1 β mRNA	iNOS mRNA
正常组	6	0.9532 $\pm$ 0.0047	0.9199 $\pm$ 0.0129
风寒湿组	6	1.0413 $\pm$ 0.0152 $\Delta\Delta$	1.0026 $\pm$ 0.0096 $\Delta\Delta$
低头位组	6	1.0297 $\pm$ 0.0313 $\Delta\Delta$	1.0049 $\pm$ 0.0182 $\Delta\Delta$
复合组	6	1.0885 $\pm$ 0.0271 $\Delta\Delta\star\star\nabla$	1.0160 $\pm$ 0.0078 $\Delta\Delta\star$
葛根汤组	6	0.9908 $\pm$ 0.0121 $\Delta\star\star\nabla$	0.9437 $\pm$ 0.0031 $\Delta\Delta\star\star\nabla\blacktriangle$
桂枝汤组	6	0.9529 $\pm$ 0.0025 $\star\star\nabla\blacklozenge$	0.9057 $\pm$ 0.0044 $\Delta\star\star\nabla\blacklozenge$

与正常组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与风寒湿组比较, $\star P < 0.05$, $\star\star P < 0.01$; 与低头位组比较, $\nabla P < 0.01$; 与复合组比较, $\blacktriangle P < 0.01$; 与葛根汤组比较, $\blacklozenge P < 0.01$

模1个月后服用葛根汤, 桂枝汤组在风寒湿组造模1个月后服用桂枝汤。两个给药组每日定时给予含药饲料, 待完全吃完后再添加一般饲料。

1.4 取材时间与方法: 正常组、模型组于1个月后, 治疗组于给药1个月后, 耳静脉栓塞处死家兔, 手术显微镜下取各组家兔颈部椎间盘, 沿上、下软骨终板与椎体的交界面切下椎间盘, 组织匀浆, 抽提总RNA待测。

1.5 试剂: TRIzol 试剂(GIBCO BRL 公司), 焦碳酸二乙酯(DEPC, Sigma 公司), 甲酰胺(Sigma 公司), 溴乙锭(Sigma 公司), 琼脂糖(电泳纯, Sangon 公司), M-MLV、RNasin、PCR Marker(Promega 公司), 无水乙醇、氯仿、异丙醇、硼酸(分析纯, 华东试剂公司), EDTA、dNTPs(分析纯, 华美公司), 三羟甲基氨基甲酸(Tris, 分析纯, Sangon 公司), 逆转录试剂盒(Promega 公司), TaqDNA 聚合酶(MBI 公司), 其它试剂均为分析纯。

PT-PCR 反应系: (1) RT 反应系: 1mmol/L DTT, M-MLV 逆转录酶(200U/ μ l), 10mmol/L dNTP, 随机六聚体引物(Random primer); 5 $\times$ 逆转录酶缓冲液: 250mmol/L tris-HCl(pH8.3), 375mmol/L KCl, 15mmol/L MgCl₂; (2) PCR 反应系: 50mmol/L MgCl₂, 10mmol/L dNTPmix, TaqDNA 聚合酶(5U/ μ l); 10 $\times$ PCR 缓冲液: 100mmol/L tris-HCl(pH8.5), 500mmol/L KCl, 0.1% 明胶; 50 $\times$ TAE 缓冲液: Tris242g, 冰乙酸 57.1ml, 5mmol/L EDTA 100ml(pH8.0)。

1.6 引物序列设计: PT-PCR 检测所检测的基因及内参照 β -肌动蛋白(β -actin)引物序列由中国科学院上海申友生物科技公司合成。见表1。

1.7 实验步骤: 组织总 RNA 提取(Trizol 法), RNA 变性电泳, 反转录反应(RNA 逆转录合成 cDNA), 多聚合酶反应(PCR), 凝胶电泳, 测定其光密度或密度扫描仪对特异性条带进行密度扫描。

1.8 统计学方法: 凝胶成像系统自动采集各个条带的光密度比值, 原始数据输入 SPSS8.0 统计软件包, 每组样本均数以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 显著性检验采用两样本均数比较的 t 检验, 多组样本均数比较采用方差分析。

2 结果

2.1 椎间盘退变状态分析: 连续1个月造模后, 各个模型组椎间盘中纤维环疏松断裂, 软骨终板不规则增生、钙化, 软骨终板交界处血管芽减少、闭塞, 炎症介质前列腺素 E₂ (PGE₂)、6-酮-前列腺素 F_{1 α} (6-Keto-PGF_{1 α}) 明显升高, 成纤维细胞胶原酶(MMP-1)、溶基质素酶(MMP-3)活性明显升高, 金属蛋白酶组织抑制剂(TIMP-1)、转化生长因子 β (TGF β) mRNA 表达明显下调, 肿瘤坏死因子 α (TNF α) mRNA 表达明显上调, 凋亡相关蛋白表达变化明显(文章另发)。

2.2 总 RNA 抽提结果: 椎间盘组织总 RNA 提取的样品经过紫外分光光度计定量, 各样品 OD260nm/OD280nm 比值均在 1.6~2.0 之间, 1% 琼脂糖凝胶鉴定见 18S、28S 两条清晰条带, 表明总 RNA 无蛋白质污染, 无降解。

2.3 IL-1 β mRNA、iNOS mRNA 表达: 正常组有 IL-1 β mRNA、iNOS mRNA 表达, 各个模型组 IL-1 β 、iNOS 基因大量表达, 葛根汤组、桂枝汤组条带较风寒湿组变浅。IL-1 β mRNA、iNOS mRNA 光密度比值结果见表2。

IL-1 β mRNA 表达: 各模型组同正常组比较, IL-1 β mRNA 表达上调, 差异均有显著性($P < 0.01$); 复合组与风寒湿组($P < 0.05$)及低头位组($P < 0.01$)比较, 差异均有显著性。葛根汤和桂枝汤可下调 IL-1 β mRNA 表达, 与风寒湿组比较差异均有显著性($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 桂枝汤组与葛根汤组比较差异有显著性($P < 0.01$), 而与正常组比较差异无显著性。

iNOS mRNA 表达: 各个模型组同正常组比较, iNOS mRNA 表达上调, 差异均有显著性($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 复合组与风寒湿组比较差异有显著性($P < 0.05$), 而复合组与低头位组比较及风寒湿组与低头位组比较, iNOS mRNA 表达差异均无显著性($P >$

0.05)。葛根汤和桂枝汤可下调 iNOS mRNA 的表达,与风寒湿组比较差异均有显著性($P<0.01$),但桂枝汤组较葛根汤组作用显著($P<0.01$)。

3 讨论

临床流行病学证实,风寒湿刺激、长期低头位都是加速椎间盘退变,产生颈椎病临床症状的重要因素^[1]。风寒湿刺激已经引入风湿性关节炎、肩关节周围炎、颈椎病动物模型研究中。实验证实,风寒湿邪刺激后,肌肉、肌腱、关节滑膜、关节软骨等组织可出现微循环障碍、炎性细胞渗出、神经电生理改变、血液流变学变化、氧自由基代谢异常以及 IL-1 β 等细胞因子 mRNA 表达的改变^[2~4]。根据《伤寒论》中葛根汤和桂枝汤治疗颈部风寒湿“痹症”的论述,本文从调控椎间盘组织细胞因子表达方面探讨葛根汤和桂枝汤作用的异同点。

椎间盘退变是一个动态的复杂过程。正常椎间盘组织中较少含有 IL-1 β 及其免疫反应细胞。Rand 等^[5]发现培养中的鼠正常椎间盘细胞在脂多糖刺激下,可大量合成、分泌 IL-1 等细胞因子。Taskiran^[6]研究发现,IL-1 在椎间盘退变的病理过程中占有重要的地位。IL-1 通过诱导基质金属蛋白酶的表达,引起蛋白多糖降解;通过刺激分泌一氧化氮(NO),抑制前列腺素(PG)的合成,导致 PG 的净损失。Kawakami 等^[7]证实,NO 对继发于颈、腰椎间盘突出神经根疼痛发挥作用。McGehee 等^[8]认为,NO 可以间接改变感觉神经的兴奋性,大量一氧化氮合酶(NOS)抑制剂阻止外周乙酰胆碱及吗啡抗感受伤害的能力,通过直接向椎间盘内注射 NOS 的竞争抑制物,NO 可以抑制或改变由磷脂酶 A₂(PLA₂)产生的机械性痛觉过敏。目前认为,NO 通过自分泌或旁分泌,可直接或间接地与椎间盘中产生的细胞因子(IL-1 β , IL-6)相互作用,诱导等炎症介质产生,加速椎间盘外基质的降解,进一步加速退变椎间盘的退变。

葛根汤是在桂枝汤的基础上减桂枝、芍药量,重用葛根、麻黄而成,二者在临床上同用来治疗颈椎病。本实验显示,二者在抑制椎间盘退变过程的靶点和环节方面,既具有同效性,又具有差异性。本次实验发现葛根汤、桂枝汤都可以下调椎间盘组织 IL-1 β mRNA、iNOS mRNA 的表达,与风寒湿组比较差异均有显著性($P<0.01$)。研究还显示,葛根汤、桂枝汤可以抑制炎性物质释放,调控椎间盘细胞外基质金属蛋白酶活性,调节椎间盘中相关细胞因子和凋亡相关蛋白表达的表达。葛根汤、桂枝汤可以降低 PGE₂、6-Keto-PGF_{1 α} 、血栓烷 B₂(TXB₂)含量,与风寒湿组比较差异有显著性。

现代研究证实,桂枝汤有抗炎作用,如对于角叉菜胶引起的小鼠足肿胀、二甲苯所致的毛细血管通透性增高均有抑制作用^[9],对于佐剂性关节炎的继发肿胀与炎症介质均有抑制作用^[10]。葛根、桂枝和赤芍中度抑制 PGE₂ 的释放。葛根汤具通经活络、调理气血的功,现代临床将之广泛用治各类神经运动系统功能障碍的病症,而此类病症以经络郁滞且病性属寒者为其辨证要点。其角叉菜胶性足跖肿胀容积有减少倾向,提示本方具有抗炎作用;从与其有剂量依赖关系的抑制组胺引起的豚鼠支气管平滑肌的收缩作用及乙酰胆碱引起的回肠收缩作用可见本方对多种平滑肌具有收缩抑制作用^[11]。

参考文献

- 1 王拥军,施杞,彭宝淦.颈椎病危险因素的病例对照研究.中国中医骨伤科杂志,1997,5(6):12-14.
- 2 王绪辉,朱显华,施杞,等.风湿性关节炎实验模型及病理学研究.中医杂志,1990,31(7):50-53.
- 3 施杞,王拥军,吴士良,等.风寒湿刺激对家兔颈椎间盘 MMP-1, MMP-3 活性的影响.中国骨伤,2002,6(6):340-342.
- 4 姜杰,常向明,施杞.风寒湿对家兔颈椎间盘组织 IL-1 β mRNA 表达的影响.现代康复,2000,4(8):1190-1191.
- 5 Rand N, Reichert F, Floman Y, et al. Murine nucleus pulposus-derived cells secrete interleukins-1 β , -6, and 10 and GM-CSF in cell culture. Spine, 1997, 22(22):2598-2602.
- 6 Taskiran D, Stefanovic-Racic M, Georgescu H, et al. Nitric oxide mediates suppression of cartilage proteoglycan synthesis by interleukin-1. Biochem Biophys Res Commun, 1994, 200(1):142-148.
- 7 Kawakami M, Tamaki T, Weinstein JN, et al. Pathomechanism of pain-related behavior produced by allografts of intervertebral disc in the rat. spine, 1996, 21(18):2101-2107.
- 8 McGehee DS, Goy MF, Oxford GS. Involvement of the nitric oxide-cyclic GMP pathway in the desensitization of bradykinin responses of cultured rat sensory neurons. Neuron, 1992, 9(2):315-324.
- 9 富杭育,贺玉琢,李小芹,等.桂枝汤的实验研究.中医杂志,1990,31(12):41-44.
- 10 富杭育,贺玉琢,李小芹,等.桂枝汤的药理学研究Ⅱ.中药药理与临床,1987,3(3):1-3.
- 11 井上和惠.葛根汤的一般药理作用研究.国外医学中医中药分册,1992,14(5):48-52.

颈肩腰腿病中医药新疗法培训班招生

河北省巨鹿县中医风湿病专科研究所培训学校陶纪志医师积累了 20 余年治疗各种颈肩腰腿痛的诊断和治疗方法,应广大学员的要求,现继续面向国内外招生。传授内容有:类风湿性关节炎长期发热,遇寒后疼痛加剧,得热痛减,形寒肢热的中药疗法;颈椎骨质增生、腰椎骨质增生、骨性关节炎、产后风湿、骨坏死等疾病的处方药物疗法;现场配制讲解一种风湿病外用药的方法;颈椎、腰椎、膝关节、股骨头坏死 CT、X 线片的诊断;传授腰椎间盘突出(正骨复位法)、肩周炎一针疗法、膝关节骨刺、背部三棱针疗法、网球肘皮内针刺疗法。

开班时间:常年招生,每月 1 日、15 日准时开课。学期 10 天,开课前一天为报到日期,详细资料及入学通知汇 10 元索取。电话:(0319)4338888,地址:河北省巨鹿县中医风湿病专科研究所培训学校(朝阳路),联系人:李老,邮编:255250。