

颈复康颗粒对颈椎动静力失衡大鼠 颈椎间盘形态学改变的影响

崔学军¹ 郝银丽² 李晨光¹ 施 杞¹ 王拥军¹

(1. 上海中医药大学附属龙华医院, 上海市宛平南路 725 号, 200032; 2. 中国人民解放军第五医院)

[摘要] **目的** 观察颈复康颗粒对颈椎动静力失衡大鼠颈椎间盘形态学改变的影响。**方法** 将 SD 雄性大鼠随机分成对照组、模型组、颈复康颗粒组、莫比可组各 12 只, 建立动静力失衡性大鼠颈椎间盘退变模型, 给药 4 周后每组取 4 个标本 2 张连续切片, 观察组织病理学改变, 测量软骨终板非钙化层与钙化层厚度比值、软骨终板内血管芽数量, 检测各组退变椎间盘血管内皮细胞生长因子(VEGF)、胰岛素样生长因子-1(IGF-1)、转化生长因子- β (TGF- β)表达。**结果** 与对照组比较, 模型组大鼠颈椎间盘出现退行性改变, 软骨与椎体交界面血管芽数量减少, 软骨终板非钙化层与钙化层比值下降, 大鼠颈椎间盘中 VEGF 表达增加、IGF-1 和 TGF- β 表达下降($P<0.01$); 与模型组比较, 颈复康颗粒组血管芽数量增加($P<0.01$), 颈复康颗粒组及莫比可组椎间盘组织形态学改善($P<0.01$ 或 $P<0.05$), 软骨终板非钙化与钙化层厚度比值增加($P<0.01$), 大鼠颈椎间盘中 VEGF 表达下降、IGF-1 和 TGF- β 表达增加($P<0.01$)。**结论** 颈复康颗粒通过调节细胞因子 VEGF、IGF-1、TGF- β 的表达, 改善大鼠颈椎间盘退变模型形态学的表现, 从而减少椎间盘细胞外基质降解, 延缓椎间盘退变。

[关键词] 椎间盘退变; 颈复康颗粒; 软骨终板; 血管芽

Effects of Jingfukang Granule on the Morphological Changes of Cervical Intervertebral Disc in Rats with Cervical Intervertebral Disc Degeneration Induced by Unbalanced Dynamic and Static Forces

CUI Xuejun¹, HAO Yinli², LI Chenguang¹, et al.

(1. Longhua Hospital of Shanghai University of Chinese Medicine, Shanghai 200032; 2. The Fifth Hospital of People's Liberation Army)

ABSTRACT **Objective** To investigate the effect of Jingfukang Granule (Granule for cervical spondylosis) on the morphological changes of cervical intervertebral disc in rats with cervical intervertebral disc degeneration induced by unbalanced dynamic and static forces. **Methods** Male SD rats were randomly divided into control group, model group, Jingfukang Granule group, and Mobic group, 12 rats in each group. The imbalance model of dynamic and static force of cervical intervertebral disc degeneration was established. The drugs were given after modeling, and the rats were sacrificed 4 weeks later. Four samples of cervical intervertebral disc were collected from each group and two sections in succession were used to observe the histopathological changes. The ratio of uncalcified layer to calcified layer in cartilage endplate, and the number and area of vascular bud were measured under light microscope. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), insulin-like growth factor-1 (IGF-1), and transforming growth factor- β (TGF- β) were tested. **Results** Rats in the model group had degeneration in the cervical intervertebral disc, decrease of the number of vascular bud, and decrease of the ratio of uncalcified layer to calcified layer in cartilage endplate, increased VEGF expression, and decreased IGF-1 and TGF- β expressions ($P<0.01$). Compared with the model group, the rats in the Jingfukang Granule group had increased number of vascular bud ($P<0.01$); the rats in the Jingfukang Granule group and Mobic group had improved morphological structure ($P<0.01$ or $P<0.05$), increased ratio of uncalcified layer to calcified layer in cartilage endplate ($P<0.01$), down-regulated expression of VEGF, and up-regulated expression of IGF-1 and TGF- β ($P<0.01$). **Conclusion** By regulating the expression of VEGF, IGF-1, and TGF- β Jingfukang Granule could improve the morphological changes. With the decreased degradation of extracellular matrix, the degeneration of intervertebral disc could be delayed.

Key Words Degeneration of intervertebral disc; Jingfukang Granule (Granule for cervical spondylosis); Cartilage endplate; Vascular bud

随着社会人口老龄化以及慢性劳损的增加, 颈椎病已成为影响中老年人群健康及生活质量的重要因素^[1]。椎间盘在退变过程中, 多种因素在退变的不同阶

段或椎间盘不同部位起作用^[2]。本研究应用组织形态学等技术方法观察颈复康颗粒对椎间盘营养供应的影响, 对大鼠颈椎间盘细胞因子血管内皮细胞生长因子(VEGF)、胰岛素样生长因子-1(IGF-1)、转化生长因子- β (TGF- β)的影响, 探讨颈椎间盘退变的机理, 阐明颈复康颗粒调控颈椎间盘退变的途径和作用位点。

1 材料

1.1 实验动物

6 月龄 SD 雄性大鼠 48 只, SPF 级, 体重(500±20)g。由上海市西普尔-必凯实验动物有限公司提供, 许可证 SLXK(沪) 2003-0002。

1.2 药物和试剂

颈复康颗粒(由羌活、川芎、葛根、秦艽、威灵仙、苍术、丹参、白芍、炙地龙、红花、制乳香、黄芪等组成, 河北省承德颈复康药业集团有限公司生产, 批准文号: 冀卫药准字 1995 第 080193 号), 莫比可片(德国勃林格殷格翰大药厂, 国药准字 H20020217), 盐酸氯胺酮注射液(江苏恒瑞医药股份有限公司, 国药准字: H32022820), 红霉素软膏(上海第九制药厂, 沪卫准字: 009029), 硫酸庆大霉素(上海中西制药有限公司, 国药准字: H31022243), 4% 多聚甲醛, 20% EDTA, 0.5% 多聚赖氨酸(上海实生细胞生物技术公司); 一抗: VEGF、IGF-1、TGF-β 兔抗鼠多克隆抗体及即用型 SABC 免疫组化染色试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司)。

1.3 实验仪器

HI1210 型摊片机, Leica, 德国; TP1020 型全自动脱水机, Leica, 德国; EG1160 型全自动石蜡包埋机, Leica, 德国; RM2135 超薄切片机, Leica, 德国; HI1220 型烘片机, Leica, 德国; BH-20 光学显微镜, Olympus, 日本; 电热恒温培养箱 DPX-9052B, 上海跃进医疗器械厂; DHG-9140A 电热恒温干燥箱, 上海跃进医疗器械厂; 低温冰箱, Sankyo; MD100-2 电子分析天平, 上海天平仪器厂。

2 方法

2.1 动物造模与分组

将大鼠适应性喂养 1 周后, 编为 1~48 号, 采用随机数字表法分组, 每组 12 只。分成正常对照组(对照组)、病理模型组(模型组)、颈复康颗粒组和莫比可组, 编号后分笼饲养。保持饲养房温、湿度适宜(20℃), 通风、采光条件良好。造模方法参考文献[3]: 将大鼠(模型组、颈复康颗粒组和莫比可组)按 0.1g/kg 体重行盐酸氯胺酮腹腔注射麻醉, 颈后部剪毛, 碘伏消毒, 取颈背部正中纵向切口, 长约 2~2.5cm, 切开皮肤后, 充分游离各层肌肉, 横向切断深层颈夹肌和头、颈、寰最长肌, 完全切除颈肋肌和头半脊肌, 然后再依次切断颈 2~7 棘上和棘间韧带。彻底止血, 庆大霉素冲洗后缝合皮肤, 红霉素软膏外涂切口, 防止感染。

2.2 给药方法

术后 12 周, 各给药组开始灌胃 4 周, 用药剂量按动

物体表面积比率换算等剂量法^[4]。由正常人每日常用剂量换算得出(正常人按 60kg 标准体重计算, 大鼠按平均体重 500g 计算), 参照文献[5]并结合临床, 计算得出颈复康颗粒组大鼠灌胃每日 0.74g, 莫比可组每日 0.2775mg。按以上换算剂量, 颈复康颗粒及莫比可药物均以双蒸水溶解成不同浓度的悬浮液, 每日 1 次灌胃给药, 连续给药 30d。模型组于造模后与对照组常规饲养, 不作任何处理。

2.3 取材、染色时间和方法

给药 4 周后, 全部处死大鼠, 在 4 倍手术显微镜下沿上、下软骨终板与椎体的交界面切下椎间盘, 颈 4-5 椎间盘用于椎间盘形态学观察、软骨终板非钙化层与钙化层厚度比值分析, 颈 5-6 椎间盘用于免疫组织化学。

椎间盘取材, 4% 多聚甲醛固定 24h, 20% EDTA 脱钙 10d, 梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 石蜡机包埋, 正中额状面连续 6μm 切片, 脱蜡至水。HE 染色, SafraninO 染色, VEGF、IGF-1、TGF-β 免疫组化染色。光镜下观察切片, 棕黄色为阳性染色。已知阳性切片为阳性对照, PBS 代替一抗为阴性对照, 在 ×40、×100、×200 等不同倍数下整体浏览切片后, 各个标本的软骨终板在 100 倍显微镜下, 按上下软骨终板和左、中、右观察 6 个视野。积分光密度是平均光密度与面积的乘积, 阳性细胞染色颜色越深, 面积越大, 积分光密度值就越高。CMIAS-99B 型图像分析系统分析积分光密度。

2.4 观察指标及方法

组织病理学观察: 10×40 倍光学显微镜下观察每个颈椎间盘正中额状面的髓核细胞、纤维环的排列与结构、软骨终板及钙化层、非钙化层的厚度及形态结构的变化, 血管充血情况, 血管芽数量等。颈椎间盘组织形态学评分: 每组取 4 个标本 2 张连续切片, 采用 Miyamoto 法^[6]对椎间盘组织形态学进行分级与评分。软骨终板非钙化层与钙化层厚度比值观察: 体视学分析法。软骨终板交界面血管芽数量: 每组取 4 个标本 2 张连续切片血管芽计数, 采用 Disector 自动计数法^[7]分析各组血管芽的数量, 然后进行统计学分析。

2.5 统计学方法

采用 SPSS11.0 统计软件, 数据以($\bar{x} \pm s$)表示, 采用单因素方差分析统计数据。

3 结果

3.1 各组椎间盘组织病理学观察比较

对照组: 大鼠颈椎间盘基本结构显示, 由外周规则排列的纤维环和中央大的髓核组成, 软骨终板分为生长软骨层和关节软骨层, 关节软骨层由一薄层透明软

表1 各组大鼠颈椎间盘组织形态学评分、软骨终板非钙化层与钙化层厚度比值及血管芽数量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	标本数	切片数	Miyamoto 评分(分)	非钙化层与钙化层厚度比值	血管芽数量(个)
对照组	4	8	1.13 $\pm$ 0.35	3.03 $\pm$ 0.47	9.88 $\pm$ 1.46
模型组	4	8	4.38 $\pm$ 0.52 Δ	1.21 $\pm$ 0.29 Δ	4.63 $\pm$ 1.06 Δ
颈复康颗粒组	4	8	2.50 $\pm$ 0.76**	3.09 $\pm$ 0.44*	6.50 $\pm$ 0.76*
莫比可组	4	8	3.31 $\pm$ 0.83*	2.34 $\pm$ 0.34*	5.00 $\pm$ 0.93

注:与对照组比较, $\Delta P<0.01$;与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

表2 各组大鼠免疫组化染色结果比较($\bar{x} \pm s$)

组别	标本数	切片数	VEGF	IGF-1	TGF- β
对照组	4	8	8.69 $\pm$ 0.87	15.26 $\pm$ 1.06	14.30 $\pm$ 1.08
模型组	4	8	22.85 $\pm$ 1.91 Δ	7.95 $\pm$ 0.93 Δ	6.44 $\pm$ 1.43 Δ
颈复康颗粒组	4	8	11.64 $\pm$ 1.70*	12.73 $\pm$ 0.68*	12.21 $\pm$ 1.22*
莫比可组	4	8	17.04 $\pm$ 1.03*	11.82 $\pm$ 1.09*	8.04 $\pm$ 1.32*

注:与对照组比较, $\Delta P<0.01$;与模型组比较,* $P<0.01$

骨组成,与继发性骨化中心相连接的透明软骨钙化,潮标清晰可见,钙化的关节软骨极薄,钙化软骨与骨髓腔直接接触或与一薄层骨板相邻,钙化的软骨下分布有大的血管。模型组:大鼠颈椎间盘已开始出现退行性改变,纤维环板层结构紊乱,排列轻度不规则,部分髓核组织皱缩或变小,少数髓核轻度突出,关节软骨钙化层及非钙化层均增厚,潮标前移,软骨下骨板增厚,血管明显减少,周边不规则,血管充血曲张。各药物干预组:大鼠椎间盘形态较模型组有明显改善。颈复康颗粒组大鼠椎间盘形态接近对照组,光镜下观察形态结构较完整,纤维环排列比较规则,髓核比较饱满,潮标可见,终板内血管充血情况改善,血管芽多于模型组。

3.2 各组大鼠颈椎间盘组织形态学评分比较

表1示,颈复康颗粒组大鼠Miyamoto评分与模型组比较差异有统计学意义($P<0.01$),与莫比可组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

3.3 各组大鼠软骨终板非钙化层与钙化层厚度比值比较

表1示,颈复康颗粒组大鼠非钙化层与钙化层厚度比值增加,与模型组比较差异有统计学意义($P<0.01$),与莫比可组比较则差异无统计学意义($P>0.05$)。

3.4 各组大鼠软骨终板交界面血管芽数量比较

表1示,与模型组比较,颈复康颗粒组血管芽个数明显增加,差异有统计学意义($P<0.01$),且在增加血管芽数量方面,颈复康颗粒组整体数量优于莫比可组,但两者比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

3.5 各组大鼠免疫组化染色结果比较

表2示,对照组椎间盘VEGF阳性表达的细胞多位于终板与椎体的交界面,其余部位表达较少,而模型

组VEGF阳性表达的细胞增多,某些部位出现强阳性表达的细胞,各用药组较模型组有不同程度改善。各组IGF-1、TGF- β 阳性表达情况与VEGF表达相反,模型组表达下降,与模型组比较,颈复康颗粒组及莫比可组表达增加。CMIAS-99B型医学图像分析系统自动分析积分光密度,与对照组相比,模型大鼠椎间盘VEGF表达增强,IGF-1和TGF- β 表达下降($P<0.01$);与模型组相比,颈复康颗粒组及莫比可组VEGF表达下降,IGF-1和TGF- β 表达增加($P<0.01$)。

4 讨论

颈椎病的根本病理变化是椎间盘的退变。椎间盘退变的机制目前大致可归结为软骨终板的退变,营养供应减少,细胞老化,椎间盘内部降解酶活性的升高,基质疲劳衰竭等,而上述机制中最重要的是椎间盘软骨终板的退变^[8]。软骨终板是椎间盘的重要组成部分,它在髓核的营养交换和椎间盘的应力缓冲保护以及维持椎体的正常形态等方面起着重要作用。椎体内血管的营养物质经血管网到达软骨终板,通过弥散进入椎间盘,营养内层纤维环和髓核。软骨终板退变后,椎间盘蛋白多糖丢失增多,使软骨终板的渗透性降低,加速椎间盘的退变^[9-10]。椎体终板内的血管相互交错形成血管襻,即血管芽形态,分布在终板周围和内纤维环部位^[11-12]。随着椎间盘退变,血管芽结构遭到破坏,血管数量明显减少。在大鼠颈椎间盘退变模型椎体与软骨终板交界面血管芽内有瘀血存在^[13-14]。因此,活血化瘀治疗对改善椎间盘功能十分必要。

VEGF是一种有效的血管通透性诱导因子^[15]。VEGF的表达与组织中微血管的密度及新生血管的数量密切相关^[15]。血管内皮细胞在正常情况下不表达VEGF,但当内皮细胞被置于缺氧环境时,细胞内

VEGF 的 mRNA 水平明显增加。本实验中,颈复康颗粒降低了 VEGF 的表达强度。中医以活血化瘀为主治疗的疾病,其中医治法与方药的作用实质,异病同治的共同机制是否与抑制或上调 VEGF 有关,还需进一步思考。IGF-1 不仅能增强软骨细胞功能,促进蛋白多糖和Ⅱ型胶原的合成,而且刺激细胞分裂增殖,是强大的软骨细胞有丝分裂刺激剂,突出椎间盘软骨细胞中 IGF-1 染色呈阳性^[16]。本研究显示,颈复康颗粒治疗后 IGF-1 表达明显增高,颈复康颗粒可通过增加 IGF-1 表达,促进基质中胶原合成,但机理尚不清楚,有待进一步研究。TGF-β 可以促进细胞增殖,调节细胞分化,促进细胞外基质合成,调节机体免疫^[17]。体外实验表明,TGF-β 可促进骨膜间充质细胞的增殖和分化,促进软骨细胞的增殖,刺激Ⅰ型胶原、骨连接素和骨桥蛋白的合成。本实验发现颈复康颗粒可明显增加 TGF-β 的表达。

本研究显示,颈复康颗粒可以降低退变椎间盘 VEGF 的过度表达、促进软骨终板血管修复和生长,同时有促进退变椎间盘 IGF-1、TGF-β 表达的作用,刺激软骨细胞增殖,合成细胞外基质,改善内环境,延缓颈椎间盘退变。

参考文献

[1] 施杞,王和鸣.骨伤科学[M].北京:人民卫生出版社,2001:1099.

[2] Agrillo U, Faccioli F, Fachinetti P, et al. Guidelines for the diagnosis and management of the degenerative diseases of cervical spine [J]. J Neurosurg Sci, 1999, 43 (1): 11—14.

[3] Wang YJ, Shi Q, Lu WW, et al. Cervical intervertebral disc degeneration induced by unbalanced dynamic and static forces: a novel in vivo rat model [J]. Spine (Phila Pa 1976), 2006, 31(14): 1532—1538.

[4] 方喜业主编.医学实验动物学[M].北京:人民卫生出版社,1995:220—223.

[5] 徐晓玉,严鹏科,陈刚,等.川芎嗪对小鼠肺癌血管生长和 VEGF 表达的抑制[J].中国药理学通报,2004,20(2): 151—154.

[6] Ariga K, Miyamoto S, Nakase T, et al. The relationship between apoptosis of endplate chondrocytes and aging and degeneration of the intervertebral disc[J]. Spine(Phila Pa 1976), 2001, 26(22): 2414—2420.

[7] Sterio DC. The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector[J]. J Microsc, 1984, 134(Pt 2): 127—136.

[8] Kang JD, Georgescu HI, McIntyre-Larkin L, et al. Herniated cervical intervertebral discs spontaneously produce matrix metalloproteinases, nitric oxide, interleukin-6, and prostaglandin E₂ [J]. Spine(Phila Pa 1976), 1995, 20(22):

2373—2378.

[9] Peng BG, Hou SX, Shi Q, et al. The relationship between cartilage endplate calcification and disc degeneration: an experimental study [J]. Chin Med J, 2001, 114(3): 308—312.

[10] Benneker LM, Heini PF, Alini M, et al. 2004 Young Investigator Award Winner: vertebral endplate marrow contact channel occlusions and intervertebral disc degeneration [J]. Spine(Phila Pa 1976), 2005, 30(2): 167—173.

[11] Kakitsubata Y, Theodorou DJ, Theodorou SJ, et al. Cartilaginous endplates of the spine: MRI with anatomic correlation in cadavers [J]. J Comput Assist Tomogr, 2002, 26(6): 933—940.

[12] 彭城,任先军.椎间盘退变与终板内微血管改变的相关性研究[J].中国矫形外科杂志,2003,10(11): 1355—1357.

[13] Yoshizawa H, Ohiwa T, Kubota K. Morphological study on the vertebral route for the nutrition of the intervertebral disc [J]. Neuro Orthop, 1986, 1(1): 17—21.

[14] 王拥军,施杞,沈培芝,等.动静力失衡性大鼠颈椎间盘退变模型的动态观察[J].中国中西医结合杂志,2001,21(3): 199—202.

[15] 潘欣.血管内皮细胞生长因子的研究进展[J].国外医学临床生物化学与检验学分册,2000,21(2): 66—69.

[16] Fortier LA, Lust G, Mohammed HO, et al. Coordinate upregulation of cartilage matrix synthesis in fibrin cultures supplemented with exogenous insulin-like growth factor-1 [J]. J Orthop Res, 1999, 17(4): 467—474.

[17] Specchia N, Pagnotta A, Toesca A, et al. Cytokines and growth factors in the protruded intervertebral disc of the lumbar spine [J]. Eur Spine J, 2002, 11(2): 1450—1451.

(收稿日期:2008—12—16;修回日期:2009—02—26)

[编辑:崔京艳]

编纂《中国当代名医心镜》征稿通知

为进一步深入挖掘、研究、传承我国各地名医的特色疗法和诊治经验,北京展旭医学研究中心将编纂《中国当代名医心镜》。现面向全国征稿:中医、针灸、推拿、理疗、膏药、刮痧等传统疗法诊治常见病、多发病、疑难病的思路及经验总结;典型医案(病例)分析与治疗体会;历代、当代名医学术思想、学术经验的继承与整理。请在稿件上注明“名医心镜”字样;本书将由国内出版社出版,为了使该书具有一定的学术价值、文献价值,现面向全国诚聘主编、副主编,有意参与者请将简历寄至本中心或联系我们,请在简历上注明“参与编审”字样。截稿日期:2010 年 1 月 30 日。

为挖掘、研究、传承我国传统特效医术,拟于 2010 年 4 月在北京召开“全国特效医学技术学术研讨会”。现面向全国征稿:文稿题材不限,内容以医案分析、病例报导、特效医术介绍与特色疗法经验总结为主。会议期间将邀请专家作“医学科技成果转化面临的问题及对策”专题讲座。欢迎掌握特效医术、特色疗法的医务人员及民间医生投稿参会,请注明“特效医术”会议。截稿日期:2010 年 2 月 6 日。

以上来稿请寄:北京市丰台区丰管路 48 号北京展旭医学研究中心学术部收,邮编:100071。电子文稿:wengao@mingyi120.com。电话:010-62249561。录用文稿将在中国名医网(<http://www.mingyi120.com>)作宣传。注:为促进医学研究事业的发展,我研究中心现面向全国招聘研究会会员,有意者,请联系我们,投稿者将优先聘任。