

引用:贺宪,曾展鹏,郭淑芬,孔畅,马志锋,刘奕.淫羊藿苷对家兔腰椎间盘突出退变的影响[J].湖南中医杂志,2020,36(4):139-142.

淫羊藿苷对家兔腰椎间盘突出退变的影响

贺 宪,曾展鹏,郭淑芬,孔 畅,马志锋,刘 奕

(广州市番禺区中医院,广东 广州,511400)

[摘要] 目的:观察淫羊藿苷对退变家兔腰椎间盘中基质金属蛋白酶13(MMP-13)、基质金属蛋白酶组织抑制因子-1(TIMP-1)以及细胞凋亡因子Bax、Bcl-2蛋白表达的影响。方法:30只新西兰大白兔随机分为空白组、模型组和实验组,每组各10只。用髓核穿刺抽吸法复制腰椎间盘突出退变模型。术后4周,实验组用淫羊藿苷(3 mg/kg·d)灌胃,空白组和模型组用等量0.9%氯化钠注射液灌胃,连续4周。分别于术后4周和术后8周采用免疫组化法检测椎间盘中MMP-13、TIMP-1水平,Western blot检测椎间盘中Bax、Bcl-2水平。结果:MMP-13、TIMP-1、Bax、Bcl-2表达水平实验组术后4周及模型组术后4、8周与同时期空白组相比,实验组术后8周Bax、Bcl-2表达水平与模型组同时期比较,模型组、实验组术后8周Bax、Bcl-2表达水平与术后4周组内比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。结论:淫羊藿苷可通过下调退变椎间盘中MMP-13、Bax的表达,上调TIMP-1、Bcl-2的表达,而起到防治腰椎间盘突出退变的作用。

[关键词] 腰椎间盘突出退变;淫羊藿苷;家兔;实验研究

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A DOI:10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2020.04.056

Effect of icariin on lumbar disc degeneration in rabbits

HE Xian, ZENG Zhanpeng, GUO Shufen, KONG Chang, MA Zhifeng, LIU Yi

(Panyu Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 511400, Guangdong, China)

[Abstract] Objective: To investigate the effect of icariin on the expression of matrix metalloproteinase-13 (MMP-13), tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1), and the apoptotic factors Bax and Bcl-2 in the degenerated lumbar disc in rabbits. Methods: A total of 30 New Zealand white rabbits were randomly divided into blank group, model group, and experimental group, with 10 rabbits in each group. Nucleus pulposus puncture and aspiration were performed to establish a model of lumbar disc degeneration. At 4 weeks after surgery, the rabbits in the experimental group were given icariin (3 mg/kg·d) by gavage, and those in the blank group and the model group were given an equal volume of 0.9% sodium chloride by gavage, both for 4 consecutive weeks. At 4 and 8 weeks after surgery, immunohistochemistry was used to measure the levels of MMP-13 and TIMP-1 in the intervertebral disc, and Western blot was used to measure the levels of Bax and Bcl-2 in the intervertebral disc. Results: There were significant differences in the levels of MMP-13, TIMP-1, Bax, and Bcl-2 between the experimental group and the blank group at 4 weeks after surgery ($P < 0.05$), as well as between the model group and the blank group at 4 and 8 weeks after surgery ($P < 0.05$). There were significant differences in the levels of Bax and Bcl-2 between the experimental group and the model group at 8 weeks after surgery ($P < 0.05$). The model group and the experimental group had significant changes in the expression of Bax and Bcl-2 from 4 to 8 weeks after surgery ($P < 0.05$). Conclusion: Icariin can be used to prevent and treat lumbar disc degeneration by downregulating the expression of MMP-13 and Bax and upregulating the expression of TIMP-1 and Bcl-2 in the degenerated intervertebral disc.

[Keywords] lumbar disc degeneration; icariin; rabbit; experimental study

基金项目:广东省中医药局科研项目(20181217)

第一作者:贺宪,男,医学博士,副主任医师,研究方向:脊柱外科学

腰椎间盘突出是腰腿痛的重要原因之一。近年来因腰椎间盘突出引起的腰腿痛患病率高达60%~80%,不仅给患者带来较大痛苦,同时也消耗了大量医疗资源^[1]。在腰椎间盘突出防治上,中医药有着巨大优势。研究显示,应用补肾中药制剂治疗椎间盘突出性疾病疗效较好^[2-3]。本研究拟从基质调节因子[基质金属蛋白酶13(MMP-13)、基质金属蛋白酶组织抑制因子1(TIMP-1)]和细胞凋亡相关因子(Bcl-2、Bax)探讨淫羊藿的主要化学成分淫羊藿苷对腰椎间盘突出退变的影响及其可能的作用机制,现将实验结果报告如下。

1 实验材料

1.1 动物 选取30只6个月龄的健康普通级新西兰大白兔,平均体质量(2.5 ± 0.5) kg,雌雄各半,由广东省实验动物中心提供,许可证号:SCXK(粤)2018-0112,合格证号:44411600005386。

1.2 药物 淫羊藿苷(中国药品生物制品检定所)。

1.3 主要仪器和试剂 1.5T磁共振扫描仪(德国Siemens公司)、Leica显微镜(德国Leica公司)、兔专用固定器(广州艺佳生物);鼠抗兔MMP-13和TIMP-1多克隆抗体(武汉博士德)、鼠抗兔Bcl-2和Bax抗体(北京博奥森)、PVDF膜(广州艺佳生物)、内参抗体GAPDH(杭州贤至生物)。

2 实验方法

2.1 动物分组与造模 按照随机数字表法将30只家兔随机分为空白组、模型组和实验组,每组各10只。适应性喂养1周后按照文献[4]中的方法进行椎间盘退变模型制备。将家兔用兔专用固定盒固定,戊巴比妥钠(0.2 ml/kg)(上海新亚药业有限公司,批准文号:国药准字H31020240)耳缘静脉注射麻醉。常规备皮、消毒、铺无菌巾,沿腰椎右侧后外侧肌间隙入路显露腰椎间盘(L_{4/5}),采用21G注射针头从纤维环后外侧平行终板方向刺入5 mm,回抽注射器,吸出部分髓核,连续操作6次,缝合切口。空白组只显露腰椎间盘,不作其他处理。术后予以青霉素肌内注射预防切口感染,连续5 d。术后4周各组随机抽取2只,麻醉下行磁共振检查以验证是否造模成功。造模成功的标准参照Pfarrmann退变分级标准^[5](MRI正中矢状面T2加权像上,椎间盘结构非均质,高度正常或降低,髓核与纤维环边界不清,信号降低)制定。

2.2 给药方法 造模成功后开始灌胃。实验组采用淫羊藿苷灌胃。根据Meeh-Rubner公式: $A(\text{体表面积 m}^2) = K(\text{系数}) \cdot K(\text{体质量})^{2/3} \cdot 10^{-4}$ 计算出所用淫羊藿苷的剂量为3 mg/kg·d,将淫羊藿苷用0.9%氯化钠注射液调配成8 ml/d。空白组和模型组用等量0.9%氯化钠注射液灌胃。连续4周。

2.3 观察指标 各组分别于术后4、8周随机取5只,采用

空气栓塞法处死,取出椎间盘组织,从正中矢状位将其分成两部分,一部分行免疫组化检测,另一部分置-80℃冰箱行蛋白质免疫印迹(Western blot)法检测。

2.3.1 免疫组化检测 MMP-13 和 TIMP-1 制作4 μm厚的切片,常规脱蜡;20 μg/ml蛋白酶K37℃消化15 min,PBS冲洗3次;3% H₂O₂-甲醇中25 min,PBS冲洗3次,加入一抗(鼠抗兔MMP-13和TIMP-1)37℃孵育30 min,PBS冲洗3次,加入二抗(生物素IgG)及链霉素-生物素-过氧化酶溶液30 min,PBS冲洗3次,SABC100 30 min,PBS冲洗3次,DAB显色,中性树胶封片。每张切片在高倍镜下取5个不同的视野成像,计算阳性细胞数,并采用Quantimet 970图像分析仪进行分析。

2.3.2 Western blot 检测 Bcl-2 和 Bax 取样本5 μl,加样于10%聚丙烯酰胺膜上,电泳90 min,转膜到PVDF膜上,5%脱脂奶粉封闭1 h。一抗(鼠抗兔Bcl-2和Bax抗体)孵育,4℃过夜,PBS洗膜20 min×3次。室温孵二抗(羊抗兔IgG/HRP)1 h,PBS洗膜10 min×3次。化学发光试剂显色。采用北京科创锐新生物凝胶图成像系统对条带进行分析。

2.4 统计学方法 采用SPSS 19.0统计软件包进行统计学分析,数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,3组间均数比较采用单因素方差分析,2组间均数比较采用t检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 各组术后4周磁共振检查结果 术后4周,各组随机抽取2只行腰椎磁共振检查,观察矢状面T2加权像。空白组腰间盘高度无明显变化,信号均匀明亮,结构清晰可分。模型组和实验组造模椎间盘高度有所下降,信号降低,部分呈“黑间盘”表现,与相邻正常椎间盘比较有明显差异,表明椎间盘退变模型复制成功。

3.2 各组不同时间节点 MMP-13、TIMP-1 平均吸光度值比较 实验组术后4周及模型组术后4周、术后8周MMP-13、TIMP-1表达水平与同时期空白组相比,实验组术后8周MMP-13、TIMP-1表达水平与模型组比较,模型组、实验组术后8周MMP-13、TIMP-1表达水平与术后4周比较,差异均有统计学意义(见表1)。MMP-13、TIMP-1阳性产物均定位于细胞浆,呈棕褐色或棕黄色。空白组:2个时间点阳性细胞数都比较少,呈散在分布。模型组:术后4周阳性细胞数比较多,术后8周阳性细胞数进一步增多。实验组:术后4周阳性细胞数也比较多,术后8周阳性细胞数明显减少(见图1)。阳性细胞定位于细胞质,呈棕黄色或棕褐色。空白组:2个时间点阳性细胞数都非常少,零星分布。模型组:术后4周阳性细胞数较多,术后8周阳性细胞数明显减少。实验组:术后4周阳性细胞数比较多,术后8周阳性细胞数进一步增多(见图2)。

表1 各组不同时间节点 MMP-13、TIMP-1 平均吸光度值比较($\bar{x} \pm s$, IOD/Area)

组别	只数	MMP-13		TIMP-1	
		术后4周	术后8周	术后4周	术后8周
空白组	10	0.023±0.003	0.028±0.005	0.013±0.002	0.014±0.001
模型组	10	0.060±0.003 ^a	0.087±0.004 ^{ac}	0.040±0.003 ^a	0.025±0.002 ^{ac}
实验组	10	0.062±0.004 ^a	0.043±0.002 ^{bc}	0.041±0.002 ^a	0.051±0.003 ^{bc}

注:与空白组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$;与本组术后4周比较,^c $P<0.05$ 。

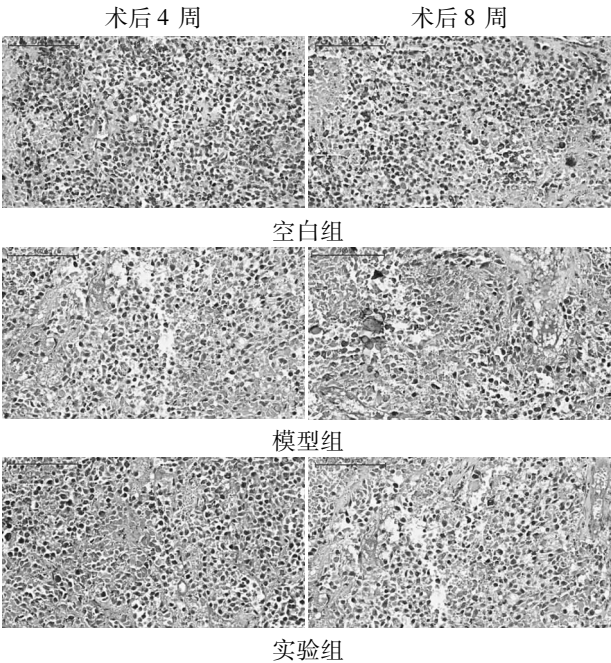


图1 各组 MMP-13 免疫组化染色图($\times 200$)

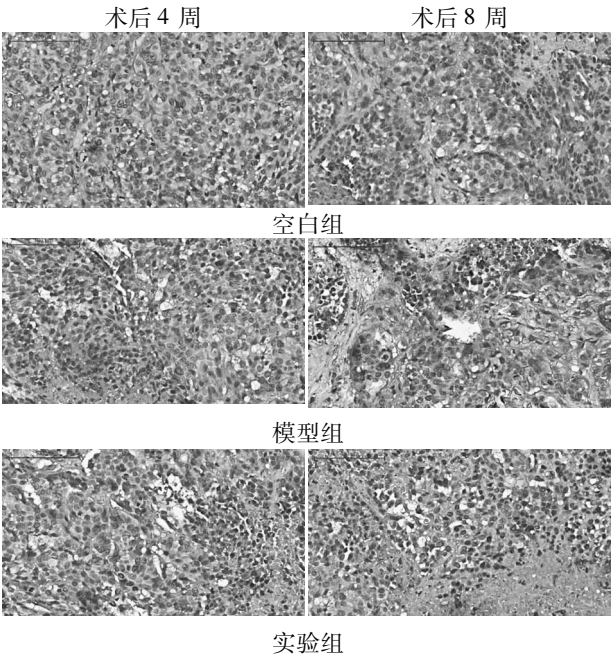


图2 各组 TIMP-1 免疫组化染色图($\times 200$)

3.3 各组不同时间节点 Bax、Bcl-2 相对表达量比较 实验组术后4周及模型组术后4周、术后8周 Bax、Bcl-2 表达水平与同时期空白组相比,实验组术后8周 Bax、Bcl-2 表达水平与模型组比较,模型组、实验组术后8周 Bax、Bcl-21 表达水平与术后4周比较,差异均有统计学意义(见表2)。空白组:两个时间点 Bax、Bcl-2 蛋白表达都较少。模型组:术后4周 Bax、Bcl-2 表达量都比较多,术后8周 Bax 表达量进一步增多,但 Bcl-2 表达量明显减少。实验组:术后4周 Bax、Bcl-2 表达量也比较多,术后8周 Bax 表达量明显减少,Bcl-2 表达量明显增多(见图3)。

表2 各组不同时间节点 Bax、Bcl-2 相对表达量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	Bax		Bcl-2	
		术后4周	术后8周	术后4周	术后8周
空白组	10	0.23±0.03	0.25±0.02	0.30±0.02	0.29±0.03
模型组	10	0.59±0.03 ^a	0.79±0.04 ^{ac}	0.69±0.02 ^a	0.11±0.02 ^{ac}
实验组	10	0.59±0.05 ^a	0.46±0.04 ^{bc}	0.69±0.03 ^a	0.96±0.02 ^{bc}

注:与空白组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$;与本组术后4周比较,^c $P<0.05$ 。

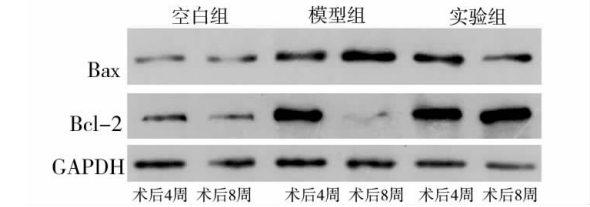


图3 各组 Bax、Bcl-2 蛋白表达电泳图

4 讨 论

淫羊藿为小檗科淫羊藿属多年生草本植物淫羊藿、柔毛淫羊藿、箭叶淫羊藿等的干燥地上部分。本品性温,味辛、甘,归肝、肾经,有补肝肾、强筋骨、祛风湿之功效。其主要有效单体成分为淫羊藿苷。现代药理学研究证实,淫羊藿苷具有调节免疫、抗衰老、抗肿瘤、降血压、调整内分泌等多种功效,是一种药用价值和保健作用极高的中药单体^[6]。本课题组前期研究发现,淫羊藿苷能增加骨性关节炎兔骨髓间充质干细胞的活性,Ⅱ型胶原的表达及葡萄糖氨基聚糖的含量,表明淫羊藿苷能明显促进骨性关节炎兔骨髓间充质干细胞的体外增殖及软骨定向分化^[7]。近年来,淫羊藿在防治椎间盘退变性疾病中应用十分频繁,疗效好,国内已有学者对于淫羊藿苷保护椎间盘退变的作用及其机制进行了少量的研究,如杜文喜等^[8]发现淫羊藿苷能够促进家兔椎间盘纤维细胞增殖,上调蛋白多糖表达和 S 期细胞比例,表明淫羊藿苷持续给药可以延缓椎间盘纤维环细胞退变。本研究通过动物实验,旨在观察淫羊藿苷对退变椎间盘中基质调节因子和细胞凋亡因子的影响,进而探讨其防治椎间盘退变性疾病的可能机制。

椎间盘退变主要表现为髓核细胞的减少和细胞外基质

的降解。研究发现,基质金属蛋白酶及其抑制因子为代表的基质调节因子在细胞外基质的合成与降解中起着十分重要的作用^[9]。MMPs是一组以 Zn^{2+} 、 Ca^{2+} 为辅助因子的蛋白水解酶,MMP-13属于MMPs家族中胶原酶的部分,主要降解Ⅱ型胶原。随着椎间盘退变的加重,MMP-13表达不断增强,尽管其机制还不是很清楚,但众多的研究结果^[4,10-11]表明MMP-13的表达与椎间盘退变关系十分密切。TIMP-1为基质金属蛋白酶组织抑制因子(TIMPS)重要成员之一,其主要作用是抗分解代谢。TIMPs可与MMPs催化中心的 Zn^{2+} 结合,封闭其催化活性,从而抑制MMPs对Ⅱ型胶原的降解。因此,MMP-13和TIMP-1两者保持着合适比例对维持椎间盘细胞外基质的正常代谢起着十分正常的作用^[11]。

此外,近年来的研究显示,髓核细胞凋亡增加也是椎间盘退变发生和发展的重要因素之一,促凋亡因子Bax和抗凋亡因子Bcl-2参与了髓核细胞凋亡的发生与发展过程^[12-14]。Gruber HE等^[12]发现在退变的椎间盘组织中,髓核细胞的凋亡率高达50%以上,其中Bax和Bcl-2参与了髓核细胞凋亡的发生与发展过程,而且两者比例决定着细胞凋亡的敏感性,对细胞接受信号刺激后存活与否起着关键性作用,因此抑制髓核细胞的凋亡和/或增加髓核细胞抗凋亡的能力将有助于椎间盘退变的防治。

本实验对实验兔椎间盘髓核进行多次抽吸,通过破坏椎间盘基质的降解与合成、细胞凋亡与抗凋亡之间的平衡来诱发椎间盘退变,成功复制出了椎间盘退变模型。本实验结果发现退变的椎间盘组织中MMP-13蛋白和Bax蛋白表达较正常椎间盘增高,而TIMP-1蛋白和Bcl-2蛋白表达减少,这一结果与其他研究结果高度相似^[10-11,15-16]。在实验组中,用淫羊藿苷灌胃治疗4周后发现退变的椎间盘组织中TIMP-1蛋白和Bcl-2蛋白表达明显增强,而MMP-13蛋白和Bax蛋白表达明显下降,表明淫羊藿苷可能通过下调退变椎间盘中MMP-13、Bax的表达和上调TIMP-1、Bcl-2的表达,起到有效防治椎间盘退变的作用。本研究可为临床上淫羊藿治疗椎间盘退变性性疾病提供科学的实验依据,但由于研究的深度和广度十分有限,淫羊藿苷延缓椎间盘退变、促进退变椎间盘组织的修复与再生的作用机理仍有待于进一步研究。

参考文献

- [1] NAGRALE AV, PATIL SP, GANDHI RA, et al. Effect of slump stretching versus lumbar mobilization with exercise in subjects with non-radicular low back pain: a randomized clinical trial[J]. J Man Manip Ther, 2012, 20(1): 35-42.
- [2] 杨公博, 朱立国, 何佩珊, 等. 药对淫羊藿-白芍治疗老年腰椎间盘突出症的临床研究[J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(6): 2710-2712.
- [3] 张秋媛, 李青, 张艺凡. 补肾通痹汤治疗腰椎间盘突出症的效果及对炎症因子的影响[J]. 中国医药导报, 2019, 16(15): 136-139.
- [4] 樊彦伟, 严冬雪, 招友. 富氢水对兔腰间盘退变的影响[J]. 山东大学学报(医学版), 2017, 55(3): 38-42.
- [5] PFIRRMANN CW, METZDORF A, ZANETTI M, et al. Magnetic resonance classification of lumbar intervertebral disc degeneration[J]. Spine, 2001, 26(17): 1873-1878.
- [6] 赵文静, 王历, 王芝兰, 等. 淫羊藿的药理作用及临床应用研究进展[J]. 中医药信息, 2016, 33(2): 105-108.
- [7] 贺宪, 孔畅, 曾巧, 等. 淫羊藿苷对骨性关节炎家兔 BMSCs 增殖及软骨定向分化影响的实验研究[J]. 湖南中医杂志, 2017, 33(3): 140-143.
- [8] 杜文喜, 谢健, 夏臣杰, 等. 淫羊藿苷对兔椎间盘纤维环细胞生物学特性的影响[J]. 山西中医学院学报, 2015, 16(3): 13-15.
- [9] SABERI A, SALEHI Z, NADERINABI B, et al. Genetic dimension of intervertebral disc degeneration: polymorphism of matrix metalloproteinase 1 and 3 in the north iranian population[J]. Turk Neurosurg, 2018, 28(3): 447-453.
- [10] LIU S, YANG SD, HUO XW, et al. 17 β -Estradiol inhibits intervertebral disc degeneration by down-regulating MMP-3 and up-regulating type II collagen in a rat model[J]. Artif Cells Nanomed Biotechnol, 2018, 46(2): 182-191.
- [11] 邹璟, 黄国付, 张琦, 等. “夹脊”电针对兔退变腰间盘组织中基质金属蛋白酶13和基质金属蛋白酶组织抑制因子1表达的影响[J]. 2014, 39(3): 192-196.
- [12] GRUBER HE, HANLEY EN. Analysis of aging and degeneration of the human intervertebral disc - comparison of surgical specimens with normal controls[J]. Spine, 1998, 23(7): 751-757.
- [13] MELROSE J, SHU C, YOUNG C, et al. Mechanical destabilization induced by controlled annular incision of the intervertebral disc dysregulates metalloproteinase expression and induces disc degeneration[J]. Spine, 2012, 37(1): 18-25.
- [14] CHEN Y, WU Y, SHI H, et al. Melatonin ameliorates intervertebral disc degeneration via the potential mechanisms of mitophagy induction and apoptosis inhibition[J]. J Cell Mol Med, 2019, 23(3): 2136-2148.
- [15] MAVROGONATOU E, ANGELOPOULOU MT, KLETSAS D. The catabolic effect of TNF- α on bovine nucleus pulposus intervertebral disc cells and the restraining role of glucosamine sulfate in the TNF- α -mediated up-regulation of MMP-3[J]. Orthop Res, 2014, 32(12): 1701-1707.
- [16] LI HR, CUI Q, DONG ZY, et al. Downregulation of miR-27b is involved in loss of type II collagen by directly targeting matrix metalloproteinase 13 (MMP13) in human intervertebral disc degeneration[J]. Spine, 2016, 41(3): 116-123.

(收稿日期: 2019-08-14)