

风寒湿刺激对家兔颈椎间盘 MMP-1、MMP-3 活性的影响

施杞¹ 王拥军¹ 吴士良² 葛京化¹ 杨阳¹ 刘梅¹ 周重建¹

(1. 上海中医药大学附属龙华医院, 上海 200032; 2. 苏州大学医学院, 江苏 苏州)

【摘要】 目的 在建立不同强度风寒湿痹证型颈椎病动物模型的基础上, 检测实验家兔颈椎间盘组织中胶原酶(MMP-1)、中性蛋白多糖酶(MMP-3)活性变化。方法 8 月龄雄性新西兰白兔 24 只, 随机分为正常对照组和轻度、中度、重度刺激组。采用刺激条件是温度 5 ± 0.5 , 湿度 100%, 风力 6 级, 按轻、中、重度刺激组的不同要求, 分别给予 32、64 和 128 小时的间断重复刺激, 每日刺激 4 小时。分别采用³H-型胶原蛋白法和免疫一步夹心法检测 MMP-1、MMP-3 活性。结果 各个模型组退变指数都有不同程度上升, 重度刺激组较正常对照组有统计学差异 ($P < 0.05$)。模型组与对照组比较, 中、重度刺激组 MMP-1 和 MMP-3 活性升高明显 ($P < 0.01$), 轻度刺激组变化不明显; 模型组之间比较, 中、重度刺激组 MMP-1、MMP-3 活性明显高于轻度刺激组 ($P < 0.01$)。结论 中、重度风寒湿刺激家兔颈椎间盘退变后使 MMP-1 和 MMP-3 活性升高, 加速椎间盘细胞外基质降解, 导致颈椎间盘退变。

【关键词】 颈椎病; 痹证; 胶原酶; 中性蛋白多糖酶

Effect on activity change of MMP-1, MMP-3 of cervical intervertebral discs of rabbits by irritancy of Wind-Cold-Dampness factors SHI Qi, WANG Yong-jun, WU Shi-liang, et al. Longhua Hospital, Shanghai University of TCM (Shanghai, 200032)

【Abstract】 Objective To establish cervical spondylosis animal models of Wind-Cold-Dampness arthralgia syndrome type. The morphologic state of the discs of the rabbits was observed with light microscope, and the activity of metalloproteinase-1, metalloproteinase-3 in the discs was assayed with biochemical. **Methods** Twenty-four 8 months old rabbits were randomly allocated into four groups of the control, light, medium and heavy irritancy groups with 6 animals in each. The basic condition of Wind-Cold-Dampness is 6 class force of wind, 5 ± 0.5 and 100% humidity. 32, 64, 128 hours of continuous irritancy were applied on light, medium and heavy irritancy group respectively. The daily period of irritancy was 4 hour. **Results** The degree index number of intervertebral discs degeneration was elevated in every irritancy group, and in the heavy irritancy group the increase was significantly higher ($P < 0.05$). MMP-1 and MMP-3 activities of cervical intervertebral discs in middle and heavy irritancy group, MMP-1 and MMP-3 activity in medium and heavy irritancy group were significantly higher than that in the control group respectively ($P < 0.01$). **Conclusion** MMP-1 and MMP-3 activity were increased by medium and heavy Wind-Cold-Dampness irritancy. Acceleration of degradation of extracellular matrix of cervical intervertebral discs resulted in degeneration of cervical intervertebral discs.

【Key Words】 Cervical syndrome; Arthralgia syndrome; Metalloproteinases; Metalloproteinases

本研究以中医痹证理论为指导, 模拟自然界风寒湿邪反复刺激家兔颈部, 观察椎间盘内金属蛋白酶在退变过程中的变化, 探讨风寒湿邪对颈椎间盘退变的影响。

1 材料与方

1.1 动物与分组 选择 8 月龄雄性新西兰白兔 24 只, 体重 2.5kg 左右。由上海中医药大学动物中心提供, 合格证号: “沪动合证字 152 号”。采用完全随机实验设计分为正常对照

组、轻度刺激组、中度刺激组和重度刺激组, 每组 6 只。

1.2 造模方法 各组家兔颈部剃除毛发, 正常对照组不作其他处理。各个风寒湿组置于 SHH-250GS 改进型人工气候造模箱内, 接通超声喷雾器, 调节造模箱内环境至刺激要求强度, 即: 风力 6 级, 温度 5 ± 0.5 , 湿度 100%, 按轻、中、重度刺激的不同要求, 分别给予 32、64 和 128 小时的间断重复刺激, 每日刺激 4 小时。各组均于刺激结束后次日耳静脉栓塞处死家兔, 采集颈部椎间盘组织待测。

1.3 颈部组织形态学观察 椎间盘 EDTA 液脱钙, 经脱水,

透明,包埋,连续 8μm 横断面切片,HE 染色。按 Miyamoto 分级标准将椎间盘分为 1~5 级,分别规定为 1、2、3、4、5 分。

1.4 金属蛋白酶活性的检测 取椎间盘匀浆上清液 100μl,以 0.2%³H-I 型胶原蛋白作为底物,混匀后孵浴 37 ×24h,10000rpm 高速离心取上清液加入液体闪烁剂,以 Beckman 液闪仪测 cpm,以每分钟 1mg 降解胶原蛋白底物为 1 个酶活性单位(IU/g)。MMP-3 采用酶免疫一步夹心法,按试剂盒使用说明操作。

1.5 统计方法 原始数据输入 SPSS 8.0 统计软件包,每组样本均数以“均数 ±标准差”(x̄ ±s)表示,显著性检验采用两样本均数比较的 t 检验。

2 结果

2.1 椎间盘退变形态学分级评分 表 1 示各个模型组退变指数都有不同程度上升,重度刺激组较正常对照组有统计学差异(P<0.05)。

表 1 大鼠颈椎间盘退变程度 Miyamoto 分级标准(x̄ ±s)

组别	数量	形态学分级评分
正常对照组	6	1.50 ±0.55
轻度组	6	2.50 ±0.55
中度组	6	2.83 ±0.98
重度组	6	3.19 ±0.75

注: 各组与正常对照组比较, P<0.05, P<0.01; 中度、重度与轻度比较, P<0.05, P<0.01。以下表格说明相同。

2.2 椎间盘组织 MMP-1、MMP-3 含量测定结果 表 2 示模型组与对照组比较,轻度刺激组变化不明显,中、重度 MMP-1 和 MMP-3 活性升高明显(P<0.01);模型组之间比较,中、重度刺激组 MMP-1、MMP-3 活性明显高于轻度刺激组(P<0.01),中、重度刺激组之间没有明显差异。

表 2 椎间盘组织 MMP-1、MMP-3 含量(x̄ ±s)

组别	数量	MMP-1(IU/g)	MMP-3(ng/ml)
正常对照组	6	11.87 ±1.52	5.70 ±0.54
轻度组	6	13.75 ±1.61	7.76 ±1.72
中度组	6	17.25 ±1.12	26.26 ±2.65
重度组	6	20.58 ±2.63	31.48 ±2.78

3 讨论

3.1 风寒湿痹证的现代研究 《内经·痹论篇》:“风寒湿三气杂至,合而为痹也,其风气盛者为行痹,寒气盛者为痛痹,湿气盛者为著痹”,这段话明确指出了痹证的病因是“风寒湿”。《诸病源候论》:“由体虚,腠理开,风邪在于筋故也。邪客关机,则使筋挛;邪客足太阳之络,令人肩背拘急也。”说明痹证的发生是由于体质虚弱,卫外不固,风寒之邪侵入太阳经络所致,这是颈椎病早期的主要病机和表现。近年来,临床流行病学证实风寒湿是导致颈椎病的重要因素^[1]。风寒湿常作为痹证的致病因素,已经引入风湿性关节炎、肩关节周围炎、颈椎病的发病机理研究中,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细胞因子 mRNA 表达的改变^[2~4]。本项研究进一步说明风寒湿刺激使金属蛋白酶活性增加,椎间盘细胞外基质不断降解,使

椎间盘不断退变。这些研究极大地丰富了祖国医学“痹证”理论。

3.2 椎间盘退变与基质金属蛋白酶的关系 颈椎间盘是一个渐进性退变的过程,通过风寒湿刺激,导致家兔颈部动静力系统失去平衡。退变的椎间盘内蛋白多糖含量逐渐下降,含水量明显降低,胶原类型发生转换。正常软骨终板主要包含 I 型胶原,随着退变的发生, I 型胶原表达逐渐增加, II 型胶原表达逐渐降低,此改变与椎间盘退变程度呈正相关。这些基质合成和破坏不平衡提示在椎间盘细胞外基质中存在着一个调控基质代谢的酶系统。不同种类的金蛋白酶其作用基质有不同的特性,根据基质特异性可分为胶原酶群(MMP-1、MMP-8、MMP-13)、明胶酶群(MMP-2、MMP-9)、基质溶解酶群(MMP-3、MMP-10)、膜型金属蛋白酶(MT-MMP)和其它类(MMP-7、MMP-11、MMP-12)。不同的金属蛋白酶不但作用基质有所不同,其分泌细胞也不尽一样,在椎间盘退变中起重要作用的主要有胶原酶(MMP-1)、中性蛋白多糖酶(MMP-3)。MMP-1 是一种重要的基质金属蛋白酶,它是唯一能够裂解可溶性胶原螺旋区肽键的酶。Ng 等^[5]的研究表明退变椎间盘中胶原酶活性明显升高。Sedowfia 等^[6]分析认为椎间盘内环境的改变和不断受到的机械作用使椎间盘细胞崩解,酶抑制物合成减少,溶酶体内的组织蛋白酶 B 释放,激活潜伏状态的胶原酶,使椎间盘胶原分解加速,导致椎间盘退变。中性蛋白多糖酶(MMP-3)能够分解椎间盘中的聚集性蛋白多糖,也可分解 I、II 及 III 型胶原及纤粘蛋白、层粘蛋白等。Liu 等^[7]发现,随着椎间盘老化或退变,髓核中 MMP-3 活性升高,使糖蛋白及连接蛋白裂解成为高度异质性分子。Kang 等^[8、9]的研究证实突出的颈、腰椎间盘中的 MMP-3 及明胶酶活性明显升高。Kanemoto 等^[10]通过免疫组化方法研究表明,椎间盘中 MMP-3 阳性细胞比率与磁共振证实的椎间盘退变程度呈正相关。本次实验结果发现,随着造模时间的延长和刺激程度的增加,椎间盘退变指数增加,椎间盘中的 MMP-1、MMP-3 都升高(P<0.01),中度、重度刺激组金属蛋白酶变化更加明显,初步说明风寒湿刺激可以加速椎间盘内胶原和蛋白多糖的降解,加快椎间盘的不断退变。本研究拓宽了中医痹证实验研究的范畴,认识到风寒湿导致的外在“肢体痹”可以转化为“脏腑痹”,由影响颈椎的动力平衡到静力平衡系统,说明风寒湿不是简单的物理因素,而且可以成为“痹证”发展的病理基础。

参考文献

- 王拥军,施杞,彭宝淦. 颈椎病危险因素病例对照研究. 中国中医骨伤科杂志,1997,5(6):12-14.
- 王绪辉,朱显华,施杞,等. 风寒湿性关节炎实验模型及病理学研究. 中医杂志,1990,31(7):50-53.
- 熊昌源,毕学薇,沈霖,等. 兔肩周炎的模型复制及相关生物化学指标测定. 中国骨伤,1996,9(4):11-13.
- 姜杰,常向明,施杞. 风寒湿对家兔颈椎间盘组织 IL-1 mRNA 表达的影响. 现代康复,2000,4(8):1190-1191.
- Ng SCS, Weiss JB, Quennel R, et al. Abnormal connective tissue degrading enzyme patterns in prolapsed intervertebral discs. Spine,1986, 11:695-701.
- Sedowfia KA, Tomlinson IW, Weiss JB, et al. Collagenolytic enzyme

systems in human intervertebral discs. Spine, 1982, 7: 213-222.

7 Liu J, Roughly PT, Mort JS. Identification of human intervertebral disc stromelysin and its involvement in matrix degeneration. J Orthop Res, 1991, 9(4): 568-575.

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. Spine, 1995, 20: 2373-2378.

9 Kang JD, Georgescu HI, McIntyre-Larkin L, et al. Herniated lumbar intervertebral discs spontaneously produce matrix metalloproteinases, nitric oxide, interleukin-6 and prostaglandin E₂. Spine, 1996, 21: 271-277.

10 Kanemoto M, Hukuda S, Komiya Y, et al. Immunohistochemical study of matrix metalloproteinase-3 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in human intervertebral discs. Spine, 1996, 21(1): 1-8.

(收稿: 2001-09-25 编辑: 李为农)

手法介绍 ·

牵抖复位加穴位注射治疗急性腰骶关节损伤

羊国民 张志士 孔德宏 郭德权 徐国平 何文山
(镇江市第四人民医院, 江苏 镇江 212001)

急性腰骶关节损伤是骨科常见病, 患病后十分痛苦。自 1990 年 10 月 ~ 1998 年 5 月, 我院采用牵抖复位加穴位注射治疗急性腰骶关节损伤 72 例, 优良率 80.5%, 效果显著, 叙述如下。

1 临床资料

1.1 一般资料 本组 72 例, 男 55 岁, 女 17 例; 年龄最大 65 岁, 最小 35 岁, 平均 44 岁。病程 2 小时 ~ 27 天不等。72 例患者均有不同程度的外伤史, 腰椎平片的共同特点是生理弧度消失, 其中 51 例有脊柱侧弯畸形, 腰骶关节不对称。38 例下腰段 CT 检查示腰椎间盘膨出, 黄韧带肥厚, 硬膜囊受压。

1.2 诊断依据 有弯腰和旋转活动等外伤史或有背部受凉病史。起病急骤, 腰骶部剧烈疼痛, 坐卧不安, 行走极度困难。背部或腰骶部肌肉痉挛, 无明显压痛区域或压痛点。直腿抬高腰骶部胀痛或向下肢放射痛。服止痛药物、针灸、推拿、理疗效果均不明显。X 线示腰椎生理弧度消失, 侧弯畸形, 腰骶关节不对称。

2 治疗方法

72 例中 11 例单纯用牵抖复位治疗, 61 例采用穴位注射加牵抖复位治疗。

2.1 牵抖复位 由三人完成, 两助手向上顶压腋部, 术者双手握紧踝部, 向下牵拉直至臀部悬空, 左右摇晃摆动 30 次。再令患者屈髋屈膝, 医者用左肘部按压双膝下, 右手握双踝作骨盆旋转活动, 时间 2 分钟, 再让患者俯卧, 双手按压腰骶部抖动数次, 嘱患者下床活动。治疗后大部分患者疼痛完全消除, 活动轻松自如。少数患者仍有轻微疼痛, 行走不便, 必要时 24 小时后再行第 2 次治疗, 术后休息 1 ~ 2 周。

2.2 穴位注射方法 患者取俯卧位, 选足太阳膀胱经双侧大肠俞, 上、中、次髎及阿是穴 3 ~ 4 个穴位, 药物用维生素 B₁₂ 500μg 加维生素 B₁ 200mg, 在选穴点先注射一小丘, 然后边推边进 3.0 ~ 3.5cm, 每个穴位注射 0.8 ~ 1.0ml。此时患者感注

射区明显酸胀, 让患者仰卧, 腰骶部垫一薄枕, 作牵抖复位治疗。

3 治疗结果

本组优 39 例, 下腰部疼痛及放射痛消失, 腰骶部活动自如, 生活自理, 一周恢复工作。良 19 例, 腰骶部疼痛及下肢放射痛明显好转, 活动轻度受限, 行走或站立时下腰部有轻度胀痛, 经对症处理, 休息 2 周恢复工作。好转 14 例, 腰骶部疼痛或下肢放射痛有所好转, 腰骶部可作一定范围活动, 仍需卧床休息继续治疗。优良率 80.5%。

4 讨论

腰骶关节急性损伤, 大多发生在 40 岁以上年龄阶段的人, 其主要原因是腰椎退变, 腰背肌虚弱。从解剖角度看, 腰骶部结构的特殊性是造成损伤的一个不容忽视的问题。腰骶关节由 S₁ 上关节突与 L₅ 下关节相合, 是一个不合套不完整关节, L₅ 关节突大而成弧形, S₁ 关节突较小, 因腰骶关节活动度较大, 相对比其他关节易发生退变松弛。当腰部姿势不当活动或负重, 外力作用使退变松弛的关节发生半脱位, 使 L₅ 神经穿越的骨纤维孔道变形缩小, 产生 L₅ 神经卡压。此外, 腰骶韧带是附着在 L₅ 横突前下缘与骶翼上后部的致密组织, 其内缘游离与 S₁ 上关节突围成骨纤维孔道, 因此腰骶关节一旦发生错动, L₅ 神经无退让余地, 进而受到卡压, 产生剧烈的腰骶部疼痛。腰背肌虚弱引起腰椎生物力学异常, 导致下腰段不稳是引起急性腰骶关节损伤一个重要因素, 正常情况下腰背肌收缩能够减少腰骶部剪应力, 保持腰骶部动态和静态平衡。腰背肌虚弱时, 腰椎前屈, 背肌张力减弱, 重心前移, 力臂持重点转移到腰骶部韧带和关节, 造成腰骶部关节或韧带损伤。治疗腰骶关节急性损伤, 穴位注射针刺足太阳膀胱经双侧大肠俞, 上、中、次髎及阿是穴有较好的镇痛作用, 牵抖旋转复位, 使腰背臀部肌肉放松, 使错动的腰骶关节回复, 从而达到解除 L₅ 神经在骨纤维孔道内的卡压, 使疼痛消除。

(收稿: 2001-11-20 编辑: 李为农)