

葛根汤和桂枝汤调节椎间盘组织 Fas、bcl2 蛋白表达的实验研究

刘梅¹, 王拥军¹, 施杞¹, 周重建¹, 杨阳¹, 侯宝兴², 莫文²

(1. 上海中医药大学脊柱病研究所, 上海 200032; 2. 上海中医药大学龙华医院伤骨科)

摘要 目的: 比较检测风寒湿痹证型颈椎病动物模型中颈椎间盘 Fas、bcl2 蛋白的表达; 检测葛根汤、桂枝汤对风寒湿型颈椎病家兔颈椎间盘组织中 Fas、bcl2 蛋白的调节作用。方法: 8 月龄雄性新西兰大白兔 24 只, 随机分为正常对照组、风寒湿刺激组、葛根汤治疗组、桂枝汤治疗组。风寒湿刺激组温度 6 ℃, 湿度 95%, 风力 6 级, 每日连续刺激 4 h, 间断重复刺激 128 h; 葛根汤、桂枝汤治疗组在风寒湿刺激组造模基础上服用。采用免疫组织化学 ABC 法检测椎间盘石蜡切片中 Fas、bcl2 蛋白的表达情况。结果: 风寒湿刺激组同正常对照组比较, Fas 表达均上调 ($P < 0.01$), 葛根汤降低 Fas 表达, 与风寒湿刺激组比较有显著性差异 ($P < 0.01$)。风寒湿刺激组同正常对照组比较, bcl2 表达均下降 ($P < 0.05 \sim 0.01$), 葛根汤上调 bcl2 表达, 但与风寒湿刺激组比较没有显著性差异 ($P > 0.05$), 桂枝汤对 bcl2 的调节作用不明显。结论: 风寒湿刺激组同正常组对照比较, Fas 表达均上调, bcl2 表达均下降, 葛根汤降低 Fas 表达, 上调 bcl2 表达, 发挥延缓椎间盘退变的作用, 桂枝汤调节上述细胞因子的作用低于葛根汤。

关键词 颈椎病; 基因表达; 葛根汤; 桂枝汤

Expression of the Fas receptor, bcl2 in the cervical intervertebral disc of the rabbit modified by the Guizhitang and Gegentang LIU Mei, WANG Yong-jun, SHI Qi, ZHOU Chong-jian, YANG Yang, HOU Baoxing, MUO Wen. Institute of Spondylopathy, Shanghai University of TCM (Shanghai, 200032, China)

Abstract Objective: To compare the expression of the Fas receptor, bcl2 in the degenerative intervertebral disc of the rabbit's cervical spondylosis model induced by Fenghanshi. To study the effects of the Guizhitang, Gegentang on the expression of the Fas receptor, bcl2. **Methods:** 24 male rabbits were divided randomly into normal group, Fenghanshi group, Gegentang group and Guizhitang group. Fenghanshi model was created in 6 ℃ temperature, 95% humidity, and 6 grade wind with 4 hours stimulation at each day for the total of 128 hours. Fenghanshi group was treated by Gegentang and Guizhitang. The expression of the Fas receptor, bcl2 in the degenerative disc was detected with the immunohistochemistry ABC. **Results:** The expression of the Fas receptor increase in the Fenghanshi model compare with the normal ($P < 0.01$). Gegentang could regulate down the expression of Fas receptor in the fenghanshi model ($P < 0.01$). On the other hand, the expression of the bcl2 decrease in the Fenghanshi model compared with the normal ($P < 0.05 \sim 0.01$). Gegentang could regulate up the expression of Fas receptor in the Fenghanshi model ($P > 0.01$). **Conclusion:** The expression of the Fas receptor can be regulated up and the bcl2 regulated down in the Fenghanshi model compared with the normal. Gegentang can regulate down the expression of the Fas receptor and regulate up the bcl2.

Key words Cervical spondylopathy; Gene expression; Gegen decoction; Guizhi decoction

颈椎间盘退变是导致颈椎病的重要原因。有研究发现, 退变颈椎间盘中存在细胞凋亡^[1]。我们既往研究发现风寒湿颈椎病模型中颈椎出现退变^[2]。

文献报道^[3], 桂枝汤和葛根汤可以下调颈椎病动物模型椎间盘磷脂酶 A₂(PLA₂) 的活性水平。本文在此基础上研究风寒湿能否增加椎间盘细胞的凋亡, 以及治疗颈椎病的中药方剂葛根汤和桂枝汤是否能改变退变椎间盘中的凋亡。

1 材料和方法

1.1 动物分组 8 月龄雄性新西兰大白兔 24 只, 体

基金项目: 国家自然科学基金(NO. 39970917)

国家中医药管理局基金(NO. 00-01LQ11)

通讯作者: 刘梅 Tel: 021-54232325 E-mail: LiuMei926@sina.com

重(2.5±0.2) kg,由上海中医药大学实验动物中心提供。将 24 只新西兰大白兔随机分为 4 组,即正常对照组、风寒湿刺激组、葛根汤组、桂枝汤组。

1.2 造模方法 正常对照组家兔颈部剃除毛发,不作其他处理。风寒湿刺激组家兔颈部剃除毛发,固定动物于人工气候造模箱内,调节造模箱内环境至刺激要求强度,温度 6℃,湿度 95%,风力 6 级。每日连续刺激 4 h,间断重复刺激 128 h。葛根汤组、桂枝汤组在风寒湿刺激组造模 1 个月 after 服用。

1.3 给药方法 葛根汤:葛根 12 g 麻黄 9 g 桂枝 6 g 芍药 6 g 炙甘草 6 g 生姜 9 g 大枣 3 枚;桂枝汤:桂枝 9 g 芍药 9 g 炙甘草 6 g 生姜 9 g 大枣 3 枚。按人剂量与兔子剂量之间的换算方法,换算成每公斤兔子所需的服药剂量。

1.4 主要仪器 LNG-783 台式快速离心浓缩干燥器(江苏太仓医疗器械厂),CMIAS-99B 型医学图像分析系统,Olympus BX-50 光学显微镜,MICRO-CEK ScanMaker 9600XL 扫描仪。

1.5 相关试剂 Fas 羊抗兔多克隆抗体,bcl-2 羊抗兔多克隆抗体(博士德公司),ABC-抗羊 IgG 浓缩型试剂盒,DAB(以上购自华美生物工程公司)。

1.6 免疫组化 ABC 法步骤 6 μm 石蜡切片经二甲苯脱蜡及梯度酒精入水,按试剂盒步骤操作,中性树脂封片。

1.7 结果判断 各组 6 个标本,采用 CMIAS-99B 型医学图像分析软件对免疫组化结果进行图像分析,每张切片上选择在 100 倍显微镜下,按左上、中上、右上、左下、中下、右下观察 6 个区域,调节系统去除本底后测量特异染色的平均积分光密度值。细胞有棕黄色颗粒者为免疫染色阳性。

1.8 统计方法 原始数据输入 SPSS 8.00 统计软件包,每组样本以“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,多组样本均数比较的精确方差分析。

2 结果

2.1 Fas、bcl-2 基因的蛋白表达观察 Fas 主要位于细胞浆内和细胞膜上,核内也有较明显表达,正常对照组椎间盘细胞内 Fas 表达较其低,风寒湿刺激组椎间盘细胞内 Fas 表达明显,葛根汤组椎间盘细胞内 Fas 表达比风寒湿刺激组浅,桂枝汤组椎间盘细胞内 Fas 表达与风寒湿刺激组相似。

bcl-2 表现为细胞浆内呈棕黄色颗粒或弥漫成片为阳性,正常对照组椎间盘细胞内 bcl-2 表达较其他

组明显,风寒湿刺激组椎间盘细胞内 bcl-2 表达变浅,葛根汤组椎间盘细胞内 bcl-2 表达比风寒湿刺激组色深,桂枝汤组椎间盘细胞内 bcl-2 表达与风寒湿刺激组相似。

2.2 Fas、bcl-2 积分光密度分析结果 见表 1。

表 1 凋亡相关基因蛋白 Fas、bcl-2 表达积分光密度分析结果(x̄±s)

Tab. 1 Optical density analysis of Fas, bcl-2 expression(x̄±s)

组别	n	Fas	bcl-2
正常对照组	6	1.673±0.834	6.288±1.612
风寒湿刺激组	6	5.380±1.241 ^{△△}	3.343±1.625 [△]
葛根汤组	6	2.455±1.145 ^{◇◇}	4.892±1.502
桂枝汤组	6	4.262±1.202 [△]	3.260±0.991 [△]

Fas 表达:风寒湿刺激组同正常对照组比较,Fas 表达上调,有显著性差异(P<0.01);葛根汤降低 Fas 表达,与风寒湿刺激组比较有显著性差异(P<0.01),桂枝汤组降低 Fas 表达不明显。

bcl-2 表达:风寒湿刺激组同正常对照组比较,bcl-2 表达下降,均有显著性差异(P<0.05~0.01);葛根汤上调 bcl-2 表达,但与风寒湿刺激组比较没有显著性差异(P>0.05),桂枝汤对 bcl-2 的调节作用不明显。

3 讨论

现代临床流行病学证实风寒湿是导致颈椎病的重要因素^[4]。施杞等^[5]建立了风寒湿型颈椎病的动物模型,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。葛根汤具通经活络、调理气血的功效,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。桂枝汤具发汗解表,调和营卫等功效,有研究表明^[6]桂枝汤具有一定的抗炎、抗过敏和免疫调节作用。周军等^[7]对桂枝汤防治大鼠佐剂型关节炎的作用机制进行研究,发现桂枝汤可明显抑制继发性关节炎关节液中 IL-1β、TNF-α 的活性。我们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。本文进一步从 Fas、bcl-2 等凋亡相关蛋白方面揭示葛根汤和桂枝汤治疗颈椎病的机制。

Fas 属 I 型膜蛋白,归为 TNF/NGF-R 家族。一般认为,Fas 分子中至少有 3 个与凋亡诱导功能密切相关的结构域:EXT、死亡结构域(death domain,DD)和调控区(regulatory region,RR)。DD 为 Fas 分

子存在于细胞内端的一个由 68 个氨基酸组成的结构域,一旦该区发生缺失、突变或者被显性负调分子阻截失活, Fas 的细胞凋亡诱导功能即随之丧失。 bcl 2 是抑制细胞凋亡的基因, bcl 2 家族蛋白在细胞底物的调节中发挥着重要作用^[8]。研究发现所有具有抗凋亡活性的 bcl 2 家族成员均具有 4 个保守的接合器元件 BH1、2、3、4, 其中 BH4 同抗凋亡活性密切相关。一般认为 bcl 2 抑制细胞凋亡的主要机制是通过抑制凋亡体即 CED- 3- CED- 4- CED- 9 复合体的形成来阻断 caspase 级联切割程序。

我们认为椎间盘退变后椎间盘细胞凋亡可能由于营养因子丧失, 引起一系列凋亡相关基因表达, 最终产生细胞凋亡的代谢和形态改变。由于 Fas 表达的上调诱导了椎间盘细胞的凋亡, bcl 2 表达下调, 使细胞凋亡的抑制作用减弱, 细胞凋亡加强。现代研究认为, 椎间盘细胞外基质的降解及基质与细胞黏附功能减退导致椎间盘退变, 导致输入细胞中的各种“存活信号”转导中断, 细胞失去信号刺激而凋亡^[9]。根据《伤寒杂论》中葛根汤和桂枝汤治疗颈项部风寒湿“痹证”的论述, 通过“方- 证- 效”的研究,

探讨葛根汤和桂枝汤治疗痹证型颈椎病的药效机制和两方剂之间的异同点, 进一步揭示了“痹证”在颈椎病中相关证候的本质和葛根汤、桂枝汤的作用机制, 丰富和发展了中医理论。

参考文献

- 1 Lotz JC, Colliou OK, Chin JR, et al. Compression induced degeneration of the intervertebral disc: An in vivo mouse model and finite element study. Spine, 1998, 23(23) : 493- 506.
- 2 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, 15(6) : 340- 342.
- 3 周军, 方素萍, 霍海如, 等. 葛根汤对退变颈椎间盘组织磷脂酶 A₂ 的影响. 中国中医骨伤科杂志, 2002, 10(4) : 12- 14.
- 4 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.
- 5 施杞. 实验性颈椎病动物模型的比较研究(会). 上海: 中国中医药学会骨伤科分会第 12 次全国学术交流会, 1998. P 6.
- 6 富杭育, 周爱香, 郭淑英, 等. 桂枝汤对白细胞介素 1、干扰素、肿瘤坏死因子所致发热的作用. 中药药理与临床, 1994, 10(3) : P 3.
- 7 周军, 方素萍, 齐云, 等. 桂枝汤对大鼠佐剂型关节炎的防治作用研究. 中药药理与临床, 2000, 16(6) : P 3.
- 8 Reed JC. Double identity for proteins of the bcl 2 family. Nature, 1997, 387: 77.
- 9 Clark EA, Brugg JS. Integrins and signal transduction pathways: the road taken. Science, 1995, 268(1) : 233- 239.

(收稿日期: 2003- 09- 17 本文编辑: 连智华)

北京市京华行科贸有限责任公司

生产研制产品报价单

京药管械经营许 20000737 号 京医械广备字(第) 200312099 号

一、牵引康复设备 (D)代表全电脑控制

1. JKF 系列多功能脊柱牵引康复床: 电脑程控, 腰椎、颈椎、全身静止、间歇牵引, 侧扳, 腰部热疗按摩。
 II型: 19800 元/台 IIIA 型: 26500 元/台 IIIA(D) 型: 38000 元/台
 IB 型: 8800 元/台 IB(D) 型: 19800 元/台 IC 型: 13000 元/台 IC(D) 型: 23900 元/台
2. FYC 系列俯卧式多功能腰椎治疗床: 屈膝俯卧位牵引、捶击、热疗一体化, 颈牵、下肢摇摆。
 II型: 9850 元/台 IIIA 电动型: 13900 元/台 IIIA(D) 型: 29000 元/台
3. JQY 系列多功能颈椎牵引治疗仪: 颈牵、电针、热疗一体化。
 I 型: 5800 元/台 I(B) 型: 12600 元/台 I(A) 型: 8800 元/台 IC 家用型: 520 元/台

二、RLY- A 系列 BH 型中频热场针灸按摩仪

该系列产品均为电脑程控, I 型产品具有人工针灸的各种针法及按摩手法, 手法逼真、柔和、深沉, 力度等同人工。中频波渗透性强, 可调至较深层次的穴位及病灶处。III型和VI型增设远红外线热疗、药物离子导入, 配有与人体各部位相吻合的药物模具。主治: 风湿病、腰椎间盘突出症、颈椎病、骨质增生、关节炎、急慢性扭拉伤、偏瘫肢体恢复等。

- I 型: 6000 元/台 III型: 9000 元/台(双功能型) VI型: 12000 元/台(双功能智能型)

三、其它设备

1. XN 心脑检查治疗仪 IIIA 型 2960 元/台
2. GZ 骨质增生药物电泳治疗仪 IIIA 型 3260 元/台
3. FD 风湿治疗仪 IIIA 型 2880 元/台
4. DJS 胆结石治疗仪 IIIA 型 3380 元/台

邮购办法: (1) 邮局, 银行汇款均可, 款到后立即发货。(2) 厂家销售, 所售产品保修壹年, 长期维修。运费保险费由我方负责。(3) 面向全国常年办理邮购, 欢迎来函来电索取资料。公司地址: 北京广安门外大街 305 号八区荣丰嘉园 8 号楼 2722 号 邮编: 100055 联系人: 徐照 电话: 010- 63275185, 63275186 值班电话: 010- 66031777 手机: 13901040602, 13910097637 银行汇款户名: 北京市京华行科贸有限责任公司 开户行: 北京建行玉泉路支行 帐号: 6510006032630017010