

# 参麦液对早期退变腰椎间盘组织中 NO、TGF-β<sub>1</sub> 表达的影响

林定坤, 郭玉海, 陈博来, 孔畅, 杨仁轩, 赵帅, 黄刚  
(广东省中医院骨科, 广东 广州 510120)

**摘要** 目的: 探讨参麦液在延缓椎间盘退变中的作用。方法: 对 6 例年轻腰椎间盘突出患者的椎间盘组织采取体外细胞培养, 随机分为 4 组: 对照组、1% 参麦液组、2.5% 参麦液组、5% 参麦液组, 用分光光度法测定各组培养上清液中 NO 含量与 NOS 活性, 并采用免疫组化的研究方法测定椎间盘细胞 TGFβ<sub>1</sub> 表达。结果: 对照组退变椎间盘组织产生的 NO 为 (144.1 ± 9.7) μmol/L, NOS 为 (6.2 ± 0.6) U/ml, 高于参麦液组, 有统计学差异。参麦液组中的椎间盘细胞呈不同程度的棕黄色, 对照组则呈阴性改变。结论: 参麦液可降低椎间盘内炎症因子的浓度, 促进椎间盘细胞 TGFβ<sub>1</sub> 表达, 有效减缓椎间盘组织的退变。

**关键词** 一氧化氮; 一氧化氮合酶; 转化生长因子β<sub>1</sub>; 细胞培养; 中成药

**Effect of Shenmai decoction(参麦液) on the expression of NO and TGFβ<sub>1</sub> of degenerative lumbar intervertebral disc tissue in earlier period** LIN Ding-kun, GUO Yuhai, CHEN Bor-lai, KONG Chang, YANG Ren-xuan, ZHAO Shuai, HUANG Gang. Department of Orthopaedics, TCM Hospital of Guangdong Province, Guangdong Guangzhou, 510120, China

**Abstract Objective:** To investigate the action of Shenmai liquid(参麦液) in deferring the degeneration of the human intervertebral discs. **Methods:** Six herniated lumbar discs of the youths were placed into cell culture and randomly distributed into four groups: the control group, the 1, 2.5 and 5 percent Shenmai decoction(参麦液) groups. The incubation supernatants were used to detect the nitric oxide(NO) and the nitric oxide synthase (NOS) concentration with the method of spectrophotography, and the transforming growth factor β<sub>1</sub>(TGF-β<sub>1</sub>) expression of the intervertebral disc cells were estimated with immunohistochemical method. **Results:** The contents of NO and NOS in the control group were marked higher than those in the Shenmai decoction(参麦液) groups. The intervertebral disc cells in the Shenmai decoction(参麦液) groups showed obviously brown, and the control were negative. **Conclusion:** Shenmai decoction(参麦液) can decrease the concentration of the inflammatory factors and promote the expression of TGFβ<sub>1</sub> of the human intervertebral discs, which can defer the degeneration of the human intervertebral discs.

**Key words** Nitric oxide; Nitric oxide synthase; Transforming growth factorβ<sub>1</sub>; Cell culture; Chinese patent drugs

随着年龄的增长, 椎间盘不可避免的发生退变, 使脊柱运动性降低, 并引发腰腿痛等疾患。因此, 采取有效的方法延缓椎间盘的退变是减少脊柱疾患, 从根本上防治腰腿痛的一种安全、高效的新途径。研究表明, NO、NOS 和 TGF-β<sub>1</sub> 在椎间盘退变中扮演重要角色。本研究采用体外培养早期退变椎间盘细胞的方法, 观察参麦液对椎间盘细胞 NO、NOS、

TGF-β<sub>1</sub> 表达的影响, 了解参麦液是否具有延缓椎间盘退变的作用。

## 1 材料与方法

**1.1 材料来源** 材料来自我科住院患者, 男 3 例, 女 3 例; 年龄 22~ 35 岁, 平均 26.8 岁。病史 2~ 6 个月, 平均 3.7 个月, 均为初次腰腿痛发作, 且 CT 或 MR 检查突出物较大, 明显压迫神经根, 其中取自 L<sub>3,4</sub> 2 例, L<sub>4,5</sub> 3 例, L<sub>5</sub>S<sub>1</sub> 1 例, 标本均在手术中切取, 突出腰椎间盘组织中含不同比例的髓核和纤维环。

**1.2 实验材料** RPMF1640 培养基, D-Hanks 液及 PBS 缓冲液(Sigma 公司), 胎牛血清(杭州四季青有限生物技术公司), NO、NOS 试剂盒(南京聚力生物工程研究所), TGF- $\beta_1$  免疫组化试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司), 10% 参麦注射液(登峰牌, 杭州正大青春宝药业有限公司), 培养瓶、培养皿、培养板(比利时, Orange)

### 1.3 实验方法

**1.3.1 椎间盘原代细胞培养** 将标本无菌条件下 PBS 反复冲洗 3~5 遍, 去除表面的血细胞, 用眼科剪刀将纤维环和髓核剪成约  $1\text{ mm}^3$  大小, 0.25% 胰蛋白酶、0.2% II 型胶原酶交替消化, D-Hanks 液冲洗离心后, 加入适量的 10% 胎牛血清培养液, 计数后将细胞以  $1\sim 2\times 10^5$  浓度接种于  $25\text{ cm}^2$  培养瓶, 置于  $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  的细胞培养箱中培养, 随机分为 4 组: 对照组, 1% 参麦液组, 2.5% 参麦液组, 5% 参麦液组, 隔日更换 10% 胎牛血清培养液, 细胞达到 60% 铺满瓶底后, 药物组中加入不同浓度的参麦液, 共同孵育 72 h, 收取上清液, 离心后  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  保存, 待测。

**1.3.2 椎间盘传代培养** 原代细胞约 90% 铺满瓶底时, 倾去培养液, D-Hanks 液反复冲洗 2 遍, 加入 5 ml 左右 0.25% 胰蛋白酶和 0.01% EDTA 混合液, 3~5 min 后于镜下见胞质回缩, 多数细胞悬浮后, 加入少许 10% 胎牛血清培养液终止消化, 毛细吸管轻轻吹打瓶壁细胞使之脱落, 经离心、冲洗、计数后制备成  $1\sim 2\times 10^5$  浓度的细胞悬液, 并接种于  $60\text{ cm}^2$  培养皿中, 培养皿内预先放置经多聚赖氨酸处理的盖玻片数枚, 分别按 4 个组别不同隔日换液, 待细胞达到 90% 融合后收集盖玻片, 按照 TGF- $\beta_1$  免疫组化试剂盒说明书进行免疫组化操作。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS 11.0 软件包进行统计学处理, GLM-General Factorial ANOVA 作均数的显著性检验。

## 2 结果

**2.1 椎间盘细胞培养上清液中 NO 含量与 NOS 活性** 如表 1 所示, 对照组 NO 含量明显高于实验组, 组间差异具有显著性意义( $F=45.4, P<0.01$ ); 对照组 NOS 活性也明显高于实验组, 组间差异具有显著性意义( $F=52.4, P<0.01$ )。

**2.2 免疫组化结果** 早期退变椎间盘原代细胞与传代细胞在形态学上无明显差异, 空白对照组细胞

棕黄色不明显或呈阴性, 实验组细胞胞浆均呈不同程度棕黄色改变, 以 5% 参麦液组效果最为明显, 阳性细胞以成纤维细胞、软骨细胞为主, 提示参麦液可促进退变软骨组织自身 TGF- $\beta_1$  的表达。

表 1 不同组别椎间盘细胞培养液中 NO、NOS 比较( $\bar{x}\pm s$ )  
Tab. 1 Comparison of NO and NOS in the intervertebral disc incubation supernatants among groups( $\bar{x}\pm s$ )

组别 group	n	NO( $\mu\text{mol/L}$ )	NOS(U/ml)
对照组 control group	6	144.1 $\pm$ 9.7	6.2 $\pm$ 0.6
1% 参麦液组 1% shenmai decoction group	6	129.6 $\pm$ 7.4	5.1 $\pm$ 0.3
2.5% 参麦液组 2.5% shenmai decoction group	6	110.7 $\pm$ 9.4	4.5 $\pm$ 0.4
5% 参麦液组 5% shenmai decoction group	6	92.5 $\pm$ 5.5	3.1 $\pm$ 0.5
F 值 F value		45.4	52.4

## 3 讨论

NO 可通过自分泌或旁分泌方式作用于椎间盘细胞, 改变其生物学行为, 产生病理效应, 从而参与了椎间盘的退变。退变椎间盘细胞可产生多种炎症介质, 引起椎间盘突出; 椎间盘突出后又反过来刺激炎症介质的释放, 两者互为因果, 椎间盘的退变刺激了 NO 的产生, NO 的产生又加剧了椎间盘的退变<sup>[1]</sup>。我们对不同组别腰椎间盘细胞培养上清液中 NO 含量与 NOS 活性测定表明参麦液对体外培养椎间盘细胞炎症介质的释放具有抑制作用。

国内有报道 TGF- $\beta_1$  可按照剂量依赖方式正向调节椎间盘 I 型胶原的表达, 与椎间盘退变过程中的纤维化密切相关<sup>[2]</sup>。随着年龄的增长, 退变椎间盘细胞的 TGF- $\beta_1$  表达率下降, 远远低于正常椎间盘组织, 髓核内蛋白多糖含量和细胞成分也减少, 导致椎间盘的生物力学特性丧失。我们将参麦液按不同浓度加入培养液中, 发现实验组细胞胞浆呈不同程度的棕黄色, 对照组则棕黄色不明显或呈阴性, 提示参麦液可促进细胞 TGF- $\beta_1$  的表达。

### 参考文献

- Kang JD, Racie MS, McIntyre LA, et al. Toward a biochemical understanding of human intervertebral disc degeneration and herniation. Spine, 1997, 22(10): 1065-1073.
- 陈岩, 胡有谷, 齐宗华, 等. 转化生长因子 $\beta$ 与椎间盘细胞 I 型胶原基因调控的关系. 中国矫形外科杂志, 2000, 7(2): 151-153.

(收稿日期: 2004-06-08 本文编辑: 连智华)