

## • 基础研究 •

# 益气化癆方对椎间盘软骨细胞凋亡相关因子的作用

孙鹏<sup>1</sup>, 王拥军<sup>2</sup>, 施杞<sup>2</sup>, 周泉<sup>2</sup>, 刘梅<sup>2</sup>, 周重建<sup>2</sup>, 钱雪华<sup>2</sup>

(1. 上海中医药大学针灸推拿学院, 上海 200032; 2. 上海中医药大学脊柱病研究所暨上海中医药大学附属龙华医院)

**【摘要】** 目的: 探讨益气化癆方对椎间盘软骨细胞凋亡状态下 Bax、Bcl-2 及 Caspase-8 表达的调控作用。方法: 清洁级雄性 1 月龄 SD 大鼠 20 只, 酶消化法获取椎间盘软骨细胞, 用抗 Fas 抗体诱导其发生凋亡, 通过益气化癆方及其拆方益气方、化癆方药理血清干预, 免疫组化法 (SP) 检测分析大鼠椎间盘软骨细胞不同状态下 Bax、Bcl-2 及 Caspase-8 的表达。结果: 相对正常组, 凋亡模型组的 Bax 和 Caspase-8 表达明显, 而 Bcl-2 轻度表达, 有显著差异 ( $P < 0.01$ )。益气化癆方、益气方和化癆方均能降低椎间盘软骨细胞的 Bax、Caspase-8 的表达, 而上调 Bcl-2 的表达, 3 种中药组与诱导凋亡组相比有显著差异 ( $P < 0.01$ )。结论: 中药益气化癆方、益气方和化癆方都可以调控凋亡的大鼠椎间盘软骨细胞内 Bax、Bcl-2、Caspase-8 的表达, 其治疗颈椎病的机制与其对凋亡相关因子的调控有关。

**【关键词】** 椎间盘; 软骨细胞; 细胞凋亡; 益气化癆方

**Effects of Yiqi-Huayu recipe (益气化癆方) and its decomposed formulas on apoptosis related factors of discus intervertebrale chondrocytes in rats** SUN Peng<sup>\*</sup>, WANG Yong-jun, SHI Qi, ZHOU Quan, LIU Mei, ZHOU Chong-jian, QIAN Xue-hua. <sup>\*</sup> Acupuncture and Moxibustion College of Shanghai University of TCM, Shanghai 200032, China

**ABSTRACT Objective** To study the effects of Yiqi-Huayu recipe (益气化癆方) and its decomposed formulas mediated on expressions of Bcl-2, Bax and Caspase-8 of apoptotic discus intervertebrale chondrocytes in rats. **Methods** Immunohistochemical and integral optical density analytic methods were used to observe the effects of Yiqi-Huayu recipe, Yiqi recipe, Huayu recipe mediated sera on the expressions of Bcl-2, Bax and Caspase-8 of apoptotic discus intervertebrale chondrocytes in rats induced by anti-Fas antibody. **Results** As compared with apoptosis group, Bcl-2 expression was higher, Bax and Caspase-8 expressions were lower in Yiqi-Huayu treated, Yiqi treated, Huayu-treated ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** Yiqi-Huayu recipe and its decomposed formulas can delay degeneration of the cervical intervertebral disc, which may be due to its action in regulating the expressions of Bcl-2, Bax and Caspase-8.

**Key words** Intervertebral disc; Chondrocytes; Apoptosis; Yiqi-Huayu recipe

椎间盘的病理退变在颈椎病的发生发展过程中起重要作用, 研究发现凋亡相关因子在椎间盘的退变中起重要作用<sup>[1]</sup>。本研究将从椎间盘软骨细胞水平探讨益气化癆方<sup>[2]</sup>、益气方和化癆方对椎间盘凋亡细胞 Bax、Bcl-2 及半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶-8 (Caspase-8) 表达的作用。

## 1 材料与方

### 1.1 材料

**1.1.1 试剂与药品** DMEM 培养液 (Gibco), II 型胶原酶 (Sigma), 胰蛋白酶 (上海细胞所), 小牛血清 (杭州四季青生物工程材料有限公司), 抗生素 (青霉素 100 U/m<sup>3</sup> 链霉素 100 μg/m<sup>3</sup>) 由上海市瑞金医院伤骨科研究所提供, 鼠抗人 Bcl-2 基因蛋白单克隆抗体、兔抗人 Bax 基因蛋白单克隆抗体 (DAKO), 兔抗人 Caspase-8 基因蛋白单克隆抗体 (Santa Cruz), SP 试剂盒 (DAKO)。

益气化癆方由黄芪、党参、川芎、丹参等组成; 益气方由黄芪、党参等组成, 化癆方由川芎、丹参等组成。以上药物制取大鼠含药血清备用, 由上海中医药大学脊柱病研究所提供。

基金项目: 1. 国家自然科学基金项目 (编号: 30171170& 30572398);

2. 国家自然科学基金重点项目 (编号: 0330700);

3. 上海市科技“启明星”跟踪计划 (编号: 05QM1412);

4. 上海市医学重点学科建设项目 (编号: 05111027);

5. 上海市重点学科建设项目 (编号: T0303)

**1.1.2 实验仪器** 细胞培养箱 (Heraeus B-5060 EK-CO<sub>2</sub>), 倒置相差显微镜 (Olympus 日本), 超净工作室 (上海净化设备厂 CSB-1), CM IAS-99B型医学图像分析系统 (北航图像技术研发中心), Olympus BX-50光学显微镜。

**1.1.3 实验动物** 清洁级雄性 1月龄 SD大鼠共 20只, 体重(50±10)g, 由上海中医药大学动物中心提供。实验中所用细胞均取自以上大鼠。

## 1.2 方法

**1.2.1 大鼠椎间盘软骨细胞分离培养** 大鼠经氯胺酮腹腔注射过度麻醉致死; 取出整个颈椎, 4倍解剖显微镜下沿上下椎骨缘取下椎间盘; 分离软骨终板、髓核和纤维环。Hanks液清洗椎间盘软骨终板组织 3次, 剪碎至 1 mm<sup>3</sup> 大小, 加 0.25% 胰蛋白酶溶液, 37℃ 下搅拌消化 15 min 离心机内, 1 000 r/min 离心 5 min, 去上清液; 加入 0.02% II型胶原酶 4~5 ml 37℃ 下搅拌消化 30 min 然后过滤离心, 1 000 r/min 离心 5 min, 去上清液; 加入含 20% 小牛血清的培养液后清洗离心 (1 000 r/min 离心 5 min), 去上清液, 重复 3次; 吹打细胞, 镜下计数, 按 2×10<sup>4</sup> /ml 密度种植于培养瓶 (Uncle, 丹麦) 中, 加入适量含 20% 小牛血清的 DEME 培养液; 将培养瓶置于 5% CO<sub>2</sub>, 37℃ 细胞培养箱中培养, 倒置显微镜观察细胞贴壁及生长情况。每 2~3 d 更换培养液。

原代细胞形成单层后, 进行传代, 用 0.25% 胰蛋白酶消化, 收获细胞制成细胞悬液, 按 2×10<sup>4</sup> /ml 密度接种于培养瓶中。

**1.2.2 诱导凋亡** 将第 3代细胞以 2×10<sup>4</sup> /ml 密度接种于内置玻片的六孔培养板和培养瓶内, 细胞贴壁融合生长至 80% 后, 换无血清培养液, 孵育 24 h 去上清液后随机分为: 对照组, 加入 20% 小牛血清培养液; 实验组, 加入抗 Fas 抗体 (DAKO, 由 1% 小牛血清培养液配置成终浓度为 0.25 μg/ml), 继续培养 12 h。

**1.2.3 分组及干预** 根据不同干预方法, 将细胞随机分为 5组, 依次为正常对照组、凋亡诱导组、中药血清干预组 (益气化痰方、益气方、化痰方)。其中, 正常对照组为正常细胞加 20% 小牛血清的 DEME 培养液, 凋亡诱导组为诱导凋亡细胞, 中药血清干预组为 DEME 培养液配制 20% 相应血清加入诱导凋亡细胞, 以上细胞培养 48 h 后, 依次进行下面处理。

**1.2.4 Bax Bcl2 Caspase-8 免疫组化** ①原代 80% 融合的软骨终板细胞或经过诱导处理后的细胞薄片, PBS 洗涤, 4% 多聚甲醛固定 20 min, PBS 洗涤 3 min×3 ②0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 室温 20 min, PBS 洗涤 3 min×3 ③0.1% Triton×100, 20 min, PBS 洗涤 3 min×3 ④加入一抗, 4℃ 冰箱过夜, PBS 洗涤 3 min×3 ⑤加入二抗为生物素化羊抗兔 IgG 或生物素化兔抗鼠 IgG (1:400), 37℃, 30 min, PBS 洗涤 3 min×3 ⑥ Streptavidin-HRP 1:400 37℃, 40 min, PBS 洗涤 3 min×3 ⑦0.05% DAB 加 0.03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 12 min ⑧苏木精衬染, 常规封片。以不加一抗为阴性对照。阳性结果判断: 染色阳性表达为棕黄色, 主要存在于细胞浆内, 核膜、胞浆同时着色亦为阳性; 单纯核膜着色而无胞浆着色或胞核、胞浆均无着色为阴性。

**1.2.5 图像分析** 取免疫组化染色薄片, 100倍显微镜下, 按上、下和左、中、右观察 5个视野, CM IAS-99B型医学图像

系统分析, 用平均灰度值和平均光密度对阳性信号进行量化。灰度值表示阳性细胞表达强度, 灰度值越小表达信号越强; 平均光密度则反之。

**1.2.6 统计学分析** 应用 SPSS 统计软件包 10.0 进行两组间析因设计方差分析。

## 2 结果

正常对照组的 Bax 表达, 平均光密度低, 说明正常组的 Bax 轻度表达; 凋亡模型组的 Bax 的平均光密度高, 说明 Bax 表达明显, 明显高于对照组, 有显著差异 ( $P < 0.01$ )。正常对照组的 Bcl2 表达, 平均光密度高, 说明正常组的 Bcl2 高度表达; 凋亡模型组的 Bcl2 平均光密度低, 说明 Bcl2 表达不明显, 与对照组相比有显著差异 ( $P < 0.01$ )。正常对照组的 Caspase-8 表达, 平均光密度低, 说明正常组的 Caspase-8 轻度表达; 凋亡模型组的 Caspase-8 平均光密度高, 说明 Caspase-8 表达明显, 明显高于对照组, 有显著差异 ( $P < 0.01$ ); 三种中药药理血清分别对 Bax 和 Caspase-8 呈明显的下调作用, 而对 Bcl2 呈明显的上调作用, 有显著差异 ( $P < 0.01$ )。具体结果见表 1。

表 1 中药作用后 Bcl2, Bax, Caspase-8 平均光密度结果 ( $\bar{x} \pm s$ )

Tab 1 Expression of Bcl2, Bax, Caspase 8 treated by three TCM sera ( $\bar{x} \pm s$ )

Groups	Caspase 8	Bcl2	Bax
Normal	0.14±0.01 <sup>△△</sup>	0.42±0.05 <sup>△△</sup>	0.13±0.02 <sup>△△</sup>
Apoptosis	0.20±0.02	0.16±0.02	0.31±0.03
Yiqi-Huayu	0.15±0.01 <sup>△△</sup>	0.23±0.03 <sup>△△</sup>	0.17±0.01 <sup>△△</sup>
Yiqi	0.17±0.01 <sup>△△</sup>	0.21±0.02 <sup>△△</sup>	0.15±0.02 <sup>△△</sup>
Huayu	0.18±0.02 <sup>△△</sup>	0.21±0.01 <sup>△△</sup>	0.19±0.01 <sup>△△</sup>

注: 与凋亡组比较, <sup>△△</sup> $P < 0.01$

Note As compared with the apoptosis group <sup>△△</sup> $P < 0.01$

益气方和化痰方之间的关系: 通过析因设计方差分析观察, 中药对 Bax 的作用中, 益气方和化痰方有交互作用; 中药对 Caspase-8 的作用中, 益气方和化痰方无交互作用; 中药对 Bcl2 的作用中, 益气方和化痰方无交互作用。

## 3 讨论

随着年龄和退变, 椎间盘细胞数量逐渐减少, Guber 等<sup>[3]</sup> 研究认为这种现象与过度凋亡有关。Park 等<sup>[4]</sup> 报道椎间盘 Fas 的表达程度与椎间盘退变之间存在某种关联。Bcl2 蛋白家族线粒体途径是细胞凋亡的重要途径之一, Bcl2 可以抑制细胞凋亡, 与其拮抗物 Bax 蛋白的消长平衡, 是决定细胞是否发生凋亡的重要调节点之一。Caspase 是目前公认的与凋亡关系最为密切的一类蛋白酶, 既往研究发现, 诱导凋亡后的椎间盘软骨细胞 Bcl2 表达显著降低, 而 Bax 和 Caspase-8 表达显著升高<sup>[1]</sup>。

中药抗凋亡研究较多, 周泉等<sup>[5]</sup> 研究发现益气化痰方可以抑制椎间盘纤维环细胞的凋亡指数, 调控凋亡相关因子, 如 Bcl2, Bax 及 Caspase-8。本研究在细胞学水平上, 使用免疫组化技术观察 3 种中药血清 (益气化痰方、益气方和化痰方) 对凋亡软骨细胞 Bax, Bcl2 和 Caspase-8 表达的影响。3 种中

药药理血清分别对 Bax和 Caspase-8呈明显的下调作用,而对 Bcl-2呈明显的上调作用。

益气化癥方由益气方和化癥方组成。为了探讨拆方中益气中药和化癥中药的相互作用,使用析因设计方差分析进一步研究,发现益气方和化癥方对 Bax具有协同作用,而对 Bcl-2和 Caspase-8则没有协同作用。即在抑制 Bax的表达方面,益气化癥方作用强于拆方;而在对 Bcl-2和 Caspase-8的调控作用上,益气方和化癥方,以及益气化癥方分别具有各自不同的作用。以上研究说明,益气化癥方及其拆方对凋亡软骨细胞的调节作用呈现多层次交互作用。

本研究从椎间盘软骨终板软骨细胞的层面上,研究益气化癥方的作用靶点,提示益气化癥方对退变椎间盘的抑制作用,可能是通过对椎间盘软骨细胞凋亡的调控产生;而中药的

深层调控机制尚需进一步研究探讨。

#### 参考文献

- 1 王拥军,孙鹏,刘梅,等.大鼠椎间盘软骨细胞中 Bax, Bcl-2及 Caspase-8的表达.中国脊柱脊髓杂志,2004,14(8):480-484
- 2 孙鹏,施杞,王拥军.中药对退变颈椎间盘的作用机理研究概述.上海中医药杂志,2003,37(4):51-54
- 3 Gruber HE, Hanley EN Jr. Recent advances in disc cell biology. Spine, 2003, 28(2):186-193.
- 4 Park JB, Lee K, Park SJ, et al. Mitochondrial involvement in Fas-mediated apoptosis of human lumbar disc cells. J Bone Joint Surg (Am), 2005, 87(6):1338-1342.
- 5 周泉,王拥军,施杞,等.益气化癥方和拆方对大鼠纤维环细胞凋亡相关因子的影响.中西医结合学报,2005,3(6):466-469.

(收稿日期:2006-05-16 本文编辑:李为农)

## • 诊治失误 •

# 股骨骨折后膝关节僵硬经按摩引起再骨折 3例

## Refracture caused by massage on stiffness of knee joint after femoral fracture

马遂麟,张闻

MA Sui-lin, ZHANG Wen

关键词 股骨骨折; 按摩 **Key words** Femoral fractures; Massage

推拿疗法(古称按摩)若运用不当易造成骨折及血管神经损伤等严重后果,我院2002-2004年收治3例因推拿引起股骨骨折的病例,现报道如下。

### 1 临床资料

患者1,女,42岁。右股骨中下段骨折10个月,右膝关节僵硬,活动度 $10^{\circ}$ 。在外院按摩后于2002年6月来我院门诊拍X线片显示右股骨中下段斜形骨折。

患者2,男,37岁。左股骨中段骨折术后1年,钢板取出后左膝关节僵硬,活动度为 $15^{\circ}$ 。在外院按摩后,2003年9月来我院门诊拍X线片显示左股骨中段粉碎性骨折。

患者3,女,38岁。右股骨中段骨折术后1年,钢板取出后右膝关节僵硬,活动度为 $20^{\circ}$ 。在外院按摩后,于2004年10月来我院门诊拍X线片显示右股骨中段粉碎性骨折。

本组患者因骨折后,膝关节僵硬,均在外院施行重度推拿按摩,并强迫活动,硬扳膝关节(一手托住窝部,另一手下压小腿),突听大腿响声后,手法停止,大腿痛甚,畸形,有摩擦感,X线示有骨折。

### 2 治疗方法与结果

第1例右股骨斜形骨折,行右下股骨结节骨牵引加小夹板外固定,1年后骨折愈合,又行右膝关节松解术,术后3个月,右膝关节活动正常,上班工作。另2例行股骨干切开复位钢板内固定加植骨术,待骨折愈合后行膝关节松解术,并嘱患

者常推拿伤肢髌骨,轻微逐步活动关节等。据Schatzker评定标准<sup>[1]</sup>:本组结果优(膝关节活动范围 $>130^{\circ}$ ,活动后无明显不适)1例;可(膝关节活动范围 $90^{\circ}\sim 110^{\circ}$ ,活动后轻度不适及肿胀)2例。经按摩手法治疗2个月后膝关节活动基本恢复正常。

### 3 讨论

本组3例均为骨折后,因长期膝关节不活动或伸直位固定而致膝关节粘连、僵硬。时间1~2年,活动度 $10^{\circ}\sim 20^{\circ}$ ,其活动范围小。从X线片及手术切开中证实骨折愈合欠佳,骨干中有多个螺丝孔,骨质不够坚实。因医者在手法前对骨骼的愈合及关节的粘连程度不十分了解,给予重度推拿按摩,盲目施行暴力、猛力,并以膝关节为支点、小腿为杠杆硬扳,引起膝关节剧痛,使大腿肌肉对抗性强烈收缩,导致股骨干骨折。

推拿按摩是中医伤科的一种很好的治疗方法,医生应掌握好要领、禁忌证与适应证,根据病案的不同,进行辨证施治。再者可根据病情和膝关节粘连程度,行手术切开松解。若医者只求快速解除关节粘连,即会发生上述并发症及其意想不到的严重后果。

#### 参考文献

- 1 陈启亮,陈思禄.股骨远端骨折的内固定治疗.中国骨伤,2005,18(5):304-305.

(收稿日期:2006-03-07 本文编辑:连智华)