

· 基础研究 ·

田胡止痛颗粒对大鼠椎间盘磷脂酶 A₂ 及神经根炎性细胞的影响翁凤泉¹, 康乐¹, 黄经光¹, 陈日荣¹, 周美容¹, 翁志辉¹, 欧阳厚淦²

(1. 江门市五邑中医院, 广东 江门 529031; 2. 湖南中医药大学)

【摘要】 目的: 应用自体椎间盘移植的动物模型探讨田胡止痛颗粒治疗腰椎间盘突出症的相关机制。方法: 对 72 只大鼠随机分为假手术组 (SG)、模型对照组 (CG)、芬必得组 (FG)、田胡止痛颗粒组 (TG), 每组 18 只, 采用自体尾椎椎间盘植入 L₅ 神经根背侧的方法制备大鼠腰椎间盘突出模型。各组大鼠于术后 1 d 开始灌胃, SG 和 CG 用蒸馏水, FG 和 TG 分别用芬必得和田胡止痛颗粒的悬浊液, 并分别于术后的 7、14、28 d 处死动物, 检测原移植椎间盘 (SG 取残留尾椎的椎间盘组织) 磷脂酶 A₂ 的活性, 对 L₅ 神经根进行病理切片检查和炎性细胞计数。结果: TG 椎间盘磷脂酶 A₂ 的活性在用药 7 d 后与 CG 相比有统计学差异 ($P < 0.05$), 14 及 28 d 后比较有统计学差异 ($P < 0.01$)。TG 神经根的炎性细胞浸润数目在各时间段亦少于 CG ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 神经根的损伤情况明显轻于 CG。结论: 田胡止痛颗粒能够降低大鼠突出椎间盘磷脂酶 A₂ 的活性, 减轻神经根的炎性反应, 促进神经功能的恢复。

【关键词】 腰椎; 椎间盘移位; 中药药理学; 磷脂酶 A

Effects of Tianhu acesodyne grains (田胡止痛颗粒) on the activity of phospholipase A₂ of intervertebral disc and inflammatory cells of nerve root of rats WENG Feng-quan^{*}, KANG Le, HUANG Jing-guang, CHEN Ri-rong, ZHOU Mei-rong, WENG Zhi-hui, OUYANG Hou-gan^{*} Wuyi TCM Hospital of Jiangmen City, Jiangmen 529031, Guangdong, China

ABSTRACT Objective To explore the correlative mechanism of Tianhu acesodyne grains (田胡止痛颗粒) for the treatment of lumbar disc herniation (LDH) by using an animal model which suffered from grafting operation of self intervertebral disc. **Methods** Seventy-two rats were divided into 4 groups randomly: sham surgery groups (SG), model contrast group (CG), Fenbid group (FG), Tianhu acesodyne grains (田胡止痛颗粒) (TG). There were 18 rats in each group. The coccygeal intervertebral disc was transplanted to the dorsal part of the right 5th lumbar nerve root of rats to establish the non-compressive model of LDH. After one day, the rats in SG and CG were fed with distilled water while rats in FG were fed with Fenbid and rats in TG were fed with suspending liquid of Tianhu acesodyne grains (田胡止痛颗粒). Each 6 rats of every group were chosen randomly and killed at 7th, 14th, 28th days after operation. The transplanted intervertebral disc and the remnant coccygeal disc of SG were taken out and stored under 0 °C. The activities of PLA₂ were tested through method of trace acid titration. At the same time, the right nerve roots of 5th lumbar were observed by pathological section and the inflammatory cells were counted under optical microscope. **Results** At 7th day after the drugs were given to the rats, the activities of PLA₂ had significant difference in rats between TG and CG ($P < 0.05$), and much significant difference ($P < 0.01$) at 14th and 28th days. The amount of inflammatory cells of TG was obviously smaller than that of CG ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and the damage of nerve roots of TG was much lighter than that of CG. **Conclusion** Tianhu acesodyne grains (田胡止痛颗粒) can decrease the activity of PLA₂ in prolapsed intervertebral disc of rats, alleviate the inflammatory reaction of nerve root and promote the function recovery.

Key words Lumbar vertebrae; Intervertebral disk displacement; Pharmacology (TCD); Phospholipases A

Zhongguo Gushang/China J Orthop & Trauma 2007, 20(3): 176-179 www.zggszz.com

有关腰椎间盘突出症 (PLID) 引起腰腿痛的发病机制虽未完全明了, 但突出髓核中磷脂酶 A₂ (PLA₂) 活性的异常升高已为广大学者所认同。因此, 本实验通过采用大鼠自体尾椎椎间盘移植法制造 PLID 模型, 对椎间盘 PLA₂ 的活性及神

经根炎性细胞进行研究, 旨在探讨田胡止痛颗粒治疗 PLID 及 PLID 致腰腿痛的相关机制。

1 资料与方法

1.1 材料 ①实验动物: 4 月龄 SPF 级 SD 雄性大鼠 72 只, 体重在 250~350 g 之间, 由广州中医药大学动物实验中心提供。动物合格证号为粤监证字 2005A031SCXK (粤) 2003-0001。②实验药品: 田胡止痛颗粒 (江门市五邑中医院制剂室

基金项目: 广东省中医药管理局课题 (编号: 1050123)

通讯作者: 翁凤泉 Tel 0750-3509838 E-mail kangletige@yahoo.com.cn

制备,批号为0406021),由田七、延胡索、丹参、半枫荷、川杜仲、川续断、怀牛膝、石楠藤、络石藤等组成。芬必得缓释胶囊(中美天津史克制药有限公司,批号为05050150)。③实验试剂:卵磷脂(国药集团化学试剂有限公司,进口分装),甘氨酸(广东达濠精细化学品公司新宁化工厂,批号为20041208),硼酸(天津北联精细化学品开发有限公司,批号为20050606),脱氧胆酸钠(中国医药上海化学试剂公司,批号为F20031018),氯化钙,EDTA(乙二胺四乙酸)(广州化学试剂厂,批号为20031101-1),盐酸和氢氧化钠自备,青霉素钠盐(山东鲁抗医药股份有限公司,批号为B050303),戊巴比妥钠(国药集团化学试剂有限公司,进口分装)。④主要仪器: TG328-B光学分析天平(湘仪天平仪器厂),HH系列恒温水浴锅(江苏金坛中大仪器厂),手持式组织匀浆机(德国KA),PXJ1B型PH计(江苏江分电分析仪器有限公司),手术显微镜(中国镇江)。

1.2 动物实验方法和取材

1.2.1 动物分组 按随机和体重均衡原则把72只大鼠分为假手术组(SG)、模型对照组(CG)、田胡止痛颗粒组(TG)、芬必得组(FG),每组18只,每组再分为3小组(6只/组),分笼饲养(6只/笼)。

1.2.2 造模方法 实验前取1只大鼠经X线片示双侧髂嵴最高点平L₅下缘。大鼠经腹腔注射戊巴比妥钠(45 mg/kg)后,剪短术区被毛,用8%硫化钠溶液脱毛,在无菌条件下,各组动物均距肛门1 cm处截断尾骨,采用背正中切口(以L_{5,6}间隙为中心,长约3 cm),切开皮肤、浅筋膜,钝性分离右侧棘突的椎旁肌,暴露L₅上下关节突及横突,SG组仅咬除L_{5,6}右侧部分椎板、L₅的下关节突、L₆的上关节突,在手术显微镜下暴露并确认L₅神经根及其背根节。余组根据相关文献^[1]取出大鼠自体尾椎的椎间盘组织轻轻放于右侧L₅神经根背侧,注意不造成机械性压迫。在切断鼠尾之前用橡皮条结扎切口近端以减轻出血,切除后以1-0号丝线缝合尾椎断端。用庆大霉素加生理盐水冲洗切口内部,1-0号丝线逐层缝合。术后单笼喂养12 h后放回原笼,并连续3 d各组大鼠均腹腔注射青霉素钠盐20万U/kg每天1次,以预防切口感染。

1.2.3 给药 各组均于术后第1天开始灌胃给药,每天1次。SG、CG用蒸馏水10 ml·kg⁻¹,TG用田胡止痛颗粒混悬液10 ml·kg⁻¹(每10 ml蒸馏水含田胡止痛颗粒15.1 g),FG用芬必得混悬液10 ml·kg⁻¹(每10 ml蒸馏水含芬必得50.4 mg)。以上剂量均按人鼠体表面积换算(Meeh-Rubner氏公式)关系确定,相当于临床等效剂量。

1.2.4 取材 分别在术后第7、14、28天在各组中随机选出1小组大鼠(共6只),处死后切开原L₅的手术部位,取出原植入的椎间盘组织(假手术组则取残留尾椎的椎间盘组织),0℃下保存待测。同时取出原植入椎间盘下面的L₅神经根组织(长约0.5 cm),10%甲醛固定,4℃下保存。

1.3 检测项目与方法

1.3.1 椎间盘PLA₂活性的检测(微量酸滴定法) ①底物缓冲液的配制:称取卵磷脂(PC)1.5594 g甘氨酸3.7535 g硼酸0.1104 g脱氧胆酸钠1.2499 g加蒸馏水500 ml摇匀溶解(其浓度分别为3.75、0.1、3.57及6.03 mmol/L)。使用

前60℃水浴30 min用1M的NaOH调pH至8.52。稀释液除不含PC外,其他与底物缓冲液相同。②组织匀浆制备:椎间盘组织剪碎,每克组织加稀释液4 ml加入组织匀浆机,并将匀浆机底部放入冰水中,以4000 r/min速度匀浆5 min,匀浆至细胞完全破碎为止。然后吸取上层清液,再次离心10 min再吸取上层清液,4℃下保存。③活性测定:样本在60℃水浴30 min后冷却,置4℃冰箱备用。取2只25 ml烧杯分别作为对照管和滴定管,前者依次加入底物缓冲液8 ml EDTA(15 mmol/L)1.1 ml样本0.4 ml后者用CaCl₂(0.5 mmol/L)0.2 ml取代EDTA,余同前者。然后两管均在37℃水浴60 min再于对照管中加入CaCl₂(0.5 mmol/L)0.2 ml滴定管中加入EDTA(15 mmol/L)1.1 ml混匀后用高灵敏度pH计(PXJ1B型数字式离子计,pH灵敏度为±0.001)分别测定两管pH值,用新标定的稀盐酸(0.004 mol/L)将对照管的pH滴定至测定管的pH值,以所消耗的盐酸计算测定管中酶活力。1个PLA₂活性单位规定为在37℃,每分钟每毫升样本反应消耗1 mmol盐酸(1U=1 mmol·mL⁻¹·min⁻¹),即PLA₂(U)=N×V×10⁶×2.5/t N、V分别为所消耗盐酸的体积(ml)和浓度(mol/L),t为反应时间。

1.3.2 神经根组织学观察 分别在术后第7、14、28天取右侧L₅神经根,送病理室进行局部炎性细胞计数(计数400倍光镜下1个视野的炎性细胞数目)和组织学观察。

1.4 统计学处理 使用SPSS 13.0统计软件,每组样本以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间应用单因素4水平方差分析中的LSD法或Dummett's T3法(方差不齐)进行两两比较。

2 结果

在实验及观察期间,各实验组大鼠一般情况良好,造模时无明显的神经根、马尾、硬脊膜等损伤,术后1~2 h清醒,无术侧下肢瘫痪,在休息及行走时无任何运动功能障碍,在站立及休息时亦未表现出喜欢用某一肢体来承重的现象。但经疼痛相关行为观察^[2],除假手术组外的各组大鼠均出现明显的机械刺激过敏反应,说明造模的有效性。大鼠背部和尾部的切口均在5~10 d愈合,食量正常,无明显感染征象及死亡。

2.1 椎间盘PLA₂活性变化(表1) 予大鼠灌胃后第7天时,4组进行方差分析, $F=222.02$, $P<0.01$,组间有统计学差异。CG、FG、TG均出现PLA₂活性的明显升高,与SG相比均有统计学差异($P=0.001$, $P<0.01$)。FG、TG均低于CG($P=0.005$, $P<0.01$),但TG高于FG($P=0.003$, $P<0.01$);14、28 d时($F=149.56$, 296.36 , $P<0.01$),CG、FG、TG仍高于SG($P=0.001$, $P<0.01$),CG高于其他3组($P=0.001$, $P<0.01$),TG与FG则无统计学差异($P=0.621$, 0.952 , $P>0.05$),说明7 d时田胡止痛颗粒对PLA₂活性开始有抑制作用,但不如芬必得明显,14、28 d时则无统计学差异,CG组的PLA₂活性一直处于较高水平,SG组则处于较低水平。

2.2 神经根的组织学观察 上表示神经根炎性细胞浸润数目的变化规律基本与PLA₂的活性一致。假手术组术后神经根亦有少量炎性细胞浸润(1~9个/HP),显示出手术操作对神经根还是有一定的影响,但大鼠造模后神经根的炎性细胞浸润现象较假手术组明显增强,说明椎间盘组织(含髓核)对神经根的炎性刺激确实存在,予大鼠芬必得和田胡止痛颗粒

表 1 各组大鼠不同时间段 PLA₂ 活性、炎性细胞浸润数目比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Comparisons of activity of PLA₂ and amount of inflammatory cells of rats in all groups during different time ($\bar{x} \pm s$)

组别 Groups	大鼠数 Rats	PLA ₂ 活性 (U) Activity of PLA ₂ (U)			炎性细胞数 (个数/HP) Amount of inflammatory cells (number/HP)		
		7天 7 d	14天 14 d	28天 28 d	7天 7 d	14天 14 d	28天 28 d
		SG	6	3.968 ± 0.186	4.120 ± 0.414	3.917 ± 0.258	7.50 ± 1.049
CG	6	9.845 ± 0.218 ^{△△}	8.903 ± 0.389 ^{△△△}	9.131 ± 0.262 ^{△△△}	18.67 ± 2.066 ^{△△}	16.17 ± 1.169 ^{△△}	15.50 ± 1.049 ^{△△}
FG	6	5.797 ± 0.261 ^{***△△}	5.301 ± 0.295 ^{***△△}	4.818 ± 0.265 ^{***△△}	9.67 ± 2.160 ^{**}	9.33 ± 1.033 ^{***△△}	5.00 ± 1.414 ^{**}
TG	6	8.293 ± 0.765 ^{***△△☆☆}	5.452 ± 0.347 ^{***△△}	4.973 ± 0.484 ^{***△△}	14.67 ± 1.211 ^{***△△☆☆}	10.33 ± 1.751 ^{***△△}	5.50 ± 1.049 ^{***△△}

注: SG=假手术组, CG=模型组, FG=芬必得组, TG=田胡止痛颗粒组。IU = 1nmol · m⁻¹ · min⁻¹。与 CG比较, *P < 0.05, **P < 0.01, 与 SG比较, [△]P < 0.05, ^{△△}P < 0.01; 与 FG比较, [☆]P < 0.05, ^{☆☆}P < 0.01

Note: SG = sham surgery group, CG = model contrast group, FG = Fenbid group, TG = Tianhu acesodyne grains. IU = 1nmol · m⁻¹ · min⁻¹. Compared with CG, *P < 0.05, **P < 0.01. Compared with SG, [△]P < 0.05, ^{△△}P < 0.01. Compared with FG, [☆]P < 0.05, ^{☆☆}P < 0.01.

后, 炎性细胞浸润明显减轻。神经根组织学观察显示: 假手术组 (图 1), 神经纤维束排列整齐, 无明显水肿, 雪旺细胞胞浆饱满, 少量炎性细胞浸润。模型组 (图 2), 有明显的神经根水肿, 髓鞘碎裂, 神经纤维排列明显紊乱、不连续, 雪旺细胞自溶、软化。田胡止痛颗粒组 (图 3), 神经纤维束排列较整齐, 轻度水肿, 纤维束保存完整。芬必得组 (图 4), 神经纤维比较明显水肿, 纤维束排列轻度紊乱, 纤维束保存完整。

3 讨论

目前, 众多研究表明 PLID 患者的髓核和神经根附近的组织标本含有活性异常升高的 PLA₂^[3], 以及其他炎性介质的存在, 如肿瘤坏死因子 (TNF)、白细胞介素-1 (IL-1)、IL-6 前列腺素 E2 (PGE2)、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子。而 PLA₂ 是一种脂肪分解酶, 专门分解糖磷脂的 2-酰基位, 成为水解性磷

脂和自由脂肪酸, 是局部组织炎症的启动物质, 可在炎症部位细胞膜水解花生四烯酸 (AA), 产生 PGE、白三烯 (LT) 等一系列具有强烈致炎和致痛作用的 AA 代谢产物。同时, PLA₂ 激活可能介导 TNF 对外周中性粒细胞 (PMN) 的趋化和粘附的调节作用, 使用 PLA₂ 阻断剂可能阻断 TNF 对 PMN 的激活, 减轻炎症反应造成的神经根损伤。

中医药治疗 PLID 在临床上应用非常广泛, 且疗效明显。本研究证实了高活性的 PLA₂ 伴随着显著的神经根炎性反应, 从而推测两者具有一定的正相关性。而且, 相关研究表明, PLID 患者直腿抬高试验与炎性细胞出现率有显著相关性^[4]。试验结果显示田胡止痛颗粒和芬必得均能降低 PLA₂ 活性, 但芬必得较田胡止痛颗粒起效快。因此, 可以认为, 田胡止痛颗粒能够降低椎间盘 PLA₂ 活性并减轻神经根炎性反

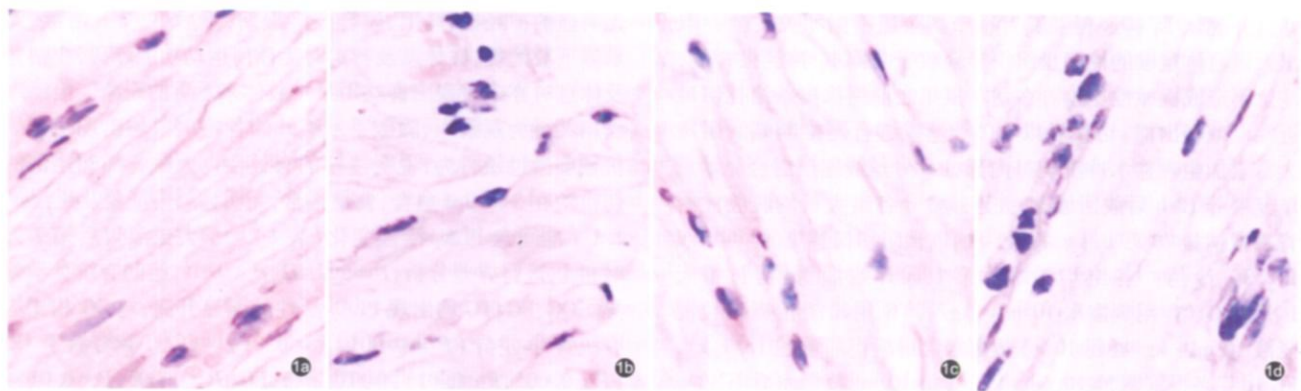


图 1 术后 28d 各组大鼠神经根病理切片 1a. 假手术组: 神经纤维束排列整齐, 无明显水肿, 雪旺细胞胞浆饱满, 少量炎性细胞浸润 1b. 模型组: 有明显的神经根水肿, 髓鞘碎裂, 神经纤维排列明显紊乱、不连续, 雪旺细胞自溶、软化 1c. 田胡止痛颗粒组: 神经纤维束排列较整齐, 轻度水肿, 纤维束保存完整 1d. 芬必得组: 神经纤维比较明显水肿, 纤维束排列轻度紊乱, 纤维束保存完整

Fig.1 The pathological sections of nerve roots of rats in all groups at the 28th day 1a. SG: nerve fiber bundle lined up in order, no obvious hydropsia, Schwann cells were filled with endochylema, and few inflammatory cells infiltrate 1b. CG: obvious nerve root hydropsia, medullary sheath broken, nerve fiber bundle lined up obviously in disorder and discontinuity, aqctocytolysis and bletting of Schwann cell

1c. TG: nerve fiber bundle lined up in order, moderate hydropsia, and fiber bundle maintained integrity 1d. FG: obvious hydropsia of nerve fiber, nerve fiber bundle lined up in disorder slightly and maintained integrity

应,这可能是其治疗 PLD的作用机制之一。

参考文献

- 1 贺石生,侯铁胜,单晓巍,等.硬膜外移植自体髓核大鼠神经根结构和功能的影响.第二军医大学学报,2001,22(5):435.
- 2 贺石生,侯铁胜,单晓巍,等.米帕林对硬膜外移植自体髓核大鼠疼痛相关行为的影响.第二军医大学学报,2000,21(6):558.

- 3 Saal JS. The role of inflammation in lumbar pain. Spine 1995, 20(16): 1821-1827.
 - 4 胡海清,金捷.炎性细胞在各型突出椎间盘中出现率的比较以及与直腿抬高试验的相关性.中国现代医学杂志,2004,14(22):45-48.
- (收稿日期:2006-06-16 本文编辑:连智华)

• 手法介绍 •

仰卧提牵屈肘法治疗伸直型肱骨髁上骨折

施翔,宁伟宏,王敏

(长兴县中医院骨伤科,浙江 长兴 313100)

关键词 肱骨骨折;骨折,闭合性;手法;骨科

Manipulative method for the treatment of humeral supracondylar fracture of straighten type with supine position of elbow flexion and traction SHI Xiang, NING Wei-hong, WANG Min. Department of Orthopaedics and Traumatology, the TCM Hospital of Changxing Changxing 313100 Zhejiang, China

Key words Humeral fractures; Fractures, closed; Manipulation, orthopedic

Zhongguo Gushang / China J Orthop & Trauma 2007, 20(3): 179 www.zggzsz.com

2002年2月-2004年9月,应用仰卧提牵屈肘法治疗伸直型肱骨髁上骨折28例,效果良好,现报告如下。

1 临床资料

本组28例,男19例,女9例;年龄6~14岁。就诊时间30 min~24 h,右侧13例,左侧15例,均为闭合性骨折,不伴有桡神经损伤。

2 治疗方法

2.1 手法复位 患者仰卧于治疗床上,患肩前屈90°,一助手扶住患肩部,另一助手立于对侧踏脚凳,在垂直于床面的轴面上,向上提牵患肢1~2 min,纠正重叠与嵌插后,术者双手掌按住骨折断端的尺桡侧向中间挤压,纠正侧方移位。然后术者改用双手握住骨折断端,拇指放在鹰嘴部,对侧助手在提牵的同时,逐步屈肘至90°,术者拇指用力向前方推,余指抓住骨折断端不动,用捺正手法纠正向前成角。

2.2 固定方法 常规前臂中立位屈肘固定,若复位前X线片提示肱骨髁上骨折内侧骨皮质粉碎,估计复位后不够稳定,前臂旋前位固定。予上臂、前臂及手部缠上棉纸,先放肘后石膏托,后放肘前石膏托,固定范围近端至腋下,远端至手部。术后严密观察患肢手指的感觉、活动情况,及时调整石膏托松紧度,3~4周后解除外固定。

2.3 功能疗法 解除外固定后,均给予手法按摩、理疗、中药熏蒸及配合主动功能锻炼,以促进患肢功能恢复。

3 治疗结果

本组病例全部得到随访,时间6个月~1.5年,骨折于术后3~4周均达临床愈合标准。依据疗效评定标准^[1]:优,肘关节活动正常,携带角正常,23例;良,肘关节活动正常,携带

角减少5°~10°,4例;可,肘关节活动较正常减少10°,肘内翻<10°,1例;差,肘关节活动度减少>10°,肘内翻>10°,0例。本组优良率96.5%。

4 讨论

4.1 优点 ①一次复位成功率高。复位时侧方和成角移位纠正满意,术者与助手均在垂直于治疗床的截面上操作,对牵引的方向容易判断,不会因配合不当而造成侧方或成角移位。②复位后固定方便,不易发生成角移位。仰卧提牵屈肘法在被动屈肘超过90°时,其自身重力作用,可使肱三头肌及肱骨后侧骨膜紧张,使骨折断端更加稳定。

4.2 注意事项 ①前臂中立位或旋前位屈肘固定。以对于尺侧骨皮质较粉碎的患者,强调旋前位固定。在此体位下固定,因有效持续的肘外翻应力存在,而达到最大限度的预防肘内翻产生的可能^[2]。②1周内对患肢严密观察,及时调整石膏托的松紧度,防止固定太紧出现缺血性肌挛缩,避免肿胀消退而引起骨折断端的再移位。③切忌骨折整复手法粗暴及反复多次整复。④注意骨折后期的功能锻炼及药物治疗。采用中药外洗、理疗、手法按摩患肢等方法,对防止肘关节周围组织的粘连、肌腱的挛缩有一定的好处,并能促进功能恢复。

参考文献

- 1 金明胜,辜志昌.折顶复位旋后位固定治疗严重移位的小儿肱骨髁上骨折.中国骨伤,2002,15(1):56.
- 2 李国帅,朱晓东.屈肘旋前位整复肱骨髁上骨折.中国骨伤,2004,17(9):550.

(收稿日期:2006-06-16 本文编辑:连智华)