

## · 基础研究 ·

## 黄芪对破裂型椎间盘突出重吸收动物模型的影响

姜宏<sup>1</sup>, 刘锦涛<sup>2</sup>, 惠 ■ 华<sup>1</sup>, 王拥军<sup>2</sup>

(1. 苏州市中医医院, 江苏 苏州 215003; 2. 上海中医药大学脊柱病研究所)

**【摘要】目的:** 研究破裂型椎间盘突出重吸收过程中免疫反应的作用机制, 以及黄芪干预重吸收过程的作用机制。**方法:** 将 28 只雄性 SD 大鼠, 随机分为正常组、模型组、黄芪注射液治疗组和胸腺肽治疗组等 4 组。动物 10 d 后处死, 取髓核组织, 进行 HE 染色观察形态结构变化, 流式细胞仪检测 T、B 细胞含量。**结果:** 相对于模型组, 治疗组大鼠髓核组织的形态结构发生明显变化, T、B 细胞含量比例明显大于模型组。**结论:** 突出髓核组织能够引发自身免疫反应, 黄芪对破裂型椎间盘突出的重吸收有一定促进作用, 可能是通过增强自身免疫而发挥作用的。

**【关键词】** 椎间盘移位; 模型, 动物; 自身免疫; 中草药

**An experimental study on the influence of radix astragali on the resorption of ruptured disc herniation** JIANG Hong, LIU Jin-tao\*, HUI Reng-hua, WANG Yong-jun. \*The Institute of Spinal Disease, the Shanghai University of TCM, 201203, Shanghai, China

**ABSTRACT Objective:** To investigate the possible mechanism of immune response in the resorption of the ruptured intervertebral disc herniation, and the possible mechanism of radix astragali on the resorption of the ruptured disc herniation. **Methods:** Twenty-eight male SD (Sprague-dawley) rats were chosen. The rats were randomly divided into 4 groups: the control group, model group, the group treated with radix astragali injection and the group treated with thymic peptide. The rats were killed and discs were harvested 10 days after treatment. Flow cytometry and HE staining were used for analysis of cells and tissue. **Results:** Compared with the control group, the proportion of activated T cells (CD4+ and CD8+) and B cells were significantly higher in the two drug-treatment groups. **Conclusion:** Herniated nucleus pulposus attracts activated T and B cells and triggered an immune response. Radix astragali could strengthen the autoimmune response.

**Key words** Intervertebral disk displacement; Models, animal; Autoimmunity; Drugs, Chinese herbal

Zhongguo Gushang/China J Orthop & Trauma, 2009, 22(3):205-207 www.zggszz.com

基金项目: 江苏省中医药局资助项目(编号: 200523)

通讯作者: 刘锦涛 Tel: 0512-65225929 E-mail: liujintao0533@yahoo.com.cn

愈合。

## 参考文献

- [1] 任可, 张春才, 康庆林, 等. 天鹅记忆接骨器对实验性骨折愈合时骨桥素和骨连接素 mRNA 的影响. 第二军医大学学报, 2005, 26(9): 1018-1021.
- [2] Isales CM, McDonald JM. Future developments in therapy. Ann N Y Acad Sci, 2007, 1117: 258-263.
- [3] Yang X, Ricciardi BF, Hernandez-Soria A, et al. Callus mineralization and maturation are delayed during fracture healing in interleukin-6 knockout mice. Bone, 2007, 41(6): 928-936.
- [4] 张春才, 禹宝庆, 许硕贵, 等. 应用生理性成骨力值概念治疗骨折与骨不连——兼论 MO 现象与有效固定. 中国骨伤, 2007, 20(6): 361-363.
- [5] 康庆林, 张春才, 许硕贵. 对骨折有效内固定的几点思考. 中国骨伤, 2003, 6(5): 281-282.
- [6] Uthoff HK, Poitras P, Backman DS. Internal plate fixation of fractures: short history and recent developments. J Orthop Sci, 2006, 11(2): 118-126.
- [7] Brighton CT, Fisher JR Jr, Levine SE, et al. The biochemical pathway mediating the proliferative response of bone cells to a mechanical stimulus. J Bone Joint Surg Am, 1996, 78(9): 1337-1347.
- [8] Bhatt KA, Chang EI, Warren SM, et al. Uniaxial mechanical strain: an in vitro correlate to distraction osteogenesis. J Surg Res, 2007, 143(2): 329-336.
- [9] Koike M, Shimokawa H, Kanno Z, et al. Effects of mechanical strain on proliferation and differentiation of bone marrow stromal cell line ST2. J Bone Miner Metab, 2005, 23(3): 219-225.
- [10] Liu X, Zhang X, Luo ZP. Strain-related collagen gene expression in human osteoblast-like cells. Cell Tissue Res, 2005, 322(2): 331-334.
- [11] Ignatius A, Blessing H, Liedert A, et al. Tissue engineering of bone: effects of mechanical strain on osteoblastic cells in type I collagen matrices. Biomaterials, 2005, 26(3): 311-318.
- [12] Jagodzinski M, Drescher M, Zeichen J, et al. Effects of cyclic longitudinal mechanical strain and dexamethasone on osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells. Eur Cell Mater, 2004, 16(7): 35-41.

(收稿日期: 2008-07-10 本文编辑: 李为农)

腰椎间盘突出症是临床常见病、多发病,其中大多数可经非手术疗法得到缓解或治愈<sup>[1]</sup>。目前,影像学研究证实椎间盘突出后能够逐渐缩小或消失,并认为突出组织的这种形态学改变是非手术治疗有效的原因之一<sup>[2-3]</sup>。后纵韧带完整与否是决定椎间盘突出能否自然吸收或缩小的关键因素,游离型、突破后纵韧带型等破裂型椎间盘突出最易吸收<sup>[4]</sup>。突出的髓核组织引发的自身免疫反应是椎间盘突出后发生重吸收的机制之一,本实验在临床及动物实验研究的基础上,建立破裂型椎间盘突出动物模型,并观察黄芪促进自身免疫反应的作用,特别是对促进椎间盘突出后重吸收的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物 选取清洁级 3 月龄 SD 雄性大鼠 28 只,体重 350 g 左右。实验动物由中科院实验动物中心提供,许可证号 SCXK(沪)2007-0005。随机分为正常对照组、模型组、黄芪注射液治疗组和胸腺肽治疗组 4 组。动物实验环境:清洁级。

1.2 建立动物模型 模型组、黄芪注射液治疗组和胸腺肽治疗组动物造模:采用氯胺酮(0.10 g/kg)腹腔注射,麻醉成功后,剃去背部体毛,橡皮筋扎住尾部。常规消毒,无菌条件下,每只切取尾椎椎间盘 2 个,包含上下软骨终板。用针刺破上下终板,使髓核暴露,造成游离或破裂状态。用 7 号手术线“米”形包绕椎间盘,放入生理盐水器皿备用,然后无菌条件下后正中中线后路切开背部皮肤、肌肉,暴露脊椎,去掉椎板。将取出尾椎椎间盘放入椎管切开处,使之接触血运,并造成脊髓相应受压,逐层缝合,造成破裂型椎间盘突出动物模型。术后从第 2 天起黄芪注射液治疗组和胸腺肽治疗组动物给予黄芪注射液、胸腺肽腹腔注射,持续 10 d。

1.3 实验仪器及实验试剂 流式细胞仪(美国 Becton Dickinson 公司),计算机数据处理软件 Lysis 与 CELLQUEST(美国 B.D.公司提供),新芝 DY-89-1 型电动均浆机(宁波新芝生物科技股份有限公司)。实验试剂 FITC Anti-rat CD4, FITC Anti-rat CD8a, FICT Mouse IgG1, k Isotype control(美国 BioLegend)。

1.4 观察项目与方法

1.4.1 观察项目 椎间盘突出组织发生重吸收,必然存在形态结构的变化,本实验利用 HE 染色法观察形态结构变化。由于正常椎间盘组织被排除在免疫系统之外,难检测到 T、B 细胞<sup>[5]</sup>。本实验利用流式细胞仪检测 T、B 细胞数量,检测了除空白组之外的另 3 组,对模型组与两治疗组作比较。

1.4.2 方法 术后 10 d 将大鼠麻醉后处死,模型组、黄芪注射液治疗组和胸腺肽治疗组由于每只大鼠埋植 2 个椎间盘,其一,用多聚甲醛浸泡 24 h,10%EDTA 脱钙 1 周,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡包埋固定、切片,HE 染色后观察组织形态变化。另一椎间盘用眼科剪剪碎,放入研钵轻度研磨,用 10 ml PBS 反复冲洗组织,经过匀浆机反复震荡混匀,透过细胞滤网滤去组织将液体导入离心管内,取 3 ml 放入离心机导管以 2 000 rpm/5 s,离心 15 min,弃上清,经过一系列处理后,加入抗体。计算机数据处理软件分析得出 T(T 辅助细胞, T 杀伤细胞)、B 细胞的含量比例。正常对照组 10 d 后处死,切取正常尾椎椎间盘 1 个,包埋切片之后,做 HE 染色(方法同

上)。

1.5 统计分析 用 SPSS 13.0 统计软件包分析数据,采用单因素方差分析对各组之间的差异进行检验。数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,检验标准  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HE 染色观察 对照组椎间盘(即正常状态下椎间盘): HE 染色片在光镜×100 倍下,可见中心为髓核区,胶原纤维排列呈网状,髓核细胞较小,呈圆形,散在其中,外周环绕的是纤维环区,大量胶原纤维散在排列,纤维环细胞为长梭形状,核呈长柱状,染色深。模型组、黄芪注射液治疗组和胸腺肽治疗组:纤维环板层结构变化不大,排列轻度不规则,髓核组织变化较大,胶原纤维组织皱缩甚至消失,髓核细胞更小,细胞核聚集,细胞间质部分消失,形状极不规则。

2.2 T、B 细胞含量 黄芪注射液治疗组和胸腺肽治疗组与模型组 Th(T 辅助细胞)、Tc(T 毒性细胞)和 B 细胞的含量有很大不同。黄芪注射液治疗组 Th、Tc 和 B 细胞的含量与胸腺肽治疗组及模型组比较,细胞比例明显大于模型组及胸腺肽治疗组( $n=7, P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。见表 1。

表 1 各组 T、B 细胞含量检测值( $\bar{x} \pm s$ )

Tab.1 Contents of T and B cell in each group( $\bar{x} \pm s$ )

组别	数量	Th	Tc	B
模型组	7	11.25±2.61	10.94±3.50	13.82±3.00
黄芪组	7	22.92±4.29**	22.42±4.30**	23.63±4.83**
腺肽组	7	30.96±4.60*	29.53±4.94*	27.24±4.81*

注:T、B 细胞代表一种特异性的免疫反应。\*\*代表模型组 Th、Tc 和 B 细胞含量与黄芪注射液治疗组比较, $P < 0.01$ ; \*代表黄芪注射液治疗组和胸腺肽治疗组细胞含量比较差异有统计学意义, $P < 0.05$

Note: T or B cell represents a species-specific immune response. \*\* represents that the number of T and B cell in the group treating with radix astragalii injection are significantly higher than those of negative control group ( $P < 0.01$ ). \* represents the number of T and B cell in the group treating with radix astragalii injection are different from the group treating with thymic peptide ( $P < 0.05$ )

3 讨论

自 1985 年 Teplick 等<sup>[6]</sup>首次报道椎间盘存在重吸收现象以来,椎间盘自发性吸收或缩小的临床报道不断增多,特别是游离型、突破后纵韧带型突出最易吸收。突出椎间盘组织能够缩小或吸收已经是公认的事实,但其吸收机制目前尚不清楚,可能与突出椎间盘组织诱发自身免疫作用有关。还有,何种干预能够促进其吸收目前尚是一个盲区。

腰椎间盘组织是人体最大的无血供组织,髓核被纤维环包裹,与血液循环相隔离,其营养主要来自软骨终板的弥散作用,因而具有自身免疫性<sup>[7]</sup>。由于正常椎间盘无血运,很难接触自身免疫系统,所以被排斥在自身免疫系统之外<sup>[8]</sup>。在游离型、突破后纵韧带型椎间盘突出中,突出物突破后纵韧带进入硬膜外,暴露于血循环中的椎间盘组织成为机体的抗原,可导致自身免疫反应发生,由此产生自身抗体或自身致敏淋巴细胞对突出的椎间盘组织产生免疫溶解作用<sup>[9]</sup>。Habtemariam 等<sup>[10]</sup>通过免疫组化研究发现,突出的椎间盘组织中有 IgM、

IgG 沉积,且常沉积在新生血管周围,认为是免疫反应启动了再吸收过程。Komori 等<sup>[11]</sup>认为,对破裂型及游离型的腰椎间盘突出,由于突出髓核组织暴露于硬膜外腔的血管环境中,导致炎症反应和突出组织血管化,从而引发巨噬细胞的吞噬作用和免疫反应。李军等<sup>[12]</sup>也认为突出的髓核组织中有免疫球蛋白沉积,可引起自身免疫反应性炎症。宋若先等<sup>[13]</sup>通过实验研究认为作为自身免疫反应抗原的髓核组织,游离于椎管内引发了局部的免疫反应,确实可以再吸收或缩小。大量研究证明了破裂型椎间盘突出过程中,自身免疫反应是促进突出髓核组织发生重吸收的原因之一。本研究在动物实验的基础上建立了大鼠破裂型椎间盘突出动物模型,并进一步研究相关药物促进自身免疫反应的作用机制。

Medzhitov 等<sup>[5]</sup>的研究认为活性 T、B 细胞代表一种特异性的免疫反应。结果显示模型组与两药物治疗组比较,组织中的 T、B 细胞含量比例明显小。我们可以从中得出这样的结论:接触血运的组织,即暴露在自身免疫系统环境下的髓核能够吸引活性 T、B 细胞,而黄芪与胸腺肽能够增强髓核组织吸引活性 T、B 细胞的作用,从而表明黄芪与胸腺肽一样都能增强自身免疫作用。

黄芪是临床方剂中治疗椎间盘突出的常用药。《本草纲目》记载黄芪具有补气固表利水的作用。现代研究发现,黄芪主要含有皂苷、多糖、氨基酸及微量元素,具有增强机体免疫、抗衰老等功能。以往动物实验表明,黄芪能提高正常小鼠的 ANAE(酸性 α 萘酚醋酸酯酶阳性淋巴细胞)比率<sup>[14-15]</sup>及植物血凝素(PHA)诱导的体内淋巴细胞转化率,并能完全纠正环磷酰胺(CY)及强的松龙(PDS)的免疫抑制作用,对 T 淋巴细胞介导的细胞免疫功能具增强和调节作用<sup>[14]</sup>。本实验发现黄芪能增加突出椎间盘髓核组织中的活性 T、B 细胞含量,增强机体的免疫功能,后者有利于促进突出后椎间盘的重吸收。此外,HE 染色的组织学观察也发现,其确实引发了突出组织趋向吸收的形态学改变。尽管胸腺肽能够增强机体的免疫力,符合促进椎间盘突出后重吸收的治疗机制,但由于其不良反应大,难以应用于腰椎间盘突出症的临床治疗。

本实验初步研究了椎间盘突出重吸收过程中突出组织自身免疫反应的现象,探讨了黄芪等对腰椎间盘突出后重吸收的影响与机制,为进一步研究药物影响椎间盘突出重吸收的方向提供了有益的思路。

参考文献

[1] 胡有谷. 腰椎间盘突出症. 第 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2004.

414.

[2] Maigne JY, Rime B, Deligne B. Computed tomographic follow-up study of forty-eight cases of nonoperatively treated lumbar intervertebral disc herniation. *Spine*, 1992, 17: 1071-1074.

[3] Ahn SH, Ahn MW, Byun WM. Effect of the transligamentous extension of lumbar disc herniations on their regression and the clinical outcome of sciatica. *Spine*, 2000, 25(4): 475-480.

[4] 姜宏, 施杞, 郑清波. 腰椎间盘突出后的自然吸收及其临床意义. *中华骨科杂志*, 1998, 18(12): 755-756.

[5] Medzhitov R, Janeway CA Jr. Innate immune recognition and control of adaptive immune responses. *Semin Immunol*, 1998, 10: 351-353.

[6] Teplick JG, Haskin ME. Spontaneous regression of herniated nucleus pulposus. *AJR Am J Roentgenol*, 1985, 145(2): 371-375.

[7] Naylor A, Happey F, Turner RL, et al. Enzymic and immunological activity in the intervertebral disk. *Orthop Clin North Am*, 1975, 6(1): 51-58.

[8] Geiss A, Larsson K, Rydevik B, et al. Autoimmune properties of nucleus pulposus: an experimental study in pigs. *Spine*, 2007, 32(2): 168-173.

[9] 崔全起, 姜宏, 施杞. 国外椎间盘突出研究新进展. *中国中医骨伤科杂志*, 1998, 12(6): 52-54.

[10] Habtemariam A, Grönblad M, Virri J, et al. Immunocytochemical localization of immunoglobulins in disc herniations. *Spine*, 1996, 21(16): 1864-1869.

[11] Komori H, Shinomiya K, Nakai O, et al. The natural history of herniated nucleus pulposus with radiculopathy. *Spine*, 1996, 21(2): 225-229.

[12] 李军, 刘森, 朱丽萍. 腰椎间盘突出症的病理分型和全身及局部体液免疫水平的相关性研究. *西安医科大学学报*, 1999, 20(3): 374-376.

[13] 宋若先, 宫良泰, 许复郁, 等. 游离型腰椎髓核组织再吸收及缩小的可能机制. *中国临床康复*, 2004, 8(8): 1476-1477.

[14] 毛小娟, 王军志, 王风连. 红芪多糖和黄芪多糖的免疫调节作用. *中国药理学通报*, 1983, 5(6): 367-371.

[15] 宋秀琴, 王金秀, 张蕴芬, 等. 当归补血汤及其单味药对小鼠 M 由受体及淋巴细胞 PFC 和 ANAE 的影响. *北京中医学院学报*, 1989, 12(2): 43-45.

(收稿日期: 2008-09-18 本文编辑: 桑志成)

广告目次

- 1. 盘龙七片(陕西盘龙制药集团有限公司) ..... (封 2)
- 2. 祛风止痛胶囊(咸阳步长制药有限公司) ..... (对封 2)
- 3. 好及施、曲安奈德(广东省医药进出口公司珠海公司) ..... (封 3)
- 4. 骨松宝(贵州富华药业有限责任公司) ..... (封底)
- 5. 颈痛颗粒(山东福瑞达医药集团公司) ..... (对中文目次 2)
- 6. 施沛特(山东福瑞达医药集团公司) ... (对英文目次 1)
- 7. 复方南星止痛膏(江苏南星药业集团有限公司) ..... (对正文首页)