

· 基础研究 ·

葛根汤对大鼠退变颈椎间盘组织前列腺素 E₂ 及环氧合酶的影响

周军¹ 方素萍² 霍海如¹ 齐云¹ 郭淑英¹ 姜廷良¹ 施杞³

(1. 中国中医研究院中药研究所, 北京 100700; 2. 北京广安门医院分子生物室, 北京; 3. 上海中医药大学骨伤所, 上海)

【摘要】 目的 观察葛根汤对模型大鼠退变颈椎间盘组织 PGE₂ 及 COX 活性的影响, 以探讨葛根汤治疗颈椎病的抗炎作用机理。方法 选用动力失衡性颈椎病动物模型, 造模后 6 个月, 取出颈椎间盘组织, 采用放免法、催化活性测定法分别测定 PGE₂ 含量及 COX 活性。结果 模型组 PGE₂ 含量及 COX 活性明显升高, 葛根汤可下调 PGE₂ 的含量及抑制 COX 的活性。结论 葛根汤下调退变颈椎间盘组织中 PGE₂ 的含量, 与抑制 COX 活性密切相关, 这可能是其治疗颈椎病的作用机制之一。

【关键词】 中草药; 颈椎病; 前列腺素 E₂; 环氧合酶

Effects of GeGen Decoction on PGE₂ and COX in degenerated cervical intervertebral discs in rats ZHOU Jun, FANG Su-ping, HUO Hai-ru, et al. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of TCM (Beijing, 100700, China)

【Abstract】 Objective To explore the anti-inflammation mechanism of GeGen Decoction (GGD) on cervical spondylosis by investigating GGD on Prostaglandin E₂ (PGE₂) and Cyclooxygenase (COX) activity in degenerated cervical intervertebral discs **Methods** Rats were modeled on the cervical dynamic unbalance, and 6 months later PGE₂ content and COX activity in cervical intervertebral discs were measured by radioimmunoassay and catalytic activity assay, respectively. **Results** The PGE₂ and COX activity were significantly higher in experimental groups; GGD could down-regulate the content of PGE₂ and inhibit COX activity. **Conclusion** GGD could down-regulate the content of PGE₂ activity in degenerated cervical intervertebral discs by inhibit COX activity, which may be one of its mechanisms in treating cervical spondylosis.

【Key words】 Chinese herbal drugs; Cervical vertebrae disease; Prostaglandin E₂; Cyclooxygenase

颈椎病是临床上的常见病、多发病, 炎症介质在其发病过程中起着重要的作用。葛根汤是临床上治疗本病的常用方剂。本文拟运用大鼠颈椎病动物模型, 观察葛根汤对退变颈椎间盘组织中前列腺素 E₂ (Prostaglandin E₂, PGE₂) 及其合成酶环氧合酶 (Cyclooxygenase, COX) 活性的影响, 以探讨葛根汤治疗颈椎病的抗炎作用机理。

1 材料和方法

1.1 实验动物 6 月龄 SD 大鼠 50 只, 体重 (200 ± 20)g, 雌雄各半, 由中国医学科学院实验动物研究所提供, 动物合格证号: 医动字第 01-3009 号。在本所实验动物室饲养观察。

1.2 实验药物与制备 按原方比例: 葛根 20g 麻黄 15g 桂枝 15g 芍药 15g 生姜 15g 大枣 10g 甘草 10g 配齐药物, 先煎麻黄去上沫, 然后加入其它药, 水煎 2 次 (每次 25 min) 合并药液, 过滤浓缩为含饮片 1.64 g/ml, 用时蒸馏水

稀释至所需浓度。

芬必得胶囊, 中美天津史克制药有限公司产品 (批号 99100582)。将芬必得胶囊中药物于研钵中研成粉末, 蒸馏水配制成 9 mg/ml 的混悬液, 用时摇匀给药。

1.3 主要试剂与仪器 PPO, 德国 MERCK 公司产品; POPOP, Koch-Light 进口分装, 上海化学试剂采购供应站试剂厂; 谷胱甘肽 (还原型), 美国 Amersham 产品; 花生四烯酸, Cayman 产品 (购自晶美生物); 考马斯亮蓝 G-250, 英国进口分装, 中国医药公司采购供应站经销; 其他均为国产分析纯。^[3H]标记前列腺素 E₂ 放免药盒, 中国人民解放军总医院科技开发中心放免研究所。LS 9 800 液体闪烁记数仪, 美国 BECKMAN 公司。

1.4 动物分组与给药 将 25 只雌性和 25 只雄性大鼠, 随机分为 5 个组, 每组 10 只 (雌雄各半)。观察药物设大、小两个剂量, 灌胃给药, 每日 1 次。动物造模 4 个月后将开始给药, 连续给药 2 个月取材。动物分组及给药为: 葛根汤大剂量组 (PL, 1.64 g/kg), 葛根汤小剂量组 (PS, 0.82 g/kg), 芬必得组

基金项目: 国家 95 攀登预选项目“中药现代化关键问题的基础研究”课题 (970211018)

(Ibu, 90 mg/kg), 模型组及假手术组 (Mo, Sh, 等容量蒸馏水)。

1.5 模型制作与取材 参照文献报道^[1]的大鼠颈椎病实验模型的方法进行造模。造模动物到期后, 股动脉放血处死, 用手术刀沿椎体上下软骨板迅速切下 C_{2,3}、C_{3,4} 椎间盘, CO₂ 干冰速冻后, 置于 -80℃ 冰箱保存待测。C_{2,3} 用于 COX 的测定; C_{3,4} 用于 PGE₂ 的测定。

1.6 PGE₂ 和 COX 的测定 PGE₂ 采用放射免疫测定法。COX 作用于底物花生四烯酸, 产生前列腺素; 通过测定前列腺素的生成量, 间接测定环氧合酶活性^[2]。

1.6.1 PGE₂ 测定 从低温冰箱中取出各组 C_{3,4} 椎间盘, 室温下称取约 10 mg, 用眼科剪冰浴中尽量剪碎, 放入微型匀浆器中, 制备组织匀浆液, 按试剂盒说明进行操作。在液体闪烁计数仪上计数。

1.6.2 COX 测定 ①匀浆液的配制: 0.2 mol/L 磷酸氢二钠水溶液 81 ml, 与 0.2 mol/L 磷酸二氢钠水溶液 19 ml 混合 (pH 7.4), 加 EDTA 148.9 mg, L-半胱氨酸 48.5 mg, 加蒸馏水配成 400 ml 液体 (其中含 50 mM 磷酸钠盐, 1 mM EDTA, 1 mM 半胱氨酸); ②组织匀浆的制备: 从低温冰箱中取出各组 C_{2,3} 椎间盘, 室温下称取约 10 mg, 用眼科剪将其剪碎, 放入微型匀浆器中, 加匀浆液 0.5 ml, 电动匀浆机匀浆 30 秒, 15 000 × g 低温离心 1 分钟, 吸取上清液, 加匀浆液做 1:2 稀释。蛋白含量用考马斯亮蓝 G-250 染色法测定; ③底物液的配制: 配底物液 20 ml, 其中含花生四烯酸 10 μg/ml, 还原型谷胱甘肽 3 μg/ml; ④酶温育: 底物液 100 μl, 匀浆液 900 μl, 反应总体积为 1 ml。置 37℃ 水浴中温育 60 分钟; ⑤提取 PGE₂: 温育后, 反应液中加入 1 ml 甲酸 (1M), 1 ml 无水乙醇, 4 ml 重蒸馏乙酸乙酯一次提取, 提取液 1 000 × g 离心 10 分钟。取上层有机相, 负压抽干。向吹干样器中加 PBS 1 ml, 充分振荡至溶。所得溶液再按试剂盒说明进行 PGE₂ 的检测。

酶活力以每分钟每毫克蛋白中的酶作用于底物所产生的 PGE₂ 的量来表示 (pg/mg·min)。

1.7 统计方法 实验数据采用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组间 *t* 检验。

2 结果

2.1 葛根汤对 PGE₂ 含量的影响 (见表 1)

表 1 各组大鼠退变颈椎间盘组织 PGE₂ 的含量 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	PGE ₂ (pg/mg)
Mo	10	50.24 ± 4.51
Ibu	10	44.19 ± 4.75*
PL	9	44.33 ± 3.93**
PS	10	44.28 ± 4.95*
Sh	10	40.60 ± 3.35**

与 Mo 比较, *P < 0.05, **P < 0.01

由表中可见, Mo 组 PGE₂ 值远高于 Sh 组, 统计学处理有显著差异, 说明造模的成功。Ibu、PL、PS 组与 Mo 组比较有显著差异, PL、PS 与 Ibu 组比较无差异。说明 PL、PS 及 Ibu, 都有明显的抑制炎症介质 PGE₂ 的作用。

2.2 葛根汤对 COX 活性的影响 (见表 2)

表 2 各组大鼠退变颈椎间盘组织 COX 的活性 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	COX 活性 (pg/mg·min)
Mo	10	0.173 ± 0.078
PL	10	0.102 ± 0.045*
PS	9	0.102 ± 0.046*
Ibu	9	0.106 ± 0.038*
Sh	10	0.074 ± 0.021**

与 Mo 比较 *P < 0.05, **P < 0.01

由表中可见, Mo 组值明显高于 Sh 组, 而给药后的 PL、PS 及 Ibu 组, 与 Mo 组比较均有显著差异, PL、PS 与 Ibu 组比较无差异。说明 PL、PS 及 Ibu 均有明显抑制 COX 活性的作用。

3 讨论

葛根汤具有解肌发表、升津液、舒筋脉的作用, 临床上常将葛根汤用于颈椎病的治疗^[3]。本文从抗炎角度就葛根汤对炎症介质 PGE₂ 及其合成酶 COX 的影响进行了探讨。

在致炎因素刺激下, 细胞膜磷脂酶 A₂ 被激活, 水解细胞膜磷脂的酯键, 释出花生四烯酸。在环氧合酶的催化作用下, 花生四烯酸转化为前列腺素 (PGs)。研究表明^[4,5], PGE₂ 是退变椎间盘炎症介质中的重要成分, PGE₂ 大量释放可刺激椎间盘周围组织, 使血管扩张、渗出增加、炎症发展加速; 可提高组织对致痛因子的敏感性, 激起痛觉过敏状态, 增强和延长致痛因子对感觉神经末梢的致痛作用, 且其本身亦可致痛; 还可抑制软骨、椎间盘组织中蛋白多糖的合成, 刺激蛋白酶的生成, 影响这些组织中胶原的构成和性能^[6,7], 从而加速椎间盘的退变。因此, PGE₂ 是在椎间盘退变的炎性组织中释放出来, 又反过来促进椎间盘退变进程的重要炎症介质。有效地抑制或降低这种炎症介质的组织含量, 对颈椎病的治疗和预防有着重要的意义。本实验结果显示模型组 PGE₂ 含量明显高于正常对照组, 说明造模成功。芬必得为抑制 PGE₂ 的合成抗炎药物。葛根汤大、小剂量与芬必得, 对 PGE₂ 的含量均有明显的下调作用, 二者比较无差异。这表明, 葛根汤有明显下调退变颈椎间盘组织中 PGE₂ 含量的作用。

为了进一步阐明葛根汤对退变椎间盘组织中 PGE₂ 的作用机制, 我们又检测了其合成酶 COX 的活性水平。有关中药治疗颈椎病是否对退变椎间盘中 COX 有影响, 尚未见报道。我们的实验结果表明, 葛根汤大、小剂量均有明显的抑制 COX 活性的作用, 芬必得也有明显的抑制作用, 与前者比较无差异。提示葛根汤有明显抑制颈椎病动物退变椎间盘 COX 活性的作用, 葛根汤下调 PGE₂ 的含量应与此有密切的关系。这可能是葛根汤治疗颈椎病的作用机制之一。

环氧合酶是参与花生四烯酸转变为前列腺素类化合物的起始酶。它有两种亚型, 一种是组成型酶称为 COX-1, 另一种是诱导型酶称为 COX-2。COX-1 本身存在于细胞内, 在正常情况下持续产生大量的生理所需 PGs; 而 COX-2 在生理状态下不存在于细胞内, 只有在细胞受到细胞因子等刺激后才开始形成, 从而能迅速合成大量的 PGs。囿于方法与条件的限制, 我们仅对总体 COX (包括 COX-1 和 COX-2) 的活性作了测定, 间接探讨了葛根汤对 COX-2 的影响。至于

·手法介绍·

闭合复位法治疗 Barton 骨折

殷升贤 鞠学教 李培臻
(诸城市中医医院, 山东 诸城 262200)

Barton 骨折在复位过程中, 骨折块容易移动, 腕管撕裂严重的还容易在骨折块中嵌插软组织, 从而造成复位困难。现结合我院 1996—2001 年 9 例 Barton 骨折病例的临床总结, 就闭合复位的手法及固定等问题作一初步探讨。

1 临床资料

本组共 9 例, 均为新鲜骨折, 均在受伤后 1 天内就诊。其中男 2 例, 女 7 例; 年龄 20~46 岁, 平均 33 岁。右侧 8 例, 左侧 1 例, 骨折块向掌侧移位 7 例, 骨折块向背侧移位 2 例。

2 治疗方法

2.1 屈腕腕关节尺偏加旋转 臂丛麻醉成功后, 术者位于患侧, 一手握腕骨以上部位, 另一手握患肢前臂远侧, 将患肢置于屈腕, 轻度旋前位, 适当牵引, 同时将腕关节向尺侧偏, 轻轻旋转脱位远侧部分, 使脱位的腕关节复位。

2.2 骨折块复位 若骨折块向掌侧移位, 两手握住腕骨以上部分, 将脱位的腕关节尽量前屈, 轻轻内旋尺偏, 适当牵引, 两拇指压住游离骨折块, 随牵引的进行向背侧下方推移骨折块, 纠正短缩畸形后逐渐将腕关节掌屈, 两拇指向背侧挤压游离骨折块, 使其复位, 用一拇指压住骨折块远端, 将腕关节轻前屈, 角度不要过大, 纠正骨折块向关节内突出。若骨折块向背侧移位, 两手握住腕骨以上部分, 将脱位的腕关节尽量背伸, 轻轻外旋尺偏, 适当牵引, 两拇指压住游离骨折块, 随牵引的进行向掌侧下方推移骨折块, 纠正短缩畸形后逐渐将腕关节背伸, 两拇指向掌侧挤压游离骨折块, 使其复位, 用一拇指压住骨折块远端, 将腕关节轻轻背伸, 角度不要过大, 纠正骨折块向关节内突出。

2.3 固定 若骨折块向掌侧移位, 保持前臂中立位, 腕关节掌屈尺偏, 骨折块掌侧部分加垫, 石膏夹外固定。若骨折块向背侧移位, 保持前臂中立位, 腕关节位于背伸位, 将腕关节远端内旋尺偏, 骨折块部分加垫, 石膏夹外固定。注意外固定的松紧, 随时更换石膏夹。

3 治疗结果

本组 9 例骨折均采用闭合复位法获得成功。治疗后骨折复位达到或接近解剖复位者 7 例, 骨折块略向近端移位者 2 例。随诊 6 例, 时间 3 个月~5 年, 平均 2 年 1 个月。6 例中全部无腕关节内外翻畸形及神经损伤症状。X 线片检查示 5 例骨性愈合, 1 例纤维性愈合。除 2 例因不敢进行腕关节功能锻炼导致腕关节前屈稍有受限外, 其余 7 例均无后遗症。

4 讨论

以往的文献在腕关节复位中多注重牵引和挤压, 忽视了腕关节处于不同位置对复位的影响, 复位难度大, 且效果不好, 屈腕腕关节尺偏加旋转灵活运用腕关节脱位后的“多余”空间, 操作轻柔, 复位成功率高。采用臂丛麻醉, 既有利于减轻病人的痛苦, 又利于前臂肌肉的松弛, 避免不必要的腕部软组织损伤, 利于复位和固定。腕关节复位后将其固定于一定的位置, 转移肌肉张力对骨折块的压力, 有利于防止骨折块的移动, 又不会阻碍腕部关节囊等软组织的愈合。腕关节的功能主要体现在灵活程度上, 不需要承受太大的压力, 骨折呈骨性愈合还是纤维性愈合, 对预后无明显差异。因此, 不必为强求解剖复位而反复整复或手术, 也不必为追求骨性愈合而采用长时间或严格固定。

(收稿: 2001-09-30 编辑: 李为农)

葛根汤是仅仅或主要作用在 COX-2, 还是对前列腺素代谢酶(P-450, 15-PGDH 等)也有影响, 这有待进一步探讨。

参考文献

- 1 郝永强, 施杞, 郑松国, 等. 大鼠颈椎病实验模型的设计与建立. 中国矫形外科杂志, 1999, 6(4): 282-284.
- 2 王建周, 扬武, 于小鹏, 等. 建立一种简便、灵敏的前列腺素—环氧酶测定法. 科学通报, 1986, (2): 148-150.
- 3 周军. 桂枝汤、葛根汤治疗颈椎病临床研究概况. 山东中医杂志, 2000, 19(12): 755-757.
- 4 Kang JD, Georgescu HI, McIntyre-Larkin L, et al. Herniated lumbar intervertebral discs produce matrix metalloproteinase, nitric oxide, in-

- terleukin-6, and prostaglandin E₂. Spine, 1996, 21: 271.
- 5 James DK, Helga IG, Lori ML, et al. Herniated cervical intervertebral discs spontaneously produce matrix metalloproteinases, nitric oxide, IL-6 and prostaglandin E₂. Spine, 1995, 20(2): 2373-2378.
- 6 Jame DK, Maja SR, Lori AM, et al. Toward a biochemical understanding of human intervertebral disc degeneration and herniation. Spine, 1997, 22(10): 1065-1073.
- 7 James DK, Helga IG, Lori ML, et al. Herniated lumbar intervertebral discs spontaneously produce matrix metalloproteinases. Nitric oxide, Interleukin-6, and Prostaglandin E₂. Spine, 1996, 21(3): 271-277.

(收稿: 2002-06-03 编辑: 李为农)