

复方川脊片对兔颈椎病模型 椎动脉基质金属蛋白酶-2 的干预作用

寿折星, 沈霖*, 熊鹏程

(华中科技大学同济医学院附属协和医院中西医结合病房, 湖北 武汉 430022)

[摘要] 目的: 探讨基质金属蛋白酶-2(MMP-2) 在椎动脉血管表达的意义及复方川脊片的干预效果。方法: 40 只兔随机分为正常组, 模型组, 颈复康组, 复方川脊片组。硬化剂注射法造模, 4 周后, 模型组, 颈复康组及川脊片组分别以生理盐水、颈复康及川脊片混悬液灌胃。治疗 4 周后检测椎动脉血管搏动指数, 全血黏度及血浆黏度, 椎动脉血管 MMP-2 的表达。结果: 与正常组相比模型组搏动指数提高, 全血黏度及血浆黏度增加, MMP-2 表达增多 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 治疗组搏动指数降低, 全血黏度及血浆黏度降低, MMP-2 表达较少 ($P < 0.05$)。结论: 部分的抑制 MMP-2 在椎动脉的表达可能是复方川脊片治疗颈椎病的机制之一。

[关键词] 复方川脊片; 椎动脉; 颈椎病; 基质金属蛋白酶-2

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2009)10-0075-03

The Significance of Expression of MMP-2 in the Vertebral Artery in Rabbits with Cervical Spondylosis and the Intervent Effects of Compound Chuanji Pills

SHOU Zhe-xing, SHEN Lin*, XIONG Peng-cheng

(Department of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Union Hospital,
Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the significance of expression of MMP-2 in the vertebral artery and the intervent effects of Compound Chuanji Pills on it. **Methods:** Forty rabbits were randomly divided into four groups: the normal group, the model group, the Jingfukang(JFK) Group and the Chuanji Pills (CJP) group. The method of injecting sclerosing agent was used to induce the vertebral artery type of cervical spondylosis in rabbits. Four weeks later, the model group, JFK group and CJP group were treated with sodium chloride, suspension of JFK or suspension of CJP respectively by intragastric administration. After four weeks of therapy, the pulsatility index of the vertebral artery, the plasma viscosity, the blood viscosity and the expression of matrix metalloproteinase-2(MMP-2) in the vertebral artery were detected. **Results:** The pulsatility index, plasma viscosity, blood viscosity and expression of MMP-2 were significantly higher in the model group than that of normal group ($P < 0.05$); compared with the normal group and the model group, the pulsatility index of the vertebral artery, plasma viscosity, blood viscosity and expression of MMP-2 decreased remarkably in the CJP group ($P < 0.05$). **Conclusion:** One of the mechanism of CJP in treating of cervical spondylosis might partially inhibit the expression of MMP-2 in the vertebral artery.

[Key words] Compound Chuanji Pills; vertebral artery; cervical spondylosis; matrix metalloproteinase-2

[收稿日期] 2009-01-09

[基金项目] 湖北省科技攻关重点课题(2005AA302B07)

[通讯作者] * 沈霖, Tel: (027) 85726395; E-mail: shenlinhb@yahoo.com.cn

椎动脉型颈椎病患者常伴血黏度增高, 血管发生硬化, 搏动指数增高。复方川脊片以活血化瘀中药为主, 临床研究显示它有改善椎动脉型颈椎病患者椎动脉搏动指数作用^[1], 但其疗效尚不清楚。为此本实验复制兔颈椎病模型, 以复方川脊片为实验药物进行相关的研究, 报道如下:

1 材料及方法

1.1 实验动物及分组 清洁级日本大耳兔 40 只, 6 月龄, 体重 2.5~3 kg, 雌雄各半, 购于同济医学院动物实验中心(合格证号: 0076523)。随机分为正常组, 模型组, 川脊片组, 颈复康组 4 组, 每组 10 只。

1.2 实验药物, 试剂及仪器 消痔灵注射液, 由吉林省集安益盛药业股份有限公司生产(国药准字 Z22026175。批号: 0704152)。颈复康颗粒由承德颈复康药业集团有限公司生产(国药准字 Z13022204 号。批号: 20070102)。MMP-2 一抗鼠抗兔及二抗犬抗鼠均购自武汉博士德生物技术有限公司。R206D 旋转蒸发器为英国 Bibby 公司生产。血流变学检测为 LBY2N6 型全血自动模块式血流变仪, 北京普利生仪器有限公司产品。经颅多谱勒检测仪为德国 DWL-P 型。HMIAS-2000 型高清晰度彩色医学图文分析系统为武汉千屏影像技术有限责任公司产品。复方川脊片按照以下比例组成: 川续断 93.8 g, 狗脊 93.8 g, 乳香 62.5 g, 没药 62.5 g, 伸筋草 93.8 g, 熟地黄 62.5 g, 桑枝 62.5 g, 白芍 250 g, 牛膝 62.5 g, 甘草 31.3 g, 红花 62.5 g, 葛根 62.5 g。复方川脊片药物在本院制剂室制备: 中药清水浸泡 12 h, 武火煮沸, 文火煮 0.5 h, 取出药液后, 再加入清水入药渣中, 武火煮沸, 文火煮 0.5 h, 取药液, 将 2 次药液合并, 浓缩至较高浓度。再按照体积比(中药液: 乙醇=2:3)加入 95% 乙醇液, 4℃静置 24 h, 用无菌滤纸滤去残渣, 取上清液用旋转蒸发器蒸发至无醇味。并用烧杯进一步将各组药液浓缩定容至 10 mL, 用 pH 计测量各组 pH 值。在本实验中, 药液 pH 值多小于 6.0, 用碳酸氢钠调整 pH 值为 6.8~8.5 分装于无菌瓶中, 终浓度为含生药 0.25 g·mL⁻¹, 4℃保存备用。

1.3 造模方法 参照文献法^[2], 采用硬化剂注射法制作椎动脉型颈椎病模型。先用脱毛剂将新西兰大白兔右侧自枕后及颈部的体毛脱掉, 给兔左侧颈 3 至颈 5 椎体处消毒, 抽取消痔灵 10 mL 注射于兔左侧 C3~C5 颈椎横突侧面, 进针以感觉到横突边缘骨头为准, 回抽针栓无血, 然后推注消痔灵。将消痔

灵注射液约 10 mL 注射于家兔第 3~5 颈椎右侧横突侧面, 并于第 2 周, 第 4 周各重复 1 次。正常组不做注射。

1.4 给药方法 造模 4 周后川脊片组及颈复康颗粒组按临床剂量灌胃, 模型组给予生理盐水 20 mL 灌胃, 正常组不予灌胃。川脊片及颈复康颗粒均按人、兔体表面积折算成等效剂量^[3], 川脊片按生药量计为 2.0 g·kg⁻¹, 颈复康颗粒为 1.33 g·kg⁻¹, 配成 20 mL 混悬液每天早晨 8 点灌胃, 每天 1 次, 共 4 周。

1.5 检测指标 给药 4 周后, 进行一下指标的检测:

搏动指数: 剃尽家兔枕后及颈部体毛并均匀涂上介质, 以 TCD 探头分别对准家兔颈椎侧面和枕外隆突后的枕窗, 与血流方向呈 30~40 度角, 聚焦深度 40~80 mm, 分别测定搏动指数(Pi)。

血流变学检测: 肝素抗凝血 5 mL 在血流变仪上机检测。血流变学检测指标有: 全血黏度选取低切 1.00·S⁻¹, 中切 115·S⁻¹, 高切 300·S⁻¹; 血浆黏度检测选切变率 300·S⁻¹。

免疫组织化学: 空气栓塞法处死动物后选取椎动脉第 II 段注射部位靠近头部一侧同一部位做成石蜡切片。4% 的多聚甲醛固定 24 h 后行常规石蜡包埋、切片, 切片厚度为 5 μm。免疫组化方法测定血管 MMP-2 蛋白表达: 石蜡切片采用链霉卵白素-生物素-辣根过氧化物酶复合物法(SP)法, 常规脱蜡至水, 3% H₂O₂ 灭活内源性过氧化物酶, 微波抗原修复后, 10% 正常山羊血清(PBS 稀释)封闭, 滴加 50 倍稀释的一抗, 37℃孵育 1h, PBS 冲洗, 5 min×3 次; 滴加生物素标记的二抗, 37℃孵育 15 min, PBS 冲洗, 5 min×3 次, 滴加辣根酶标记的链霉卵白素工作液; 滴加 DAB 显色, 中性树胶封片。以 PBS 代替一抗作阴性对照。应用 HMIAS-2000 型高清晰度彩色医学图文分析系统对 MMP-2 表达进行图像分析, 以光密度值(OD)作为图像的输出结果。

1.9 统计方法 采用 SPSS11.0 统计软件进行统计, 双侧 t 检验, 计量数据结果以均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, P<0.05 为有统计学意义。

2 结果

2.1 血流变学检测结果 与正常组相比, 模型组全血黏度, 血浆黏度均升高, 差异有统计学意义(P<0.05), 与模型组相比, 川脊片组全血切变率, 血浆黏度均降低, 差异有统计学意义(P<0.05), 见表 1。

2.2 TCD 检测结果 与正常组相比, 模型组搏动指数提高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与模型组相比颈复康组和川脊片组搏动指数降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 2。

2.3 MMP-2 检测结果 与正常组相比, 模型组 MMP-2 明显增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 颈复康组和川脊片组 MMP-2 表达受抑制, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 2。

表 1 各组血流变学指标检测结果($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	剂量 (g·kg ⁻¹)	全血黏度(mPa·s)			血浆黏度 (mPa·s)
			1.00·S ⁻¹	115·S ⁻¹	300·S ⁻¹	
正常组	9	—	3.92±0.51 ¹⁾	4.86±0.62 ¹⁾	6.95±1.68 ¹⁾	1.42±0.56 ¹⁾
模型组	10	—	4.56±0.54	5.25±0.79	8.86±2.43	1.78±0.69
颈复康组	10	1.33	4.35±0.48	5.02±0.65	7.55±1.98	1.57±0.48
川脊片组	10	2.0	3.56±0.24 ¹⁾	4.65±0.54 ¹⁾	6.65±1.58 ¹⁾	1.33±0.25 ¹⁾

注: 与模型组相比, ¹⁾ $P < 0.05$ (下同)

表 2 注射侧椎动脉 MM-2 光密度值
及搏动指数($\bar{x} \pm s$)

分组	例数	剂量 (g·kg ⁻¹)	MMP-2 表达 (OD·μm ⁻²)	搏动指数
正常组	9	—	0.28±0.02 ¹⁾	0.98±0.20 ¹⁾
模型组	10	—	0.51±0.18	1.47±0.34
颈复康	10	1.33	0.42±0.15 ¹⁾	1.15±0.28 ¹⁾
川脊片组	10	2.0	0.35±0.14 ¹⁾	1.36±0.21 ¹⁾

3 讨论

椎动脉从锁骨下动脉分出后, 至进第六颈椎(C6)或第五颈椎(C5)横突孔为第一段, 由 C6 或 C5 颈椎横突孔至环椎横突孔为第二段, 出横突孔至枕骨大孔为第三段, 穿透硬脑膜, 走行很短一段即与对称的椎动脉汇合称第四段, 即基底动脉^[4]。由于椎动脉血管弯曲较多, 加上椎动脉血管在受到机械压迫后, 血管管道突然变得狭窄, 受到血流的冲击作用, 血管局部血流动力不稳定、血管壁侧压力和切应力发生变化。而血管壁的机械牵张力可以通过还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸的介导而增加 MMP-2 的 mRNA 表达及其酶原的释放^[5]。血流动力学的不稳定、血管壁侧压力和切应力的变化, 是导致 MMP-2 分泌的重要原因^[6]。当血黏度增加时, 这种剪切力增加, 相应的 MMP-2 表达增加。MMP-2 为降解弹性蛋白的主要酶^[7], 它表达增加将引起血管壁破坏, 使血管壁硬化。

本研究显示, 与空白组相比, 模型组血黏度, 血管搏动指数及 MMP-2 表达均明显增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 治疗组全血切变率, 血浆黏度, 搏动指数, MMP-2 表达均降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。说明高血黏度通过高剪切力作用增加 MMP-2 的表达, 降解弹性蛋白, 使血管发生硬化, 其结果为血管搏动指数增加, 小脑及脑干供血不足。复方川脊片通过降低血黏度, 抑制 MMP-2 的表达, 抑制弹性纤维的降解, 最终起到保护血管, 延缓血管硬化的作用。

颈椎病中医学病因病机, 主要为是络脉瘀滞, 风寒湿邪入侵, 痹阻太阳经脉, 经隧不通, 或气血不足, 筋脉失养, 肾虚精亏, 髓不养骨, 乃属本虚标实之证。治宜活血通络, 补肾填精。复方川脊片由川续断、狗脊、石菖蒲、乳香、没药、红花、伸筋草等组成, 全方以通为用, 攻补兼施, 乃立方大意。

对该药的药理研究机制的研究结果表明该药可以通过抑制椎动脉血管 MMP-2 的表达达到治疗椎动脉型颈椎病的目的。

[参考文献]

[1] 周丕琪, 沈霖, 杨艳萍, 等. 复方川脊片治疗椎动脉型颈椎病患者的临床观察[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2004, 12(2): 12-14.

[2] 朱明双, 郑重, 黄勇. 注射硬化剂法制作家兔椎动脉型颈椎病动物模型[J]. 中医正骨, 2000, 12(12): 11-13.

[3] 苗明三. 实验动物和动物实验技术[M]. 北京: 中国中医药出版社, 1997: 144.

[4] 刘巍, 成红兵. 成人椎动脉第二段的临床应用解剖学研究[J]. 交通医学, 2002, 6(3): 245-246.

[5] Grote K, Flach I, Luchtefeld M, et al. Mechanical stretch enhances mRNA expression and proenzyme release of matrix metallo proteinase-2 (MMP-2) via NAD(P) H oxidase-derived reactive oxygen species [J]. Circ Res, 2003, 92: 80-86.

[6] Ishikawa Y, Asuwa N, Ishii T, et al. Vascular remodeling by hemodynamic factors [J]. Virchow Arch, 2000, 437: 138-148.

[7] Sinha I, Hannawa K, Eliason J. Early MT-1 MMP expression following elastase exposure is associated with increased cleaved MMP-2 activity in experimental rodent aortic aneurysms[J]. Surgery, 2004, 136(2): 176-182.