

益气活血方介导 P38MAPK 信号通路促进突出椎间盘组织重吸收的机制研究

高春鹏¹ 朱宇² 姜宏² 刘建文³

(1.泰兴市中医医院,江苏泰兴225400;2.苏州市中医医院,江苏苏州215009;

3.华东理工大学生物科学与工程药学院国家重点实验室,上海200237)

摘要 目的:以P38丝裂原活化蛋白激酶(P38MAPK)为切入点,研究益气活血方促进破裂型椎间盘突出组织重吸收的作用机制。方法:将大鼠随机分为对照组、中药组和中药+P38阻断剂组,通过刺破大鼠自体尾椎椎间盘包埋至L4-5背部肌肉的方法统一制作破裂型椎间盘突出重吸收模型。对照组予腹腔注射2%二甲基亚砜(DMSO),生理盐水灌胃;中药组予腹腔注射2% DMSO,益气活血方灌胃;中药+P38阻断剂组予腹腔注射P38特异性阻断剂,益气活血方灌胃。各组均用药干预4周后处死并取出包埋的椎间盘,称重并计算椎间盘减少质量,HE染色镜下观察椎间盘形态退变情况,Real Time PCR法检测P38MAPK、基质金属蛋白酶3(MMP-3)、基质金属蛋白酶9(MMP-9)、血管内皮生长因子(VEGF)等指标的mRNA表达,Western Blot法检测VEGF、MMP-3、MMP-9、P38MAPK、磷酸化P38丝裂原活化蛋白激酶(P-P38MAPK)的蛋白表达。结果:治疗4周后,中药组大鼠椎间盘质量减小值明显高于其他2组($P<0.05$)。镜下观察,3组移植椎间盘的组织形态均出现较为明显的退变;与对照组和中药+P38阻断剂组相比,中药组移植椎间盘的组织退变和髓核细胞凋亡更明显。中药组治疗后椎间盘髓核组织中P38MAPK、VEGF、MMP-3、MMP-9的mRNA相对表达量明显高于其他2组($P<0.05$),髓核组织中P38MAPK、VEGF、MMP-3、MMP-9及P-P38MAPK的蛋白表达水平明显高于其他2组($P<0.05$)。结论:益气活血方能激活P38MAPK信号通路的磷酸化,调控突出髓核组织的新生血管化,提高基质金属蛋白酶的表达,促进细胞外基质(ECM)的降解失衡及细胞的凋亡,显著促进突出椎间盘组织的退变和重吸收。

关键词 益气活血方 破裂型椎间盘突出 重吸收 P38MAPK信号通路 基因表达调控 大鼠 实验研究

中图分类号 R681.530.5

文献标志码 A

文章编号 1672-397X(2018)06-0075-04

基金项目 国家自然科学基金项目(81473691)

腰椎间盘突出症(Lumbar intervertebral disc herniation, LIDH)是临床常见病、多发病。近年来,腰椎间盘突出后发生影像学重吸收的报道日益增多^[1-2]。LIDH患者在无化学融核和外科干预的情况下,突出髓核自发消失或者变小的现象称为“重吸收”(resorption)^[3]。前期基础研究及临床观察随访发现,姜宏经验方“益气活血方”能明显改善LIDH患者的临床症状并促进重吸收的发生^[4]。新的研究发现,P38丝裂原活化蛋白激酶(P38 mitogen-activated protein kinases, P38MAPK)信号通路能够通过调控细胞因子表达及细胞凋亡参与椎间盘的退变^[5]。因此我们推测,益气活血方刺激突出髓核组织的新生血管化和细胞外基质的代谢失衡,促进突出髓核组织的重吸收与P38MAPK信号通路的过度激活有关。本实验旨在观察并对比益气活血方和P38MAPK特异性阻断剂对大鼠突出髓核的组织结构和组织中

基质金属蛋白酶3(MMP-3)、MMP-9、血管内皮生长因子(VEGF)及P38MAPK基因和蛋白表达的影响,探讨益气活血方促进破裂型椎间盘突出重吸收的作用机制。

1 实验材料

1.1 动物与分组 选择3月龄体重在180~220g的SD雄性大鼠30只,由上海Slac实验动物有限责任公司提供,合格证号:SCXX(沪)2015-0005。

1.2 药物、主要仪器和试剂 中药益气活血方(苏州市中医医院药剂科提供),药物组成:生炙黄芪(各)20g、当归10g、川芎15g、炒白术10g、防己10g、木瓜10g、威灵仙10g、地龙15g、水蛭6g、白芥子6g,加冷水500mL浸泡30min,煎煮(火力2100W)开锅后煎30min取汁200mL,再加水300mL煎30min取汁200mL,2次相兑并浓缩成1.5g/mL煎剂保存于恒温冰箱中。MMP-3抗体、MMP-9抗体、VEGF抗体、

P38MAPK抗体, proteintech公司; 磷酸化P38丝裂原活化蛋白激酶(P-P38MAPK)抗体, Santa Cruz公司; DMSO, 苏州昆山金城试剂厂; P38MAPK特异性阻断剂, SB203580 (S1076), Selleck Chemicals公司; 总RNA反转录试剂盒、EasyTaq PCR试剂盒, Gibico公司; 荧光定量PCR试剂盒, 华北制药股份有限公司; TL-18M台式高速冷冻离心机, 上海离心机械研究所; SW-CJ-1FD超净工作台, 上海博迅实业有限公司医疗设备厂; SBE6003电泳仪, 上海申能博彩生物有限公司; PCR基因扩增仪, Bio-Rad公司; iCycler荧光定量PCR仪, Eppendorf公司; XSP-17C倒置生物显微镜, 上海长方光学仪器有限公司; Ti-S荧光显微镜, 日本尼康公司; 高效液相色谱仪, 岛津国际贸易有限公司。

2 实验方法

2.1 分组与造模 大鼠采用完全随机分组分为对照组、中药组和中药+P38阻断剂组, 每组10只。3组采用同一术式造模, 5只1笼, 室温22℃, 通风良好, 12h光照循环(6:00—18:00)。

获取尾椎(Co)椎间盘: 大鼠适应性饲养1周, 腹腔注射盐酸氯胺酮(0.10g/kg)麻醉, 背部L5附近备皮, 常规消毒, 在无菌条件下切取大鼠第3、4尾椎椎间盘(包含上下软骨终板)。使用7号注射器针头(内径0.5mm、外径0.7mm)刺破所取椎间盘的纤维环, 使髓核组织暴露, 用万分之一单位电子天平称重并记录, 随后将尾椎椎间盘放置于无菌聚碳酸酯(PC)管套并浸泡在生理盐水中备用。前期预实验发现3月龄SD雄性大鼠第3、4尾椎椎间盘的直径为(3.56±0.42)mm, 高为(3.18±0.40)mm。

植入椎间盘: 以第5腰椎为中心, 沿背部皮肤后正中中线切约2.5cm纵形切口, 分离筋膜及肌肉组织(背最长肌、多裂肌), 暴露L4、L5的棘突和椎板, 用骨钳咬除L4、L5棘突及全部椎板和部分椎弓根, 并用7号针头穿破黄韧带并划破硬脊膜(使尾椎椎间盘接触脑脊液, 模拟椎管内环境), 劈开骨缺口附近竖脊肌, 用血管钳扩大肌肉裂隙成一空腔。将已固定在PC管套中的Co3、4椎间盘植入空腔内, 逐层缝合, 切口涂抹红霉素眼膏以预防感染。待大鼠苏醒, 可正常活动后放入笼中正常饲养。

2.2 药物干预 造模后第2日, 开始药物干预。对照组予生理盐水灌胃并腹腔注射2%DMSO(10mg/kg), 1次/d; 中药组予益气活血方煎剂按9.1mL/kg剂量1次/d灌胃, 同时腹腔注射2%DMSO(10mg/kg, 1次/d); 中药+P38阻断剂组予腹腔内注射P38MAPK的阻断剂SB203580(使用前用2%DMSO稀释, 10mg/kg, 1次/d), 同时等体积生理盐水灌胃。各组均连续药物干预4周。灌胃给药剂量根据“人和动物体表面

积折算的等效剂量比率表”临床等效剂量=临床用量×等效剂量系数(0.018)计算得出。

2.3 取材 于药物干预4周后将各组大鼠麻醉处死, 沿原手术切口打开背部肌肉, 取出包埋的椎间盘去除PC管套后迅速用电子天平称重并记录。将椎间盘分为2份分别标号: 一份放入10%的中性甲醛固定液细胞固定24h, 制备4μm厚的组织切片标本, 行HE染色; 另一份用0.01mmol/L磷酸缓冲盐溶液(PBS)洗去血渍后放入已标记的无菌EP管中, 于-80℃冰箱中保存。预留用于Real Time PCR、Western Blot等检测。

2.4 HE染色观察组织退变情况 切片经二甲苯脱蜡, 梯度乙醇复水化, 苏木素染色10min, 冲洗, 并用氨水返蓝, 孵育后水洗置于0.5%伊红染色1min, 70%乙醇浸泡分化5min后, 水洗并镜检。常规脱水, 透明, 封片。

2.5 Real Time PCR方法检测目的基因的mRNA表达 提取总RNA: 按Gibico公司RNA抽提试剂盒说明书, 应用Trizol试剂溶液提取各组NPCs的总RNA。反转录: 在超净台中, 取DEPC处理的200μL PCR管置冰上, 依次加入1μg总RNA, 1.0μL cDNA模板, 加入Forward Primer(20μmol/L)和Reverse Primer(20μmol/L)各0.25μL, 0.125μL Taq酶, 2μL dNTP, 1.5μL MgCl₂(25mmol/L), 2.5μL 10×Buffer缓冲液, 加入17.375μL的ddH₂O, 使反应体系总体积达到25.0μL, 于42℃反转录1h, 获取cDNA。通过Real-time PCR对TNF-α、IL-1β、P38MAPK、MMP-3、MMP-9进行扩增, 引物序列以基因管家GAPDH为内参, 利用Primer premier 5.0为待测基因设计引物序列, 见表1。

表1 引物序列

引物名称	序列
GAPDH	Forward Primer 5'-CAGGGCTGCTTTTAACTC-3'
	Reverse Primer 5'-GGAAGATGCTGATGGGAT-3'
MMP-3	Forward Primer 5'-CAGGTACCAACCTATTCCTG-3'
	Reverse Primer 5'-CAGGCTCCAGAGAGTTAGAT-3'
MMP-9	Forward Primer 5'-ATAGAATGCTTACTGTGCGT -3'
	Reverse Primer 5'-TTTGATGAGTGGATAGCTCG -3'
P38MAPK	Forward Primer 5'-GTGGCTGACCCTTATGAC -3'
	Reverse Primer 5'-CACAGTGAAGTGGGATGG -3'
VEGF	Forward Primer 5'-CGCAACAACGCAATCTATG -3'
	Reverse Primer 5'-ATTCGGTCTCCTTGTTCA -3'

PCR反应: 95℃条件下, 5min预变性, 30s变性, 56~65℃ 30s退火(所有的引物的退火温度58℃), 72℃条件下延伸重复35个循环, 每次循环读取CT(cycle threshold)值, 72℃ 5min最终延伸。每0.2℃读取CT值, 绘制裂解曲线。

琼脂糖凝胶电泳:点样法取内参扩增产物及PCR产物与6×DNA Loading Buffer混匀,微量移液器上样。120V电压进行电泳约30min。当溴酚蓝在凝胶中迁移适当距离后,停止电泳,拿出凝胶,在紫外透射下观察目的条带,并用凝胶成像系统拍照记录。

所有的原始数据均借助实时定量PCR仪所附带的软件来完成,标记跟踪待测基因,最后与标准曲线进行对比,通过CT值表示相关基因的表达水平。我们对每一个基因的样品都相对独立地重复3次($n=3$),取CT平均值代表基因在该条件下的mRNA水平。每份待测基因的CT值与内参GAPDH的比值作为各组mRNA的相对表达量。

2.6 Western Blot方法检测蛋白表达 根据说明书提取椎间盘组织的总蛋白并按BCA蛋白定量法对细胞核浓度进行定量,配制10% SDS-聚丙烯酰胺分离胶,在电泳仪上对等量蛋白进行电泳,分离蛋白质,根据待测蛋白大小分别进行转膜。用TBST缓冲液漂洗后置于封闭液中封闭2h,室温下加入配制好的1mL一抗溶液,4℃孵育过夜。回收一抗后,加入二抗

37℃孵育2h。

TBST漂洗后,将PVDF膜放入免疫印迹化学发光试剂中进行显影,通过计算机图像处理技术(Quantity One)测定各蛋白条带的灰度值,以待测基因的灰度面积与内参照β-actin的灰度面积的比值为半定量资料,重复3次,并进行统计分析。

2.7 统计学方法 建立EXCEL数据库,采用SPSS 16.0软件对实验数据进行统计分析,实验数据用($\bar{x} \pm s$)表示,数据进行正态性和方差齐性检验,计量资料采用One-Way ANOVA分析, $P<0.05$ 代表有统计学差异。

3 实验结果

3.1 各组椎间盘质量改变比较 对照组椎间盘质量减小值为(8.17±5.19) mg,中药组为(19.29±5.34) mg,中药+P38阻断剂组为(11.91±6.88) mg,中药组椎间盘质量减小值明显高于其他2组($P<0.05$),提示益气活血方能促进突出椎间盘的缩小和重吸收。

3.2 HE染色观察各组椎间盘组织形态 中药组椎间盘较其他2组形态退变更为明显,光镜下见纤维

环胶原纤维排列紊乱,细胞核染色数量减少,细胞基质胶冻样改变,并伴有大量炎性细胞和新生血管浸润,见图1。椎间盘形态退变程度与质量减小趋势一致。

3.3 各组椎间盘VEGF、P38MAPK、MMP-9、MMP-3的mRNA表达比较 结果见表2。

3.4 各组髓核组织P-P38MAPK、P38MAPK、VEGF、MMP-9、MMP-3的蛋白表达比较 结果见表3。

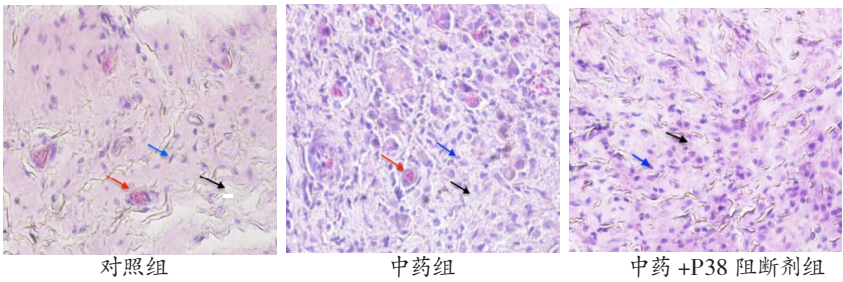


图1 尾椎髓核组织 HE 染色(×20)

注:蓝色箭头示髓核细胞核,黑色箭头示胶原纤维,红色箭头示新生毛细血管。

表2 各组椎间盘VEGF、MMP-3、MMP-9、P38MAPK的基因相对表达量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数(只)	P38MAPK/GAPDH	VEGF/GAPDH	MMP-3/GAPDH	MMP-9/GAPDH
对照组	10	1.00±0.03	1.00±0.30	1.00±0.10	1.00±0.02
中药组	10	3.56±0.04 [#]	5.67±1.30 [#]	4.15±0.23 [#]	7.86±0.27 [#]
中药+P38阻断剂组	10	1.14±0.08	1.97±0.31	3.51±0.24	3.28±0.47

注: *与对照组比较, $P<0.05$; #与中药+P38阻断剂组比较, $P<0.05$ 。

表3 各组椎间盘VEGF、MMP-3、MMP-9、P-P38MAPK、P38MAPK的蛋白表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数(只)	P38MAPK/β-actin	P-P38MAPK/β-actin	VEGF/β-actin	MMP-3/β-actin	MMP-9/β-actin
对照组	10	0.865±0.047	0.721±0.023	0.777±0.028	1.079±0.017	0.812±0.040
中药组	10	1.463±0.100 [#]	1.657±0.032 [#]	0.905±0.038 [#]	1.746±0.032 [#]	1.079±0.065 [#]
中药+P38阻断剂组	10	0.711±0.041 [*]	0.657±0.021	0.670±0.025 [*]	1.275±0.020 [*]	0.785±0.040

注: *与对照组比较, $P<0.05$; #与中药+P38阻断剂组比较, $P<0.05$ 。

4 讨论

LIDH可归属于中医学“腰腿痛”“痹证”范畴,证属气滞血瘀。这与现代医学对LIDH是由突出物压迫导致神经根瘀血、水肿,伴发各种炎症介质刺激引发微循环障碍的病理认识具有相通之处。课题组姜宏教授结合中医传统理论和现代医学研究认为,本病的辨证重点应抓住“虚”“瘀”二字,故拟“益气活血”为本病的治疗大法,研制了治疗LIDH的专方“益气活血方”,此方能显著改善LIDH患者的临床症状并能促进突出组织的重吸收。方中重用黄芪为君药,大补脾肺之元气,使气旺则血行,血行则湿散,现代药理学研究显示黄芪可提高自身免疫效应^[6];当归配伍川芎,既能养血和血,又能活血化瘀,其有效成分川芎嗪能改善血液流变学,促进新生血管的形成,并能够降低血小板的黏附,缓解突出物压迫引起的神经根瘀血、缺血、水肿^[7]。君臣配伍起到益气活血的

功效。白术、防己二药合用有利水消肿之效,威灵仙可宣通十二经络,又有“化骨除鲠”之能,木瓜、白芥子祛湿通络,5味佐药能够减轻神经根和脊髓的水肿。地龙、水蛭通络散结,祛瘀生新。诸药配合,达到益气、活血、祛痰、通络的功效。

近年来大量研究表明,突出组织的新生血管化、细胞外基质代谢失衡以及椎间盘细胞的凋亡是导致椎间盘突出重吸收的主要原因。VEGF作为一种血管生长刺激因子,其高表达可作为突出组织新生血管化的标志。研究表明新生血管化可诱导以血管反应为中心的免疫性炎症,并刺激多种蛋白水解酶的释放,加速椎间盘组织退变(IDD)^[8]。ECM的代谢失衡和突出髓核组织的细胞凋亡是IDD主要原因^[9]。MMPs是ECM代谢的关键酶类,其高表达一方面能直接降解绝大部分ECM成分(除外蛋白多糖);另一方面可以通过弱化细胞-基质的黏附加速椎间盘细胞的凋亡^[10]。研究显示,MMPs家族中MMP-3、MMP-9是加速ECM降解及软骨破坏的关键因素,其高表达能够导致椎间盘组织的IDD,从而促进重吸收过程^[11]。

Studer^[12]在外培养的髓核细胞加入P38MAPK抑制剂后能逆转由TNF- α 诱导的MMPs/TIMPs比值升高的趋势,表明P38MAPK信号通路能够调控MMPs的表达从而在椎间盘ECM降解过程中起着至关重要的作用。因此,本研究提出益气活血方通过介导P38MAPK信号通路加速突出髓核组织的新生血管化和细胞外基质的代谢失衡,促进突出髓核组织的重吸收的假设。

本实验结果表明益气活血方能够激活P38MAPK的磷酸化,促进突出髓核组织中VEGF、MMP-3、MMP-9的基因和蛋白表达,促进突出椎间盘组织的新生血管化和ECM的降解,加速突出组织的重吸收过程;而中药+P38阻断剂组无论是椎间盘组织形态还是VEGF、MMP-3、MMP-9的基因和蛋白表达均受到明显抑制。由此可见,益气活血方上调VEGF、MMP-3、MMP-9的基因和蛋白表达,促进突出组织重吸收的作用主要通过介导P38MAPK信号通路的磷酸化实现。

然而,P38MAPK的磷酸化能够提高VEGF的表达,促进突出椎间盘组织的新生血管化,这势必加重患者突出部位的炎性疼痛,但临床上大多服药患者并无腰痛加重的症状。考虑可能为中药复方中不同组分在体内除调控P38MAPK信号通路外,还与其他几条经典信号通路之间存在调节关系,具体原因有待进一步剖析该方的作用机制以及P38MAPK与其他几条经典信号通路之间的联系。

参考文献

- [1] STEFFEN F, KIRCHER P R, DENNLER M. Spontaneous regression of lumbar Hansen type 1 disk extrusion detected with magnetic resonance imaging in a dog[J]. J Am Vet Med Assoc, 2014, 244 (6): 717.
- [2] HONG J, BALL P A. Resolution of lumbar disk herniation without surgery[J]. N Engl J Med, 2016, 374 (16): 1564.
- [3] ORIEF T, ORZ Y, ATTIA W, et al. Spontaneous resorption of sequestered intervertebral disc herniation[J]. World Neurosurg, 2012, 77 (1): 149.
- [4] 高春鹏, 俞鹏飞, 刘锦涛, 等. 姜宏教授益气活血法治疗椎间盘突出症经验介绍[J]. 新中医, 2016, 48 (5): 224.
- [5] HAN Y, LI X, YAN M, et al. Oxidative damage induces apoptosis and promotes calcification in disc cartilage endplate cell through ROS/MAPK/NF- κ B pathway: Implications for disc degeneration[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2017: 1.
- [6] 姜宏, 刘锦涛, 惠初华, 等. 黄芪对破裂型椎间盘突出重吸收动物模型的影响[J]. 中国骨伤, 2009, 22 (3): 206.
- [7] 刘丹, 戴丽蓉, 刘纪宁. 川芎嗪对免疫调节作用的研究进展[J]. 现代临床医学, 2014, 40 (1): 10.
- [8] OHBA T, HARO H, ANDO T, et al. TNF- α -induced NF- κ B signaling reverses age-related declines in VEGF induction and angiogenic activity in intervertebral disc tissues[J]. J Orthop Res, 2009, 27 (2): 233.
- [9] WANG S Z, RUI Y F, LU J, et al. Cell and molecular biology of intervertebral disc degeneration: current understanding and implications for potential therapeutic strategies[J]. Cell Prolif, 2014, 47 (5): 389.
- [10] AMAR S, MINOND D, FIELDS G B. Clinical Implications of Compounds Designed to Inhibit ECM-Modifying Metalloproteinases[J]. Proteomics, 2017, 17: 23.
- [11] LIU Z, LI C, MENG X, et al. Hypoxia-inducible factor-1 α mediates aggrecan and collagen II expression via NOTCH1 signaling in nucleus pulposus cells during intervertebral disc degeneration[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2017, 488 (3): 554.
- [12] STUDER R K, ABOKA A M, GILBERTSON L G, et al. P38 MAPK inhibition in nucleus pulposus cells: a potential target for treating intervertebral disc degeneration[J]. Spine, 2007, 32 (25): 2830.

第一作者: 高春鹏(1987—), 男, 医学硕士, 住院医师, 中医骨伤专业。

通讯作者: 姜宏, 医学博士, 教授, 博士研究生导师。honghong751@126.com

收稿日期: 2017-11-17

编辑: 吴宁