

本文引用:谢芳,吴官保,姚红艳,冯帅华,杨 届.补肾活血汤干预衰老大鼠退变椎间盘模型中经典 WNT 信号通路 β -catenin 蛋白含量的研究[J].湖南中医药大学学报,2018,38(3):275-279.

补肾活血汤干预衰老大鼠退变椎间盘模型中经典 WNT 信号通路 β -catenin 蛋白含量的研究

谢芳¹,吴官保^{1*},姚红艳²,冯帅华¹,杨 届¹

(1.湖南省中医药研究院附属医院,湖南 长沙 410208;2.湖南中医药大学,湖南 长沙 410006)

[摘要] **目的** 观察补肾活血汤对衰老大鼠退变椎间盘组织形态结构及 β -catenin 蛋白含量的影响。**方法** 选取三月龄健康 SD 大鼠 80 只,雌雄各半,随机分为空白组、假模型组、模型组、中药低剂量组以及中药高剂量组,每组 16 只,雌雄各半。除空白组和假模型组外,其余各组注射 D-半乳糖建立大鼠衰老动物模型,空白对照组、假模型组与模型组每日生理盐水灌胃,中药低剂量组及中药高剂量组补肾活血汤每日灌胃,持续 12 周。分别于造模后、灌胃 4 周后、灌胃 8 周后、灌胃 12 周后每组随机抽取雌雄大鼠各 2 只处死取材,光镜下观察椎间盘组织形态学变化并运用蛋白质印迹法(Western Blot)检测 β -catenin 蛋白表达差异。**结果** 与模型组比较,经补肾活血汤干预后,中药低剂量组及中药高剂量组大鼠椎间盘组织形态学评分降低($P<0.05$), β -catenin 蛋白表达水平降低($P<0.05$)。**结论** 补肾活血汤能有效抑制经典 Wnt/ β -catenin 信号通路中关键蛋白分子 β -catenin 蛋白的表达,从而起到延缓椎间盘退变的作用。

[关键词] 补肾活血汤;腰椎间盘突出; β -catenin 蛋白

[中图分类号] R285.5;R681.5+3

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2018.03.011

Effects of Bushen Huoxue Decoction on β -catenin Protein Level of WNT Signal Pathway in Lumbar Intervertebral Disc Degeneration Aging Model Rats

XIE Fang¹, WU Guanbao^{1*}, YAO Hongyan², FENG Shuaihua¹, YANG Jie¹

(1. The Affiliated Hospital of Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410006, China; 2. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

[Abstract] **Objective** To observe the effect of Bushen Huoxue decoction on the structural and histopathological changes and β -catenin protein in lumbar intervertebral disc degeneration aging model rats. **Methods** Eighty three-month old SD rats (male-female half and half) were randomly divided into blank control group, sham-model group, model group, TCM low-dose group and TCM high-dose group, 16 rats in each group. Except the blank group and sham-model group, the aging model rats in other groups were established by injecting D-galactose. The rats in blank control group, sham-model group and model group were daily given normal saline by gavage. TCM low-dose and high-dose groups were daily treated with Bushen Huoxue decoction for 12 weeks by gavage. Two male rats and two female rats in each group were randomly executed at after modelling, after 4 weeks of gavage, after 8 weeks of gavage and after 12 weeks of gavage, and samples were selected from dead rats. The histomorphological change of model group was observed by light microscope, and the expression of β -catenin protein was detected by Western Blot method. **Results** Compared with the model group, the histomorphology score in TCM low-dose and high-dose groups treated with Bushen Huoxue decoction decreased ($P<0.05$), and the expression of β -

[收稿日期] 2017-04-20

[基金项目] 湖南省中医药管理局资助项目(201221)。

[作者简介] 谢芳,男,医师,硕士,研究方向:脊柱脊髓疾患。

[通讯作者] * 吴官保,男,主任医师,教授,硕士研究生导师, E-mail: yhywgb@126.com。

catenin protein decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** Buyang Huanwu decoction shows inhibition effect on the expression of key β -catenin protein in the classical Wnt/ β -catenin signal pathway, and thus could relieve the degeneration of intervertebral disc.

[**Keywords**] Bushen Huoxue decoction; lumbar intervertebral disc degeneration; β -catenin protein

腰椎退行性病变及腰椎间盘突出症作为临床常见病症,给现代人们的生活造成的困扰正日渐加重。随着现代社会的发展,人们生活习惯的改变,其发病日益趋向年轻化和严重化^[1]。目前椎间盘的具体退变机制尚未明确,近年来对其退变信号通路调控机制的研究已成为一大热点。Wnt 信号转导通路包含多种分支传导信号通路,其中每一条亚通路都有其特定的作用。目前逐渐被研究人员所熟悉的主要是 Wnt/ β -catenin 信号通路。研究表明^[2],Wnt/ β -catenin 信号通路的异常激活能改变椎间盘组织细胞的内环境,促进软骨终板、髓核及纤维环的退变,从而引起椎间盘结构的变形。本项目前期研究^[3-4]证明:补肾活血汤在通过减少椎间盘组织中炎症因子的表达,减少炎症反应从而有效缓解椎间盘的退变。本文旨在通过观察 D-半乳糖致衰老大鼠椎间盘的退变情况,并检测 β -catenin 蛋白在退变椎间盘治疗前后的表达情况研究补肾活血汤对经典 Wnt 信号通路的影响,从另一个角度揭示补肾活血汤对于椎间盘退变的治疗机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 三月龄 SD 大鼠 (SPF 级) 80 只,雌雄各半,体质量 (236.40 ± 54.28) g,生产单位:湖南斯莱克景达实验动物有限公司,许可证号:SCXK(湘)2013-0004,动物合格证编号:43004700027559。

1.1.2 实验试剂 D-半乳糖(批号:H15M8C30836):上海源叶生物科技有限公司,纯度 99%;Tris、APS、SDS、TEMED、Tween-20、丙烯酰胺、甘氨酸、甲叉双丙烯酰胺、丽春红:美国 Sigma 公司;HRP goat anti-mouse IgG、HRP goat anti-rabbit IgG:美国 Proteintech;RIPA 裂解液:中国北京普利莱公司;蛋白酶抑制剂:德国 Merck 公司;蛋白磷酸酶抑制剂:瑞士 Roche 公司;SuperECL Plus 超敏发光液:美国 Thermo pierce 公司;显影液、定影液:中国 WellBiotechnology 公司(以上试剂均由维尔生物科技有限公司统一采供并提供)。

1.1.3 补肾活血汤制备 按《伤科大成》中所载方剂补肾活血汤,以现在临床常用药物剂量为依据,处方组成:熟地黄 15 g,杜仲 10 g,枸杞子 10 g,补

骨脂 15 g,菟丝子 10 g,当归尾 10 g,没药 10 g,山茱萸 10 g,红花 6 g,独活 10 g,肉苁蓉 10 g,上述饮片均由湖南省中医药研究院附属医院药剂科提供。浸泡、煎煮、去渣,分别浓缩至生药含量约为 0.58 g/mL 及 1.66 g/mL 2 种剂量(分别相当于临床等效剂量的 1、2 倍),封瓶备用。

1.1.4 主要仪器 TS-92 型摇床(江苏其林贝尔有限公司);TGL-18R 型台式冷冻离心机(深圳黑马有限公司);164-5050 型电泳仪(美国 Bio-rad 公司);DYCZ-24EN 型电泳槽(北京六一有限公司);DYCZ-40A 型转膜仪(北京六一有限公司);QL-901 型旋涡混合器(江苏其林贝尔有限公司)(以上均由湖南省中医药研究院附属医院病理科提供)。

1.2 实验方法

1.2.1 动物分组 80 只大鼠采用随机数字表分为 5 组,A 组为空白组 16 只,B 组为假模型组 16 只(注射生理盐水),C 组为衰老模型组(D-半乳糖干预)16 只,D 组为中药低剂量组 16 只、E 组为中药高剂量组 16 只(均为补肾活血汤干预)。

1.2.2 动物造模 实验动物造模方法借鉴邱柏程等^[5]衰老大鼠模型造模方法:A 组大鼠不予以处理用作空白对照,C 组、D 组、E 组大鼠分别予以 10%D-半乳糖溶液 0.125 g/(kg·d)腹腔注射,B 组大鼠予以等量生理盐水腹腔注射,药物注射造模时间为 30 d,造模期间每只大鼠每日腹腔注射前,先称量质量,根据大鼠质量变化调整注射剂量。造模后各组随机选取雌雄大鼠各 2 只,处死后取出腰椎间盘组织,制作石蜡标本,在光镜下观察各组大鼠椎间盘形态。按 Miyamoto 等^[6]分级标准将椎间盘组织在光镜下的观察结果分为 1-5 级,分别规定为 1、2、3、4、5 分,椎间盘形态达 3 级或以上为造模成功。

1.2.3 干预方法 大鼠造模成功后,根据人与动物体表面积换算公式,计算出大鼠给药剂量。A、B、C 组均予以生理盐水灌胃,D 组、E 组分别以 5.8 g/kg、16.6 g/kg 灌胃予以补肾活血汤,每天 1 次,灌胃期间每周称 1 次大鼠质量,根据质量变化调整药物灌胃剂量,持续 12 周。

1.2.4 标本采集 实验过程中分别于造模后、灌胃 4 周后、灌胃 8 周后、灌胃 12 周后于各组随机抽取雌雄大鼠各 2 只,处死后取出腰椎间盘组织,一部

分制作成蜡块标本,于光学显微镜下观察椎间盘形态结构,另一部分取出的椎间组织盘测定质量后冷冻,用于测定 β -catenin 蛋白的含量。

1.2.5 光镜下观察椎间盘形态组织变化及评分 分别于造模后、灌胃第4周、第8周、第12周时取各组玻片标本于光镜下观察椎间盘组织的形态组织变化,依据 Wang 等^[7]制定的椎间盘评分标准来评价:以光镜下大鼠椎间盘纤维环、髓核、骨赘3个观察因子(每个观察因子按退变情况从低到高分别计为0~3分)为标准计分,最后根据总分评价椎间盘的退变情况。

1.2.6 β -catenin 蛋白含量测定 采用 Western blot 方法,根据 BCA 方法测定 β -catenin 蛋白浓度。将样品制备后,通过 BCA 蛋白定量试剂盒(WellBiology),测定 β -catenin 浓度范围(操作按试剂盒指示说明依次操作),作为 Western blot 的参考。电泳分离蛋白,转膜 110 min,25 °C用 5%脱脂奶粉封闭 1 h。稀释一抗,4 °C过夜, β -catenin 稀释比例为 1:1 000, β -actin 稀释比例为 1:4 000,HRP 标识的二抗以 1:3 000 的比例混合稀释,室温下孵育 45~60 min。ECL 化学发光液(Thermo)与膜一起孵育 3 min 后,与 X 胶片在暗盒内片曝光数秒至数分钟;显影冲洗。将曝光后的底片扫描,并用 Quantity one 专业灰度分析软件进行分析,以 β -catenin 蛋白条带灰度与 β -actin 蛋白条带灰度的比值表示 β -catenin 蛋白的表达水平。

1.3 统计方法

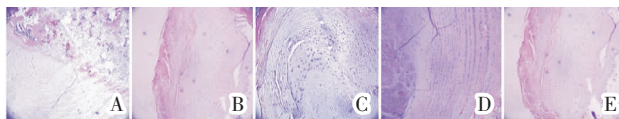
实验数据用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,所有数据均采用“ $\bar{x}\pm s$ ”表示。使用单因素的方差分析对比各组间的均数,如果满足正态性和方差齐性检验,采用单因素方差分析的最小二乘法(LSD法),行多组间均数的两两比较,方差不齐时,采用 *t* 检验。 $P < 0.05$ 时表示各组数据差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 光镜下各组大鼠椎间盘组织形态变化

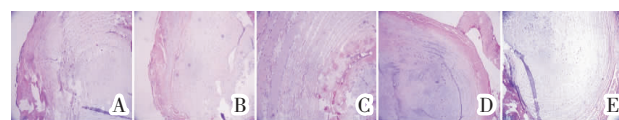
造模后,A、B组纤维环及髓核结构完整,排列规律;C、D、E组纤维环胶原纤维层及软骨排列杂乱,髓核皱缩(见图1)。灌胃4周后,A、B组椎间盘组织无明显变化;C组纤维层变薄,软骨细胞增多;D、E组纤维层变薄,无软骨细胞增生。灌胃8周后,A、B组胶原纤维及软骨细胞分层排列,髓核稍有脱

水;C组纤维环出现裂隙,软骨层钙盐沉积;D组纤维层逐渐被软骨细胞取代;E组纤维层维持排列。灌胃12周后,A、B组纤维层变薄,不规则排列;C组原纤维层骨化物生成,胶原纤维及髓核基本消失;D组钙盐沉积;E组纤维环破裂(见图2)。



注:A.空白组;B.假模型组;C.模型组;D.中药低剂量组;E.中药高剂量组

图1 造模后大鼠椎间盘组织形态结构光镜图(HE,×400)



注:A.空白组;B.假模型组;C.模型组;D.中药低剂量组;E.中药高剂量组

图2 灌胃12周后大鼠椎间盘组织形态结构光镜图(HE,×400)

2.2 各组大鼠椎间盘形态组织学评分

造模后,与空白组、假模型组对比,所有D-半乳糖致衰老大鼠椎间盘形态组织学评分均增加,差异具有统计学意义($P < 0.05$),表明衰老大鼠椎间盘退变,提示造模成功;灌胃4、8、12周后,与模型组比较,中药低剂量组及中药高剂量组大鼠椎间盘形态组织学评分降低,差异具有统计学意义($P < 0.05$),提示补肾活血汤能有效延缓大鼠椎间盘的退变。结果见表1。

表1 大鼠椎间盘形态组织学评分 ($\bar{x}\pm s, n=4, \text{分}$)

组别	造模后	灌胃4周	灌胃8周	灌胃12周
A(空白组)	0.50±0.58	0.75±0.50	1.00±0.00	1.25±0.25
B(假模型组)	0.25±0.50	0.50±0.58	1.00±0.00	1.00±0.57
C(模型组)	3.00±0.82 [#]	3.50±1.29*	4.75±0.96*	5.50±1.29*
D(中药低剂量组)	2.75±0.96 [#]	2.75±0.96* Δ	3.50±0.50* Δ	4.00±0.82* Δ
E(中药高剂量组)	2.50±0.58 [#]	2.75±0.96* Δ	3.25±0.50* Δ	3.75±0.50* Δ
F值	13.85	8.79	36.42	35.60
P值	0.00	0.00	0.00	0.00

注:造模后,与空白组、假模型组比较,[#] $P < 0.05$;灌胃4、8、12周后,与空白组、假模型组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$ 。

2.3 各组大鼠 β -catenin 蛋白相对表达水平对比

造模后:与空白组对比,假模型组 β -catenin 蛋白表达水平无明显差异;与空白组对比,模型组、中

药低剂量组、中药高剂量组中 β -catenin 蛋白表达水平明显增高,差异具有统计学意义($P<0.05$),说明造模成功,即 D-半乳糖能加速大鼠椎间盘退变。灌胃 4、8、12 周后:与空白组对比,模型组中 β -catenin 蛋白表达水平增高,差异具有统计学意义($P<0.05$),说明 D-半乳糖能加速大鼠椎间盘退变;与模型组对比,中药低剂量组、中药高剂量组中 β -catenin 蛋白表达水平降低,差异具有统计学意义($P<0.05$),说明补肾活血汤能减少大鼠椎间盘内 β -catenin 蛋白的含量,即能延缓大鼠椎间盘的退变;与中药低剂量组对比,中药高剂量组 β -catenin 蛋白表达水平降低,差异具有统计学意义($P<0.05$),说明高浓度补肾活血汤对大鼠椎间盘退变的治疗效果更好,进一步证明补肾活血汤对椎间盘退变的治疗意义。见表 2、图 3-图 7。

表 2 各组大鼠 β -catenin 蛋白相对表达水平(β -catenin/ β -actin)

组别	$(\bar{x}\pm s, n=4)$			
	造模后	灌胃 4 周	灌胃 8 周	灌胃 12 周
A(空白组)	0.41±0.01	0.44±0.01	0.46±0.01	0.48±0.01
B(假模型组)	0.41±0.01	0.44±0.01	0.47±0.02	0.48±0.01
C(模型组)	0.45±0.01 [#]	0.47±0.01 [*]	0.49±0.01 [*]	0.51±0.02 [*]
D(中药低剂量组)	0.47±0.01 [#]	0.43±0.01 ^{*△}	0.32±0.01 ^{*△}	0.25±0.01 ^{*△}
E(中药高剂量组)	0.45±0.01 [#]	0.35±0.01 ^{*△▲}	0.30±0.02 ^{*△▲}	0.22±0.01 ^{*△▲}
F 值	29.80	94.56	168.69	909.15
P 值	0.00	0.00	0.00	0.00

注:造模后,与空白组、假模型组比较,[#] $P<0.05$;灌胃 4、8、12 周后,与空白组、假模型组比较,^{*} $P<0.05$;与模型组比较[△] $P<0.05$;与中药低剂量组比较[▲] $P<0.05$ 。

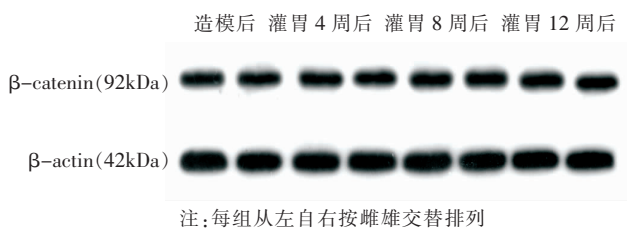


图 3 空白组雌雄大鼠 β -catenin 蛋白电泳图

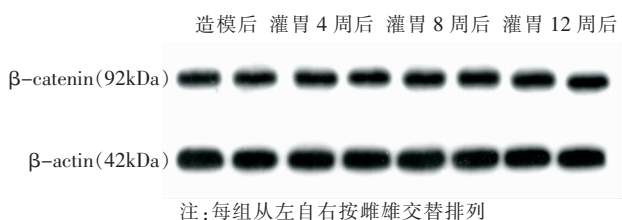


图 4 假模型组雌雄大鼠 β -catenin 蛋白电泳图

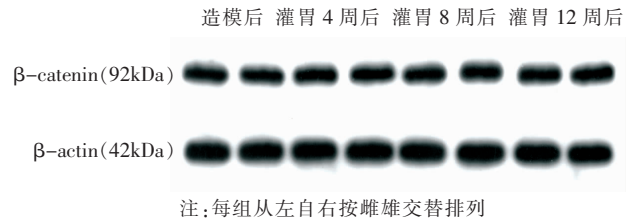


图 5 模型组雌雄大鼠 β -catenin 蛋白电泳图

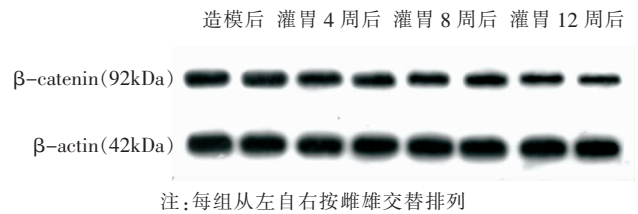


图 6 中药低剂量组雌雄大鼠 β -catenin 蛋白电泳图

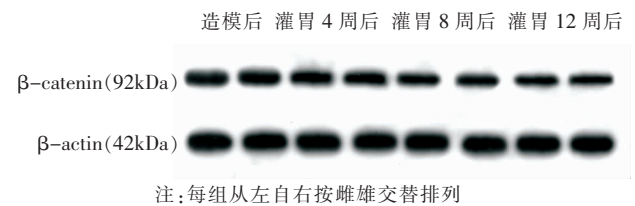


图 7 中药高剂量组雌雄大鼠 β -catenin 蛋白电泳图

3 讨论

Wnt/ β -catenin 信号通路是 Wnt 信号通路中的一个重要分支,是由 β -catenin 蛋白介导的,对细胞的增殖代谢及生长发育有着重要意义的调控系统。Wnt/ β -catenin 信号通路由 Wnt 配体,跨膜受体, β -catenin 蛋白及转录因子等组成。在静息状态下, β -catenin 蛋白被细胞质中的降解复合体不断的磷酸化,处于低浓度表达水平;Wnt 配体与跨膜受体结合后,将 β -catenin 蛋白从降解复合体中游离出来,使其在细胞内的表达水平增高,最终 β -catenin 蛋白进入细胞核,并激活下游的转录因子。通常认为 β -catenin 蛋白表达水平的增高是 Wnt/ β -catenin 信号通路激活的标志。目前较多的研究发现 Wnt/ β -catenin 信号通路能够调控软骨细胞的生存与代谢^[8-10]。椎间盘组织作为一个类软骨组织其软骨终板的退变与钙化正是椎间盘退变的表现形式之一,所以 Wnt/ β -catenin 信号通路的激活与椎间盘的退化有着必然的联系。Hiyama 等^[11]通过激活 Wnt/ β -catenin 信号通路,检测到椎间盘细胞基质金属蛋白酶的表达水平增高。因 MMPs 能够降解椎间盘细胞外基质中的

胶原纤维及蛋白多糖从而加快椎间盘的退变速度,提示 Wnt/ β -catenin 信号通路可能通过调控基质金属蛋白酶的表达水平,从而参与到椎间盘的退变过程之中。

在我国传统医学的认知中椎间盘退变性疾病属于“痹症”的范畴,常因风邪夹湿气或寒邪侵袭人体所致。《灵枢·百病始生》记载:“风雨寒热,不得虚,邪不能独伤人。”高龄人群因为年高体衰,肝肾不足,致使肝肾之精不能濡养筋骨,从而出现腰部疼痛,下肢酸软等症状。腰为肾之府,肾为先天之本,藏精主骨,为一身阴阳之根本;肝在体合筋,肝血充足则筋肉强劲有力,肢体活动自如。肝肾亏虚,不能滋养筋骨,筋骨萎弱,气行不畅,邪气入侵腰部,致使腰部长期疼痛不愈。所以本病之本为肝肾亏虚,其标为风寒湿邪、血瘀气滞、痰饮等^[12]。赵永华等^[13]认为腰椎间盘突出发病“肾虚”为本,“瘀血”为标,运用补肾活血针法能有效的缓解腰部疼痛。现代研究发现^[14]补肾活血汤能促进骨髓间充质干细胞的增值,并能降低炎症因子的表达。补肾活血汤为我国清代医家赵濂所著《伤科大成》所记载的经方,方中熟地黄、山茱萸为君药,益肾填精;杜仲、枸杞、肉苁蓉、补骨脂、菟丝子为臣药,温补元阳,使筋骨坚强;当归尾、没药、红花、独活为佐药,活血通络,祛风除湿。全方配伍严谨,以补肾温阳为主,兼以活血祛湿,扶正祛邪,标本兼顾。

本次实验通过检测 D-半乳糖连续注射后的大鼠椎间盘组织中的 β -catenin 水平,发现模型组中 β -catenin 蛋白的表达水平明显较空白组高 ($P < 0.05$),证明 Wnt/ β -catenin 信号通路确实参与到椎间盘的退变过程中,提示 Wnt/ β -catenin 的异常激活能加速椎间盘的退变。通过分别检测补肾活血汤灌胃 4、8、12 周后大鼠椎间盘组织中 β -catenin 表达水平,发现中药低剂量组与中药组高剂量组中 β -catenin 蛋白的表达水平明显较模型组低 ($P < 0.05$),表明经过补肾活血汤干预, β -catenin 蛋白在椎间盘组织细胞中的表达水平下调,补肾活血汤能够通过调控 β -catenin 蛋白的表达从而起到延缓椎间盘退变的治疗效果。综上所述,补肾活血汤能有效地降

低退变椎间盘中 β -catenin 蛋白的表达,从而抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路的激活,能有效地延缓椎间盘的退变。

参考文献:

- [1] 赵定麟.临床骨科学[M].北京:人民军医出版社,2003:806.
- [2] ZHANG Y, CHEE A, THONAR E J, et al. Intervertebral disk repair by protein, gene, or cell injection: a framework for rehabilitation-focused biologics in the spine [J]. PMR, 2011,3(6): 88-94.
- [3] 刘仁.D-半乳糖致衰老大鼠椎间盘退变及补肾活血汤干预的研究[D].长沙:湖南中医药大学,2014.
- [4] 冯帅华,姚红艳,吴官保,等.补肾活血法对去势大鼠腰椎间盘组织中 TNF- α 影响的实验研究 [J]. 湖南中医杂志,2015,31(11): 158-161.
- [5] 邱柏程,刘庆丰.D-半乳糖大鼠衰老模型的评价[J].广西医药杂志,2009,31(7):918-920.
- [6] MIYAMOTO S, YONENOBU K, ONO K. Experimental cervical spondylosis in the mouse.[J]. Spine, 1991, 16(16):495-500.
- [7] WANG WL, ABRANSON JH, GANGULY A,et al.The surgical pathology of notochordal remnants in adult intervertebral disk:a report of 3 case[J]. AM J Surg Pathol,2008,32(8):1003-1009.
- [8] NING B, WANG P, PEI X, et al. Dual function of β -catenin in articular cartilage growth and degeneration at different stages of postnatal cartilage development[J]. International Orthopaedics, 2012, 36(3):655-664.
- [9] WU Q Q, ZHU M, ROSIER R N, et al. β -catenin, cartilage, and osteoarthritis[J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 2010,1192(1):344-350.
- [10] YASUHARA R, OHTA Y, YUASA T, et al. Roles of β -catenin signaling in phenotypic expression and proliferation of articular cartilage superficial zone cells[J]. Laboratory Investigation, 2011, 91(12):1739.
- [11] HIYAMA A, SAKAI D, RISBUD M V, et al. Enhancement of Intervertebral Disc Cell Senescence by WNT/ β -Catenin Signaling-Induced Matrix Metalloproteinase Expression[J]. Arthritis & Rheumatism, 2010, 62(10):3036-3047.
- [12] 张健,周临东.中医药治疗腰椎间盘突出症的现状及机理探讨 [J].中医正骨,2011,23(10):26-28.
- [13] 赵永华,张其云,陈亚锋.补肾活血针法治疗腰椎间盘突出症临床观察[J].湖南中医药大学学报,2015,35(9):62-64.
- [14] 黄永铨,罗毅文,王斌,等.补肾活血汤提取物促进大鼠骨髓间充质干细胞增殖的研究[J].广州中医药大学学报,2015,32(1): 86-91.

(本文编辑 杨 璞)