

本文引用: 蔡楚豪, 展嘉文, 韩涛, 谢瑞, 张伟业, 王戈文, 朱立国. 补肾活血方对内源性“筋伤”腰椎失稳兔模型的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2023, 43(10): 1803-1808.

补肾活血方对内源性“筋伤”腰椎失稳兔模型的影响

蔡楚豪¹, 展嘉文², 韩涛², 谢瑞³, 张伟业², 王戈文², 朱立国^{2*}

1.北京中医药大学,北京 100015;2.中国中医科学院望京医院,北京 100015;3.北京中医医院顺义医院,北京 101300

[摘要] **目的** 探究补肾活血方对内源性“筋伤”腰椎失稳兔模型的影响。**方法** 22只健康新西兰兔行韧带损伤型“筋伤”腰椎失稳动物模型手术,造模后随机分为补肾活血方组和模型组,每组11只,另取11只健康新西兰兔为假手术组。补肾活血方组予补肾活血方中药溶液(生药 3.597 g·kg⁻¹·d⁻¹灌胃,每日给药1次),假手术组、模型组灌胃等体积的生理盐水,均灌胃8周。于造模前及造模后4、8周行X线透视,进行椎体水平位移、椎间高度指数(disc height index, DHI)测算;取新西兰兔完整腰椎椎间盘,行HE染色以及TUNEL染色,观察各组病理情况。**结果** 与假手术组比较,模型组椎体水平位移增加($P<0.05$)、DHI明显降低($P<0.05$)、椎间盘组织细胞凋亡率升高($P<0.05$)。与模型组比较,补肾活血方组第8周椎体水平位移减少($P<0.05$)、DHI升高($P<0.05$),椎间盘组织细胞凋亡率在第4、第8周均降低($P<0.05$)。**结论** 补肾活血方可能通过减小腰椎椎体水平位移,提高椎体的DHI,降低椎间盘组织细胞的凋亡率,对韧带损伤型“筋伤”腰椎失稳动物模型起治疗作用。

[关键词] 补肾活血方;退行性腰椎失稳;椎体水平位移;椎间高度指数;新西兰兔

[中图分类号]R285.5

[文献标志码]A

[文章编号]doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2023.10.008

Effects of Bushen Huoxue Formula on rabbit model with lumbar instability induced by endogenous "sinew injury"

CAI Chuhao¹, ZHAN Jiawen², HAN Tao², XIE Rui³, ZHANG Weiye², WANG Gewen², ZHU Ligu^{2*}

1. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100015, China; 2. Wangjing Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100015, China; 3. Shunyi Hospital, Beijing Hospital of Chinese Medicine, Beijing 101300, China

[Abstract] **Objective** To explore the effects of Bushen Huoxue Formula (BSHXF) on rabbit model with lumbar instability induced by endogenous "sinew injury". **Methods** A total of 22 healthy New Zealand rabbits were undergone ligamentous injury surgery to create an animal model with lumbar instability induced by "sinew injury". After modeling, the rabbits were randomly divided into BSHXF group and model group, with 11 rabbits in each. Another 11 healthy New Zealand rabbits were used as sham-operated group. BSHXF group was given medicinal solution of BSHXF (crude drug 3.597 g·kg⁻¹·d⁻¹ by gavage, once daily), while sham-operated group and model group were given the same volume of normal saline by gavage. All groups were treated for 8 weeks. X-ray examination was performed before and 4 and 8 weeks after modeling to measure the horizontal displacement of the vertebral body and the disc height index (DHI); the intact lumbar intervertebral discs taken from the New Zealand rabbits were stained with HE and TUNEL, through which the pathological conditions of each group were observed. **Results** Compared with

[收稿日期]2023-05-24

[基金项目]国家自然科学基金重点项目(81930118)。

[第一作者]蔡楚豪,男,硕士研究生,研究方向:脊柱退行性疾病。

[通信作者]*朱立国,男,博士,主任医师,博士研究生导师,E-mail:zhlg@aliyun.com。

sham-operated group, model group showed an increase in horizontal displacement of vertebral body ($P<0.05$) and a significant decrease in DHI ($P<0.05$), and higher apoptosis rate of intervertebral disc tissue ($P<0.05$). Compared with model group, BSHXF group showed a decrease in horizontal displacement of vertebral body ($P<0.05$) and an increase in DHI ($P<0.05$) at the 8th week, and lower apoptosis rate of intervertebral disc tissue at the 4th and 8th week ($P<0.05$). **Conclusion** BSHXF may have a curative effect on the rabbit model with lumbar instability induced by "sinew injury" by reducing the horizontal displacement of the lumbar vertebral body, increasing the DHI of the vertebra, and decreasing the apoptosis rate of intervertebral disc histocyte.

[**Keywords**] Bushen Huoxue Formula; degenerative lumbar spinal instability; horizontal displacement of the lumbar vertebral body; disc height index; New Zealand rabbit

退行性腰椎失稳 (degenerative lumbar spinal instability, DLSI) 是导致下腰痛 (low back pain, LBP) 的常见疾病, 患者以反复发作的腰痛, 时常伴有局部酸胀无力, 伴或不伴下肢放射痛为主要临床症状。该病病程迁延难愈, 对患者身心健康及生活质量造成负面影响, 是导致中老年人活动障碍的常见原因^[1-3]。据全球疾病负担研究结果显示^[4], 在所调查的 204 个国家范围内, 369 种疾病中, LBP 是导致全球负担升高的 10 个关键病种之一, 发病年龄呈年轻化趋势。有研究表明, 80% 的成年人曾受到腰痛的困扰^[5]。流行病学调查显示, 30% 的腰痛与腰椎失稳相关^[6-7]。随着我国人口逐渐老龄化, DLSI 将带来巨大的经济和社会负担。

近年来, 国内外对于 DLSI 的研究投入逐渐增加, 在该病影像学、病理学、生物力学、诊断学及治疗学等领域的相关研究正在逐步深入开展^[8-13]。现代研究普遍认为, 人体脊柱稳定性由两大部分组成: 一是内源性稳定, 包括椎体、附件、椎间盘、韧带, 维持静力平衡; 二是外源性稳定, 主要由肌肉调节和控制, 是脊柱活动的原动力, 维持着脊柱的动力平衡^[14]。《素问·痿论》指出: “宗筋主束骨而利关节也。” “筋” 的理论体系对中医骨伤科发展有着重要意义, 相关理论与现代医学对人体脊柱稳定系统的认识相类似。 “筋, 肉之力也” “诸筋者皆属于节”, 筋的主要功能为连属关节, 络缀形体, 主司关节运动。由此可见, 脊柱相关结构中的关节突、关节囊、韧带以及肌肉均发挥着 “筋” 的作用, 维持着脊柱的稳定与运动。中医学认为, 肝藏血, 主疏泄, 在体合筋。肾藏精, 肝肾同源, 精血同源, “筋” 发挥正常功能赖于精血的濡养, 而肝以血为体, 以气为用, 气帅血行, 使血脉通利, 不滞不瘀, 才能濡养筋骨肌肉。本研究团队前期以肾虚血瘀立法, 根据古方青娥丸加减形成的补肾活血方, 在临床中治疗腰痛类疾病取得了较好疗效^[15], 并且通过网络药理学初步探讨了补肾活血中药治疗 DLSI 的作用机制^[16]。因此, 本实验探究补肾活血方对内源性 “筋伤” 腰椎失稳的影响, 以期为该病的治疗提

供一定的理论依据。

1 资料与方法

1.1 实验动物

体质量为 2.5~3.0 kg, 4~6 月龄, 健康新西兰兔 33 只, 雌雄混合, 单独饲养于北京市昌扬西山养殖场, 许可证号: SCXK(京)2021-0008。自由饮食水及饲料, 环境温度为 20~25 ℃。

1.2 主要药物、试剂与仪器

补肾活血方药物组成: 杜仲 15 g, 补骨脂 10 g, 怀牛膝 10 g, 丹参 12 g, 威灵仙 10 g, 木瓜 9 g。按照补肾活血方原方用量制备药液 (由中国中医科学院望京医院中药房提供)。

伊红 (批号: MD23021607)、苏木素染液 (批号: MD23021607)、TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒 (批号: MD23032511) 均购自北京百奥思科生物医学技术有限公司。

石蜡切片机 (型号: RM2235)、加热石蜡包埋系统 (型号: G1150 H) 均购自北京百奥思科生物医学技术有限公司。

1.3 分组与造模

取 22 只健康新西兰兔, 根据施杞等^[17]与张鹏等^[18]报道的实验方法, 进行韧带损伤型 “筋伤” 腰椎失稳动物模型手术, 暴露出 L2~L6 棘突和腰背最长肌, 用刀柄沿椎板向两边将肌肉分开, 暴露出 L2~L6 椎板, 用小组织剪或手术刀切除 L2~L6 棘上韧带、棘间韧带, 切除关节突关节的部分关节囊, 造模动物出现椎体水平位移的数值增大、椎间高度指数 (disc height index, DHI) 减小, 提示造模成功^[19]。造模后的新西兰兔按照随机数字表法分为模型组、补肾活血方组, 每组 11 只。另取 11 只健康新西兰兔行造模手术相同的皮肤切口后立即缝合, 为假手术组。术后对实验兔按每千克体质量 20 U 给予青霉素, 每日肌肉注射 1 次, 连续注射 5 d。

1.4 给药方案

根据标准动物剂量折算表计算 (相当于临床等

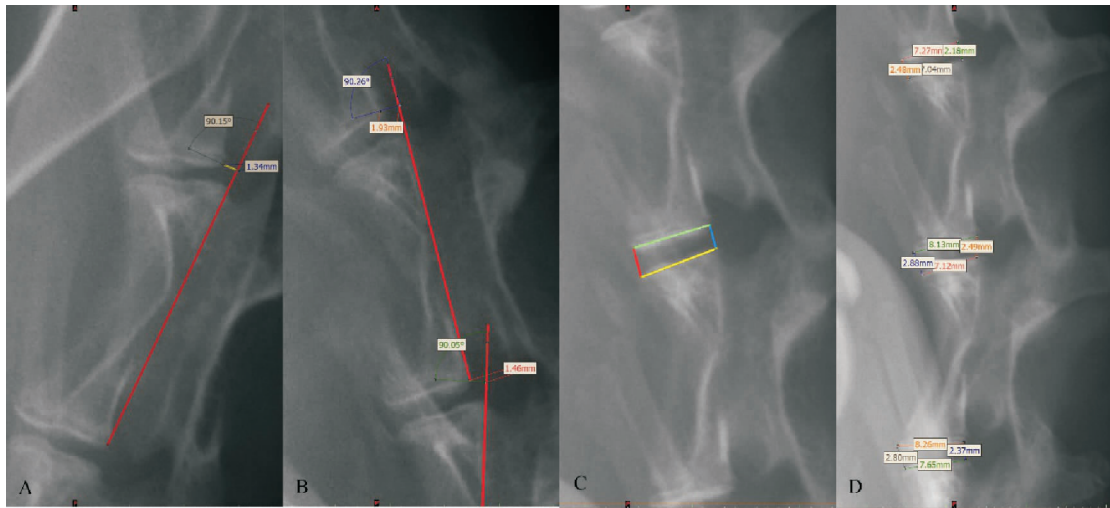


图1 腰椎影像学指标测量示意图

注:A、B为椎体水平位移测量示意图,红线为椎体后缘所在直线,图A短黄线表示上位椎体后下角距下位椎体后缘所在直线的距离;C、D为DHI测量示意图,四边形边长分别表示椎体间前侧高度、椎体间后侧高度、上位椎体下缘宽度、下位椎体上缘宽度。

效剂量):动物每日用药量=成人每日用药量/正常成人质量×换算常数×校正系数^[18],参照课题组前期实验给药方案,补肾活血方组新西兰兔按生药 $3.597\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 灌胃^[19],每日给药1次,自造模后连续给药8周。模型组与假手术组按同法灌服等体积的生理盐水。

1.5 观察指标

1.5.1 影像学指标 分别于术前、术后4周、术后8周每组取4只实验兔,进行影像学X线摄片。用实验兔固定装置固定实验兔头部,拍摄腰椎正、侧位X线片,进行椎体水平位移及DHI测量。

(1)椎体水平位移测量

在侧位X线片上,应用Mimics医学影像控制系统,测绘L1~L7椎体水平位移,即上位椎体后下角至下位椎体后缘连线的垂直距离(如图1A、B)。

(2)DHI测量

根据AKEDA等^[20]提出的DHI计算公式, $\text{DHI}=(\text{椎体间前侧高度}+\text{椎体间后侧高度})/(\text{上位椎体下缘宽度}+\text{下位椎体上缘宽度})$,如图1C所示。在实验兔X侧位片上,应用Mimics医学影像控制系统进行L1/2~L7/S1椎间盘相关数据参数测量,并计算DHI,作为反应具体椎间隙高度的指标(图1D)。

1.5.2 病理学检测

(1)HE染色

于第4、第8周随机取各组实验兔3只,空气栓塞处死后,取出腰段脊柱,切割、修整后得到完整椎间盘组织,进行HE染色。固定椎间盘组织,脱钙,乙醇浓度阶梯依次脱水,使用二甲苯溶液进行透明。

将浸蜡后的组织包埋于石蜡中,切片、铺片。贴片、烘片,脱蜡。苏木精染细胞核,伊红染细胞质。脱水封片,显微镜观察,最后进行图像采集分析。

(2)TUNEL染色

于第4、第8周随机取各组实验兔3只,空气栓塞处死后,取出腰段脊柱,切割、修整后得到完整椎间盘组织,进行TUNEL染色。脱蜡,蒸馏水洗脱。于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 蛋白酶K中孵育,洗涤蛋白酶K。加入TUNEL反应液, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光孵育,洗涤反应液。用抗荧光淬灭封片液封片后,于荧光显微镜下观察。

1.6 统计学方法

采用SPSS 20.0统计软件进行数据分析,结果以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,数据符合正态分布及方差齐性时,多组均数间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD法。数据不满足正态性时,使用非参数检验进行分析。以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组椎体水平位移比较

与假手术组比较,模型组、补肾活血方组第4、第8周椎体水平位移明显增大($P<0.05$);与模型组比较,补肾活血方组第8周椎体水平位移明显减小($P<0.05$)。详见表1。

表1 各组椎体水平位移比较($\bar{x}\pm s$, $n=4$, $\times 10^{-2}\text{ mm}$)

组别	术前	第4周	第8周
假手术组	42.44±14.30	41.28±16.23	46.01±18.45
模型组	39.66±12.53	63.42±17.11*	102.26±31.72*
补肾活血方组	39.30±15.32	63.52±22.43*	81.50±23.81*#

注:与假手术组相比,* $P<0.05$;与模型组相比,# $P<0.05$ 。

2.2 各组 DHI 比较

与假手术组比较,模型组第 4、第 8 周 DHI 明显减小($P<0.05$);与模型组比较,补肾活血方组第 8 周 DHI 明显增大($P<0.05$)。详见表 2。

表 2 各组 DHI 比较($\bar{x}\pm s, n=4, \%$)

组别	第 0 周	第 4 周	第 8 周
假手术组	36.18±3.25	36.12±6.27	34.12±3.84
模型组	35.87±2.86	33.03±3.63*	29.66±3.02*
补肾活血方组	35.95±3.58	35.21±3.54	32.83±3.84#

注:与假手术组相比,* $P<0.05$;与模型组相比,# $P<0.05$ 。

2.3 各组椎间盘组织细胞凋亡率比较

与假手术组比较,第 4、第 8 周模型组、补肾活血方组椎间盘组织细胞凋亡率明显增大($P<0.05$);与模型组比较,第 4、第 8 周补肾活血方组椎间盘组织细胞凋亡率明显减小($P<0.05$)。详见表 3、图 2。

表 3 各组椎间盘组织细胞凋亡率比较($\bar{x}\pm s, n=3, \%$)

组别	第 0 周	第 4 周	第 8 周
假手术组	36.58±7.55	31.26±0.16	40.33±6.25
模型组	36.58±7.55	55.98±1.32*	63.24±1.53*
补肾活血方组	36.58±7.55	47.8±3.19*#	52.1±2.12*#

注:与假手术组相比,* $P<0.05$;与模型组相比,# $P<0.05$ 。

2.4 各组 HE 染色结果

第 4 周时,假手术组椎间盘相对完整,形态正

常,纤维环排列规整,髓核含丰富的软骨细胞,基质中可见大液泡;模型组可见纤维环排列紊乱;补肾活血方组较模型组纤维环排列更规整。第 8 周时,随着自然退变,假手术组椎间盘组织切片标本可见纤维环排列存在一定程度的紊乱;模型组椎间盘纤维环退变较其他两组更明显,纤维环排列紊乱且存在缝隙,髓核皱缩,基质较少;补肾活血方组与模型组比较,纤维环裂隙较少,与髓核交界区更清楚,髓核基质更多。详见图 3。

2.5 各组腰椎侧位片观察

观察对比各组第 4 周拍摄的 X 线片,未见明显差异。对比第 8 周 X 线侧位片,与假手术组相比,补肾活血方组、模型组均有明显的骨质增生,可见一定的椎体滑移表现,模型组可见椎间隙变窄。详见图 4。

3 讨论

DLSI 的主要临床症状为腰痛或下肢疼痛,属于中医学“腰痛”“腰痹”等范畴。随着年龄增加,肝肾亏虚,或长期劳伤,或外邪侵袭等,出现局部气血瘀滞,筋骨失衡,从而产生疼痛与失稳。其中肾虚为关键病机。中国中医科学院望京医院朱立国教授根据《太平惠民和剂局方》中的青娥丸,结合自身临床经验加减化裁,形成补肾活血方,全方补肾助阳、强筋健骨、活血通络,标本兼治,用于治疗临床肾虚血瘀型腰痛。

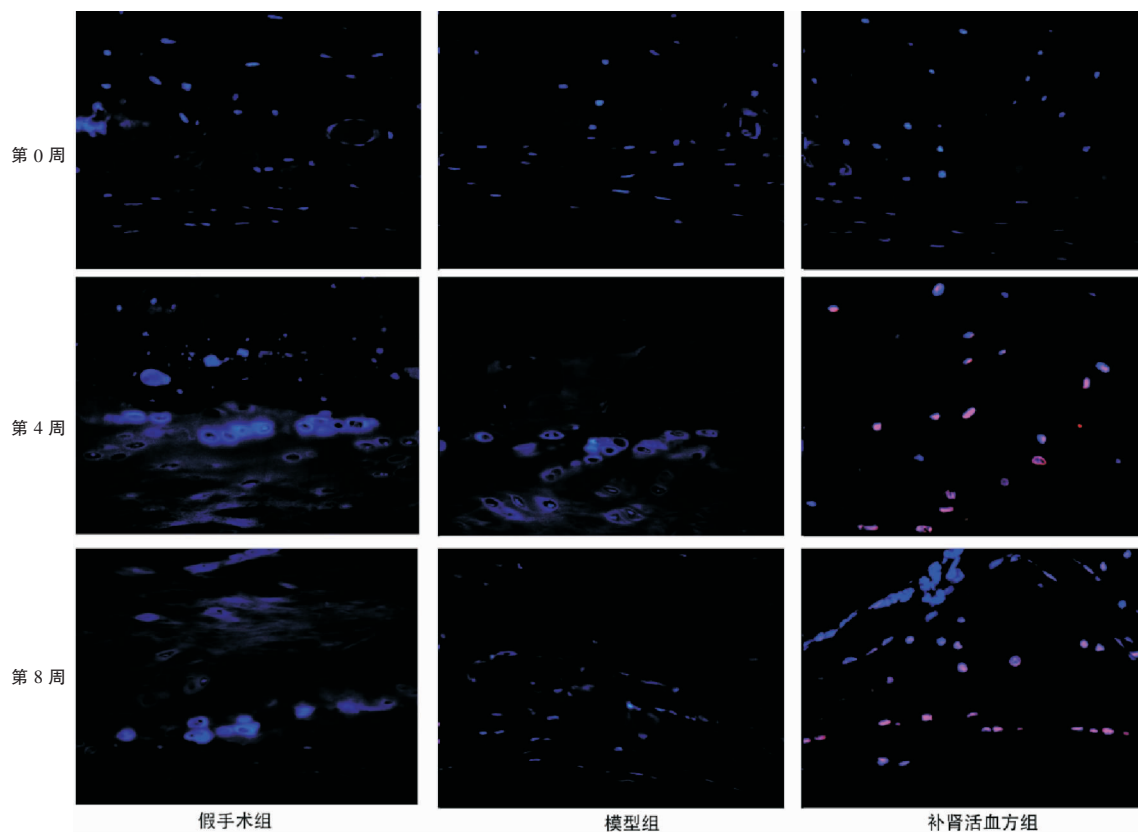


图 2 第 0、第 4、第 8 周时各组椎间盘组织 TUNEL 染色图片($\times 400$)

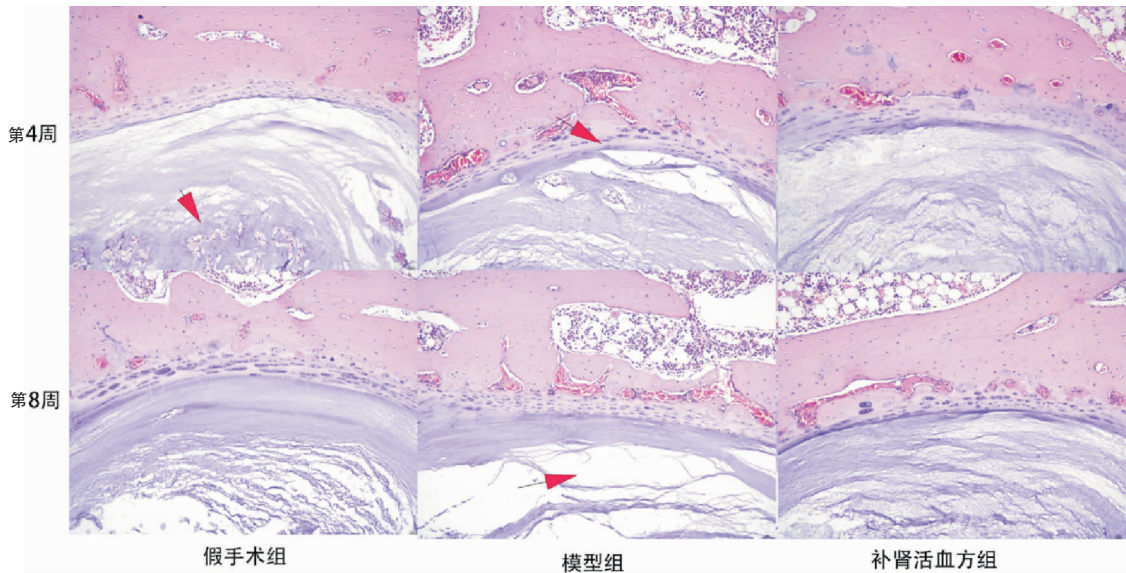


图3 第4、第8周时各组实验兔椎间盘 HE 染色图(×100)

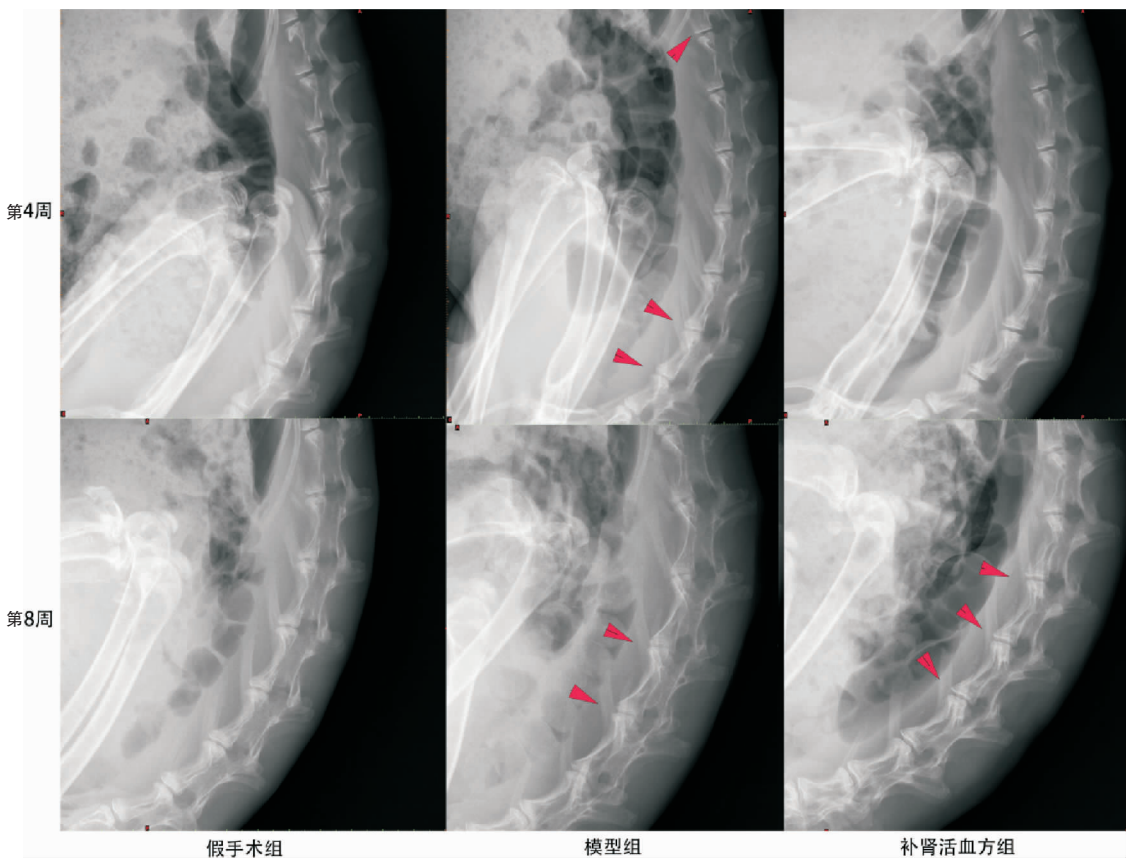


图4 第4、第8周时各组实验兔腰椎侧位 X 线片

方中盐杜仲为君药,其性温,助阳补虚,主入肝肾二经,可补肝肾、强筋骨。臣药为补骨脂与牛膝,一方面辅杜仲补肾温阳,补骨脂辛热香燥,苦甘并存,能补能涩,强腰固精,能治风冷侵袭之腰膝冷痛;另一方面,助君药发挥补肝肾、强筋骨之功效,且牛膝归肝肾二经,可治腰膝酸痛、筋骨无力,亦可活血化瘀、通经止痛。佐使药丹参、威灵仙、木瓜,丹参可佐助牛膝活血化瘀,其性微寒,避免全方一味温补;威灵

仙辛散温通,性猛善走,通行十二经脉,通络止痛,驱散风湿外邪;木瓜舒筋活络,驱散风湿外邪。

目前普遍认为,椎间盘的变性与腰椎不稳直接相关,椎间盘变性是腰椎不稳的诱发因素^[21]。本研究结果显示,补肾活血方组椎间盘组织细胞凋亡率在第4、第8周均低于模型组。椎间盘内大量的细胞凋亡可使椎间盘内环境的平衡被破坏,加速椎间盘退变的进程^[22]。在第8周时,补肾活血方组椎体水平位

移较模型组更小, DHI 较模型组更高。椎间盘退变是导致腰椎失稳的重要病理因素^[23], 一定程度的椎间盘高度下降使椎间关节以及韧带松弛, 失去维持稳定的必要张力, 会导致椎体滑移和动力不稳^[21]。综合实验结果, 认为补肾活血方干预可延缓内源性“筋伤”腰椎失稳新西兰兔模型的退变失稳进展。

本研究在模型的建立上存在不足, 兔作为四足行走的哺乳动物, 脊柱节段在数量和结构方面与人体有着一定差异, 人类脊柱相关的腰痛症状的发生, 与直立行走活动时, 腰椎受到的应力刺激有关。有研究^[24]设计了无创性脊柱轴向加压的方法来建立实验兔椎间盘退变模型, 在今后腰椎失稳相关的实验研究中, 建立动物模型时可与之合理结合, 加以创新, 使模型更接近人类腰椎退变情况。本实验研究主要采用破坏韧带等组织结构, 即破坏静力平衡的方式, 造成实验兔腰椎失稳的模型。今后可行进一步实验, 增设破坏脊柱动力平衡的分组, 对比观察补肾活血方对其的影响。

参考文献

- [1] 张 鹏, 江蓉星, 江应政, 等. 腰椎力学失衡与椎间盘退变的机理研究[J]. 成都中医药大学学报, 2007, 30(3): 32-35.
- [2] MITCHELL UH, HURRELL J. Clinical spinal instability: 10 years since the derivation of a clinical prediction rule. A narrative literature review[J]. Journal of Back and Musculoskeletal Rehabilitation, 2019, 32(2): 293-298.
- [3] 杜玲怡, 樊天佑, 王亚伦, 等. 功能性腰椎不稳诊断研究进展[J]. 陕西医学杂志, 2021, 50(5): 634-637, 641.
- [4] GBD 2019 Diseases and Injuries Collaborators. Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990-2019: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019[J]. Lancet, 2020, 396(10258): 1204-1222.
- [5] BORENSTEIN D G. Epidemiology, etiology, diagnostic evaluation, and treatment of low back pain[J]. Current Opinion Rheumatology, 1999, 11(2): 151-157.
- [6] 彭 兵, 程招军, 胡 炜, 等. 中老年腰痛患者退行性腰椎不稳的相关因素分析[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2018, 26(5): 14-18.
- [7] IZZO R, GUARNIERI G, GUGLIELMI G, et al. Biomechanics of the spine. Part II: spinal instability[J]. European Journal of Radiology, 2013, 82(1): 127-138.
- [8] WANG Y, HUANG K. Research progress of diagnosing methodology for lumbar segmental instability: A narrative review[J]. Medicine, 2022, 101(1): e28534.
- [9] 李棋龙, 陈忠仪, 吕倩忆, 等. 基于有限元模型探讨不同角度肘按法对腰椎间盘位移的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2021, 41(8): 1223-1229.
- [10] 周智毅, 王建伟, 张亚峰, 等. 关节突关节退变与腰椎不稳症关系的研究进展[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2018, 26(7): 81-83, 88.
- [11] 谢 瑞. 基于筋伤理论探讨退行性腰椎失稳的力学、病理学机制及手法干预研究[D]. 北京: 中国中医科学院, 2021.
- [12] 麦敏军, 黄尚君, 古 波, 等. 腰椎定位斜扳法治疗腰椎失稳[J]. 中医正骨, 2018, 30(4): 19-22, 27.
- [13] 王瑞阳, 茹 能, 向清华, 等. 腰椎不稳的影像学研究进展[J]. 临床医学研究与实践, 2023, 8(13): 187-190.
- [14] 詹红生, 石印玉, 张明才, 等. 基于“骨错缝、筋出槽”病机认识的椎间盘病症诊治新观点[J]. 上海中医药杂志, 2007, 41(9): 4-6.
- [15] 朱立国, 展嘉文, 冯敏山, 等. 补肾活血方治疗椎间盘源性腰痛临床观察[J]. 世界中医药, 2017, 12(3): 554-557.
- [16] 谢 瑞, 朱立国, 于 杰, 等. 基于网络药理学探讨补肾活血中药治疗退行性腰椎失稳症的作用机制研究[J]. 世界中西医结合杂志, 2020, 15(11): 1992-1997, 2006.
- [17] 施 杞, 郝永强, 彭宝淦, 等. 动静力平衡失调与颈椎病: 颈椎病动物模型的实验研究[J]. 上海中医药大学学报, 1999, 13(1): 52-56.
- [18] 黄继汉, 黄晓晖, 陈志扬, 等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9(9): 1069-1072.
- [19] 展嘉文, 朱立国, 冯敏山, 等. 补肾活血方含药血清对离体兔脊柱运动节段压力退变模型的影响 [J]. 中国骨伤, 2018, 31(7): 627-634.
- [20] AKEDA K, YAMADA T, INOUE N, et al. Risk factors for lumbar intervertebral disc height narrowing: A population-based longitudinal study in the elderly[J]. BMC Musculoskelet Disord, 2015, 9(16): 344.
- [21] 李翔宇, 孙祥耀, 孔 超, 等. 退行性腰椎不稳发病相关的结构因素及治疗研究进展[J]. 中国骨与关节杂志, 2019, 8(6): 439-443.
- [22] SHEN J, XU S, ZHOU H, et al. IL-1 β induces apoptosis and autophagy via mitochondria pathway in human degenerative nucleus pulposus cells[J]. Scientific Reports, 2017, 25(7): 41067.
- [23] 李浩鹏, 杨保辉, 张国安, 等. 退行性腰椎不稳发病相关因素的临床研究[J]. 实用骨科杂志, 2009, 15(5): 339-341.
- [24] 白雪东. 无创性轴向载荷建立兔腰椎间盘退变动物模型及其退变机制探索[D]. 西安: 第四军医大学, 2016.

(本文编辑 周 旦)