

## ◆实验研究论著◆

## 铁包金按摩膏对腰椎间盘突出症大鼠腰背脊神经根中 PLA2 影响的实验研究

蔡萍<sup>1</sup>, 戎宽<sup>1</sup>, 杨惠<sup>2</sup>, 胡余飞<sup>2</sup>, 匡建军<sup>1</sup>

1. 湖南省中医药研究院, 湖南 长沙 410006; 2. 湖南中医药大学, 湖南 长沙 410208

**[摘要]** 目的: 观察铁包金按摩膏对腰椎间盘突出症(LDH)大鼠突出的椎间盘节段脊神经根中磷脂酶 A2 (PLA2) 的调节作用。方法: 健康 SD 大鼠 48 只, 采用随机数法将大鼠分为空白组、铁包金组、狗皮膏组和模型组, 每组 12 只。采用注射法建立非压迫型腰椎间盘突出大鼠模型, 造模成功后分别对各组进行相应处理: 空白组模拟手术后正常饲养; 铁包金组予铁包金按摩膏局部治疗; 狗皮膏组采用狗皮膏外贴治疗; 模型组给予凡士林局部对比治疗; 分别测量治疗 1 周、2 周、3 周后各组 LDH 大鼠相应椎间盘节段脊神经根中 PLA2 的活性并对数据进行统计学分析。结果: 给药 1 周、2 周、3 周, 各组 PLA2 活性均高于空白组 ( $P < 0.05$ )。给药 2 周, 铁包金组、狗皮膏组均低于模型组 ( $P < 0.05$ ); 给药 3 周铁包金组、狗皮膏组 PLA2 均低于给药 1 周 ( $P < 0.05$ )。结论: 铁包金按摩膏具有降低非压迫性髓核突出大鼠模型相应节段脊神经根中 PLA2 活性的作用。

**[关键词]** 腰椎间盘突出症; 铁包金按摩膏; 大鼠; 磷脂酶 A2 (PLA2)

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2015) 11-0194-03

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2015.11.087

## Research of Gold Plated Iron Massage Cream on PLA2 in Intervertebral Disc Segmental Spinal Nerve Root of Rat Models of Lumbar Disc Herniation

CAI Ping, RONG Kuang, YANG Hui, HU Yufei, KUANG Jianjun

**Abstract:** Objective: To Investigate the regulating effect of Gold plated iron massage cream on Phospholipase A2 (PLA2) in intervertebral disc segmental spinal nerve root of rat models of lumbar disc herniation(LDH). Methods: Forty healthy SD rats, using random numbers, were divided into the blank group, gold plated iron massage cream(GP)group, dog-skin plaster (DP) group and the model group, 12 cases in each group. Injection was adopted to establish the non-pressure lumbar nucleus pulposus prominent rat model. After the success of building models, each group was treated corresponding processing respectively: The GP group with local treatment of GP, the DP group with DP stick, the model group with Vaseline treatment. The blank group normally fed without injection. The active of PLA2 in intervertebral disc segmental spinal nerve root was detected 1-week, 2-week, 3-week after treatment. Results: The active of PLA2 in each group 1-week, 2-week, 3-week after treatment was higher than that in the blank group( $P < 0.05$ ). In GP group and DP group, the active of PLA2 2-week, 3-week after treatment was lower than that in the model group. That 3-week in GP group and DP group after treatment was lower than that 1-week in GP group and DP group( $P < 0.05$ ). Conclusion: GP can effectively decrease PLA2 in non-pressure lumbar nucleus pulposus prominent rat model.

**Keywords:** Lumbar disc herniation (LDH); Gold plated iron massage cream; Rats; Phospholipase A2(PLA2)

腰椎间盘突出症(lumbar intertebal disc hemiationn, LDH)是在椎间盘发生退行性改变的基础上, 纤维环破裂, 髓核突出刺激或压迫神经根、马尾神经或脊髓所表现的一种综合征, 是腰痛和坐骨神经痛的常见病因之一, 也是骨科常见

**[收稿日期]** 2015-03-29

**[基金项目]** 湖南省科技厅 (2013SK3108); 杨永华全国名老中医药专家传承工作室

**[作者简介]** 蔡萍 (1975-), 女, 副研究员, 主要从事中药资源、中药制剂及质量标准研究。

**[通讯作者]** 匡建军, E-mail: 973541411@qq.com.

病、多发病<sup>[1]</sup>。本实验通过观察铁包金按摩膏对 LDH 大鼠突出的椎间盘节段脊背神经根中磷脂酶 A2(PLA2)的调节作用,为铁包金按摩膏提供实验依据。

## 1 材料与方法

1.1 试剂与仪器 PLA2 试剂盒由美国的 R&D systems 公司(批号 803217)提供。冻存管,型号:IMCE,规格:1 mL。亚西牌液氮生物容器:川食药械监督生产。超低温实验室冰箱:型号:Ultra-Low,公司:中科美菱科技有限公司。高速电动匀浆器:型号:FSH-II 型,公司:江苏金坛市环宇科学仪器厂。台式高速冷冻离心机:型号:Neofuge 23R;移液枪:规格:20~200  $\mu$ L,美龙科技有限公司;数显恒温水箱:型号:HH-S1,常州恒隆仪器有限公司;自动酶标仪:型号:Synergy HT,公司:USA BioTek;全自动速冻脱水机:型号:LEICAAPS200S,武汉中纪科学仪器有限公司;其他:组织剪、咬骨钳、持针器、缝针、量杯、注射器、微量进样器等均由湖南中医药研究院提供。

1.2 动物分组及处理 选择健康 SD 大鼠 48 只,雌雄各半,体重 200~220 g 由湖南中医药研究院实验动物中心提供,合格证号(20041028)。将上述 48 只 SD 大鼠按雌雄分别称重,并按体重大小标记编号;用随机数字表法分为模型组、铁包金按摩膏(铁包金)组、狗皮膏组、空白组(假手术组),每组 12 只。大鼠神经根模型建立<sup>[2]</sup>:取模型组、铁包金组、狗皮膏组大鼠共 36 只,体重约 200 g。自体髓核制备:1%氯胺酮 50 mg/kg 腹腔麻醉,对大鼠被毛,消毒,铺巾,距尾根 1cm 处剪短尾巴并缝合,切开尾椎取出 5 个髓核约 50 mg 放置于无菌 0.5 mL EP 管中加入 50  $\mu$ L 生理盐水充分搅拌成混悬液备用(备用悬浊液置于 0℃冰箱暂存)。模型建立:大鼠均采用右屈曲侧卧位,以腰椎 4、5 棘突间为穿刺点,被毛常规皮肤络合点消毒,消毒完毕后沿腰 4、5 棘间穿刺点用 9 号穿刺针行硬膜外穿刺,进针时垂直穿透皮肤后针尖向尾椎方向倾斜约 75°角缓慢进针,进针深度约 3 mm 后可有落空感;穿刺成功后取出穿刺针内芯管,用微量注射器先注入 20  $\mu$ L 髓核混悬液,接着注入 30  $\mu$ L 2%利多卡因。用 1%氯胺酮 50 mg/kg 腹腔注射可使大鼠麻醉约 30 min。假手术组按上述造模准备方法,切除尾椎,硬膜外穿刺成功后依次注射 20  $\mu$ L 生理盐水及 30  $\mu$ L 2%利多卡因。术后注射青霉素 4.4 万 U/d 预防感染。造模成功判定:麻醉持续约 30 min 后恢复,观察如果造模大鼠双前肢活动自如双后肢活动功能减退或消失,继续观察 20~30 min 后完全恢复则表明硬膜外注射成功。术后 3 天给予青霉素肌注,4.4 万 U/d(按《动物实验学》2.2 万 U/100 g)预防感染。给药方法:正常饲养后根据体表换算方法,取同等治疗量(相当于临床等效剂量)药物(参照《中药药理实验方法学》的方法换算透皮贴剂的有效药物浓度,计算出用药量约合 6.25 g/kg)涂抹于给药部位,并轻揉数分钟。每天用药一次(模型组给与相应量凡士林)。每次给药部位及面积为以腰 4、5 棘

突间为中心做半径 1.5 cm 的圆。空白组假手术后不作外用药处理。

1.3 PLA2 的检测 取材方法:上述 4 组分别于术后 7 天、14 天、21 天各随机取 4 只大鼠,10%水合氯醛(300~350) mg/kg 腹腔注射深度麻醉后取材。取出腰 5 背根神经节组织,放入 4%的多聚甲醛中固定,取出相应节段对侧神经根组织约 20mg,置于 1 mL 的冻存管中,予以液氮速冻,-80℃下保存待测。检测方法:采用微孔比色法测定组织中 PLA2 的活性。将所需试剂及待测样本置于 37℃恒温水浴育温 10 min。取相应数量聚苯乙烯板,3 小孔为一单元每小孔分别标注为测定孔、对照孔、空白孔。分别于测定孔中加入工作液 160  $\mu$ L,样本 40  $\mu$ L;对照孔中加入对照液 160  $\mu$ L,样本 40  $\mu$ L;空白孔中加入基础液 160  $\mu$ L,蒸馏水 40  $\mu$ L;37℃恒温箱中温育 60 min。取出聚苯乙烯板,于自动酶标检测仪中空白孔调零,于波长 410 nm 上读取各孔的 OD 值。样品的 PLA2 活性可根据其 OD 值由标准曲线及回归方程式换算出相应的活性。酶活力计算:A 单元 PLA2 活力(IU/mL)=12.25×(A 测定孔值-A 对照孔值)。

1.4 统计学方法 应用 SPSS19.0 统计学软件进行分析,实验结果所有数据均采用( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组间均数比较用单因素方差分析,组间两两比较方差齐者用 LSD 检验。

## 2 结果

2.1 一般情况 实验过程中,铁包金组有 1 只大鼠正常麻醉剂量下死亡,考虑个体差异所致,这与实验过程中观察到有极个别大鼠麻醉剂量甚至超出正常 2/3 情况类似;空白组 1 只大鼠手术后观察发现右后肢功能散失,术后一天无明显恢复迹象,考虑注射损伤右侧脊背神经根可能;手术后各组大鼠未出现伤口大量流血或伤口感染现象;各组治疗期间未有大鼠出现死亡。造模及治疗 1 周结束后,各组大鼠数量如下:空白组 11 只、狗皮膏组 12 只、模型组 12 只、铁包金组 11 只。造模结束后各组大鼠均未出现双后肢活动障碍、爬行异常或跛行的现象,运动损害功能评分计 0 分。

2.2 各组 PLA2 活性比较 见表 1。给药 1 周、2 周、3 周,各组 PLA2 活性均高于空白组( $P < 0.05$ )。给药 2 周,铁包金组、狗皮膏组均低于模型组( $P < 0.05$ );给药 3 周铁包金组、狗皮膏组 PLA2 均低于给药 1 周( $P < 0.05$ )。

		表 1 各组 PLA2 活性比较( $\bar{x} \pm s$ )			IU / mL
组别	样本数	1 周	2 周	3 周	
空白组	11	2.22±0.89	2.29±0.86	1.92±0.80	
铁包金组	11	8.67±1.46	6.41±0.98	4.24±0.95	
狗皮膏组	12	9.06±1.57	6.30±0.89	4.07±0.89	
模型组	12	12.15±1.53	11.74±1.05	10.03±0.76	

与空白组比较,① $P < 0.05$ ;与模型组比较,② $P < 0.05$ ;与 1 周比较,③ $P < 0.05$

### 3 讨论

LDH 属于中医学腰痛范畴,病机多从脏腑、运气理论及经络理论阐述,病因多与外伤、慢性劳损、外感风寒湿热之邪有关。中医治疗腰痛辨证主要为血瘀、寒湿、湿热、肝肾亏虚。治疗上以内以中药汤剂,疏经活络、调气和血、补肾强筋;外敷膏散之剂,活血散瘀、软坚散结、祛风止痛;辅以针灸推拿理伤手法,整脊、梳肌、复原止痛,对腰痛引起的一系列症状起到了很好的治疗作用。因此从中医学宝库中挖掘能进一步提高防治 LDH 的药物、方法,是医学工作者的一个重大研究方向。

椎间盘突出的概念首先由 Goldthwaitn<sup>[4]</sup>依据临床经验在 1911 年提出。临床上治疗采取单纯以解除椎间盘突出压迫为主的椎间盘切除术并不能全部有效缓解疼痛,然而一些服用非甾体类抗炎镇痛药的患者症状却能得到明显的缓解,提示炎症因子在 LDH 中可能发挥着重要作用。因此如何消除这些炎症介质及细胞因子,减轻神经根炎症反应成为治疗 LDH 的关键。

本实验动物模型,模拟了 LDH 中髓核对脊神经根化学性刺激的病理改变;结果模型组大鼠脊背神经根中 PLA2 活性明显升高,与空白组比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );铁包金组、狗皮膏组在 1、2、3 周均有降低脊背神经根中 PLA2 活性的作用,与模型组比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。狗皮膏组与铁包金组比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。铁包金按摩膏与狗皮膏均能降低相应节段脊背神经根中 PLA2 的活性,提示铁包金按摩膏对 LDH 的作用机制之一与 PLA2 的活性有关。

利用实验动物模型模拟 LDH 症状是目前相关实验的一个难题。其中包括两项重要原因:一是突出髓核的直接压迫改变导致的受压神经根缺血缺氧改变;二是突出髓核免疫源性引起的神经激惹症状<sup>[5]</sup>。两种发病因素很难在一个动物模型中兼顾,因此本实验验证铁包金按摩膏治疗 LDH 对炎症因子 PLA2 的作用机制具有局限性,但是对研究外用药物治疗 LDH

机理研究有重要意义;铁包金按摩膏是在传统按摩手法与中医外用膏药结合的创新思想下产生的,本实验未对其进行分述研究,因此不能说明铁包金膏药与手法按摩之间的关系。

综上,铁包金按摩膏对 LDH 的机制还需要进一步深入研究。本实验通过采用自体髓核注射法建立大鼠 LDH 神经根刺激模型,方法可靠,操作相对简单。实验证明了铁包金按摩膏具有降低非压迫性髓核突出大鼠模型脊背神经根中 PLA2 活性的作用,这可能是其在临床上发挥治疗 LDH 的作用机制之一。目前对 LDH 引起腰腿痛的炎症及免疫机制中的启动环节研究甚少。寻找生物学炎症反应瀑布效应的上游机制,并对上游因素进行干预,对腰椎间盘突出源性腰腿痛更早起到治疗作用意义重大。这也符合现代医学早期干预、预防为主防治思想。

### [参考文献]

- [1] 吴在德,吴肇汉.外科学[M].7版.北京:人民卫生出版社,2008:850.
- [2] 陆志东,金群华,陈志荣.大鼠非压迫性髓核突出模型的建立[J].中国矫形外科杂志,2003,11(19):1361-1363.
- [3] Chatani K, Kawakami M, Weinstein JN, et al. Characterization of thermal hyperalgesia, c-fos expression, and alterations in neuropeptides after mechanical irritation of the dorsal root ganglion[J]. Spine, 1995, 20(3): 277-289.
- [4] 胡有谷.腰椎间盘突出症[M].3版.北京:人民卫生出版社,2004:2.
- [5] 杨明,杨虹,陈锦香.地龙提取液对兔急性脑缺血再灌注损伤的保护作用[J].吉林医学,2011,32(19):3847-3848.

(责任编辑:骆欢欢)