

益肾养髓方对脊髓型颈椎病大鼠脊髓中星形胶质细胞过度增殖的影响

秦晓宽¹, 银河¹, 杨博文¹, 金哲峰¹, 唐彬¹, 刘志伟¹, 陈忻¹, 朱立国^{1,2} (1. 中国中医科学院望京医院, 北京 100102; 2. 中医正骨技术北京市重点实验室, 北京 100007)

摘要: 目的 观察益肾养髓方对脊髓慢性压迫大鼠脊髓(C₅~C₇)中胶质纤维酸性蛋白(glia fibrillary acidic protein, GFAP)mRNA 表达量及 GFAP 蛋白表达和分布的影响, 以探讨益肾养髓方对脊髓型颈椎病(Cervical Spondylotic Myelopathy, CSM)大鼠脊髓中星形胶质细胞过度增殖和胶质瘢痕形成的作用。方法 将 56 只健康雌性 SD 大鼠随机分为正常组、假手术组、模型组、阳性对照组及益肾养髓方低、中、高剂量组, 每组 8 只。模型组、益肾养髓方各剂量组及阳性对照组大鼠采用吸水膨胀材料压迫脊髓建立脊髓型颈椎病大鼠模型, 假手术组仅手术暴露脊髓。手术后 2 周, 益肾养髓方不同剂量组采用中药水煎剂灌胃, 阳性对照组采用单唾液酸四己糖神经节苷脂钠肌注, 其余组采用生理盐水灌胃, 每日 1 次, 连续 4 周。于给药后第 1、3、7、14、21、28 天进行大鼠运动功能评价(BBB 评分)。术后 6 周时 HE 染色观察脊髓组织结构, RT-qPCR 法检测大鼠脊髓 GFAP 的 mRNA 表达, 免疫荧光观察 GFAP 蛋白表达。结果 灌胃后益肾养髓方各组及阳性对照组大鼠 BBB 评分明显高于模型组, 差异具有统计学意义($P < 0.05$), 说明益肾养髓方对改善脊髓型颈椎病大鼠脊髓功能有一定疗效。HE 染色益肾养髓方各组及阳性对照组可见脊髓组织中瘢痕、空洞变少, 胞浆逐渐增多, 神经细胞形态接近假手术组。RT-qPCR 及免疫荧光结果提示模型组 GFAP mRNA 及蛋白表达升高($P < 0.05$), 益肾养髓方各组及阳性对照组可降低其表达, 与模型组比差异具有统计学意义($P < 0.05$)。结论 益肾养髓方可降低脊髓慢性压迫性损伤大鼠脊髓中 GFAP 的表达, 从而减少胶质瘢痕的形成, 促进大鼠后肢运动功能恢复。

关键词: 益肾养髓方; 脊髓型颈椎病; 慢性脊髓损伤; 星形胶质细胞; 过度增殖; 胶质瘢痕; 胶质纤维酸性蛋白(GFAP); 大鼠

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1003-9783(2022)02-0173-07

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2022.02.005

Effect of Yishen Yangsui Formula on Hyperproliferation of Astrocytes in Spinal Cord of Rats with Cervical Spondylotic Myelopathy

QIN Xiaokuan¹, YIN He¹, YANG Bowen¹, JIN Zhefeng¹, TANG Bin¹, LIU Zhiwei¹, CHEN Xin¹, ZHU Ligu^{1,2} (1. Wangjing Hospital of China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100102, China; 2. Beijing Key Laboratory of Orthopedics of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100007, China)

Abstract: **Objective** To observe the effects of Yishen Yangsui formula on the expression of glial fibrillary acidic protein(GFAP) mRNA, and to study its effects on the expression and distribution of GFAP protein in the spinal cord (C₅~C₇) of rats with chronic spinal cord compression, further explore the effects of this formula on the hyperproliferation of astrocytes and the formation of glial scars in the spinal cord of cervical spondylotic myelopathy (CSM) rats. **Methods** Fifty-six healthy female SD rats were randomly divided into normal group, sham operation

收稿日期: 2021-10-03

作者简介: 秦晓宽, 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 脊柱及相关疾病临床与基础研究。Email: Aqinxiaokuan@163.com。通信作者: 陈忻, 男, 博士, 主治医师, 研究方向: 脊柱及相关疾病临床与基础研究。Email: 15101161150@139.com。朱立国, 男, 博士, 教授, 研究方向: 脊柱及相关疾病临床与基础研究。Email: zhl95@aliyun.com。

基金项目: 国家自然科学基金青年项目(8190152606); 中国中医科学院中央级公益性科研院所基本科研业务费自主选题项目(ZZ11-082); 中国中医科学院优秀青年科技人才(创新类)培养专项(ZZ14-YQ-022)。

group, model group, low-, medium- and high- dose *Yishen Yangsui* formula group, and positive control group, with 8 rats in each group. All rats in the model group, traditional Chinese medicine group and positive control group were used to establish CSM model by compressing the spinal cord with water-absorbent swelling materials. The sham operation group only exposed the spinal cord. Two weeks after the operation, the different doses of *Yishen Yangsui* formula groups were given traditional Chinese medicine decoctions by gavage. Positive control group was given intramuscular injection of monosialotetrahexosylganglioside (dissolved in normal saline), and the rest groups were given intragastric administration of normal saline once a day for 4 consecutive weeks. The motor function of rats (BBB score) was evaluated at 1, 3, 7, 14, 21, 28 days after the intervention. HE staining was performed to observe the tissue structure of the spinal cord at 6 weeks after operation, and RT-qPCR method was used to detect GFAP mRNA expression in rat spinal cord, immunofluorescence observation was used to investigate GFAP protein expression. **Results** After intragastric administration, the BBB scores of the rats in *Yishen Yangsui* formula groups and the positive control group were significantly higher than those in the model group, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The results indicated that the *Yishen Yangsui* formula has a certain effect on improving the spinal cord function of CSM rats. HE staining of *Yishen Yangsui* formula group and the positive control group showed that the scars and cavities in the spinal cord tissue decreased, the cytoplasm gradually increased, and the morphology of nerve cells was similar to that in the sham operation group. The results of RT-qPCR and immunofluorescence indicated that the expression of GFAP mRNA and protein in the model group was increased ($P < 0.05$), and the expression of GFAP in *Yishen Yangsui* formula groups and the positive control group could be found to be decreased. The difference was statistically significant compared with the model group ($P < 0.05$). **Conclusion** *Yishen Yangsui* formula can reduce the expression of GFAP in the spinal cord of rats with chronic compression injury of the spinal cord, thus reducing the formation of glial scars and promoting functional recovery of hindlimbs in rats.

Keywords: *Yishen Yangsui* formula; cervical spondylotic myelopathy; chronic spinal cord injury; astrocyte; hyperproliferation; glial scar; glial fibrillary acidic protein (GFAP); rats

脊髓型颈椎病 (Cervical Spondylotic Myelopathy, CSM) 是由于多种因素导致脊髓受压, 从而引发慢性脊髓损伤的颈椎疾病, 其主要表现为脊髓功能障碍^[1]。脊髓型颈椎病在颈椎病中占 10% ~ 15%, 其症状重、致残率高、发病较为隐匿, 严重危害国民健康^[2-3]。近年来其发病率逐年上升, 发病年龄呈现年轻化趋势^[4], 成为严重危害中老年乃至年轻人健康的最常见颈椎疾患之一。重度脊髓型颈椎病患者手术是金标准, 而对于轻中度患者自诊断开始 3 年之内可行保守治疗^[5]。

益肾养髓方是首都名中医朱立国教授在经典方剂地黄饮子的基础上结合大量临床经验总结提炼而成的有效经验方, 治疗轻中度脊髓型颈椎病患者临床疗效确切, 可有效改善患者四肢感觉及运动功能评分, 且安全性高^[6]。星形胶质细胞过度增殖形成的胶质瘢痕被认为是阻碍急性脊髓损伤后神经轴突再生的关键所在^[7], 但是在慢性脊髓损伤中该病理环节研

究较少。Tsitsopoulos PP 等^[8]通过分析脊髓型颈椎病患者和对照组的脑脊液生化指标发现脊髓型颈椎病患者患者的脊髓中存在星形胶质细胞激活, 且与神经功能下降密切相关。益肾养髓方是否通过影响星形胶质细胞过度增殖形成的胶质瘢痕发挥神经保护作用尚缺乏有效论证。

本研究采用国际公认的吸水膨胀材料压迫脊髓的方法建立脊髓型颈椎病大鼠模型^[9]。通过观察造模及给药后大鼠运动功能评价, 记录大鼠四肢运动功能情况; 采用 HE 染色、实时荧光定量逆转录聚合酶链式反应法 (quantitative reverse transcription PCR, RT-qPCR) 和免疫荧光等技术检测药物对受压节段脊髓瘢痕形成情况、脊髓组织中相关 mRNA、蛋白表达分布的影响, 旨在从分子水平探讨益肾养髓方对慢性脊髓压迫后受损脊髓神经修复的干预作用, 以期阐明该复方治疗脊髓型颈椎病的药效作用, 为下一步深入研究其作用机制奠定基础, 并为益肾养髓

方的临床应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物 选取雌性 Sprague Dawley (SD) 大鼠 56 只, (240±20)g, SPF 级, 购于斯贝福(北京)生物技术有限公司, 动物许可证号: SCXK(京)2019-0010, 动物质量合格证号: 110324211100589045。动物饲养于谱尼测试集团股份有限公司, 使用许可证号: SYXK(京)2018-0022。动物适应性饲养 3 d, 室温 25℃左右, 光照时间为 8:00~20:00。

1.2 药物及试剂 益肾养髓方由巴戟天、熟地黄、鹿角霜、白芍、黄芪、桂枝、丹参、鬼箭羽、羌活组成, 中药饮片购自中国中医科学院望京医院中药房, 由中国中医科学院望京医院药剂科主任药师王景红鉴定。益肾养髓方中药饮片以去离子水浸泡 30 min, 加热煮沸后文火煎 30 min, 倒出药液, 纱布过滤; 残渣再煎 1 次, 倒出药液。将 2 次水煎液混合, 置 70℃恒温水浴, 浓缩药液至 1.674 g·mL⁻¹, 4℃保存备用。注射用单唾液酸四己糖神经节苷脂钠, 购自中国中医科学院望京医院, 批号: 0H0023B08; 0.9%氯化钠注射液, 华润双鹤药业股份有限公司, 批号: D201908303; 注射用青霉素钠, 石药集团中诺药业(石家庄)有限公司, 批号: 0162107311; 4%多聚甲醛溶液, 福州奥研实验器材有限公司, 批号: BL539A; 戊巴比妥钠, 美国 Sigma-Aldrich 公司, 批号: SIGMA-P3761; 苏木素-伊红(HE)染色试剂盒, 北京索莱宝科技有限公司, 批号: G1120; TRUEscript RT MasterMix、2×Sybr Green qPCR Mix, 北京艾德莱生物科技有限公司, 批号分别为: PC5802、PC3302; 胶质纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP) 一抗、荧光二抗, 美国 proteintech 公司, 批号分别为: 16825-1-AP、A-21206; 免疫染色封闭液, 上海碧云天生物技术有限公司, 批号: P0102。

1.3 仪器 6-16KS 台式离心机, 美国 Sigma 公司; FV1000 型激光共聚焦显微镜, 日本 Olympus 公司; CFX96 型 qPCR 仪, 美国 Bio-Rad 公司; RM2245 石蜡切片机, 德国 Leica 公司; 刀柄、眼科剪、线剪、有齿镊、无齿镊、持针器、弯钳、直钳, 上海医疗器械(集团)有限公司。

1.4 分组及给药方法 将 56 只大鼠随机分为 7 组, 分别为正常组、假手术组、模型组、阳性对照组及益肾养髓方低、中、高剂量组, 每组 8 只。大鼠灌胃药量参照体表面积法计算药物等效给药剂量^[10-11]。

术后 2 周开始给药, 每日给药 1 次, 每周称体质量 1 次, 据此调整给药剂量, 连续给药 4 周。按生药量计, 益肾养髓方高、中、低剂量组分别给予 16.74、8.37、4.185 g·kg⁻¹·d⁻¹ 益肾养髓方, 以 10 mL·kg⁻¹ 灌胃给药; 阳性对照组给予单唾液酸四己糖神经节苷脂钠 4.2 mg·kg⁻¹·d⁻¹ (使用生理盐水溶解) 肌肉注射; 正常组、模型对照组及假手术组灌胃等量生理盐水。

1.5 脊髓型颈椎病模型复制 采用吸水膨胀材料聚乙烯醇丙烯酰胺互穿网络水凝胶压迫脊髓的方法^[9]进行造模。具体方法如下: 大鼠给予 2%戊巴比妥钠进行腹腔注射麻醉, 用剃毛机剃除颈后部的毛, 常规碘伏消毒, 铺巾, 取大鼠颈椎后正中切口长 3~4 cm, 切开皮肤、皮下; 暴露颈肩部肌群, 自下往上正中切开肌肉群向两侧牵开, 暴露整个 C₅~C₇ 颈椎椎板; 小心将吸水膨胀材料 (1.5×0.7×0.3 mm) 植入 C₅~C₇ 椎板下; 逐层缝合肌肉、皮肤, 每只肌肉注射青霉素 8 万 U, 术毕。假手术组采用上述同样方法暴露 C₅~C₇ 椎板, 小心将同体积吸水膨胀材料植入 C₅~C₇ 椎板下后随即取出, 不造成脊髓压迫。模型组及假手术组大鼠术后青霉素连续肌肉注射 3 d, 术前及术后均不必禁食。正常组大鼠不予处理。

1.6 大鼠运动功能评分 于灌胃后 1、3、7、14、21、28 d, 每组 8 只大鼠在平面开阔地采用 Basso-Beattie-Bresnahan (BBB) 评分法^[12]进行运动功能评分。重复 3 次, 取平均值。

1.7 脊髓样本取材 灌胃 4 周后进行样本采集, 每组随机取 4 只大鼠, 2%戊巴比妥钠腹腔注射进行麻醉, 手术剪打开大鼠胸腔, 暴露心脏, 将灌流针头于左心室靠近心尖搏动处插入, 用 0.9%氯化钠溶液和 4%的多聚甲醛溶液先后进行灌注, 在观察到大鼠四肢抽搐, 四肢及尾巴僵硬和全身强直现象时停止灌流。取 C₅~C₇ 对应脊髓节段, 部分固定、脱水、透明、石蜡包埋后进行 HE 染色; 部分 4%多聚甲醛溶液中过夜、25%蔗糖溶液脱水、OCT 胶包埋后进行免疫荧光检测。

每组剩余 4 只大鼠, 腹腔注射戊巴比妥钠, 处死, 取 C₅~C₇ 对应脊髓节段到冻存管后, 放置于液氮速冻, 随后转入 -80℃冰箱保存, 用于 RT-qPCR 检测。

1.8 脊髓组织 HE 染色 将取出的脊髓组织经脱水和石蜡包埋后切片, 脱蜡后用苏木素及伊红染色。于镜下观察脊髓病理形态学变化。

1.9 RT-qPCR 法检测脊髓组织中 GFAP mRNA 的表达 Trizol 法提取总 RNA, 逆转录成 cDNA, 以 cDNA 为模板, 选择 RT-PCR 反应的操作方法测定特

异性 mRNA 的表达水平。使用 SYBR® Premix Ex Taq™ (Tli RNaseH Plus) 进行 PCR 定量反应。使用 NCBI 中的 Primer-BLAST 工具进行引物设计, 由中美泰和生物技术(北京)有限公司合成。引物序列信息见表 1。各组样本的目的基因表达水平以相应 β -actin 作为参照, 最终采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算目的基因相对于内参基因 β -actin 的相对表达量。

表 1 目的基因及内参基因的引物序列

Table 1 Table 1 Primer sequence of target gene and internal reference gene

基因	引物序列(5'→3')	长度/bp
GFAP	上游 ACGTTAAGCTAGCCCTGGAC	20
	下游 TGCTTTTGGCCCCCTCGGAT	19
β -actin	上游 GCTCTCTTCAGCCTTCCTT	20
	下游 AGGCTCTTACGGATGTCACG	21

1.10 免疫荧光法检测脊髓组织中 GFAP 蛋白的表达

取大鼠脊髓, 冰冻切片机连续切片(片厚 10 μ m), -80 $^{\circ}$ C 保存备用。将冰冻切片复温 30 min, PBS 缓冲液冲洗 3 次, 每次 10 min; 山羊血清 37 $^{\circ}$ C 封闭 1 h, 一抗(GFAP 1:250) 孵育过夜, PBS 缓冲液避光冲洗 3 次, 每次 10 min; 相应荧光二抗 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 1 h, PBS 缓冲液避光冲洗 3 次, 每次 10 min; DAPI

染核, PBS 缓冲液避光冲洗 3 次, 每次 10 min; 滴加防淬灭剂, 封片剂封片, 荧光显微镜下观察拍照。

1.11 统计学处理方法 采用 SPSS 25.0 统计软件进行统计分析, 计量资料用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。多组间比较采用单因素方差分析方法, 采用 Shapiro-Wilk 进行正态检验, 若方差齐则采用 Tukey 法^[13-14]进行两两比较, 若方差不齐则采用 Dunnett's T3 法进行两两比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 益肾养髓方对脊髓型颈椎病大鼠 BBB 评分的影响

见表 2。造模术后的各时间点, 正常组及假手术组比较差异无统计学意义($P > 0.05$); 模型组、阳性对照组及益肾养髓方低、中、高剂量组大鼠肢体运动功能 BBB 评分与正常组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$)。灌胃 1 d, 模型组和益肾养髓方低、中、高剂量组及阳性对照组之间大鼠 BBB 评分比较差异无统计学意义($P > 0.05$); 灌胃 3 d 及以后, 相同时间点的益肾养髓方中剂量组与模型组大鼠 BBB 评分比较差异均有统计学意义($P < 0.05$); 灌胃 7 d 及以后, 益肾养髓方低、高剂量组及阳性对照组与模型组大鼠 BBB 评分比较差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

表 2 各组大鼠肢体运动功能 BBB 评分($\bar{x} \pm s$, 分; $n=8$)

Table 2 BBB score of motor function of rats' limbs($\bar{x} \pm s$, scores; $n=8$)

组别	灌胃 1 d	灌胃 3 d	灌胃 7 d	灌胃 14 d	灌胃 21 d	灌胃 28 d
正常组	21.00 $\pm$ 0.00	21.00 $\pm$ 0.00	21.00 $\pm$ 0.00	21.00 $\pm$ 0.00	21.00 $\pm$ 0.00	21.00 $\pm$ 0.00
假手术组	21.00 $\pm$ 0.00	21.00 $\pm$ 0.00	21.00 $\pm$ 0.00	21.00 $\pm$ 0.00	21.00 $\pm$ 0.00	21.00 $\pm$ 0.00
模型组	9.25 $\pm$ 1.04*	9.50 $\pm$ 0.93*	9.88 $\pm$ 0.84*	10.25 $\pm$ 0.89*	11.13 $\pm$ 0.83*	12.13 $\pm$ 0.83*
益肾养髓方低剂量组	9.63 $\pm$ 1.06*	10.13 $\pm$ 1.13*	11.50 $\pm$ 0.93* [△]	13.88 $\pm$ 0.94* [△]	15.00 $\pm$ 0.76* [△]	16.25 $\pm$ 0.89* [△]
益肾养髓方中剂量组	9.88 $\pm$ 1.23*	10.75 $\pm$ 0.91* [△]	12.38 $\pm$ 0.82* [△]	14.13 $\pm$ 0.84* [△]	17.00 $\pm$ 0.76* [△]	18.00 $\pm$ 0.76* [△]
益肾养髓方高剂量组	9.75 $\pm$ 1.04*	10.38 $\pm$ 1.06*	11.63 $\pm$ 0.74* [△]	14.00 $\pm$ 1.20* [△]	15.13 $\pm$ 0.64* [△]	17.13 $\pm$ 0.83* [△]
阳性对照组	9.63 $\pm$ 1.06*	10.00 $\pm$ 0.93*	11.13 $\pm$ 0.83* [△]	13.63 $\pm$ 0.92* [△]	14.75 $\pm$ 0.78* [△]	16.00 $\pm$ 0.76* [△]

注: 与正常组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, [△] $P < 0.05$

2.2 益肾养髓方对脊髓型颈椎病大鼠脊髓组织的影响

各组大鼠脊髓组织常规病理染色结果见图 1。正常组与假手术组脊髓组织灰质白质结构未被破坏, 交界清楚, 神经元细胞胞体饱满, 形态完整且分布均匀; 模型组脊髓组织可见神经元肿胀坏死, 大量瘢痕组织, 脊髓组织排列结构紊乱, 有部分囊腔; 益肾养髓方各组及阳性对照组脊髓组织瘢痕等病理变化有所改善, 益肾养髓方中剂量组最为明显。

2.3 益肾养髓方对脊髓型颈椎病大鼠脊髓组织中 GFAP mRNA 表达的影响

见图 2。术后 6 周即给药 4 周后, 与正常组比较, 假手术组大鼠脊髓组织中 GFAP mRNA 表达差异无统计学意义($P > 0.05$), 模型组大鼠脊髓组织中 GFAP mRNA 表达增强($P < 0.05$); 与模型组比较, 各给药组大鼠脊髓组织中 GFAP mRNA 表达减弱($P < 0.05$), 其中益肾养髓方中剂量组 GFAP mRNA 表达最低。

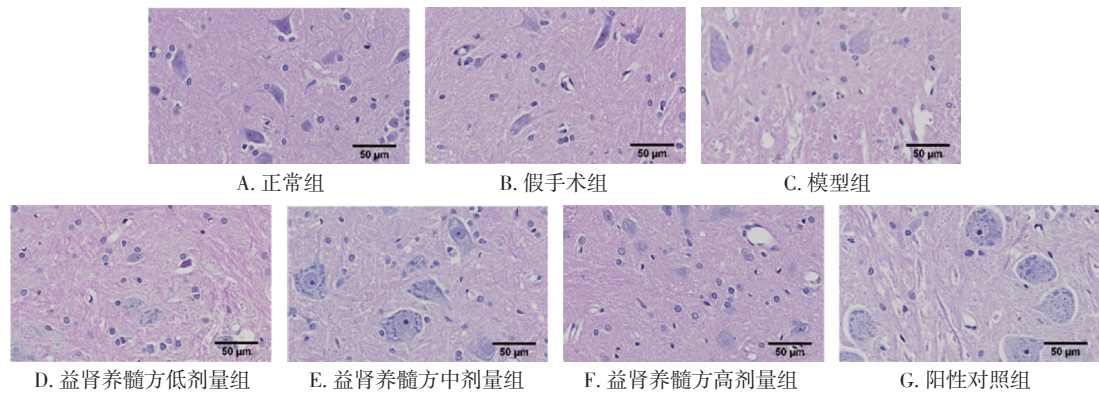
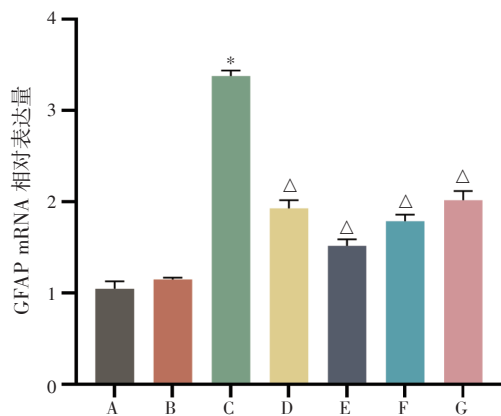


图 1 各组大鼠脊髓压迫部位组织病理切片 HE 染色结果(×200)

Figure 1 HE staining results of histopathological sections of spinal cord compression site of rats in each group(×200)



注：A，正常组；B，假手术组；C，模型组；D，益肾养髓方低剂量组；E，益肾养髓方中剂量组；F，益肾养髓方高剂量组；G，阳性对照组。与正常组比较，* $P < 0.05$ ；与模型组比较，[△] $P < 0.05$

图 2 各组大鼠脊髓组织 GFAP 的 mRNA 相对表达量($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

Figure 2 The relative mRNA expression of GFAP in the spinal cord tissue of rats in each group($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

2.4 益肾养髓方对脊髓型颈椎病大鼠脊髓组织中 GFAP 蛋白表达的影响

见图 3、图 4。术后 6 周即给药 4 周后，与正常组比较，假手术组大鼠脊髓组织中 GFAP 荧光强度差异无统计学意义($P > 0.05$)，模型组大鼠脊髓组织中 GFAP 荧光强度明显增强($P < 0.05$)，星形胶质细胞活化增殖程度增高；与模型组比较，各给药组大鼠脊髓组织中 GFAP 荧光强度明显减弱($P < 0.05$)，星形胶质细胞活化程度降低，其中益肾养髓方中剂量组活化程度最低。

3 讨论

早期干预对于脊髓型颈椎病患者脊髓功能保护，延缓病情进展具有重要意义，然而目前尚缺乏治疗脊髓型颈椎病的特效药物^[15]。脊髓型颈椎病(Cervical Spondylotic Myelopathy, CSM)在中医学属于“项强”“痹症”“痿症”等范畴。《灵枢·经脉》曰：“人始生

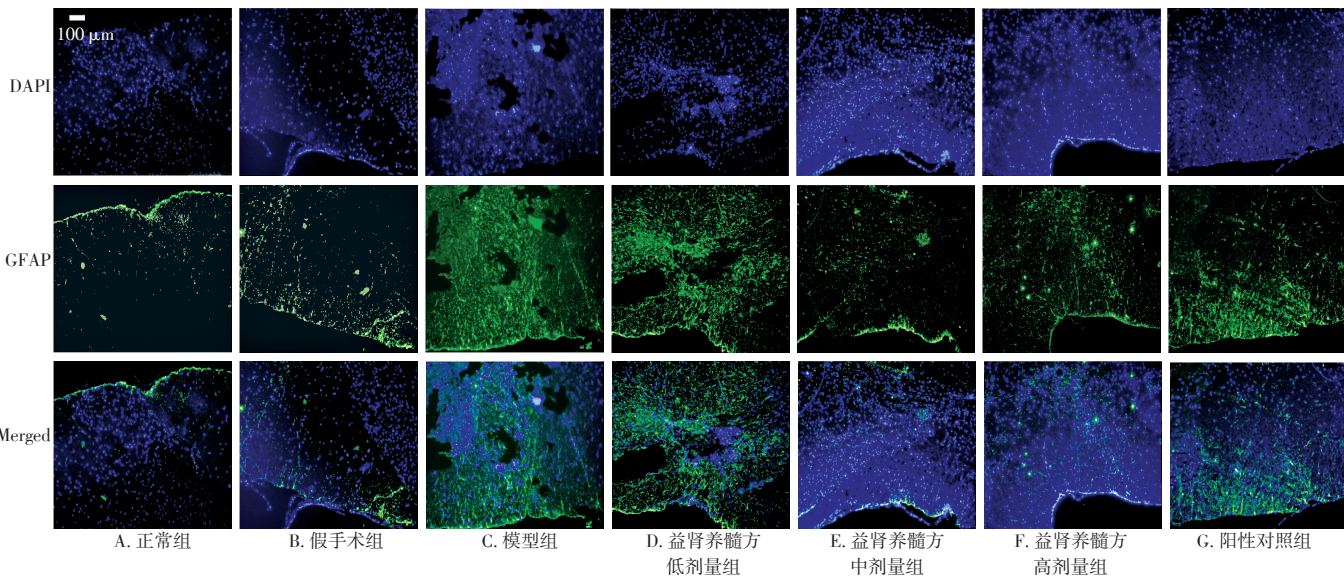
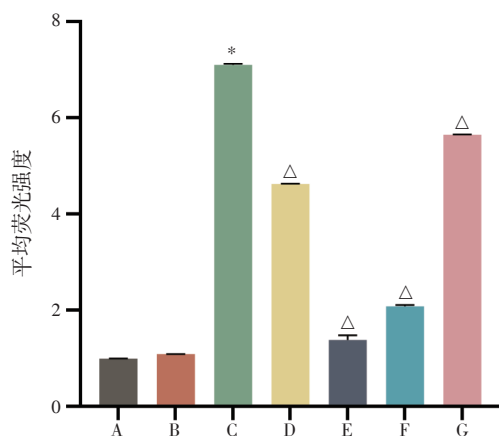


图 3 各组大鼠脊髓组织胶质纤维酸性蛋白(GFAP)表达情况(×200)

Figure 3 GFAP expression in spinal cord tissue of rats in each group(×200)



注: A, 正常组; B, 假手术组; C, 模型组; D, 益肾养髓方低剂量组; E, 益肾养髓方中剂量组; F, 益肾养髓方高剂量组; G, 阳性对照组。与正常组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, $^{\Delta}P < 0.05$

图4 各组大鼠脊髓组织 GFAP 平均荧光强度($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

Figure 4 The average fluorescence intensity of GFAP in the spinal cord of rats in each group($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

而精成, 精成生髓, 肾不足则髓减。”其根本病机为“本虚标实”, 肝肾亏损、气血虚弱为本; 风寒湿邪客居于经脉、气滞血瘀为标^[16-18]。益肾养髓方针对该病本虚标实之病机, 以益肾活血类中药为主, 由巴戟天、熟地黄、鹿角霜、白芍、黄芪、桂枝、鬼箭羽、丹参、羌活组成。巴戟天补肾温阳、强筋壮骨; 熟地黄补血滋阴、益精填髓, 二者合而为君。臣药为鹿角霜、白芍, 前者温肾助阳, 后者养阴柔肝。佐使药为黄芪、桂枝、鬼箭羽、丹参、羌活, 其中黄芪、桂枝益气升阳、温经通脉; 鬼箭羽、丹参活血通经、通络止痛; 羌活祛风湿、利关节, 助太阳气化, 畅督脉经气, 使药力达于颈部。益肾养髓方可有效改善轻中度脊髓型颈椎病患者四肢感觉及运动功能与脊髓型颈椎病大鼠行为学评分^[6], 具有一定的潜在应用价值。

脊髓损伤后星形胶质细胞肥大、增殖, 胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)等骨架蛋白高表达, 而 GFAP 是胶质瘢痕的重要组成部分^[19-21], 脊髓损伤后形成的胶质瘢痕构成阻碍轴突再生的物理屏障。近年来胶质瘢痕在慢性脊髓损伤神经再生修复中的作用也越来越受到重视。有研究表明, 脊髓型颈椎病患者脊髓中存在星形胶质细胞过度增殖, 且与神经功能下降密切相关^[8]; 大鼠慢性压迫性脊髓损伤包括非神经损伤核心组织的中心区域周围产生大量星形胶质瘢痕^[22]; 有研究^[23]显示, 在大鼠脊髓损伤 8 周后, 手术清除陈旧性瘢痕组织, 能

观察到明显的神经纤维再生, 其结果提示陈旧性瘢痕组织的存在确实影响了神经轴突的再生。

本研究中正常组与假手术组对应脊髓组织中 GFAP mRNA 及蛋白表达差异无统计学意义, HE 染色显示两组脊髓组织灰质白质清晰, 神经元结构完整; 行为学观测两组差异无统计学意义。模型组 GFAP mRNA 及蛋白表达相对于正常组明显升高; HE 染色显示脊髓组织可见神经元肿胀坏死, 大量瘢痕组织, 脊髓组织排列结构紊乱, 有部分囊腔; BBB 评分明显低于正常组与假手术组。以上结果再次证实慢性脊髓损伤会导致星形胶质细胞过度活化增殖。益肾养髓方各剂量组及阳性对照组脊髓组织中 GFAP mRNA 及蛋白表达相对模型组明显降低; HE 染色结果显示瘢痕减少, 神经元形态等病理变化有不同程度改善; 行为学结果表明益肾养髓方促进了脊髓型颈椎病大鼠后肢运动功能的恢复。表明益肾养髓方可通过抑制星形胶质细胞过度活化增殖进而减少胶质瘢痕形成来发挥神经保护作用。益肾养髓方中剂量组相对低、高剂量组对脊髓型颈椎病大鼠脊髓中星形胶质细胞过度增殖的干预效果更好, 可能是高剂量组中药较为浓稠, 不易吸收, 而低剂量尚未达到药物溶解饱和度与吸收饱和度^[24]。

本研究初步明确益肾养髓方可通过抑制星形胶质细胞过度活化增殖, 进而减少胶质瘢痕形成来促进慢性脊髓损伤恢复。然而本实验没有设置时间点动态观察慢性压迫性脊髓损伤大鼠胶质瘢痕变化情况, 并且益肾养髓方在体内调控星形胶质细胞的活化、减少胶质瘢痕形成的具体信号通路和分子机制也是今后进一步深入研究的方向。以上研究将为中药复方的临床应用与新药研发提供科学依据。

参考文献:

- [1] MCCORMICK J R, SAMA A J, SCHILLER N C, et al. Cervical spondylotic myelopathy: a guide to diagnosis and management[J]. J Am Board Fam Med, 2020, 33(2): 303-313.
- [2] PERDOMO-PANTOJA A, CHARA A, KALB S, et al. The effect of renin-angiotensin system blockers on spinal cord dysfunction and imaging features of spinal cord compression in patients with symptomatic cervical spondylosis[J]. Spine J, 2020, 20(4): 519-529.
- [3] BOOGAARTS H D, BARTELS R H. Prevalence of cervical spondylotic myelopathy[J]. Eur Spine J, 2015, 24 Suppl 2: 139-41.
- [4] GIBSON J, NOURI A, KRUEGER B, et al. Degenerative cervical myelopathy: a clinical review[J]. Yale J Biol Med, 2018, 91(1):

- 43-48.
- [5] BAKHSHESHIAN J, MEHTA V A, LIU J C. Current diagnosis and management of cervical spondylotic myelopathy[J]. *Global Spine J*, 2017, 7(6): 572-586.
- [6] 朱立国, 唐彬, 银河, 等. 益肾养髓方治疗脊髓型颈椎病35例[J]. *中国中医骨伤科杂志*, 2018, 26(6): 56-58, 63.
- [7] HU J, ZHANG G, RODEMER W, et al. The role of RhoA in retrograde neuronal death and axon regeneration after spinal cord injury[J]. *Neurobiol Dis*, 2017, 98: 25-35.
- [8] TSITSOPOULOS P P, HOMSTROM U, BLEMMOW K, et al. Cerebrospinal fluid biomarkers of glial and axonal injury in cervical spondylotic myelopathy[J]. *J Neurosurg Spine*, 2021, 29: 1-10.
- [9] 银河, 陈琳, 陈忻, 等. 脊髓型颈椎病动物模型的研究现状[J]. *中华中医药杂志*, 2021, 36(1): 354-357.
- [10] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 202-204.
- [11] 邓文龙. 动物中人体剂量换算遵循的原则[J]. *中药药理与临床*, 2016, 32(3): 196-197.
- [12] BASSO D M, BEATTIE M S, BRESNAHAN J C. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats[J]. *J Neurotrauma*, 1995, 12(1): 1-21.
- [13] WANG B, CUI X. An improved uniformly more powerful exact Fisher-Hayter pairwise comparisons procedure[J]. *Biometrical Journal*, 2017, 59(4): 767-775.
- [14] PEREIRA D G, AFONSO A, MEDEIROS F M. Overview of Friedman's test and post-hoc analysis[J]. *Communications in Statistics- Simulation and Computation*, 2015, 44 (10): 2636-2653.
- [15] PEKE W, ALMANSOUR H, RICHTER M. Spondylotic cervical myelopathy: indication of surgical treatment[J]. *Orthopade*, 2018, 47(6): 474-482.
- [16] 秦晓宽, 孙凯, 朱立国, 等. 基于数据挖掘的中医药治疗脊髓型颈椎病用药规律探析[J]. *中国医药导报*, 2021, 18(5): 150-154.
- [17] 李文浩, 牛逸群, 谭明生. 基于数据挖掘法探讨中医药治疗脊髓型颈椎病的用药规律[J]. *中医正骨*, 2021, 33(1): 22-26, 33.
- [18] 朱立国, 唐彬, 陈忻, 等. 中药治疗脊髓型颈椎病的研究进展[J]. *现代中医临床*, 2020, 27(1): 66-70.
- [19] BRENNER M. Role of GFAP in CNS injuries[J]. *Neurosci Lett*, 2014, 17, 565: 7-13.
- [20] DIAD D O, KIM H, HOLL D, et al. Reducing pericyte-derived scarring promotes recovery after spinal cord injury[J]. *Cell*, 2018, 173(1): 153-165.e22.
- [21] TRAN A P, WARREN P M, SILVER J. The biology of regeneration failure and success after spinal cord injury[J]. *Physiol Rev*, 2018, 98(2): 881-917.
- [22] WANG Y, SUN J C, WANG H B, et al. Effects of MicroRNA-494 on astrocyte proliferation and synaptic remodeling in the spinal cord of a rat model of chronic compressive spinal cord injury by regulating the nogo/ng2 signaling pathway[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 48(3): 919-933.
- [23] LI X, YANG B, XIAO Z, et al. Comparison of subacute and chronic scar tissues after complete spinal cord transection[J]. *Exp Neurol*, 2018, 306: 132-137.
- [24] 朱春胜, 聂安正, 王笑, 等. 中药量效关系的研究进展[J]. *中草药*, 2019, 50(7): 1708-1712.

(编辑: 修春)