

· 论著 ·

葛根汤与桂枝汤对兔颈椎间盘组织 IL-1、iNOS、TNF、TGF mRNA 表达的调节作用

王拥军, 施 杞, 周重建, 侯宝兴, 刘 梅, 莫 文

(上海中医药大学脊柱病研究所, 上海中医药大学附属龙华医院伤骨科, 上海 200032)

[摘要] 目的 检测兔动物模型风寒湿颈椎病组、低头位颈椎病组、风寒湿加低头位颈椎病组的颈椎间盘组织中白细胞介素 1 (interleukin-1, IL-1)、诱导型氮氧化物合酶(inducible nitric-oxide synthase, iNOS)、肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor-alpha, TNF)、转化生长因子 (transforming growth factor-beta, TGF) 的 mRNA 的表达, 并检测葛根汤、桂枝汤对兔风寒湿颈椎病组颈椎间盘组织中上述细胞因子 mRNA 的调节作用。方法 36 只大白兔随机分为正常对照组、风寒湿颈椎病组、低头位颈椎病组、风寒湿加低头位颈椎病组、葛根汤治疗组、桂枝汤治疗组。葛根汤、桂枝汤治疗组均以风寒湿颈椎病模型为基础。采用逆转录聚合酶链反应法检测颈椎间盘组织中上述细胞因子 mRNA 的表达。结果 各模型组与正常对照组比较 IL-1 mRNA、iNOS mRNA 表达上调 ($P < 0.01$); 葛根汤、桂枝汤治疗组与风寒湿颈椎病组比较, IL-1 mRNA、iNOS mRNA 表达均下调 ($P < 0.05$ 或 < 0.01); 低头位加风寒湿颈椎病组 TNF mRNA 表达上调, 与风寒湿及低头位颈椎病组比较 ($P < 0.01$); 葛根汤下调 TNF mRNA 表达, 与风寒湿颈椎病组比较 ($P < 0.01$); 各模型组同正常对照组比较, TGF mRNA 表达均下调 ($P < 0.01$); 与风寒湿颈椎病组比较, 葛根汤上调 TGF mRNA 表达 ($P < 0.01$); 桂枝汤对 TGF mRNA 的调节作用不明显。结论 风寒湿、低头位、低头位加风寒湿的刺激可不同程度地上调椎间盘退变过程中 IL-1、iNOS mRNA 的表达, 下调 TGF mRNA 的表达; 低头位加风寒湿颈椎病组上调 TNF mRNA 表达, 证明上述细胞因子参与椎间盘的退变过程, 其中 IL-1、iNOS、TNF 加速颈椎间盘的退变, TGF 延缓颈椎间盘的退变。葛根汤下调 IL-1、iNOS、TNF mRNA 的表达, 上调 TGF mRNA 的表达, 发挥延缓椎间盘退变的作用; 桂枝汤调节上述细胞因子的作用低于葛根汤。

[关键词] 中草药; 颈椎; 椎间盘; 白细胞介素 1; 一氧化氮合酶; 肿瘤坏死因子; 转化生长因子; 动物, 实验

[中图分类号] R681.531 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-1977(2003)04-0273-04

Regulation effects of Gegen recipe and Guizhi recipe on expression of IL-1, iNOS, TNF, TGF mRNA in degenerated cervical intervertebral disk in rabbits

WANG Yong-Jun, SHI Qi, ZHOU Chong-Jian, HOU Bao-Xing, LIU Mei, MO Wen

(Institute of Spinal Disease, Longhua Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China)

[ABSTRACT] **Objective** To study the effects of Gegen Recipe and Guizhi Recipe regulating the expression of IL-1, iNOS, TNF and TGF mRNA in degenerated intervertebral disk caused by stimulation of wind, cold and damp. **Methods** Thirty-six rabbits were randomly separated into six groups, viz. control group, stimulation by wind, cold and damp group, head in low-location group, compound model group(head in low-location plus stimulation of wind, cold and damp), Gegen Recipe group and Guizhi Recipe group. The gene expression of IL-1, iNOS, TNF and TGF mRNA in degenerated cervical intervertebral disks were assayed by RT-PCR. **Results** Compared with the control group, IL-1 mRNA and iNOS mRNA expression were up-regulated in each model group ($P < 0.01$). Both Gegen Recipe and Guizhi Recipe down-regulated IL-1 mRNA, iNOS mRNA expression, which had significant differences compared with the stimulation model group ($P < 0.01$ or < 0.05). TNF mRNA expression was significantly enhanced in the compound model group compared with the control group ($P < 0.01$). There was no significant difference between the head in low-location group and the stimulation model group. Gegen Recipe down-regulated TNF mRNA expression compared with the stimulation group ($P < 0.01$), while the effect of Guizhi Recipe was not significant. Compared with the control group, TGF mRNA expression went down in each model group ($P < 0.01$). Gegen Recipe up-regulated TGF mRNA expression ($P < 0.01$), while the effect of Guizhi Recipe on adjusting TGF mRNA was not significant. **Conclusion** Stimulation by wind, cold and damp, head in low-location, and compound of both can down-regulate the expressions of IL-1, iNOS, TNF mRNA, and up-regulate the expression of TGF mRNA. These researches certify that these factors take part in the progression of intervertebral disk degeneration. IL-1, iNOS, TNF accelerate the degeneration and TGF defers the degeneration. Gegen Recipe down-regulates the expression of TNF mRNA and up-regulates the expression of TGF mRNA. The effect on regulating the cell factors expressions by Guizhi Recipe is lower than that of Gegen Recipe.

[KEY WORDS] drugs, Chinese herbal; cervical vertebrae; intervertebral disk; interleukin-1beta; nitric-oxide synthase; tumor necrosis factor-alpha; transforming growth factor-beta; animal, laboratory

葛根汤源自张仲景《伤寒杂病论》。原文第三十一条曰：“太阳病，项背强，无汗恶风者，葛根汤主之。”第十四条曰：“太阳病，项背强，反汗出恶风者，桂枝加葛根汤主之。”项背强”就是风、寒、湿邪侵袭项背部，而致项背肌肉出现酸痛、拘急的“痹证”表现。本文依据上述理论，在建立风寒湿和/或低头位颈椎病动物模型的基础上，通过研究椎间盘组织中细胞因子的表达，进一步揭示葛根汤和桂枝汤治疗颈椎病的机制。

1 材料与方

1.1 动物分组 8 月龄雄性新西兰大白兔 36 只，体重(2.5 ± 0.2)kg，由上海中医药大学实验动物中心提供。36 只新西兰大白兔随机分为 6 组：正常对照组、风寒湿颈椎病组、低头位颈椎病组、风寒湿加低头位颈椎病组、葛根汤治疗组、桂枝汤治疗组。

1.2 造模方法 剃除正常对照组家兔颈部毛发，不作其它处理。剃除风寒湿颈椎病组家兔颈部毛发，将动物固定在人工气候造模箱内，调节造模箱内环境至温度 6℃，湿度 95%，风力 6 级，使家兔接受连续刺激 4 h/d，共 32 d。低头位颈椎病组采用自制的特殊支架将家兔固定于低头位 45°，2 h/次，2 次/d，

连续 1 个月。风寒湿加低头位颈椎病组按风寒湿及低头位组的方法同时进行造模，连续 1 个月。葛根汤、桂枝汤治疗组在风寒湿造模 1 个月后分别服用葛根汤和桂枝汤。

1.3 中药处方及用法 葛根汤：葛根 12 g、麻黄 9 g、桂枝 6 g、芍药 6 g、炙甘草 6 g、生姜 9 g、大枣 3 枚。桂枝汤：桂枝 9 g、芍药 9 g、炙甘草 6 g、生姜 9 g、大枣 3 枚。葛根汤按 12.75 g 生药 · kg⁻¹ · d⁻¹ 给药，桂枝汤按 9.13 g 生药 · kg⁻¹ · d⁻¹ 给药，分别水煎浓缩后与兔饲料混合均匀，制备成含药颗粒。葛根汤和桂枝汤治疗组家兔在风寒湿造模 1 个月后分别服用含药颗粒 1 个月。

1.4 引物序列设计 采用逆转录聚合酶链反应(reverse transcriptase polymerase chain reaction, RT-PCR)，检测白细胞介素 1 (interleukin-1, IL-1)、诱导型氮氧化物合酶(inducible nitric-oxide synthase, iNOS)、肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor-alpha, TNF)、转化生长因子 (transforming growth factor-beta, TGF) 的 mRNA。基因及内参照 -actin 引物序列购自中国科学院上海申友生物科技有限公司，见表 1。

表 1 目的基因及引物序列设计

引物名称,片段(bp)		引物序列
IL-1 (305 bp)	Forward	5' GGATGACGCCTGAGAACTT 3'
	Reverse	5' TCACGCAGGACAGGTACAGA 3'
iNOS(231 bp)	Forward	5' GAGACGCACAGGCAGAGGTT 3'
	Reverse	5' GGTGACCACAGCCACAGTGA 3'
TGF (250 bp)	Forward	5' AACTACTGCTTCAGCTCCAC 3'
	Reverse	5' GTAACACGATGGCGAGTGCG 3'
TNF (340 bp)	Forward	5' GCTGAGCCAGCGTGCGAACG 3'
	Reverse	5' CAGGTACTCAGGCTGGTTGA 3'
-actin(660 bp)	Forward	5' ACGATGCTCCAAGAGCTGTT 3'
	Reverse	5' TCAGGCAGCTCATAGCTCTT 3'

1.5 实验方法和步骤 (1)采用 Trizol 法提取颈椎间盘组织中总 RNA；(2)RNA 变性电泳；(3)逆转录反应(RNA 逆转录合成 cDNA)；(4)多聚酶链反应；(5)凝胶电泳，测定光密度或用密度扫描仪对特异性条带进行密度扫描。

1.6 统计学方法 用 SPSS 8.0 统计软件包处理数据，样本均数用($\bar{x} \pm s$)表示，采用两样本均数比较的 t 检验，多组样本均数比较用精确方差分析。

2 结果

2.1 颈椎间盘组织总 RNA 提取 颈椎间盘组织

总 RNA 提取的样品经紫外分光光度计定量，各样品 OD 值(260 nm)/ OD 值(280 nm)的比值在 1.6 ~ 2.0 之间；1% 琼脂糖凝胶鉴定见 18 S、28 S 两条清晰条带，表明总 RNA 无蛋白质污染，无降解。

2.2 IL-1、iNOS mRNA 表达 正常对照组有 IL-1、iNOS mRNA 的表达；各模型组 IL-1、iNOS 基因大量表达；葛根汤、桂枝汤治疗组凝胶电泳条带显色较风寒湿颈椎病组浅。IL-1、iNOS mRNA 光密度比值结果见表 2。

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No.39970917)，国家中医药管理局基金资助项目(No.00-01LQ11)
[作者简介] 王拥军(1965-),男,博士,教授、主任医师。

表 2 各组颈椎间盘组织 IL-1、iNOS mRNA 光密度比值

组别	n	IL-1 mRNA	iNOS mRNA
正常对照组	6	0.9532 ± 0.0047	0.9199 ± 0.0129
风寒湿颈椎病组	6	1.0413 ± 0.0152**	1.0026 ± 0.0096**
低头位颈椎病组	6	1.0297 ± 0.0313**	1.0049 ± 0.0182**
低头位加风寒湿颈椎病组	6	1.0885 ± 0.0271**	1.0160 ± 0.0078**
葛根汤治疗组	6	0.9908 ± 0.0121	0.9437 ± 0.0031
桂枝汤治疗组	6	0.9529 ± 0.0025	0.9057 ± 0.0044

注:与正常对照组比较,** P < 0.01;与风寒湿颈椎病组比较, P < 0.05, P < 0.01;与低头位颈椎病组比较, P < 0.01

2.3 TNF、TGF mRNA 表达 正常对照组有 TNF mRNA 表达条带;各模型组 TNF mRNA 大量表达,条带变深;葛根汤、桂枝汤治疗组的条带较风寒湿颈椎病组浅。正常对照组有明显的 TGF

mRNA 表达条带;各模型组 TGF mRNA 条带变浅;葛根汤治疗组的条带较风寒湿颈椎病组深,桂枝汤治疗组与风寒湿颈椎病组比较,条带变化不明显。结果见表 3。

表 3 各组颈椎间盘组织 TNF、TGF mRNA 光密度比值

组别	n	TNF mRNA	TGF mRNA
正常对照组	6	0.8906 ± 0.0211	0.9710 ± 0.0572
风寒湿颈椎病组	6	0.9045 ± 0.0199	0.8384 ± 0.0305**
低头位颈椎病组	6	0.8958 ± 0.0169	0.8254 ± 0.0351**
低头位加风寒湿颈椎病组	6	1.0284 ± 0.0182**	0.8027 ± 0.0212**
葛根汤治疗组	6	0.8578 ± 0.0294	0.9662 ± 0.0127
桂枝汤治疗组	6	0.9819 ± 0.0285	0.8679 ± 0.0158

注:与正常对照组比较,** P < 0.01;与风寒湿颈椎病组比较, P < 0.01;与低头位颈椎病组比较, P < 0.01;与葛根汤治疗组比较, P < 0.01

3 讨论

正常椎间盘组织中不含有 IL-1 及其免疫反应细胞。Rand 等^[1]发现培养中的鼠正常椎间盘细胞在脂多糖的刺激下,可大量合成并分泌 IL-1 等细胞因子。Taskiran 等^[2]发现 IL-1 在椎间盘退变的病理过程中占有重要地位,IL-1 通过诱导基质金属蛋白酶的表达引起蛋白多糖降解;通过刺激分泌一氧化氮(nitric oxide, NO)抑制前列腺素的合成。Kawakami 等^[3]证实 NO 与颈、腰椎间盘突出所致的神经根疼痛有关。目前认为,NO 通过自分泌或旁分泌,可直接或间接地与椎间盘组织中的细胞因子(IL-1、IL-6)发生相互作用,诱导产生炎症介质,引起根性放射痛,加速椎间盘中 I、II 型胶原比值的改变,从而抑制蛋白多糖的合成,加速椎间盘的退变。Rand 等^[1]指出,TNF 是导致髓核退变的主要细胞因子,在神经根损伤的发病机制中起重要作用,这种作用通过神经纤维损伤和神经内膜水肿而实现。TNF 可引起轴索及髓鞘损伤^[4],导致血管内凝血和增加血管通透性,TNF 还具有神经毒性,能诱导疼痛行为的变化^[5]。Ignatowski 等^[6]研究表

明,TNF 还参与神经性疼痛。TGF 1 是一种具有双向调节作用的生长因子,体外研究差异较大。Nishida 等^[7]利用腺病毒搭载人 TGF 1 基因(Ad/CMV-TGF-1)注入椎间盘组织,可引起 TGF 1 总量的大量增加,葡聚糖的合成也有明显增加。

葛根汤具有发汗解表、生津液、濡经脉之功,张仲景用其治疗风寒表实兼太阳经脉失于濡养之“项背强”证。本课题组依据《内经》“痹证”理论及仲景经验,结合多年临床实践认为,风寒湿颈椎病为“本虚标实”之证,多因体虚感受风寒湿邪,客于经络而致气血失和、筋脉不遂而为病。临床上用葛根汤和桂枝汤治疗风寒湿颈椎病,可获得较好的疗效。葛根汤是在桂枝汤的基础上减少桂枝、芍药的用量,重用葛根、麻黄而成。现代研究证实,葛根含有多种黄酮类成分,主要有大豆苷、大豆苷元、葛根素等;葛根、桂枝和赤芍可中度抑制前列腺素 E₂ 的释放;桂枝汤本身也具有抗炎作用,如对于角叉菜胶引起的小鼠足肿胀、二甲苯所致的毛细血管通透性增高均有抑制作用^[8],对于佐剂性关节炎的继发肿胀与炎症介质也有抑制作用^[9]。以此为据,现代临床将其广泛用于治疗各类神经运动系统功能障碍疾病,而

此类病证又以经络郁滞、病性属寒为其辨证要点。

本次实验表明,葛根汤、桂枝汤均可下调椎间盘组织 IL-1 mRNA 和 iNOS mRNA 的表达,与风寒湿颈椎病组比较有显著性差异。葛根汤上调 TGF mRNA 的表达,下调 TNF mRNA 的表达,与风寒湿颈椎病组比较有显著性差异。桂枝汤对 TGF mRNA 的调节作用不明显。我们的研究还显示,葛根汤、桂枝汤可以抑制炎性物质释放,调控椎间盘细胞外基质金属蛋白酶的活性,调节椎间盘中相关细胞因子和凋亡相关蛋白的表达。实验显示,二者在抑制椎间盘退变过程的靶点和环节方面,既有同效性,又有差异性。

总之,我们依据《伤寒杂病论》中有关葛根汤和桂枝汤治疗颈部风寒湿“痹证”的论述,通过“方-证-效”的研究,探讨了葛根汤和桂枝汤治疗痹证型颈椎病的药效机制和两方之间的异同点,从而进一步揭示了痹证型颈椎病相关证候的本质及葛根汤、桂枝汤的作用机制。

[参考文献]

- 1 Rand N, Reichert F, Floman Y, *et al* . Murine nucleus pulposus-derived cells secrete interleukins-1-beta, -6, and 10 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in cell culture[J] .Spine,1997,22(22):2598-2602 .
- 2 Taskiran D, Stefanovic-Racic M, Georgescu H, *et al* . Nitric oxide mediates suppression of cartilage proteoglycan

(上接第 258 页)

糊棚牢,触则痛”的生动描述。

1 手法治疗

1.1 手法治疗步骤 (1)用双手拇指伸进患者口腔内按住两侧第 3 磨牙处,作上下活动 10 次左右。(2)一手固定下颌骨,一手以拇指点揉患侧的下关穴和颊车穴,有酸胀得气感,但以患者能够承受为度,每 1 处穴位点揉 10~20 次左右。(3)以拇指指腹自患侧下关穴开始沿着下颌骨前缘,自上向下按推 3~5 次,用力要踏实平均,不能轻浮。(4)最后用手部小鱼际肌按摩下颌关节周围,放松组织。上述 4 步手法作为 1 节,3~4 节/次,2~3 次/周,病情轻者需治疗 2~3 周,重者需治疗 4~6 周为 1 个疗程。

1.2 导引疗法 运用张口、错腮、舔颌等方法锻炼颞下颌关节,以恢复肌肉、韧带、关节之间的精细协调功能,使颞下颌关节功能稳定而灵活。

synthesis by interleukin-1 [J] .Biochem Biophys Res Commun,1994,200(1):142-148 .

- 3 Kawakami M, Tamaki T, Weinstein JN, *et al* . Pathomechanism of pain-related behavior produced by allografts of intervertebral disc in the rat[J] .Spine,1996,21(18):2101-2107 .
- 4 Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, *et al* . A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells[J] .Nature,1997,385(6618):729-733 .
- 5 Viviani B, Corsini E, Galli CL, *et al* . Glia increase degeneration of hippocampal neurons through release of tumor necrosis factor-alpha[J] .Toxicol Appl Pharmacol,1998,150(2):271-276 .
- 6 Ignatowski TA, Covey WC, Knight PR, *et al* . Brain-derived TNF alpha mediates neuropathic pain [J] .Brain Res,1999,841(1-2):70-77 .
- 7 Nishida K, Kang JD, Gilbertson LG, *et al* . Modulation of the biologic activity of the rabbit intervertebral disc by gene therapy: an *in vivo* study of adenovirus-mediated transfer of the human transforming growth factor beta 1 encoding gene[J] .Spine,1999,24(23):2419-2425 .
- 8 贺玉琢,富杭育,周爱香,等 .经抗炎的药效法再探麻黄汤、桂枝汤、银翘散、桑菊饮的药物动力学[J] .中药药理与临床,1993,9(1):1-3 .
- 9 富杭育,贺玉琢,周爱香,等 .经解热的药效法初探麻黄汤、桂枝汤、银翘散、桑菊饮的药物动力学[J] .中药药理与临床,1992,8(1):1-3 .

[收稿日期] 2003-09-04 [本文编辑] 黄文华 周庆辉

1.3 自我按摩 (1)用拇指指腹或腕豆骨按揉下关、颊车穴的痛点。(2)用拇指自下颌关节沿下颌骨前缘由上而下抹推。(3)用手部大、小鱼际肌轮流按摩下颌关节周围。(4)用手心紧贴关节作上下搓揉,使患处产生温热舒适感为度。上述按摩 2~3 次/d,操作时可使用一些润滑油膏,以防皮肤受损。

1.4 注意事项 在治疗期间,应注意局部保暖,避免吃硬性食物。

2 中药治疗

2.1 内服中药 气血两虚者用《正体类要》之八珍汤方加味。有外邪者用《伤科补要》之疏风养血汤方加减。

2.2 外用中药 《魏氏经验方》之下颌洗方:落得打 12 g、山慈姑 9 g、伸筋草 12 g、秦艽 9 g、络石藤 18 g、桂枝 9 g、透骨草 12 g、全当归 9 g、乳香 9 g、没药 9 克、川芎 9 g。

[收稿日期] 2003-09-04 [本文编辑] 黄文华 周庆辉