

[文章编号] 1671-587X(2012)02-0202-05

## Smad2/3/4 真核表达质粒的构建及重组蛋白表达

张红艳<sup>1</sup>, 王春玉<sup>1</sup>, 姚远<sup>2</sup>, 李彦姝<sup>1</sup>, 王迪<sup>1</sup>, 李丰<sup>1</sup>

(1. 中国医科大学细胞生物学教研室 卫生部细胞生物学重点实验室 教育部医学细胞生物学重点实验室  
辽宁 沈阳 110001; 2. 辽宁省人民医院消化内科, 辽宁 沈阳 110016)

**[摘要]** 目的: 构建 pcDNA3.1myc-HisA-Smad2/3/4 真核表达质粒, 证实融合蛋白在细胞内表达。方法: 以 pcDNA3.1-Smad2/3 和 pGEX2T-Smad4 质粒为模板, 设计特异性引物, PCR 扩增 Smad2/3/4 全长编码基因, 亚克隆至含有 pcDNA3.1myc-HisA 标签的真核表达载体中。将构建的重组质粒测序并转染到人胚胎肾细胞 HEK293 中, 提取细胞蛋白进行 Western blotting 检测。结果: Smad2/3/4 全长基因序列克隆到真核表达载体 pcDNA3.1myc-HisA 中, 酶切鉴定片段为 1 401、1 275 和 1 656 bp。Western blotting 检测到融合蛋白 pcDNA3.1myc-HisA-Smad2/3/4 的表达。结论: 成功构建 pcDNA3.1myc-HisA-Smad2/3/4 真核表达质粒, 同时鉴定其融合蛋白的表达。

**[关键词]** Smad; 蛋白免疫印记; 融合蛋白

**[中图分类号]** Q291 **[文献标志码]** A

## Construction of recombinant plasmid pcDNA3.1myc-HisA-Smad2/3/4 and its protein expression

ZHANG Hong-yan<sup>1</sup>, WANG Chun-yu<sup>1</sup>, YAO Yuan<sup>2</sup>, LI Yan-shu<sup>1</sup>, WANG Di<sup>1</sup>, LI Feng<sup>1</sup>

(1. Department of Cell Biology, Key Laboratory of Cell Biology, Ministry of Public Health, Key Laboratory of Cell Biology, Ministry of Education, China Medical University, Shenyang 110001, China;  
2. Department of Gastroenterology, People's Hospital of Liaoning Province, Shenyang 110016, China)

**Abstract: Objective** To construct the expression plasmid of pcDNA3.1myc-HisA-Smad2/3/4 and identify its fusion protein expression. **Methods** pcDNA3.1-Smad2/3 and pGEX2T-Smad4 were used as templates, and the special primers were designed. The Smad2/3/4 coding sequence was amplified by polymerase chain reaction (PCR) method and subcloned into pcDNA3.1myc-HisA vector. After the target region was sequenced, the plasmid was transfected into HEK293 cell line. The expression of the recombinant plasmid in HEK293 cells was detected by Western blotting. **Results** Smad2/3/4 was constructed into expression vector pcDNA3.1myc-HisA successfully. The lengths of the fragments were 1 401, 1 275 and 1 656 bp, and they were identified by restriction enzymes digestion. The expression of pcDNA3.1myc-HisA-Smad2/3/4 fusion protein was proved by Western blotting. **Conclusion** The eukaryotic expression plasmid pcDNA3.1myc-HisA-Smad2/3/4 is successfully constructed, and the expression of pcDNA3.1myc-HisA-Smad2/3/4 fusion protein is identified.

**Key words:** Smad; Western blotting; fusion protein

转化生长因子  $\beta$ (TGF- $\beta$ )超家族是一类作用繁多的细胞因子, 参与细胞增殖、分化、细胞外基质

[收稿日期] 2011-12-01

[基金项目] 国家自然科学基金资助课题(31171360, 30900752, 30800415); 教育部博士点基金资助课题(20102104110016)

[作者简介] 张红艳(1981-), 女, 内蒙古自治区通辽市人, 实验师, 医学硕士, 主要从事肿瘤信号转导通路的研究。

[通信作者] 李丰(Tel: 024-23256666-5347, E-mail: fli@mail.cmu.edu.cn)

改建及胚胎发育等多种细胞活动,并在多种疾病尤其是肿瘤、纤维变性类疾病及自身免疫性疾病的发病中扮演着重要角色<sup>[1-2]</sup>。TGF- $\beta$  超家族包括 TGF- $\beta$ 、骨形态发生蛋白 (BMP) 和活化素 (activins) 等亚类,可以通过激活多个下游信号通路行使其功能,其中 Smads 信号通路被认为是最关键的。Smads 蛋白家族包括 8 个成员,分为 R-Smads, Co-Smad 和 I-Smads 3 类<sup>[3]</sup>。R-Smads 包括 Smad1/2/3/5/8,能够与受体结合并被受体磷酸化而激活;Co-Smad 指 Smad4,能够与活化了的 R-Smads 结合形成复合体,该复合体可进核结合 DNA 并与多种转录辅因子共同作用调控基因转录;I-Smads 包括 Smad6/7,作为 R-Smads 的竞争性抑制子,负向调控 TGF- $\beta$  通路。TGF- $\beta$  信号通路受精密的调控,不同的上游配体激活不同的下游分子。TGF- $\beta$ 1 属于 TGF- $\beta$  超家族的 TGF- $\beta$  亚类,Smad2/3/4 参与该信号通路。Smad2/3/4 在细胞质中与多种蛋白相互作用,如 SARA<sup>[4]</sup> 和 PDK1<sup>[5]</sup> 等。作为 TGF- $\beta$ 1 通路的重要下游蛋白,Smad2/3/4 与某些相互作用蛋白的结合受 TGF- $\beta$ 1 调控。在 TGF- $\beta$ 1 作用下,PDK1 与 Smad2/3/4 的结合减弱<sup>[5]</sup>;而 Smad2 与 SARA 的结合依赖于 TGF- $\beta$ 1 刺激<sup>[4]</sup>。本研究旨在利用基因重组技术构建 pcDNA3.1myc-HisA Smad2/3/4 真核表达质粒,使用标签抗体检测 Smad2/3/4 在细胞中的表达,同时使用标签抗体进行免疫沉淀,质谱分析 Smad2/3/4 新的相互作用蛋白,进一步探索其生

物学功能及在 TGF- $\beta$  信号通路中的功能。

## 1 材料与方法

1.1 菌株、细胞和质粒 大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态为本实验室制备;HEK293 细胞为本实验室保存;pcDNA3.1myc-HisA 载体购自 Invitrogen 公司,pcDNA3.1-Smad2/3 获赠于 Sabelle van Seuning 教授,pGEX2T-Smad4 获赠于 Koichi Shimada 教授。

1.2 试剂 Pyrobest<sup>TM</sup> DNA polymerase、dNTP、限制性核酸内切酶 *EcoR* I 和 *Kpn* I 均购自大连 TaKaRa 公司;质粒提取及 DNA 电泳凝胶回收试剂盒购自 Promega 公司;DNA 和蛋白 marker 购自 GenScript 公司;T4 DNA 连接酶购自 NEB 公司;Myc 抗体购自 Santa 公司;HRP 标记的羊抗鼠 IgG 购自北京中杉金桥公司;引物合成和 DNA 测序测定由 Invitrogen 公司完成;Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司;DMEM 及胎牛血清购自 Gibco 公司;ECL 发光试剂盒购自 GE Healthcare 公司;其他试剂均为国产分析纯。

1.3 Smad2/3/4 全长基因扩增 设计 Smad2/3/4 扩增的 PCR 引物,并在引物中加入 *EcoR* I 和 *Kpn* I 2 个限制性酶切位点。引物序列见表 1。以质粒为模板,利用 pyrobest 酶,通过 PCR 扩增,获得 Smad2/3/4 全长编码序列。

表 1 引物序列及酶切位点

Tab. 1 Primer sequence and restriction enzyme cutting site

Vector name	Primer sequence and restriction enzyme cutting site
pcDNA3.1myc-HisA (Smad2)	<i>Kpn</i> I F 5'-ATTCGGGGTACCCACCATGTCGTCCATCTTGCCA-3' <i>EcoR</i> I R 5'-CGGCCGGAATTCTGACATGCTTGAGCAACGCAC-3'
pcDNA3.1myc-HisA (Smad3)	<i>Kpn</i> I F 5'-ATTCGGGGTACCCACCATGTCGTCCATCCTGCCT-3' <i>EcoR</i> I R 5'-CGGCCGGAATTCAGACACACTGGAACAGCGGAT-3'
pcDNA3.1myc-HisA (Smad4)	<i>Kpn</i> I F 5'-CGGCCGGGTACCCACCATGGACAATATGTCTAT-3' <i>EcoR</i> I R 5'-CGGCCGGAATTCGTCTAAAGTTGTGGGTCTGC-3'

1.4 pcDNA3.1myc-HisA-Smad2/3/4 表达载体的构建 将 pcDNA3.1myc-HisA 载体和 Smad2/3/4 PCR 片段用 *EcoR* I 和 *Kpn* I 双酶切后,酶切产物经琼脂糖凝胶电泳分离,凝胶回收纯化产物。回收产物摩尔比按照 1:5(载体:片段)比例,利用 T4 DNA 连接酶,将 2 个片段常温连接 2 h,然后

16 $^{\circ}$ C 连接过夜,取 5  $\mu$ L 连接产物转化到 DH5 $\alpha$  大肠杆菌感受态细胞中,涂于 LB/Amp 平板,37 $^{\circ}$ C 培养过夜。挑取菌落,接种于含氨苄西林的 LB 培养基中,37 $^{\circ}$ C 振荡过夜。一部分菌液用来保存菌种,另一部分用碱裂解法提取质粒 DNA,用 *EcoR* I 和 *Kpn* I 双酶切鉴定外源基因的插入,质

粒 DNA 送 Invitrogen 公司进行测序分析。

1.5 pcDNA3.1myc-HisA-Smad2/3/4 瞬时转染 HEK293 细胞系 HEK293 细胞用 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 高糖培养基培养, 细胞铺于 6 孔板至 70% ~ 80% 融合, 按照 Invitrogen 公司提供的 Lipofectamine 2000 转染 6 孔板的说明书进行操作。

1.6 蛋白质提取与 Western blotting 鉴定 转染 24 h 后, 弃掉培养基, 用 PBS 清洗 2 次。在细胞中加入 60  $\mu$ L 含有蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液, 用橡皮刮刀将细胞缓慢刮下。收集所有液体至新的离心管中, 冰上放置 10 min, 裂解细胞。13 000 g、4 $^{\circ}$ C 离心 30 min, 将上清转到新的离心管中, 取上清 5  $\mu$ L, 利用考马斯亮蓝 G250 染液和 0.5 g  $\cdot$  L $^{-1}$  BSA, 绘制标准曲线, 测量 595 nm 的吸光度(A)值, 以结果做直线回归方程:  $Y = aX + b$ 。测量蛋白样品与对照在 595 nm 的 A 值, 差值代入标准曲线方程, 求出相应蛋白浓度。

将蛋白定量后, 取 80  $\mu$ g 总蛋白经 10% SDS-PAGE 凝胶分离, 4 $^{\circ}$ C 过夜, 40 V 恒压转移到 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉封闭 1 h。用 Flag 抗体 (1:1 000 稀释) 室温孵育 2 h, 然后 TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min。再用辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 (1:5 000 稀释) 二抗孵育 2 h, 然后 TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min。ECL 显影, Western blotting 成像系统采集图像。

## 2 结果

2.1 PCR 扩增 Smad2/3/4 基因全长 以 pcDNA3.1-Smad2/3 和 pGEX2T-Smad4 质粒为模板, 特异性引物进行 PCR 扩增 Smad2/3/4 基因全长。扩增条件为 95 $^{\circ}$ C、5 min 预变性; 95 $^{\circ}$ C、1 min, 55 $^{\circ}$ C、1 min, 72 $^{\circ}$ C、1 min, 进行 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C、10 min, 温度降至 4 $^{\circ}$ C。1% 琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙啶染色后, 在紫外灯下观察结果。见图 1。

2.2 重组质粒 pcDNA3.1myc-HisA-Smad2/3/4 的构建及鉴定 每个质粒挑取 2 个克隆, 将重组质粒 pcDNA3.1myc-HisA-Smad2/3/4 用 EcoR I 和 Kpn I 双酶切后, 图 2 中 1 和 2 泳道为 Smad2, 得到 5 400 和 1 401 bp 的 2 条带; 3 和 4 泳道为 Smad3, 得到 5 400 和 1 275 bp 的 2 条带; 5 和 6 泳道为 Smad4, 5 泳道得到 5 400 和 1 656 bp 的 2 条带, 6 泳道未得到目的片段。重组质粒的酶切鉴定表明质粒构建成功, 经过测序分析, 外源系列

在 NCBI-Blast 比对结果与 Smad2/3/4 编码序列一致。

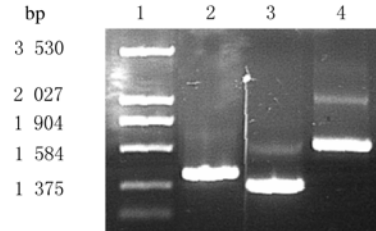


图 1 Smad2/3/4 基因 PCR 产物的扩增

Fig. 1 Amplification of the PCR products of Smad2/3/4 Lane 1: DNA marker; Lane 2: PCR product of Smad2; Lane 3: PCR product of Smad3; Lane 4: PCR product of Smad4.

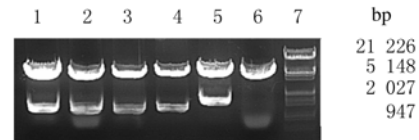


图 2 重组质粒 pcDNA3.1myc-HisA-Smad2/3/4 酶切分析 Fig. 2 Restrictive enzyme digestion analysis of the recombinant plasmid pcDNA3.1myc-HisA-Smad2/3/4 Lane 1, 2: pcDNA3.1myc-HisA-Smad2; Lane 3, 4: pcDNA3.1myc-HisA-Smad3; Lane 5, 6: pcDNA3.1myc-HisA-Smad4; Lane 7: DNA marker.

2.3 Western blotting 检测蛋白表达 分别将 pcDNA3.1myc-HisA 空载和 pcDNA3.1myc-HisA-Smad2/3/4 转染 HEK293 细胞, 24 h 后收集细胞, 提取蛋白, 经 SDS-PAGE 凝胶电泳, Western blotting 检测蛋白表达, 转染 pcDNA3.1myc-HisA-Smad2/3/4, 有一明显条带 (图 3), 空载体对照组未出现反应条带, 结果表明构建的真核表达质粒在 HEK293 细胞中表达。

## 3 讨论

TGF- $\beta$  对上皮细胞生长有抑制作用。在肿瘤早期, 可以抑制肿瘤的发生。但是, 在肿瘤晚期, TGF- $\beta$ 1 的生长抑制作用被限制, 并通过引起细胞的上皮向间质转化促进癌细胞迁移和侵袭<sup>[6]</sup>。一些肿瘤中存在 TGF- $\beta$  信号通路蛋白 (如 T $\beta$ R II, Smad4) 的突变, 从而逃避 TGF- $\beta$  引起的生长抑制。利用细胞系进行研究发现: 仅 40% 的胃癌细胞中存在 TGF- $\beta$  信号通路蛋白的突变, 但在外源转入突变蛋白对应的野生型蛋白后, 其中 75% 的

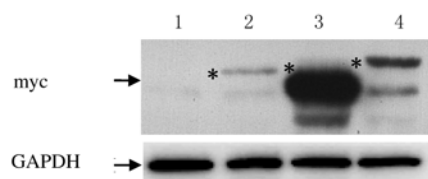


图 3 Western blotting 检测 pcDNA3.1myc-HisA-Smad2/3/4 融合蛋白在 HEK293 细胞中的表达

Fig. 3 Expressions of pcDNA3.1myc-HisA-Smad2/3/4 fusion proteins in HEK293 cells detected by Western blotting

Lane 1: pcDNA3.1myc-HisA vector; Lane 2: pcDNA3.1myc-HisA-Smad2; Lane 3: pcDNA3.1myc-HisA-Smad3; Lane 4: pcDNA3.1myc-HisA-Smad4; \* target protein.

细胞仍然不能恢复对 TGF- $\beta$  的反应性, 这提示胃癌细胞内存在重要的 TGF- $\beta$  通路抑制因子。有学者<sup>[7-8]</sup>发现一些 TGF- $\beta$  通路的抑制因子, 如在骨髓瘤中 CDK2 通过磷酸化 Smad2 的 MH1 区破坏 TGF- $\beta$  引起的转录调节功能; Cam kinase II 通过磷酸化 Smad2/3/4 抑制 TGF- $\beta$ /Smads 的转录调节功能; PKB 通过结合 Smad3 抑制其转录活性及核转位。但是, 还可能存在未被发现的 TGF- $\beta$  通路抑制因子。

经典的 Smads 信号通路是 TGF- $\beta$  作为配体与相应膜受体结合, 进而激活相应下游信号蛋白 Smads, 行使对应的生物学功能, 形成一个严格而精密的信号网络。TGF- $\beta$ 1 属于 TGF 超家族的 TGF 亚类, 能够结合并激活细胞膜上的 TGF- $\beta$  受体 II (T $\beta$ R II), 活化的 T $\beta$ R II 进而结合并磷酸化同样位于细胞膜上的 TGF- $\beta$  受体 I (T $\beta$ R I, AXL5)。具有活性的受体复合体形成后, 细胞质内的 Smad2/3 C 末端的 SXS 序列被 T $\beta$ R I 磷酸化, 与 Smad4 形成复合体, 进入细胞核并行使基因转录调控功能<sup>[9]</sup>。

最近有研究表明: 虽然经典的 Smads 作用是由 R-Smads 与 Smad4 形成复合体来完成, 但也存在不依赖 Smad4 的情况。在角质细胞中, IKK $\alpha$  能够结合 Smad2/3 并促进 Mad1、Mad2 等介导 TGF- $\beta$  引起的细胞生长抑制基因的表达, 这种促进不依赖于 Smad4<sup>[10]</sup>。在造血干细胞中, 核蛋白转录中介因子 1 $\gamma$  (TIF1 $\gamma$ ) 能够与 Smad4 竞争和 Smad2/3 的结合, 介导 TGF- $\beta$ /Smads 引起的不同作用: Smad2/3-TIF1 $\gamma$  介导细胞分化, 而

Smad2/3-Smad4 介导细胞的生长抑制<sup>[11]</sup>。

目前, 肿瘤已经成为威胁人类健康的重要疾病, 其发病率逐年上升, 但其发生发展的分子机制仍未完全阐明, TGF- $\beta$ / Smads 信号转导通路在机体组织中生物学作用广泛, 与肿瘤的发生发展密切相关。因此, 本实验利用 DNA 重组技术将 Smad2/3/4 重组到 pcDNA3.1myc-HisA 载体中, 通过酶切和测序保证扩增片段的正确性, 并采用 Western blotting 方法证实融合蛋白的表达。融合蛋白中含有 myc 标签, 可用于目标蛋白的纯化和检测。

综上所述, 本实验成功构建 pcDNA3.1myc-HisA-Smad2/3/4 真核表达质粒, 为进一步研究其在信号转导通路中的作用提供了实验基础。

#### [参考文献]

- [1] Lin X, Chen Y, Meng A, et al. Termination of TGF-beta superfamily signaling through SMAD dephosphorylation—a functional genomic view [J]. *J Genet Genomics*, 2007, 34(1): 1-9.
- [2] Wrighton KH, Lin X, Feng XH. Phospho-control of TGF-beta superfamily signaling [J]. *Cell Res*, 2009, 19(1): 8-20.
- [3] Brown KA, Pietenpol JA, Moses HL. A tale of two proteins: differential roles and regulation of Smad2 and Smad3 in TGF-beta signaling [J]. *J Cell Biochem*, 2007, 101(1): 9-33.
- [4] Runyan CE, Schnaper HW, Poncelet AC. The role of internalization in transforming growth factor beta1-induced Smad2 association with Smad anchor for receptor activation (SARA) and Smad2-dependent signaling in human mesangial cells [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(9): 8300-8308.
- [5] Seong HA, Jung H, Kim KT, et al. 3-phosphoinositide-dependent PDK1 negatively regulates transforming growth factor-beta-induced signaling in a kinase-dependent manner through physical interaction with Smad proteins [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(16): 12272-12289.
- [6] Wakefield LM, Roberts AB. TGF-beta signaling: positive and negative effects on tumorigenesis [J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2002, 12(1): 22-29.
- [7] Baughn LB, Di Liberto M, Niesvizky R, et al. CDK2 phosphorylation of Smad2 disrupts TGF-beta transcriptional regulation in resistant primary bone marrow myeloma cells [J]. *J Immunol*, 2009, 182(4): 1810-1817.
- [8] Remy I, Montmarquette A, Michnick SW. PKB/Akt modulates TGF-beta signalling through a direct interaction with Smad3 [J]. *Nat Cell Biol*, 2004, 6(4): 358-365.
- [9] Schmierer B, Hill CS. TGFbeta-SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8(12): 970-982.
- [10] Descargues P, Sil AK, Sano Y, et al. IKK $\alpha$  is a critical coregulator of a Smad4-independent TGFbeta-Smad2/3

signaling pathway that controls keratinocyte differentiation [J].  
Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105(7): 2487-2492.  
[11] He W, Dorn DC, Erdjument-Bromage H, et al.

Hematopoiesis controlled by distinct TGF $\beta$  and Smad4  
branches of the TGF $\beta$  pathway [J]. Cell, 2006,  
125(5): 929-941.

## 骨疏康配合手法治疗骨质疏松症并发颈椎病 60 例疗效观察

天津中医药大学第一附属医院骨科(天津 300193) 赵冀伟

### 1 资料与方法

1.1 一般资料 180 例患者选自本院骨伤科 2009 年 10 月—2011 年 2 月门诊患者。纳入标准: ①骨质疏松症诊断标准参照世界卫生组织推荐的骨质疏松症诊断标准; 颈椎病诊断标准依据文献制定, 包括颈肩背部疼痛不适、头晕、头痛或伴有手臂麻木、酸胀、拘急以及恶心、视物模糊等临床症状; 颈椎 X 光片示有退行性改变; 同时伴有一些全身症状, 如腰膝酸软、四肢无力或耳鸣、形寒肢冷等; ②年龄 50~68 岁; ③临床观察前 4 周内未接受同类药物治疗者。病例排除标准: ①并发心、脑血管、肝、肾、造血系统及内分泌系统等严重原发性疾病及精神病患者; ②非颈椎退行性变所致的以上肢疼痛为主的疾患, 如腕管综合征、肩周炎等; ③有药物过敏史; ④正在使用其他抗骨质疏松药物治疗者。凡有上述情况之一者不予入选。所有患者随机分为 3 组: 治疗组 60 例, 男性 8 例, 女性 52 例, 年龄 52~68 岁, 平均 62.8 岁; 手法对照组 60 例, 男性 6 例, 女性 54 例, 年龄 50~68 岁, 平均 61.7 岁; 药物对照组 60 例, 男性 7 例, 女性 53 例, 年龄 51~67 岁, 平均 63.8 岁; 3 组患者在性别、年龄方面差异无显著性 ( $P>0.05$ ), 具有可比性。

1.2 治疗方法 治疗组: 服用骨疏康冲剂(辽宁东港康辰医药发展有限公司生产, 批号 Z20003255), 每日 2 次, 每次 10 g, 温开水送服, 连服 3 个月, 同时配合手法治疗每日 1 次。①放松手法: 患者取坐位, 在颈椎棘突两侧及双侧肩背部, 做按揉法, 使颈部肌肉放松, 解除痉挛。②拔伸手法: 患者取坐位, 术者立于患侧, 一手托住患者下颌, 一手扶住患者后枕部, 两手同时向上缓缓用力拔伸, 当拔伸到最大限度时, 使头向左右旋转 3~4 次。③整理手法: 患者取坐位, 放松颈肩部, 术者立于患者后方轻柔揉颈肩部, 理顺肌肉, 帮助患者做前屈、后伸、侧屈及旋转运动。手法对照组: 采用与治疗组同样的手法治疗, 每日 1 次, 治疗 3 个月。药物对照组: 服用骨疏康冲剂, 每日 2 次, 每次 10 g, 温开水送服, 连服 3 个月。

1.3 检测指标 采用双能 X 线骨密度检测仪检测腰椎部位的骨密度。生化法检测碱性磷酸酶 (ALP), 酶法测定抗酒石酸盐酸性磷酸酶 (TRAP)。观察治疗前后症状改变状况, 治疗前后拍摄颈椎正侧位片, 观察颈椎退变改善程度。

1.4 统计学分析 采用 SPSS 11.5 统计软件进行统计分析, 计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 用药前后比较采用配对  $t$  检验, 计数资料组间比较采用  $\chi^2$  检验, 等级资料采用 Ridit 分析。

### 2 结果

2.1 疗效评定标准 显效: 临床症状消失或明显好转, X 线颈椎退变未见加重, 骨密度有提高; 有效: 临床症状有好转, X 线颈椎退变未见明显变化, 骨密度无变化; 无效: 临床症状无好转, X 线颈椎退变加重, 骨密度降低。

2.2 治疗结果 治疗组显效 52 例, 有效 6 例, 无效 2 例, 总有效率 96.7%; 手法对照组显效 2 例, 有效 48 例, 无效 10 例, 总有效率 83.3%; 药物对照组显效 6 例, 有效 45 例, 无效 9 例, 总有效率 85.0%; 治疗组总有效率高与手法对照组和药物对照组 ( $P<0.05$ )。治疗组与药物对照组患者骨密度 ( $g \cdot cm^{-2}$ ) 治疗后 ( $0.832 \pm 0.162$ ,  $0.842 \pm 0.112$ ) 较治疗前 ( $0.743 \pm 0.132$ ,  $0.744 \pm 0.121$ ) 明显升高 ( $P<0.01$ ), 手法对照组患者骨密度治疗后 ( $0.752 \pm 0.112$ ) 较治疗前 ( $0.742 \pm 0.122$ ) 无明显变化 ( $P>0.05$ )。治疗组、手法对照组和药物对照组患者 ALP ( $U \cdot L^{-1}$ ) 治疗后 ( $68.20 \pm 11.24$ ,  $64.90 \pm 11.24$ ,  $68.90 \pm 10.29$ ) 与治疗前 ( $63.7 \pm 10.26$ ,  $64.8 \pm 10.22$ ,  $63.7 \pm 11.24$ ) 比较差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。治疗组与药物对照组患者 TRAP ( $U \cdot L^{-1}$ ) 治疗后 ( $2.39 \pm 1.14$ ,  $2.43 \pm 1.18$ ) 较治疗前 ( $4.48 \pm 1.29$ ,  $4.45 \pm 1.26$ ) 明显降低 ( $P<0.01$ ), 手法对照组患者 TRAP ( $U \cdot L^{-1}$ ) 治疗后 ( $4.38 \pm 1.44$ ) 较治疗前 ( $4.49 \pm 1.24$ ) 降低, 但差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。

### 3 讨论

骨疏康以淫羊藿、熟地黄为主药, 淫羊藿温补肾阳, 熟地黄滋补肾阴, 阴阳齐补, 填精补髓, 使肾气充盛; 骨碎补为辅料, 以补肾活血, 加强主药补肾壮骨之力。黄芪和丹参为佐药, 起到益气活血作用。全方以补为主, 通补兼施; 以治本为主, 标本兼治, 着重整体调节, 阴阳双补, 气血共调, 使肾气充盈, 骨强髓旺。现代研究证明: 骨疏康中的中药成分淫羊藿、黄芪均能有效防治骨质疏松症。TRAP 反应破骨细胞活性, 骨疏康可以使 TRAP 明显下降, 表明骨疏康有抑制破骨细胞活性、减缓骨吸收的作用, 而抑制骨吸收是减缓骨量丢失的关键, 再次证明骨疏康对骨质疏松症的治疗作用。手法治疗作用在于扩大椎间隙及椎间孔, 使椎体滑脱者复位, 松解肌肉, 改善血液循环, 促进新陈代谢, 解除肌肉紧张痉挛, 提高局部组织的痛阈, 松解颈部软组织黏连, 解除神经血管束的卡压; 促进静脉、淋巴回流, 促进炎症递质的分解、稀释, 使局部损伤性炎症消退, 恢复颈部生物力学平衡, 促使病变组织恢复正常。综上所述, 采用骨疏康配合手法治疗颈椎病并发骨质疏松症, 能明显提高疗效, 利于疾病更快治愈, 值得推广。