

独活寄生汤对大鼠腰椎间盘突出细胞活性及 CaM-CaMK-CREB 信号通路的影响*

钟灼琴¹, 李长辉², 宋红梅², 陈彦², 林志辉²,
叶颖², 陈倩婧², 王诗忠³, 张坤木^{2△}

(1. 福建省立医院, 福建 福州 350003; 2. 福建中医药大学附属第二人民医院, 福建 福州 350003

3. 福建生物工程职业技术学院, 福建 福州 350001)

摘要: **目的** 研究独活寄生汤治疗腰椎间盘突出症与 CaM-CaMK-CREB 信号通路的内在关联。**方法** 用独活寄生汤中药血清、空白血清及胎牛血清对大鼠腰椎间盘突出纤维环细胞进行分组干预。采用 MTT 比色法检测独活寄生汤中药血清作用后的纤维环细胞生长曲线; 应用 western blotting 技术检测独活寄生汤中药血清对 CaM、CaMK、CREB 表达及定量的影响, 并对检测结果进行数据处理及统计学分析。**结果** 中药血清干预后的第 1 天, 5 组之间两两比较无明显差异 ($P>0.05$); 中药血清干预后的第 2 天至第 7 天各组与空白血清组比较均有明显差异 ($P<0.05$); 与空白血清组比较, 各剂量独活寄生汤中药血清均能可显著提高大鼠腰椎间盘突出纤维环细胞内的 CaM、CaMKII、CaMKIV 和 CREB 等蛋白的表达水平 ($P<0.01$), 且随着中药剂量的增加 CaM、CaMKII、CaMKIV 和 CREB 等蛋白的表达水平提升能力也在增加。**结论** 独活寄生汤中药血清可明显促进大鼠腰椎间盘突出纤维环细胞生长, 随着中药剂量的增加中药血清促进细胞生长能力增强; 临床上独活寄生汤治疗腰椎间盘突出症效应过程可能存在一条重要的信号通路“CaM-CaMK-CREB”。

关键词: 独活寄生汤; 腰椎间盘突出细胞; 原代培养; 信号通路; 腰椎间盘突出

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2723(2015)02-0011-04

独活寄生汤方原出孙思邈《备急千金要方》。方中重用独活为君, 辛苦微温, 善治伏风, 除久痹, 且性善下行, 以祛下焦与筋骨间的风寒湿邪。臣以细辛、防风、秦艽、桂心, 细辛入少阴肾经, 秦艽祛风湿, 舒筋络而利关节, 桂心温经散寒, 通利血脉, 防风祛一身之风而胜湿; 佐入桑寄生、杜仲、牛膝以补益肝肾而强筋健骨, 当归、川芎、地黄、白芍养血和血, 人参、茯苓、甘草健脾益气。纵观全方, 以祛风寒湿邪为主, 辅以补肝肾、益气血之品, 邪正兼顾, 祛邪不伤正, 扶正不留邪。很多临床研究表明独活寄生汤对脊柱及骨关节疾病具有明显的治疗效果。刘氏^[1]以独活寄生汤治疗老年腰椎间盘突出症 36 例, 治愈 22 例, 好转 13 例, 无效 1 例, 总有效率 97.2%; 方氏^[2]以独活寄生汤加减联合塞来昔布治疗轻中度

膝骨关节炎 58 例, 显效 21 例, 有效 10 例, 无效 7 例, 总有效率达到 87.93%; 李氏^[3]等以独活寄生汤加味治疗腰椎间盘突出症 64 例观察, 痊愈 36 例, 有效 24 例, 无效 4 例, 占 5.31%, 总有效率 94%; 白氏^[4]等以独活寄生汤加味治疗腰椎间盘突出症 130 例观察, 治愈 69 例, 显效 24 例, 好转 21 例, 无效 16 例, 总有效率 87.69%。但其深入机理未见报道。

引起腰椎间盘突出症的原因很多, 椎间盘退变是主要因素, 其中尤以纤维环破裂被认为是重要的诱发因素而使纤维环在临床和基础研究中倍受关注^[5]。结合以往研究^[6-7], 在纤维环细胞信号转导中, 二级信号分子 Ca^{2+} 下游产物 CaM、CaMK、CREB 之间存在着一条重要的信号通路“CaM-CaMK-CREB”。以往针对本通路的调控研究不够系统, 完

* 基金项目: 福建省教育厅课题(JB11084); 福建省中医处中医药科研课题(wzkf201304/wzkf201302)

收稿日期: 2015-02-23

作者简介: 钟灼琴(1985-)女, 福建罗源人, 住院医师, 在读硕士研究生, 主要研究方向: 脊椎病康复。

△通信作者: 张坤木, E-mail: 277873495@qq.com

整研究 CaM-CaMK-CREB 通路的文献未检索到,因此,笔者从独活寄生汤中药血清对大鼠腰椎间盘突出纤维环细胞信号转导机制这一新的研究方向进行以下探索:先通过实验观察独活寄生汤中药血清对大鼠腰椎间盘突出纤维环细胞生长及对 CaM、CaMK、CREB 表达及定量的影响,后研究临床上独活寄生汤治疗腰椎间盘突出症效应过程与对 CaM-CaMK-CREB 信号通路的内在关联。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

生物净化工作台(苏州净化设备有限公司 SW-CJ-IF);CO₂ 培养箱(日本 SANYO 公司);倒置显微镜(德国 Leica 公司);离心沉淀器(上海手术器械厂 80-2 CENTRIFUGE);恒温水浴锅(深圳 HH-4);550 型酶标仪(美国 BIO-RAD 公司);稳压稳电流泳仪(北京六一仪器厂 DYY-6B);凝胶成像系统(美国 BIO-RAD 公司 Gel Doc XR);所用中药均购自本校国医堂;其余试剂买已经配好的。

1.2 动物

1.2.1 实验动物一

健康清洁级 SD 大鼠 80 只,体质量(250±10)g 范围,雌雄各半,用于中药血清及空白血清制备。

1.2.2 实验动物二

健康 1 个月龄清洁级 SD 大鼠 2 只,体质量 100g 左右,雌雄不拘,用于提取椎间盘细胞。

以上两组动物均购买于上海斯莱克实验动物有限责任公司,许可证号 SCXX(沪)2008-0005。饲养于本校实验动物中心(医动字 23-016 号)。

1.3 方法

1.3.1 中药药物制备

独活寄生汤由独活、桑寄生、杜仲、牛膝、细辛、秦艽、茯苓、肉桂心、防风、川芎、人参、甘草、当归、芍药、干地黄等 15 味中药组成,由福建中医学院附属第二人民医院药物制剂中心严格按《备急千金要方》原方剂量比例制剂并提供。

1.3.2 独活寄生汤中药血清及空白血清的制备^[8-10]

独活寄生汤由本医院药物制剂中心严格按《伤寒论》原方剂量比例制剂并提供。将药物按体表面积折算成动物的等效剂量,大鼠生药量为 11.6 g/kg。选择 Sprague-Dauley 大鼠 80 只,体质量在(250±10)g 范围,雌雄各半,以计算机随机分组法将

其分为 4 组即:低剂量组 20 只大鼠、中剂量组 20 只大鼠、高剂量组 20 只大鼠和基线对照组 20 只大鼠。低剂量组以等效剂量的 0.5 倍(每只 1mL)、中剂量组以等效剂量(每只 2mL)、高剂量组以 2 倍剂量(每只 4mL)灌胃,基线对照组以 2mL 生理盐水代之。连续灌胃 4d(每天 2 次),于末次灌胃 2h 后乙醚吸入麻醉,于腹主动脉及心脏采血,分离血清,-20℃保存,备用。

1.3.3 大鼠椎间盘纤维环细胞原代培养、传代培养及鉴定

在参考大量文献^[11-15]基础上反复实验目前已研究出简单易行、重复性强的方法,并发表在相关期刊上^[16]。以往的文献报道研究通常在细胞原代培养与传代培养中使用同一体积分数胎牛血清的培养液,实验发现此方法不利于细胞的传代培养,且细胞在传代过程中稳定性降低,为此本实验在原代培养中使用体积分数 15%胎牛血清的 DMEM 培养基,细胞传代培养一代后可换成体积分数为 10%胎牛血清的 DMEM 培养基,既保证了细胞的正常生长,有尽可能的节约资源。

1.3.4 MTT 比色法测定大鼠椎间盘纤维环细胞生长曲线

1.3.4.1 实验步骤

参考薄华本,邵红伟,胡凌波等关于细胞活性检测方法优化研究中的方法^[17]。结合本实验实际情况主要分为计算细胞量调整浓度、培养细胞、呈色和比色等 4 个步骤,最终通过 492nm 波长的酶标仪测得相应吸光度值(即比色值)。记录分析。

1.3.4.2 结果分析

统计分析用 SPSS13.0 软件进行,数据表示用均值±标准差($\bar{x} \pm s$),本实验为组间多重比较故我们采用单因素方差分析检验,以 $P < 0.05$ 为差别有统计学意义。

1.3.5 Western blotting 检测相关蛋白表达水平

1.3.5.1 实验步骤

参考杨志高,张帆,陈智等关于退变腰椎间盘髓核中磷酸化 p38MAPK 的表达中的 Western blotting 检测方法^[18]。取蛋白进行聚丙烯酰胺凝胶电泳 90min,按照湿转法将电泳产物放在 NC 膜上转膜 2h,TBST 液清洗 3 次后将 NC 膜放入封闭液中室温下摇床 2h 后置于 4 摄氏度冰箱过夜,一抗孵育用

TBS(1:500)稀释室温下孵育 2h,TBST 清洗 3 次,每次 10min,二抗孵育用 TBST(1:3 000)稀释室温下孵育 2h,TBS 清洗 2 次,每次 5min。最后用购买的 AB 试剂盒显色,胶片成像收集图像。

1.3.5.2 蛋白条带分析

采集胶片图像采用 BIO-RAD 凝胶成像系统,计算条带的 OD 值运用 Image-Pro Jia 6.0 软件,并进行半定量分析。

1.3.5.3 数据分析

统计分析用 SPSS17.0 软件进行,用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示数据,本实验为组间多重比较故我们采用单因素方差分析检验,以 $P<0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 MTT 法检测独活寄生汤中药血清对大鼠腰椎间盘突出纤维环细胞活性的影响

MTT 法检测结果(见表 1)。

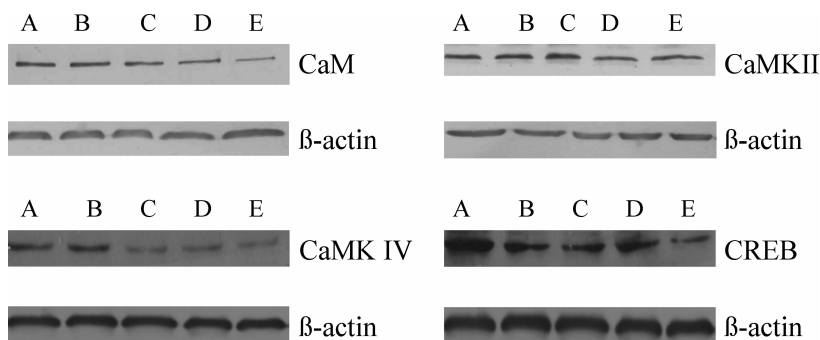
2.2 Western blotting 方法检测相关蛋白结果(见图

表 1 各组血清对大鼠腰椎间盘突出细胞生长影响比色值

组别	作用 1d	作用 2d	作用 3d	作用 4d	作用 5d	作用 6d	作用 7d
空白组	0.183±0.0015 ^a	0.245±0.0042	0.370±0.0011	0.457±0.0023	0.543±0.0034	0.620±0.0015	0.621±0.0010
低剂量组	0.184±0.0012 ^a	0.260±0.0016 ^b	0.443±0.0018 ^b	0.581±0.0031 ^b	0.636±0.0021 ^b	0.714±0.0023 ^b	0.776±0.0024 ^b
中剂量组	0.184±0.0014 ^a	0.285±0.0021 ^b	0.489±0.0018 ^b	0.659±0.0026 ^b	0.704±0.0027 ^b	0.822±0.0019 ^b	0.993±0.0014 ^b
高剂量组	0.185±0.0012 ^a	0.349±0.0020 ^b	0.584±0.0023 ^b	0.690±0.0013 ^b	0.793±0.0017 ^b	0.909±0.0017 ^b	1.081±0.0175 ^b
胎牛血清组	0.185±0.0022 ^a	0.393±0.0016 ^b	0.628±0.0019 ^b	0.749±0.0020 ^b	0.817±0.0037 ^b	0.959±0.0031 ^b	1.177±0.0152 ^b

注:中药血清干预后的当天,五组之间无明显差异(^a $P>0.05$);干预后的第二天至第七天各组与空白血清组比较均有明显差异(^b $P<0.05$)

2,表 2)



各组血清对大鼠腰椎间盘突出细胞 CaM、CaMK 和 CREB 蛋白的影响:A 胎牛血清组,B 高剂量中药血清组,C 中剂量中药血清组,D 低剂量中药血清组,E 空白血清组

图 2 Western blotting 方法检测相关蛋白结果

表 2 各组血清对大鼠腰椎间盘突出细胞 CaM、CaMK 和 CREB 蛋白的影响

(%)

组别	CaM	CaMKII	CaMK IV	CREB
胎牛血清组	17.000±0.090 ^a	49.193±1.406 ^a	57.915±0.101 ^a	61.047±0.484 ^a
高剂量中药血清组	17.120±0.086 ^{ab}	50.499±1.360 ^{ab}	58.664±1.059 ^{ab}	61.601±0.414 ^{ab}
中剂量中药血清组	16.150±0.057 ^{ab}	46.642±3.484 ^{ab}	57.107±0.053 ^{ab}	60.078±0.494 ^{ab}
低剂量中药血清组	11.121±0.155 ^{ac}	20.432±0.189 ^{ac}	39.093±0.523 ^{ac}	37.052±0.085 ^{ac}
空白血清组	8.242±1.170 ^c	11.451±0.020 ^c	19.291±0.157 ^c	20.388±0.432 ^c

注:与空白血清组比较,低、中、高剂量中药血清组和 10%胎牛血清组蛋白表达水平均较明显升高(^a $P<0.05$);与 10%胎牛血清组比较,高、中剂量中药血清组的蛋白表达能力均无明显变化(^b $P>0.05$),但低剂量中药血清组及空白血清组的蛋白表达有明显变化(^c $P<0.05$);高剂量中药血清组与中剂量中药血清组的蛋白表达能力比较有明显差异(^a $P<0.05$)。

3 讨论

“血清药理学”是日本学者 Hiroko Iwama 首次提出,田代真一正式明确概念。它是指将中药或中药复方经口给动物灌服一定时间后采集动物血液,分离血清,用含有药物成分的血清进行体外实验的一种半体内实验方法。该方法对中药离体实验有重大意义。主要针对中药及其复方复杂多样的化学成分特点,用含药血清代替煎剂或粗提物进行体外实验。因为它克服了中药粗制剂直接进行体外实验的缺点,其结果的可信度高,本实验即采用此技术模拟独活寄生汤体内实验进行体外干预研究。

通过 MTT 比色法检测独活寄生汤中药血清对大鼠腰椎间盘突出纤维环细胞生长的影响研究发现:低、中、高剂量中药血清组和 10%胎牛血清组等 4 组均能明显促进大鼠腰椎间盘突出纤维环细胞生长($P < 0.05$);这种作用跟时间、剂量息息相关,随着中药剂量的增加中药血清促进细胞生长能力增强。但同时由于 MTT 法只能用来检测细胞相对数和相对活力,不能测定细胞绝对数,说服力不够,如何更精确的测定其真实细胞数有待进一步深入探讨。

进一步通过 Western blotting 方法检测独活寄生汤中药血清对大鼠腰椎间盘突出纤维环细胞中 CaM-CaMK-CREB 蛋白影响发现:各剂量中药血清均能提高大鼠腰椎间盘突出纤维环细胞的相关蛋白表达水平,但在等效剂量(相当于本实验的中剂量)以下中药血清在提高相关蛋白表达能力方面与 10%胎牛血清组有明显的差异,等效剂量以上制成的中药血清在提高相关蛋白表达水平方面与 10%胎牛血清组无明显的差异。本实验只能说明各剂量独活寄生汤中药血清都能提高 CaM、CaMKII、CaMKIV 和 CREB 等蛋白的表达水平,且低剂量中药血清组提升相关能力最弱,高剂量中药血清组提升相关蛋白表达水平能力最强。但由于实验条件的限制,本人的课题设计中并未加入相关蛋白抑制剂,Western blotting 检测结果只能说明应用独活寄生汤中药血清作用于大鼠腰椎间盘突出纤维环细胞可明显改变 CaM、CaMK、CREB 表达及定量,但临床上独活寄生汤防治腰椎间盘突出症的效应过程是否确实存在着一条重要的信号通路“CaM-CaMK-CREB”尚有待进一步的完善。而且是否存在其他信号通路影响也将是我们需要进一步深入探讨的重要问题。

参考文献:

- [1] 刘瑞珍. 独活寄生汤治疗老年腰椎间盘突出症 36 例[J]. 光明中医, 2009, 24(8): 1478-1479.
- [2] 方涛. 独活寄生汤加减联合塞来昔布治疗轻中度膝关节炎的疗效观察[J]. 云南中医学院学报, 2014, 37(4): 65-67.
- [3] 李本觉, 贺文容. 独活寄生汤加味治疗腰椎间盘突出症 64 例[J]. 现代中西医结合杂志, 2009, 18(27): 3319-3320.
- [4] 白义认, 孙香林, 王雷. 独活寄生汤加味治疗腰椎间盘突出症 130 例[J]. 现代中医药, 2010, 30(3): 34-35.
- [5] 何磊, 王志峰, 韩明舫. 腰椎间盘突出退变机理及防治的研究[J]. 辽宁中医药大学学报, 2007, 9(6): 59-60.
- [6] Mizuno M, Yamada K, Maekawa N, et al. CREB phosphorylation as a molecular marker of memory processing in the hippocampus for spatial learning [J]. Behav Brain Res, 2002, 133(2): 135-141.
- [7] Kunmu Zhang, Changhui Li, Shizhong Wang, et al. A study of the influence of Guizhi plus Gegen Decoction on the mechanism of signal transductions occurring in cervical intervertebral disc cells of adult rats[J]. Biomedical Research, 2014, 25 (4): 620-625.
- [8] 崔晓兰, 周爱香, 贺玉琢, 等. 中药复方血清药理研究方法学探讨-IV[J]. 中国实验方剂学杂志, 2000, 6(2): 23.
- [9] 许理忠, 侯宝兴, 王拥军, 等. 益气化痰方对体外培养的大鼠颈椎间盘软骨细胞超微结构的影响 [J]. 上海中医药大学学报, 2004, 18(2): 47.
- [10] 李仪奎. 中药血清药理学实验方法的若干问题 [J]. 中药新药与临床药理, 1999, 10(2): 95-98.
- [11] 周泉, 王拥军, 施杞. 椎间盘纤维环细胞的培养[J]. 脊柱外科杂志, 2003, 1(4): 226-229.
- [12] 甘露, 张志辉, 吕美娜, 等. 细胞培养技术[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2008, 12(29): 5739-5742.
- [13] 潘勇, 周跃, 李长青, 等. 组织工程椎间盘纤维环种子细胞的培养和鉴定[J]. 四川医学, 2009, 4(30): 450-452.
- [14] 林旺, 王万明. 纤维环细胞的培养技术及生长因子调控[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(15): 2955-2959.
- [15] 郭志良, 周跃, 滕海军, 等. 大鼠椎间盘纤维环细胞的培养和鉴定[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(2): 300-304.
- [16] 张坤木, 陈少清, 宋红梅, 等. 大鼠椎间盘纤维环细胞的培养及鉴定[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(11): 1973-1976.
- [17] 薄华本, 邵红伟, 胡凌波, 等. 细胞活性检测方法优化[J]. 中国实用医药, 2008, 3(21): 1-2.
- [18] 杨志高, 张帆, 陈智, 等. 退变颈椎间盘髓核中磷酸化 p38MAPK 的表达 [J]. 第二军医大学学报, 2010, 7(31): 739-743.

(编辑: 杨阳)

(英文摘要见第 20 页)

- 然产物研究与开发,2009,21(1):10-12.
- [7] 赵庆,郝小江,邹澄,等. 滇姜花中的两个新成分 [J]. 天然产物研究与开发,2008,20(5):761-764.
- [8] 高杰杰,郝小江,何红平,等. 圆瓣姜花的化学成分研究 [J]. 云南中医学院学报,2013,36(3):28-30.
- [9] Zhao Q,Hong X,Wang Y S,et al. Two new diterpenoids from *Hedychium forrestii* [J]. Chinese Chemical Letters, 2003,14(11):1141-1143.
- [10] 赵映梅,邹海舰,朱培芳,等. 滇姜花中倍半萜成分的研究 [J]. 云南中医学院学报,2012,35(6):7-9.
- [11] 赵庆,郝小江,陈耀祖,等. 滇姜花的倍半萜成分[J]. 云南植物研究,1995,17(2):201-203.
- [12] 赵庆,邹澄,郝小江,等. 滇姜花抗肿瘤活性二萜及其光敏氧化反应的研究 [J]. 植物学报,1999,41(5):528-530.
- [13] Zhao Q,Hao X J,Chen Y Z,et al. Studies on Photosensitized Oxidation of Diterpenoids from *Hedychium* Genus [J]. Chinese Chemical Letters,1996,7(1):25-28.
- [14] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival:application to proliferation and cytotoxicity assays [J]. J Immunol Methods,1983,65:55-63.
- [15] Fu Y H,Zhang Y,He H P,et al. Strynuxlins A and B, alkaloids with an unprecedented carbon skeleton from *Strychnos nux-vomica* [J]. J Nat Prod,2012,75:1987-1990.
- (编辑:杨阳)

Photosensitized Oxidation of α -eudesmol and Antitumor Researches of the Products

ZHAO Ying-mei¹, ZHANG Ying², ZOU Cheng², CAO Qing-qing³, ZHAO Qing³

(1. Chenggong District Hospital, Kunming 650500, China; 2. Kunming Medical University, Kunming 650500, China;

3. Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650500, China)

ABSTRACT: **Objective** Sesquiterpenoids were utilized to synthesis bioactive derivatives. **Methods** α -eudesmol, a sesquiterpene, was oxidized with the method of photosensitized oxidation. **Results** Three sesquiterpene derivatives were obtained, one peroxide derivative showed significant antitumor activity against several cancer cells. **Conclusion** It is feasible to obtain the derivatives with significant antitumor activity.

KEY WORDS: α -eudesmol; photosensitized oxidation; antitumor activity; sesquiterpenoids; *Hedychium yunnanense* Gangep; Zingiberaceae

(原文见第 11 页)

Effect of Duhuo Jisheng Decoction on the Cells Activity and Signal Transductions of CaM-CaMK-CREB Occurring in Lumbar Disc Cells of Adult Rats

ZHONG Zhuo-qin¹, LI Chang-hui², SONG Hong-mei², CHEN Yan², LIN Zhi-hui², YE Ying²,
CHEN Qian-jing², WANG Shi-zhong³, ZHANG Kun-mu²

(1. Fujian Provincial Hospital, Fuzhou 350003, China;

2. Second People's Hospital, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350003, China;

3. Fujian Vocational College of Bioengineering, Fuzhou 350001, China)

ABSTRACT: **Objective** The relationship between the CaM-CaMK-CREB signal pathway and the treatment for lumbar disc disease by Duhuo Jisheng decoction was studied. **Methods** Group intervention on fibrous ring cells of lumbar intervertebral disc of adult rats by medicine serum mixed with Du huo ji sheng decoction, blank serum and fetal calf serum respectively was made. Detect by MTT colorimetric assay the growth curve of fibrous ring cell under the adoption of Du huo ji sheng decoction serum; Conduct western blotting to detect the impact of herbal medicine serum on expression and quantification of CaM, CaMK and CREB; Perform data processing and statistical analysis on the results. **Results** The five groups showed no significant difference between each other during the first day after the intervention of Chinese medicine serum ($P>0.05$); from the second to seventh day after the intervention, there were significant difference between the blank serum group and other groups ($P<0.05$). Compared with the blank serum group, Du huo ji sheng Decoction medicine serum at all doses could substantially improve the expression of CaM, CaMKII, CaMKIV and CREB in fibrous ring cells of lumbar intervertebral disc of adult rats ($P<0.01$), and with the increased doses of Chinese medicine, the capacity of improving the expression level was also increasing. **Conclusion** Du huo ji sheng decoction medicine serum could highly stimulate the development of fibrous ring cells of lumbar intervertebral disc of adult rats. Clinically when it comes to the treatment by Du huo ji sheng decoction for lumbar disc disease, there is likely to be an important signal pathway called "CaM-CaMK-CREB".

KEY WORDS: Duhuo Jisheng Decoction; lumbar disc cells; primary cell culture signal pathway; Lumbar disc herniation