

中药热奄包外敷干预颈型颈椎病家兔的实验研究^{*}

罗先意¹, 黄少炎¹, 史红美¹, 王光义^{2*}

(1. 贵州医科大学, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵州医科大学附院, 贵州 贵阳 550004)

[摘要] 目的: 观察中药热奄包外敷干预对颈型颈椎病模型兔颈肌的形态学、血清白细胞介素 1- β (IL-1 β) 和白细胞介素-6 (IL-6) 水平的影响。方法: 将 24 只雄性健康新西兰家兔随机均分为空白对照组、模型组和外敷组, 空白对照组家兔不制模不干预, 模型组和外敷组采用无创方法制作颈型颈椎病模型, 外敷组家兔于造模成功后颈部予中药热奄包外敷治疗 3 疗程; 外敷组干预结束后处死各组家兔, 观察各组家兔颈肌组织形态学, 采用 Elisa 检测各组家兔血清中 IL-1 β 和 IL-6 水平。结果: 与空白对照组比较, 模型组家兔颈部肌纤维排列紊乱、肿胀、变性坏死和炎细胞浸润, 毛细血管淤积阻塞, 血清 IL-1 β 和 IL-6 水平明显高于空白对照组 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 外敷组家兔颈部肌纤维排列整齐、无明显炎症反应, 毛细血管通畅、分布均匀, 血清 IL-1 β 和 IL-6 水平低于模型组 ($P < 0.01$)。结论: 中药热奄包外敷能缓解颈部损伤肌纤维的炎性变化, 改善局部微循环, 降低血清炎症因子 IL-1 β 和 IL-6 水平。

[关键词] 颈型颈椎病; 白细胞介素 1- β ; 白细胞介素-6; 兔; 中药热奄包; 外敷

[中图分类号] R244.9; R681.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2017)11-1258-04

DOI: 10.19367/j.cnki.1000-2707.2017.11.004

Herbal REYANBAO Intervention for Cervical Spondylosis in Rabbits

LUO Xianyi¹, HUANG Shaoyan¹, SHI Hongmei¹, WANG Guangyi²

(1. Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China;

2. Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the level of morphology of cervical muscle, serum interleukin 1- β (IL-1 β) and interleukin-6 (IL-6) in model rabbits by the herbal REYANBAO intervention for cervical spondylosis. **Methods:** 24 healthy male New Zealand rabbits were randomly divided into blank control group, model group and external application group; rabbits in blank control group were not mold and intervened; model group and external application group were used to create cervical spondylosis model by non-invasive method; with the success in modeling, the neck of rabbit was treated with herbal REYANBAO treatment of 3 courses. The rabbits in the external application group were killed after the intervention. Morphology of rabbit neck muscle tissue was observed by Elisa detecting the level of IL-1 β and IL-6 in serum of rabbits. **Results:** Compared with the blank control group, model group were arranged in disorder, neck muscle fiber swelling, necrosis and inflammatory cell infiltration as well as capillary deposits blocking. The levels of serum IL-1 β and IL-6 were significantly higher than those in blank control group ($P < 0.01$). Compared with the model group, neck muscle fiber of rabbit in external application group was neatly arranged with smooth capillary and uniform distribution. There was no obvious inflammatory reaction, and the levels of serum IL-1 β and IL-6 were lower than those of the model group ($P < 0.01$). **Conclusion:** Inflammatory changes with herbal REYANBAO can relieve neck injury of muscle fiber, improve local microcirculation, decrease IL-1 β and IL-6 levels of serum inflammatory factor.

[Key words] cervical spondylosis; interleukin 1- β ; interleukin-6; rabbit; herbal REYANBAO; external application

^{*} [基金项目] 国家中医药管理局“全国中医药名老专家传承工作建设项目”(2014~); 贵州省中医药管理局、民族医药科学技术研究课题(QZYY-2016-075)

^{**} 通信作者 E-mail: 573087568@qq.com

网络出版时间: 2017-11-15 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20171115.2215.005.html>

随着工作、生活节奏及方式的改变,电脑、手机和电视等的普及使得更多人长期保持低头伏案状态,由此颈椎病的发病率日益升高,且趋于年轻化。我国颈椎病的发病率为 3.8%~17.6%,且每年新增患者约 1 百万人,其中颈型颈椎病的发病率占颈椎病的 40%^[1-3]。颈型颈椎病是以颈部症状为主,伴有头枕或肩背部不适,X 线显示颈椎生理曲度改变等退行性变化的症候群,是各型颈椎病的发病早期。颈椎周围肌肉的作用及部分炎性细胞的产生与颈型颈椎病的关系密切,非手术治疗是颈型颈椎病的首选和基本疗法^[4]。中药热奄包属中医外治法,对于颈型颈椎病有较好的疗效,本实验通过制作颈型颈椎病家兔模型,采用中药热奄包外敷治疗,探讨中药热奄包外敷治疗颈型颈椎病的机理。

1 材料与方法

1.1 实验材料

(6±0.5)月龄的健康清洁级雄性新西兰家兔 24 只,每只体重(2.5±0.5)kg,均购自贵州医科大学动物实验中心,对动物的处置符合 2006 年科技部发布的《关于善待实验动物的指导性意见》规定。实验方药通痹方由贵州医科大学附属医院针灸科提供。

1.2 主要器材和试剂

颈椎病兔造模固定器(JNT-MTX)、吹风机(1 800 W、220 V、50/60 Hz)、微波炉(MJ-2358)、治疗巾、半自动轮转切片机(Leica RM 2245)、光学显微镜(DW2500)、台式冷冻离心机(Allegra X-15R)、多功能酶标仪(Synergy H4)、微量移液器(Eppendorf 艾本德)以及电热恒温箱(HPX-9052MBE)、ELISA 检测试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 造模方法 参照张欣等^[5]无创造模方法复制兔颈型颈椎病模型:剪去家兔颈部毛发,后将家兔置于改良兔固定盒中,敷以自制保湿冰袋,局部湿度 100%,局部平均温度(2±0.5)℃,调节冰袋松紧并将其下端扣住固定盒两侧的锁扣,使兔的颈部成低头屈曲位 45°,将吹风机出风口对准兔颈部,风力 5 级。每次造模 3 h,每天 2 次,造模期间注意放松兔双后肢,防止长时间压迫,连续造模

28 d。造模结束后,常规饲养 7 d。若家兔颈部肌肉张力增大,颈部可触及条索状物质,即造模成功。

1.3.2 动物分组及干预 共分空白对照组、模型组和外敷组 3 组,单笼适应性喂养 1 周,恒温、恒湿,标准饲料,自由饮水。空白对照组 8 只,在造模期间同时置于固定盒中,允许其颈部自由活动,不做干预,其余时间常规饲养于兔笼中。另外的 16 只家兔在造模成功后按随机数字表法均分为模型组和外敷组。模型组家兔造模成功后允许颈部自由活动,不作干预;外敷组在成功造模后,予以中药热奄包外敷干预治疗。参照《中药新药治疗颈椎病的临床研究指导原则》,中药热奄包外敷干预方案如下:(1)通痹方方药,葛根 20 g、桂枝 12 g、伸筋草 10 g、牛膝 10 g、路路通 10 g、细辛 10 g、防风 10 g、川芎 15 g、红花 10 g、没药 20 g、赤芍 15 g、独活 15 g、威灵仙 15 g、秦艽 15 g、甘草 3 g,研细备用;(2)用 12 cm×5 cm 棉布袋将方药药末装袋,并用潮湿的毛巾包裹放入微波炉中高火加热 3 min,将装有方药末的热奄包敷于外敷组家兔的颈部,每天 1 次,每次 20~25 min,5 次为一疗程,疗程间休息 2 d,共 3 个疗程。3 组家兔的喂养时间均为 8 周,在外敷组干预结束后第 3 天同时处死 3 组家兔,取材观察下列指标。

1.4 取材、观察及检测

1.4.1 血清白细胞介素-1β(IL-1β)和血清白细胞介素-6(IL-6)检测 全部干预结束后第 3 天清晨各组家兔空腹耳缘静脉取血 5 mL 后静置 30 min,于 4℃ 3 000 r/min 离心 5 min,提取上清液 1.0 mL,于-20℃保存。检测前 20 min 从冰箱取出样品静置,室温下融化,应用 Elisa 法测定血清 IL-1β 和 IL-6 的含量。

1.4.2 颈部肌肉组织形态学观察 耳缘静脉取血结束后,予耳缘静脉空气栓塞法处死,立即逐层切开颈部肌肉组织,肉眼观察并记录颈部肌肉组织情况;然后在颈 3~6 棘突旁约 2 cm 处取约 1 cm³ 肌肉组织置于中性福尔马林中固定 48 h,4℃冰箱过夜,石蜡包埋、切片、常规 HE 染色,在光学显微镜下观察颈部组织的形态学变化。

1.5 统计学处理

采用 SPSS 17.0 软件进行分析。计量资料采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间均数比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA),组间多重比较使用 SNK 法。以 $P < 0.01$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 家兔颈型颈椎病模型

16 只家兔复制兔颈型颈椎病模型,14 只家兔出现颈部肌肉张力增大,颈部可触及条索状物质,模型复制成功率为 87.5%。

2.2 颈肌组织形态学观察

空白对照组肌细胞呈纤维状排列、规则有序,着色均匀,无变性、坏死,肌细胞间的毛细血管通

畅;肌组织明带、暗带规律性交替相间,无炎性细胞浸润,无肌纤维细胞增生等病变。模型组:肌纤维粗细严重不均,间隙增宽,明显排列不整齐,肌细胞核固缩,明、暗带不清晰,肌细胞间毛细血管淤积阻塞且分布不均,肌细胞间质存在较多炎性细胞浸润,且可见纤维增生等。外敷组:肌纤维粗细均匀排列规则整齐,肌细胞核未见异常,明、暗带明显、排列规则有序,肌细胞间质间无明显炎性细胞浸润,无明显肌纤维增生、肿胀等改变,细胞间毛细血管分布均匀通畅。见图 1。

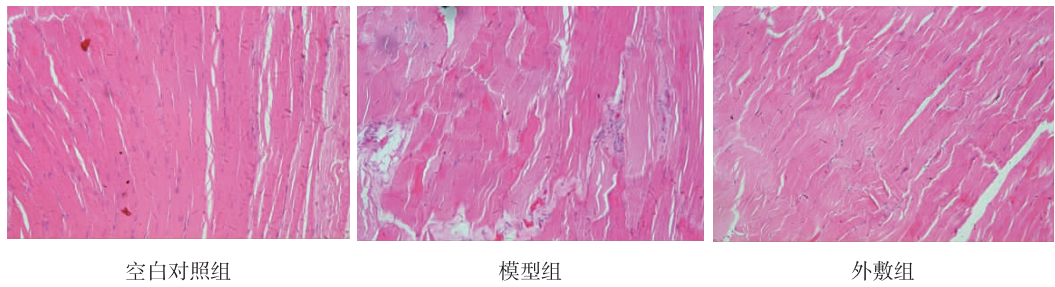


图 1 各组家兔颈肌组织学观察(HE, ×200)
Fig. 1 Histological observation of cervical muscles of rabbits

2.3 血清 IL-1β、IL-6 水平

模型组家兔血清 IL-1β、IL-6 的含量明显高于空白对照组,外敷组家兔血清 IL-1β、IL-6 的含量明显低于模型组,差异有统计学意义($P < 0.01$),见表 1。

表 1 各组家兔血清 IL-1β 和 IL-6 水平($\bar{x} \pm s$)
Tab. 1 The levels of serum IL-1β and IL-6 in each group rabbits

| 组别 | n | 血清 | |
|-------|---|---------------------------------|--------------------------------|
| | | IL-1β(ng/L) | IL-6(ng/L) |
| 空白对照组 | 8 | 5.107 0 ± 0.170 | 4.068 8 ± 0.117 |
| 模型组 | 7 | 15.748 8 ± 0.254 ⁽¹⁾ | 9.197 4 ± 0.211 ⁽¹⁾ |
| 外敷组 | 7 | 9.196 8 ± 0.541 ⁽²⁾ | 4.936 0 ± 0.465 ⁽²⁾ |

⁽¹⁾与空白对照组比较, $P < 0.01$; ⁽²⁾与模型组比较, $P < 0.01$

3 讨论

在中医学中虽然没有“颈型颈椎病”这个病名,但对该病临床表现的描述却很多,散见于“痹症”、“颈筋急”和“项强”等。《素问·痹论》中提到“风寒湿三气杂至,合而为痹也”和“所谓痹者,各以其时,重感于风寒,湿之气也”,认为颈型颈椎病是因正气虚损、感受风寒湿邪侵袭、劳累过度等

导致颈项部经络气血不通所致。有研究显示,热奄包能通过药物和温热效应,缓解疼痛^[7]。故本课题采用疗效确切的通痹方制成中药热奄包,该方中葛根为治疗颈椎病的要药,具有解肌升阳之功,善于疏解经气的壅滞,又能引药上行,直达病所。现代药理学研究表明,葛根具有改善血液流变学、改善血流动力学、改善微循环等作用^[6];桂枝温经通络,有行气止痛之效;伸筋草、羌活、细辛、防风、路路通、威灵仙、秦艽有散寒祛湿、祛风通络止痛之效;牛膝滋肝肾,强筋骨;川芎为“血中之气药”,具通达气血功效;红花、赤芍、没药活血行气,祛瘀活络止痛;甘草调和诸药,诸药合用共奏有温经散寒、祛风除湿、舒筋活络,通痹止痛之功^[6]。在本实验中,热奄包经微波炉中高火加热后外敷颈部,既可使热力与药物有效成分经皮肤渗入颈部软组织直达患处发挥作用,又可使其良性调节经络腧穴。

本研究采用的家兔颈型颈椎病模型的造模方法简便、行之有效对需要观察和检测的组织无直接干扰,有利于后续通痹方制成的热奄包外敷实施,故可以依据此法对家兔进行物理造模复制。复制成功率为 87.5%。在本研究中,观察 3 组家兔颈肌组织形态学变化。空白对照组家兔颈部肌纤维间无炎性病变,结构完整,毛细血管通畅、均匀;模

型组颈肌肌纤维扭曲肿胀、变性坏死和炎细胞浸润,肌细胞细胞核固缩,间隙增宽,明、暗带及H带不清晰,毛细血管循环障碍;外敷组肌纤维无明显炎性细胞浸润、增生及肿胀等改变,细胞间毛细血管分布均匀通畅。可见,中药热奄包外敷能显著抑制颈肌炎性反应及毛细血管病变的作用。IL-1 β 由活化单核巨噬细胞产生,在炎症的发生、发展中起关键作用,同时是一种促进关节软骨破坏的因子^[8-9]。IL-6是一种来源广泛的多功能细胞因子^[10]。有研究发现,IL-1 β 、IL-6在颈型颈椎病炎症反应及退行性改变中起着一定作用^[11-12]。软组织病变会导致颈椎动静力失衡,已有研究表明,在动静力失衡大鼠中IL-1 β 通过诱导IL-1 α 、IL-6及TNF等合成释放,进而介导炎症反应,且IL-6可以通过破坏大鼠的颈部动静力平衡系统对椎间盘造成破坏,从而导致颈椎病^[13-14]。结合本实验结果发现,模型组兔血清IL-1 β 、IL-6水平明显高于空白对照组,外敷组兔血清IL-1 β 、IL-6水平低于模型组,推测其可能机制是该中药热奄包下调了IL-1 β 、IL-6水平的作用,或抑制了其它炎性因子,降低了其在颈部软组织中的致炎作用;从而解除了肌纤维炎性病变,进而表现为颈部微循环改善,肌纤维炎性反应减轻或消除,颈周组织痉挛缓解;即达到减轻颈型颈椎病症状的作用。

4 参考文献

- [1] 张红星,黄国付,唐雷. 颈椎病针刀治疗研究概况[J]. 中国针灸, 2010(S1):140-142.
- [2] 李呈爱. 中药外敷联合推拿治疗颈椎病69例[J]. 河南中医, 2015(11):2685-2687.
- [3] 杨世斌. 颈肌与颈型颈椎病的关系[J]. 颈腰痛杂志, 2008(1):77-79.
- [4] 李增春,陈德玉,吴德,等. 第三届全国颈椎病专题座谈会纪要[J]. 中华外科杂志, 2008(23):1796-1799.
- [5] 张欣,李殿宁,李开平,等. 无创兔颈型颈椎病动物模型的建立[J]. 中华中医药学刊, 2015(4):913-916.
- [6] 马彦旭. 葛根在颈椎病中的应用[J]. 北京中医药, 2011(6):478-480.
- [7] 程海平,陈斌. 热奄包在颈腰腿痛中的运用体会[J]. 黑龙江中医药, 2010(1):24-25.
- [8] 张成亮,刘加元,刘守正. 外周血细胞因子水平与颈椎病病情严重程度相关研究[J]. 检验医学与临床, 2014(6):776-777.
- [9] Tang X, Zhou Z, Shen B, et al. Serum levels of TNF- α , IL-1 β , COMP and CTX-II in patients with Kashin-Beck disease in Sichuan, China[J]. Rheumatol Int, 2012(11):3503-3509.
- [10] 杜伟,申勇,李宝俊,等. 细胞因子IL-1 α 、IL-6、TNF- α 、MMP3与颈椎间盘退变机制的相关性研究[J]. 中国矫形外科杂志细胞因子, 2012(3):259-262.
- [11] 张圆芳,何坚,柳维林,等. 寒湿型兔颈型颈椎病模型的建立与评估[J]. 福建中医药, 2017(10):26-27.
- [12] 朱春城,彭力平,谢增军. 中药外敷治疗急性软组织损伤的动物实验研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011(14):298-299.
- [13] 唐森,陈惠德,张文芽,等. TNF- α 、IL-1 β 在退变颈椎间盘的表达和意义[J]. 安徽医药, 2011(2):194-196.
- [14] 张文芽,陈惠德,唐森. 核因子 κ B白介素-6在动静力失衡性大鼠退变颈椎间盘中的表达[J]. 中国矫形外科杂志, 2012(3):259-262.

(2017-08-11 收稿,2017-10-31 修回)

中文编辑:文箫颖;英文编辑:乐萍