

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.24.016

[http://www.crter.org]

王晶, 董芳芳, 李晓锋, 许金海, 舒冰, 施杞, 王拥军, 周重建. 低氧诱导因子1 $\alpha$ 基因敲除小鼠椎间盘退变与益气化痰方的干预[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(24): 4481-4487.

## 低氧诱导因子1 $\alpha$ 基因敲除小鼠椎间盘退变与益气化痰方的干预\*\*

王晶<sup>1,2</sup>, 董芳芳<sup>1,2</sup>, 李晓锋<sup>1,2</sup>, 许金海<sup>2</sup>, 舒冰<sup>1,2</sup>, 施杞<sup>1,2</sup>, 王拥军<sup>1,2</sup>, 周重建<sup>1,2</sup>

1 上海中医药大学脊柱病研究所, 上海市 200032  
2 上海中医药大学附属龙华医院, 上海市 200032

### 文章亮点:

根据上海中医药大学施杞终身教授认为软骨组织缺血缺氧导致的退变主要病机在于“气虚血瘀”原理, 根据“以气为主, 以血为先”的中医辨证论治理论, 以“益气化痰”法则治疗软骨退变性疾病, 进行临床效果观察, 同时观察低氧诱导因子1 $\alpha$ 条件性基因敲除小鼠椎间盘软骨退变情况。实验结果说明了低氧诱导因子1 $\alpha$ 基因敲除小鼠出现了椎间盘软骨退变, 并且这种退变随着小鼠增龄而加重; 益气化痰方可以减轻低氧诱导因子1 $\alpha$ 基因敲除小鼠的椎间盘软骨退变。

### 关键词:

组织构建; 组织构建与生物活性因子; 益气化痰方; 低氧诱导因子1 $\alpha$ ; 基因敲除小鼠; 椎间盘; 软骨; 退变; 骨化; 骨缺损; II型胶原; 软骨细胞; 基质金属蛋白酶; 国家自然科学基金

### 摘要

**背景:** 低氧诱导因子1 $\alpha$ 与椎间盘软骨的正常生理及病理情况存在密切的关系, 能够维持软骨组织在低氧环境中的正常活性, 低氧诱导因子1 $\alpha$ 基因敲除后, 软骨组织无法维持其正常低氧状态, 导致软骨组织营养供应障碍, 使软骨细胞处于异常缺血缺氧状态, 长此以往, 软骨组织会发生退变。

**目的:** 观察低氧诱导因子1 $\alpha$ 条件性基因敲除小鼠椎间盘软骨退变情况, 以及中药复方益气化痰方对减缓低氧诱导因子1 $\alpha$ 基因敲除小鼠椎间盘软骨退变的作用。

**方法:** ①将杂交繁殖获得同窝的低氧诱导因子1 $\alpha$ <sup>+/+</sup>对照小鼠和低氧诱导因子1 $\alpha$ 基因敲除小鼠, 分别分为为2.5月龄组和4.5月龄组( $n=6$ )。分别在2.5、4.5月龄处死相应小鼠, 取L<sub>4-6</sub>腰椎进行藏红固绿、苏木精-伊红染色及免疫组化相关指标染色及分析。②取12只0.5月龄低氧诱导因子1 $\alpha$ 基因敲除小鼠随机均分为生理盐水组和益气化痰方组。灌胃给药2个月后, 取两组小鼠的L<sub>4-6</sub>椎间盘进行藏红固绿、苏木精-伊红染色及免疫组化相关指标染色及分析。

**结果与结论:** ①低氧诱导因子1 $\alpha$ <sup>-/-</sup>小鼠: 2.5月龄组椎间盘软骨组织出现破损和骨化, 细胞分布不均匀, 软骨细胞减少, 椎间盘软骨中II型胶原和Sox9表达降低, X型胶原、基质金属蛋白酶13表达增加; 4.5月龄组椎间盘软骨损伤更加严重, II型胶原蛋白与Sox9表达进一步降低, X型胶原、基质金属蛋白酶13表达进一步上升。②与生理盐水组比较, 益气化痰方干预后苏木精-伊红染色和藏红固绿染色显示软骨骨化和缺损减轻, 软骨细胞数目较多, 分布较均匀。与生理盐水组比较, 益气化痰方组椎间盘软骨中II型胶原和Sox9的表达升高, X型胶原、基质金属蛋白酶13表达减少。说明低氧诱导因子1 $\alpha$ 基因敲除小鼠出现了椎间盘软骨退变, 并且这种退变随着小鼠增龄而加重; 益气化痰方可以减轻低氧诱导因子1 $\alpha$ 基因敲除小鼠的椎间盘软骨退变。

## Intervertebral disc degeneration in hypoxia-inducible factor 1 alpha-knockout mice and treatment of Yiqihuayu Prescription

Wang Jing<sup>1,2</sup>, Dong Fang-fang<sup>1,2</sup>, Li Xiao-feng<sup>1,2</sup>, Xu Jin-hai<sup>2</sup>, Shu Bing<sup>1,2</sup>, Shi Qi<sup>1,2</sup>, Wang Yong-jun<sup>1,2</sup>, Zhou Chong-jian<sup>1,2</sup>

1 Institute of Spine Disease, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China  
2 Longhua Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China

王晶★, 女, 1987年生, 安徽省人, 汉族, 2010年上海中医药大学在读硕士, 主要从事脊柱退变疾病研究。  
188628850@qq.com

通讯作者: 周重建, 博士, 研究员, 上海中医药大学脊柱病研究所, 上海市 200032  
zhouchongjian@hotmail.com

中图分类号: R318  
文献标识码: B  
文章编号: 2095-4344 (2013)24-04481-07

收稿日期: 2012-10-13  
修回日期: 2012-12-06  
(20120813003/D·A)

Wang Jing★, Studying for master's degree, Institute of Spine Disease, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China; Longhua Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China 188628850@qq.com

Corresponding author: Zhou Chong-jian, M.D., Investigator, Institute of Spine Disease, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China; Longhua Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China zhouchongjian@hotmail.com

Supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 30973760\*; the Foundation for Innovation Team Plan in Shanghai High Institutes, Shanghai Municipal Education Commission, No. [2009]6\*

Received: 2012-10-13

Accepted: 2012-12-06

## Abstract

**BACKGROUND:** Hypoxia-inducible factor 1  $\alpha$  is highly correlated with normal physiology and pathology of intervertebral disc cartilage because it can maintain normal activities of cartilage in hypoxia. After knockout of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ , cartilage cannot maintain the hypoxia state, resulting in nutritional disturbance, and hypoxia/ischemia in chondrocytes. Consequently, cartilage degeneration occurs.

**OBJECTIVE:** To observe the degeneration of intervertebral disc cartilage end-plate in hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  gene knockout mice and investigate the effects of Chinese herbal compound *Yiqihuayu* Prescription on intervertebral disc cartilage end-plate degeneration.

**METHODS:** We collected 2.5- ( $n=6$ ) and 4.5-month-old ( $n=6$ ) hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  gene knockout mice and wild type hypoxia-inducible factor 1 $\alpha^{+/+}$  control mice were obtained by interbreeding. The mice were sacrificed at 2.5 and 4.5 months old. Lumbar vertebra at L<sub>4-6</sub> levels was harvested for Safranin O/fast green, hematoxylin-eosin, immunohistochemical staining. Another 12 hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  gene knockout mice of 0.5 month old were randomly assigned to normal saline and *Yiqihuayu* Prescription groups. Following intragastrical administration for 2 months, lumbar vertebra at L<sub>4-6</sub> levels was harvested for Safranin O/fast green, hematoxylin-eosin, immunohistochemical staining and analysis.

**RESULTS AND CONCLUSION:** For hypoxia-inducible factor 1 $\alpha^{-/-}$  mice, mice at 2.5 months old developed aging related cartilage loss and bony tissue appearance, in addition to cartilage defects, uneven distribution of cells, and chondrocyte reduction. In addition, type II collagen and Sox-9 expression in intervertebral disc cartilage decreased, while type X collagen and matrix metalloproteinase 13 expression increased. At 4.5 months old, the cartilage injury was worsened, type II collagen and Sox-9 expression further reduced, and type X collagen and matrix metalloproteinase 13 expression further increased. Compared with normal saline group, *Yiqihuayu* Prescription reduced ossification and defect of endplate cartilage, the number of chondrocytes increased, and the distribution was more uniform as shown by Safranin O/fast green and hematoxylin-eosin staining. Moreover, *Yiqihuayu* Prescription increased type II collagen and Sox-9 expression, but decreased type X collagen and matrix metalloproteinase 13 protein expression. The results indicate that intervertebral disc cartilage degeneration occurred in hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  gene knockout mice, which was progressed with aging of mice. *Yiqihuayu* Prescription can attenuate the degeneration of intervertebral disc cartilage in hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  gene knockout mice.

**Key Words:** tissue construction; tissue construction and bioactive factors; *Yiqihuayu* Prescription; hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ ; gene knockout mice; intervertebral disc; cartilage; degeneration; ossification; bone defect; type II collagen; chondrocyte; matrix metalloproteinase; National Natural Science Foundation of China

Wang J, Dong FF, Li XF, Xu JH, Shu B, Shi Q, Wang YJ, Zhou CJ. Intervertebral disc degeneration in hypoxia-inducible factor 1 alpha-knockout mice and treatment of *Yiqihuayu* Prescription. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2013;17(24): 4481-4487.

## 0 引言

椎间盘退变是颈椎病、腰椎间盘突出症发生的病理基础,而椎间盘的退变始于软骨终板的退变<sup>[1]</sup>。低氧诱导因子1基因与椎间盘软骨的正常生理及病理情况存在密切的关系,能够维持软骨组织在低氧环境中的正常活性<sup>[2-4]</sup>。低氧诱导因子1 $\alpha$ 基因敲除后,软骨组织无法维持其正常低氧状态,导致软骨组织营养供应障碍,使软骨细胞处于异常缺血缺氧状态,长此以往,软骨组织会发生退变。

II型胶原是软骨特异性基因,也是透明软骨的主要成分之一,是维持软骨的主要细胞外基质,由正常软骨细胞分泌,能维持软骨细胞的生理功能;因此,当发生脊柱退行性改变造成软骨组织的退变时,II型胶原的表达量减少。Sox-9基因是调控软骨分化的一个转录因子,可以调控软骨细胞中Col2a1的表达,从而对软骨的发育和成熟都具有重要的生物学作用<sup>[5]</sup>。骨性关节炎时,Sox-9基因的表达减少,并且它的表达量随着软骨组织损伤程度的加重而逐渐减少。基质金属蛋白酶家族成员是骨性关节炎关键性的破坏性因素,可导致软骨基质中蛋白聚糖的降解和胶原网络的破坏,从而引起软骨破坏<sup>[6]</sup>,软骨组织发生破坏时,它的表达量升高,并且基质金属蛋白酶13与软骨损伤的严重程度呈正相关。X型胶原也是软骨损伤的一

个特异性的标志物。与正常成人关节软骨相比X型胶原可以在大部分的椎间盘软骨中检测到,并且多分布在软骨细胞团周围,也见于骨赘,X型胶原表达提示椎间盘退变某阶段或某些部位软骨细胞的肥大化,从而失去合成正常软骨基质,因此,发生脊柱退变性疾病时,X型胶原的表达量升高,并随着疾病日益严重而逐渐升高。实验旨在观察低氧诱导因子1 $\alpha$ 基因敲除小鼠椎间盘的改变情况,并分析中药复方益气化痰方对低氧诱导因子1 $\alpha$ 基因敲除小鼠椎间盘软骨的影响。

## 1 材料和方法

**设计:** 动物实验观察。

**时间及地点:** 于2011年9月至2012年7月上海市中医药研究院脊柱病研究所完成。

**材料:**

**实验动物:** 8周龄低氧诱导因子1 $\alpha^{fx/fx}$ 雌性小鼠,由上海瑞金医院邓廉夫教授赠予。8周龄Col2-Cre<sup>ERT2</sup>雄性小鼠2只,由美国罗彻斯特大学陈棣教授赠与。将Col2-Cre<sup>ERT2</sup>小鼠与低氧诱导因子1 $\alpha^{fx/fx}$ 小鼠交配,获得Col2-Cre<sup>ERT2</sup>;低氧诱导因子1 $\alpha^{fx/-}$ 小鼠,并再次与低氧诱导因子1 $\alpha^{fx/fx}$ 小鼠交配,获得Col2-Cre<sup>ERT2</sup>;低氧诱导因子1 $\alpha^{fx/fx}$ 小鼠。将2周龄低氧诱导因子1 $\alpha^{fx/fx}$ 小鼠和同窝出生Col2 $\alpha$ -Cre<sup>ERT2</sup>;低氧诱导因子1 $\alpha^{fx/fx}$ 小鼠腹腔注射10 g/L Tamoxifen(购于sigma公司),100 mg/kg,1次/d,连续注射5 d,即获得低氧诱导因子1 $\alpha$ 基因敲除小鼠及同窝低氧诱导因子1 $\alpha^{+/+}$ 对照小鼠,分别饲养至2.5和4.5月龄时,每组各处死6只小鼠,共24只小鼠,取L<sub>4-6</sub>椎体进行检测

**实验试剂与药物:** 免疫组化试剂盒购于美国invitrogen公司;琼脂糖购于美国Promega公司基因组DNA提取试剂盒、溴乙锭和红水购于美国Sigma公司;多克隆兔抗II型胶原抗体、抗X型胶原抗体、抗Sox9抗体、抗低氧诱导因子1 $\alpha$ 抗体和多克隆鼠抗基质金属蛋白酶13抗体购于美国abcam公司。

益气化痰方由黄芪、人工麝香、川芎、青风藤、防己、人工牛黄等药物组成,由上海中医药大学提供,黄芪、川芎、青风藤、防己制备浸膏,真空干燥,粉碎成细粉,与人工麝香、人工牛黄细粉混匀,过筛,压成1 000片,每片含生药0.63 g。由上海现代中医药技术发展有限公司提供。

**实验方法:**

**药物干预:** 取12只0.5月龄低氧诱导因子1 $\alpha$ 基因敲除

小鼠,随机均分为生理盐水组和益气化痰方组,从2.5月龄时,益气化痰方组开始灌胃给药,1次/d。按照人体质量为60 kg,7 500 mg/d,小鼠体质量20 g计算,小鼠益气化痰方用量约为22.5 mg。1个月后,小鼠体质量约30 g,给药量改为33.75 mg/d。在给药后60 d时,取下各组L<sub>4-6</sub>节段腰椎进行检测。

**标本染色:**

**标本处理:** 标本在40 g/L多聚甲醛浸泡24 h后,清水冲洗2 h,15%EDTA脱钙8周,每3 d换脱钙液1次,标本经过脱水后石蜡包埋,6  $\mu$ m冠状位连续切片,进行藏红固绿染色、苏木精-伊红染色。

**苏木精-伊红染色和藏红固绿染色:** 常规脱蜡至水,苏木精染2 min,分化返蓝后,分别伊红染液染5 min或者固绿/藏红染液染5 min,冲洗后脱水透明,中性树胶封固。普通光镜下观察。

**免疫组织化学染色:** 将切片常规脱蜡后分别在体积分数3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/甲醇溶液中孵育15 min去除内源性过氧化物酶,蛋白酶K消化10 min,体积分数5%BSA封闭,兔多克隆抗体X、II型胶原、基质金属蛋白酶13、Sox9(1:100稀释)一抗,4  $^{\circ}$ C过夜,生物素标记的山羊抗兔IgG二抗,37  $^{\circ}$ C孵育15 min,抗生蛋白链菌素-HRP 37  $^{\circ}$ C孵育10 min,DAB显色剂显色5-10 min,苏木精复染,常规脱水透明,中性树胶封固。阴性对照用PBS代替一抗。每个样本取3个视野范围统计进行分析统计。

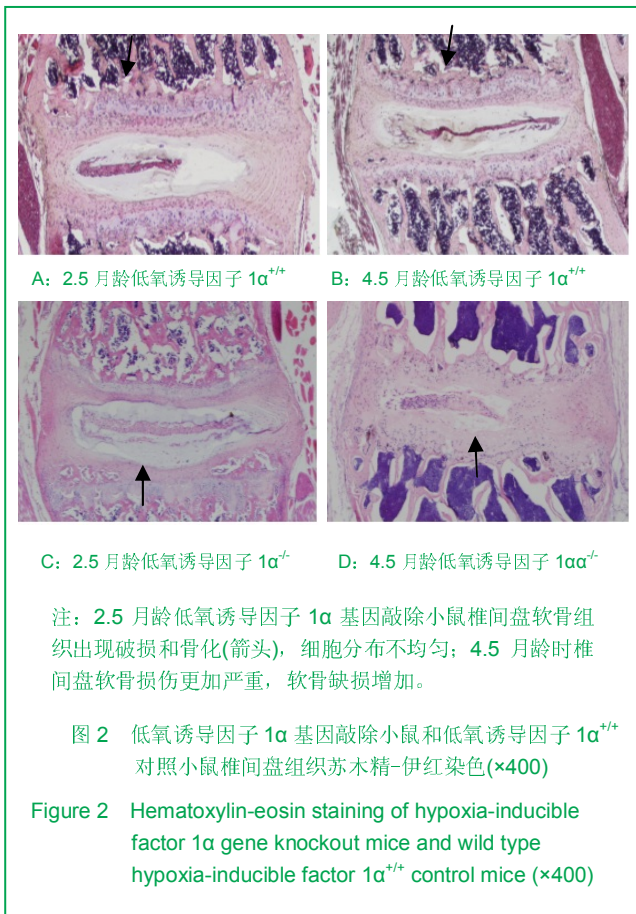
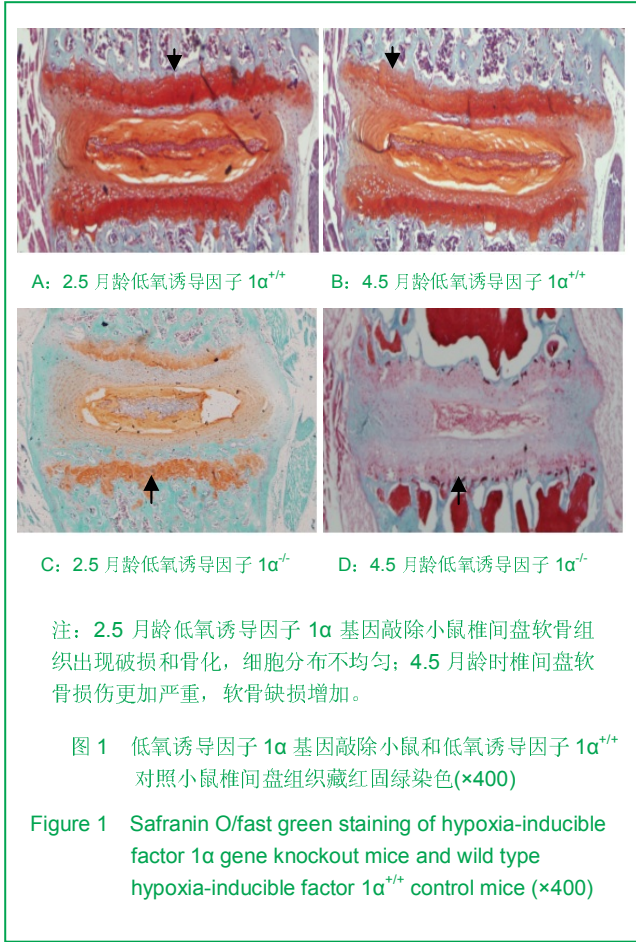
**主要观察指标:** 通过藏红固绿、苏木精-伊红及免疫组化相关指标(II型胶原、X型胶原、血管内皮生长因子、基质金属蛋白酶13和Sox-9)染色及分析,观察低氧诱导因子1 $\alpha$ 基因敲除小鼠椎间盘表型,以及益气化痰方对低氧诱导因子1 $\alpha$ 基因敲除小鼠椎间盘软骨的影响。

**统计学分析:** 采用SPSS 17.0统计学软件包进行统计分析。计量资料满足方差齐性采用( $\bar{x}\pm s$ )。均数比较先进行正态性检验和方差齐性检验,两样本均数比较用独立样本t检验、多样本均数比较用单因素方差分析。所有的统计检验均采用双侧检验, $P\leq 0.05$ 即将被认为统计学检验具有显著性差异。

## 2 结果

### 2.1 低氧诱导因子1 $\alpha$ 基因敲除小鼠椎间盘表型观察

**藏红固绿和苏木精-伊红染色结果:** 2.5月龄低氧诱导因子1 $\alpha$ 基因敲除小鼠椎间盘软骨组织出现破损和骨化,细胞分布不均匀,软骨细胞减少。4.5月龄小鼠更加严重,软骨缺损增加,细胞进一步减少,见图1, 2。



免疫组织化学染色结果, 见图3-6, 表1。

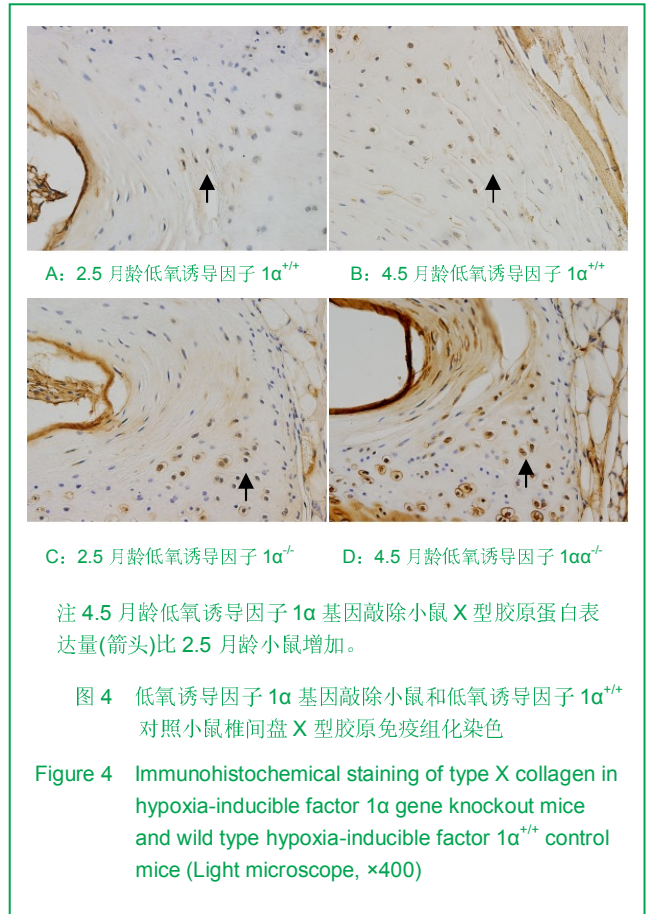
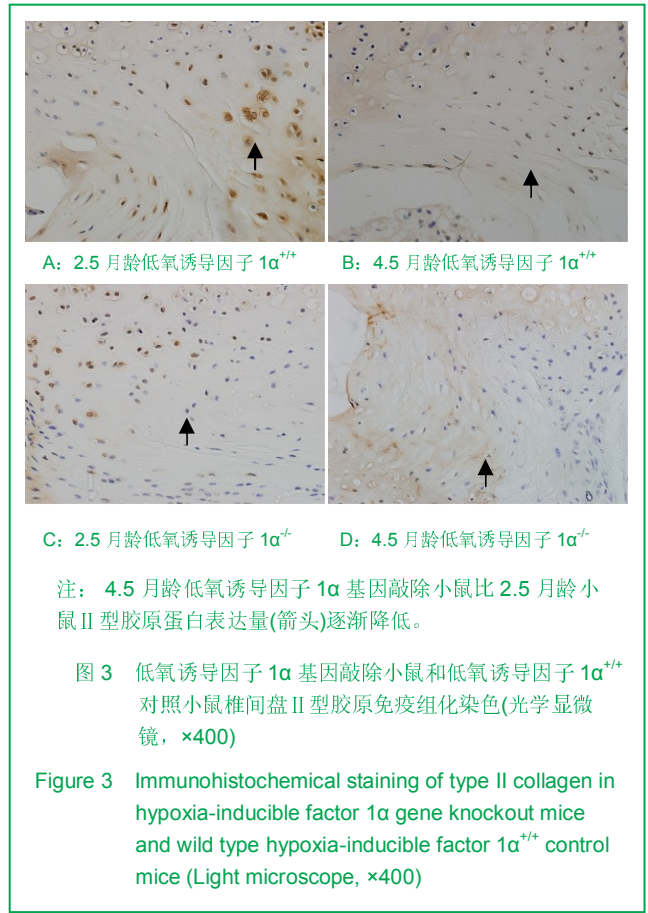


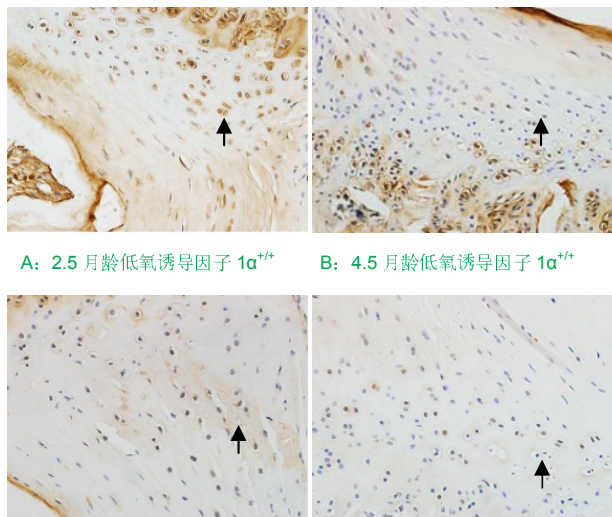
表1 低氧诱导因子1 $\alpha$ 基因敲除小鼠和低氧诱导因子1 $\alpha^{+/+}$ 对照小鼠2.5和4.5月龄时II型胶原、X型胶原、基质金属蛋白酶13和Sox9在椎间盘软骨中所占面积比较

Table 1 Comparison of areas of type II collagen, type X collagen, matrix metalloproteinase 13 and Sox-9 in intervertebral disc cartilage of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  gene knockout mice and wild type hypoxia-inducible factor 1 $\alpha^{+/+}$  control mice ( $\bar{x}\pm s, n=5, \mu\text{m}^2$ )

项目	2.5月龄		4.5月龄	
	低氧诱导因子1 $\alpha^{+/+}$	低氧诱导因子1 $\alpha$ 基因敲除小鼠	低氧诱导因子1 $\alpha^{+/+}$	低氧诱导因子1 $\alpha$ 基因敲除小鼠
II型胶原	0.81 $\pm$ 0.03	0.31 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.79 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	0.20 $\pm$ 0.02 <sup>c</sup>
X型胶原	0.08 $\pm$ 0.02	0.45 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.20 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	0.52 $\pm$ 0.03 <sup>c</sup>
基质金属蛋白酶13	0.04 $\pm$ 0.01	0.25 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.04 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	0.34 $\pm$ 0.02 <sup>c</sup>
Sox9	0.44 $\pm$ 0.04	0.12 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.41 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	0.08 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>

与低氧诱导因子1 $\alpha^{+/+}$ 2.5月龄比较, <sup>a</sup> $P < 0.01$ ; 与低氧诱导因子1 $\alpha^{+/+}$ 4.5月龄比较, <sup>b</sup> $P < 0.01$ ; 与低氧诱导因子1 $\alpha$ 基因敲除小鼠2.5月龄比较, <sup>c</sup> $P < 0.01$ 。

注: 低氧诱导因子1 $\alpha$ 基因敲除2.5月龄和4.5月龄小鼠椎间盘中II型胶原和SOX9蛋白表达面积减少, X型胶原和基质金属蛋白酶13表达增加; 低氧诱导因子1 $\alpha$ 基因敲除4.5月龄小鼠椎间盘中II型胶原和SOX9蛋白表达面积减少更多, X型胶原和基质金属蛋白酶13表达增加更多。

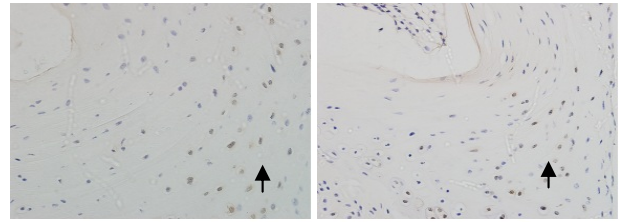


A: 2.5月龄低氧诱导因子1 $\alpha^{+/+}$  B: 4.5月龄低氧诱导因子1 $\alpha^{+/+}$   
C: 2.5月龄低氧诱导因子1 $\alpha^{-/-}$  D: 4.5月龄低氧诱导因子1 $\alpha^{-/-}$

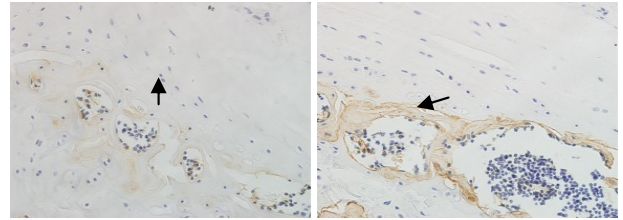
注: 2.5月龄小鼠椎间盘中Sox9表达减少, 4.5月龄低氧诱导因子1 $\alpha$ 基因敲除小鼠, Sox9蛋白表达量(箭头)逐渐降低。

图5 低氧诱导因子1 $\alpha$ 基因敲除小鼠和低氧诱导因子1 $\alpha^{+/+}$ 对照小鼠椎间盘Sox9免疫组化染色(光学显微镜,  $\times 400$ )

Figure 5 Immunohistochemical staining of Sox-9 in hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  gene knockout mice and wild type hypoxia-inducible factor 1 $\alpha^{+/+}$  control mice (light microscope,  $\times 400$ )



A: 2.5月龄低氧诱导因子1 $\alpha^{+/+}$  B: 4.5月龄低氧诱导因子1 $\alpha^{+/+}$



C: 2.5月龄低氧诱导因子1 $\alpha^{-/-}$  D: 4.5月龄低氧诱导因子1 $\alpha^{-/-}$

注: 2.5月龄小鼠椎间盘中基质金属蛋白酶13表达增加(箭头), 4.5月龄低氧诱导因子1 $\alpha$ 基因敲除小鼠, 基质金属蛋白酶13蛋白表达量逐渐增加。

图6 低氧诱导因子1 $\alpha$ 基因敲除小鼠和低氧诱导因子1 $\alpha^{+/+}$ 对照小鼠椎间盘基质金属蛋白酶13免疫组化染色(光学显微镜,  $\times 400$ )

Figure 6 Immunohistochemical staining of matrix metalloproteinase 13 in hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  gene knockout mice and wild type hypoxia-inducible factor 1 $\alpha^{+/+}$  control mice (light microscope,  $\times 400$ )

与同月龄对照小鼠相比2.5月龄和4.5月龄低氧诱导因子1 $\alpha$ 基因敲除小鼠椎间盘中II型胶原蛋白和Sox9表达减少, 并且随着增龄II型胶原和Sox9蛋白表达量逐渐降低; X型胶原和基质金属蛋白酶13表达增加, 且随着增龄表达量逐渐升高, 差异均有显著性意义( $P < 0.01$ )。

## 2.2 益气化痰方对低氧诱导因子1 $\alpha$ 基因敲除小鼠椎间盘软骨影响

**藏红固绿染色和苏木精-伊红染色结果:** 生理盐水组低氧诱导因子1 $\alpha$ 基因敲除小鼠软骨终板出现部分缺损和骨化, 相比之下, 益气化痰方组椎间盘缺损和骨化明显减轻, 见图7。

**免疫组织化学染色:** 益气化痰方组与生理盐水组比较, 小鼠椎间盘中II型胶原、X型胶原、基质金属蛋白酶13和Sox9含量差异有显著性意义( $P < 0.01$ ), 即同生理盐水组小鼠椎间盘相比, 益气化痰方组小鼠椎间盘II型胶原、Sox9表达明显升高, 益气化痰方组小鼠椎间盘X型胶原和基质金属蛋白酶13表达降低。见图8, 表2。

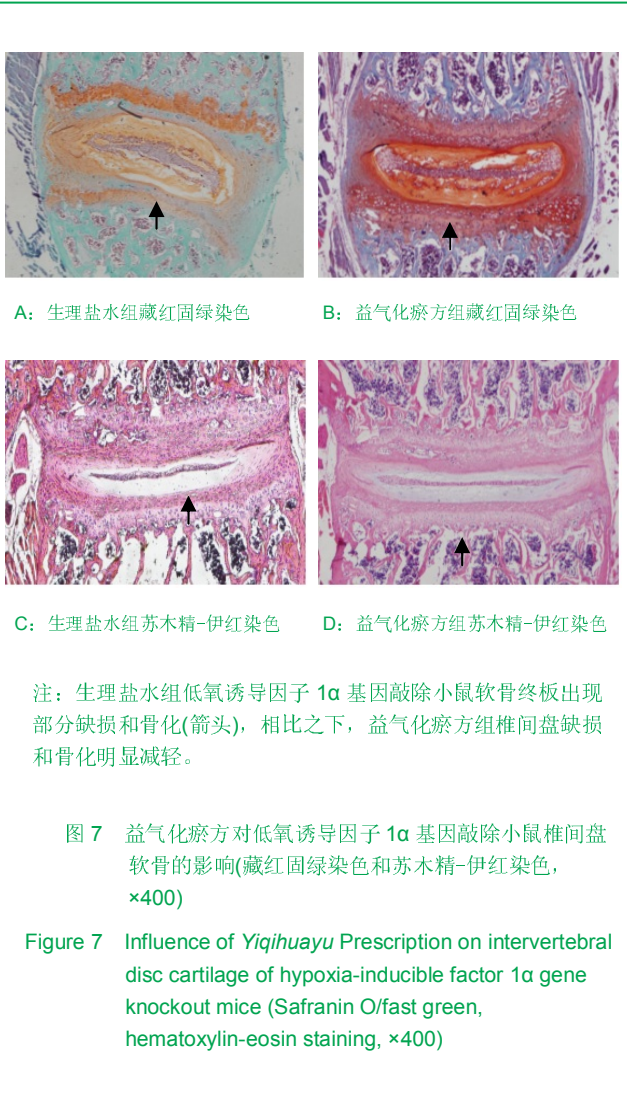


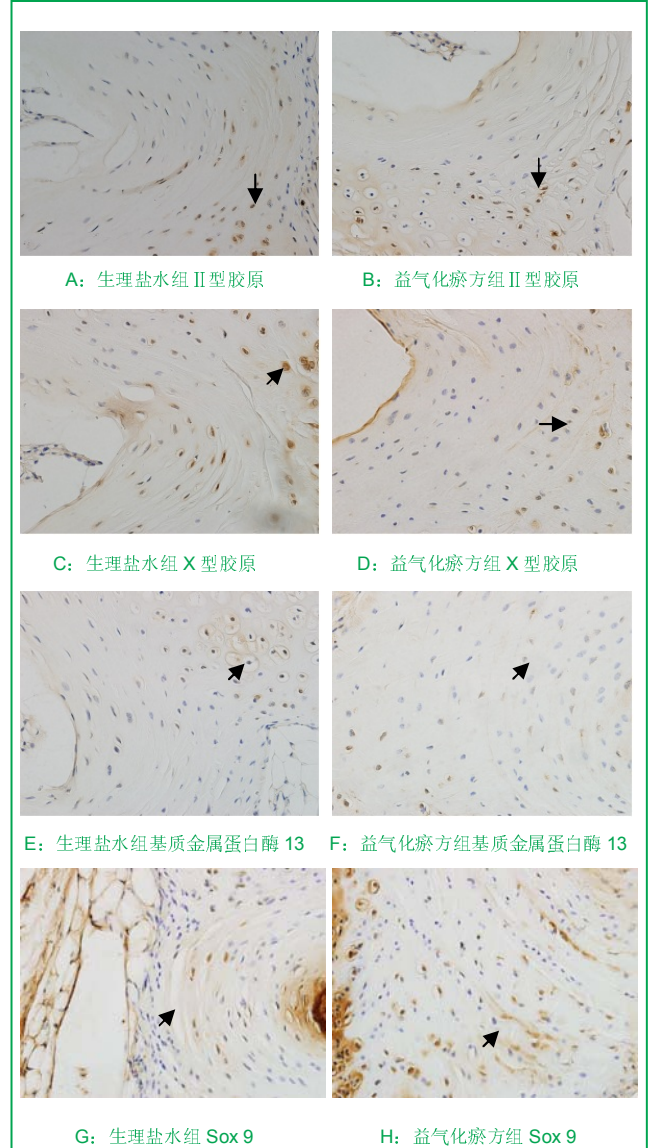
表 2 生理盐水组和益气化痰方组 II 型胶原、X 型胶原、基质金属蛋白酶 13 和 Sox9 在椎间盘软骨中所占面积比较

Table 2 Comparison of areas of type II collagen, type X collagen, matrix metalloproteinase 13 and SOX-9 in intervertebral disc cartilage of normal saline and Yiqihuayu Prescription groups ( $\bar{x}\pm s, n=6, \mu\text{m}^2$ )

指标	生理盐水组	益气化痰方组
II 型胶原	0.33 $\pm$ 0.02	0.45 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>
X 型胶原	0.45 $\pm$ 0.02	0.26 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>
基质金属蛋白酶 13	0.26 $\pm$ 0.02	0.14 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>
Sox9	0.16 $\pm$ 0.02	0.23 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>

与生理盐水组比较。<sup>a</sup> $P < 0.01$ 。

注: 与生理盐水组比较, 益气化痰方组小鼠椎间盘 II 型胶原、Sox9 表达明显升高, 益气化痰方组小鼠椎间盘 X 型胶原和基质金属蛋白酶 13 表达降低。



### 3 讨论

软骨组织对这种低氧环境的适应依赖于低氧诱导因子 1 $\alpha$ 。当细胞缺氧时, 低氧诱导因子 1 $\alpha$  迅速进入细胞核, 与低氧诱导因子 1 $\beta$  结合形成二聚体, 即低氧诱导因子 1, 启动缺氧相关基因的转录<sup>[7]</sup>, 这些基因包括血管内

皮生长因子、促红细胞生成素等,从而使细胞适应低氧状态得以存活。因此低氧诱导因子1 $\alpha$ 基因与椎间盘软骨的正常生理及病理情况存在密切的关系,低氧诱导因子1 $\alpha$ 基因敲除后,软骨组织无法维持其正常低氧状态,导致软骨组织营养供应障碍,使软骨细胞处于异常缺血缺氧状态,长此以往,软骨组织会发生退变<sup>[8]</sup>。低氧诱导因子1 $\alpha$ 基因敲除小鼠椎间盘表型的观察试验证实,在低氧诱导因子1 $\alpha$ 基因敲除小鼠的椎间盘没有低氧诱导因子1 $\alpha$ 的表达,2.5月龄时软骨终板部位出现软骨的缺失和新骨的形成,相应部位Col2a1和Sox9蛋白表达降低,X型胶原和基质金属蛋白酶13表达升高。这些病理改变显示低氧诱导因子1 $\alpha$ 基因的缺乏导致软骨组织不能维持其正常低氧环境,软骨细胞的代谢功能紊乱甚至软骨细胞的凋亡坏死,软骨细胞及细胞外基质中的各种炎症因子等的表达发生变化,Col2a1等软骨重要组成成分含量减少,X型胶原、基质金属蛋白酶13等因子含量表达增加,阻碍了软骨组织维持其正常代谢活动,最终导致椎间盘软骨的退变。

慢性脊柱退变属于中医“痹症”的范畴,其主要病机是气血痹阻不通,筋脉关节失于濡养所致。上海中医药大学施杞终身教授认为软骨组织缺血缺氧导致的退变主要病机在于“气虚血瘀”,根据“以气为主,以血为先”的中医辨证论治理论,以“益气化痰”法则治疗软骨退变性疾病,临床效果非常显著。益气化痰方是由黄芪,川芎,人工麝香,青风藤,防己,人工牛黄等组成。黄芪性甘,微温,有益气固表,健脾补中,升阳举陷之功效,为补中益气要药,可大补脾胃之元气,使气旺血行、瘀去络通而为君<sup>[9]</sup>;川芎为臣药,辛散温通,既能活血化痰,又能行气止痛,为“血中之气药”;麝香辛温,走窜之力强,可以活血通经,消肿止痛,以助黄芪、川芎行气化痰之功。全方共奏益气化痰、通络止痛之功<sup>[10]</sup>。

作者采用益气化痰方对低氧诱导因子1 $\alpha$ 基因敲除小鼠从2.5月龄开始用药干预。和生理盐水组相比,益气化痰方组椎间盘软骨部位骨化和缺损减轻,表明小鼠椎间盘软骨的形态破坏得到延缓。II型胶原和Sox9蛋白的表达增加,提示椎间盘软骨组织损伤减少。X型胶原、基质金属蛋白酶13蛋白表达减少,表明益气化痰方干预后,椎间盘软骨组织的破坏受到抑制。以上结果证明,在低氧诱导因子1 $\alpha$ 缺乏的情况下,益气化痰方能够加强软骨血液循环,增加软骨细胞的营养供应,从而减轻低氧诱导因子1 $\alpha$ 基因敲除小鼠椎间盘软骨的损伤,对低氧诱导

因子1 $\alpha$ 基因敲除小鼠的椎间盘软骨具有一定的保护作用。

**致谢:** 感谢参与实验的所有研究人员及研究生。

**基金资助:** 国家自然科学基金面上项目(30973760); 沪教委科[2009]6号,上海市高校创新团队计划。

**利益冲突:** 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

**伦理要求:** 实验过程中对动物的处置应符合2009年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

**作者声明:** 文章为原创作品,数据准确,内容不涉及泄密,无一稿两投,无抄袭,无内容剽窃,无作者署名争议,无与他人课题以及专利技术的争执,内容真实,文责自负。

#### 4 参考文献

- [1] Peng JG, Jia LS, Shi Q, et al. ZHONGGUO JIAOXIANG WAIKE ZAZHI. 2000;7(2):147-150.  
彭宝淦,贾连顺,施杞,等. 软骨终板在椎间盘退变过程中的作用机理[J]. 中国矫形外科杂志,2000,7(2):147-150.
- [2] Hubbi ME, Gilkes DM, Baek JH, et al. Four-and-a-half LIM domain proteins inhibit transactivation by hypoxia-inducible factor 1. J Biol Chem. 2012;287(9):6139-6149.
- [3] Semenza GL. HIF-1 and human disease: one highly involved factor. Genes Dev. 2000;14(16):1983-1991.
- [4] Semenza GL. Oxygen-dependent regulation of mitochondrial respiration by hypoxia-inducible factor 1. Biochem J. 2007;405(1):1-9.
- [5] Cha BH, Kim JH, Kang SW, et al. Cartilage tissue formation from dedifferentiated chondrocytes by codelivery of BMP-2 and SOX-9 genes encoding bicistronic vector. Cell Transplant. 2012 Jul 5.
- [6] Wang Q, Mei HP. Zhonghua Linchuang Mianyi he Biantai Fanying Zazhi. 2008;2(1):41-43.  
王婧,梅焕平. 骨性关节炎软骨修复与基因治疗[J]. 中华临床免疫和变态反应杂志,2008,2(1):41-43.
- [7] Hofer T, Desbaillets I, Höpfel G, et al. Dissecting hypoxia-dependent and hypoxia-independent steps in the HIF-1alpha activation cascade: implications for HIF-1alpha gene therapy. FASEB J. 2001;15(14):2715-2717.
- [8] Park SK, Dadak AM, Haase VH, et al. Hypoxia-induced gene expression occurs solely through the action of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha): role of cytoplasmic trapping of HIF-2alpha. Mol Cell Biol. 2003;23(14):4959-4971.
- [9] Piontkivska H, Chung JS, Ivanina AV, et al. Molecular characterization and mRNA expression of two key enzymes of hypoxia-sensing pathways in eastern oysters Crassostrea virginica (Gmelin): hypoxia-inducible factor  $\alpha$  (HIF- $\alpha$ ) and HIF-prolyl hydroxylase (PHD). 2011;6(2):103-114.
- [10] Li RF. Shiyong Zhongyi Neike Zazhi. 2012;26(7):45-47.  
李蓉芳. 调脾化湿通络法治疗湿热阻络型类风湿关节炎对照临床观察[J]. 实用中医内科杂志,2012,26(7):45-47.