

夹脊电针对兔退变腰椎间盘组织中 caspase3、caspase9 表达的影响

汪伯毅¹,邹璟¹,黄国付²

【摘要】目的:观察夹脊电针对兔退变腰椎间盘组织中 caspase-3、caspase-9 表达的影响。**方法:**将 20 只新西兰兔随机分为正常组($n=5$)、假模型组($n=5$)、模型组($n=5$)、电针组($n=5$)。正常组给予正常喂养,不予特殊处理;假模型组实验兔在 L₄、L₅ 椎体间穿入克氏针,不予椎体间加压,不做治疗;模型组在 L₄、L₅ 椎体间穿入两根平行的克氏针,然后在克氏针两端连接加压装置,不做治疗;电针组在成功造模的基础上,施以电针治疗。在造模后第 28d 各组实验兔取出腰椎间盘组织,并通过免疫组化检测其中 caspase3、caspase9 表达情况。**结果:**干预 28d 后,与正常组同期相比较,假模型组的 caspase-3、caspase-9 表达差异无统计学意义,模型组 caspase-3、caspase-9 表达水平均显著升高(均 $P<0.05$);与模型组同期比较,电针组 caspase-3、caspase-9 表达均显著降低(均 $P<0.05$)。**结论:**夹脊电针通过下调腰椎间盘组织中 caspase-3、caspase-9 表达,减少细胞凋亡,从而延缓腰椎间盘退变。

【关键词】电针;夹脊穴;椎间盘退变;caspase3;caspase9

【中图分类号】R49;R681 **【DOI】**10.3870/zgkf.2020.08.001

Effects of Electroacupuncture Stimulation of “Jiaji(EX-B2)” on Expression of Caspase-3 and Caspase-9 in Rabbit Degenerated Intervertebral Disc Wang Boyi, Zou Jing, Huang Guofu. Wuhan Hospital of Integrated Chinese and Western Medicine, Wuhan 430022, China

【Abstract】**Objective:** To observe the effect of electroacupuncture at jiaji(EX-B2) on the expression of caspase-3 and caspase-9 in rabbit degenerated intervertebral disc. **Method:** A total of 20 New Zealand rabbits were randomly divided into normal, sham operation, model, and EA groups ($n=5$ each). Rabbits in normal group were given natural breeding without any treatment. The rabbits in model group were given the custom-made external device on the bases of two K-wires inserted into the vertebral bodies L4 and L5 parallel to the adjacent study for 28 days. There were nothing else treatment in this group. The rabbits in sham operation group were attached to two K-wires inserted into the vertebral bodies L4 and L5 parallel to the adjacent study without any pressure loading devices or other treatment. The rabbits in EA group were given EA therapy from the first day of the disc degeneration model established. The expression levels of caspase-3 and caspase-9 in the lumbar intervertebral disc (L4-L5) tissues were assayed by immunohistochemistry at 28th day. **Results:** No significant changes were found between the control and sham groups at any time point for the expression of caspase-3 and caspase-9. Compared to the normal group, caspase-3 and caspase-9 expression levels at 28th day in the model group were apparently increased (all $P<0.05$). As compared with the model group, the expression levels of caspase-3 and caspase-9 were remarkably decreased in the EA group at day 28 ($P<0.05$). **Conclusion:** The treatment of EA at jiaji(EX-B2) has a protective effect on the tissues of the lumbar intervertebral disc in rabbits. Its mechanism of delaying the degeneration of the lumbar intervertebral disc may be related to the down-regulation of caspase-3 and caspase-9.

【Key words】 electroacupuncture; jiaji(EX-B2); intervertebral disc degeneration; caspase-3;caspase9

基金项目:国家自然科学基金面上项目(No. 81574072; No. 81774392)

收稿日期:2019-08-15

作者单位:1. 武汉市第一医院中医科,武汉 430022;2. 武汉市武昌医院,武汉 430063

作者简介:汪伯毅(1988-),男,住院医师,主要从事针刺的机制研究工作。

通讯作者:黄国付,531529128@qq.com

以椎间盘退变为始动因素的腰椎退行性疾病临床多发,且易复发。退变基础上,若伴随有脊柱持续轴向负荷,易加速椎间盘老化、纤维环破裂,继而出现影像学改变以及腰腿部不适症状。既往临床医生多关注腰椎间盘退行性疾病的症状处理,对于椎间盘退变机制

的重视不够,一定程度上影响了椎间盘退行性疾病的有效防治。一直以来,以针灸为主的中医外治手段广泛应用于腰椎退行性疾病的治疗中,但针灸治疗的机理尚不十分明确。近年来,研究者注意到细胞凋亡异常在椎间盘退变中作用关键^[1],细胞凋亡增加后椎间盘退变的发生和发展明显加强^[2],而半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶(Caspase)家族在细胞凋亡过程中具有核心调控作用。能否探寻干预椎间盘细胞凋亡的手段值得广大科研工作者研究。本研究拟观察夹脊电针对兔退变腰椎间盘组织中 caspase-3、caspase-9 表达的影响,试图从细胞凋亡角度探讨电针防治腰椎退行性疾病可能机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物与器材与试剂 ①动物:本次实验 20 只骨骼发育成熟的雄性新西兰大白兔(月龄 5~6 个月,体质量 3.0~4.0kg)均由武汉大学实验动物中心提供(合格证书编号 42000500005577)。开始实验前大白兔均给与适应性饲养 1 周(武汉市第一医院中心实验室)。将 20 只实验兔进行随机编号后分为正常组、假模型组、模型组和电针组 4 个组别。每组各 5 只。②器材:东风汽车设备制造厂提供椎间盘轴向加压造模器;实验兔固定器为课题组成员自己制备;采用美国通用电气公司生产的 Signa HDx 3.0T 磁共振器;采用南京济生医疗科技有限公司生产的韩氏穴位神经刺激仪;针灸针为一次性,由苏州医疗用品厂有限公司提供,规格 0.30mm×25mm;切片机由上海徕卡仪器有限公司生产提供(RM2016);采用上海福玛实验设备有限公司提供的 DGX-9003B 型烘箱;采用格兰仕微波炉电器有限公司提供的 P70D20P-TF 型微波炉;采用北京六一仪器厂生产的 WD-9405A 型脱色摇床;采用重庆光电仪器有限公司提供的 XSP-C204 型普通光学显微镜;③试剂:PBS 溶液(0.01M);NaH₂PO₄(0.593g);Na₂HPO₄(5.802g);NaCl(17.0g);去离子水(ddH₂O,定容至 2L);10×EDTA 修复液(谷歌生物,目录号:G1010H2O2);H₂O₂(国药集团化学试剂有限公司,目录号:1001218);BSA(Roche,北京索莱宝科技有限公司分装,目录号:A8020);抗兔/鼠通用型免疫组化试剂盒(Dako Denmark A/S,REALTMEnVision +/HRP RABBIT/MOUSE,货号:K5007);Anti-Caspase-3 Rabbit pAb(GB11009-1);Anti-Caspase-9 Rabbit pAb(GB11053-1)。

1.2 方法 ①实验造模:参照研究者 Kroeber^[3]及黄国付等^[4]的造模方法,先将实验兔固定于多功能操作台上,用 10% 水合氯醛(1mL/kg)在兔耳缘静脉注射

麻醉。麻醉成功后进行备皮,分别在实验兔 L₄、L₅ 椎体旁约 1.5cm 定位,稍后做 1cm 垂直切口,逐层分离肌肉直至椎体暴露,用克氏针(直径 1.5mm)垂直刺入两椎体间,借助电钻力辅助克氏针横穿透椎体及对侧皮肤,稍后对切口进行缝合。调整克氏针两端使之平行,最后将自制轴向加压造模器安装于克氏针两端,调整造模器为 200N 的压力,加压操作时间为 28d(见图 1A~B)。术后给予实验兔肌肉注射青霉素(4×106U,1 次/d,连续 5d)预防伤口感染。造模第 28d 拆除克氏针上的轴向加压造模器,拔出克氏针,将实验兔置于 3.0T 磁共振器上以评估造模成功与否。造模不成功的实验动物予以剔除后补齐样本量。②实验方法:正常组(n=5)给予自然喂养,不予特殊处理;假模型组(n=5)实验兔在 L₄、L₅ 椎体间穿入克氏针,不予椎体间加压,不做治疗;模型组(n=5)在 L₄、L₅ 椎体间穿入克氏针,然后施以轴向加压造模器加压,不做治疗;电针组(n=5)在成功造模的第 1d 开始施以电针治疗(见图 2)。治疗方法:取下加压造模器及克氏针,将实验兔固定于多功能操作台,参照《实验针灸学》^[5]中“实验动物穴位标准定位”,用 28 号 1 寸长针灸针捻转刺入兔 L₄-L₅ 双侧夹脊穴(深度 0.5~0.8cm),待针下有沉涩感时连接韩氏穴位神经刺激仪(调频波 2/15Hz,强度 1~2mA),每天行 1 次针刺治疗(时间 20min),治疗周期(连续 6d 为 1 疗程,疗程间隔 1d,共治疗 4 个疗程)。

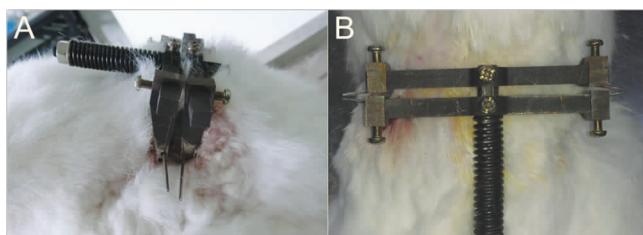


图 1A~B 造模



图 2 电针治疗

1.3 检测指标 在造模后第28天各组5只实验兔均行L4-5椎间盘MRI平扫,评估造模效果。我们将各实验兔腰椎间盘DWI原始数据传输到处理工作站,应用软件对原始数据进行处理,生成ADC伪彩图。在ADC图上,选取腰椎的中间层面,于L4-5椎间盘中间即在T2WI上观察到的椎间盘髓核矢状位的中央区选择1个点ROI,并测量ADC值,每点重复测量3次,取平均值。MRI分级方案参照Thompson椎间盘退变病理分级:I级,NP呈胶冻状,AF排列整齐,透明软骨样CEP厚度均匀,椎体边缘规则。II级,NP边缘出现白色纤维组织,AF纤维层之间出现粘蛋白样物质,CEP厚度不规则,椎体边缘有凸出。III级,NP内出现固化纤维组织,AF与NP界限不清,AF内粘蛋白样物质广泛沉积,CEP可见灶状缺损,椎体边缘散在骨赘。IV级,NP内出现平行于CEP的水平裂隙,AF出现放射状或环状破裂,CEP的软骨下出现灶状硬化,椎体骨赘<2mm。V级,裂隙贯穿AF和NP,CEP广泛硬化,椎体骨赘>2mm。I~V级对应计1~5分统计。磁共振扫描之后处死实验兔,取出椎间盘组织,并通过免疫组织化学检测其中caspase-3、caspase-9表达的情况。将石蜡切片置于烘箱(65℃)中烘片2h,脱蜡至水,用PBS进行冲洗(时间5min,共冲洗3次);将切片置于EDTA缓冲液中,通过微波进行修复,方式为中火至沸后断电,间隔10min后再采用低火至沸的方式;自然冷却后用PBS洗3次,每次洗的时间为5min;切片需阻断内源性过氧化物酶(放入3%过氧化氢溶液,室温下孵育10min);PBS洗3次,每次5min,甩干后5%BSA封闭20min(封闭电荷);把BSA液去除,每张切片加入一抗(50μl稀释过)覆盖组织,在4℃环境中过夜;PBS洗3次,每次5min;去除PBS液,每张切片加相应种属的二抗50~100μl,在4℃环境中孵育50min;PBS洗3次,每次5min;去除PBS液,之后每张切片加新鲜DAB溶液50~100μl,通过显微镜来控制其显色;显色完全后,通过蒸馏水或自来水进行冲洗,苏木素复染,1%盐酸酒精分化(1s),自来水冲洗,氨水返蓝,流水冲洗;切片经过70%~100%梯度的酒精脱水干燥,二甲苯透明,中性树胶封固,其中每10min一个梯度。将切片放在普通显微镜下,调整好位置后观察、采集图片,每张切片选择3个高倍镜视野,镜下棕色为阳性细胞,应用Image J图像分析系统计数阳性细胞后再进行统计学分析。

1.4 统计学方法 所有试验数据均通过SPSS17.0统计软件进行统计学分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间均数比较用t检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 实验动物造模情况 部分实验兔在建立模型一周内出现一侧耳廓部分缺失,考虑耳源静脉注射损伤所致。造模后共10只实验兔出现下肢活动欠灵活,4只实验兔出现肢体瘫痪,3只实验兔在造模后一周内死亡,肢体瘫痪及死亡的动物均予以剔除后补齐样本量。各组实验兔在造模及电针干预期间食欲正常,反应灵活,无肌肉萎缩,无蓬乱及感染。

2.2 4组实验兔第28天椎间盘MRI比较 正常组实验兔、假模型组实验兔各椎间盘信号强度相当,均为均匀明亮的高信号;而模型组实验兔和电针组实验兔经过造模处理后椎间盘信号强度较相邻正常椎间盘信号有所降低,有的椎间盘甚至出现黑色,表明造模成功。见图3A~H。

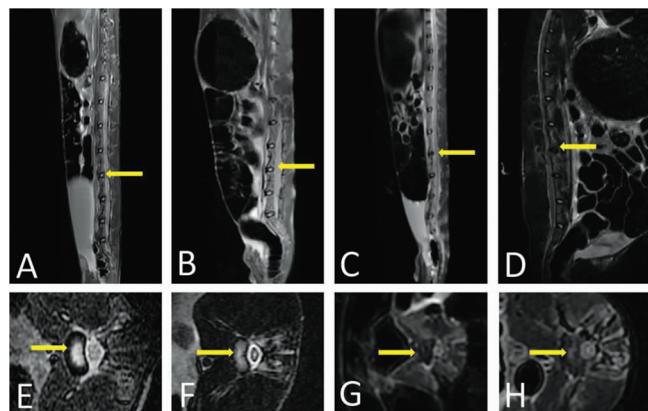


图3A~H 4组椎间盘MRI比较

注:A为正常组椎间盘MRI矢状位,髓核信号均匀明亮;B为假模型组,与正常组无明显差异;C为模型组,椎间盘无信号强度,表明髓核水分丢失,蛋白降解;D为电针组治疗后,椎间盘信号与模型组相比有部分改善;E、F、G、H为对应轴位像;箭头所指为椎间盘信号改变

2.3 4组实验兔ADC值及MRI分级比较 与正常组同期比较,假模型组第28天ADC值及MRI分级差异无统计学意义,模型组第28天ADC值明显下降($P < 0.05$),MRI分级明显上升($P < 0.05$);与模型组同期比较,电针组第28天ADC值明显上升($P < 0.05$),MRI分级明显下降($P < 0.05$)。见表1。

表1 4组实验兔干预第28天ADC值及MRI分级比较
 $\bar{x} \pm s$

组别	n	ADC值	MRI分级
正常组	5	1.69±0.21	1.2±0.4
假模型组	5	1.72±0.15	1.4±0.5
模型组	5	1.30±0.06 ^a	4.2±0.4 ^a
电针组	5	1.47±0.05 ^b	3.4±0.5 ^b

与正常组比较,^a $P < 0.05$,与模型组比较,^b $P < 0.05$

2.4 4组 caspase-3 及 caspase-9 表达比较 与正常组同期比较,假模型组第 28 天 caspase-3 及 caspase-9 表达差异无统计学意义;模型组第 28 天 caspase-3 及 caspase-9 表达增强($P < 0.05$)。与模型组同期比较,电针组第 28 天 caspase-3 及 caspase-9 表达下降($P < 0.05$)。见图 4A~C。

3 讨论

正常椎间盘没有血管组织供应其营养,主要依靠软骨终板途径进行营养供应。随着年龄增长,椎间盘退变程度有所增加,髓核细胞数目会相应减少,含水量下降,合成细胞外基质的质量降低^[6]。此时,若长期过度压力施加于椎间盘,会加速软骨终板的损伤,影响到椎间盘的营养物质供应及代谢废物的排除,进一步加剧椎间盘退变,继而引发腰椎间盘突出症,退行性腰椎病。近年来,越来越多的学者^[7-8]注意到细胞凋亡与腰椎间盘退变密切相关,随着细胞凋亡增加,椎间盘内细胞数量减少,细胞外基质的生成减少,椎间盘基质原本生成与破坏的动态平衡受到冲击,加速了椎间盘退变。目前研究^[9]发现细胞凋亡受到多种信号通路调控,Caspase 家族作为细胞凋亡通路中最重要的调控因子,在哺乳动物细胞凋亡启动及执行阶段起重要作用。

用。Caspase-3 是 caspase 级联反应中最重要的凋亡执行因子,而 caspase-9 作为 caspase-3 的上游调控因子,与 caspase-3 共同在细胞凋亡中起到关键作用^[10]。研究者赵英伦等^[11]报道了腰椎间盘退行性病变患者血清 caspase-3,caspase-9 浓度明显高于正常健康者,并且血清 caspase-3,caspase-9 浓度越高者腰椎间盘突出节段越多,进一步说明了凋亡因子 caspase-3,caspase-9 很可能跟腰椎间盘退变密切相关。而研究者 Chen^[12]注意到基因敲除动物模型中,抑制 caspase-3 的表达的实验手段可显著阻滞体内和体外的细胞凋亡。基于此,探寻可以有效减少椎间盘组织中 caspase-3,caspase-9 表达的手段,将为抑制椎间盘细胞凋亡,继而延缓椎间盘退变提供可能。

目前临幊上针对腰椎间盘退行性疾病的干预手段较多,而诸多开放/微创手术,理疗,药物治疗均不能从根本上阻止 LDD 的发生和发展。电针以其突出的疗效一直活跃于 LDD 的防治中,且得到了国际社会的关注和认可^[13-14]。夹脊穴位于背腰部,脊柱正中旁开 0.5 寸,与旁行的足太阳膀胱经和正中的督脉联系密切,可通过调控两经而治疗腰痛。而现代研究^[15]亦从解剖及神经体液调节角度证实了夹脊穴深刺缓解局部肌肉痉挛,平衡脊椎内外环境而治疗腰痛。

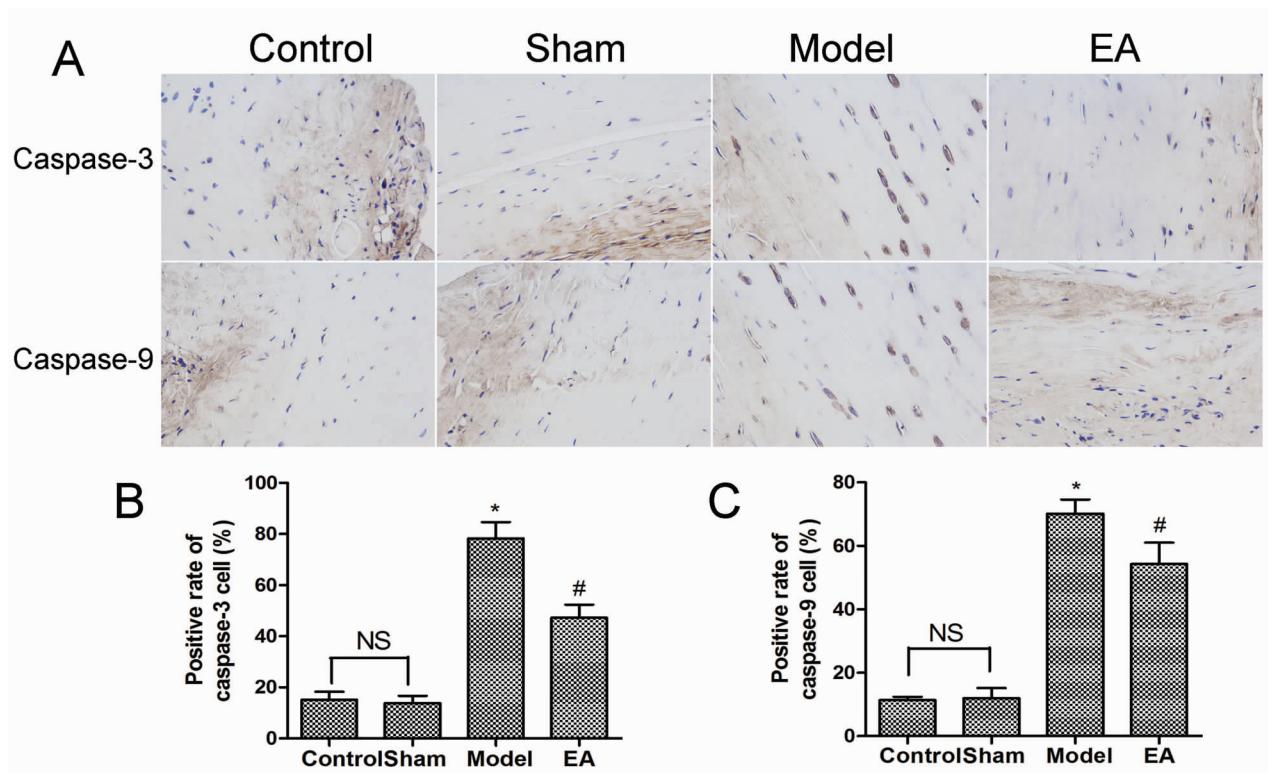


图 4A~C 4 组 caspase-3 及 caspase-9 表达比较

注: A 为免疫组化结果; B 为 caspase-3 表达结果; C 为 caspase-9 表达结果; Control 为正常组; Sham 为假模型组; Model 为模型组; EA 为电针组; 与正常组同期比较, * $P < 0.05$; 与模型组同期比较, # $P < 0.05$

本课题组前期的研究证实了电针对腰椎间盘退变性疾病有良好的治疗作用,且能降低LDD引起的免疫反应^[16-17]。本研究通过持续加压装置作用于实验兔腰椎间盘,诱导模型兔发生椎间盘退变(符合人的自然退变征像),继而通过夹脊电针治疗28d,观察夹脊电针对兔退变椎间盘组织中caspase-3、caspase-9表达的影响,研究结果发现,造模成功后兔腰椎间盘组织中caspase-3、caspase-9表达较造模前明显增强,表明椎间盘退变后,细胞凋亡增加,细胞外基质的生成减少,而电针夹脊穴干预28d后兔退变腰椎间盘组织中caspase-3、caspase-9表达明显降低,表明电针夹脊穴干预有利于细胞凋亡因子表达下调。由此,我们推测夹脊电针通过下调凋亡促进因子caspase-3、caspase-9的表达来抑制椎间盘细胞凋亡,继而纠正细胞外基质合成与分解的失衡,从而达到延缓椎间盘退变的目的。这将为临床应用针刺防治腰椎退行性疾病提供科学的理论依据。但夹脊电针具体通过哪个信号通路介导而抑制细胞凋亡有待我们进一步研究。

【参考文献】

- [1] 黄国付,汪伯毅,邹璟,等.夹脊电针对兔退变腰椎间盘组织中decorin蛋白表达的影响[J].中国康复,2015,30(5):323-327.
- [2] 李妍玲,邹璟,黄国付.电针夹脊穴对兔退变腰椎间盘Actin、Tubulin表达的影响[J].中国康复,2018,33(1):3-6.
- [3] Kroeger M,Unglaub F,Guehring T,et al. Effects of controlled dynamic disc distraction on degenerated intervertebral discs: an in vivo study on the rabbit lumbar spine model[J]. Spine,2005,30(2):181-187.
- [4] Huang GF,Jing Z,Jing S,et al. The Effect of Electroacupuncture on the Extracellular Matrix Synthesis and Degradation in a Rabbit Model of Disc Degeneration[J]. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, Volume 2014,26(9):731395-731404.
- [5] 郭义.实验针灸学[M].北京:中国中医药出版社,2008:402-417.
- [6] 张延松,胡俊明,郝杰.椎间盘退变基因治疗进展[J].中国矫形外科杂志,2014,22(7):617-619.
- [7] 佟思琪,邹璟,黄国付.PKA-CREB通路参与电针对退变椎间盘AQP1、3基因表达的影响[J].辽宁中医杂志,2018,45(7):1542-1546.
- [8] 廖明轩,邹璟,黄国付.cAMP-PKA信号通路参与电针调控兔退变椎间盘AQP1、AQP3表达的机制研究[J].中华中医药学刊,2018,36(6):1320-1323.
- [9] Wang H,Liu H,Zheng ZM,et al. Role of death receptor, mitochondrial and endoplasmic reticulum pathways in different stages of degenerative human lumbar disc[J]. Apoptosis,2011,16(10):990-1003.
- [10] 张小蕾,薛艺璇,林依梦,等.电针预处理对心肌缺血再灌注损伤大鼠Caspase-9、Caspase-3及CK的影响[J].湖北中医杂志,2018,40(11):3-6.
- [11] 赵英伦,马元,莫森,等.腰椎间盘突出症患者血清中Caspase-3和Caspase-9活性研究.现代检验医学杂志[J].2018,33(2):13-15.
- [12] Chen MF,Huang SJ,Huang CC,et al. Saikosaponind induces cell death through caspase-3-dependent, caspase-3-independent and mitochondrial pathways in mammalian hepatic stellate cells[J]. BMC Cancer,2016,16(1):532.
- [13] Lam M, Galvin R,Curry P. Effectiveness of acupuncture for nonspecific chronic low back pain:a systematic review and meta-analysis[J]. Spine,2013,38(24):2124-2138.
- [14] Li AKapitck TJ. The case of acupuncture for chronic low back pain: when efficacy and comparative effectiveness conflict[J]. Spine,2011,36(3):181-182.
- [15] 姜永霞,程博,蒋松鹤,等.腰段夹脊穴的解剖学特征及其临床意义[J].中国针灸,2012,32(2):138-142.
- [16] 汪伯毅,黄国付.电针夹脊穴对腰椎间盘突出症镇痛作用的临床观察[J].湖北中医杂志,2013,35(11):68-69.
- [17] Huang GF,Jing Z,Jing S,et al. Electroacupuncture Stimulates Remodeling of Extracellular Matrix by Inhibiting Apoptosis in a Rabbit Model of Disc Degeneration[J]. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2015,11(2) :386012-386021.

作者·读者·编者

《中国康复》杂志实行网站投稿

《中国康复》杂志已经实行网上投稿系统投稿,网址:<http://www.zgkfzz.com>,欢迎广大作者投稿,并可来电咨询,本刊电话:027-69378389,E-mail:zgkf1986@163.com;kfkl@tjh.tjmu.edu.cn。