

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2014.18.016

芒针透刺对急性脊髓损伤兔脊髓细胞凋亡受体 Fas 及 Caspase-3 的影响

何 春¹, 全仁夫^{1*}, 陈荣良¹, 杨迪生², 杨宗保³, 许世超¹

(1. 杭州市萧山区中医院, 浙江省杭州市萧山区育才路 156 号, 311201, 2. 浙江大学医学院附属二院; 3. 厦门大学医学院)
基金项目: 浙江省中医药科研基金资助项目 (2008CB067)

摘要 **目的** 探讨芒针透刺治疗急性脊髓损伤的可能作用机制。 **方法** 135 只日本大耳兔随机均分为假手术组、模型组和芒针透刺组, 每组 45 只。模型组和芒针透刺组建立兔 T13-L1 急性脊髓损伤模型; 假手术组、模型组不给任何刺激, 芒针透刺组芒针透刺双侧秩边、水道穴, 辅以针刺气海、中极, 得气后同侧秩边、水道连接于针灸治疗仪上, 刺激时间 15 min, 频率 20~40 次/min, 强度 1.5~3.0 V, 每日 1 次, 共 5 天。分别于术后 1、3、5 天取伤段脊髓观察形态学变化, 检测脊髓细胞凋亡受体 Fas、Caspase-3 蛋白及其 mRNA 表达。 **结果** 假手术组各取材点脊髓界限清晰, 神经元细胞结构完整; 模型组脊髓组织正常结构紊乱, 局部区域内神经元细胞可见细胞核消失; 芒针透刺组脊髓组织结构及神经元细胞破坏较模型组轻微。与假手术组比较, 模型组大鼠术后 1、3、5 天脊髓 Fas、Caspase-3 蛋白及 mRNA 表达明显升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 芒针透刺组术后第 3、5 天 Caspase-3 蛋白及 mRNA 表达明显降低, 术后第 3 天 Fas 蛋白及 mRNA 亦降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。 **结论** 芒针透刺对急性脊髓损伤有明显的保护作用, 抑制脊髓 Fas、Caspase-3 水平可能是其作用机制之一。

关键词 芒针; 透刺; 急性脊髓损伤; 细胞凋亡受体

急性脊髓损伤发生机制相当复杂, 细胞凋亡是损伤后脊髓细胞死亡的重要形式, 与多种凋亡相关基因相关^[1]。近年来临床研究发现, 中医药对急性脊髓损伤及其严重并发症有显著的临床疗效^[2-3]。我们以芒针透刺秩边、水道穴, 观察干预后脊髓形态学变化, 脊髓细胞凋亡受体 Fas、Caspase-3 蛋白及其 mRNA 表达水平变化, 探讨芒针透刺对急性脊髓损伤的可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物

日本大耳兔 135 只, 雌雄各半, 清洁级, 体重 (2.50 ± 0.25) kg, 由南昌龙平兔业有限公司提供, 实验动物许可证号: SCXK (赣) 2009-0001。

1.2 主要仪器

石蜡切片机 (型号: SM2000R, 德国 Leica 公司), 光学显微镜 (型号: BX-50, 日本 Olympus 公司), 华佗牌针灸治疗仪 (型号: SDZ-II, 苏州

医疗用品厂有限公司), 芒针或毫针 [1.5 寸及 3 寸, 苏州医疗用品厂有限公司, 苏食药监械 (准) 字 2008 第 2270626 号], 台式离心机 (型号: TGL-16C, 上海安亭科学仪器厂), 电子天平 (型号: BT25S, 北京赛多利斯仪器系统有限公司), 超净台 (型号: ZHJH-4214, 苏州净化仪器厂)。

1.3 主要试剂

免疫组化染色试剂盒 (北京中杉金桥公司, 批号: SP-9002), 浓缩型二氨基联苯胺 (DAB) 试剂盒 (北京中杉金桥公司, 批号: ZLI-9032), Fas 多克隆抗体 (武汉博士德生物工程有限公司, 批号: BA00484), Caspase-3 多克隆抗体 (Abcam 公司, 批号: abAB13847)。

1.4 动物分组及处理方法

采用随机分组数字表法将 135 只日本大耳兔分为假手术组、模型组、芒针透刺组, 每组 45 只。假手术组仅予暴露椎板后关闭切口; 模型组和芒针透刺组参考文献 [4] 方法造成 T13-L1 段脊髓损伤。假手术组、模型组常规饲养, 不给予任何刺

* 通讯作者: quanrenfu@126.com, 13336021097

激; 芒针透刺组采用芒针透刺双侧秩边、水道穴, 辅以针刺气海、中极, 得气后同侧秩边、水道组成回路连接于针灸治疗仪上, 刺激时间 15 min, 频率 20 ~ 40 次/min, 强度 1.5 ~ 3.0 V, 每日 1 次, 共 5 天。

1.5 观测指标及方法

各组动物分别于术后第 1、3、5 天采用随机数字表法选取 9 只动物, 采用空气栓塞法处死, 心脏灌注, 取出完整 T13 - L1 段脊髓。

1.5.1 形态学观察 脊髓采用 4% 多聚甲醛固定, 常规石蜡包埋, 连续 4 μ m 厚度切片, 行 HE 染色, 光镜下观察脊髓横切面形态学变化。

1.5.2 免疫组织化学染色法检测 Fas、Caspase-3 蛋白表达 常规石蜡切片, 按照 Fas、Caspase-3 抗体说明书染色, 光镜下每张切片选取 3 个视野, 进行光密度值计数 (Image-ProPlus 图像分析软件, 版本: 6.0)。

1.5.3 RT-PCR 检测 Fas mRNA、Caspase-3 mRNA 表达 引物由上海生工生物工程技术服务有限公司 (中国) 合成, 经 GenBank 序列验证, β -actin 为内参。引物序列: Fas 上游 5'-GCAGACAAGCGATT-TACTTCT-3', 下游 5'-ATCAGAACAGTGAAGCGTACA-3'; Caspase-3 上游 5'-GCTGTGTGGCTTGCTA-AGTT-3', 下游 5'-TCACGTATCCTGGCGACTGTC-3'; β -actin 上游 5'-GAGTACGCCAACATGGTGCTGTC-3', 下游 5'-CGTTCATGAGCCACACTTAGC-3'。Trizol 法抽提脊髓组织总 RNA, 反转录按照反转录试剂盒说明书操作, PCR 扩增按以下反应条件进行: 94 $^{\circ}$ C 4min, 94 $^{\circ}$ C 40s, 55 $^{\circ}$ C 60s, 72 $^{\circ}$ C 1min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 5min。从第 18 循环起每间隔 3 个循环拿出 1 管至 33 循环。产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳后, 电泳结果用 GDS 800 凝胶成像分析系统进行电泳条带分析, 以 Caspase-3 或 Fas 与 β -actin 吸收峰面积的比值对扩增循环数作图, 选择最适循环数, 此实验的最佳循环次数为 30 个循环, 分析 Fas mRNA、Caspase-3 mRNA 电泳条带灰度值, 计算相对表达量 (相对表达量 = 实验灰度值 / 内参灰度值)。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计学软件处理, 计量数据以均数 $\pm$ 标准差表示, 采用方差分析和 LSD 检验。

2 结果

2.1 各组兔脊髓形态学变化

假手术组各取材点脊髓界限清晰, 胶质细胞分

布散在均匀, 细胞核呈波浪状, 两头较尖, 尼氏体清晰, 神经元细胞结构完整。术后第 1 天, 模型组和芒针透刺组均见散在片状出血, 局部水肿, 可见明显坏死区, 胶质细胞增生, 灰质中形成空腔, 部分空腔较大, 部分尼氏小体消失, 局部区域有淋巴细胞浸润, 脊髓组织正常结构紊乱, 可见神经元细胞胞体缩小、核固缩。术后第 3 天, 模型组脊髓组织正常结构紊乱, 仍见少量散在片状出血, 胶质细胞增生明显, 损伤区域空腔较大, 尼氏小体消失, 部分神经元细胞可见核固缩。术后第 5 天, 模型组脊髓组织结构仍相当紊乱, 严重核固缩变性, 局部区域内神经元细胞可见细胞核消失, 形成巨大空腔, 大量胶质细胞伴随增生。与模型组比较, 术后 3、5 天芒针透刺组脊髓组织结构比较清晰, 仍有少量完整神经元细胞核存留, 神经细胞结构较清晰, 水肿、坏死亦较轻微, 灰质和白质分界较清, 胶质细胞轻度增生, 未见出血。

2.2 各组不同时间兔脊髓 Fas、Caspase-3 蛋白表达比较

Fas 蛋白阳性细胞于脊髓灰白质均有分布, 以白质内表达为多; 假手术组术后第 3 天见 Fas 蛋白极少量阳性细胞表达于白质, 模型组术后第 3 天 Fas 蛋白阳性细胞损伤段神经元灰白质均有分布, 以白质内表达较多, 术后 3 天芒针透刺组与模型组比较, Fas 蛋白阳性细胞分布则较少。Caspase-3 蛋白阳性细胞主要分布于灰质背角神经元; 假手术组术后第 5 天见极少量 Caspase-3 蛋白阳性细胞表达, 在模型组术后 5 天 Caspase-3 蛋白阳性细胞于灰质背角神经元细胞外及胞浆内均可见大量的阳性表达, 芒针透刺组术后第 5 天较模型组 Caspase-3 阳性表达较少且散在。

表 1 示, 各时间点模型组 Fas、Caspase-3 蛋白表达与假手术组比较均明显升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。在术后各时间点芒针透刺组 Fas 蛋白表达较模型组显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。在术后第 3、5 天芒针透刺组 Caspase-3 蛋白表达与模型组比较亦降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

2.3 不同时间各组兔脊髓 Fas mRNA、Caspase-3 mRNA 表达比较

表 2 示, 各时间点假手术组 Fas mRNA、Caspase-3 mRNA 的表达与模型组比较均显著升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与模型组比较, 芒针透刺组第 1、3 天 Fas mRNA 的表达显著降低 ($P < 0.05$); 芒针透刺组第 3、5 天 Caspase-3 mRNA 的表达亦较模型组降低 ($P < 0.01$)。

表 1 不同时间各组兔脊髓 Fas、Caspase-3 蛋白光密度值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	兔数	Fas			Caspase-3		
		1 d	3 d	5 d	1 d	3 d	5 d
假手术组	9	0.040 ± 0.009	0.041 ± 0.010	0.049 ± 0.009	0.041 ± 0.022	0.025 ± 0.013	0.036 ± 0.013
模型组	9	0.372 ± 0.047 **	0.743 ± 0.068 **	0.256 ± 0.040 *	0.405 ± 0.055 **	0.747 ± 0.049 **	0.272 ± 0.040 **
芒针组	9	0.314 ± 0.089 Δ	0.465 ± 0.045 $\Delta\Delta$	0.216 ± 0.063 Δ	0.394 ± 0.077	0.554 ± 0.044 $\Delta\Delta$	0.226 ± 0.075 Δ

注: 与假手术组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, Δ $P < 0.05$, $\Delta\Delta$ $P < 0.01$

表 2 不同时间各组兔脊髓组织 Fas、Caspase-3 mRNA 相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	兔数	Fas mRNA			Caspase-3 mRNA		
		1 d	3 d	5 d	1 d	3 d	5 d
假手术组	9	0.103 ± 0.009	0.113 ± 0.013	0.136 ± 0.027	0.191 ± 0.029	0.218 ± 0.013	0.193 ± 0.015
模型组	9	0.507 ± 0.069 **	0.722 ± 0.026 **	0.315 ± 0.014 *	0.407 ± 0.031 **	0.858 ± 0.040 **	0.653 ± 0.027 **
芒针组	9	0.408 ± 0.022 Δ	0.599 ± 0.040 Δ	0.283 ± 0.022	0.429 ± 0.015	0.624 ± 0.022 $\Delta\Delta$	0.348 ± 0.026 $\Delta\Delta$

注: 与假手术组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, Δ $P < 0.05$, $\Delta\Delta$ $P < 0.01$

3 讨论

急性脊髓损伤大多数源于交通创伤、坠落伤、砸伤、暴力、战伤或运动损伤,绝大多数为闭合性损伤,呼吸系统感染、泌尿系统感染、压疮是急性脊髓损伤的主要并发症,发生率为 96.5% [4]。脊髓损伤一般分原发性损伤和继发性损伤。机械压迫、细胞内电解质紊乱、出血等直接引起脊髓原发性损伤,上述损伤发生于伤后 4 h 内,呈不可逆改变。相对于原发性损伤,继发性损伤非外力直接作用,发生于急性脊髓损伤后引发的一系列病理生化改变和迟发性的神经细胞死亡,比如炎症、自身免疫反应、血—脊髓屏障破坏、局部缺血一再灌注损伤、自由基反应、细胞内外离子紊乱及细胞因子表达、细胞凋亡等,这些过程一般多为可逆性改变,细胞凋亡被认为是脊髓继发性损伤的重要原因和神经元细胞死亡的主要方式 [5]。因此控制继发性损伤,尤其是控制细胞凋亡成为研究的重点,临床通过药物、物理及手术等干预以保护脊髓,减少神经元死亡,促进脊髓功能的恢复,这对改善患者的预后,提高患者生活质量显然具有更重要意义 [6]。

既往研究显示,针灸对急性脊髓损伤有很好的疗效 [7]。芒针源于《黄帝内经》“九针”中的长针,因其针具细长如麦芒而得名,其针法独特,可以疏导深在脏腑经络的气血。毛林焕 [8] 认为芒针以深刺为主要特点,其适应范围主要为病位较深的疾病或神经、肌肉、筋膜疾病。从中医理论上,治痿独取阳明,两个阳明经穴位——秩边透水道,一针透两穴,选穴配方上少而精,从解剖上看,其行针路径及穴周解剖关系可看到,盆腔血管神经网络分布非常密集,芒针刺刺激盆神经,通过神经反馈到脊髓中枢或大脑皮质,刺激受损脊髓组织从而产生

治疗效果。

有研究表明, Caspase 家族被认为在细胞凋亡级联网络中处于中心地位, Caspases 家族的激活使凋亡细胞直接解体 [9], 而 Caspase-3 则是 Caspase 家族成员中最重要的效应型,活化后的 Caspase-3 可以切割许多蛋白质底物,参与调节细胞骨架蛋白、抑制参与 DNA 修复的酶以及抗凋亡蛋白等,从而引起细胞死亡 [10]。Fas 是肿瘤坏死因子受体家族 (TNFR) 成员,能与细胞内 Caspase 家族中最顶端的 Caspase-8 结合形成死亡诱导信号复合体。

综合实验结果,术后第 1 天 (早期) 神经元细胞凋亡和死亡共存,如脊髓区域结构紊乱、细胞器破坏或溶解消失等坏死现象与凋亡小体形成、胞体缩小、核固缩等细胞凋亡现象同时出现,与此同时,坏死区周围往往同时存在一个或数个凋亡区域,说明凋亡使损伤面积扩大。术后第 5 天,脊髓组织内主要表现为如核固缩变性等细胞凋亡现象,而片状出血坏死区等渐吸收形成空泡等,说明急性脊髓损伤后期继发性损伤是以细胞凋亡为主,这提示如果能控制细胞凋亡将能挽救脊髓损伤带来的伤害。持续规律的芒针透刺减少了脊髓神经元进一步死亡,HE 染色实验中芒针透刺组脊髓损伤组织神经元存活较多,神经细胞结构较清晰,组织水肿坏死情况较模型组轻微,胶质细胞增生也同样较少。芒针透刺组的 Fas、Caspase-3 蛋白表达较模型组明显减少,芒针透刺组 Fas、Caspase-3 mRNA 表达较模型组明显减弱。从组织、细胞、基因 3 个层次证明,芒针透刺对脊髓损伤有明确的治疗作用,抑制细胞凋亡可能是其产生治疗作用的机制。

参考文献

[1] Williams GT, Smith CA. Molecular regulation of apoptosis;

- genetic controls on cell death [J]. Cell, 1993, 74(5): 777-782.
- [7] 任亚锋, 韦大文, 刘承梅. 重灸法配合间歇导尿治疗脊髓损伤后神经源性膀胱功能障碍 38 例 [J]. 中医杂志, 2009, 50(1): 49-50.
- [8] 王殿华. 龟鹿益髓胶囊配合针灸治疗脊髓空洞症 60 例 [J]. 中医杂志, 2007, 48(6): 530-531.
- [9] 陈银海, 刘敏, 何井华. 脊髓损伤患者流行病学调查 [J]. 实用医学杂志, 2011, 27(6): 1032-1033.
- [10] Richter C, Schweizer M, Cussariz A, et al. Control of apoptosis by the cellular ATP level [J]. FEBS Lett, 1996, 378(2): 107-110.
- [11] Li L, Zhu H, Xu CJ, et al. Cleavage of BID by Caspase-8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis [J]. Cell, 1998, 94(4): 491-501.
- [12] 王天宇, 孙波. 胸腰椎压缩性骨折后腹胀、便秘中医治疗方法探究 [J]. 中医杂志, 2010, 51(2): 107-108.
- [13] 毛林焕. 芒针治疗疾病病谱分析 [J]. 中医研究, 2009, 22(1): 61-62.
- [14] 蒋文文, 郝晓霞, 郭雅琼, 等. Caspase 信号通路调控大鼠再生肝细胞的凋亡 [J]. 解剖学报, 2012, 43(3): 359-364.
- [15] 冉群芳, 倪光夏, 项晓. 针刺对脑缺血再灌注模型大鼠海马 Caspase-3 mRNA 表达的影响 [J]. 吉林中医药, 2008, 28(4): 302.

Effects of Elongated Needle Therapy on the Expressions of Fas and Caspase-3 in Rabbits With Acute Spinal Cord Injury

HE Chun¹, QUAN Renfu¹, CHEN Rongliang¹, YANG Disheng², YANG Zongbao³, XU Shichao¹

(1. TCM Hospital of Xiaoshan District, Hangzhou, Zhejiang Province 311201; 2. The Second Affiliated Hospital of Zhejiang University School of Medicine; 3. Medical College Xiamen University)

ABSTRACT Objective To study the possible mechanism of elongated needle therapy for acute spinal cord injury.

Methods Totally 135 Japanese rabbits were randomized into the sham operation group, model group and elongated needle therapy group, with 45 in each. The T13-L1 acute spinal cord injury models were established in the model group and elongated needle therapy group. The sham operation group and model group were not given any stimulation. The elongated needle therapy group was given elongated needling on bilateral points Zhibian (BL54) and Shuidao (ST28), and common acupuncture needling on Qihai (CV6) and Zhongji (CV3). The morphological changes of spinal cord were observed. The expressions of Fas, Caspase-3, Fas mRNA and Caspase-3 mRNA were detected.

Results The spinal boundary was clear and neuronal cell structure was intact in the sham operation group. The spinal structure was disordered and the nucleus of neuronal cells was disappeared in the model group. The damage of spinal structure and neuronal cells was slight in the elongated needle therapy group. Comparing with the sham operation group, the expressions of Fas, Caspase-3, Fas mRNA and Caspase-3 mRNA were significantly increased in the model group on the 1st, 3rd, and 5th days after operation ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The expressions of Caspase-3 and Caspase-3 mRNA were significantly decreased in the elongated needle therapy group on the 3rd, and 5th days after operation, and the expressions of Fas and Fas mRNA were significantly decreased in the elongated needle therapy group on the 3rd day after operation ($P < 0.05$ or $P < 0.01$).

Conclusion The elongated needle therapy has an obvious protective effect on acute spinal cord injury, which may be relevant to inhibiting the expressions of Fas and Caspase-3.

Keywords elongated needle; penetration needling therapy; acute spinal cord injury; apoptosis receptor

(收稿日期: 2013-11-05; 修回日期: 2014-03-10)

[编辑: 洪涛]

欢迎邮购医学光盘

四大经典 VCD 《黄帝内经》《伤寒论》《金匱要略》《温病学》全套 2500 元, 其中《金匱要略》单套 800 元, 其余每套 600 元。四大基础 VCD 《中医基础理论》、《中医诊断学》、《中药学》、《方剂学》全套 2700 元, 单套 700 元。

汇款地址: 北京东直门内南小街 16 号中医杂志社; 收款人: 北京医海林音像书店, 邮编: 100700, 联系人: 张伟平, (010) 64014411-3036; 叶晨, (010) 64013162。