

·基础研究·

电针委中穴对腰椎退变模型大鼠纤维环细胞 caspase3、XIAP 蛋白表达的影响*

邓德万¹ 林建平² 陈少清¹ 夏 梦¹ 王诗忠^{1,3}

摘要

目的:观察电针委中穴对腰椎退变模型大鼠纤维环细胞凋亡及 caspase3 和 XIAP 表达的影响。

方法:将 40 只雄性 SD 大鼠按随机数字表法分为假手术组、模型组、电针委中穴组、电针非穴组。采用纤维环穿刺法制作腰椎退变模型。于造模 1 个月后进行电针治疗,电针委中穴组取“委中”穴,电针非穴组取委中内侧 0.5cm,均每日 1 次,每次 20min,连续治疗 4 周。治疗结束后取材,运用 TUNEL 法检测纤维环细胞凋亡,免疫组化检测(caspase3)和 XIAP 表达。

结果:假手术组偶见 TUNEL 细胞,caspase3 低表达,XIAP 高表达;模型组纤维环细胞 TUNEL 阳性细胞和 caspase3 表达较假手术组显著增加($P<0.01$),XIAP 表达低于假手术组($P<0.01$);与模型组比较,电针委中穴组 TUNEL 阳性细胞和 caspase3 表达均明显减少($P<0.01$),XIAP 表达增加($P<0.01$);与电针委中穴组比较,电针非穴组纤维环细胞 TUNEL 阳性细胞和 caspase3 表达较高($P<0.05$),XIAP 蛋白表达减少($P<0.05$)。

结论:电针可延缓椎间盘退变,其机制可能与调节纤维环细胞 caspase3 和 XIAP 表达,抑制纤维环细胞凋亡有关。

关键词 委中穴;椎间盘退变;纤维环;caspase3;XIAP

中图分类号:R685 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2016)-04-0394-05

Effects of electro-acupuncture of “Weizhong” point on the expressions of caspase3 and XIAP in rat with lumbar disc degeneration/DENG Dewan, LIN Jianping, CHEN Shaoqing, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2016, 31(4): 394—398

Abstract

Objective: To observe the effects of electro-acupuncture (EA) of “Weizhong”(BL40) point on the expressions of caspase3 and XIAP in rat with lumbar disc degeneration so as to explore the underlying mechanism.

Method: Forty male adult SD rats were randomly divided into sham-operated, model, EA-BL40 and non-point groups. The rat model of lumbar disc degeneration set up by puncturing the annulus fibrosus with needles with defined gauges. Following modeling, EA was performed at BL40 for 20 min, once daily for 4 weeks, with one day's interval between two weeks. The non-point was located 0.5cm lateral to the BL40 and stimulated by EA similar to EA-BL40. At the end of the experiment, lumbar disc tissues were taken out for TUNEL and detecting the expression of caspase3 and XIAP with immunohistochemistry.

Result: Apoptotic cells and caspase3 in annulus fibrosus of model group was higher than that of sham-operated group($P<0.01$),and expression of XIAP decreased in group of model($P<0.01$). In comparison with the model group, expression of apoptotic cells and caspase3 decreased in group of EA-BL40($P<0.01$), and the expression of XIAP increased significantly in EA-BL40 group($P<0.01$). Compared with the EA-BL40 group, expression of apoptotic cells and caspase3 increased in non-point group($P<0.05$), and expression of XIAP decreased signifi-

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2016.04.004

*基金项目:国家自然科学基金资助项目(81303017);福建省自然科学基金(2014J01346);福建省教育厅 A 类科技项目(JA13163)

1 福建中医药大学,福建福州,350122; 2 福建中医药大学附属康复医院; 3 通讯作者

作者简介:邓德万,男,硕士研究生; 收稿日期:2015-02-12

cantly($P<0.05$).

Conclusion: EA could regulate the expression of caspase3 and XIAP to delay disc degeneration.

Author's address Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou,350122

Key word Weizhong point;intervertebral disc degeneration;annulus fibrosus;caspase3;XIAP

腰椎退行性疾病是骨科常见疾病之一,是腰椎间盘组织在多种因素综合作用下发生细胞介导的生物化学改变,其结局往往是椎体节段不稳、骨赘形成、椎管狭窄、椎间盘突出,压迫神经根、脊髓,从而引发腰痛。其发病率高,严重影响人们的工作和生存质量,是多数国家公共健康问题之一^[1-2]。近年来,腰椎退行性疾病在临床治疗中日益受到重视,如何延缓椎间盘退变和防治腰痛已成为当今的研究热点。研究发现^[3-4],细胞凋亡与椎间盘退变过程密切相关,抗凋亡机制在椎间盘退行性改变过程中发挥重要作用。电针治疗腰椎退行性疾病具有鲜明疗效,故本研究通过复制大鼠腰椎退变模型,观察电针委中穴后腰椎间盘组织凋亡情况及凋亡相关蛋白caspase3、XIAP蛋白表达水平,探讨其对腰椎退变的调控机制。

1 材料与方

1.1 实验动物及分组

SPF级3月龄健康雄性SD大鼠40只,体质量250—300g,由上海动物实验中心提供,许可证号:SCXK(沪)2012-0002。适应性饲养1周后,按体质量进行编号,运用随机数字表法将40只大鼠分为假手术组、模型组、电针委中穴组、电针非穴组,每组10只。

1.2 主要实验设备和试剂

低温离心机、金属恒温箱、激光共聚焦显微镜(日本产);石蜡包埋机、切片机、烤片机(上海产);华佗牌G6805电针仪(苏州产);Motic Med6.0显微生物图像分析系统;TUNEL试剂盒(Promega, Madison, WI, USA);免疫组化DAB试剂盒(型号:Kit-0017,福州迈新生物技术开发有限公司);兔抗鼠caspase3多克隆抗体、兔抗鼠XIAP多克隆抗体(北京博奥森生物技术有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 动物模型制备:腰椎退变模型的制作参照Rousseau等^[5]报道的纤维环穿刺法加以改进,术前所有实验大鼠禁食12h,称重,应用10%水合氯醛腹

腔注射(3ml/kg)麻醉后腹部剃毛,清洁,仰卧位固定。取右侧旁正中切口,暴露腹后壁,剪开后腹膜,肠子转移到左侧,光镜下分离下腔静脉,暴露腹面L3/L4、L4/L5、L5/L6椎间盘,穿刺椎间盘(21号穿刺针,穿刺深度为1.5mm)。穿刺完成后,依次缝合皮下筋膜及皮肤。

假手术组:仅切开皮肤后缝合。

造模后同等条件下饲养1个月。每组随机取2只大鼠,通过HE染色,分析以确定模型复制是否成功:假手术组腰椎间盘的髓核网状结构完整,四周环绕纤维环结构排列有序,清晰可辨;模型组髓核网状结构退化,呈纤维软骨样改变,体积减小,纤维环细胞出现肿胀甚至断裂,排列紊乱,明确造模成功。

1.3.2 干预方法:假手术组和模型组正常喂养不予其他处理;电针委中穴组和电针非穴组分别在造模1个月予电针委中穴和非经非穴对照点(委中穴内侧旁开0.5cm)^[6-7]。电针的具体操作:运用双极联体针^[8]予委中穴和非穴点行直刺0.5cm(针灸针规格0.16mm×10mm),针刺后连接G-6805华佗牌电针仪,予疏密波,频率2Hz/10Hz,电流强度1mA,以下肢出现轻微颤抖为准,每天治疗1次,每次治疗20min,连续治疗4周^[9]。

1.3.3 标本获取及检测:TUNEL法检测纤维环细胞凋亡:干预结束后,以过量10%水合氯醛腹腔注射处死,迅速从腰椎后正中中线切开皮肤,逐层分离腰椎两旁的肌肉韧带,直达椎体。取下整个腰椎段椎间盘于冰面上操作,快速取出L4/L5椎间盘组织。L4/L5椎间盘组织放入4%多聚甲醛中固定48h,于37℃恒温箱中以10%EDTA脱钙30d,常规脱水、透明、浸蜡、包埋、切片。采用DeadEnd荧光测定TUNEL系统来检测细胞凋亡。试验结束后立即将做好的组织切片放在激光共聚焦显微镜(Leiss LSM710)下分析样本,200倍高倍视野下观察并拍照,镜下细胞核由DAPI染为蓝色,凋亡细胞呈绿色荧光。用Motic Med 6.0显微生物图像分析系统统计阳性细胞数及总细胞数,计算凋亡阳性细胞率。

免疫组化法:组织切片常规脱蜡入水,0.01M 枸橼酸钠 (pH6.0)热抗原修复 10min; H₂O₂ 室温孵育 10min 以阻断内源性过氧化物酶;10%正常山羊血清封闭,室温孵育 30min;倾去血清,勿洗,滴加一抗于 4℃冰箱过夜;室温复温 30min,滴加生物素标记山羊抗兔二抗工作液,室温孵育 10min;滴加辣根过氧化物酶标记链霉卵白素工作液,室温孵育 10min; DAB 显色剂显色 90s,自来水充分冲洗(以上步骤除血清封闭外,其余步骤间均需 PBS 浸洗 3 次,每次 5min);苏木素复染,PBS 返蓝,逆梯度酒精脱水,中性树胶封片。胞质出现棕褐色或黄褐色颗粒的细胞为阳性染色。每张切片随机取 3 个不同视野(400×),用 Motic Med 6.0 显微生物图像分析系统统计阳性细胞数及总细胞数,计算阳性细胞率,取均值。

1.4 统计学分析

采用 SPSS18.0 软件进行统计分析,所有数据均以均值±标准差表示,组间比较采用单因素方差分析,P<0.05 为差异具有显著性意义。

2 结果

2.1 腰椎间盘突出纤维环细胞凋亡情况

见图 1,表 1。细胞核为蓝色荧光,凋亡细胞呈

表 1 各组大鼠纤维环细胞 TUNEL 染色及 caspase3、XIAP 阳性细胞率比较 (x±s,%)

组别	例数	TUNEL	caspase3	XIAP
假手术组	8	19.47±3.96	27.05±7.41	48.65±8.36
模型组	8	46.27±9.24 ^①	55.50±10.03 ^①	21.68±13.86 ^①
电针委中穴组	8	28.78±8.89 ^{②③}	40.80±7.88 ^{②③}	44.85±5.09 ^{②③}
电针非穴组	8	38.10±10.26	49.69±5.24	34.64±9.22

注:与假手术组比较,①P<0.01;与模型组比较,②P<0.01;与电针非穴组比较,③P<0.05

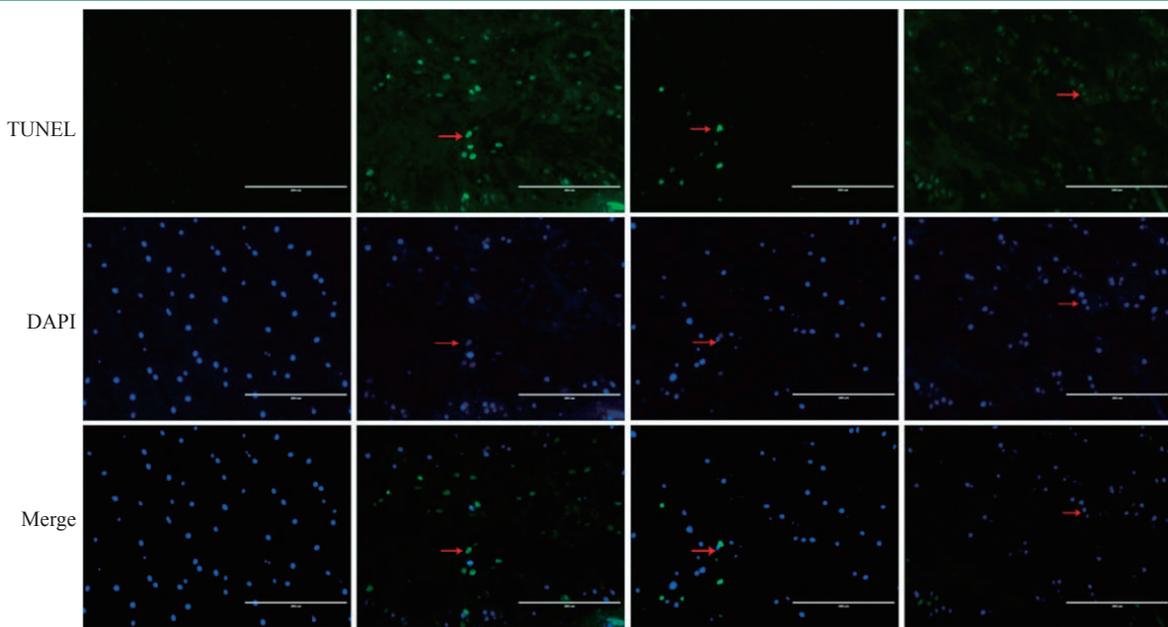
绿色荧光。结果显示假手术组大鼠纤维环细胞仅有少量 TUNEL 阳性凋亡细胞表达;模型组大鼠 TUNEL 阳性凋亡细胞数较假手术组明显增多,差异具有显著性意义(P<0.01);电针委中穴组 TUNEL 阳性细胞数较模型组明显减少,差异具有显著性意义(P<0.01);与电针委中组比较,电针非穴组 TUNEL 阳性细胞数较高,差异具有显著性意义(P<0.05)。表明纤维环穿刺可引起纤维环细胞凋亡,电针可抑制纤维环细胞凋亡。

2.2 腰椎间盘突出纤维环细胞 caspase3 蛋白免疫组化检测结果

见图 2,表 1。caspase3 蛋白表达结果显示,假手术组染色多呈弱阳性或阴性表达;模型组大鼠纤维环细胞染色普遍较深,棕褐色颗粒较多,大多呈阳性

图 1 各组大鼠纤维环细胞 TUNEL 阳性细胞表达

(×200)



(TUNEL 监测,图中绿色荧光为凋亡纤维环细胞,蓝色荧光为细胞核)

表达;电针委中穴组、电针非穴组多呈阳性或弱阳性表达。与假手术组比较,模型组 caspase3 阳性细胞数明显增加,差异具有显著性意义($P<0.01$);与模型组比较,电针委中穴组 caspase3 蛋白阳性细胞数明显降低,差异具有显著性意义($P<0.01$);与电针委中穴比较,电针非穴组 caspase3 蛋白阳性率较高($P<0.05$)。

2.3 腰椎间盘突出纤维环细胞 XIAP 蛋白免疫组化检测结果

见图3,表1。XIAP 蛋白表达结果显示,假手术

组大鼠纤维环细胞具有较多的 XIAP 蛋白表达,且颜色较深,多呈强阳性;模型组纤维环细胞 XIAP 蛋白表达较少;电针委中穴组和非穴组呈阳性、弱阳性表达。与假手术组比较,模型组 XIAP 阳性细胞数显著降低,差异具有显著性意义($P<0.01$);与模型组比较,电针委中穴组 XIAP 阳性细胞数有显著提高($P<0.01$),提示电针能够促进大鼠纤维环细胞 XIAP 蛋白的表达;与电针委中穴组比较,电针非穴组中 XIAP 表达减少($P<0.05$)。

图2 各组大鼠纤维环细胞 caspase3 蛋白表达 (免疫组化染色,×400)

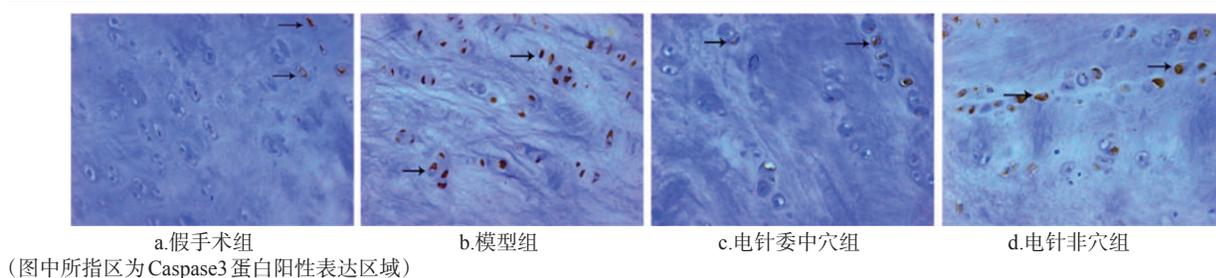
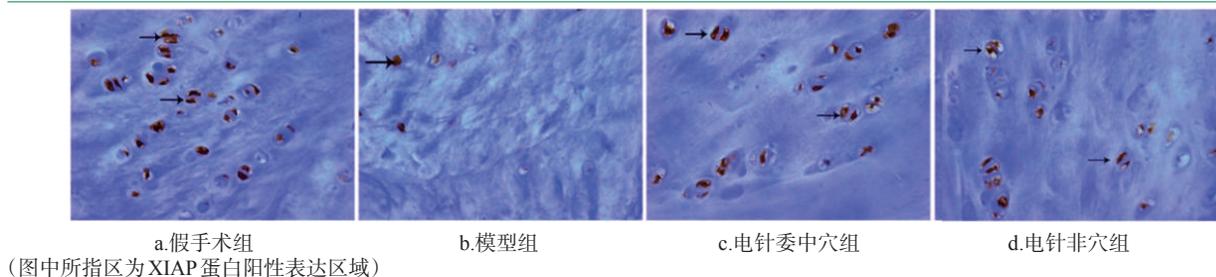


图3 各组大鼠纤维环细胞 XIAP 蛋白表达 (免疫组化染色,×400)



3 讨论

针灸治疗腰痛具有悠久的历史和丰富的临床经验。历代医籍中有关针灸治疗“腰痹”“腰脚痛”等腰痛病症的记载颇多,《针灸大全》中就有“腰背委中求”的记载。委中穴作为“四总穴”之一,为临床针灸治疗腰椎退行性疾病的常用效穴,合并有“经脉所过,主治所及”、“血之郄穴”等特点。大量临床实践和基础研究也证明针刺委中穴治疗腰椎退行性疾病疗效满意^[10-11]。

腰椎退行性疾病与椎间盘结构的破坏和功能障碍密切相关的病变,其过程是多种复杂的因素相互作用的结果,如细胞凋亡、炎症反应、蛋白酶类激活、异常应力等^[12-13]。近年来研究发现^[14],纤维环细胞凋亡与椎间盘退变过程联系密切。

细胞凋亡由 Kerr 等^[15]最早提出,是指为维持内环境稳定,由基因控制的细胞自主的有序的死亡,是目前认为有可能进行干预的细胞死亡途径之一。细胞凋亡在多细胞动物的生长发育和生理、病理过程中发挥重要作用,涉及一系列基因的激活、表达以及调控,且参与了一些人类退行性疾病的发生与发展。Caspase-3 是 CPP32 亚家族成员之一,位于凋亡通路的下游,是 Caspase 家族中最为重要的凋亡执行者之一,它被合成后通常以非活化的酶原形式存在于不同类型细胞的胞质中,在多种凋亡信号刺激下经蛋白水解被激活,对多种蛋白底物进行降解,被认为是整个凋亡级联反应的一个关键调节节点,它的活化是凋亡进入不可逆阶段的标志^[16]。本实验显示凋亡细胞与 caspase3 在模型组中表达较假手术组高

($P<0.01$),说明凋亡细胞与 caspase3 表达的增加将导致椎间盘结构和功能的异常,与椎间盘退变过程密切相关。同时,电针委中穴组凋亡细胞与 caspase3 表达较模型组低($P<0.01$),提示电针委中穴能够抑制纤维环细胞凋亡。

IAPs 为新发现的一类在结构上具有同源性的细胞凋亡抑制蛋白,且不同 IAP 家族成员具有一定组织特异性。XIAP 由 Liston P 等^[17]于 1996 年在人胚胎脑组织细胞中克隆出的 IAP 家族的一员,具有普遍表达性,在人体除外周淋巴细胞外均有表达,是 IAP 家族中最强有力的 Caspase 抑制物。本实验中 XIAP 在假手术组和电针委中穴组高表达,在模型组中低表达,说明 XIAP 的表达高低与椎间盘退变呈负相关,提示 XIAP 的表达与椎间盘退变过程联系密切。

结构生物学分析显示 XIAP 蛋白具有两个特征域:N 端含有 3 个 BIR 区域,C 端为一段锌指结构。BIR1、BIR2 结构域可以结合并抑制活化的 Caspase-3、7^[18];而 BIR3 结构区可与 Caspase-9 单体形成异源性二聚体,使 Caspase-9 保持单体结构,丧失催化活性,从而抑制其凋亡效应子 Caspase-3 的激活^[19];XIAP 锌指结构域具有 E3 泛素连接酶活性,可促进 Caspase9、caspase3 蛋白降解,从而达到抗凋亡作用,表明 XIAP 不同的结构域以不同的方式抑制 caspase3 和 Caspase9 的活性^[20]。在诱导发生凋亡的细胞中 XIAP 被切割为两个片段,切割后,XIAP 的抗凋亡活性被抑制,这种调节方式使细胞对不同的死亡刺激作出精细的调节。

综上,caspase3 与 XIAP 在椎间盘细胞凋亡过程中发挥重要作用,XIAP 以不同的方式抑制 caspase3 的活性,调控纤维环细胞凋亡,从而延缓椎间盘退变的发生发展。本研究表明,电针委中穴可改善腰椎退变,其机制可能是通过调节退变大鼠腰椎间盘纤维环细胞 caspase3 和 XIAP 蛋白的表达,抑制纤维环细胞凋亡,从而以延缓椎间盘退变。因而,通过进一步研究电针委中穴对腰椎退变模型大鼠纤维环中细胞凋亡的调控基因和信号传导途径的影响,是防治腰椎退行性疾病的有效途径之一。同时,这种调控作用在委中穴组与非穴组之间的差异性也证明电针委中穴对腰椎间盘的保护作用与经穴的特异性密不可分,说明经穴与非经穴在针刺效应特异性方面存在差异。

参考文献

- [1] Mehra M, Hill K, Nicholl D, et al. The burden of chronic low back pain with and without a neuropathic component: a healthcare resource use and cost analysis[J]. J Med Econ, 2012,15(2):245—252.
- [2] Dagenais S, Caro J, Haldeman S. A systematic review of low back pain cost of illness studies in the United States and internationally[J]. Spine J,2008,8(1):8—20.
- [3] Ding F, Shao ZW, Xiong LM. Cell death in intervertebral disc degeneration[J]. Apoptosis,2013,18(7):777—785.
- [4] Zhao CQ, Jiang LS, Dai LY. Programmed cell death in intervertebral disc degeneration[J]. Apoptosis,2006,11(12):2079—2088.
- [5] Rousseau MA, Bass EC, Lotz JC. Ventral approach to the lumbar spine of the Sprague Dawley rat[J]. Lab Anim (NY), 2004,33(6):43—45.
- [6] 李忠仁. 实验针灸学[M]. 新 1 版,北京:中国中医药出版社,2011.
- [7] 易受乡,封迎帅,常小荣,等. 点刺“委中”放血治疗腰椎间盘突出症机制的探讨[J]. 世界针灸,2008,1:45—51.
- [8] 徐斌,喻晓春,陈采益,等. 经穴穴区不同组织结构与经穴刺激效应量差异的关系:经穴相对特异性的实验研究[J]. 针刺研究,2010,6:422—428.
- [9] 彭博,张莉,陈欢,等. 电针委中穴对腰肌损伤家兔 CK、VEGF 和 MVD 的影响[J]. 中国康复,2014,1:3—7.
- [10] 王苓苓,张维波,谢衡辉,等. 使用血流成像技术对“腰背委中求”经典理论的验证[J]. 针刺研究,2007,4:247—251.
- [11] 陈欢,彭博,李富运,等. 电针对兔腰肌急性钝挫伤后组织修复与碱性成纤维细胞生长因子/细胞外信号调节激酶信号通路的影响[J]. 中国康复理论与实践,2014,3:215—220.
- [12] Adams MA, Roughley PJ. What is intervertebral disc degeneration, and what causes it?[J]. Spine (Phila Pa 1976), 2006,31(18):2151—2161.
- [13] Hadjipavlou AG, Tzermiadianos MN, Bogduk N, et al. The pathophysiology of disc degeneration: a critical review [J]. J Bone Joint Surg Br,2008,90(10):1261—1270.
- [14] 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.
- [15] Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics[J]. Br J Cancer,1972,26(4):239—257.
- [16] Reddi AH. Inhibition of cell death in the intervertebral disc by caspase 3 small interfering RNA[J]. Arthritis Rheum,2011,63(6):1477—1478.
- [17] Liston P, Roy N, Tamai K, et al. Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes[J]. Nature,1996,379(6563):349—353.
- [18] Lin YF, Lai TC, Chang CK, et al. Targeting the XIAP/caspase-7 complex selectively kills caspase-3-deficient malignancies[J]. J Clin Invest,2013,123(9):3861—3875.
- [19] Kaufmann T, Strasser A, Jost PJ. Fas death receptor signaling: roles of Bid and XIAP[J]. Cell Death Differ,2012,19(1):42—50.
- [20] Zou H, Yang R, Hao J, et al. Regulation of the Apaf-1/caspase-9 apoptosome by caspase-3 and XIAP[J]. J Biol Chem,2003,278(10):8091—8098.