

椎间盘脱出模型大鼠脊髓血管生成因子 mRNA 的表达变化及电针对其影响

吴伟澎¹, 李伟¹, 程鹏¹, 姜代勋¹, 陈武^{2*}

(1. 北京农学院兽医学(中医药)北京市重点实验室; 2. 北京农学院动物科学技术学院, 北京 102206)

【摘要】 目的 探讨椎间盘脱出症中与血管生成相关因子的变化及其电针作用, 分析电针参与脊髓微血管生成的机理。方法 采用自制硅胶片在 T₁₃ 段脊髓的左腹侧位压迫建立椎间盘脱出模型, 将大鼠随机分为三组, 即电针治疗组($n=6$)、模型组($n=6$)、假手术组($n=6$), 电针组每日电针治疗一次, 模型组与假手术组不做任何治疗。术后 7 d 后取压迫部位脊髓组织, RT-PCR 法检测 Ang-1、Tie-1、Ang-2、Tie-2、VEGF、Flt-1、caspase-3、Tsp-1 的 mRNA 表达量, 组织切片法观察脊髓损伤情况。结果 电针组大鼠后肢运动机能显著改善; 脊髓组结构相对完整, 灰质、白质界限清晰; 荧光定量 PCR 结果显示模型组与假手术组相比 Ang-1、Ang-2、Tie-1、Tie-2、caspase-3、Tsp-1 表达极显著升高($P<0.01$), VEGF、Flt-1 差异无显著性($P>0.05$); 模型组与电针组相比 Ang-2、Tie-1、Tie-2、caspase-3、Tsp-1 极显著升高($P<0.01$), Ang-1、VEGF、Flt-1 差异无显著性($P>0.05$); 电针组与假手术组各指标差异均无显著性($P>0.05$); 结论 脊髓压迫损伤后血管生成相关因子 mRNA 表达异常, 电针能够下调 Ang-2、Tie-2、Tsp-1 和 caspase-3 的表达, 使血管生成促进因子和抑制因子水平趋于正常, 从而为受损脊髓组织的修复提供有利条件。

【关键词】 椎间盘脱出模型; 血管生成因子; 电针; 大鼠

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2015) 03-0261-06

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2015.03.008

Changes of expression of angiogenic factor mRNA in the spinal cord of rat models of protruded intervertebral disc and the effects of electroacupuncture

WU Wei-peng¹, LI Wei¹, CHENG Peng¹, JIANG Dai-xun¹, CHEN Wu²

(1. Beijing Key Laboratory of Veterinary Traditional Chinese Medicine;

2. Department of Animal Science and Technology, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China)

【Abstract】 Objective The purpose of this study was to determine the changes of expression of angiogenic factor mRNA in the spinal cord of rats with protruded intervertebral disc and the effects of electroacupuncture, and to analyze the role of electroacupuncture in the spinal microvascular angiogenesis. **Method** Eighteen healthy male Sprague-Dawley rats were divided randomly into 3 groups: the electroacupuncture group, model group and sham-operated group. The protruded intervertebral disc models were generated by the left lateral and ventral spinal cord compression at T13 using a self-made silicon sheet. Only the rats in the first group were treated by electroacupuncture once a day for consecutive 7 days. Spinal cord tissue samples were taken from the compression site at 7 days after operation. The mRNA levels of Ang-1, Tie-1, Ang-2, Tie-2, VEGF, Flt-1, caspase-3 and Tsp-1 were determined by RT-PCR, and the pathological changes of the spinal cord was examined using HE staining. **Results** The rats in the electroacupuncture treated group showed significantly improved hind leg function, a relatively complete spinal cord structure, and a clear boundary between grey and white matters. The expression levels of Ang-1, Ang-2, Tie-1, Tie-2, capase-3 and Tsp-1 in the spinal cord tissues of the model group

【基金项目】 国家自然科学基金项目(编号: 31372473)。

【作者简介】 吴伟澎(1989-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 针灸机理。E-mail: wwp2012@126.com

【通讯作者】 陈武(1966-), 男, 教授, 博士, 研究方向: 中西医结合兽医学。Tel/Fax: 010-80799434, E-mail: tcvchenwu@Hotmail.com

were significantly higher than those of sham-operated group ($P < 0.01$), but the levels of VEGF and Flt-1 between those two groups showed no significant difference ($P > 0.05$). The expression levels of Ang-2, Tie-1, Tie-2, caspase-3 and Tsp-1 of the electroacupuncture group were significantly lower than those in the model group ($P < 0.01$), while the expression levels of Ang-1, VEGF and Flt-1 were not significantly different between the two groups ($P > 0.05$). All the indexes between electroacupuncture and sham-operated groups showed no significant difference ($P > 0.05$). **Conclusions** Our results demonstrate that mRNA expression of relevant angiogenic factors were abnormal after spinal cord compression, while electroacupuncture can down-regulate the expression of Ang-2, Tie-2, Tsp-1 and caspase-3, and modulate the promoting and inhibiting factors of angiogenesis to return towards normal, therefore, to create beneficial conditions for the repair of spinal cord injuries.

【Key words】 Protruded intervertebral disc, model; Angiogenic factors; Electroacupuncture; Rats

椎间盘脱出是人和动物常见病,针灸疗法显示了良好的疗效。髓核脱出压迫脊髓导致功能障碍与微循环障碍和微血管数量变化密切相关^[1]。本实验室前期研究表明椎间盘脱出压迫模型大鼠的脊髓微血管数量异常减少,而电针组能够改善这种异常变化^[2],但其机理不明。血管生成因子与血管生成抑制因子、血管破坏因子之间的动态平衡是维持微血管的数量和结构稳定性的重要因素^[3],本研究通过观察血管生成因子血管生成素 1 (angiopoietin-1, Ang-1)、血管生成素 2 (angiopoietin-2, Ang-2)、血管内皮细胞生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 及它们的受体 Tie-1、Tie-2、Flt-1,血管生成抑制因子凝血酶敏感蛋白 1 (thrombospondin-1, Tsp-1),细胞凋亡因子 caspase-3 在脊髓受压损伤后表达量的变化以及电针对其的影响,为针灸治疗椎间盘病提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

东华牌电针治疗仪 (WQ-6F);毫针 (苏州天协针灸器械有限公司,规格 0.2 × 25 mm);微动力仪 (Surgic XT, NSK, Japan);Step One Plus 荧光定量 PCR 仪 (ABI);戊巴比妥钠 (北京化学试剂公司,德国进口分装);注射用青霉素钾 160 万单位、注射用硫酸链霉素 50 万单位;TRIzol (Invitrogen);Revert Aid TM First Stand cDNA Synthesis Kit (Thermo);Trans Start Green qPCR Super Mix (Trans Gen Biotech)。

1.2 实验动物分组

清洁级雄性 SD 大鼠 18 只,体重 180 ~ 200 g,由中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心提供【SCXK-(军) 2012-004】,实验在北京农学院屏障动物实验设施进行【SYXK (京) 2010 -0003】,并按

实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。实验动物随机分成三组,即电针治疗组 ($n = 6$)、模型组 ($n = 6$)、假手术对照组 ($n = 6$)。电针组和模型组进行脊髓压迫,假手术组只暴露脊髓不压迫。电针组进行电针治疗,对照组和假手术组不做任何治疗。

1.3 椎间盘脱出模型制作

大鼠椎间盘脱出模型参考文献^[4],腹腔注射戊巴比妥钠 40 mg/(kg·bw) 进行麻醉,俯卧保定,以胸腰段椎体为中心剃毛、消毒,以第一腰椎 (L_1) 为中心,沿背正中线切开皮肤约 2 cm,分离筋膜、背最长肌、多裂肌,充分暴露 L_1 的棘突、椎板和关节突,微动力仪小心打磨椎板,暴露脊髓背侧,将自制的硅胶片从 L_1 的左侧填塞入至 T_{13} 段脊髓的左腹侧位,假手术组则只暴露脊髓,不进行压迫。分层缝合肌肉、皮肤关闭切口。术后每只大鼠肌肉注射青霉素钾 30 000 U/(kg·bw);硫酸链霉素 15 mg/(kg·bw),2 次/日,连用 3 d。单独分笼饲养,正常供给饮水和饲料,人工帮助排尿、排便,每日三次。

1.4 穴位选取与电针方法

电针治疗组,根据本课题组前期研究,选用以下三组穴位:左右膀胱俞 (BL28);左侧足三里 (ST36)、趾间 (EX-LE10);右侧足三里 (ST36)、趾间 (EX-LE10),每组分别接通电针仪,频率 2 Hz,幅度为 5,每天一次,每次 20 min,连续治疗 7 d。

1.5 运动机能评分

采用 BBB 运动机能评分法^[5],于术前、术后每日,对大鼠左、右后肢分别进行运动机能评分,其中第 1 天在大鼠从麻醉状态完全清醒后开始评分。

1.6 标本收集

术后第 7 天,在麻醉状态下,500 mL 生理盐水进行心脏灌注,在冰块上快速取出脊髓,从压迫正中向头侧取 3 mm 用于 RT-PCR 检测,向尾侧取 3 mm 用于病理学检测。

1.7 病理学检测

脊髓组织在 4% 多聚甲醛中固定 24 h, 常规脱水、组织包埋、切片、HE 染色, 显微镜下观察脊髓损伤情况。

1.8 RT-PCR 检测

取 50 mg 脊髓组织, 用 TRIzol 提取总 RNA, 按表 1 血管生成相关因子基因引物

Tab.1 The primers of the related-angiogenic genes

基因 Gene	引物 (5' - 3') Primer	长度/bp Length	退火温度/°C Tm
Ang-1	GTGGCTGGAAAACTTGAGA TGGATTTCAAGACGGGATGT	200	56
Tie-1	TGCGAGCCCACTCCAAGAGA ACAGGGTAACTCAAAGGCTC	269	59
Ang-2	GACCACTGGGCATCGCTACG CTGGTTGCTGATGCTACTG	169	62
Tie-2	TGCCACCATCACTCAATACC AAACGCCAATAGCACGGTGA	216	58
VEGF	ACTGGACCCTGGCTTTACTGC TTGGTGAGGTTTGATCCGCATG	310	62
Flt-1	AGGAGAGGACCTGAAACTGTCCT TTCCTGGCTCTGCAGGCATAGGT	212	63
Caspase-3	TGCGGCGTTACACGACCTT CAAAGCCAGTGGCACTCATTCTC	200	61
Tsp-1	CCGGTTTGATCAGAGTGGT GGTTTCGGAAGGTGCAAT	200	58
GAPDH	ACCACCATGGAGAAGGCTGG GGTTTCTTACTCCTTGGAGG	707	61

1.9 分析方法

试验得到的数据均采用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 记录。应用 SPSS 10.0 软件包, 采用 *t*-检验/LSD 多重比较分析组间差异显著性。P < 0.05 为差异有显著性。

2 结果分析

2.1 电针对椎间盘脱出模型大鼠后肢运动机能的影响

造模后大鼠的运动机能评分迅速降为零, 随着时间的延长, 后肢运动机能逐渐恢复 (见图 1-A, B)。对第 1、4、7 天数据进行统计分析, 由图 1-C 和图 1-D 可知, 在第 4 天和第 7 天, 电针组大鼠的左、右后肢运动机能评分极显著高于模型组 (P < 0.01)。电针组第 7 天大鼠的左、右后肢运动机能评分极显著高于第 4 天 (P < 0.01); 模型组第 7 天大鼠的左后肢运动机能评分与第 4 天相比差异无显著性 (P > 0.05), 第 7 天右后肢运动机能评分显著高于第 4 天 (P < 0.05)。表明电针能显著改善椎间盘脱出模型大鼠的后肢运动机能。

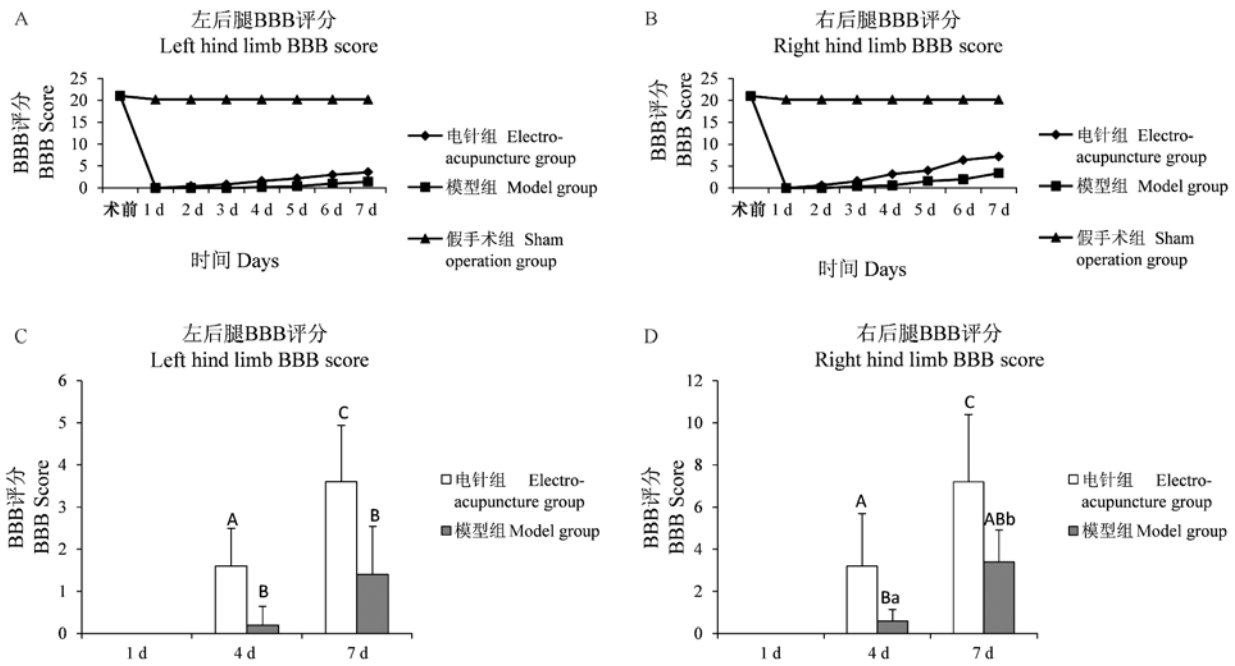
RevertAid™ First Stand cDNA Synthesis Kit 说明书反转录为 cDNA, 根据文献^[6,7]选取与血管生成相关因子引物 (见表 1), 扩增条件: 95°C 预变性 2 min; 94°C 20 s; 57 ~ 63°C 20 s; 72°C 30 s, 循环 40 次。拷贝 CT 值, 采用 2^{-ΔΔCt} 法进行分析。

2.2 组织病理学变化

电针组神经元多完好, 尼氏小体可见, 灰质与白质分界明显, 轴索与髓鞘多完整排列有序, 偶见空泡化。模型组, 神经元少见且多损伤, 尼氏小体消失, 灰质与白质边界模糊不清, 残存的白质中可见到不完整的轴索和髓鞘, 多空泡化 (见图 2)。

2.3 电针对血管生成相关因子的 mRNA 表达的影响

由图 3 可知, 模型组与假手术组相比 Ang-1、Ang-2、Tie-1、Tie2、caspase-3、Tsp-1 极显著升高 (P < 0.01), VEGF、Flt-1 差异无显著性 (P > 0.05); 模型组与电针组相比 Ang-2、Tie-1、Tie2、caspase-3、Tsp-1 极显著升高 (P < 0.01), Ang-1、VEGF、Flt-1 无显著性变化 (P > 0.05); 电针组与假手术组各指标差异均无显著性 (P > 0.05)。结果显示, 模型组 Ang-2、Tie-1、Tie2、caspase-3、Tsp-1 的 mRNA 的表达量异常高于假手术组和电针组, 电针组与假手术组各指标差异均无显著性, 提示电针能维持血管生成相关因子的 mRNA 表达的相对稳定并使之接近机体正常水平。



注:任两数值比较,小写字母完全不一致表示 $P < 0.05$,大写字母完全不一致表示 $P < 0.01$ 。下同
 Note. Comparison of any two values, completely different small letters denote $P < 0.05$, completely different capital letters denote $P < 0.01$. The same as below.

图 1 电针对椎间盘脱出模型大鼠后肢运动机能的影响

Fig. 1 Effects of electroacupuncture on the hind limb motor function in the rat models of intervertebral disc herniation

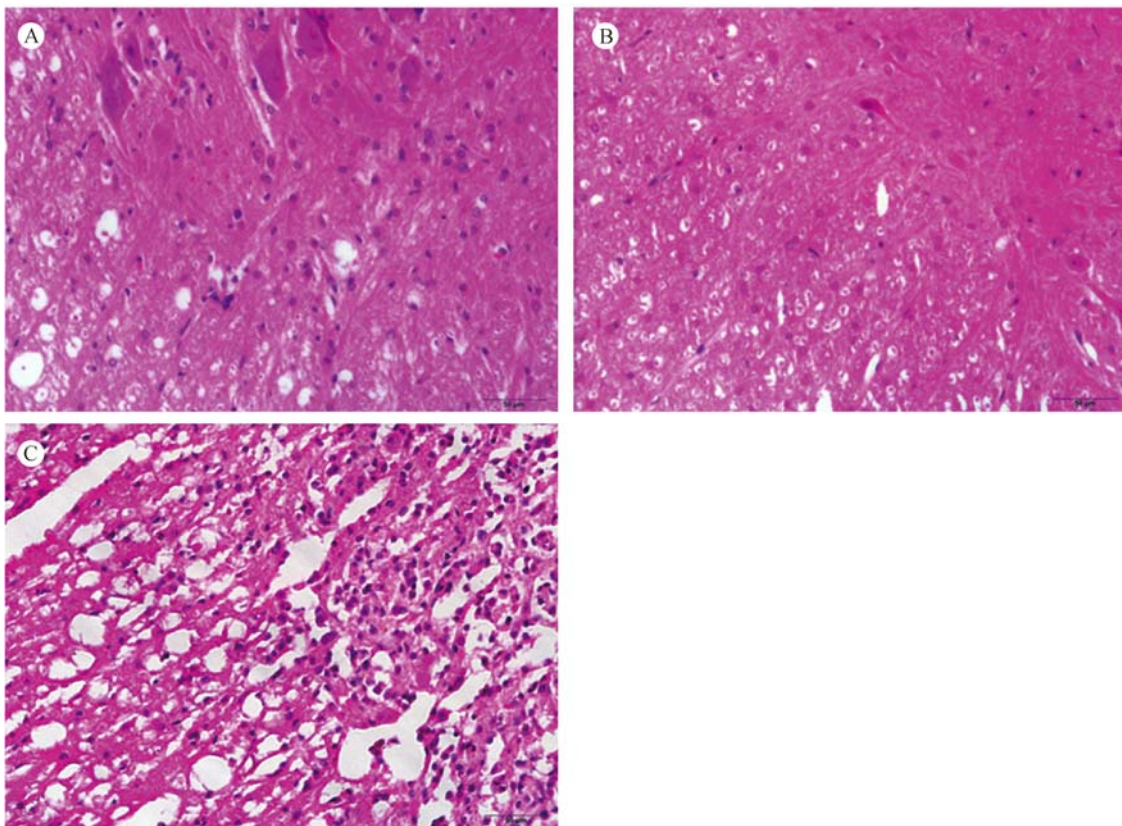


图 2 电针组(A),假手术组(B),模型组(C),脊髓腹角形态学观察(标尺 = 50 μm)

Fig. 2 Pathological changes in the anterior horn of spinal cord in the rats of the electroacupuncture group (A), sham operation group (B), and model group (C). HE staining, bar = 50 μm .

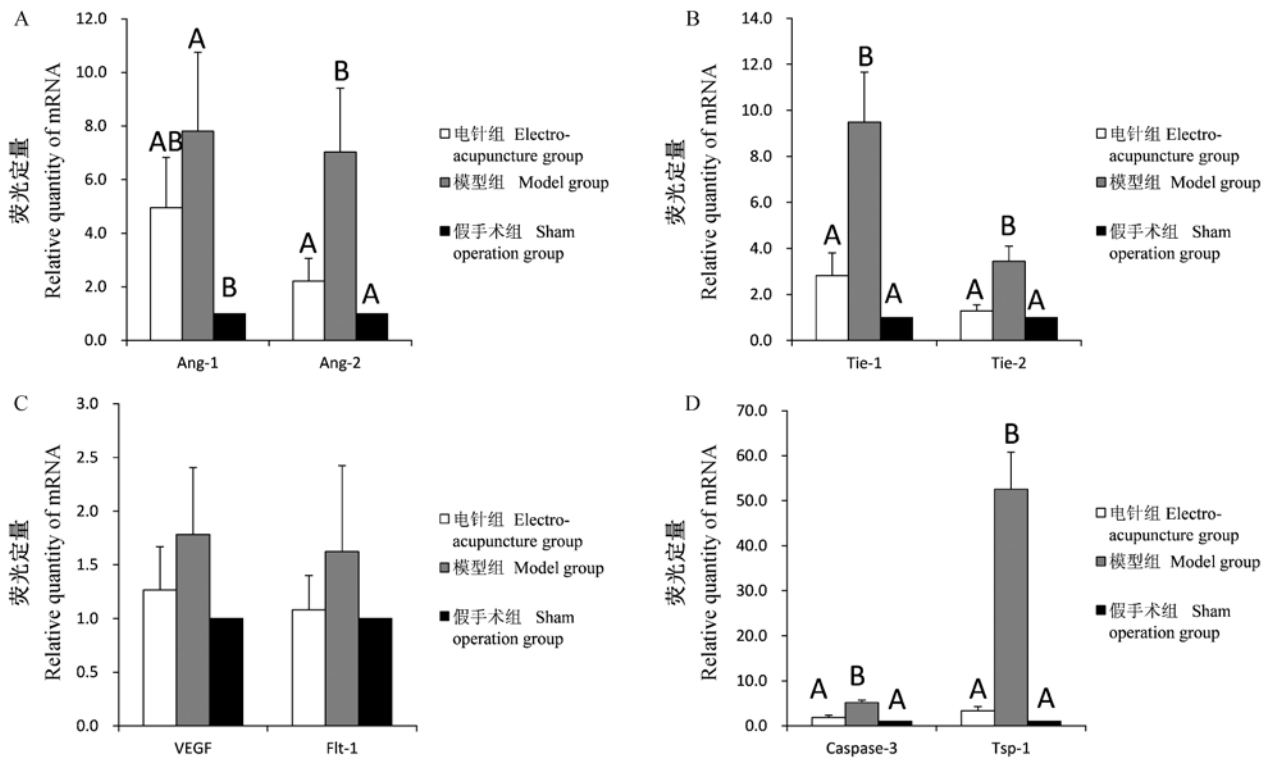


图3 电针对血管生成相关因子 mRNA 表达的影响

Fig. 3 Effects of electroacupuncture on the changes of mRNA expressions of angiogenesis-related factors

3 讨论

脊髓血管能为脊髓组织运送营养物质,同时移除组织代谢产物,对受损脊髓组织的修复意义重大。而血管结构的稳定与血管生成因子和血管生成抑制因子与细胞凋亡因子关系密切^[8]。

脊髓组织受到打击、压迫等损伤后,受损部位出血、水肿、缺氧,局部组织稳态受到破坏,导致大量钙离子内流,自由基大量产生,单胺类物质大量释放,致使血管收缩,脊髓微血管灌注量显著下降,进一步加剧组织缺血缺氧的状态^[9]。在低氧环境下机体过量表达的缺氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α) 与 VEGF 基因转录启动子的结合位点结合,促进 VEGF 的表达^[10]。VEGF 能促进血管内皮细胞的增殖和迁移,促进血管的新生。新生血管由于缺少血管周细胞和基质细胞,结构稳定性差,渗透性增强,加剧组织出血与水肿,造成脊髓组织二次损伤^[11]。在本次试验中,模型组 VEGF 和 Flt-1 的表达量有所上调,但与电针组和假手术组相比无统计学意义。

Tie-1、Tie-2 是一类酪氨酸受体,Tie-1 能维持血管内皮细胞结构及功能的完整性,促进新生血管的

成熟,其配体目前仍不十分清楚;Tie-2 的配体为 Ang-1 和 Ang-2^[12]。Ang-1 和 Ang-2 能竞争性与 Tie-2 结合并与 VEGF 协同作用,参与血管新生,并且在维持新生血管的稳定性中发挥重要作用。Ang-1 与 Tie-2 结合时表现为维持血管结构正常;Ang-2 与 Tie-2 结合表现为打破血管的正常结构,当在 VEGF 高度表达的环境下,Ang-2 与 Tie-2 结合有利于内皮细胞迁移,促进血管新生,反之则表现为血管的退变^[13]。本研究结果中,模型组的 Ang-2 与 Tie-2 的 mRNA 表达都显著上调,VEGF 的 mRNA 表达虽有上调,但与电针组和假手术组相比无显著差异,提示模型组存在 VEGF 低表达环境引起血管退变的因素。在 VEGF 低表达环境中 Ang-2 与 Tie-2 的结合表现为血管退变,而在模型组 Ang-2 与 Tie-2 的表达显著高于电针组 ($P < 0.01$),提示电针能够减少 Ang-2 与 Tie-2 的结合,从而有利于维持血管的正常结构。另外,电针组与假手术组的 Ang-1、Ang-2、Tie-1、Tie-2 均无显著差异,提示电针能够调节 Ang-1、Ang-2、Tie-2、VEGF 之间的平衡使之接近正常机体水平,维持受损脊髓的血管生成相关因子的相对稳定。本课题组前期研究表明,电针能显著提高压迫部位脊髓血流灌注量,促进神经机能的恢复^[4]。

本研究观察到电针下调 VEGF、Ang-1、Ang-2、Tie-2 的表达,这可能与电针增加压迫部位脊髓血流灌注量,缓解局部缺氧环境,减轻血管新生造成的二次损伤等相关^[11]。

Tsp-1 作为强效血管生成的负性调节因子之一,能与血管内皮细胞上的 CD36 受体作用,影响血管内皮细胞释放 VEGF,抑制血管内增殖、分化和迁移,从而抑制血管的生成;并能诱导血管内皮的凋亡,破坏血管结构的稳定^[14]。Caspase-3 处于凋亡有序级联反应的下游,是多种凋亡刺激信号传递的汇聚点,它的活化是凋亡进入不可逆阶段标志。TSP-1 能与细胞膜上的 CD47 受体结合,上调 Caspase-3 的表达^[15],诱导细胞凋亡。本研究结果显示模型组 Tsp-1 和 Caspase-3 的表达显著上调,而电针能极显著降低 TSP-1、Caspase-3 的 mRNA 表达,提示电针能够抑制血管生成负性调节因子的表达,从而为血管的生成和稳定提供有利环境。万赛英等^[16]研究也表明电针可以上调 Ang-1 及下调 TSP-1 的表达,促进脑缺血区的血管的重建。余晓慧^[17]等研究表明电针能通过抑制 Caspase-3 在大鼠脊髓损伤神经元中表达,抑制神经细胞凋亡,减轻了脊髓继发性损伤,促进神经功能恢复。

脊髓压迫损伤后血管生成相关因子 mRNA 表达异常,电针能够下调 Ang-2、Tie-2、Tsp-1 和 Caspase-3 的表达,从而使血管生成促进因子和抑制因子趋于正常水平,为受损脊髓组织修复提供有利条件。

参 考 文 献

- [1] 王雪乔,饶宇腾,吴伟澎,等. 犬椎间盘脱出模型的建立及其脊髓微循环与组织学变化观察 [J]. 中国比较医学杂志, 2014, 24(6): 22-26.
- [2] 卢知松. 电针对椎间盘脱出大鼠模型脊髓血流量及形态学影响的研究 [D]. 北京:北京农学院,2012.
- [3] Winkler EA, Sengillo JD. Blood-spinal cord barrier pericyte reductions contribute to increased capillary permeability [J]. J Cerebr Blood Flow Metab, 2012, 32(10): 1841-1852.
- [4] 卢知松,陈益山,姜代勋,等. 椎间盘脱出大鼠模型的脊髓血流量变化及电针效应 [J]. 中国实验动物学报,2011, 19(5): 381-386.
- [5] Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats [J]. J Neurotrauma,1995, 12(1) : 1-21.
- [6] Io H, Hamada C, Ro Y, et al. Morphologic changes of peritoneum and expression of VEGF in encapsulated peritoneal sclerosis rat models [J]. Kidney Int. 2004, 65(5): 1927-1936.
- [7] 闫凤霞,高维娟,钱涛,等. 黄芪注射液对缺氧缺糖/复氧复糖大鼠海马神经元 caspase-3 表达的影响 [J]. 中国药理学通报, 2010, 26(7): 898-903.
- [8] Zea Longa EL, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91.
- [9] 黄辉,余化霖. 继发性脊髓损伤发病机制的研究进展 [J]. 医学综述, 2013, 19(7): 1162-1165.
- [10] Pugh CW, Ratcliffe PJ. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system [J]. Nat Med, 2003, 9(6): 677-684.
- [11] Oudega M. Spinal cord injury and repair: role of blood vessel loss and endogenous angiogenesis [J]. Adv Wound Care, 2010, 1: 335-340.
- [12] Hara M, Nakamura M, Shirkawa Y, et al. Delayed cyst formation after radiosurgery for cerebral arteriovenous malformations: two case reports [J]. Minim Invasive Neurosurg,1998, 41(1): 40-45.
- [13] Suri C. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie-1 and Tie-2 that disrupts in vivo angiogenesis [J]. Science, 2003, 245: 45-50.
- [14] Vailhe, Feige. Thrombospondins as anti-angiogenic therapeutic agents [J]. Curr Pharm Des, 2003. 9(7): 583-588.
- [15] Chung J, Wang XQ, Lindberg FP, et al. Thrombospondin-1 acts via IAP/CD47 to synergize with collagen in alpha2beta1-mediated platelet activation [J]. Blood, 1999, 94(2): 642-648.
- [16] 万赛英,谭峰,吴海科,等. 电针干预高血压大鼠脑缺血 Ang 1、TSP-1 的表达及细胞超微结构的研究 [J]. 中华中医药学刊, 2010, 12(28): 2544-2547.
- [17] 余晓慧. 电针对局灶性脑缺血大鼠 Caspase-3 蛋白表达的影响 [J]. 辽宁中医学院学报, 2005, 7(2): 167.

[收稿日期] 2015-01-08