

本文引用:唐 学,肖靛宜,吴清明,钟茜云,陈 翼,何可旺,胡晓妹,伍果美.电针颈夹脊穴对颈型颈椎病模型兔椎间盘软骨细胞 MMP-3、TGF- β 1 的影响[J].湖南中医药大学学报,2017,37(6):674-678.

电针颈夹脊穴对颈型颈椎病模型兔椎间盘软骨细胞 MMP-3、TGF- β 1 的影响

唐 学¹,肖靛宜²,吴清明^{2*},钟茜云¹,陈 翼¹,何可旺¹,胡晓妹¹,伍果美¹

(1.湖南中医药大学,湖南 长沙 410208; 2. 湖南中医药大学第二附属医院, 湖南 长沙 410007)

〔摘要〕目的 采用 ELISA 法观察电针颈型颈椎病(CS)模型兔对其椎间盘软骨中基质金属蛋白酶-3(MMP-3)、转化生长因子- β 1(TGF- β 1)含量的影响,从而探讨电针治疗颈型 CS 可能的作用机制。方法 将 18 只新西兰纯种兔按随机数字表法随机分为空白组、模型组、治疗组,每组 6 只,除空白组外其余两组采用复合病因造模法造模,连续 10 周。造模成功后,治疗组予电针治疗,其他两组正常饲养,连续 4 周。耳缘静脉注射空气栓塞处死各组动物,取 C₄₋₇ 椎间盘组织,分离出软骨终板,采用 ELISA 法观察椎间盘软骨中 MMP-3、TGF- β 1 的含量。结果 与空白组比较,模型组兔椎间盘软骨细胞中 MMP-3、TGF- β 1 含量均升高,差异具有显著统计学意义 ($P<0.01$)。与模型组比较,治疗组兔椎间盘软骨细胞中 MMP-3 含量降低,TGF- β 1 含量升高,差异具有显著统计学意义($P<0.01$)。结论 电针颈型 CS 模型兔颈夹脊穴可以降低其椎间盘软骨细胞中 MMP-3 含量,抑制其对软骨细胞外基质(ECM)的降解,维持血窦-软骨终板界面弥散营养物质的能力,延缓或阻止椎间盘退变的发生;同时可以升高 TGF- β 1 含量,促进 ECM 的合成,对椎间盘进行修复,维持椎间盘软骨终板的正常形态结构,减轻早期椎间盘退变的程度。

〔关键词〕 电针;颈夹脊穴;颈型颈椎病;软骨细胞外基质;基质金属蛋白酶 3;转化生长因子- β 1

〔中图分类号〕 R245.97

〔文献标识码〕 A

〔文章编号〕 doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2017.06.026

Effects of Electro-acupuncture at Cervical Jiaji Points on MMP-3 and TGF- β 1 in Intervertebral Disc Chondrocytes of Cervical Spondylotic Model Rabbits

TANG Xue¹, XIAO Liangyi², WU Qingming^{2*}, ZHONG Qianyun¹, CHEN Yi¹, HE Kewang¹, HU Xiaomei¹, WU Guomei¹

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. The Second Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China)

〔Abstract〕 Objective To observe the effect of electro-acupuncture on the expression of MMP-3 and TGF- β 1 in cervical intervertebral disc cartilage in cervical spondylotic (CS) model rabbits, and to explore the possible mechanism of EA treatment. **Methods** The eighteen New Zealand pure rabbits were randomly divided into blank group, model group and treatment group, six rabbits in each group. Except for the blank group, the other two groups were made by compound etiological modeling method for 10 weeks. After modeling successfully, the treatment group was given electro-acupuncture treatment, the other two groups were given normal feeding, for 4 weeks. The animals in each group were killed by air embolism complicating injection. The C4-7 intervertebral disc tissue was isolated and the cartilage endplate was isolated. The contents of MMP-3 and TGF- β 1 in intervertebral disc cartilage were detected by ELISA. **Results** Compared with the blank group, the contents of MMP-3 and TGF- β 1 in the intervertebral disc chondrocytes of the model group significantly increased ($P<0.01$). Compared with the model group, the content of MMP-3 and TGF- β 1 in the intervertebral disc chondrocytes of the treatment group significantly decreased ($P<0.01$). **Conclusion** Electro-acupuncture cervical cervicogenic model could decrease the content of MMP-3 in intervertebral disc chondrocytes and inhibit the degradation of ECM in chondrocytes, delay or prevent

〔收稿日期〕 2016-09-30

〔基金项目〕 湖南省高校创新平台开放基金资助项目(15K096)。

〔作者简介〕 唐 学,男,在读硕士研究生,研究方向:主要从事针灸推拿应用与机制研究工作。

〔通讯作者〕 * 吴清明,男,教授,硕士研究生导师,E-mail: qmwu6789@163.com。

the diffusion of nutrients in cartilage endplate interface. It also could increase the level of TGF- β 1, promote the synthesis of ECM, repair the intervertebral disc, maintain the normal form of cartilage endplate structure, reduce the extent of early disc degeneration.

[**Keywords**] electro-acupuncture; cervical Jiaji points; neck cervical spondylosis; cartilage extracellular matrix; matrix metalloproteinase-3; transforming growth factor- β 1

颈椎病(cervical spondylosis,CS)又称颈椎综合征,是指由于颈椎间盘退行性变、颈椎骨质增生以及颈部损伤等原因引起脊柱内外平衡失调,刺激或压迫颈部脊髓、神经根、椎动脉或交感神经,而引起一系列症状的临床综合征^[1]。该病常伴有头晕头痛、肢体无力、麻木和疼痛等症状,严重者可见双下肢痉挛、行走困难,甚至四肢麻痹,大小便障碍,出现瘫痪,严重影响患者的生活质量。其中,颈型颈椎病亦称局部型颈椎病,具有头、肩、颈、臂的疼痛及相应的压痛点,颈肩部活动轻度受限,X线片上没有椎间隙狭窄等明显的退行性改变,但可以有颈椎生理曲线的改变,椎体间不稳定及轻度骨质增生等变化。此型在临床上极为常见,实际上是颈椎病的最初阶段,是最早期的颈椎病。据流行病学调查统计^[2],中国颈椎病患者的发病率约为3.8%~17.6%,全国约有5 000万到15 000万人患有此病,且每年新增颈椎病患者大约100万人。目前颈型颈椎病的西医治疗主要是保守疗法,包括牵引、理疗和口服消炎镇痛药物等方法,但疗效有限,不能从根本上治疗颈椎病,并且长期口服药物副作用较大。近年有关研究表明:电针治疗颈型颈椎病具有多途径良性调节、早期起效迅速、远期疗效稳定、总有效率高等优势。通过查找历年相关文献资料,探讨电针颈型CS模型兔对其椎间盘软骨中基质金属蛋白酶-3(matrix metalloproteinases-3,MMP-3)、转化生长因子- β 1(transforming growth factor- β 1,TGF- β 1)含量的影响,探究二者对维持椎间盘软骨细胞处于合成与分解代谢的动态平衡状态,稳定成熟软骨细胞外基质(extracellular matrix,ECM)的结构和功能,改善椎间盘营养障碍,治疗颈型CS可能的作用机制。这将为临床合理应用电针治疗本病提供重要的理论依据。

1 材料与仪器

1.1 实验动物

湖南中医药大学动物实验中心提供的健康普通级新西兰纯种兔18只(动物合格证号:SCXK(湘)

2015-0004),每只日龄70 d,体质量1.5~2.0 kg,雌雄各半。饲养环境:每只分笼圈养于动物中心实验室,自然采光,温度20~25℃,相对湿度50%~70%。

1.2 实验仪器

无菌针灸针(安迪牌,0.25 mm×40 mm);电针仪(华佗牌,SDZ-II型);ELISA试剂盒(TGF- β 1:L16032263548T;MMP-3:L16031842448T);台式冷冻离心机(湘仪,TGL-16);酶标仪(汇松,MB-530);全自动酶标洗板机(汇松,PW-812);恒温振荡器(强乐,THZ-C);自制低头位兔子固定架。

2 方法

2.1 穴位定位

参照新世纪全国高等中医院校规划教材《实验针灸学》及中国针灸学会实验针灸分会制定的《动物针灸穴位图谱》量取。选穴:颈4~7夹脊穴,即第4至第7颈椎棘突下旁开0.5 cm。

2.2 动物造模

将18只新西兰纯种兔按随机数字表法随机分为空白组、模型组、治疗组,每组6只,除空白组外其余两组采用复合病因造模法(低头位固定+风寒湿刺激)造模^[3],将模型组、治疗组各6只新西兰纯种兔置于自制改良后的简易兔盒中,剃去颈部毛发,敷以自制保湿冰袋,调节保湿冰袋松紧并将其下端扣住兔盒,使兔的颈部成低头屈曲位60°,将吹风机出风口对准兔颈部,风力5档。每次造模时间为2 h,每天上午与下午各造模1次,共4 h,持续10周。

2.3 干预方法

治疗组兔颈后部剃毛后取穴定位,皮肤常规消毒后,直刺0.5~0.8 cm,进针后不施以手法刺激,连接华佗牌SDZ-II型电针仪,正极连接双侧颈4夹脊穴,负极连接双侧颈7夹脊穴,予疏密波,频率2~100 Hz,电压2~4 V,强度至肌肉轻微抖动,留针30 min,每天1次,2周为1疗程,间隔1 d进行下1疗程,共2个疗程。模型组与空白组均不予治疗处理。三组兔均正常饲养。

2.4 标本的采集及处理

耳缘静脉注射 20 mL 空气栓塞处死动物,迅速切开项后正中皮肤,分离肌肉,取下整个颈段脊椎,沿上下椎骨缘分别取出 C_{4/5}、C_{5/6}、C_{6/7} 椎间盘组织,分离出软骨终板,用生理盐水反复冲洗干净,存于-80℃超低温冰箱备用。

2.5 观察指标及方法

2.5.1 颈后肌肉硬度 造模结束后,仔细观察三组兔颈后肌肉硬度变化。

2.5.2 影像学观察 造模结束后,三组兔均行颈部正位片,进行影像学观察。

2.5.3 组织形态学观察 将软骨终板组织放入 4% 多聚甲醛中固定 48 h,5% 硝酸中脱钙,常规处理后,石蜡包埋切片,5 μm 厚,HE 染色,光镜下观察软骨细胞形态结构。

2.5.4 细胞因子测定 颈型 CS 模型兔椎间盘软骨细胞相关细胞因子的测定:将软骨终板组织称质量,超声波粉碎。加入 PBS 研磨制成匀浆,3 500 r/min 离心 10 min,取上清液 500 μL,浓度为 0.01 mol/L。采用 ELISA 法测定 MMP-3、TGF-β1 的含量。

2.6 统计学方法

采用 SPSS 20.0 软件进行处理,均以 $P<0.05$ 为有统计学意义。计量资料用“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,均进行正态性和方差齐性检验。满足正态性者,多组计量资料采用单因素方差分析,方差齐时选择 LSD 法,方差不齐时选择 Dunnett's T_3 法;不满足正态性者,选择秩和检验。

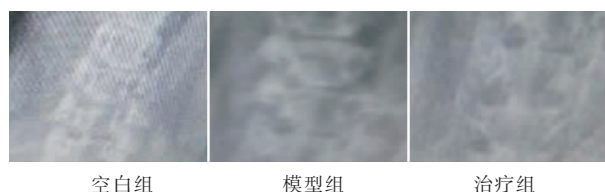
3 结果

3.1 兔颈后肌肉硬度变化

空白组兔颈后肌肉柔软有弹性,未触及明显紧张感。模型组、治疗组兔在造模过程中,颈后肌肉逐渐变得痉挛、僵硬,拨动部分家兔颈后肌时,指下犹如拨琴弦感;造模结束时,模型组、治疗组兔颈后肌肉明显,呈条索状肌痉挛。

3.2 影像学观察

造模结束后,三组兔均行颈部正位片,空白组兔颈椎正常生理曲度存在,椎体排列整齐,边缘光滑完整,颈椎各椎体间隙相等。模型组、治疗组兔子颈椎生理曲度改变,椎体排列不规整,椎体间隙降低,椎体边缘有轻度骨质增生。详见图 1。

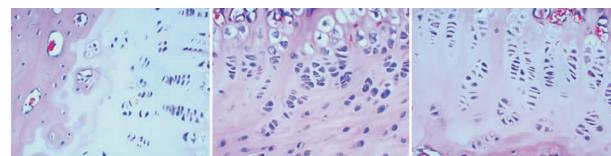


空白组 模型组 治疗组

图 1 各组兔颈部正位片

3.3 光镜下观察软骨细胞形态结构

经 14 周不同处理后取材行 HE 染色,空白组可见大量呈椭圆形的正常软骨细胞结构,核膜完整,核染色质均匀分布,线粒体无肿胀,空泡变性细胞少见,软骨陷窝存在,胶原纤维排列紧密整齐。模型组可见大量空泡变性软骨细胞,大量固缩软骨细胞,甚至溶解消失;胶原纤维排列极不规整,甚为松散,并且部分胶原纤维溶解。治疗组大部分软骨细胞基本显示正常结构,软骨陷窝存在,有少量软骨细胞变性;胶原纤维排列基本规整,有少量胶原纤维排列紊乱、松散,未见胶原纤维溶解。详见图 2。



空白组 模型组 治疗组

图 2 光镜下软骨细胞形态结构观察(HE,×400)

3.4 各组兔椎间盘软骨细胞中 MMP-3、TGF-β1 的含量

与空白组比较,模型组兔椎间盘软骨细胞中 MMP-3、TGF-β1 含量均升高,差异有显著统计学意义($P<0.01$),说明造模处理后兔椎间盘发生椎间盘退变,造模成功。与模型组比较,治疗组兔椎间盘软骨细胞中 MMP-3 含量降低,TGF-β1 含量升高,差异有显著统计学意义($P<0.01$),说明电针治疗能降低兔椎间盘软骨细胞中 MMP-3 含量,升高兔椎间盘软骨细胞中 TGF-β1 含量。见表 1。

表 1 各组兔椎间盘软骨细胞中 MMP-3、TGF-β1 含量的比较 (n=6, $\bar{x}\pm s$, μg/μL)

组别	MMP-3	TGF-β1
空白组	7.53±0.58	7.27±0.99
模型组	17.49±1.07 ^{▲▲}	9.46±1.60 ^{▲▲}
治疗组	3.14±0.45 ^{★★}	21.20±0.47 ^{★★}

注:与空白组比较,▲▲ $P<0.01$;与模型组比较,★★ $P<0.01$ 。

4 讨论

现在公认对颈椎病及其所有临床表现发生起根

本作用的主要因素是颈椎间盘的退变。有研究发现细胞凋亡与细胞增殖之间的不平衡参与了骨性关节炎等退行性疾病的发生发展。尽管细胞凋亡与椎间盘退变的关系近年来逐渐受到重视,但椎间盘细胞凋亡的信号转导途径仍不明了,而且对细胞增殖与椎间盘退变的关系则关注很少。

正常椎间盘由纤维环、髓核和软骨终板构成。来自毛细血管的营养成分在到达椎间盘前必须通过一层致密的软骨终板。软骨终板直接与椎体骨髓血窦接触,椎间盘营养物质转运主要通过血窦-软骨终板界面进行,因此,软骨终板途径是椎间盘主要的营养途径^[4]。一般情况下,椎间盘软骨细胞处于合成代谢与分解代谢的动态平衡之中,这种平衡状态在维持成熟软骨细胞外基质(extracellular matrix, ECM)结构和功能中也起主要作用。一旦平衡被破坏,将造成椎间盘营养障碍,出现椎间盘退变^[5]。

基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)是基质降解酶类中最重要的一种,主要参与细胞外基质的代谢,几乎能降解ECM的所有成分。MMPs可引起椎间盘基质中蛋白多糖聚合体降解,蛋白多糖含量下降,组成成分(硫酸软骨素/硫酸角质素比值下降)发生明显改变,造成髓核失水而丧失其固有的弹性,可直接导致椎间盘生物力学功能的减退和丧失,从而加速椎间盘退变^[6]。MMP-3是重要的基质金属蛋白酶之一,属于基质降解酶,是椎间盘软骨细胞降解的关键酶,也是降解退变的椎间盘基质的主要酶类。而随着椎间盘退变的发生及发展,MMP-3在退变的椎间盘中的表达明显异常^[7]。经研究证实,MMP-3与基质退变之间存在密切关系,退变的椎间盘组织产生的MMP-3比正常椎间盘组织要高^[8-12]。如果能够有效抑制MMP-3的合成及活性,则可能降低对软骨细胞ECM的降解,维持血窦-软骨终板界面弥散营养物质的能力,延缓或阻止椎间盘退变的发生^[13]。

软骨终板的主要成分是蛋白多糖和胶原,而TGF- β 1是蛋白多糖及胶原代谢等椎间盘ECM的重要调节物质之一,在椎间盘退变的病理过程及基因治疗中发挥重要作用。蛋白多糖能调节基质胶原间的有效孔径,控制带电溶质在椎间盘中的分布和转运,对保持椎间盘组织和外界环境间的物质交换及防止终板自身的钙化都具有重要的作用^[14]。胶原

成分具有抗压、均匀传递应力能力,发挥缓冲、吸收应力的能力,是构成软骨基质的支架结构,其质和量的改变必然引起软骨终板承载能力的降低和增加损伤的机会^[15]。研究表明,在退变的椎间盘中TGF- β 1受体的活性明显高于正常者,且TGF- β 1含量与椎间盘退变程度成正相关^[16];在椎间盘退变早期,TGF- β 1通过促进ECM的合成,对椎间盘进行修复,维持椎间盘软骨终板的正常形态结构,减轻早期椎间盘退变的程度^[17-18]。

祖国医学虽无“颈椎病”的病名,但根据其临床表现特点,多归属于“痹症”“项痹”“项强”“颈筋急”“项背强”“风伤项急”等范畴。《素问·本脏》云“是故血和则经脉流行,营复阴阳,筋骨强劲,关节清利矣”,说明了中医治疗颈椎病的关键在于调节阴阳气血、强筋骨、利关节为法。对于颈椎病的针灸治疗,历代都有详细的论述,所取经脉多为足太阳经、手少阳经、督脉,较之传统的选经取穴方法,现代临床治疗颈椎病多根据不同的病变部位选取相应节段颈夹脊穴,结合“经络所过,主治所及”的理论以及腧穴的主治特性进行选穴。颈夹脊穴位于后颈部,既是本病的病位所在,又是督脉与足太阳膀胱经经气外延重叠覆盖之处,采用电针法处理颈夹脊穴可结合毫针与电生理效应的双重作用,起到联络沟通二脉、调节局部气血运行、疏理项部经筋肌肉等作用,从而达到治疗颈型颈椎病的目的。

本实验中采用ELISA法观察电针颈型CS模型兔对其椎间盘软骨中MMP-3、TGF- β 1含量的影响,从而探讨电针治疗颈型CS可能的作用机制。结果显示:颈型CS模型兔椎间盘软骨外基质中MMP-3含量升高,破坏软骨细胞合成代谢与分解代谢的动态平衡,使其难以维持成熟软骨细胞外基质的结构和功能,造成椎间盘营养障碍,导致椎间盘的退变。另一方面,颈型CS模型兔椎间盘中TGF- β 1含量升高,促进ECM的合成,对退变的椎间盘进行修复,减轻早期椎间盘退变的程度。电针颈型CS模型兔颈夹脊穴可以降低其椎间盘软骨细胞中MMP-3含量,抑制其对软骨细胞ECM的降解,维持血窦-软骨终板界面弥散营养物质的能力,延缓或阻止椎间盘退变的发生;同时可以升高TGF- β 1含量,促进ECM的合成,对退变的椎间盘进行修复,维持椎间盘软骨终板的正常形态结构,减轻早期椎间盘退变

的程度。本实验仅作为动物实验,观察例数偏少,只选定了颈型CS这一简单类型,所以关于电针颈夹脊穴对颈型CS的其他神经体液、化学物质和调节机制的作用,有待将来进一步实验研究。

参考文献:

- [1] 贾连顺.颈椎病的现代概念[J].脊柱外科杂志,2004,2(2):123-126.
- [2] 朱立国,于杰.关于神经根型颈椎病的临床治疗述评[J].医学信息,2009,22(1):3-5.
- [3] 张欣,李殿宁,李开平,等.无创兔颈型颈椎病动物模型的建立[J].中华中医药学刊,2015,33(4):913-915.
- [4] 黄宗强,刘尚礼,郑召民.椎间失稳诱发椎间盘退变的病理学观察[J].中国矫形外科杂志,2007,15(5):376-379.
- [5] Dudli S, Haschtmann D, Ferguson SJ. Fracture of the vertebral end-plates, but not equienergetic impact load, promotes disc degeneration invitro[J]. J Orthop Res, 2012, 5: 809-816.
- [6] 陈德胜,金群华.基质金属蛋白酶及其抑制剂与椎间盘源性下腰痛的关系[J].脊柱外科杂志,2005,3(2):121-123.
- [7] 陈德胜,金群华,李燕,等.MMPs抑制剂对退变椎间盘中MMP-3表达的影响[J].中国康复理论与实践,2006,12(8):692-693.
- [8] Soblajima S, Shimer AL, Chadderdon RC, et al. Quantitative analysis of gene expression in a rabbit model of intervertebral disc degeneration by realtime polymerase chain reaction[J]. Spine J, 2005, 5(1):14-23.
- [9] Kato T, Haro Komon HL, et al Sequential dynamics of inflammatory cytokine, angiogenesis inducing factor and matrix degrading enzymes during spontaneous resorption of the herniated disc [J]. J Orthop Res, 2004, 22(4): 895-900.
- [10] 曾佳兴,梁斌,尹东,等.MMP-3、IgG和CD68在青少年与中老年突出腰椎间盘突出组织中的表达分析[J].中国脊柱脊髓杂志,2013,23(12):1109-1114.
- [11] Bachmeier BE, Nerlich A, Mittermaier N, et al. Matrix metal-loproteinase expression levels suggest distinct enzyme roles during lumbar disc herniation and degeneration [J]. Eur Spine, 2009, 18(11):1573-1586.
- [12] 刘斌,戎利民,曾春,等.椎间失稳致兔腰椎软骨终板退变的形态学研究[J].中国临床解剖学杂志,2009,27(4):440-443.
- [13] 张昭,霍洪军,杨学军,等.兔椎间失稳软骨终板II型胶原变化的相关实验研究[J].中国误诊学杂志,2008,8(25):6054-6056.
- [14] Ireland D. Molecular mechanisms involved in intervertebral disc degeneration and Potential new treatment strategies[J]. Bioscience Horizons, 2009, 2(1):83-89.
- [15] 汪妍霞,王瑞琳,熊光宜,等.退变椎间盘中新生血管与TGF- β 1表达的关系及其临床意义[J].临床与实验病理学杂志,2012,28(9):983-986.
- [16] 戴启宇,杨廷桐,于芳芳,等.退行性变椎间盘组织转化生长因子 β 1基因的表达[J].中国组织工程研究,2013,17(24):4495-4501.
- [17] Singh KM, Masuda KM, Thonar E, et al. Age-related changes in the Extracellular Matrix of nucleus pulposus and annulus fibrosus of human intervertebral disc [J]. J SPine, 2009, 1(34): 10-16.
- [18] Cui D, Zhang S, Ma J, et al. Short interfering RNA targeting NF- κ B induces apoptosis of hepatic stellate cells and attenuates extracellular matrix production [J]. Dig Liver Dis, 2010, 42(11):813-817.

(本文编辑 匡静之)