

## · 基础研究 ·

夹脊电针对腰椎间盘突出性病变兔模型  
椎间盘髓核蛋白聚糖表达的影响邹 璟<sup>1</sup> 姜梦雅<sup>1</sup> 李 解<sup>2</sup> 黄国付<sup>3</sup>

**摘要 目的** 观察夹脊电针对腰椎间盘突出性病变(LDD)兔模型椎间盘髓核蛋白聚糖表达的影响。  
**方法** 40 只新西兰兔随机分为正常组、假手术组、模型组和治疗组,组内分为 28 d、56 d 两个取材时间点作为亚组,每个亚组 5 只。轴向压力诱导 LDD 后行 L4、L5 夹脊穴电针干预 28 d,各组于 28 d、56 d 取椎间盘组织,Western Blot 法检测二聚糖(BGN)及核心蛋白多糖(DCN)蛋白表达。**结果** 与正常组同期比较,假手术组各时间点 BGN 及 DCN 蛋白表达差异无统计学意义( $P > 0.05$ );模型组 28 d、56 d BGN 及 DCN 蛋白表达降低( $P < 0.05$ )。与模型组同期比较,电针组 56 d BGN 及 DCN 蛋白表达升高( $P < 0.05$ )。**结论** 夹脊电针可以通过上调退变椎间盘髓核组织中蛋白聚糖的表达防治 LDD。

**关键词** 电针;夹脊穴;椎间盘退行性病变;二聚糖;核心蛋白多糖

Effect of Electroacupuncture at Jiaji Points (EX-B2) on Nucleus Proteoglycan Expression In Rabbits Model with Lumbar Disc Degeneration ZOU Jing<sup>1</sup>, JIANG Meng-ya<sup>1</sup>, LI Jie<sup>2</sup>, and HUANG Guo-fu<sup>3</sup>  
1 Department of Acupuncture, First Hospital of Wuhan, Wuhan (430000); 2 Department of Rehabilitation, Hubei Xinhua Hospital, Wuhan (430000); 3 Acupuncture Clinic of Wuchang Hospital, Wuhan (430000)

**ABSTRACT Objective** To study the effect of electroacupuncture (EA) at Jiaji points (EX-B2) on the nucleus proteoglycan in rabbits model with lumbar disc degeneration (LDD). **Methods** Totally 40 rabbits were randomly divided into the control, sham, model and EA group. Each group was divided into 2 subgroups ( $n = 5$ ). A loading device was used to induce the LDD model. EA intervention was applied for 28 days. Then tissues were harvested for Western Blot to detect the protein expression of biglycan(BGN) and decorin(DCN) at day 28 and 56. **Results** No significant change was found between the control and sham groups at any time point for the protein expression of BGN and DCN. Compared with the control group, protein expression of BGN and DCN were apparently decreased in the model group at day 28 and 56 ( $P < 0.05$ ). In EA group, protein expression of BGN and DCN were apparently higher than those in the model group at day 56 ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** EA at Jiaji points can up-regulate the nucleus proteoglycan which may explain the effectiveness of the EA intervention on LDD.

**KEYWORDS** electroacupuncture; Jiaji points (EX-B2); disc degeneration; biglycan; decorin

腰椎间盘突出性病变(lumbar disc degeneration, LDD)是指以椎间盘退变为病理基础的一类疾病,如腰椎间盘突出症、退行性腰椎病等,临床多发,且易复发,严重影响患者生活质量甚至导致劳动能力丧

失<sup>[1]</sup>。对 LDD 的防治研究,一直是国际相关研究领域的焦点。基质降解和合成代谢之间的失衡被认为是 LDD 的主要病理环节<sup>[2]</sup>,主要表现为髓核组织水分和营养的减少,蛋白聚糖是细胞外基质的主要成分,对于稳定髓核细胞功能、维持椎间盘的结构具有重要的意义。本实验研究电针夹脊穴对退变椎间盘组织蛋白聚糖表达的影响,探讨电针纠正基质代谢、防治 LDD 的作用机制。

基金项目:国家自然科学基金面上项目(No. 81173324)

作者单位:1. 武汉市第一医院针灸科(武汉 430000);2. 湖北省新华医院康复科(武汉 430000);3. 武汉市武昌医院针灸科(武汉 430000)

通讯作者:黄国付, Tel: 027-85332903, E-mail: hgfmkp@yahoo.com.cn

DOI: 10.7661/j.cjim.20171202.323

## 材料与方法

1 动物 清洁级健康成年雄性新西兰大白兔

40 只,月龄 5~6 月,体重 3.0~4.0 kg,由武汉大学实验动物中心提供,实验动物证许可证号:SCXK(鄂)2013-0002,由武汉市第一医院中心实验室在标准条件下(温度 23~27℃,相对湿度 60%,明暗交替)适应性饲养 3 周后开始实验,实验程序经武汉市第一医院实验动物伦理委员会审批(No. 2014018)。

2 主要仪器及试剂 Signa HDx 3.0T 磁共振器(美国 GE 公司);HANS 穴位神经刺激仪(HANS-200A,南京济生医疗科技公司);电钻(上海锐奇工具公司, JIZ-SH09-10C 6910JER);毫针(健卫仕牌针灸针,型号:P3215,直径 0.25 mm,长 40 mm);电泳仪(北京六一仪器厂, DYY-7C);Bglycan 一抗(北京博奥森生物, bs-7552R);Decorin 一抗(武汉博士德生物公司, BA0798);标记羊抗小鼠二抗(武汉博士德生物公司, BA1051), PMSF(ST506)、RIPA 裂解液(P0013B)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(P0010HRP)均购自北京碧云天生物技术公司。

3 造模、分组及干预方法 参照 Kroeber MW 等<sup>[3]</sup>造模方法,动物背部备皮,10%的水合氯醛(1 mL/kg)耳缘静脉注射麻醉后俯卧位固定,在相邻两椎体(L4、L5)的椎旁一侧做直切口,钝性分离椎旁肌肉,显露椎体后分别在相邻两椎体钻入一直径 1.5 mm 克氏针,并在每根克氏针两端安装一垂直的连接杆,两个连接杆之间装以自制的弹簧装置,施以 200 N 的压力持续加压 28 d。安装造模器后常规给予青霉素  $4 \times 10^6$  IU 肌肉注射预防感染,1 次/d,连续 5 d。MRI 检测判定造模成功。造模不成功予以剔除后补齐样本量,本次造模成功率 67.5%。所有动物进行编号,按随机数字表分为 4 组,每组 10 只,每组分为 2 个亚组,正常组:正常饲养;假手术组:只穿刺,不进行椎体间加压力;模型组:穿刺并进行轴向力诱导 LDD 模型,以上三组分别在第 28 d 及 56 d 时间点处死 5 只并取组织。电针组:穿刺并加压,第 28 d 处死 5 只,另外 5 只取下模型装置,电针治疗 28 d 后取组织。动物处死前行 MRI 检测,判断模型是否成功。

电针治疗参考实验动物穴位标准定位<sup>[4]</sup>,选取双侧 L4、L5 夹脊穴,直刺 0.5~0.8 cm,快速捻转至针下沉涩感后,接以 HANS 穴位神经刺激仪,刺激参数均为调频波(2/15 Hz,即频率在 2 Hz 与 15 Hz 之间交替,每种频率持续 3 s,以 6 s 为 1 个周期);其波宽在 2 Hz 时为 0.6 ms,15 Hz 时为 0.4 ms,刺激强度为 1~2 mA,每次每穴 20 min,每天 1 次。连续 6 d

为 1 个疗程,疗程间隔 1 d,共干预 4 个疗程。

#### 4 检测指标及方法

4.1 一般状态 术后及电针干预期间,观察实验动物一般状态及健康情况,包括精神、毛发、饮食、肢体活动功能及死亡率。

4.2 兔椎间盘磁共振检测 预期造模时间(28 d)到达后,拆除兔加压装置,拔出克氏针,采用磁共振器(3.0T),摄 T2 加权(矢状位)像,行 L4-5 椎间盘 MRI 平扫,行 T2 矢状位及轴位像,以判断模型是否成功。

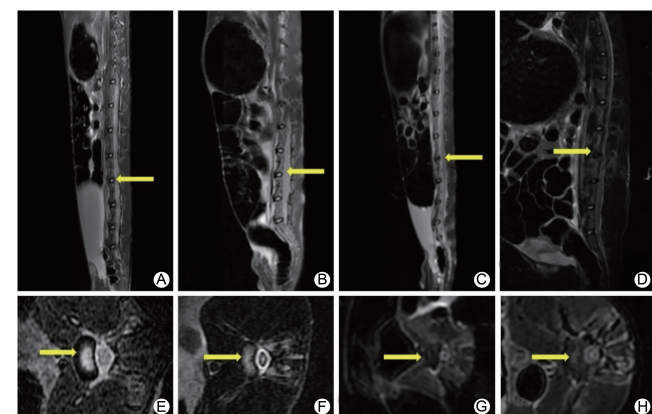
4.3 二聚糖(biglycan, BGN)和核心蛋白多糖(decorin, DCN)蛋白表达检测 行 MRI 检查后将动物处死,取出椎间盘组织,从正中矢状位将其分成两部分,一部分置 -70℃ 冰箱供蛋白表达分析,一部分其他分子生物学分析。Western Blot 法检测 BGN 和 DCN 蛋白表达。将新西兰兔椎间盘髓核组织加适量裂解液,匀浆后离心机中,所得样品采用经典的 BCA 法测定浓度,配制 10% 的 PAGE 胶电泳,待浓缩胶凝固后,将样品蛋白摇匀,依次上各组蛋白样品,待凝胶中的溴酚蓝离底部有 1 cm 处时停止电泳,根据胶的大小剪 PVDF 膜及滤纸, PVDF 膜用甲醇浸泡 3~5 s 后和滤纸一同浸泡于电转缓冲液中。然后用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 浸泡 PVDF 膜,室温摇床封闭 2 h。加入一抗孵育, TBST 充分洗涤 PVDF 膜 5~6 次,每次 5 min,用封闭液稀释相应的 HRP 标记二抗稀释,使 PVDF 膜浸泡于二抗孵育液中, ECL 化学发光,显影,定影。BandScan 分析胶片中 BGN 和 DCN 灰度值,计算各组目的蛋白和内参的比值,取其平均数后计算不同时间点 BGN 和 DCN 的相对表达量及变化趋势。

5 统计学方法 采用 SPSS 17.0 软件,结果以  $\bar{x} \pm s$  表示。组内比较采用单因素方差分析,组间比较采用 *t* 检验分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

1 各组动物一般状态比较 部分动物在建立模型后出现耳源静脉注射一侧耳廓部分缺失,造模后共 13 只实验动物出现下肢活动欠灵活。6 只动物在造模后 1 周内死亡,予以剔除后补齐。余各组动物在造模及电针干预期间整体发育良好,反应灵活,食欲正常,无肌肉萎缩,毛发颜色有光泽,无蓬乱及感染。

2 各组磁共振检测椎间盘髓核组织信号变化(图 1) 正常组椎间盘表现为均匀明亮的高信号,所示椎间盘与邻近节段的椎间盘信号无明显差异,模型组椎间盘表现为黑色,无信号强度,与正常椎间盘差异

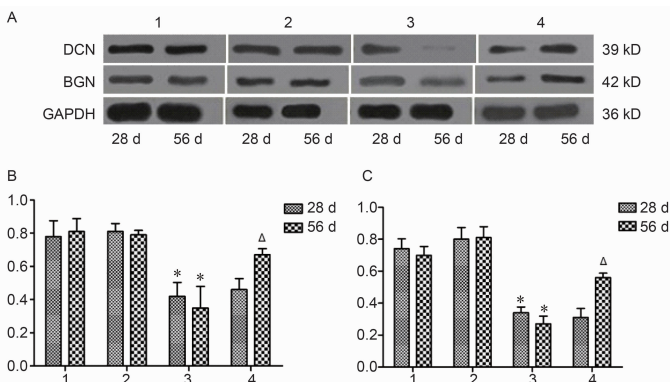


注:A 为正常组椎间盘 MRI 矢状位,髓核信号均匀而高量;B 为假手术组,与正常组无明显差异;C 为模型组,椎间盘无信号强度,表明髓核水分丢失,蛋白降解;D 为电针组治疗后,椎间盘信号与模型组相比有部分改善;E、F、G、H 为对应轴位像;箭头所指为椎间盘信号改变

图 1 各组 MRI 图

明显,电针组治疗后与模型组椎间盘信号无明显差异。

3 各组 BGN 及 DCN 蛋白表达比较(图 2) 与正常组同期比较,假手术组各时间点 BGN 及 DCN 蛋白表达差异无统计学意义( $P > 0.05$ );模型组 28 d 及 56 d BGN 及 DCN 蛋白表达降低( $P < 0.05$ )。与模型组同期比较,电针组 56 d BGN 及 DCN 蛋白表达升高( $P < 0.05$ )。



注:A 为蛋白印记结果;B 为 BGN 表达;C 为 DCN 表达;1 为正常组;2 为假手术组;3 为模型组;4 为电针组;与正常组同期比较, \*  $P < 0.05$ ;与模型组同期比较,  $\Delta P < 0.05$

图 2 各组 BGN 及 DCN 蛋白表达比较

## 讨 论

LDD 可随着年龄的增加而逐渐发生,纤维软骨逐渐替代髓核中黏液样胶原物质,并使髓核的形态随着改变,其中胶原 1、胶原 2、BGN、DCN、纤维调节素等基因表达下调<sup>[5-7]</sup>。蛋白聚糖包括 BGN 和 DCN,是

髓核细胞外基质的主要成分,也是椎间盘能有充足的营养供应的主要来源,通过核心蛋白的作用与 I、II 型胶原纤维的结合,导致胶原纤维形成的时间延迟或形成较细的纤维,从而可防止椎间盘等结缔组织的钙化,是椎间盘保持固有弹性、抵抗压力、吸收震荡的基础<sup>[8]</sup>。既往研究多集中于纤维环在 LDD 中的作用,忽视了髓核组织作为椎间盘主要营养来源的重要性,本研究从蛋白聚糖的角度探讨了电针预防 LDD 的机制。

髓核在承受压力的情况下使脊椎均匀地负荷,髓核具有可塑性,在压力下变为扁平状,使压力向各个方向传递。长期过度压力诱导和应力负荷是 LDD 形成的原因之一,压力诱导可导致细胞、细胞因子和细胞外基质相互影响而构成了难以自行逆转的恶性循环,早在 2002 年 Kroeber MW 等<sup>[3]</sup>报道了与压力诱发 LDD 原理类似的模型,其模型能够以周为时间单位,使压力装置作用于椎间盘,导致椎间盘发生明显的退变,符合人体自然退变的规律,并可方便地开展细胞和基因水平的相关研究。本研究参照该造模方法并加以改进,成功建立了 LDD 模型后,部分动物在出现一侧耳廓部分缺失,考虑为多次耳源静脉注射后引起局部结痂,造模后动物出现下肢活动欠灵活,考虑为 LDD 引起的下肢活动障碍,与本病临床表现相符。蛋白印记结果发现退变的椎间盘组织中 BGN 及 DCN 含量较正常椎间盘明显降低。正常组与假手术组二者表达无差异,说明未经压力诱导的椎间盘髓核中蛋白聚糖未出现降解。

目前临床上 LDD 性疾病的治疗如非手术治疗(非甾体类抗炎药、物理治疗及疼痛管理等)和手术治疗(如椎体融合、椎间盘置换及椎间盘内电热治疗等)多疗效欠佳<sup>[9,10]</sup>,且不能从根本上阻止 LDD 的发生和发展。本病归属于中医学的“腰痛”、“痹症”范畴,电针疗法一直备受青睐,其临床疗效已经得到了国际社会的关注和认可<sup>[11,12]</sup>。夹脊穴位于背腰部,与旁行的足太阳经和背部正中的督脉联系密切,《灵枢·经脉》曰:“膀胱足太阳之脉……其直者,从巅入络脑,挟脊抵腰中……其支者,从膊内左右别下贯脚,挟脊内。现代临床研究亦发现针刺夹脊穴,向脊柱方向透刺,可引起针感传导直达病所的效应,通过神经体液调节作用<sup>[13]</sup>,影响交感神经末梢释放化学介质,使病变受累的脊椎、关节、肌肉、韧带等组织结构以及神经血管邻近组织产生良性反应<sup>[14,15]</sup>,调整改善脊椎内外环境,使之趋于平衡。本课题组前期研究认为,电针夹脊穴对腰 LDD 性疾病具有良好的治疗作用,电针能降低

LDD 引起的免疫炎症反应<sup>[16-18]</sup>,本研究从 LDD 的始动因素出发,探讨了髓核中蛋白聚糖电针治疗前后的差异,结果发现电针夹脊穴干预 28 d 后可增加髓核中 BGN 和 DCN 蛋白表达,电针夹脊穴可以通过促进退变椎间盘髓核组织中蛋白聚糖的表达,纠正细胞外基质的合成与分解失衡,从而达到防治 LDD 的效果。

磁共振技术的引用是本研究的特色之处,可以敏感地发现髓核信号的变化,已经广泛运用于临床评价 LDD, Benneker LM 等<sup>[19]</sup>对 39 例患者行腰椎间盘突出 MRI 检查发现 T2 信号强度、椎间盘高度等影像学量化参数分别与水含量、蛋白多糖含量评分显著相关。本研究发现退变椎间盘髓核信号降低,水分丢失,蛋白聚糖加速降解。本研究将传统的针刺方法、夹脊穴理论与现代分子生物学技术、影像学相结合,从椎间盘髓核蛋白多糖的角度出发,探讨了蛋白聚糖参与电针保护 LDD 的机制,为临床治疗提供了科学的理论依据,研究的不足之处在于椎间盘组织中纤维环以及软骨终板的退变各有不同的特点,LDD 的网络信号机制错综复杂,具体的信号传导途径及相互作用还有待于进一步研究。

利益冲突:作者承若不存在利益冲突。

### 参 考 文 献

- [1] Chan LK, Leung VY, Tam V, et al. Decellularized bovine intervertebral disc as a natural scaffold for xenogenic cell studies [J]. *Acta Biomater*, 2013, 9(2): 5262-5272.
- [2] Saldin LT, Cramer MC, Velankar SS, et al. Extracellular matrix hydrogels from decellularized tissues: structure and function [J]. *Acta Biomater*, 2017, 49: 1-15.
- [3] Kroeber MW, Unglaub F, Wang H, et al. New *in vivo* animal model to create intervertebral disc degeneration and to investigate the effects of therapeutic strategies to stimulate disc regeneration [J]. *Spine*, 2002, 27(23): 2684-2690.
- [4] 华兴邦. 兔穴位图谱的研制 [J]. *实验动物与动物实验*, 1991, 3(1): 1.
- [5] Kang R, Li H, Ringgaard S, et al. Interference in the endplate nutritional pathway causes intervertebral disc degeneration in an immature porcine model [J]. *Int Orthop*, 2014, 38(5): 1011-1017.
- [6] Kepler CK, Ponnappan RK, Tannoury CA, et al. The molecular basis of intervertebral disc degeneration [J]. *Spine J*, 2013, 13(3): 318-330.
- [7] Gullbrand SE, Peterson J, Ahlborn J, et al. ISSLS prize winner: Dynamic loading induced convective transport enhances intervertebral disc nutrition [J]. *Spine*, 2015, 40(15): 1158-1164.
- [8] Hamilton T, Glass E, Drobatz K, et al. Severity of spinal cord dysfunction and pain associated with hydrated nucleus pulposus extrusion in dogs [J]. *Vet Comp Orthop Traumatol*, 2014, 27(4): 313-318.
- [9] Lazebnik M, Singh M, Glatt P, et al. Biomimetic method for combining the nucleus pulposus and annulus fibrosus for intervertebral disc tissue engineering [J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2011, 5(8): 179-187.
- [10] 陈红艳, 潘树和. 腰椎间盘突出症的中西医治疗近况 [J]. *河北医学*, 2010, 16(2): 240-241.
- [11] 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.
- [12] Li A, Kaptchuk TJ. The case of acupuncture for chronic low back pain: when efficacy and comparative effectiveness conflict [J]. *Spine*, 2011, 36(3): 181-182.
- [13] 宋书昌, 薄向红, 卢智, 等. 针刺夹脊穴联合刺络拔罐治疗腰椎间盘突出症的疗效观察 [J]. *针灸临床杂志*, 2013, 29(8): 21-23.
- [14] 张素杰. 电针夹脊穴结合中频理疗治疗腰椎间盘突出症 28 例 [J]. *河南中医*, 2015, 35(6): 1427-1429.
- [15] 李林, 陈博, 张明才, 等. 电针夹脊穴治疗腰椎间盘突出症性炎症期临床观察 [J]. *中华中医药学刊*, 2010, 28(11): 2263-2265.
- [16] Huang GF, Zou J, Shi J, et al. Electroacupuncture stimulates remodeling of extracellular matrix by inhibiting apoptosis in a rabbit model of disc degeneration [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015: 386012.
- [17] 邹璟, 黄国付, 张琦, 等. 夹脊电针对兔退变椎间盘组织中基质金属蛋白酶 13 和基质金属蛋白酶组织抑制因子 1 表达的影响 [J]. *针刺研究*, 2014, 39(3): 192-197.
- [18] 邹璟, 姜梦雅, 李解, 等. 细胞凋亡参与电针对退变椎间盘保护作用的研究 [J]. *时珍国医国药*, 2017, 28(9): 2271-2273.
- [19] Benneker LM, Heini PF, Anderson SE, et al. Correlation of radiographic and MRI parameters to morphological and biochemical assessment of intervertebral disc degeneration [J]. *Eur Spine J*, 2005, 14(1): 27-35.

(收稿: 2017-03-25 在线: 2017-12-30)

责任编辑: 赵芳芳