

电针治疗对钳夹型大鼠脊髓损伤后 BMP-2 的表达

李经辉¹⁾, 谢勇¹⁾, 刘禹¹⁾, 黄辉¹⁾, 吴海鹰²⁾, 余化霖¹⁾, 白鹏¹⁾
(1) 昆明医科大学第一附属医院神经外二科; 2) 急诊科, 云南昆明 650032)

[摘要] **目的** 探讨电针治疗大鼠脊髓损伤后局部脊髓 BMP-2 的表达变化, 为电针治疗脊髓损伤提供实验依据。 **方法** 将 36 只 SD 大鼠随机分成假手术组、脊髓损伤组、电针组, 动物模型采用医用脑动脉瘤临时夹钳夹的急性钳夹型大鼠脊髓损伤模型, 取术后 7 d、14 d、21 d、28 d 各组损伤局部脊髓组织, 提取蛋白经电泳成像与数据分析, 测定损伤后局部脊髓组织内的 BMP-2 的表达变化。 **结果** BMP-2 的表达在大鼠脊髓损伤后 7~14 d 出现明显增强, 高表达持续至 28 d 以后, 电针组 BMP-2 的表达低于脊髓损伤组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 随时间推移更加明显, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。 **结论** 电针治疗脊髓损伤, 促进脊髓功能恢复与抑制 BMP-2 有关。

[关键词] 钳夹型大鼠脊髓损伤模型; 电针; 骨形态发生蛋白

[中图分类号] R338.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095-610X (2014) 03-0019-04

Expression of BMP-2 in Clip-type Spinal Cord Injury Rats Model after Electro-acupuncture Treatment

LI Jing-hui¹⁾, XIE Yong¹⁾, LIU Yu¹⁾, HUAN Hui¹⁾, WU Hai-yin²⁾, YU Hua-lin¹⁾, BAI Peng¹⁾
(1) Second Dept. of Neurosurgery; 2) Dept. of Emergency, The 1st Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650032, China)

[Abstract] **Objective** Investigate the expression of BMP-2 in spinal cord injury (SCI) rats after the electro-acupuncture (EA) treatment in order to provide experimental basis for electro-acupuncture treatment of SCI. **Methods** 36 SD rats were randomly divided into the SCI group, the SHAM group and the EA group. Aneurysm-clipping (temporary) method was used to make up an acute SCI model. The injured myeloid tissues were obtained at the 7th, 14th, 21st and 28th day respectively after injury. The expression of the BMP-2 in the injured spinal cord tissue in each group was observed by Western blotting. **Results** The expression of BMP-2 was obviously enhanced after injury for 7~14 days, and this high-level expression sustained until the 28th days. The expression of BMP-2 in the EA group was lower than that in the SCI group with statistically significant difference ($P < 0.05$), and the difference increased over time. **Conclusion** Electric-acupuncture could promote the functional recovery after spinal cord injury by inhibiting the expression of BMP-2. And the results have provided the experimental basis for electro-acupuncture treatment of spinal cord injury

[Key words] Clip-type spinal cord injury rats model; Electric-acupuncture; BMP

脊髓损伤 (spinal cord injury, SCI) 指脊髓受到创伤打击后使机体出现运动和 (或) 感觉障碍, 可导致瘫痪, 是一种严重的致残, 致死性损伤, 是神经外科临床中的常见病、多发病及疑难病。在中

医学中属“体惰”“痿证”等范畴, 为外力损伤督脉, 致使气血逆乱, 经络瘀阻, 气血不能温煦濡养肢体所致^[1]。骨形态发生蛋白 (bone morphogenetic proteins, BMPs) 是转化生长因子超家族的分子成

[基金项目] 云南省教育厅重大专项基金资助项目 (Zd2012001); 云南省教育厅科学研究基金资助项目 (2013y287)

[作者简介] 李经辉 (1978~), 男, 云南昆明市人, 医学博士, 主治医师。吴海鹰和李经辉对本文有同等贡献。

[通讯作者] 白鹏。E-mail: frogprincea@163.com; 余化霖。E-mail: yuhl308@126.com

员之一^[2]。国内外研究表明,在大鼠脊髓损伤模型中, BMP-2 促使局部神经细胞信号的改变,增加胶质瘢痕的形成,影响局部形态学改善与功能恢复^[3]。BMP-2 能促使星型胶质细胞的增生、抑制神经再生并阻止神经功能的恢复^[4]。由于电针能减少星形胶质细胞反应性增生,促进轴突的再生长及功能的恢复,而 BMPs 能促使星型胶质细胞增生,抑制神经再生并阻止功能的恢复,但电针刺激脊髓损伤后的功能恢复是否通过抑制 BMP-2 的表达来实现其作用机制未见相关报道,实验通过 Western blotting 蛋白质检测等实验方法就二者关系做进一步研究,为电针治疗脊髓损伤,修复脊髓功能提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

选相同条件下饲养的成年健康雌性大鼠 36 只,体重为 220~250 g,均由昆明医科大学动物中心提供,动物许可证号:(滇)2011-0004。实验对动物的处理方法符合中华人民共和国科学技术部颁发的《关于善待实验动物的指导性意见》。

1.2 主要试剂

辣根酶标记山羊抗兔 IgG (北京市中杉金桥生物科技有限公司), PA115-BCA 蛋白质定量试剂盒 (天根生化科技(北京)有限公司), Anti-BMP-2 (英国 abcam 公司)。

1.3 实验动物分组

本实验将 36 只 SD 大鼠随机分为 3 组,即 EA 组、SCI 组、SHAM 组,每组 12 只大鼠。EA 组接受 SCI 手术+EA 治疗;SCI 组接受 SCI 手术;SHAM 组仅接受椎板切除术。3 组分 4 个时间组取材,检测(术后 7 d、14 d、21 d、28 d)。

1.4 大鼠 SCI 模型建立

本研究内容和方法取得昆明医科大学实验动物伦理委员会的批准后,采用医用脑血管临时动脉瘤夹钳夹脊髓方法建立大鼠急性钳夹脊髓损伤模型^[5]。

1.5 电针治疗

电针组在造模后第 3 天选取“命门”(第 2 腰椎棘突下,向上斜刺)、“大椎”(第 7 颈椎棘突下,向下斜刺),进针约 0.5~0.7 cm,双侧“环跳”(在股骨大转子与尾骨之间,向臀部斜刺),进针约 0.5~0.7 cm,使用华佗牌电针治疗仪器 SDZ-V 型,持续脉冲电流,波形为疏密波(疏波

工作 5 s,密波工作 9 s,疏波与密波频率之比为 1:5)、频率 10 Hz,强度 0.75 mA,治疗时间为 30 min,输出强度以大鼠双侧大腿肌肉轻微抽动为准。EA 组术后第 3 天直到术后第 28 天,每天电针 1 次。SCI 组和 SHAM 组不做任何处理,仅给予其托起紧握 1 下,模拟电针组给予大鼠的应激状态。

1.6 损伤脊髓 BMP-2 含量测定

将冻存于 -80 °C 冰箱的 SD 大鼠脊髓组织提取出 0.1 g 放入 1.5 mL 的离心管内,加入 1 000 μ L 细胞裂解液(此裂解液中已含有蛋白酶抑制剂,磷酸酶抑制剂),使用匀浆机进行研磨,离心,12 000 r/min,15 min 后于 4 °C 冰箱静置 10 min,取上清液进行 Western blotting 蛋白质检测。检测前每只样品取出 2 μ L 在 96 孔板上用 BCA 蛋白定量 BMP-2 试剂盒进行蛋白质定量(蛋白质的浓度为 μ g/ μ L,每个蛋白孔道上样量为 50 μ g,计算出每个样品的上样量。染色、转膜(半干转移系统)、免疫反应、化学发光、显影、定影、拍照。采用 Imagej 2x 图像分析软件检测目的条带和 actin 的灰度值,计算二者的比值,作为 BMP-2 相对表达量。

1.7 统计学分析

计量资料用 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用 SPSS 统计软件包对各组实验数据行单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

对照组(SHAM 组)、脊髓损伤组(SCI 组)、电针组(EA 组)每组分别在 7 d、14 d、21 d、28 d 每个时间点取样本,均重复 3 次检测,计算各个样本灰度值与内参灰度值的比值(图 1)。采用 SPSS17.0 统计软件统计分析。

经双因素方差分析后,EA 组 BMP-2 的表达与 SCI 组及 SHAM 组有统计学差异 ($P < 0.05$),电针组间 14 d、21 d、28 d 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

实验结果表明 BMP-2 的表达在脊髓损伤后 7~14 d 出现增强,表达持续至 28 d 以后,电针组 BMP-2 的表达低于脊髓损伤组,这种表达差别随时间推移而明显,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$),见表 1。

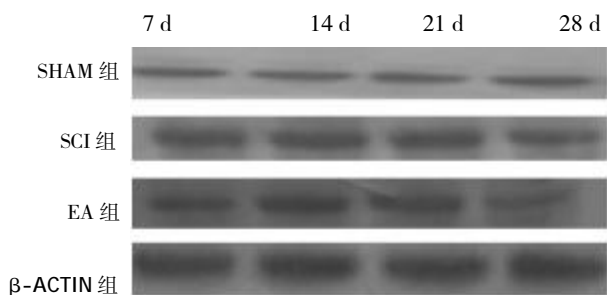


图1 各组不同时间 Western 印迹条带

Fig. 1 The Western blotting of each group at the different times

表1 BMP-2 与内参灰度比值的变化 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 The gray level ratio change of BMP-2 and actin ($\bar{x} \pm s$)

分 组	7 d	14 d	21 d	28 d
SCI 组	0.83 ± 0.07	0.93 ± 0.07	0.81 ± 0.05	0.75 ± 0.07
EA 组	0.57 ± 0.15	0.71 ± 0.16	0.62 ± 0.17	0.44 ± 0.19
SHAM 组	0.28 ± 0.09	0.28 ± 0.11	0.28 ± 0.05	0.28 ± 0.08

3 讨论

目前,临床已证实电针对 SCI 病人的功能恢复有着可靠的疗效。然而,电针 (electro-acupuncture, EA) 刺激促使神经功能恢复的作用机制尚不清楚。研究表明电针刺激脊髓损伤后大鼠督脉,能促使损伤处内源性少突胶质细胞前体细胞增殖与分化,使其再髓鞘化与改善已脱髓鞘化轴突的功能^[6]。亦有研究证实,应用弗氏完全佐剂诱导星形胶质细胞增生,GFAP 标记物在灰质中强表达,而通过电针刺激后这种强表达明显减弱^[7]。Sun T 等^[8]在慢性压迫性坐骨神经损伤模型中,针刺损伤大鼠下肢“足三里”、“环跳”穴,与对照组相比伤侧的脊髓 GFAP 染色明显降低。这些研究表明电针能抑制星形胶质细胞的表达,促使轴突功能的恢复,从而达到再生的目的。因此,电针治疗脊髓损伤具有理论基础。

BMPs 根据其结构的相似度被分成 30 多种亚型,其中一个亚型是由 BMP-2 和 BMP-4 组成,它们存在于脊椎动物与果蝇的同源基因中,对中枢神经系统的发育,发展起到重要的作用^[2]。成熟的 BMPs 通过联系 BMP 受体 (BMPRs) 的旁分泌与自分泌发挥作用。BMPs 是一种二聚化合物,在胚胎晚期与出生后,BMP 信号通路促使星形胶质细胞的分化。同样,睫状神经生长因子-白血病抑制因子 (CNTF-LIF) 的细胞家族促使星形胶质细胞分

化,它们是通过信号传导与转录活化 (JAK-STAT) 信号通路实施。JAK-STAT3 与 BMP-Smad 信号通路通过 STAT3-P300/CBP-Smad1 复合物激活 GFAP 因子,促使星形胶质细胞的分化^[9]。BMP 信号促使 GFAP 与星形胶质细胞的成熟,但是 BMPs 调节星形胶质细胞生长的程度没有统一认识^[10]。

目前,国内外的研究表明,在大鼠脊髓损伤模型中,BMP-2 促使局部神经细胞信号的改变,增加胶质瘢痕形成,影响局部形态学改善与功能恢复。Li HF 等^[11]研究表明 BMP1a 在脊髓损伤后星形胶质细胞中的表达大幅度的提高,神经胶质细胞与 BMP 信号传导通路关系紧密。而 Parikh 等^[12]研究表明 BMP 的下游因子 pSmad-1 能调控和支配背根神经节轴突的生长,下调这种信号通路能降低神经轴突的生长潜力,在成年的背角神经元中激活 pSmad-1 能促使感觉神经元的再生。亦有研究表明通过预先分化星形胶质细胞祖细胞,将其暴露于骨形态发生蛋白中,并移植于脊髓损伤处,术后神经功能恢复有明显差异^[13]。这些研究表明,骨形态发生蛋白能促使星形胶质细胞的增生、抑制神经再生并阻止神经功能的恢复。

实验结果表明 BMP-2 的表达在脊髓损伤后 7~14 d 出现明显增强,持续至 28 d 以后,电针组 BMP-2 的表达低于脊髓损伤组,这种表达差别随时间推移更加明显。提示与 SCI 组对比,EA 组经电针刺激后,BMP-2 蛋白因子的表达受到抑制。因此,笔者认为电针刺激促进脊髓损伤后神经功能恢复原因之一可能是通过抑制 BMP-2 及其系列因子的表达来减轻星形胶质细胞的增生及胶质瘢痕的形成,从而有助于脊髓神经再生及神经功能的恢复,这一结果有待进一步深入研究证实。

[参考文献]

- [1] 何竟,李齐寅,丁明甫. 针灸治疗脊髓损伤文献计量分析[J]. 中国医学康复杂志,2010,25(11):1093.
- [2] ZHANG D, MEHLER M F, SONG Q, et al. Development of bone morphogenetic protein receptors in the nervous system and possible roles in regulating trkC expression[J]. J Neurosci, 1998, 18(9):3314-3326.
- [3] POON P C, GUPTA D, SHOICHET M S, et al. Clip compression model is useful for thoracic spinal cord injuries: histologic and functional correlates [J]. Spine, 2007, 32(25):2853-2859.
- [4] PARIKH P, HAO Y, HOSSEINKHANI M, et al. Regeneration of axons in injured spinal cord by activation of bone morphogenetic protein/Smad1 signaling pathway in adult neurons [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, 108(19):

- 99 - 107.
- [5] 李经辉, 黄辉, 余化霖, 等. 钳夹型急性大鼠脊髓损伤模型的建立与评估[J]. 昆明理工大学学报(自然科学版), 2012, 37(6):67 - 75.
- [6] WRANA J L, ATTISANO L, CARCAMO J, et al. TGF beta signals through a heteromeric protein kinase receptor complex[J]. Cell, 1992, 71(6):1 003 - 1 014.
- [7] DING Y, YAN Q, RUAN J W, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells and electroacupuncture downregulate the inhibitor molecules and promote the axonal regeneration in the transected spinal cord of rats [J]. Cell Transplant, 2011, 20(4):475 - 491.
- [8] SUN T, CUI C B, LUO J G, et al. Effect of electroacupuncture on the expression of spinal glial fibrillary acidic protein, tumor necrosis factor- α and interleukin-1 β in chronic neuropathic pain rats [J]. Zhen Ci Yan Jiu, 2010, 35(1):12 - 16.
- [9] DMITRIEV A E, FARHANG S, LEHMAN RA J R, et al. Bone morphogenetic protein-2 used in spinal fusion with spinal cord injury penetrates intrathecally and elicits a functional signaling cascade[J]. Spine, 2010, 10(1):16 - 25.
- [10] DMITRIEV A E, CASTNER S, LEHMAN RA J R, et al. Alterations in recovery from spinal cord injury in rats treated with recombinant human bone morphogenetic protein-2 for posterolateral arthrodesis [J]. J Bone Joint Surg Am, 2011, 93(16):1 488 - 1 499.
- [11] LI H F, JIANG X H, ZOU D Q, et al. Expression of bone morphogenetic protein receptor IA in rats after contusive spinal cord injury [J]. Nan Fang Yi Ke Da Xue Bao, 2011, 31(7):1 124 - 1 130.
- [12] PARIKH P, HAO Y, HOSSEINKHANI M, et al. Regeneration of axons in injured spinal cord by activation of bone morphogenetic protein/Smad1 signaling pathway in adult neurons [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, 108(19):99 - 107.
- [13] DAVIES S J, SHIH C H, NOBLE M, et al. Transplantation of specific human astrocytes promotes functional recovery after spinal cord injury [J]. PLo One, 2011, 6(3):173 - 178.

(2014 - 01 - 04 收稿)

(上接第 18 页)

- 康复, 2010, 14(32):6 001 - 6 005.
- [12] LAMMERT E, CLEAVER O, MELTON D. Induction of pancreatic differentiation by signals from blood vessels[J]. Science, 2001, 294(5 542):564 - 567.
- [13] PHILIPPE P, FRANK P, SIMONE M P, et al. Influences of vascularization and osteogenic cells on heterotopic bone formation within a macroporous ceramic in rats [J]. Plast Reconstr Surg, 2003, 111(6):1 932 - 1 941.
- [14] LAVENDER M D, PANG Z, WALLACE C S, et al. A system for the direct co-culture of endothelium on smooth muscle cells [J]. Biomaterials, 2005, 26(22):4 642 - 4 653.
- [15] HEYDARKHAN-HAGVALL S, HELENIUS G. Co-culture of endothelial cells and smooth muscle cells affects gene expression of angiogenic factors [J]. J Cell Biochem, 2003, 89(6):1 250 - 1 259.
- [16] ROSE S L, BABENSEE J E. Complimentary endothelial cell/smooth muscle cell co-culture systems with alternate smooth muscle cell phenotypes [J]. Ann Biomed Eng, 2007, 35(8):1 382 - 1 390.
- [17] PIERRE B, SAADEH, BABAK J, et al. Mechanisms of fibroblast growth factor-2 modulation of vascular endothelial growth factor expression by osteoblastic cells [J]. Endocrinology, 2000, 141(6):2 075 - 2 083.
- [18] LINDA Q GRIFFITH, GAIL NAUGHTON. Tissue engineering-current challenges and expanding opportunities [J]. Science, 2002, 295(8):1 009 - 1 014.
- [19] SOKER S, MACHADOM, ATALA A. Systems for therapeutic angiogenesis in tissue engineering [J]. World J Urol, 2000, 18(1):10 - 18.
- [20] KAIGLER D, KREBSBACH PH, POLVERINI P, et al. Role of vascular endothelial growth factor in bone marrow stromal cell modulation of endothelial cells [J]. Tissue Engineering, 2003, 9(1):96 - 103.
- [21] MARTINE M L, DECKERS, RUTGER L, et al. Bone morphogenetic proteins stimulate angiogenesis through osteoblast-derived vascular endothelial growth factor A [J]. Endocrinology, 2002, 143(4):1 545 - 1 553.
- [22] 解慧琪, 杨志明, 魏人前, 等. PtsA58H质粒转化人胚腱细胞的生物学特性研究 [J]. 中华手外科杂志, 2000, 16(3):136 - 139.
- [23] 顾广祥, 施晓雷, 杭化莲, 等. BrdU作为脂肪干细胞标记示踪法的可行性[J]. 世界华人消化杂志, 2010, 18(1):14 - 19.

(2014 - 01 - 15 收稿)