

· 基础研究 ·

活血止痛汤对硬膜外瘢痕中线粒体凋亡途径相关基因的影响

范希玲¹, 周辉², 夏志敏², 牛海鑫³, 罗均君³

(1. 浙江大学医学院附属第一医院, 浙江 杭州 310003; 2. 杭州市中医院, 浙江 杭州 310007; 3. 浙江中医药大学)

【摘要】 目的:探讨中药活血止痛汤对硬膜外瘢痕中线粒体凋亡途径及 Caspase-3, -9, Bax, Bcl-2 相关基因表达水平的影响。**方法:**雌性新西兰白兔 60 只(体重: 2.5~3.0 kg)按随机数表分成假手术组(A)、空白对照组(B)、透明质酸钠组(C)和活血止痛汤组(D, 主要药物有当归 20 g、赤芍 20 g、红花 20 g、乳香 15 g、没药 15 g 等 11 味), 每组 15 只。除 A 组外, 其余各组手术切除 L_{4,5} 椎板, 造成 1.0 cm×1.0 cm 硬脊膜裸露区。C 组于硬膜囊外均匀地涂上一层透明质酸钠约 0.5 ml, B、D 组以等量生理盐水处理, 术后 2 周内 D 组予活血止痛汤(2.5 ml/kg, 每日 1 次, 连续 14 d)灌胃。术后第 2、4、8 周末每组各处死 5 只, 逆转录酶链反应(RT-PCR)测定其硬膜外瘢痕组织中 Caspase-3, -9, Bax, Bcl-2 的表达水平。**结果:**RT-PCR 检测发现各组 Caspase-3, -9, Bax, Bcl-2 的表达水平在各个时期均与 A 组存在统计学差异(P<0.01)。第 2、4、8 周时, C 组和 D 组 Caspase-3, -9, Bcl-2 的表达水平明显低于 B 组(P<0.05), Bax 则明显高于 B 组(P<0.05); 在第 8 周时, D 组 Caspase-3, -9, Bax, Bcl-2 的表达水平与 C 组亦有统计学意义(P<0.05)。**结论:**活血止痛汤通过调节 Caspase-3, -9, Bax, Bcl-2 的表达, 可进一步诱导线粒体的凋亡通路, 从而达到预防硬膜外瘢痕增生、粘连的效果。

【关键词】 瘢痕; 线粒体; 基因; 动物, 实验; 中草药

DOI: 10.3969/j.issn.1003-0034.2010.10.018

Effects of Huoxuezhitong recipe on the pathway of mitochondrial apoptosis and the expression of related gene in epidural scar tissue FAN Xi-ling, ZHOU Hui*, XIA Zhi-min, NIU Hai-xin, LUO Jun-jun. *Hangzhou Hospital of TCM, Hangzhou 310007, Zhejiang, China

ABSTRACT Objective: To study the effect of *Huoxuezhitong* recipe on the pathway of mitochondrial apoptosis and the expression of related gene (Caspase-3, -9, Bax, Bcl-2) in epidural scar tissue. **Methods:** A total of 60 New Zealand rabbits, ranging in weight from 2.5 to 3.0 kg, were randomly divided into sham operative group (group A), control group (group B), sodium hyaluronate group (group C), *Huoxuezhitong* recipe group (group D, included *Danggui* 20 g, *Chishao* 20 g, *Honghua* 20 g, *Ruxiang* 15 g, *Myrrh* 15 g etc.) with 15 rabbits in each group. Except for group A, L_{4,5} vertebral plate were resected leading to 1.0 cm×1.0 cm dura mater exposed area, which were covered with 0.5 ml sodium hyaluronate in group C, covered with same amount of saline in group B and D. At 2 weeks after operation, the rabbits of group D were administered with *Huoxuezhitong* recipe (2.5 ml/kg, once a day, continuous 14 d). Five rabbits of each group were selected randomly and were killed at 2, 4 and 8 weeks after operation; and the expression of Caspase-3, -9, Bax, Bcl-2 in scar tissue were surveyed by semiquantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results:** The results by RT-PCR showed significant different in expressions of Caspase-3, -9, Bax, Bcl-2 of group A and others groups at each period (P<0.01). At 2, 4, 8 weeks after operation, compared with group B, the expressions of Caspase-3, -9, Bcl-2 in group C and D were decreased (P<0.05), but the expression of Bax in group C and D were increased (P<0.05). At 8 weeks after operation, the expressions of Caspase-3, -9, Bax, Bcl-2 in group D was significant decreased compared with group C (P<0.05). **Conclusion:** *Huoxuezhitong* recipe can regulate the levels of expression of Caspase-3, -9, Bax, Bcl-2 mRNA and further induce the pathway of mitochondrial apoptosis, thereby, achieve the effect of prophylaxis for the proliferation and conglutination of epidural scar tissue

KEYWORDS Cicatrix; Mitochondria; Genes; Animals, laboratory; Drugs, Chinese herbal

Zhongguo Gushang/China J Orthop & Trauma, 2010, 23(10): 776-779 www.zggszz.com

腰椎间盘突出症和腰椎管狭窄症是腰腿痛的常见原因, 椎板切除后的缺损最终由纤维瘢痕组织所

修复, 并在硬膜囊已裸露的前提下发生粘连, 在脊柱的伸屈活动中牵拉、压迫神经根, 形成腰椎术后失败综合征。因此, 如何预防或减少椎板切除术后硬膜外瘢痕形成, 对提高脊柱外科手术疗效具有重要意义, 这个问题一直是骨科领域备受重视的课题。本实验

基金项目: 浙江省中医药管理局科技项目(编号: 2008CB057)

通讯作者: 周辉 E-mail: hotstone615@126.com

结合祖国医学传统理论, 建立活血止痛汤预防硬膜外瘢痕动物模型, 观察其对瘢痕组织中线粒体凋亡途径及 Caspase-3, -9, Bax, Bcl-2 基因表达的影响, 进一步证实活血化癥方药预防硬膜外瘢痕的疗效。

1 材料与方

1.1 主要药物 活血止痛汤 (主要包括当归 20 g、赤芍 20 g、红花 20 g、乳香 15 g、没药 15 g 等 11 味组成) 由杭州市中医院制剂室制备, 每毫升相当于生药 0.67 g, 批号 090210。透明质酸钠由山东博士伦福瑞达制药有限公司提供 [国药准字 H10960136], 批号 081223022, 每毫升相当于 10 mg。

1.2 试剂及仪器 ①主要的试剂: Trizol、异丙醇、氯仿、AMV 逆转录酶、Taq 酶、RNA 抑制剂、Oligo d (T) Primers、RT-PCR 试剂盒等购自 (TaKaRa) 宝生物工程公司。②实验主要仪器设备: SW-CJ-1FD 超净工作台、MDF-382E 型超低温冰箱 (日本 SANYOO)、BIOFUGE28RS 型低温高速离心机、凝胶成像分析系统 (EQ170-8060)、FFG02HSD 型 PCR 仪、Milli-Q 型超纯水机、HH.W21.CR600 恒温水浴箱、DYY-6B 型稳压稳流电泳仪、微量核酸测量仪 (ultrospec3300pro) 等。

1.3 实验动物分组、造模、给药及处理 雌性新西兰白兔 (由浙江中医药大学实验动物研究中心提供) 60 只, 体重 2.5~3.0 kg, 按体重大小排序后, 按随机数目表法随机分成假手术组 (A)、空白对照组 (B)、透明质酸钠组 (C) 和活血止痛汤组 (D), 每组 15 只。各动物以 3% 戊巴比妥钠 40 mg/kg 体重耳缘静脉麻醉成功后, 背部去毛 (A 组仅做去毛处理), 常规消毒铺巾, 无菌条件下进行手术。以 L_{4,5} 棘突间隙为中心作后正中切口长约 6 cm, 暴露分离椎旁肌, 牵向两侧, 暴露 L₃₋₆ 棘突及椎板, 咬除 L_{4,5} 棘突及全椎板, 注意仔细操作避免损伤脊髓神经, 显露 L_{4,5} 段硬膜囊后约 1.0 cm×1.0 cm, 生理盐水冲洗。C 组于硬膜囊外均匀涂上一层透明质酸钠约 0.5 ml, 其余各组以等量生理盐水处理, 逐层缝合筋膜及皮肤并消毒创口。

各动物术后单笼饲养 24 h, 术后 3 d 肌肉注射青霉素 20 万 U kg⁻¹d⁻¹, 预防感染。自术后第 1 天开始, D 组动物予活血止痛汤 2.5 ml/kg (按成人剂量换算) 灌胃; B、C 两组予等量生理盐水。每日 1 次, 连续 14 d。术后除 5 只动物后肢不全瘫继续单笼饲养外, 其余动物 24 h 后按组分笼饲养。10 d 内陆续有 11 只动物死亡, 各组大体均等。10 d 后各动物状态良好。14 d 后重新补齐。每组分别于术后 2、4、8 周末各处死 5 只动物。无菌条件下原手术入路进入, 细心分离, 切取硬膜外瘢痕组织, 迅速-90℃冻存以待测 Caspase-3, -9, Bax, Bcl-2 的表达水平。

1.4 观察指标与方法

1.4.1 引物设计与合成 检索 NCBI GenBank 数据库中 Caspase-3, -9, Bax, Bcl-2 全长 mRNA 序列, 应用 Primer premier 5.0 软件设计出 Caspase-3, -9, Bax, Bcl-2 基因及内参 β -actin 基因 (基因序列号: SZD09187) 的上下游引物序列见表 1。表 1 中的引物均由湖南生物工程技术有限公司合成。

表 1 RT-PCR 引物序列

Tab. 1 RT-PCR primer sequences

基因	序列号 bp	退火 温度(℃)
β -actin	5'-ACG ATG CTC CAA GAG CTG TT-3'	499 55.4
	5'-TCA GGC AGC TCA TAG CTC TT-3'	
Caspase - 3	5'-ATG GAA GCG AAT CAA TGG AC-3'	478 56.5
	5'-GAG CGA CGG AGA GAG ACT GT-3'	
Caspase - 9	5'-AAC AGG CAA GCA GCA AAG TT-3'	423 54.0
	5'-CAC GGC AGA AGT TCA CAT TG-3'	
Bax	5'-GCG TCC ACC AAG AAG CTG A-3'	467 58.0
	5'-ACC ACC CTG GTC TTG GAT CC-3'	
Bcl-2	5'-CAG CTG CAC CTG ACG CCC TT-3'	473 60.5
	5'-GCC TCC GTT ATC CTG GAT CC-3'	

1.4.2 Caspase-3, -9, Bax, Bcl-2 基因水平观察 ①瘢痕组织总 RNA 的提取: 按试剂盒要求将样品加入 1 ml Trizol 试剂使核中研磨并充分裂解, 加 0.25 ml 氯仿, 将试管盖严剧烈振摇 1 min 至泡沫状, 置冰上孵育 2~3 min, 4℃, 12 000 g 离心 30 min, 样品混合物分离成两相, 下层红色酚-氯仿相及上层无色水相, RNA 单独存在于水相。将水相移入新试管, 加 0.5 ml 异丙醇混匀, 15℃~30℃孵育 10 min, 同上 4℃, 12 000 g 离心 30 min。除去上清, 用 75% 乙醇清洗 RNA 沉淀, 加入至少 1 ml 浓度 75% 乙醇, 旋涡混合样品, 4℃, 7 500 g 离心 5 min, 弃上清后倒置晾干 1 h, 加入 20 μ l 双蒸水溶解沉淀。A260 nm / 280 nm 比率 < 1.60, 测浓度后用 0.5% SDS 溶液溶解 RNA, 并用微量移液器吹打, -20℃保存待用。②逆转录反应: 取 2 μ g 总 RNA, 分别加入下列成分: dNTPs 混合物 2.0 μ l; TP5 buffer 4.0 μ l; 无 RNase 去离子水 0.5 μ l; Revert taste 1.0 μ l; oligo(dT) 1.0 μ l; 双蒸水 1.5 μ l。混匀后 65℃变性 5 min, 冰浴 5 min 后加入缓冲液 5 ml, 用无 RNase 去离子水配至 25 ml。上述混合物 37℃反应 1 h, 95℃变性 5 min 后冰浴, 进行扩增反应, 或-20℃保存待用。③多聚酶链反应 (PCR): 取反转录产物 2 μ l, 加入 2×PCR Master Mix 混合液 12.5 μ l, Caspase-3, -9, Bax, Bcl-2 上下游引物各 1 μ l, β -actin 上下游引物各 1 μ l, 加双蒸水 8.5 μ l。扩增条件: 95℃预变性 5 min, 经 95℃变性 30 s、退火温度 (见表 1) 30 s、72℃延伸 30 s, 反应 35 个循环, 最后

一轮 72 ℃延伸 10 min, 6 ℃保存。④琼脂糖电泳分析:取 PCR 产物 10 μl 于琼脂糖凝胶上电泳 30 min, 拍摄电泳条带图像分析扫描结果。测定扩增产物的曝光点的面积(AT)及灰度值(GT),测定 β-actin 曝光点面积(AA)及灰度值(GA)。其 RNA 相对量=(AT/GT)/(AA/GA)。

1.5 统计学处理 各组 RT-PCR 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,比较采用单因素方差分析和 *q* 检验。统计学分析均应用 SPSS 12.0 软件,以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

从各组 Caspase-3, -9, Bax, Bcl-2 mRNA 基因表达量的比较来看,在整个病程中的变化趋势基本一致,内参 β-actin 基因在各组的转录水平较为恒定,可作为 Caspase-3, -9, Bax, Bcl-2 PCR 产物的相对衡量标准。各指标在各个时期 B、C、D 组与 A 组均存在统计学差异(*P*<0.01)。术后第 2 周末时,各组表达开始显著,C 组和 D 组 Caspase-3, -9, Bcl-2 的表达水平明显低于 B 组(*P*<0.05),Bax 则明显高于 B 组(*P*<0.05);第 4 周时,各组 Caspase-3, -9, Bax, Bcl-2 的表达水平均达到高峰,而 C 组和 D 组的表达最为明显

(*P*<0.05);第 8 周末时,D 组细胞凋亡基因的表达均有回落,其不仅与 B 组存在统计学差异(*P*<0.05),而且与 C 组也存在统计学差异(*P*<0.05)。统计数据见表 2-3,RT-PCR 产物电泳结果见图 1。

3 讨论

3.1 细胞凋亡的线粒体途径及其相关基因 细胞凋亡的信号传递和执行需要一系列信号分子、酶、受体、基因调节蛋白的共同作用,而细胞凋亡是依赖一类对天冬氨酸特异的半胱氨酸蛋白酶(Caspases)产生的级联事件的结果,目前认为 Caspases 家族中,Caspase-3, -9 是细胞凋亡线粒体通路中最重要的蛋白酶^[1]。Caspase-3 家族蛋白酶是介导细胞凋亡的核心酶,它与凋亡的关系最为密切,是细胞凋亡下游的关键执行者。Akasaka 等^[2]通过体外成纤维细胞的研究指出,Caspase-9 的活化是细胞凋亡的必要步骤,Caspase-9 活化可能在瘢痕成纤维细胞的凋亡中起着重要的调节作用。Bcl-2 和 Bax 是一对平衡基因,都能以同源二聚体形式存在,当 Bcl-2 基因表达增强,细胞内 Bcl-2 蛋白含量升高时,越来越多的 Bax-Bax 二聚体相互分开,与 Bcl-2 形成更稳定的异二聚体,从而抑制 Bax 促细胞凋亡^[3]。虽然 Bcl-2 家族成

表 2 不同时期各组 Caspase-3 和 Caspase-9 的基因表达($\bar{x} \pm s$)

Tab. 2 Comparison of the expression of Caspase-3 and Caspase-9 among three groups($\bar{x} \pm s$)

组别	Caspase-3			Caspase-9		
	第 2 周	第 4 周	第 8 周	第 2 周	第 4 周	第 8 周
A 组	0.104±0.066	0.110±0.034	0.100±0.097	0.120±0.079	0.125±0.890	0.109±0.045
B 组	0.713±0.074*	0.757±0.096 [▲]	0.686±0.087	0.718±0.099*	0.792±0.107 [▲]	0.776±0.097
C 组	0.625±0.082	0.685±0.089	0.645±0.081	0.628±0.086	0.748±0.104	0.713±0.106
D 组	0.450±0.084	0.574±0.095	0.476±0.064 [#]	0.408±0.097	0.479±0.081	0.381±0.093 [#]

注:Caspase-3 相同时期,与 A 组比较,**P*=0.007;与 C 组比较,**P*=0.043, [▲]*P*=0.043, [#]*P*=0.041;与 D 组比较,**P*=0.043, [▲]*P*=0.043;与 B 组比较,**P*=0.043。Caspase-9 相同时期,与 A 组比较,**P*=0.005;与 C 组比较,**P*=0.043, [▲]*P*=0.046, [#]*P*=0.041;与 D 组比较,**P*=0.040, [▲]*P*=0.040;与 B 组比较,**P*=0.041

Note: Caspase3 at the same time, compared with group A, **P*=0.007; compared with group C, **P*=0.043, [▲]*P*=0.043, [#]*P*=0.041; compared with group D, **P*=0.043, [▲]*P*=0.043; compared with group B, [▲]*P*=0.043。Caspase-9 at the same time, compared with group A, **P*=0.005; compared with group C, **P*=0.043, [▲]*P*=0.046, [#]*P*=0.041; compared with group D, **P*=0.040, [▲]*P*=0.040; compared with group B, [#]*P*=0.041

表 3 不同时期各组 Bax 和 Bcl-2 的基因表达($\bar{x} \pm s$)

Tab.3 Comparison of the expression of Bax and Bcl-2 among three groups($\bar{x} \pm s$)

组别	Bax			Bcl-2		
	第 2 周	第 4 周	第 8 周	第 2 周	第 4 周	第 8 周
A 组	1.108±0.146	0.100±0.034	0.100±0.008	0.120±0.079	0.125±0.089	0.109±0.045
B 组	0.620±0.079*	0.554±0.006 [▲]	0.601±0.008	0.718±0.076*	0.767±0.008 [▲]	0.676±0.127
C 组	1.380±0.022	1.125±0.089	1.312±0.010	0.653±0.019	0.608±0.104	0.653±0.121
D 组	1.550±0.111	1.314±0.344	1.476±0.060 [#]	0.498±0.040	0.579±0.006	0.501±0.003 [#]

注:Bax 相同时期,与 A 组比较,**P*=0.009;与 C 组比较,**P*=0.037, [▲]*P*=0.038, [#]*P*=0.034;与 D 组比较,**P*=0.038, [▲]*P*=0.039;与 B 组比较,**P*=0.033。Bcl-2 相同时期,与 A 组比较**P*=0.007;与 C 组比较,**P*=0.042, [▲]*P*=0.044, [#]*P*=0.043;与 D 组比较,**P*=0.040, [▲]*P*=0.043;与 B 组比较,**P*=0.047

Note: Bax at the same time, compared with group A, **P*=0.009; compared with group C, **P*=0.037, [▲]*P*=0.038, [#]*P*=0.034; compared with group D, **P*=0.038, [▲]*P*=0.039; compared with group B, [#]*P*=0.033。Bcl-2 at the same time, compared with group A, **P*=0.007; compared with group C, **P*=0.042, [▲]*P*=0.044, [#]*P*=0.043; compared with group D, **P*=0.040, [▲]*P*=0.043; compared with group B, [#]*P*=0.047

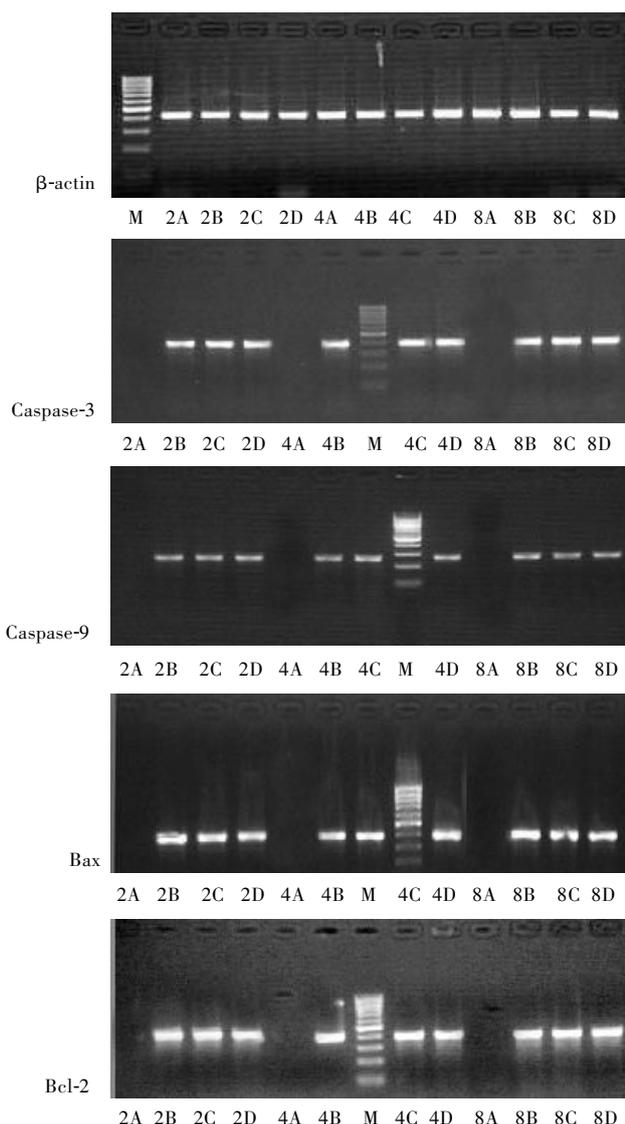


图 1 RT-PCR 检测各组硬膜外瘢痕组织中 Caspase-3, -9, Bax, Bcl-2 mRNA 的表达(M, mark; 2A, 第 2 周 A 组; 2B, 第 2 周 B 组; 2C, 第 2 周 C 组; 2D, 第 2 周 D 组; 4A, 第 4 周 A 组; 4B, 第 4 周 B 组; 4C, 第 4 周 C 组; 4D, 第 4 周 D 组; 8A, 第 8 周 A 组; 8B, 第 8 周 B 组; 8C, 第 8 周 C 组; 8D, 第 8 周 D 组)

Fig. 1 Detected the expression of Caspase-3, -9, Bax, Bcl-2 mRNA at scar tissue by RT-PCR (M, mark; 2A, group A at the second week; 2B, group B at the second week; 2C, group C at the second week; 2D, group D at the second week; 4A, group A at the 4th week; 4B, group B at the 4th week; 4C, group C at the 4th week; 4D, group D at the 4th week; 8A, group A at the 8th week; 8B, group B at the 8th week; 8C, group C at the 8th week; 8D, group D at the 8th week)

员存在于细胞其他部位(核膜或内质网膜),但大量证据显示其主要效应部位是线粒体。

在细胞凋亡中, Bcl-2 家族促凋亡成员被激活,通过去磷酸化方式(Bid)或 Caspase 蛋白水解作用(Bad)转移到线粒体。Bax 引起线粒体释放大量蛋白

质, 转而形成全细胞色素 C (Bax 是在线粒体外膜通过形成离子通道方式促进细胞色素 C 等蛋白分子释放), 只有全细胞色素 C 才可以诱导 Caspases 激活。而 Bcl-2 可直接与 Apaf-1 (apoptotic protease activating factor 1, 线虫 ced-4 的同源物) 结合, 促使其寡聚化, 通过相应的 CARDs 招募 Caspase-9 酶原等形成凋亡复合物, 进而激活 Caspase-3, 启动 Caspases 级联反应诱导凋亡^[4]。

3.2 活血化瘀方药能调节线粒体的细胞凋亡通路

中药对瘢痕的防治有着悠久的历史, 对其机制也有独特的认识, 认为它主要由气血壅滞、经络痹阻、痰湿搏结或三者相辅相成所致, 治疗上主要是活血化瘀、软坚散结为主。活血化瘀方药具有促进创伤修复, 抑制病理性瘢痕形成的功效。夏志敏等^[5]通过活血止痛汤对硬膜外瘢痕中羟脯氨酸含量的研究, 证实其能抑制瘢痕组织中成纤维细胞和胶原的代谢, 减少硬膜外瘢痕的形成和粘连。目前国内外学者在病理性瘢痕领域研究中主要从细胞凋亡基因及细胞因子着手, 并取得了一些进展, 但其确切的发病机制仍未完全阐明。了解和研究诱导凋亡因子的信号转导途径对于基因手段治疗病理性瘢痕具有重要的实际意义。我们的研究发现, 在椎板切除术后各个时期, 活血止痛汤均能明显调节硬膜外瘢痕组织 Caspase-3, -9, Bax, Bcl-2 的表达。尤其到了后期(第 8 周), 该药物的这一作用与透明质酸钠组和空白对照组相比, 都有统计学差异。由此我们认为, 椎板切除术后, 活血止痛汤能通过下调 Caspase-3, -9, Bcl-2 和上调 Bax 在硬膜外瘢痕中的表达, 可进一步诱导线粒体的凋亡通路, 从而达到了预防硬膜外瘢痕增生、粘连的效果。

参考文献

- [1] 袁长青, 丁振华. Caspases 的活化及其在细胞凋亡中的作用[J]. 生理学进展, 2002, 33(3): 220-224.
- [2] Akasaka Y, Ito K, Fujita K, et al. Activated caspase expression and apoptosis increase in keloids: cytochrome c release and caspase-9 activation during the apoptosis of keloid fibroblast lines[J]. Wound Repair Regen, 2005, 13(4): 373-382.
- [3] 陈伟, 付小兵. 增生性瘢痕中凋亡相关基因转录的变化[J]. 中华实验外科杂志, 2005, 22(2): 235-237.
- [4] Adams JM. Ways of dying: multiple pathways to apoptosis [J]. Genes Dev, 2003, 17(20): 2481-2495.
- [5] 夏志敏, 周辉, 赵万军, 等. 活血止痛汤对硬膜外瘢痕组织中羟脯氨酸含量及其超微结构的影响[J]. 中国骨伤, 2007, 20(8): 532-535.

(收稿日期: 2010-03-26 本文编辑: 王宏)