

痉证及痿证中药方对大鼠脊髓持续性压迫损伤局部 ET-3mRNA 表达的影响

施杞, 胡志俊, 王拥军, 李晨光, 谢兴文
(上海中医药大学附属龙华医院伤骨科, 上海 200032)

摘要 目的: 研究大鼠脊髓持续性压迫后缩血管因素 ET-3mRNA 的改变, 探讨痉、痿证方对大鼠脊髓持续性慢性损伤局部 ET-3mRNA 表达的影响。方法: 将雄性中年大鼠随机分为假手术组、轻压、中压及重压模型组和轻、中、重压的痉证方、痿证方治疗组。采用大鼠颈椎前路螺钉压迫颈脊髓, 螺钉留置持续压迫 30 d 以产生慢性损伤, 用 RT-PCR 方法检测受压局部 ET-3mRNA 表达变化。结果: 正常脊髓组织中有 ET-3mRNA 表达, 脊髓受压后 ET-3mRNA 表达明显增高, 模型组与假手术组相比各组均 $P < 0.01$; ET-3mRNA 表达增高程度与压迫程度有关, 与轻压组相比, 中、重压组差异具有显著性意义, $P < 0.01$, 重压与中压组相比, 差异具有显著性意义, $P < 0.01$; 痉、痿证方干预后, 增高的 ET-3mRNA 明显降低, 与模型组相比, 痉、痿证方组有统计学差异, $P < 0.01$ 。结论: 痉、痿证中药方对增高的 ET-3mRNA 有明显的降低作用。

关键词 脊髓损伤; 内皮素; 中药疗法

Effects of Jing syndrome recipe(痉证方)and Wei syndrome recipe(痿证方)on ET-3mRNA expression in injury local after constant compression of spinal cord in rats SHI Qi, H U Zhijun, WANG Yongjun, LI Chenguang, XIE Xingwen. The Affiliated Longhua Hospital of Shanghai University of TCM, Shanghai 200032, China

Abstract Objective: To study the alteration of ET-3mRNA expression in rats' spinal cord after constant compressive injury, furthermore to explore the effects of Jing syndrome recipe(痉证方) and Wei syndrome recipe(痿证方) on ET-3mRNA expression in injury local of spinal cord in rats. **Methods:** The midlife male rats were randomly divided into four groups: sham operated group, model groups which included mild, moderate and severe compress groups, therapy groups of Jing syndrome recipe(痉证方) and Wei syndrome recipe(痿证方) which also included mild, moderate and severe compress groups. Screws were used to drill into spinal cord through anterior cervical vertebra body. After operation the screws remained in spinal cord for 30 days to create chronic injury, and then RT-PCR was used to check the expression changes of ET-3mRNA in compressed location. **Results:** There was expression of ET-3mRNA in normal spinal cord tissues. After spinal cord was compressed, the expression of ET-3mRNA increased significantly ($P < 0.01$). The increase degrees of ET-3mRNA expressions were related to the degree of compression, and the expressions were different in the mild, moderate and severe compress groups ($P < 0.01$). After Jing syndrome recipe(痉证方) and Wei syndrome recipe(痿证方) were used, the increased ET-3mRNA expression decreased significantly ($P < 0.01$). **Conclusion:** Jing syndrome recipe(痉证方) and Wei syndrome recipe(痿证方) are effective to decrease ET-3mRNA expression in injured spinal cord after constant compression.

Key words Spinal cord injuries; Endothelins; Treatment with Chinese herbs

脊髓损伤后缺血能引起脊髓坏死和神经功能丧失^[1]。脊髓损伤后产生缺血的因素很多, 体液因素中特别是具有强烈缩血管效应的因子在缺血发生中

有重要作用。内皮素(endothelin, ET)是目前所知的作用最强、持续时间最久的缩血管活性肽, 本实验用 RT-PCR(逆转录-聚合酶链式反应)方法检测脊髓持续性压迫操作局部 ET-3mRNA 表达的变化, 探讨 ET 在脊髓损伤后继发缺血的作用。

基金项目: 上海市科技攻关重点项目(编号: 204119026)

通讯作者: 施杞 Tel: 021-54232267 E-mail: Shiqish@hotmail.com

1 材料和方法

1.1 实验动物及分组 选用清洁级 SD 大鼠 40 只, 体重(375±25) g, 雄性。随机分为 10 组, 每组 4 只, 假手术组、轻压模型组、中压模型组、重压模型组、轻压痉证方组、中压痉证方组、重压痉证方组、轻压痿证方组、中压痿证方组、重压痿证方组。动物由上海中医药大学动物实验中心提供, 许可证号: SCX(沪)2003-002。

1.2 模型制作 氯氨酮 100 mg·kg⁻¹ 腹腔注射, 麻醉生效后, 作颈前侧正中中线稍偏右直切口, 于浅层的胸骨舌骨肌和其深层的肩胛舌骨肌与胸骨乳突肌间隙进入, 向内推开气管直达第 4 颈椎椎体, 用直径×螺距分别为 1.4 mm×2.6 mm, 1.4 mm×3.0 mm, 1.4 mm×3.5 mm 的平头金属螺丝钉于椎体正中拧入, 规定螺距 2.6 mm 为轻压, 3.0 mm 为中压, 重压为 3.5 mm。术后常规缝合, 抗菌 7 d, 分组喂养 30 d。

1.3 药物及用法 痉证方组成: 生黄芪 15 g, 丹参 12 g, 柴胡 9 g, 白芍药 15 g, 葛根 10 g, 炙蜈蚣 5 g; 痿证方组成: 炙黄芪 15 g, 党参 12 g, 鹿角霜 12 g, 仙灵脾 12 g, 当归 9 g, 炒白术 12 g。水煎, 每剂药浓缩为 30 ml, 水煎剂型, 按成人用量的 1/60×大鼠体重×10, 每天 1 次灌胃给药, 药量 2 ml, 连续给药 30 d。

1.4 取材 氯氨酮 120 mg·kg⁻¹ 腹腔注射处死动物, 以压迫点为中心取脊髓组织 1.5 cm, 取材后放进液氮中, 后转入 -80℃ 冰箱中保存, 备用。

1.5 检测方法 RT-PCR 法。ET-3 目的基因上下链为: GGA CTA GGA AGC CCT TCT AG 423-453; AGG AGG TCT TGA TGC TGT TG 725-706 片段长 291 bp。基因库序列号 M-64711, 由上海申能博彩生物科技有限公司合成。内参照 β-actin 引物序列由上海博亚生物技术有限公司合成。P1 5' GTG GGC CGC CCT AGG CAC CAG 3' P2 5' GGC TGG AAG AGA GCC ACG GGG 3' 片段长 688 bp, 基因库序列号 NM-03114。数据计算用目的基因的平均光密度与内参基因的平均光密度之比作为目的基因的半定量表达值。

1.6 统计方法 用 SPSS 11.0 统计软件包分析数据, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。模型组与假手术组之间, 采用单因素方差分析, 治疗组和模型组之间采用多因素方差分析的析因设计试验。

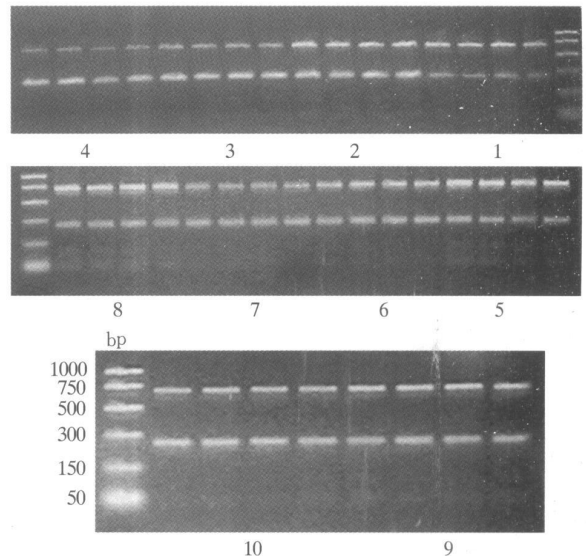
2 结果

正常脊髓组织中有 ET-3mRNA 表达。脊髓慢性损伤后, ET-3mRNA 表达明显增高, 各模型组与假

手术组相比均 $P < 0.01$; 随着压迫加重, 表达也相应增高, 与轻压组相比, 中、重压组 ET-3mRNA 表达升高, 有统计学差异, $P < 0.01$ 。重压与中压组相比, 差异具有显著性意义, $P < 0.01$ 。而治疗组相对于模型组, ET-3mRNA 表达明显下降, 痉证方组、痿证方组比较均有统计学差异, $P < 0.01$ (见图 1 及表 1)。

3 讨论

脊髓损伤后 ET 增高已有报道, 孙正义等^[2] 对大鼠脊髓进行慢性压迫, 结果使脊髓局部 ET-1 明显增高, 减压后又开始明显降低。脊髓损伤后神经细胞、胶质细胞自分泌和旁分泌 ET 增加, 中枢神经组织内血管内皮细胞分泌 ET 增加, 脊髓组织受压损伤、血管通透性增加等均可使脊髓局部 ET 表达增加。彭新生等^[3] 用原位杂交方法检测到脊髓急性损伤后损



注: 上面条带为 β-actin, 分子量 688 bp, 下面条带为目的基因, 分子量 292 bp, 1 为假手术组, 2 为轻压模型组, 3 为中压模型组, 4 为重压模型组, 5 为痉证方轻压组, 6 为痉证方中压组, 7 为痉证方重压组, 8 为痿证方轻压组, 9 为痿证方中压组, 10 为痿证方重压组。

图 1 脊髓持续性压迫损伤局部脊髓组织 ET-3mRNA RT-PCR 电泳图

Note: The above strap is β-actin(molecular weight 688 bp), the below strap is objective gene(molecular weight 292 bp), one is sham-operated group, two is mild compressed group, three is moderate compressed group, four is severe compressed group, five is mild compressed group of Jing syndrome recipe(痉证方), six is moderate compressed group of Jing syndrome recipe(痉证方), seven is severe compressed group of Jing syndrome recipe(痉证方), eight is mild compressed group of Wei syndrome recipe(痿证方), nine is moderate compressed group of Wei syndrome recipe(痿证方), ten is severe compressed group of Wei syndrome recipe(痿证方).

Fig. 1 RT-PCR electrophoresis chart of ET-3mRNA in injured spinal cord after constant compression

表 1 各组脊髓组织 ET 3mRNA 表达半定量比较($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Demi ratio comparison of ET 3mRNA in spinal cord tissue of every groups ($\bar{x} \pm s$)

Group	Rats	Mild compression	Moderate compression	Severe compression
Sham operated group	4	0.73 ± 0.19	-	-
Model group	4	0.91 ± 0.07**	1.19 ± 0.04**	1.31 ± 0.11**
Jing syndrome recipe(痉证方) group	4	0.67 ± 0.08	0.84 ± 0.03	0.99 ± 0.04
Wei syndrome recipe(痿证方) group	4	0.72 ± 0.03	0.82 ± 0.05	1.06 ± 0.10

注:用目的基因的平均光密度与内参基因的平均光密度之比作为目的基因的半定量表达值。模型组与假手术组,**与假手术组相比 $P < 0.01$;压迫与药物 2 因素间无交互作用,压迫和药物 2 因素均有统计学意义。不同压迫程度组之间,中压与轻压相比 $P < 0.01$,重压与轻压相比 $P < 0.01$;药物干预组(含模型组)之间,痉证方组与模型组相比 $P < 0.01$,痿证方组与模型组相比 $P < 0.01$,痉证方与痿证方之间相比 $P > 0.05$ 。

Note: The ratio of average optical dens(O. D.) of objective gene to the O. D. of inner reference gene is used as the demi ratio express value of objective gene. **: The expression of model group compared to that of the Sham operated group, $P < 0.01$. There was no interaction between compression and medicine. There was statistics significance for both the two factors of compression and medicine. The expression of moderate compressed group compared to that of the mild compressed group, $P < 0.01$, and that of severe compressed group compared to that of the mild compressed group, $P < 0.01$. The expression of Jing syndrome recipe(痉证方) group compared to that of model group and that of Wei syndrome recipe(痿证方) group compared to the model group, $P < 0.01$. The expression of Jing syndrome recipe(痉证方) group compared to that of Wei syndrome recipe(痿证方) group, $P < 0.05$.

伤期脊髓组织 ET-1 mRNA 的表达明显增加。我们的实验显示,持续压迫大鼠脊髓后,ET-3 mRNA 表达明显增加,并随压迫程度的加深,表达量相应增高。ET-3 mRNA 表达明显增加导致 ET-3 多肽的合成增加,说明大鼠脊髓慢性持续受压后,ET-3 参与了脊髓的损伤,ET-3 增高的来源之一是受损脊髓组织局部自身基因调控失调,基因表达加强,促进了 ET-3 多肽的合成。目前降低高表达 ET 的研究有:①ET 受体拮抗剂。彭新生等^[4]于大鼠蛛网膜下腔鞘内注射外源性 ET-1 后测定结果脊髓血流量明显降低;再

于脊髓损伤大鼠鞘内注射 ET-1 拮抗剂,血流量下降明显低于对照组。鲁凯伍等^[5]在急性损伤大鼠脊髓,同样测得脊髓 ET-1 水平明显升高,脊髓血流量明显下降,鞘内注射 ET-1 拮抗剂后,ET-1 下降,脊髓血流量改善。胡俊勇等^[6]对脊髓损伤大鼠模型鞘内给予 ET 受体拮抗剂后,脊髓运动诱发电位优于对照组且恢复过程快于对照组,肢体运动功能障碍也得到部分改善。②改善受损局部病理环境。大剂量甲基强的松龙能抗脂质过氧化,改善脊髓血流量,减轻炎症症状,降低脊髓中 ET 含量^[7]。山莨菪碱能解除血管痉挛,对急性颈髓损伤后血浆及脑脊液中 ET-1 的含量有明显的降低作用^[8]。中医药对脊髓损伤有明显的治疗作用,能够改善局部微环境,从而降低 ET 的表达^[9]。我们的实验显示,痉证方、痿证方均能使异常增高的 ET-3mRNA 表达明显下降,痉证方,功效以益气活血、疏通经络为主,重在培补生命之源,通过实验,可以推测其改善脊髓血供作用是通过影响缩血管基因的表达来实现的,正好体现了中医治病求本的思想。

参考文献

- 1 胡志俊,王拥军,卞琴,等.脊髓型颈椎病发病机理研究概况. 中医正骨, 2003, 15(11): 50-51.
- 2 孙正义,贾军,董平,等.大鼠慢性渐进性脊髓损伤减压后内皮素的变化及其与神经功能的关系. 中国矫形外科杂志, 2003, 11(11): 770-771.
- 3 彭新生,李佛保,潘滔,等.急性脊髓挫伤后内皮素 1mRNA 表达变化. 中国病理生理杂志, 2002, 18(2): 189-191.
- 4 彭新生,李佛保,潘滔,等.内皮素参与脊髓损伤后缺血. 中国危重病急救医学, 2002, 14(7): 419-421.
- 5 鲁凯伍,张震,侯铁胜,等.急性脊髓损伤后内皮素-1 含量变化及其机制的实验研究. 创伤外科杂志, 2004, 4(4): 222-224.
- 6 胡俊勇,刘世敬,杨远良,等.内皮素受体拮抗剂对大鼠脊髓损伤脊髓诱发电位和运动功能的影响. 基础医学与临床, 2003, 23(2): 220-221.
- 7 梁德,李文超,姚珍松,等.补气通络针剂加小剂量甲基强的松龙对损伤脊髓组织及血中内皮素的影响. 中医正骨, 2003, 15(7): 6-9.
- 8 罗晓阳,张建生,山莨菪碱对急性颈髓损伤后血浆及脑脊液中内皮素 1 含量的影响. 中华神经外科疾病研究杂志, 2001, 1(1): 72-74.
- 9 王慧敏,谭明生,杨洪艳,等.中药对实验性脊髓损伤早期 ET 与 NO 的影响. 中医正骨, 2002, 14(11): 5-6.

(收稿日期: 2004-12-30 本文编辑: 李为农)

• 消息 •

讣告

成都骨科医院创始人、骨科泰斗、名誉院长、全国著名中医骨科专家杨天鹏先生因病医治无效,于 2005 年 8 月 26 日 18 日 36 分在成都逝世,享年 103 岁。杨天鹏先生 1902 年 5 月 24 日出生,四川安岳人,生前系主任中医师,中华中医药学会骨科专业委员会顾问,《中国骨伤》、《中医正骨》杂志顾问,成都中医药大学教授,农工民主党党员。杨老先生率其弟子,总结撰写了《杨天鹏骨伤科治验心法》专著,拍摄了《杨天鹏理筋手法》、《壮元益寿功》专题片,为中医骨伤学和民众健康保健留下了丰富宝贵的经验。