文章编号:1000-5404(2013)07-0639-05

论著

TGF-β2对心肌细胞H9C2转录因子表达的影响及其组蛋白H3乙酰化调控机制

王文文[1,2],田 杰[1],郑 敏[1,2],孙慧超[1],陈国珍[2] [400014 重庆,重庆医科大学附属儿童医院:心血管内科[1],儿童发育疾病研究省部共建教育部重点实验室,儿科学重庆市重点实验室,重庆市(儿童发育重大疾病诊治与预防)国际科技合作基地[2]]

[摘要] **目的** 探讨转化生长因子-β2(transforming growth factor beta2,TGF-β2)对心肌细胞H9C2转录因子Mef2c和GATA4的影响及其与组蛋白H3乙酰化的关系。**方法** 比较TGF-β2对细胞生长的影响。利用Real-time PCR检测心肌细胞的心脏相关转录因子Mef2c和GATA4 mRNA的相对表达量,筛选合适的TGF-β2干预浓度。采用Western blot检测心肌细胞乙酰化组蛋白H3(acetylated histone H3,acH3)的表达差异。染色质免疫共沉淀(chromatin immunoprecipitation,ChIP)Real-time PCR检测Mef2c和GATA4启动子区与acH3结合DNA的相对表达水平。比色分析法检测TGF-β2对心肌细胞的总体组蛋白乙酰化酶(HATs)活性的影响。**结果** ①TGF-β2干预组相对于对照组心肌细胞的增殖能力增强($P<0.05$)。②心肌细胞的心脏相关转录因子Mef2c和GATA4 mRNA的相对表达量随着TGF-β2浓度的升高呈现先升高后降低的趋势,在5 μg/L的浓度时均达到最高,Mef2c mRNA相对表达量是对照组的1.8倍,GATA4 mRNA是对照组的2.3倍($P<0.05$)。③TGF-β2干预72 h后acH3蛋白表达量是对照组的4倍($P<0.05$),HATs活性是对照组的1.34倍($P<0.05$)。④TGF-β2干预组Mef2c和GATA4启动子区组蛋白H3的乙酰化水平分别是对照组的2.56和2.16倍($P<0.05$)。**结论** 5 μg/L TGF-β2可以促进心肌细胞H9C2的分裂与增殖,并上调心脏相关转录因子Mef2c和GATA4的表达,组蛋白H3乙酰化水平的升高可能是Mef2c和GATA4表达上调的机制之一。

[关键词] TGF-β2;心肌细胞H9C2;组蛋白H3;乙酰化;表观遗传学
[中图法分类号] R322.11; R329.28; R394.3 [文献标志码] A

Transforming growth factor beta2 up-regulates transcription factors in myocardial cell H9C2 by acetylation of histone H3

Wang Wenwen[1,2], Tian Jie[1], Zheng Min[1,2], Sun Huichao[1], Chen Guozhen[2] ([1]Department of Cardiology, [2]Key Laboratory of Developmental Diseases in Childhood of Ministry of Education, Chongqing International Science and Technology Cooperation Center for Child Development and Disorders, Chongqing Key Laboratory of Pediatrics, Children's Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400014, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of transforming growth factor beta2 (TGF-β2) on histone acetylation of myocardial cell strain H9C2 and its role in regulating the expression of cardiac development-related transcription factors. **Methods** H9C2 cells were cultured and then treated with TGF-β2 at concentrations of 1.25, 2.5, 5, 10 or 20 μg/L. Cell morphology was observed by inverted phase contrast microscopy (IPCM), and cell counting was carried out at 12, 24, 48 and 72 h after treatment to draw the growth curve. Quantitative real-time PCR assay was used to select suitable intervention concentration of TGF-β2 by comparing the mRNA levels of Mef2c and GATA4. Expression of acetylated histone H3 (acH3) was assessed by Western blot assays. Histone Acetylase (HATs) Activity Colorimetric Assay Kit was used to measure the level of HATs activities. And, chromatin immunoprecipitation (ChIP) real-time PCR was employed to measure the level of acH3 in promoter regions of Mef2c and GATA4. **Results** TGF-β2 enhanced the proliferation in H9C2 cells ($P<0.05$). After TGF-β2 treatment, the mRNA expression of Mef2c and GATA4 was elevated in a dose-dependent manner, and then reached peak at a dose of 5 μg/L with an increase by 1.8 folds and 2.3 folds, respectively ($P<0.05$). The acetylation level of histone H3 increased by 4-fold

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81070132)
[通信作者] 田 杰,E-mail:jietian@cqmu.edu.cn
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130108.1050.011.html(2013-01-08)

($P<0.05$), meanwhile, the HATs activity increased by 1.34-fold ($P<0.05$). TGF-β2 treatment resulted in the expression level of acH3 enhanced by 2.56- and 2.16-fold respectively in the promoter regions of Mef2c and GATA4 ($P<0.05$). **Conclusion** TGF-β2 at a dose of 5 μg/L promotes the proliferation in H9C2 cells, and up-regulates the expression of Mef2c and GATA4, which might be through improving the acetylation of histone H3.

[**Key words**] transforming growth factor beta2; myocardial cell H9C2; histone H3; acetylation; epigenetics

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China(81070132). Corresponding author: Tian Jie, E-mail: jietian@cqmu.edu.cn

心脏发育是一个极其复杂的过程,受多层次的调节[1-2],存在遗传和表观遗传修饰有机结合的互联调控网络。表观遗传学是一门研究基因组DNA序列未发生变化,而基因表达及基因功能的诱导和维持却可发生可遗传变化的科学,其修饰方式主要包括DNA甲基化,组蛋白修饰及非编码RNA调控3个层面[3-4]。近年研究发现在心脏发育的过程中,组蛋白乙酰化修饰对相关转录因子的表达具有广泛而重要的调控作用[5]。组蛋白乙酰化可以使核小体松散,从而使各种转录因子和协同转录因子能与DNA结合位点特异性结合,激活基因转录,而组蛋白去乙酰化则对基因的表达起抑制作用。组蛋白乙酰化酶(HATs)和组蛋白去乙酰化酶(HDAC)共同维持组蛋白乙酰化的动态平衡[6]。我们前期研究发现,组蛋白乙酰化修饰在心脏发育和心肌细胞分化过程中起着极其重要的作用[7-9],HATs亚型p300参与的组蛋白乙酰化修饰至关重要[10];外界环境因素如乙醇可通过改变心肌祖细胞乙酰化水平而影响其分化[11]。然而组蛋白乙酰化修饰的上游调控机制目前并不清楚。

TGF-β超家族是一类分泌型的信号多肽[12],包括TGF-βs、活动素、抑制素、骨形态形成蛋白等,广泛存在于生物体的各个系统,调节细胞的增殖、分化、粘附、移行及凋亡,维持体内平衡和生物整体及各种器官的发生、发育,其失衡可以导致各种病理状态。TGF-β在哺乳动物中有3个亚型:TGF-β1、2、3。TGF-β配体及其受体在心脏的心肌细胞和心肌成纤维细胞中表达,相关研究表明TGF-βs在心脏的发生、发育中起着重要的作用[13]。其中,TGF-β2相对于TGF-β1和TGF-β3在心脏发育的信号传导、早期心脏前体细胞的特异性定位、心脏环化及内皮细胞向间充质细胞转化过程中更为重要[13-15]。TGF-β2具体通过什么信号通路影响心脏发育和功能的,有没有参与心脏的组蛋白乙酰化尚不明确。

本实验拟通过在心肌细胞H9C2培养液中加入TGF-β2,研究TGF-β2对心肌细胞H9C2转录因子Mef2c和GATA4表达的影响及其与组蛋白H3乙酰化的关系,进一步从表观遗传学角度上完善对心脏发育的认识。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

心肌细胞H9C2细胞株(美国芝加哥大学骨肿瘤分子生物学实验室惠赠),重组人转化生长因子TGF-β2(recombinant human TGF-β2,Peprotech公司),胎牛血清(Hyclone公司),高纯总RNA快速提取试剂盒(百泰克生物技术有限公司),Real-time PCR反转录试剂盒(TaKaRa公司),Real Master Mix试剂盒(天根公司),核蛋白提取试剂盒(凯基生物技术有限公司),SDS-Page凝胶配制试剂盒(碧云天公司),抗acH3鼠单克隆抗体(Millipore公司,工作浓度1∶500),抗β-actin鼠单克隆抗体(博士德公司,工作浓度1∶1 000),山羊抗鼠IgG、山羊抗兔IgG(中山金桥公司),组蛋白乙酰化酶(HATs)活性比色分析试剂盒(Bio-Vision公司),ChIP试剂盒(Millipore公司),CFX 96荧光定量PCR仪(Bio-Rad公司),相差倒置显微镜(Olympus IX70-111),酶标仪(Thermo公司),化学发光凝胶成像分析仪(Gene公司)。

1.2 心肌细胞H9C2的培养及分组处理

心肌细胞H9C2采用常氧培养:取对数生长期的大鼠胚胎心肌细胞株H9C2接种于含有10%灭活胎牛血清的DMEM培养基中,于37 ℃、5% CO_2饱和湿度的培养箱内培养。细胞常规每2~3天传代1次,所有实验采用对数生长期细胞。TGF-β2用少量灭菌的三蒸水溶解后加入10%胎牛血清/DMEM培养基中配成250 μg/L的储存液,储存于-20 ℃冷冻冰箱长期保存。实验时,对照组细胞单纯用10%胎牛血清/DMEM培养,干预组用含有TGF-β2的10%胎牛血清/DMEM培养。

1.3 细胞形态学观察和细胞增殖检测

心肌细胞H9C2用TGF-β2干预后,应用相差倒置显微镜观察比较干预组和对照组的形态学变化。绘制细胞生长曲线:按20×10^4接种于3块12孔板,分为两组:对照组和干预组。每组设4个时间点,即干预后12、24、48 h和72 h,每个时间点设3个复孔。在不同的时间点分别将细胞消化后于相差倒置显微镜下计数,进行统计学分析,绘制细胞生长曲线,比较两组细胞增殖差异。

1.4 Real-time RT-PCR筛选合适的TGF-β2的干预浓度

3×10^4细胞接种于24孔板,待4~6 h后细胞贴壁,将细胞分为6组:对照组和分别加入1.25、2.5、5、10、20 μg/L TGF-β2的5个浓度梯度的干预组。24 h后即刻提取各组细胞mRNA并逆转录为cDNA。根据天根公司Real Master Mix试剂盒说明书加入相应试剂、引物和模板cDNA,β-actin为内参。Real-time PCR反应体系为10 μL,设3复孔。所得Ct值以$2^{-\Delta\Delta Ct}$表示基因相对表达量。各基因引物序列及退火温度见表1。

表 1　GATA4、Mef2c、β-actin 基因 Real-time PCR 引物序列

基因	引物	退火温度	片段大小
β-actin	上游:5′-GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTA-3′ 下游:5′-GACTCATCGTACTCCTGCTTGCTG-3′	65 ℃ 40 s	150 bp
Mef2c	上游:5′-GCGAAAGTTCGGATTGATGAAGA-3′ 下游:5′-GTGGATGTCAGTGCTGGCGTA-3′	65 ℃ 40 s	121 bp
GATA4	上游:5′-TCATCTCACTATGGGCACAGCA-3′ 上游:5′-GATGGATAGCCTTGTGGGGAG-3′	57 ℃ 20 s 68 ℃ 20 s	93 bp

1.5　Western blot 检测心肌细胞 acH3 蛋白的表达

细胞传代培养后,分为 4 组:对照组和用 5 μg/L TGF-β2 干预 24、48、72 h 的干预组。提取各组细胞核蛋白,BCA 法检测蛋白浓度,蛋白上样量为 50 μg。经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,电转,一抗(1∶500)4 ℃孵育过夜,二抗(1∶1 000)室温孵育 1 h,化学发光成像,条带用 Quantity One 软件转化为灰度值,以 acH3/β-actin 表示蛋白相对表达量,进行统计学分析。

1.6　染色质免疫共沉淀(chromatin immunoprecipitation, ChIP)

取 5 μg/L TGF-β2 干预 72 h 及培养相同时间的对照组细胞各约 2×10^7 个,按 ChIP 试剂盒说明书依次加入 37% 甲醛交联,利用超声破碎仪破碎 DNA 成片段,琼脂糖凝胶电泳确定其片段长度为 200 ~ 1 000 bp,用 ChIP 级 acH3 抗体做染色质免疫沉淀,经沉淀,洗脱,逆交联,纯化等一系列步骤,提取纯化 DNA,保存于 -20 ℃。

1.7　ChIP Real-time PCR

用 ChIP 中提取的 DNA 为 Real-time PCR 模板,选取 GATA4、Mef2c 的 DNA 序列第 1 外显子 5′端前 1 000 bp DNA 序列为启动子区,对其进行引物设计。引物均由成都宝生物公司设计合成。以 ChIP 中调取的 Input 产物为内参。其余方法同 Real-time RT-PCR。Mef2c 上游引物:5′-CTTTCCAGGTTG-GCTCTTACTCC-3′,下游引物:5′-GCCTCCTCCTAACAAAGT-GGGTA-3′,片段大小 131 bp,退火温度 65 ℃ 40 s;GATA4 上游引物:5′-ACTGACGCCGACTCCAAACTAAG-3′,下游引物:5′-GTGTCCCTGTTCTCCCTGTAGC-3′,片段大小 166 bp,退火温度 65 ℃ 40 s。

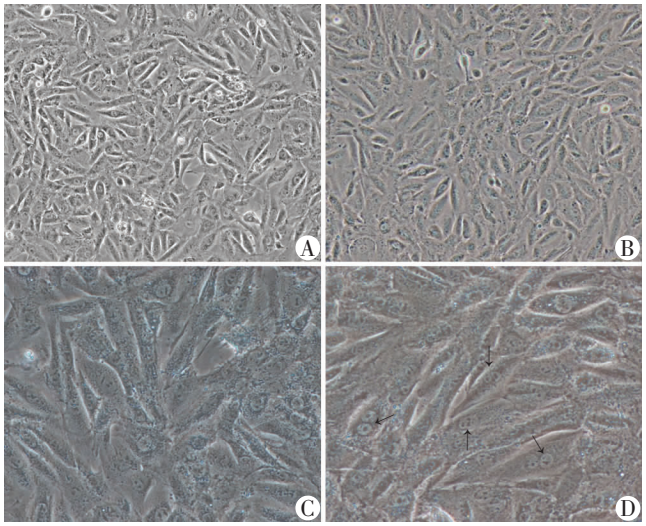
1.8　统计学处理

所有数据重复 3 次,以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 17.0 统计软件,Real-time PCR 和 Western blot 结果组间比较采用 t 检验和单因素方差分析;相同时间点的细胞计数、Mef2c 和 GATA4 启动子区域乙酰化水平及 HATs 活性检测结果组间比较采用独立样本的 t 检验。

2　结果

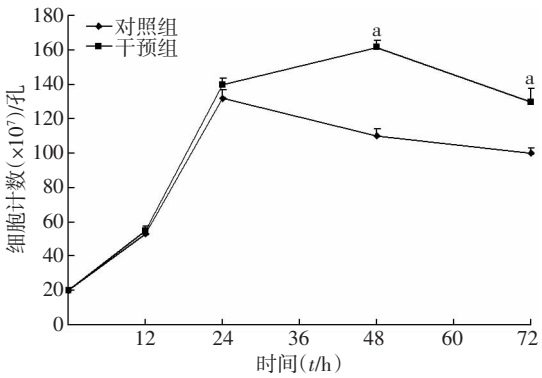
2.1　心肌细胞的增殖变化

TGF-β2 干预 24 h 后,相差倒置显微镜观察,100 倍镜下对照组和干预组的细胞生长密度无明显差别(图 1A、B),200 倍镜下可见细胞形态均成纺锤形,无明显改变,但是干预组相对于对照组细胞内染色质颗粒增加,相同倍数下处于核分裂期的细胞明显多于后者(图 1C、D)。细胞生长曲线(图 2)结果显示:对照组正常培养的细胞在 24 h 之前增殖大于凋亡,生长达到最高峰,24 h 之后凋亡大于增殖;干预组的细胞在 48 h 之前增殖大于凋亡,生长达到最高峰,48 h 之后凋亡大于增殖。两组比较,干预组的细胞生长速率及增殖时间大于对照组。在 48 h 和 72 h,干预组的细胞计数均大于对照组,差别有统计学意义($P<0.05$)。



A:对照组(×100);B:5 μg/L TGF-β2 干预组(×100);C:对照组(×200);D:5 μg/L TGF-β2 干预组　↑:示核分裂期的细胞(×200)

图 1　TGF-β2 干预后心肌细胞形态学的变化



a:$P<0.05$,与对照组比较

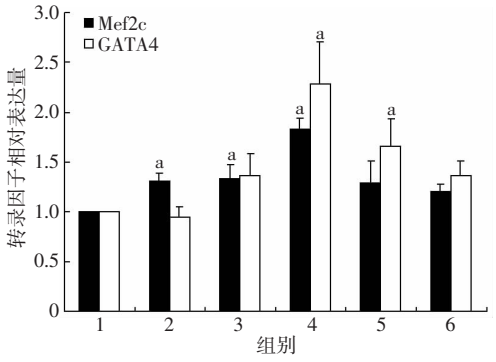
图 2　TGF-β2 干预后不同时间对照组和干预组的生长曲线分析

2.2　不同浓度的 TGF-β2 对心脏相关转录因子 Mef2c 和 GATA4 表达的影响

Real-time PCR 检测结果显示,经不同浓度的 TGF-β2 处理后,与对照组相比,心肌细胞的心脏相关转录因子 Mef2c 和 GATA4 mRNA 的相对表达量随着 TGF-β2 的浓度的升高呈现先升高后降低的趋势,在 5 μg/L 的浓度时均达到最高,Mef2c mRNA 相对表达量是对照组的 1.8 倍,GATA4 mRNA 相对表达量是对照组的 2.3 倍,差别有统计学意义($P<0.05$)。见图 3。

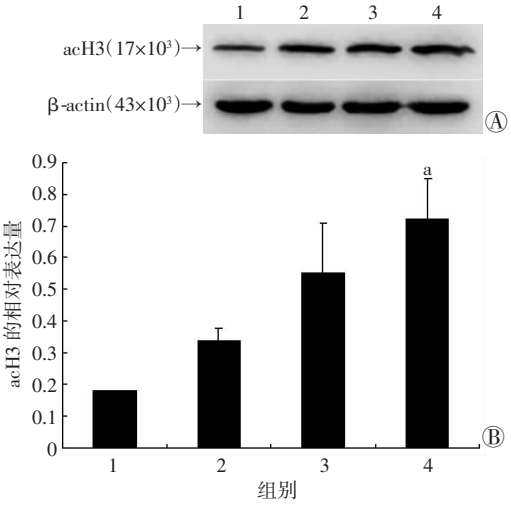
2.3　TGF-β2 对心肌细胞 acH3 蛋白表达的影响

Western blot 结果显示:经 5 μg/L 的 TGF-β2 干预 72 h 后干预组心肌细胞的 acH3 蛋白表达量是对照组的 4 倍,差别有统计学意义($P<0.05$,图 4)。



1:对照组;2:1.25 μg/L TGF-β2 干预组;3:2.5 μg/L TGF-β2 干预组;4:5 μg/L TGF-β2 干预组;5:10 μg/L TGF-β2 干预组;6:20 μg/L TGF-β2 干预组 a:$P<0.05$,与对照组比较

图3 不同浓度 TGF-β2 干预后心脏相关转录因子 Mef2c 和 GATA4 mRNA 的表达



1:对照组;2:5 μg/L TGF-β2 干预 24 h;3:5 μg/L TGF-β2 干预 48 h;4:5 μg/L TGF-β2 干预 72 h

A:Western blot 检测;B:定量分析 a:$P<0.05$,与对照组比较

图4 TGF-β2 干预不同时间后心肌细胞 acH3 蛋白的表达

2.4 TGF-β2 对 Mef2c 和 GATA4 启动子区域乙酰化水平的影响

ChIP Real-time PCR 结果显示:干预72 h 的心肌细胞 Mef2c 和 GATA4 启动子区域乙酰化水平(1.07±0.08)、(1.23±0.10)分别是培养相同时间的对照组[(0.42±0.10)、(0.57±0.13)]的2.56和2.16倍,差别有统计学意义($P<0.05$)。

2.5 TGF-β2 对心肌细胞 HATs 活性的影响

比色分析结果显示:干预组心肌细胞的 HATs 活性(2.30±0.05)是对照组(1.65±0.07)的1.34倍,差别有统计学意义($P<0.05$)。

3 讨论

TGF-β2 作为最重要的心脏发育相关的转化生长因子介导心内膜垫的发生发育[14]。本研究发现,TGF-β2 可以促进心肌细胞 H9C2 的增殖。Mef2c 和 GATA4 是重要的心脏发育相关转录因子,它们在心脏发育的过程中表达,参与心脏发育,调节心脏发育特异基因表达。本研究显示在 H9C2 细胞培养液中加入 TGF-β2,可以促进 Mef2c 和 GATA4 的表达。这与文献[15]报道 TGF-β2 表达降低,心脏发育相关转录因子 GTATA4、Mef2c 表达下降相吻合。

本研究 Real-time PCR 结果显示 TGF-β2 在促进 H9C2 细胞心脏相关转录因子 Mef2c 和 GATA4 mRNA 的表达时具有剂量依赖性,即随着 TGF-β2 浓度的升高,心脏相关转录因子 Mef2c 和 GATA4 mRNA 的表达水平呈现先升高后降低的趋势,在5 μg/L 的浓度时均达到最高,说明细胞内可能存在负反馈的调节机制。目前研究表明,心脏的发生发育受多种信号通路的共同影响,如 Wnt 信号通路、MAPK 信号通路、RAS 信号通路、钙蛋白调节通路及一系列生长因子包括 VEGF、TGF、PDGF 等,这些信号通路之间相互影响,形成一个复杂的信号通路调控网络,维持心脏发育的正常进程,单纯的一个信号分子的失调并不会导致不可逆转的心脏发育的缺失[16]。王剑[17]发现 Smad4 突变小鼠心肌细胞丧失对 TGF-β 的反应性伴随 MEK1-ERK1/2 通路激活的现象也说明了信号通路之间可能存在代偿调节。本研究发现的心脏相关转录因子随着 TGF-β2 的浓度的增高呈现先升高后降低的现象有可能是其他信号通路调节的代偿作用,具体的代偿调节机制尚有待阐明。

本课题组前期研究发现,心脏相关转录因子的表达受组蛋白乙酰化修饰的影响,干扰组蛋白乙酰化酶的活性可引起心脏核心转录因子表达异常[8]。那么,TGF-β2 对 Mef2c 和 GATA4 表达的调控作用是否与组蛋白乙酰化修饰有关呢?本研究检测了细胞 HATs 活性及组蛋白 H3 乙酰化水平。结果显示,TGF-β2 干预组 HATs 活性及组蛋白 H3 乙酰化水平升高。为了进一步研究 TGF-β2 引起的组蛋白 H3 高乙酰化是否参与调控 Mef2c 和 GATA4 的表达,我们采用 ChIP 技术检测 Mef2c 和 GATA4 启动子区域组蛋白 H3 的乙酰化情况,结果表明,TGF-β2 干预组 Mef2c 和 GATA4 启动子区域组蛋白 H3 乙酰化水平升高。结果提示,TGF-β2 可能通过提高心脏发育相关转录因子 Mef2c 和 GATA4 启动子区域的组蛋白 H3 的乙酰化水平,使其启动子区域的组蛋白 H3 的染色质 DNA 结构松弛,更易于启动心脏发育相关转录因子 Mef2c 和 GATA4 转录,从而促进其基因表达。这一发现也为本课题组进一步探讨组蛋白乙酰化修饰的上游调控机制提供了线索。

表观遗传学作为正在发展中的学科还存在很多未知的领域,而信号通路之间也形成了相互影响的复杂调控网络。本研究结果提示,TGF-β2 可促进心肌细胞的分裂和增殖,上调心脏核心转录因子 Mef2c 和 GATA4 的表达,组蛋白 H3 乙酰化修饰可能参与介导了 TGF-β2 对心脏核心转录因子的调控作用。那么,其他表观遗传修饰是否也参与了 TGF-β2 对心脏相关转录因子的调

控,抑制组蛋白 H3 乙酰化是否可阻止 TGF-β2 引起的心脏相关转录因子高表达仍有待于进一步研究。

参考文献:

[1] Satou Y, Satoh N. Gene regulatory networks for the development and evolution of the chordate heart[J]. Genes Dev, 2006, 20(19): 2634 - 2638.

[2] Backs J, Olson E N. Control of cardiac growth by histone acetylation/deacetylation[J]. Circ Res, 2006, 98(1): 15 - 24.

[3] Lobanenkov V, Loukinov D, Pugacheva E. Environmental epigenomics and disease susceptibility[J]. Epigenetics, 2011, 3(3): 261 - 266.

[4] Haluskova J. Epigenetic studies in human diseases[J]. Folia Biol (Praha) 2010, 56(3): 83 - 96.

[5] Yang X J, Seto E. Lysine acetylation: codified crosstalk with other posttranslational modifications[J]. Mol Cell. 2008, 31(4): 449 - 461.

[6] Ordovas J M , Smith C E. Epigenetics and cardiovascular disease[J]. Nat Rev Cardiol, 2010, 7(9): 510 - 519.

[7] 朱静, 冯川, 李莉, 等. 干扰组蛋白乙酰化引发间充质干细胞心肌定向分化特定蛋白的异常表达[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(4): 303 - 306.

[8] Feng C, Zhu J, Zhao L, *et al*. Suberoylanilide hydroxamic acid promotes cardiomyocyte differentiation of rat mesenchymal stem cells[J]. Exp Cell Res, 2009, 315(17): 3044 - 3051.

[9] Wu G, Nan C, Rollo J C, *et al*. Sodium valproate-induced congenital cardiac abnormalities in mice are associated with the inhibition of histone deacetylase[J]. J Biomed Sci, 2010, 17: 16.

[10] Chen G, Zhu J, Lv T, *et al*. Spatiotemporal expression of histone acetyltransferases, p300 and CBP, in developing embryonic hearts [J]. J Biomed Sci, 2009, 16: 24.

[11] 王琳轶, 田杰, 钟立霖, 等. 姜黄素干预乙醇对心肌祖细胞 H3K9 的高乙酰化失衡及心脏发育相关基因表达异常[J]. 临床心血管病杂志, 2011, 27(4): 303 - 306.

[12] Massague J, Gomis R R. The logic of TGFbeta signaling[J]. FEBS Lett, 2006, 580(12): 2811 - 2820.

[13] Azhar M, Schultz-Jel J, Grupp I, *et al*. Transforming growth factor beta in cardiovascular development and function[J] Cytokine Growth Factor Rev, 2003, 14(5): 391 - 407.

[14] Azhar M, Runyan R B, Gard C, *et al*. Ligand-specific function of transforming growth factor beta in epithelial-mesenchymal transition in heart development[J]. Dev Dyn, 2009, 238(2): 431 - 442.

[15] Song L, Yan W, Chen X, *et al*. Myocardial smad4 is essential for cardiogenesis in mouse embryos[J]. Circ Res, 2007, 101(3): 277 - 285.

[16] 常在, 杨中州. 心脏发育过程中的信号调控机制研究[J]. 生命科学, 2007, 19(4): 353 - 358.

[17] 王剑. 利用条件基因剔除技术研究 Smad4 基因在心脏发育与疾病中的功能[D]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院, 2005.

(**收稿**:2012-10-11;**修回**:2012-12-20)

(编辑 王 红)

(上接 634 页)

出未明显加重,C5 ~ 6 关节突关节前方的黄韧带较前增厚。建议去骨科手术治疗被拒,在患者强烈要求下再次应用钩活术治疗,治疗后 2 周时上述症状才减轻,疼痛 VAS 评分从治疗前 5 分下降到 2 分,JOA 评分神经功能改善率"良"[(11 - 3)/(17 - 3) × 100% = 57.14% > 50%],逐渐恢复了部分工作至今。

2 讨论

脊髓型颈椎病是临床上最严重的颈椎病类型。对多节段颈椎间盘突出、后纵韧带骨化、排便障碍、颈椎管严重骨性狭窄者目前主张早期手术治疗以保护脊髓功能[1]。牵引、针灸、推拿、理疗、中西药物、神经阻滞等保守治疗对早期或者轻中度合适的患者仍然在临床上广泛使用并有效[3]。钩活术是魏玉锁医师受中医锋钩针启发发明了"钩鍉针",并用独创的新夹脊穴对脊柱旁软组织进行钩治的疗法,是临床治疗颈腰椎病的一种新的途径和方法,经验证见效快、有效率高。脊柱的屈伸侧弯旋转各种活动同时也改变着椎管内脊髓、椎间孔内脊神经、颈部椎动脉的压强状态,这个压强维持在一个正常的范围,这就是椎管内外"(压)力"平衡。当颈腰椎间盘及小关节病变、黄韧带增厚、椎间孔周围软组织病变打破这个平衡,使脊髓和(或者)脊神经的压强超过一定阈值就会出现严重症状和功能障碍。钩活术使用特制的针具,按照 2010 年 4 月国家中医药管理局在《基层中医药适宜技术手册》已制定的钩活术操作规范对脊柱旁软组织进行特定的钩治。通过调节脊柱外围和椎间孔周围的软组织张力,重塑椎管内外"力"平衡,让椎管内和椎间孔的脊髓脊神经及颈部血管受到的超过阈值的压强下降,达到减轻症状和恢复神经功能的目的[4-6]。钩活术是软组织微创手术,是介于非手术和手术之间的疗法,需要严格选择适应证,需要一定资质和经过专业培训的医师并在正规医疗机构开展;钩活术已经通过了国家级专家鉴定,是中医药管理局适宜技术推广项目。本例慢性脊髓型颈椎病患者是不相邻的 2 个椎间盘突出,伴黄韧带病变,伴随出现脊髓型颈椎病少见的咀嚼无力症状。出现严重咀嚼无力的机制尚不清楚,可能与三叉神经脊束及运动核与颈部神经丛在第 1 ~ 2 颈髓后角相互联系相关。芮炳峰等[7]观察发现颈神经根间的吻合支普遍存在,通过颈部钩活术治疗后咀嚼无力明显好转或可佐证。本例患者病情随着时间迁延,MRI 显示颈椎间盘没有明显改变,黄韧带增厚使椎管内脊髓受压有所增加;经过 3 次钩活术治疗,均只治疗 1 次,第 1 次起效快,第 2、3 次起效依次变慢,病情复发时间间隔逐渐缩短,神经功能恢复时间也逐渐延长。综上所述,钩活术治疗脊髓型颈椎病可能通过软组织松解减轻椎管内脊髓的压力和改善受损的微循环,减轻症状和恢复神经功能;但不能改变椎间盘突出等硬性压迫,治疗后有复发倾向,需要积极采取进一步的治疗,以防止不可逆的神经功能损害。

参考文献:

[1] 王恒龙, 姜振国, 朱剑, 等. 脊髓型颈椎病前路手术 48 例临床分析[J]. 实用骨科杂志, 2009, 15(6): 445 - 446.

[2] 张杭, 孙天威, 卢守亮, 等. 单开门椎管成形术与全椎板减压融合内固定术治疗脊髓型颈椎病的临床疗效比较[J]. 中国修复重建外科杂志, 2012, 26(10): 1191 - 1196.

[3] 刘练. 综合方法治疗脊髓型颈椎病 21 例[J]. 实用中医药杂志, 2011, 27(3): 171.

[4] 杨峰, 朱换平. 钩活术治疗神经根型颈椎病 124 例临床观察[J]. 中国社区医师: 医学专业, 2011, (32): 207.

[5] 桂忠诚, 史加全. 钩活术治疗椎动脉型颈椎病临床疗效分析[J]. 临床合理用药杂志, 2011, 4(11C): 103.

[6] 魏玉锁. 钩活术治疗神经根型颈椎病[J]. 中国民间疗法, 2008, 16(1): 15 - 16.

[7] 芮炳峰, 安淑芬, 夏凤歧, 等. 颈神经及相关结构的应用解剖学观察[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(24): 2296 - 2298.

(**收稿**:2013-01-08;**修回**:2013-03-07)

(编辑 吴培红)