

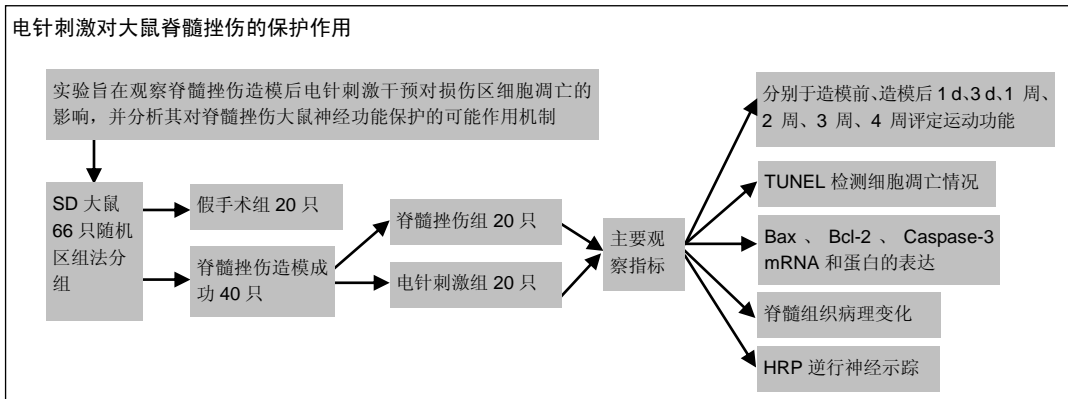
电针刺激对脊髓挫伤模型大鼠神经细胞凋亡的影响

刘建敏¹, 王福川¹, 周亚净², 穆丽², 侯少科², 郝丽娜², 张子檀²(河北医科大学附属邢台市人民医院, ¹创伤骨科, ²麻醉科, 河北省邢台市 054001)

引用本文: 刘建敏, 王福川, 周亚净, 穆丽, 侯少科, 郝丽娜, 张子檀. 电针刺激对脊髓挫伤模型大鼠神经细胞凋亡的影响[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(5):616-621.

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.2016.05.002 ORCID: 0000-0001-7017-4688(刘建敏)

文章快速阅读:



刘建敏, 男, 1981 年生, 河北省邢台市人, 汉族, 2009 年河北医科大学毕业, 硕士, 主治医师, 主要从事神经损伤、断肢再植、创伤骨科、手外科方面的研究。

通讯作者: 王福川, 硕士, 主任医师, 河北医科大学附属邢台市人民医院创伤骨科, 河北省邢台市 054001

中图分类号:R318

文献标识码:B

文章编号:2095-4344

(2016)05-00616-06

稿件接受: 2015-11-18

http://www.crter.org

文题释义:

脊髓挫伤: 指脊髓外伤后出现的神经功能的丧失, 如果比较短暂, 是由脊髓震荡引起; 持续时间较长的, 则是由挫伤或出血对脊髓产生压迫所致; 永久性的功能丧失, 则是由脊髓裂伤或横断伤所造成。

细胞凋亡: 细胞凋亡指为维持内环境稳定, 由基因控制的细胞自主的有序的死亡。细胞凋亡与细胞坏死不同, 细胞凋亡不是一件被动的过程, 而是主动过程, 它涉及一系列基因的激活、表达以及调控等的作用, 它并不是病理条件下, 自体损伤的一种现象, 而是为更好地适应生存环境而主动争取的一种死亡过程。

摘要

背景: 实验研究表明, 电针对于脊髓损伤的功能恢复具有促进作用, 可以降低疼痛, 提高急性脊髓损伤的术后疗效。

目的: 观察脊髓挫伤造模后电针刺激干预对损伤区细胞凋亡的影响, 并分析其对脊髓挫伤大鼠神经功能保护的可能作用机制。

方法: 成年雌性 SD 大鼠 66 只, 采用随机区组法分为假手术组 20 只和大鼠急性脊髓挫伤造模成功 40 只, 造模成功大鼠再随机分为脊髓挫伤组、电针刺激组。分别于造模前、造模后 1 d、3 d、1 周、2 周、3 周、4 周通过 BBB 评分、斜板试验进行运动功能评定。造模后 3 d, 通过 TUNEL 法检测各实验组大鼠脊髓挫伤区神经细胞的凋亡情况; RT-PCR、Western blot 检测脊髓挫伤区周围 bax、bcl-2、caspase-3 基因转录和蛋白的表达; 苏木精-伊红染色观察脊髓挫伤区病理组织形态学变化; HRP 示踪观察神经纤维的再生情况。

结果与结论: ①电针刺激组 2 项运动功能评分在治疗后 2 周各个时间点均较脊髓挫伤组显著增加 ($P < 0.05$)。②造模后 3 d 经脊髓电针刺激组细胞凋亡指数均明显低于脊髓挫伤组 ($P < 0.05$)。③造模后 72 h, 与脊髓挫伤组相比经脊髓电针刺激组 bax、caspase-3 基因和蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$); bcl-2 基因和蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$)。④造模后 4 周, HRP 阳性神经纤维数: 假手术组最多, 电针刺激组次之, 脊髓挫伤组最少, 各组之间差异有显著性意义 ($P < 0.05$)。结果提示, 电针刺激治疗通过减少大鼠脊髓挫伤区神经细胞的凋亡对脊髓挫伤起到保护作用。

关键词:

实验动物: 神经损伤与修复动物模型; 脊髓挫伤; 电针刺激; 神经再生; 运动功能

主题词:

脊髓损伤; 电针; 神经再生; 组织工程

Effect of electroacupuncture stimulation on apoptosis of nerve cells in a rat model of spinal cord contusion

Abstract

BACKGROUND: Electroacupuncture has promoting effects on the functional recovery of the injured spinal cord, can decrease pain, and elevate postoperative effect after acute spinal cord contusion.

Liu Jian-min¹,
Wang Fu-chuan¹,
Zhou Ya-jing², Mu Li²,
Hou Shao-ke², Hao Li-na²,
Zhang Zi-tan² (¹Department of Orthopedic Trauma, People's Hospital of Xingtai City, Hebei Medical University, Xingtai 054001, Hebei Province, China; ²Department of Anesthesiology, People's Hospital of Xingtai City, Hebei Medical University, Xingtai 054001, Hebei Province, China)

Liu Jian-min, Master,
 Attending physician,
 Department of Orthopedic
 Trauma, People's Hospital of
 Xingtai City, Hebei Medical
 University, Xingtai 054001,
 Hebei Province, China

Corresponding author: Wang
 Fu-chuan, Master, Chief
 physician, Department of
 Orthopedic Trauma, People's
 Hospital of Xingtai City,
 Hebei Medical University,
 Xingtai 054001, Hebei
 Province, China

Subject headings: Spinal
 Cord Injuries;
 Electroacupuncture; Nerve
 Regeneration; Tissue
 Engineering

OBJECTIVE: To observe the effect of electroacupuncture on apoptosis in the injured site after spinal cord contusion, and analyze its neuroprotective effects on neurological function in rats with spinal cord contusion. **METHODS:** A total of 66 adult female Sprague-Dawley rats were randomly divided into: sham surgery group ($n=20$), spinal cord contusion group ($n=20$), electroacupuncture stimulation group ($n=20$) because six rats were excluded due to modeling failure and death. Before model establishment, at 1, 3 days, 1, 2, 3 and 4 weeks after model establishment, motor functions were evaluated by BBB score and the inclined plate test. At 3 days after model establishment, apoptosis of nerve cells could be detected in the site of injury in each experimental group using TUNEL assay. mRNA and protein expression of bax, bcl-2 and caspase-3 was detected surrounding the injury site using RT-PCR and western blot assay. Morphological changes in the site of injury could be observed using hematoxylin-eosin staining. The regeneration of nerve fibers was observed using HRP tracing. **RESULTS AND CONCLUSION:** (1) Motor function score was significantly increased at various time points in the 2nd week of treatment in the electroacupuncture stimulation group than in the spinal cord contusion group ($P < 0.05$). (2) Apoptotic index was significantly lower in the electroacupuncture stimulation group than in the spinal cord contusion group at 3 days after model establishment ($P < 0.05$). (3) mRNA and protein expression of bax and caspase-3 was significantly lower in the electroacupuncture stimulation group than in the spinal cord contusion group at 72 hours ($P < 0.05$); bcl-2 gene and protein expression was significantly higher ($P < 0.05$). (4) The number of HRP-positive nerve fibers was highest in the sham surgery group, followed by electroacupuncture stimulation group, and lowest in the spinal cord contusion group at 4 weeks ($P < 0.05$). Results indicated that electroacupuncture plays a protective role on the spinal cord contusion by reducing apoptosis of nerve cells at the site of injury. **Cite this article:** Liu JM, Wang FC, Zhou YJ, Mu L, Hou SK, Hao LN, Zhang ZT. Effect of electroacupuncture stimulation on apoptosis of nerve cells in a rat model of spinal cord contusion. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu.* 2016;20(5):616-621.

0 引言 Introduction

脊髓受到直接或间接暴力后,其内部出现出血、水肿,部分神经元进入细胞凋亡阶段,进而神经系统功能受到不同程度破坏,导致神经传导中断,此为脊髓损伤后主要的病理改变。尽量减少神经元细胞凋亡的数量,无疑可保留更多脊髓损伤后的神经功能^[1-3]。有实验研究表明,电针对于脊髓损伤的功能恢复具有促进作用^[4-5],另有研究表明电针督脉穴与夹脊穴临床治疗脊髓损伤有显著疗效^[6-8],电针刺激可以降低疼痛且能提高急性脊髓损伤的术后疗效,其也可联合其他康复手段来更好的帮助损伤的脊髓功能恢复。本实验探讨脊髓损伤造模后电针刺激干预对损伤区神经再生及损伤区细胞凋亡的影响和保护作用。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 造模动物及材料 随机对照动物实验于2013年3月至2015年2月在河北医科大学动物实验室完成。

清洁级成年雌性SD大鼠,3月龄大鼠,清洁级66只,体质量240-290 g,购自河北医科大学动物实验室,动物许可证号:SCXK(冀)20070005。

1.2 造模方法 脊髓损伤模型的建立:取46只大鼠以体积分数10%水合氯醛(350 mg/kg)腹腔注射麻醉。俯卧位将大鼠固定在实验平台上,腰背部备皮满意后,按T₈₋₉棘突为切口中心,自大鼠背部正中逐层切开,充分显露T₇₋₁₀的棘突和椎板,咬除T₈₋₉棘突和部分椎板,暴露硬膜保持完整,作为损伤区。按照改良的Allen法打击,将10 g重物由2.5 cm高度处自由落下,撞击大鼠硬膜及脊髓组织。用双氧水冲洗伤口,逐层缝合大鼠损伤区切口。

1.3 造模成功的检测标准 造模后大鼠尾巴痉挛摆动且双下肢瘫痪表明成功。造模后每日挤尿两三次,直至大鼠恢复排尿反射。

1.4 电针刺激干预 剔除造模失败的3只及造模后死亡的3只,余下40只大鼠随机等分为模型组和电针刺激组。另20只大鼠只暴露脊髓组织,作为假手术组。

电针刺激组大鼠自模型完成6 h起采用督脉加体穴电针:选1寸毫针,于损伤部位(T₁₀)上、下取“大椎”“命门”穴,0.5 mm针,深达硬膜外并固定针刺位置。采用G-6805-1型电子针疗仪,疏密波,频率4 Hz,调节刺激强度以目测以大鼠后肢微微颤动为度,强度范围为0.3-0.6 mA,体穴:三阴交一后肢内踝尖直上10 mm左右,直刺4.0-5.0 mm;环跳一后肢髋关节后上缘,直刺6 mm;后三里一膝关节后外侧,在腓骨小头下约5 mm处,直刺6 mm;跟端一后肢外踝与跟腱之间的凹陷中,直刺3 mm,1次/d,30 min/次,连续3 d,直至取材。

1.5 运动功能评定 3组大鼠均于造模前、及造模后的1 d,3 d及1,2,3,4周进行相关运动功能评定。①BBB(Basso Beattie Bresnahan, BBB)评分:该评分系统将大鼠后肢运动功能分为22个等级,其中后肢全瘫为0分,功能完全正常为21分,主要观察内容包括关节活动数目和范围、负重程度及前后肢协调性、前后爪和尾部活动情况等。上述运动功能评定时间均统一为上午8:00。②斜板试验:将实验大鼠置于光滑木板上,其身体轴线与平板纵轴平行,平板每次升高5°,以大鼠能停留5 s(期间保持不下滑)的最大角度为其功能值。

1.6 TUNEL法检测凋亡细胞 造模后72 h,每组各取5只大鼠,水合氯醛麻醉后剖胸,经左心室主动脉插管,通过40 g/L多聚甲醛灌流固定。以脊髓伤区为中心取2.0 cm脊髓组织,经多聚甲醛浸泡固定。TUNEL法检测计数,按德国Roche公司试剂盒购操作。待水化、37 °C条件下蛋白酶K消化10 min,行标记液标记后,37 °C下,经生物素化的地高辛反应30 min,加SABC, DAB显色。封固,损伤区周

围随机选取不重复的6个高倍视野,对胞核含棕黄色颗粒的细胞计数。

1.7 RT-PCR检测 3组大鼠在造模后3 d随机抽取5只,取大鼠脊髓挫伤区的脊髓组织50 mg,以Trizol说明书法提取视网膜的总RNA,总RNA含量测定采用紫外分光光度计法,用RT-PCR两步法试剂盒(TaKaRa公司)将mRNA反转录成cDNA,接着再将cDNA行PCR扩增。用以下引物见表1, Bcl-2、Bax和Caspase-3引物根据Genebank资料,利用primer 5.0引物设计软件确定最优引物,然后经Blast比对,由上海生工生物有限公司合成。取扩增产物行电泳,电泳结果通过凝胶图像分析系统进行吸光度分析,计算Bcl-2, Bax, Caspase-3与GAPDH的吸光度积分的比值,作为bcl-2, bax, caspase-3 mRNA表达的指标。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列	产物长度 (bp)	反应温度
bcl-2	上游5'-TGA ACC GGC ATC TGC ACA C-3'	115	56 °C
	下游5'-CGT CTT CAG AGA CAG CCA GGA G-3'		
caspase-3	上游5'-AGA GCT GGA CTG CGG TAT TGA G-3'	148	56 °C
	下游5'-GAA CCA TGA CCC GTC CCT TG-3'		
bax	上游5'-ACA CCT GAG CTG ACC TTG GA-3'	133	56 °C
	下游5'-CCG TGT CCA CGT CAG CAA TC-3'		
GAPDH	上游5'-ATC TTC CAG GAG CGA GAT-3'	248	56 °C
	下游5'-TAA GCA GTT GGT GGT GCA-3'		

1.8 Western Blot检测 RT-PCR提取后的剩余物经1 500 r/min离心30 min后,取上清为粗体蛋白, Bradford法测定总的蛋白浓度。5%浓缩胶40 V恒压1 h, 10%分离胶60 V恒压3.5 h, 湿转14 V恒压14 h, 37 °C摇床封闭2 h, 洗膜10 min, 3次, 兔抗鼠抗体Bax、Bcl-2或(1 : 800)4 °C过夜; 抗鼠GAPDH(1 : 1 000)4 °C过夜。TBST洗膜5 min×4次, 山羊抗兔抗体1 : 700, 37 °C摇床孵育1.5 h, TBST洗膜5 min×4次。再次运用TBS洗膜10 min后DAB显色, 按Quantity one图像进行分析研究, Bax、Bcl-2和Caspase-3与GAPDH的灰度积分的比值进行分析, 作为Bax、BCL-2、Caspase-3蛋白表达的量。

1.9 苏木精-伊红染色 造模后4周, 假手术组、脊髓挫伤组、电针刺激组每组各处死5只大鼠, 取材行苏木精-伊红染色, 体积分数10%水合氯醛350 mg/kg麻醉满意后剖胸, 充分的显露大鼠的心脏, 通过升主动脉插管, 剪开右心耳后先用生理盐水冲洗, 再以40 g/L多聚甲醛固定后, 完整地取出损伤区脊髓组织, 取损伤部位的脊髓组织约1 cm, 乙醇梯度脱水后行脊髓的纵行冰冻切片, 厚度为20 μm, 苏木精-伊红染色: 苏木精染色5 min后, 经自来水冲洗, 盐酸乙醇分化10 s, 再次自来水冲洗10 min, 伊红染色7 min, 自来水洗后, 以梯度乙醇脱水, 通过二甲苯透明, 以中性树脂胶封固。

1.10 荧光金示踪 造模后4周, 用生理盐水溶解HRP。

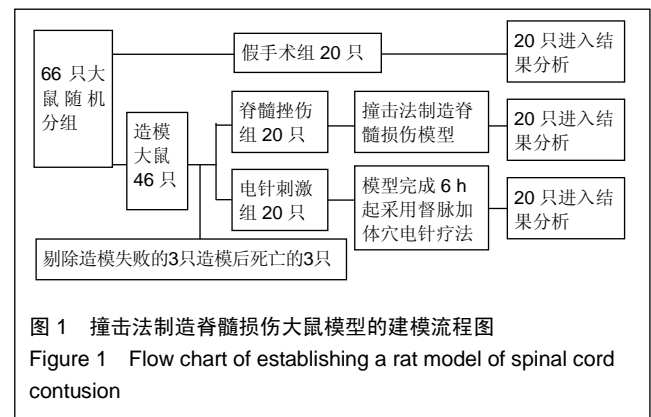
每组随机抽取5只大鼠, 在麻醉后手术展现脊髓。以0.1 μL/10 min的速度注射50% HRP 1 μL, 注射完毕后留针15 min。在T₁₂脊髓的背正中静脉左、右侧1 mm处进针, 进针深度为1.5 mm。饲养3 d。在水合氯醛麻醉下, 40 g/L的多聚甲醛心脏灌注, 并且取出T₃-T₁₁脊髓, 浸入30%的4 °C蔗糖溶液20 h后制作成5 μm的冰冻切片, 而DAB加强染色法。在其光镜下计数HRP阳性神经纤维束数目在脊髓横切面上, 每组各时点随机抽取10张切片进行纤维束阳性计数。

1.11 主要观察指标 ①运动功能评定结果。②TUNEL检测细胞凋亡结果。③Bax、Bcl-2、Caspase-3 mRNA和蛋白的表达结果。④脊髓组织病理变化。⑤HRP逆行神经示踪。

1.12 图像与统计学分析 通过Image-ProPlus 6.0软件进行图像分析。实验数据用SPSS 17.0软件分析, 两组均数比较用非配对t检验。

2 结果 Results

2.1 造模成功动物数量及过程 造模成功SD大鼠60只, 分为3组, 实验过程中无脱失, 全部进入结果分析。造模动物流程图见图1。



2.2 运动功能评定结果 造模前所有大鼠的BBB评分、斜板试验差异均无显著性意义($P > 0.05$)。电针刺激治疗后, 电针刺激组2项评分在各时间点(造模后1-4周)较脊髓挫伤组都明显增加, 差异有显著性意义($P < 0.05$)。3项评分在造模后1-4周较假手术组低, 差异有显著性意义($P < 0.05$)。见表2。

2.3 TUNEL检测细胞凋亡结果 凋亡神经细胞的细胞核内可见特异性棕黄色颗粒, 光镜下可见凋亡细胞散布于整个脊髓挫伤区, 损伤区边缘亦可见凋亡阳性细胞。TUNEL法测定, 电针刺激组中, 免疫组织化学呈棕黄色颗粒的凋亡细胞数(12.63±3.29)明显少于脊髓挫伤组(28.78±5.69)($P < 0.05$), 假手术组未见凋亡细胞(0.00±0.00)见图2。

2.4 Bax、Bcl-2、Caspase-3 mRNA的表达结果 结果(图3, 表3)显示大鼠脊髓造模后72 h, 电针刺激组损伤区脊髓组织Bax、Caspase-3 mRNA的表达高于假手术组, Bcl-2 mRNA的表达低于假手术组, 差异有显著性意义($P < 0.05$); 造模后72 h, 与脊髓挫伤组相比经脊髓电针刺激

表 2 各组大鼠 BBB 评分和斜板试验结果

($\bar{x} \pm s, n=9$)

Table 2 BBB score and the inclined plate test results in rats of each group

组别	损伤前	造模后					
		1 d	3 d	1周	2周	3周	4周
BBB评分							
脊髓挫伤组	21.00±0.00	0.00±0.00	1.26±0.04	2.63±0.58	8.39±1.31	11.14±1.09	13.56±0.39
电针刺激组	21.00±0.00	0.00±0.00	2.38±0.11	3.80±1.04	10.42±1.63	12.98±1.40	15.28±0.14
假手术组	21.00±0.00	18.91±0.06	20.29±0.17	20.85±0.16	21.00±0.00	21.00±0.02	21.00±0.00
斜板试验(°)							
脊髓挫伤组	42.50±3.38	15.61±1.60	16.41±1.47	21.71±2.14	22.79±2.37	26.21±2.33	28.27±1.23
电针刺激组	42.50±2.27	16.82±2.24	18.69±1.81	24.55±2.23	30.12±2.82	34.56±2.48	38.49±2.15
假手术组	42.50±2.43	40.16±2.32	41.31±2.29	42.40±2.39	42.51±2.06	42.52±1.79	42.45±1.30

表注: 电针刺激组 2 项评分在 2 造模后 1-4 周较脊髓挫伤组都明显增加。

表 3 各组大鼠脊髓损伤区 bax、bcl-2、caspase-3 基因表达情况
($\bar{x} \pm s, n=5$, 相对表达量)

Table 3 bax, bcl-2 and Caspase-3 gene expression in the site of injury of rats in each group

组别	bax	bcl-2	caspase-3
脊髓挫伤组	2.92±0.36	0.22±0.07	2.71±0.34
电针刺激组	1.34±0.21 ^a	0.43±0.13 ^a	1.52±0.27 ^a
假手术组	0.87±0.13	0.85±0.26	0.89±0.15

表注: 造模后 72 h, 与脊髓挫伤组相比经脊髓电针刺激组 bax、caspase-3 mRNA 的表达显著降低, bcl-2 mRNA 的表达显著升高。与其他 2 组比较, ^a $P < 0.05$ 。

表 4 各组大鼠脊髓损伤区 Bax、Bcl-2、Caspase-3 蛋白表达情况
($\bar{x} \pm s, n=5$, 相对表达量)

Table 4 Bax, Bcl-2 and Caspase-3 protein expression in the site of injury of rats in each group

组别	Bax	Bcl-2	Caspase-3
脊髓挫伤组	3.82±0.39	0.28±0.08	2.71±0.36
电针刺激组	1.32±0.25	0.43±0.15 ^a	1.47±0.27 ^a
假手术组	0.92±0.16	0.90±0.23	0.87±0.15

表注: 造模后 72 h, 与脊髓挫伤组相比经脊髓电针刺激组 Bax、Caspase-3 蛋白的表达显著降低; Bcl-2 蛋白的表达显著升高。与其他 2 组比较, ^a $P < 0.05$ 。

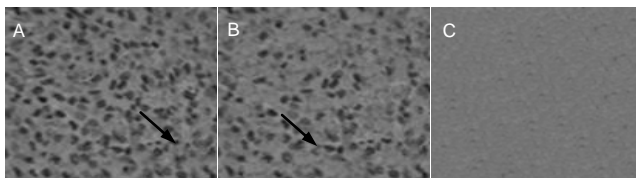


图 2 TUNEL 检测各组大鼠脊髓损伤区细胞凋亡(x200)

Figure 2 Apoptosis in the site of injury in rats of each group using TUNEL assay (x200)

图注: 图 A 为脊髓挫伤组凋亡细胞(箭头所指); B 为电针刺激组凋亡细胞(箭头所指); C 为假手术组未见凋亡细胞。

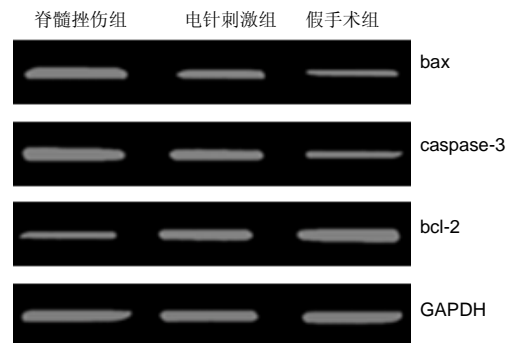


图 3 各组大鼠脊髓损伤区 bax、bcl-2、caspase-3 mRNA 的表达
Figure 3 bax, bcl-2 and Caspase-3 mRNA expression in the injury site of rats from each group

图注: 造模后 72 h, 与脊髓挫伤组相比经脊髓电针刺激组 bax、caspase-3 mRNA 的表达显著降低; bcl-2 mRNA 的表达显著升高。

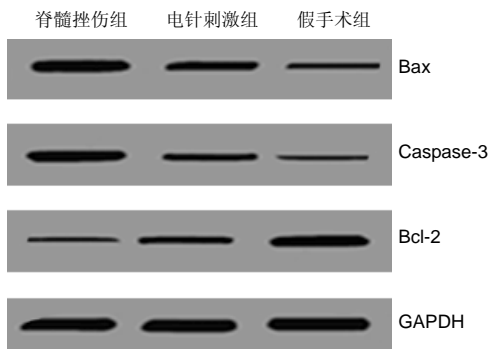


图 4 各组大鼠脊髓损伤区 Bax, Bcl-2, Caspase-3 蛋白表达

Figure 4 Bax, Bcl-2 and Caspase-3 protein expression in the injury site of rats from each group

图注: 造模后 72 h, 与脊髓挫伤组相比经脊髓电针刺激组 Bax、Caspase-3 蛋白的表达显著降低($P < 0.05$); Bcl-2 蛋白的表达显著升高($P < 0.05$)。

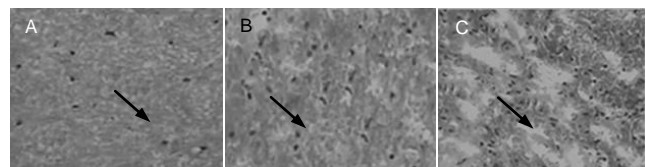


图 5 各组大鼠脊髓损伤区病理变化(x40)

Figure 5 Pathological changes in the site of injury of rats from each group (x40)

图注: 图 A 为假手术组脊髓组织结构清晰完整, 未见脊髓空洞及神经元凋亡(箭头指正常脊髓组织); B 为电针刺激组可见脊髓组织较为疏松, 脊髓空洞较小, 部分神经元坏死(箭头指部分神经元坏死); C 为脊髓挫伤组脊髓挫伤区组织结构疏松, 可见空洞形成(箭头指大量神经元坏死)。

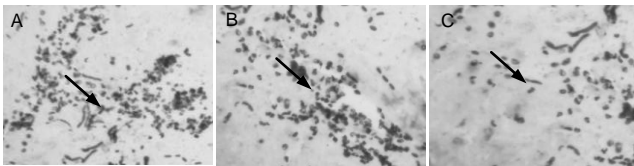


图6 各组大鼠脊髓损伤区 HRP 逆行神经示踪(箭头指 HRP 阳性纤维, $\times 200$)

Figure 6 HRP retrograde nerve tracing in the site of spinal cord injury in rats of each group (arrows show the number of HRP-positive fibers, $\times 200$)

图注: 图 A 为假手术组; B 为电针刺激组; C 为脊髓挫伤组。

组 *bax*、*caspase-3* mRNA 的表达显著降低 ($P < 0.05$); *bcl-2* mRNA 的表达显著升高 ($P < 0.05$)。

2.5 Bax、Bcl-2、Caspase-3 蛋白的表达 结果(图4, 表4)显示大鼠脊髓伤造模后 72 h, 电针刺激组损伤区脊髓组织 *Bax*、*Caspase-3* 蛋白的表达高于假手术组, *Bcl-2* 蛋白的表达低于假手术组, 差异有显著性意义 ($P < 0.05$); 造模后 72 h, 与脊髓挫伤组相比经脊髓电针刺激组 *Bax*、*Caspase-3* 蛋白的表达显著降低 ($P < 0.05$); *Bcl-2* 蛋白的表达显著升高 ($P < 0.05$)。

2.6 脊髓组织病理变化 大鼠脊髓挫伤造模后 4 周, 光镜下, 脊髓挫伤组脊髓挫伤区组织结构疏松, 可见脊髓空洞形成, 大量神经元坏死。电针刺激组脊髓挫伤区组织较为疏松, 脊髓空洞较小, 可见部分神经元坏死。假手术组脊髓组织结构完整清晰, 未见脊髓空洞及神经细胞凋亡。见图5。

2.7 HRP 逆行神经示踪 假手术组可见较多被 HRP 阳性颗粒标记的神经纤维; 电针刺激组 HRP 阳性颗粒标记的神经纤维密集程度介于假手术组与脊髓挫伤组之间, 见图6。HRP 阳性纤维数: 假手术组 (45.37 ± 5.69), 电针刺激组 (27.05 ± 4.62), 脊髓挫伤组 (9.38 ± 2.42), 组间比较差异均有显著性意义 ($P < 0.05$)。

3 讨论 Discussion

脊髓挫伤致残率高, 常遗留瘫痪等后遗症, 是临床医学的一大难题, 传统的治疗方法有手术减压治疗, 药物脱水消肿、营养神经、改善微循环及激素治疗, 以及中医、理疗等, 但总体疗效欠佳^[9-12]。脊髓挫伤造模后病理损害的发生包括原发性和继发性两种机制^[13-14]。造模后早期微循环障碍导致局部水肿、缺血缺氧, 进而大量炎症因子被激活, 产生大量自由基, 不利于神经元及轴突的再生。随即出现一系列的氧化反应, 发生免疫炎症反应, 致使脊髓挫伤区神经组织的损伤, 最终导致继发性脊髓挫伤, 从而导致许多临床神经功能缺失的症状及体征^[15-16]。

使用蚊式止血钳经椎板间隙精细操作将椎板揭开, 避免损伤椎板下脊髓, 此方法操作简单, 出血少, 可以保持硬脊膜的完整性, 防止脑脊液外流, 同时防止结缔组织、组织间液、细菌或其他有害物质的侵入; 而脊髓损伤模型

国内外多采用 Allen 法造模, 为减少手术时间及出血量, 将其改良进行造模。需要模型动物能成功维持长时间存活, 并能够符合临床特征, 造模方法又简便易行。因 SD 大鼠较其他鼠种抗病性好而能较好地耐受手术创伤, 操作简便, 成功率高, 容易饲养, 成本合理。

近年来电针刺激电针刺激作为传统的中医治疗方法, 现今已经受到越来越多学者们的关注。有研究报道, 脊髓损伤具有很大的恢复潜能。如能在受损早期给予合理、有效的针刺与康复治疗, 不仅会使血液循环得到改善, 还能预防肌肉萎缩、关节挛缩、骨质疏松的发生, 为进一步减轻脊髓功能损害带来的并发症具有很大的帮助^[17-20]。

有研究表明, 电针刺激大鼠下肢足三里环跳穴, 损伤侧的脊髓 GFAP 染色有显著降低表现, 表明电针刺激可以抑制星形胶质细胞的表达, 促使轴突功能的修复, 从而实现再生的目的^[21-22]。另有研究表明, 电针刺激可以干预脊髓缺血再灌注的损伤, 还能促进局部微环境的改善^[23]。发挥作用的机制可能是: ①抑制氧自由基和脂质过氧化损伤。②抑制神经细胞凋亡基因表达。③促进神经营养因子合成及受体的表达^[24]。此外有报道称, 电针刺激能显著增强脊髓损伤后尼氏体的恢复, 对脊髓损伤后神经的再生与修复具有促进作用^[25]。

为了进一步证实电针刺激对早期脊髓挫伤的神经细胞凋亡的抑制作用。本实验采用改良的 Allen 打击法建立大鼠急性脊髓挫伤模型, 观察电针刺激对其神经细胞凋亡的作用, 并探讨其对脊髓挫伤大鼠神经功能保护的可能作用机制。实验证实, 电针刺激组 2 项运动功能评分及细胞凋亡指数在治疗后均较脊髓挫伤组显著增加 ($P < 0.05$)。作者发现, 电针刺激组 *Bax*、*Caspase-3* 基因和蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$); *Bcl-2* 基因和蛋白表达明显升高 ($P < 0.05$), 提示电针刺激可能通过调节凋亡蛋白从而抑制神经细胞凋亡, HRP 阳性神经纤维数: 假手术组最多, 电针刺激组次之, 脊髓挫伤组最少, 各组之间差异有显著性意义 ($P < 0.05$), 有效促进大鼠脊髓挫伤的恢复。

由此可见, 电针刺激的早期应用具有抑制大鼠急性脊髓挫伤导致的损伤区神经细胞的凋亡, 保护神经细胞的作用, 从而明显减少神经功能损害, 该作用机制可能为电针刺激能有效抑制神经细胞 *bax*、*caspase-3* 基因和蛋白的表达, 促进 *bcl-2* 基因和蛋白表达, 从而达到抑制细胞凋亡的途径。总之, 通过电针刺激可使脊髓损伤区的微环境得到明显改善, 对减轻继发性神经损伤起重要作用。

作者贡献: 实验设计为刘建敏, 王福川, 周亚净, 实验实施为刘建敏, 王福川, 周亚净, 侯少科, 郝丽娜, 实验评估为刘建敏, 王福川, 资料收集为周亚净, 穆丽, 侯少科, 郝丽娜, 张子檀。

利益冲突: 所有作者共同认可文章无相关利益冲突。

伦理问题: 实验方案经河北大学动物实验伦理委员会批准, 批准号为 SCXK(冀)20070005。实验动物在戊巴妥钠麻醉下进行所有的手术, 并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。

文章查重: 文章出版前已经过 CNKI 反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审: 本刊实行双盲外审制度, 文章经国内小同行外审专家审核, 符合本刊发稿宗旨。

作者声明: 文章第一作者对研究和撰写的论文中出现的不良行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁, 可接受核查。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

4 参考文献 References

- [1] 李惠兰, 刘兰群, 卢虎英, 等. 减重步行训练和督脉电针对脊髓损伤大鼠神经营养因子及生长相关蛋白-43 表达的影响[J]. 中国康复理论与实践, 2012, 18(10): 930-933.
- [2] Chen K, Cheng HH, Zhou RJ, et al. Molecular mechanisms and functions of autophagy and the ubiquitin-proteasome pathway. Yi Chuan. 2012; 34(1): 5-18.
- [3] Erik Björklund, Eva Lindberg, Malin Rundgren, et al. Ischaemic brain damage after cardiac arrest and induced hypothermia - a systematic description of selective eosinophilic neuronal death. A neuropathologic study of 23 patients. Resuscitation. 2014; 85(4): 527-532.
- [4] 宋琳, 李晓宁, 王宁, 等. 电针对大鼠脊髓损伤后细胞凋亡 PARP-1 裂解片段表达的影响[J]. 中医药学报, 2011, 39(2): 86-88.
- [5] Oyinbo CA. Secondary injury mechanisms in traumatic spinal cord injury: a nugget of this multiply cascade. Acta Neurobiol Exp (Wars). 2011; 71(2): 281-299.
- [6] 孙为增, 王新家, 林丽艳, 等. 电针对急性脊髓损伤大鼠白细胞介素-1 B 表达变化的影响[J]. 中国康复理论与实践, 2009, 15(3): 208-210.
- [7] Chiu M, Tardito S, Barilli A. Glutamine stimulates mTORC 1 independent of the cell content of essential amino acids. Amino Acids. 2012; 43(6): 2561-2567.
- [8] Tanaka T, Mayuyama D, Takeda M, et al. Alzheimer disease and tau protein. Rinsho Shinkeigaku. 2012; 52(11): 1171-1173.
- [9] Pallini R, Vitiani LR, Bez A, et al. Homologous transplantation of neural stem cells to the injured spinal cord of mice. Neurosurgery. 2005; 57: 1014-1025.
- [10] 陈庆林, 陈勤, 金蓓蓓, 等. 远志皂苷对 AD 小鼠学习记忆能力及中枢胆碱能系统标志酶活性的影响[J]. 中药药理与临床, 2011, 27(3): 33-36.
- [11] Xie Y. Structure, assembly and homeostatic regulation of the 26S proteasome. J Mol Cell Biol. 2010; 2(6): 308-317.
- [12] Bulic B, Pickhardt B, Mandelkow EM, et al. Development of Tau aggregation inhibitors for Alzheimer's Disease. Medicinal Chemistry. 2009; 48: 1740-1752.
- [13] Williamson A, Wemer A, Rape M, et al. The Colossus of ubiquitylation: decrypting a cellular code. Mol Cell. 2013; 49(4): 591-600.
- [14] Hegde AN, Upadhyaya SC. Role of ubiquitin-proteasome-mediated proteolysis in nervous system disease. Biochim Biophys Acta. 2011; 1809(2): 128-140.
- [15] Ariake K, Ohtsuka H, Motoi F, et al. GCF2/LRRFIP1 promotes colorectal cancer metastasis and liver invasion through integrin-dependent RhoA activation. Cancer Letters. 2012; 325(1): 99-107.
- [16] Pearse DD, Sanchez AR, Pereira FC, et al. Transplantation of Schwann cells and/or olfactory ensheathing glia into the contused spinal cord: Survival, migration, axon association, and functional recovery. Glia. 2007; 55(9): 976-1000.
- [17] Sanli AM, Serbes G, Sargon MF, et al. Methothrexate attenuates early neutrophil infiltration and the associated lipid peroxidation in the injured spinal cord but does not induce neurotoxicity in the uninjured spinal cord in rats. Aeta Neurochirurgica. 2012; 154(6): 1045-1054.
- [18] 李丽, 周霞, 杨军, 等. 电针联合康复训练对脊髓损伤大鼠脑源性神经营养因子及其受体酪氨酸激酶 B 表达的影响[J]. 中华物理医学与康复杂志, 2011, 33(12): 61-63.
- [19] Wu MF, Zhang SQ, Liu JB, et al. Neuroprotective effects of electroacupuncture on early- and late-stage spinal cord injury. Neural Regen Res. 2015; 10(10): 1628-1634.
- [20] Geng X, Sun T, Li JH, et al. Electroacupuncture in the repair of spinal cord injury: inhibiting the Notch signaling pathway and promoting neural stem cell proliferation. Neural Regen Res. 2015; 10(3): 394-403.
- [21] Huang SF, Ding Y, Ruan JW. An experimental electroacupuncture study in treatment of the rat demyelinated spinal cord injury induced by ethidium bromide. Neurosci Res. 2011; 70(3): 294-304.
- [22] Yang JH, Lv JG, Wang H, et al. Electroacupuncture promotes the recovery of motor neuron function in the anterior horn of the injured spinal cord. Neural Regen Res. 2015; 10(12): 2033-2039.
- [23] Rodriguez KA, Gaczynska M, Osmulski PA, et al. Molecular mechanisms of proteasome plasticity in aging. Mech Ageing Dev. 2010; 131(2): 144-155.
- [24] 李晓宁, 田旭升, 刘芳, 等. 电针对大鼠脊髓损伤后细胞凋亡相关基因 Caspase-9 的研究[J]. 中医药信息, 2009, 26(1): 61-63.
- [25] Sun T, Cui CB, Luo JG, et al. Effect of electroacupuncture on the expression of spinal glial fibrillary acidic protein, tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta in chronic neuropathic pain rats. Zhen Ci Yan Jiu. 2010; 35(1): 12-16.