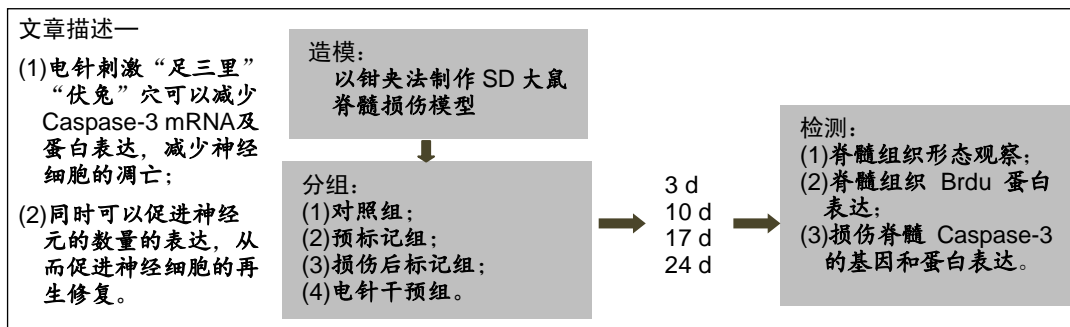


# 电针脊髓损伤模型大鼠“足三里”与“伏兔”穴神经细胞凋亡因子 Caspase-3 的表达

魏卫兵<sup>1</sup>, 周宾宾<sup>2</sup>, 张鸿升<sup>3</sup>, 杨宇<sup>2</sup>, 崔俊武<sup>2</sup>, 李振兴<sup>2</sup> (<sup>1</sup>柳州市中医医院, 广西壮族自治区柳州市 545000; <sup>2</sup>广西中医药大学第一附属医院, 广西壮族自治区南宁市 530000; <sup>3</sup>广西中医药大学附属瑞康医院, 广西壮族自治区南宁市 530000)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.2864 ORCID: 0000-0001-6069-4997(魏卫兵)

文章快速阅读:



魏卫兵, 男, 1989 年生, 江西省丰城市人, 汉族, 2019 年广西中医药大学毕业, 硕士, 主要从事颈椎病的诊治与研究的工作。

通讯作者: 周宾宾, 主任医师, 广西中医药大学第一附属医院, 广西壮族自治区南宁市 530000

文献标识码: B  
投稿日期: 2019-10-24  
送审日期: 2019-10-30  
采用日期: 2019-12-16  
在线日期: 2020-05-30



文题释义:

**caspase 家族:** Caspases 是近年来发现的一组存在于胞质溶胶中的结构上相关的半胱氨酸蛋白酶, 它们的一个重要共同点是活性位点都含有半胱氨酸, 并特异地断开天冬氨酸残基后的肽键, 现已确定至少存在 11 种 caspase, 参与细胞凋亡执行的则是 caspase 3, caspase 6 和 caspase 7, 其中 caspase 3 和 7 具有相近的底物和抑制剂特异性。

**细胞凋亡:** 是细胞的一种基本生物学现象, 在多细胞生物去除不需要的或异常的细胞中起着必要的作用, 凋亡是多基因严格控制的过程, 当脊髓损伤发生时, Bcl-2 家族、caspase 家族等开始发生调控作用。

摘要

**背景:** 中医自《内经》开始就提出了“治痿独取阳明”之理论, 但是有关电针干预足阳明胃经治疗脊髓损伤的报道相对较少。

**目的:** 探讨电针刺激“足三里”“伏兔”穴对脊髓损伤大鼠受损节段 Caspase-3 表达的影响。

**方法:** 将 64 只 SPF 级 SD 雌性大鼠随机分为 4 组, 即对照组、预标记组、损伤后标记组和电针干预组, 每组 16 只。对照组及预标记在操作前给予 Brdu(50 mg/kg)连续 10 d 腹腔注射标记细胞, 对照组于第 11 天给予咬除椎板, 并不损伤脊髓, 预标记组第 11 天给予制作脊髓损伤模型; 损伤后标记组及电针组在制作脊髓损伤后连续 10 d 腹腔注射 Brdu 标记细胞, 其中损伤后标记组不给予干预措施, 电针组造模后第 3 天开始针刺足三里、伏兔穴。各组分别于损伤后 3, 10, 17, 24 d 取脊髓组织, 运用苏木精-伊红染色观察神经元数量的变化; 免疫组织化学染色观察 Brdu 阳性细胞表达; qRT-PCR 技术检测 Caspase-3 mRNA 的变化; Western blot 检测 Caspase-3 蛋白表达的变化。实验方案经广西医科大学动物实验伦理委员会批准(批准号 201712001)。

**结果与结论:** ①脊髓损伤以后 Caspase-3 的 mRNA 及蛋白表达均高于脊髓没有受到损伤的对照组, 脊髓损伤后神经元的数量明显较对照组少; 随着时间的推移, 预标记组、损伤后标记组及电针干预组 Caspase-3 mRNA 及蛋白表达先升高后降低, 而电针组的 Caspase-3 表达明显减少, 与预标记组及损伤后标记组比较差异有显著性意义( $P < 0.05$ ); ②苏木精-伊红染色显示随着时间的推移电针组的神经元数量明显比未经干预的预标记组、损伤后标记组高, 在第 24 天时逐渐接近对照组的神经元数量; ③免疫组织化学结果显示电针组阳性蛋白表达呈先升高后降低的趋势, 17 d 升至最高, 24 d 降至最低, 整体阳性蛋白表达高于其他组 ( $P < 0.05$ ); ④结果说明, 电针刺激“足三里”“伏兔”穴可以减少 Caspase-3 mRNA 及蛋白表达, 减少神经细胞的凋亡, 同时可以促进神经元数量的增加, 从而促进神经细胞的再生修复。

关键词:

脊髓损伤; 电针刺激; 足三里; 伏兔; Caspase-3; 大鼠; 实验

中图分类号: R446; R496; R318

基金资助:

国家自然科学基金(81660814), 项目负责人: 周宾宾; 广西自然科学基金(2016JJA140159, 2017JJA140554z), 项目负责人: 周宾宾

Wei Weibing, Master, Liuzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Liuzhou 545000, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Corresponding author: Zhou Binbin, Chief physician, First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530000, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

## Effect of Electroacupuncture at *Zusanli* and *Futu* acupoints on expression of apoptosis factor Caspase-3 in spinal cord injury rats

Wei Weibing<sup>1</sup>, Zhou Binbin<sup>2</sup>, Zhang Hongsheng<sup>3</sup>, Yang Yu<sup>2</sup>, Cui Junwu<sup>2</sup>, Li Zhenxing<sup>2</sup> (<sup>1</sup>Liuzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Liuzhou 545000, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China; <sup>2</sup>First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530000, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China; <sup>3</sup>Ruikang Hospital, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530000, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China)

### Abstract

**BACKGROUND:** Traditional Chinese medicine has proposed the theory of “treatment for flaccidity aims at *Yangming* meridian” in the Internal Canon of Medicine. However, there have been relatively few reports on electroacupuncture at the stomach channel of Foot *Yangming* in the treatment of spinal cord injury.

**OBJECTIVE:** To investigate the effect of electroacupuncture stimulation of *Zusanli* and *Futu* on Caspase-3 expression in injured segments of spinal cord injury rats.

**METHODS:** Sixty-four Sprague-Dawley female rats, SPF grade, were randomly divided into four groups, i.e., control group, pre-labeling group, post-injury labeling group and electroacupuncture group, with 16 rats in each group. The control group and the pre-labeling group were intraperitoneally given Brdu (50 mg/kg) for 10 days before the operation. The control group was given a bite to remove the lamina on the 11th day, which did not damage the spinal cord. A model of spinal cord injury was made in the pre-labeling group on the 11th day. The post-injury labeling group and the electroacupuncture group were injected intraperitoneally with Brdu for 10 days after the spinal cord injury was made, and the post-injury labeling group was not treated. The electroacupuncture group started electroacupuncture at *Zusanli* and *Futu* acupoints on the 3rd day after the model was established. Spinal cord specimens were taken at 3, 10, 17, and 24 days after injury in each group, and the changes in the number of neurons were observed by hematoxylin-eosin staining. The expression of Brdu positive cells was observed by immunohistochemistry. The changes in Caspase-3 mRNA and protein expression were detected by qRT-PCR and western blot, respectively. The study protocol was approved by the Animal Ethic Committee of Guangxi Medical University, with an approval No. 201712001.

**RESULTS AND CONCLUSION:** The expression of Caspase-3 mRNA and protein after spinal cord injury was higher than that of the control group without spinal cord injury, and the number of neurons after spinal cord injury was significantly lower than that of the control group. With the passage of time, the mRNA and protein expression of Caspase-3 gene in the pre-labeling, post-injury labeling and electroacupuncture groups increased first and then decreased, while the Caspase-3 expression in the electroacupuncture group decreased significantly, which was significantly different from that in the pre-labeling and post-injury labeling groups ( $P < 0.05$ ). Hematoxylin-eosin staining results showed that the number of neurons in the electroacupuncture group was significantly higher than that in pre-labeling and post-injury labeling groups, and gradually approached the number of neurons in the control group on the 24<sup>th</sup> day. Immunohistochemical results showed that the positive protein expression in the electroacupuncture group increased first and then decreased, reaching the highest on the 17<sup>th</sup> day and the lowest on the 24<sup>th</sup> day. The overall positive protein expression was significantly higher than that in the other groups ( $P < 0.05$ ). To conclude, electroacupuncture stimulation of *Zusanli* and *Futu* acupoints can reduce the expression of Caspase-3 mRNA and protein, reduce the apoptosis of nerve cells, and promote the number of neurons, thus promoting the regeneration and repair of nerve cells.

**Key words:** spinal cord injury; electroacupuncture stimulation; *Zusanli*; *Futu*; Caspase-3; rat; experiment

**Funding:** the National Natural Science Foundation of China, No. 81660814 (to ZBB); the Natural Science Foundation of Guangxi, No. 2016JJA140159 and 2017JJA140554z (both to ZBB)

## 0 引言 Introduction

随着中国经济的不断飞速发展, 建筑业、体育事业也蓬勃发展, 同时带来的是脊髓损伤发病率的不断攀升, 并且呈不断年轻化的趋势<sup>[1]</sup>, 无论是脊髓损伤带来的运动功能障碍亦或是肾衰、尿路感染、压疮等严重的并发症都将给患者身心带来巨大的伤害<sup>[2-3]</sup>。研究表明, 脊髓损伤后长期功能障碍和神经细胞难以再生修复与细胞凋亡有着重要关系<sup>[4]</sup>, 细胞凋亡也可称程序性细胞死亡, 已被确定为脊髓损伤后影响神经组织损伤发展的关键过程<sup>[5]</sup>。细胞凋亡是一个复杂的病理生理过程, 近年来不断的研究发现B细胞淋巴瘤-2家族成员Bax、Bad、Bcl-2及半胱氨酸蛋白酶(Caspase)家族成员Caspase-3、Caspase-6、Caspase-8、Caspase-9等基因参与凋亡信号的调控<sup>[6-9]</sup>。其中caspase-3是各种凋亡刺激因子激活的半胱氨酸蛋白酶家族中的关键蛋白酶, 是细胞凋亡蛋白酶级联反应的必经之路, 在细胞凋亡早期的启动与执行过程中起着极其重要的作用<sup>[10-11]</sup>。

电针干预具有减少氧化应激反应、减轻水肿、抑制炎症反应、减少神经纤维化、抑制细胞凋亡等作用早有报道,

但其生理病理机制并未清楚<sup>[12-13]</sup>。此次实验通过建立脊髓损伤大鼠模型, 探讨电针干预足阳明胃经属穴对脊髓损伤大鼠神经细胞的凋亡可能的调控机制。

## 1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照动物实验。

1.2 时间及地点 实验于2018年1月至3月在广西医科大学动物实验中心完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 SPF级雌性SD大鼠64只, 体质量180-220 g, 由广西医科大学动物实验中心提供, 动物许可证号: SYXK桂2014-003。大鼠饲养环境湿度40%-47%, 温度20-25 °C, 光照10 h阴暗14 h。

1.3.2 实验用主要器械及仪器设备 解剖剪-直(商品型号: S13005-14), 精细剪-尖头(商品型号: S12012-12), 止血钳-弯(商品型号: F23006-14), 不锈钢微型血管夹(商品型号: R31005-10), 血管夹夹持器-配合不锈钢微型血管夹(商品型号: R34001-14), 持针钳-直(商品型号: F31031-15), 医用缝针(商品型号: F33111-24), 缝线(商

品型号: F34004-00)均由深圳瑞沃德生命科技有限公司提供;华佗牌电子针疗仪(商品编号: 30440175116),华佗牌无菌针灸针(商品编号: 30440175332)均由昆明康盛医疗器械有限公司提供;涡旋振荡仪(海门市其林贝尔仪器制造有限公司);电泳仪(中国北京六一仪器厂);荧光定量PCR仪(Applied Biosystems公司)。

**1.3.3 实验用主要试剂** SDS-PAGE蛋白上样缓冲液、RIPE 蛋白裂解液(索莱宝科技生物有限公司);反转录试剂盒、Real-time PCR 试剂盒(fermentas公司); Caspase-3 抗体(Affinity公司)。兔二抗(Abcam公司)。

#### 1.4 实验方法

**1.4.1 实验大鼠分组** 将64只实验大鼠随机分为4组,即对照组、预标记组、损伤后标记组和电针干预组,每组16只,每组分为4个亚组,依据4个取材时间段(损伤后的第3, 10, 17, 24天)分为每亚组4只。其中对照组及预标记在操作前给予BrdU(50 mg/kg)连续10 d腹腔注射,以标记脊髓内保持分化活力的细胞,对照组于第11天给予咬除椎板,并不损伤脊髓,预标记组第11天制作脊髓损伤模型。损伤后标记组及电针组在制作脊髓损伤后连续10 d腹腔注射BrdU来标记损伤后活化增殖的细胞,其中损伤后标记组不给予干预措施,电针组针刺足三里、伏兔穴。

**1.4.2 实验大鼠造模** 选取可控性强、可重复性高、损伤力度更稳定的钳夹法作为脊髓损伤造模方式<sup>[14]</sup>。以腹腔注射体积分数10%水合氯醛为麻醉方式将大鼠充分麻醉,先找到T<sub>10</sub>节段,即大鼠行俯卧位可摸见大鼠的T<sub>9-11</sub>棘突靠近,同时T<sub>10</sub>棘突为水平方向,即定位好T<sub>10</sub>节段<sup>[14]</sup>,以T<sub>10</sub>节段为中心备毛,备毛完毕后以T<sub>10</sub>为中心碘伏消毒3次,再次确认大鼠充分麻醉后开始以T<sub>10</sub>为中心纵向剪开大鼠皮肤约5 cm,逐层拨开筋膜及棘间肌,逐渐暴露T<sub>9-11</sub>椎板,动作轻柔慢慢以手持针钳咬开T<sub>10</sub>横突,以镊子上提T<sub>10</sub>棘突可见T<sub>9-T10</sub>间可有一小缝隙,以此缝隙为基础慢慢咬开T<sub>10</sub>椎板,逐渐咬至椎弓根至适宜放血管夹为度,暴露硬膜囊包裹的脊髓。以血管夹持器撑开微型血管夹,在硬膜囊下方通过整个脊髓,以微型血管夹夹闭脊髓,保持夹闭状态20 s制作脊髓损伤模型,造模后损伤处可有一大体可见的淤血夹痕,证明脊髓损伤造模成功。逐层缝合肌肉皮肤,术后给予数天的青霉素腹腔注射以防感染的发生,并每日2次的人工排尿预防尿潴留的发生,减少死亡率。如造模及干预期间发生大鼠死亡,针对死亡大鼠所在组别进行大鼠的造模及干预的补充。

**1.4.3 造模后大鼠的电针干预** 对照组、预标记组、损伤后标记组大鼠造模后不予任何干预措施,电针干预组参照《实验针灸学》穴位图谱选取足三里及伏兔穴<sup>[15]</sup>,将大鼠四肢捆绑固定于鼠架上,双侧下肢每个穴位各刺入1枚毫针,进针深度为穿皮后再进针约2 mm,进针后连接电针仪,电针刺激强度为12-15 mV,刺激频率为2 Hz,波形选择为疏密波,留针时间为30 min,周一至周五连续电针干预,

周六周日休息,5次/周。

#### 实验动物造模过程的相关问题

造模目的:	探讨电针刺激“足三里”与“伏兔”穴对脊髓损伤大鼠受损节段 Caspase-3 表达的影响
借鉴已有标准实施动物造模:	参考文献[14]钳夹法作为脊髓损伤造模方式
动物来源及品系:	SPF 级雌性 SD 大鼠由广西医科大学动物实验中心提供
模型与所研究疾病的关系:	通过建立脊髓损伤大鼠模型,探讨电针干预足阳明胃经属穴对脊髓损伤大鼠神经细胞的凋亡可能的调控机制
造模技术描述:	大鼠麻醉后,以 T <sub>10</sub> 为中心纵向剪开皮肤约 5 cm,暴露 T <sub>9-11</sub> 椎板,咬开 T <sub>10</sub> 椎板,暴露硬膜囊包裹的脊髓。以血管夹持器撑开微型血管夹,在硬膜囊下方通过整个脊髓,以微型血管夹夹闭脊髓,保持夹闭状态 20 s 制作脊髓损伤模型
动物数量及分组方法:	将 64 只实验大鼠随机分为 4 组:对照组 n=16;预标记组 n=16;损伤后标记组 n=16;电针干预组 n=16
造模成功评价指标:	以微型血管夹夹闭脊髓,保持夹闭状态 20 s 制作脊髓损伤模型,大体观察损伤处可见淤血夹痕,说明脊髓损伤造模成功
造模后实验观察指标:	①各组大鼠脊髓组织形态观察;②大鼠脊髓组织 BrdU 蛋白表达;③大鼠脊髓损伤部位 Caspase3 的 mRNA 和蛋白表达
造模过程中动物死亡原因:	①脊髓损伤过程中出血量过多;②脊髓损伤术后并感染;③脊髓损伤术后尿潴留
如何补充造模过程中缺失的动物:	如造模及干预期间发生大鼠死亡,针对死亡大鼠所在组别进行大鼠造模及干预的补充
造模后动物处理:	过量麻醉后取脊髓组织处理待检测
伦理委员会批准:	实验方案经广西医科大学动物实验伦理委员会批准(批准号 201712001)
造模过程中动物的不良反应:	出血量过多、少量存在麻醉过度难以苏醒甚至死亡的问题、术中大鼠体温无法保证导致大鼠易发生死亡

**1.4.4 大鼠取材** 按不同时间点取材,首先给予体积分数10%水合氯醛过量麻醉大鼠后迅速打开胸腔,左心室插管至主动脉,使用足量生理盐水持续灌注,剪开右心房,至右心房流出液清亮后提取脊髓组织,沿脊髓损伤部位上下各剪下5 cm左右长脊柱骨组织,以精细剪慢慢剪除脊柱骨及肌肉组织,此时万不可损伤到脊髓组织,小心提取损伤部位上下1 cm脊髓组织放置于冻存管中立即至于液氮罐当中,随后转移至-80 °C冰箱当中予以保存。

**1.4.5 苏木精-伊红染色** 切片:包埋后的组织块经修整后,用切片机切成5 μm的石蜡;贴片:将组织石蜡块在50 °C温水中展片,然后用处理干净的载玻片捞片,组织带可黏在载玻片上;烤片:60 °C恒温箱内烤片2 h;经二甲苯、乙醇、纯水浸泡水化脱蜡后开始苏木素染色5 min,盐酸乙醇分化5 s,自来水返蓝15 min,伊红染色5 min,乙醇快速脱水,二甲苯透明15 min,开始树胶封固,镜检拍照。

**1.4.6 免疫组织化学染色** 经石蜡制作、脱蜡、水化、清洗、脱水、透明、封固、镜检等过程后检测各组脊髓组织

中BrdU蛋白在光学显微镜下阳性蛋白表达的变化; 染色结果根据免疫组织化学半定量评分标准<sup>[16]</sup>: 高倍镜(x400)下通过随机截取每张图片3个视野, 统计每个视野的阳性细胞数量, 观察其阳性细胞表达强度。

**1.4.7 实时荧光定量PCR技术(qRT-PCR)检测Caspase3的mRNA表达** 将脊髓组织研磨加裂解液后混合均匀, 4 °C 12 000 r/min离心15 min, 取上清, 加入异丙醇混匀后-20 °C沉淀20 min, 4 °C, 12 000 r/min离心10 min后, 取上清, 加入等体积乙醇洗涤沉淀, 4 °C, 12 000 r/min离心10 min后去上清, 室温干燥, 紫外分析测定所抽提RNA的浓度; RNA反转录成cDNA, Caspase-3引物序列: 上游引物GGA GCT TGG AAC GCG AAG AA, 下游引物GTC CAT CGA CTT GCT TCC AT; 内参基因GAPDH上游引物序列: CAC TGA GCA TCT CCC TCA CAA, 下游引物: GTA TTC GAG AGA AGG GAG GGC T。

**1.4.8 Western blot检测Caspase3蛋白表达** 将脊髓组织混合物充分研磨, 加入裂解液后4 °C 12 000 r/min离心10 min, 取上清置于新的离心管中, 加入蛋白缓冲液中100 °C煮沸10 min后12 000 r/min离心1 min, 备用。根据不同蛋白分子量大小配置不同浓度的胶, 电泳缓冲液清洗上样孔, 将准备好的样品上样, 电泳: 恒压80 V, 30 min后恒压120 V, 1 h。一抗(Caspase3蛋白抗体稀释比1:200)4 °C孵育一抗过夜, 用TBST洗膜3次, 5 min/次; 二抗用封闭液稀释各蛋白一抗对应的二抗(兔二抗1:3 000)室温下孵育膜1 h, 用TBST洗膜3次5 min/次, 曝光, 拍照记录。

**1.5 主要观察指标** ①各组大鼠脊髓组织形态观察; ②大鼠脊髓组织BrdU蛋白表达; ③大鼠脊髓损伤部位Caspase3的mRNA和蛋白表达。

**1.6 统计学分析** 采用SPSS 22.0软件进行统计分析, 计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 重复测量资料比较采用双因素重复测量方差分析, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用LSD-t 检验。若 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义, 具有可比性。

## 2 结果 Results

**2.1 实验动物数量分析** 实验选用大鼠64只, 分为4组, 实验过程中若有大鼠的死亡, 应及时补充大鼠造模及干预, 最终进入分析大鼠数量为64只。

**2.2 苏木精-伊红染色结果** 神经元计数结果: 对照组神经元各时间点差异无显著性意义; 预标记组3-17 d神经元数量逐渐降低, 17 d降至最低, 24 d有所回升, 各时间点与对照组相比, 差异有显著性意义( $P < 0.05$ ); 损伤后标记组随着损伤时间延长逐渐降低, 10 d降至最低, 17-24 d有所提升, 与对照组相比差异有显著性意义( $P < 0.05$ ); 与预标记组相比, 损伤后标记组3-10 d同期降低( $P < 0.05$ ), 17 d比预标记组升高( $P < 0.05$ ), 24 d时差异

无显著性意义; 电针干预组同期均比预标记组和损伤后标记组高( $P < 0.05$ ), 到24 d时, 神经元恢复至(18.33±1.53), 接近对照组24 d, 但差异有显著性意义( $P < 0.05$ )。见图1, 表1。

表1 不同时间点各组脊髓损伤部位神经元数量变化 ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=4$ )  
Table 1 Changes in the number of neurons in injured spinal cord at different time points

组别	3 d	10 d	17 d	24 d
对照组	18.67±1.53	21.33±1.53	21.67±2.52	22.67±0.03
预标记组	8.67±0.58 <sup>a</sup>	6.33±0.58 <sup>a</sup>	4.00±1.00 <sup>a</sup>	10.33±0.58 <sup>a</sup>
损伤后标记组	5.67±1.53 <sup>ab</sup>	2.33±0.58 <sup>a</sup>	8.00±1.00 <sup>ab</sup>	12.00±1.00 <sup>a</sup>
电针干预组	12.00±1.00 <sup>abc</sup>	12.67±0.58 <sup>abc</sup>	11.00±1.00 <sup>abc</sup>	18.33±1.53 <sup>abc</sup>
F值	62.278	247.200	73.571	79.333
P值	0.000	0.000	0.000	0.000

表注: 与对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与预标记组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; 与损伤后标记组比较, <sup>c</sup> $P < 0.05$

**2.3 免疫组织化学结果** BrdU阳性表达位于细胞膜内, 预标记组3, 10, 17, 24 d均少量表达, 各期间差异无显著性意义; 损伤后标记组3 d组高于预标记组, 10 d时到达最高峰, 至17, 24 d有所下降, 但仍高于对照组, 17 d与对照组比较差异有显著性意义( $P < 0.05$ ); 损伤后标记组3 d和10 d时稍高于预标记组( $P < 0.05$ ), 10 d升至最高峰, 至17 d时开始下降, 除17 d外, 各同期均高于预标记组( $P < 0.05$ ); 电针干预组3 d时稍高于损伤后标记组, 从10 d开始逐渐上升, 至17 d时又开始下降, 24 d降至最低, 但整体表达高于损伤后标记组和对照组, 各组间差异有显著性意义( $P < 0.05$ ), 见图2, 表2。

表2 不同时间点脊髓损伤部位 BrdU 阳性表达量 ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=4$ )  
Table 2 Positive expression of BrdU in injured spinal cord at different time points

组别	3 d	10 d	17 d	24 d
对照组	0.037±0.002	0.023±0.001	0.025±0.001	0.027±0.000
预标记组	0.046±0.001 <sup>a</sup>	0.093±0.006 <sup>a</sup>	0.138±0.009 <sup>a</sup>	0.047±0.016
损伤后标记组	0.061±0.006 <sup>a</sup>	0.243±0.012 <sup>ab</sup>	0.080±0.005 <sup>ab</sup>	0.039±0.006
电针干预组	0.283±0.020 <sup>abc</sup>	0.419±0.030 <sup>abc</sup>	0.192±0.007 <sup>abc</sup>	0.105±0.006 <sup>abc</sup>
F值	371.558	346.702	396.69	45.147
P值	0	0	0	0

表注: 与对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与预标记组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; 与损伤后标记组比较, <sup>c</sup> $P < 0.05$

**2.4 各组大鼠脊髓损伤部位Caspase3 mRNA表达** 随着时间的延长, caspase-3 mRNA在预标记组和损伤后标记组表达呈现先升高后下降的趋势, 和对照组相比, 预标记组和损伤后标记组caspase-3 mRNA表达整体升高( $P < 0.05$ ); 与预标记组相比, 3 d和10 d时损伤后标记组mRNA表达升高, 整体差异有显著性意义( $P < 0.05$ ); 17 d时损伤后标记组低于预标记组, 差异有显著性意义( $P < 0.05$ ); 和预标记组和损伤后标记组相比, 电针干预组caspase-3 mRNA表达整体明显降低( $P < 0.05$ )。见图3, 表3。

表3 各组大鼠脊髓损伤部位的Caspase3 mRNA表达 ( $\bar{x}\pm s, n=4$ )  
Table 3 mRNA expression of Caspase3 in the injured spinal cord of rats

组别	3 d	10 d	17d	24 d
对照组	1.09±0.10	0.80±0.30	1.10±0.09	0.87±0.26
预标记组	2.17±0.14 <sup>a</sup>	2.92±0.19 <sup>a</sup>	3.33±0.17 <sup>a</sup>	1.80±0.23 <sup>a</sup>
损伤后标记组	3.40±0.29 <sup>ab</sup>	3.70±0.48 <sup>ab</sup>	2.47±0.08 <sup>ab</sup>	1.80±0.12 <sup>a</sup>
电针干预组	1.74±0.11 <sup>abc</sup>	2.03±0.19 <sup>abc</sup>	1.71±0.17 <sup>abc</sup>	1.49±0.07 <sup>a</sup>
F值	89.516	47.483	156.371	16.728
P值	0	0	0	0.001

表注:与对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与预标记组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与损伤后标记组比较,<sup>c</sup> $P < 0.05$

2.5 各组大鼠脊髓损伤部位Caspase3的蛋白表达 随着时间的延长,caspase-3蛋白在预标记组和损伤后标记组呈现先升高后下降的趋势,和对照组相比明显升高( $P < 0.05$ );预标记组和损伤后标记组相比,整体差异无显著性意义;和预标记组和损伤后标记组相比,电针干预组明显降低( $P < 0.05$ )。见图3,表4。

表4 不同脊髓损伤部位Caspase3蛋白表达量 ( $\bar{x}\pm s, n=4$ )  
Table 4 Protein expression of Caspase3 in the injured spinal cord of rats

组别	3 d	10 d	17 d	24 d
对照组	0.30±0.05	0.44±0.11	0.50±0.10	0.44±0.03
预标记组	0.95±0.10 <sup>a</sup>	1.06±0.10 <sup>a</sup>	0.92±0.20 <sup>a</sup>	0.86±0.06 <sup>a</sup>
损伤后标记组	1.00±0.05 <sup>a</sup>	0.85±0.13 <sup>a</sup>	0.88±0.22 <sup>a</sup>	0.87±0.09 <sup>a</sup>
电针干预组	0.65±0.02 <sup>abc</sup>	0.65±0.13 <sup>b</sup>	0.58±0.07 <sup>b</sup>	0.61±0.14 <sup>abc</sup>
F值	81.383	15.249	5.339	16.176
P值	0	0.001	0.026	0.001

表注:与对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与预标记组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与损伤后标记组比较,<sup>c</sup> $P < 0.05$

### 3 讨论 Discussion

脊髓损伤中医古称“痿痹”,属于“痿病”之范畴,《内经》提出了“治痿独取阳明”,并成为后世治痿之准则,《素问·痿论》解释了其机制:“阳明者,五脏六腑之海,主润宗筋,宗筋主束骨而利机关也”,阳明乃五脏六腑之海,气血生化之源,阳明为多气多血之经,主润泽,养宗筋,宗筋约束骨骼,主司关节,阳明虚,则气血亏虚,诸脉不得养而导致痿病发生。故《灵枢·根结》云“痿疾者,取之阳明”。“足三里”为胃经之合穴,又为胃腑之下合穴,《景岳全书》有言:“灸手足不遂、偏枯等证则取曲池、足三里等穴”,“伏兔”足阳明胃经之属穴,主治腰腿痛,配合足三里可治疗下肢痿痹<sup>[17]</sup>;故选取“足三里”“伏兔”作为针刺干预足阳明胃经之代表穴位。

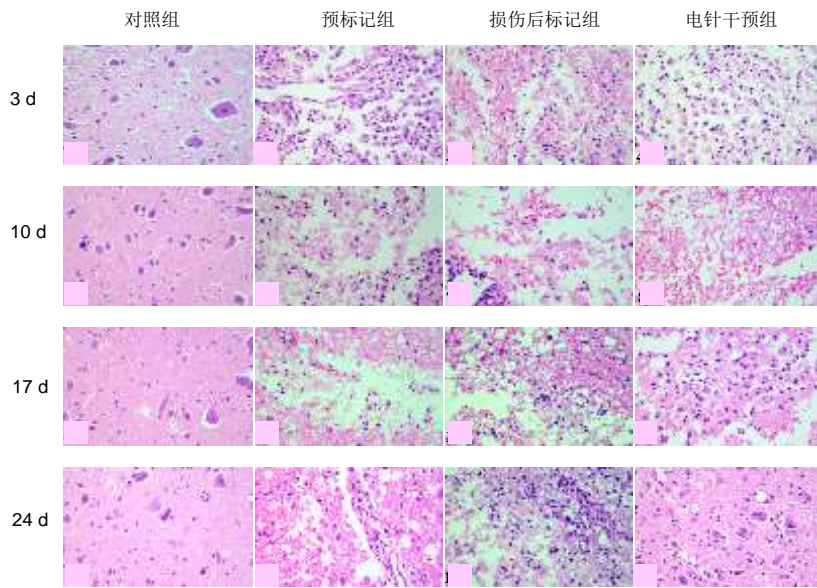
《灵枢·九针十二原》篇曰:“凡用针者,虚则实之,满则泻之,宛陈则除之,邪胜则虚之”,作为祖国传统医学,针刺治疗强调平衡气血、调和阴阳,遵循的是补虚泻实原则,故能够成为治疗痿病的主要方法。近年来关于脊髓损伤相关治疗报道越来越多,手术、药物、细胞分子生物学、

生物材料、高压氧等治疗方式不断被开发出来<sup>[18-19]</sup>,同时随着中医药国际化的进程也不断加快,作为中医药领域的核心技术,针灸的临床应用价值逐步受到国际的广泛关注及认可<sup>[20]</sup>。

研究表明,电刺激可以通过感觉传入中枢神经纤维,激活脊髓运动神经元,促进神经肌肉接头功能的恢复和减轻肢体肌肉萎缩和纤维化<sup>[21-25]</sup>,同时针灸可诱导再生干细胞,促进神经干细胞增殖,抑制神经干细胞分化为星形胶质细胞从而能够刺激神经再生<sup>[26]</sup>。结合此次研究结果脊髓损伤后神经元数量明显降低,证明脊髓损伤后存在自发性的神经细胞凋亡的现象,电针干预“足三里”“伏兔”穴对比同一时期的预标记组和损伤后标记组神经元数量均明显增高( $P < 0.05$ ),在第4周时电针组神经元的数量可以接近未经脊髓损伤的对照组,说明电针具有对神经元的修复作用,减少神经细胞的继发性凋亡;同时通过腹腔注射BrdU标记物,以检测损伤区域阳性蛋白的表达,结果显示损伤区域阳性表达率同样显示电针组的阳性细胞表达在同一时期比预标记组及损伤后标记组高,有显著性意义,证明电针刺激“足三里”“伏兔”穴可以促进细胞的增殖。在第3, 10, 17天时损伤后标记组的BrdU阳性细胞表达均高于预标记组,说明脊髓损伤后不经过电针干预亦可以刺激内源性神经干细胞的增殖。

研究显示,脊髓损伤后导致的长期功能障碍和神经细胞难以再生修复与细胞凋亡有着重要关系<sup>[4]</sup>,在凋亡过程中,胱天蛋白酶家族成员是主要参与者,胱天蛋白酶激活是凋亡的关键事件,凋亡可能以死亡受体、线粒体或内质网依赖的方式发生,胱天蛋白酶激活被认为是细胞凋亡的关键过程,迄今为止共鉴定出14种半胱天冬酶,称为半胱天冬酶1-14<sup>[8-9, 27]</sup>。其中Caspase-3是细胞凋亡的最重要参与者,是各种凋亡途径中的最终执行半胱天冬酶<sup>[28-29]</sup>。活化的Caspase-3能够消化或切割参与细胞结构、细胞周期和脱氧核糖核酸复制的蛋白质和激酶,导致这些激酶和蛋白质的活化或失活以及随后的凋亡<sup>[30]</sup>。研究认为电针刺激减少Caspase-3的表达抗凋亡的作用机制可能是Caspase-3通过特异性酶解反应将具有抗凋亡作用的Bcl-2基因分解成具有促进凋亡作用的Bcl-2片段<sup>[31]</sup>,减少凋亡反应的发生,结合此次研究结果显示电针组3-24 d的mRNA及蛋白的表达量均较预标记组、损伤后标记组的表达量低,差异显著( $P < 0.05$ ),证明电针刺激“足三里”“伏兔”穴可以降低Caspase-3的mRNA及对应蛋白的表达,促进神经元的修复。

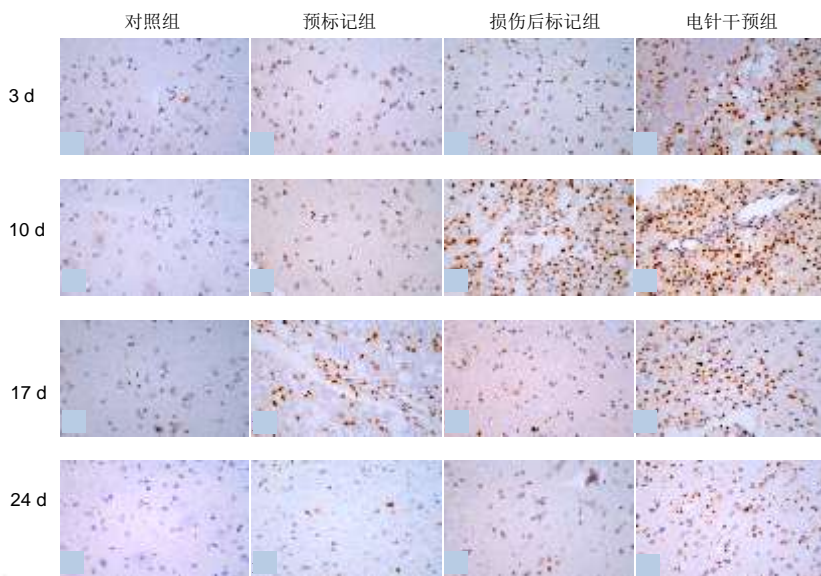
总之,电针刺激“足三里”与“伏兔”穴可以通过降低Caspase-3的mRNA及蛋白的表达,抑制细胞凋亡加速脊髓神经元的神经功能康复的机制已然明了,但是电针刺激“足三里”与“伏兔”如何来调控Caspase-3的表达的生理病理机制目前尚未分明,这也是该课题组下一步的研究计划。



图注: 随着时间的推移, 电针干预组的神经元的数量明显比未经干预的预标记组、损伤后标记组高, 在第 24 天时逐渐接近对照组的神经元的数量

图 1 各组大鼠脊髓组织形态观察(苏木精-伊红染色, ×400)

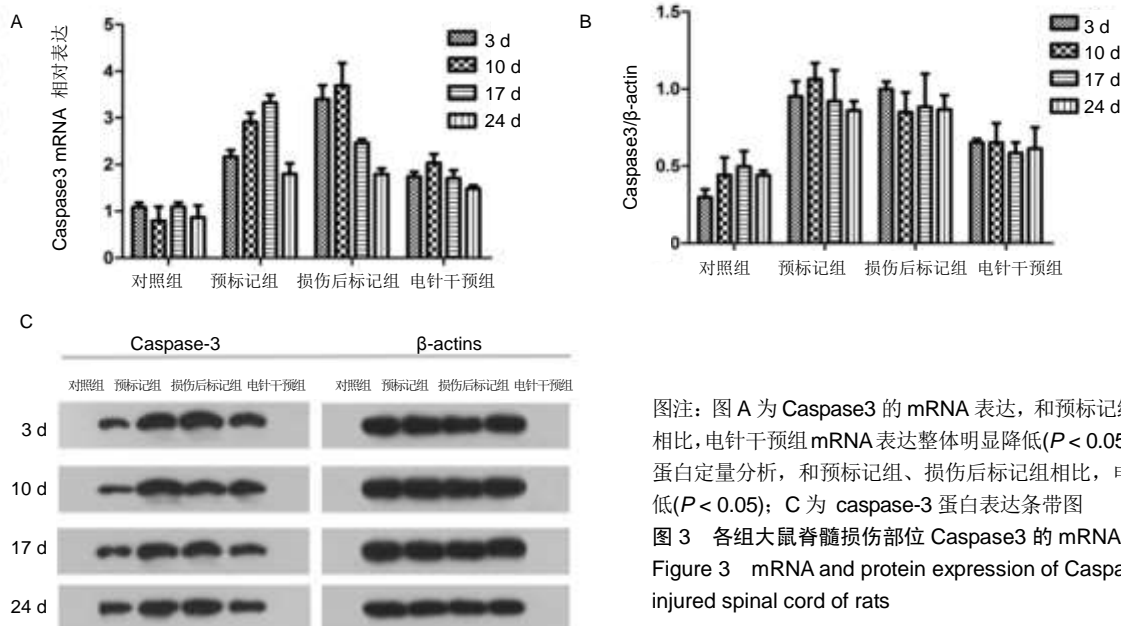
Figure 1 Morphological observation of the rat spinal cord (hematoxylin-eosin staining, ×400)



图注: 电针干预组阳性蛋白表达呈先升高后降低的趋势, 17 d 升至最高, 24 d 降至最低, 整体阳性蛋白表达高于其他组

图 2 各组大鼠脊髓组织 Brdu 蛋白的表达(免疫组织化学染色, ×400)

Figure 2 Expression of Brdu protein in the rat spinal cord (immunohistochemical staining, ×400)



图注: 图 A 为 Caspase3 的 mRNA 表达, 和预标记组、损伤后标记组相比, 电针干预组 mRNA 表达整体明显降低 ( $P < 0.05$ ); B 为 caspase-3 蛋白定量分析, 和预标记组、损伤后标记组相比, 电针干预组明显降低 ( $P < 0.05$ ); C 为 caspase-3 蛋白表达条带图

图 3 各组大鼠脊髓损伤部位 Caspase3 的 mRNA 及蛋白表达  
Figure 3 mRNA and protein expression of Caspase3 in the injured spinal cord of rats

**作者贡献:** 周宾宾为课题负责人,负责课题的所有进程,周宾宾、魏卫兵共同参与实验设计,魏卫兵成文,周宾宾审校,故周宾宾为通讯作者,魏卫兵为第一作者。

**经费支持:** 该文章接受了“国家自然科学基金(81660814)”“广西自然科学基金(2016JJA140159, 2017JJA140554z)”的资助。所有作者声明,经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

**利益冲突:** 文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程不存在利益冲突。

**机构伦理问题:** 实验方案经广西医科大学动物实验伦理委员会批准(批准号 201712001)。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。实验动物在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:** 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

**文章外审:** 文章经小同行外审专家双盲外审,同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

**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。

**开放获取声明:** 这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

#### 4 参考文献 References

[1] 陈星月,陈栋,陈春慧,等.中国创伤性脊髓损伤流行病学和疾病经济负担的系统评价[J].中国循证医学杂志,2018,18(2):143-150.

[2] SCHWAB JM, MAAS A, HSIEH J, et al. Raising awareness for spinal cord injury research. Lancet Neurol. 2018;17(7):581-582.

[3] BRAGGE P, GUY S, BOULET M, et al. A systematic review of the content and quality of clinical practice guidelines for management of the neurogenic bladder following spinal cord injury. Spinal Cord. 2019;57(7):540-549.

[4] REN XD, WAN CX, NIU YL. Overexpression of lncRNA TCTN2 protects neurons from apoptosis by enhancing cell autophagy in spinal cord injury. FEBS Open Bio. 2019;9(7):1223-1231.

[5] KAWABATA H, SETOGUCHI T, YONE K, et al. High mobility group box 1 is upregulated after spinal cord injury and is associated with neuronal cell apoptosis. Spine (Phila Pa 1976). 2010;35(11):1109-1115.

[6] ZHAO D, ZHANG M, YUAN H, et al. Ginsenoside Rb1 protects against spinal cord ischemia-reperfusion injury in rats by downregulating the Bax/Bcl-2 ratio and caspase-3 and p-Ask-1 levels. Exp Mol Pathol. 2018;105(3):229-235.

[7] YUAN B, PAN S, ZHANG WW. Effects of gangliosides on expressions of caspase-3 and NGF in rats with acute spinal cord injury. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2017;21(24):5843-5849.

[8] GASHMARDI N, HOSSEINI SE, MEHRABANI D, et al. Impacts of Bone Marrow Stem Cells on Caspase-3 Levels after Spinal Cord Injury in Mice. Iran J Med Sci. 2017;42(6):593-598.

[9] LIN HS, JI ZS, ZHENG LH, et al. Effect of methylprednisolone on the activities of caspase-3, -6, -8 and -9 in rabbits with acute spinal cord injury. Exp Ther Med. 2012;4(1):49-54.

[10] CITRON BA, ARNOLD PM, HAYNES NG, et al. Neuroprotective effects of caspase-3 inhibition on functional recovery and tissue sparing after acute spinal cord injury. Spine (Phila Pa 1976). 2008;33(21):2269-2277.

[11] DASARI VR, SPOMAR DG, CADY C, et al. Mesenchymal stem cells from rat bone marrow downregulate caspase-3-mediated apoptotic pathway after spinal cord injury in rats. Neurochem Res. 2007;32(12):2080-2093.

[12] 杨扬,徐昊禹,丁英,等.两种督脉电针对大鼠脊髓受损伤神经元存活的影响[J].解剖学研究,2018,40(1):2-5+84.

[13] FAN Q, CAVUS O, XIONG L, et al. Spinal Cord Injury: How Could Acupuncture Help. J Acupunct Meridian Stud. 2018;11(4):124-132.

[14] 魏卫兵,周祥兴,周宾宾,等.构建不同脊髓损伤节段模型大鼠下肢功能恢复的评价[J].中国组织工程研究,2019,23(7):1073-1077.

[15] 余曙光,徐斌.实验针灸学[M].北京:人民卫生出版社,2012:277.

[16] SOSLOW RA, DANNENBERG AJ, RUSH D, et al. COX-2 is expressed in human pulmonary, colonic, and mammary tumors. Cancer. 2000;89(12):2637-2645.

[17] 赵吉平,李瑛.针灸学[M].3版.北京:人民卫生出版社,2016:12.

[18] 韩玉,尹洪娜,郭玉怀,等.脊髓损伤的临床治疗进展[J].中华中医药学刊,2019,37(5):1115-1119.

[19] ZHANG Y, ZHANG WX, ZHANG YJ, et al. Melatonin for the treatment of spinal cord injury. Neural Regen Res. 2018;13(10):1685-1692.

[20] 林香均.“针灸即安慰剂”之缘由与剖析[D].北京:北京中医药大学,2016.

[21] JIANG YQ, ZAAIMI B, MARTIN JH. Competition with Primary Sensory Afferents Drives Remodeling of Corticospinal Axons in Mature Spinal Motor Circuits. J Neurosci. 2016;36(1):193-203.

[22] WILLAND MP, HOLMES M, BAIN JR, et al. Sensory nerve cross-anastomosis and electrical muscle stimulation synergistically enhance functional recovery of chronically denervated muscle. Plast Reconstr Surg. 2014;134(5):736e-745e.

[23] ZHANG C, RONG W, ZHANG GH, et al. Early electrical field stimulation prevents the loss of spinal cord anterior horn motoneurons and muscle atrophy following spinal cord injury. Neural Regen Res. 2018;13(5):869-876.

[24] 吕威,李冰,景泉凯,等.电针“大椎”“命门”对脊髓损伤大鼠神经元细胞凋亡及JNK信号通路相关蛋白表达的影响[J].针刺研究,2017,42(1):14-19.

[25] 李晓宁,吴磊,迟蕾,等.不同治疗周期夹脊电针对急性脊髓损伤大鼠运动功能及细胞凋亡的影响[J].针刺研究,2016,41(6):492-496.

[26] 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.

[27] WANG J, ZHENG Q, ZHAO M, et al. Neurocyte apoptosis and expressions of caspase-3 and Fas after spinal cord injury and their implication in rats. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci. 2006;26(6):709-712.

[28] BRECKENRIDGE DG, KANG BH, KOKEL D, et al. Caenorhabditis elegans drp-1 and fis-2 regulate distinct cell-death execution pathways downstream of ced-3 and independent of ced-9. Mol Cell. 2008;31(4):586-597.

[29] FAUBEL S, EDELSTEIN CL. Caspases as drug targets in ischemic organ injury. Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord. 2005;5(3):269-287.

[30] SPRINGER JE, AZBILL RD, KNAPP PE. Activation of the caspase-3 apoptotic cascade in traumatic spinal cord injury. Nat Med. 1999;5(8):943-946.

[31] 张志英,余安胜,严振国.电针对脊髓损伤早期caspase-3 mRNA及蛋白表达的影响[J].解剖学杂志,2002,25(6):548-552.