

“三通针法”电针调控 Rho/ROCK(Rho kinase) 及 MEK/ERK 信号通路对脊髓损伤大鼠胞浆型磷脂酶 A2 的影响

姚海华¹, 闵友江^{1,2}, 洪冬英³, 王立², 鹿秀云², 杨宜花²

https://doi.org/10.12307/2023.447

投稿日期: 2022-05-05

采用日期: 2022-07-09

修回日期: 2022-08-31

在线日期: 2022-09-30

中图分类号:

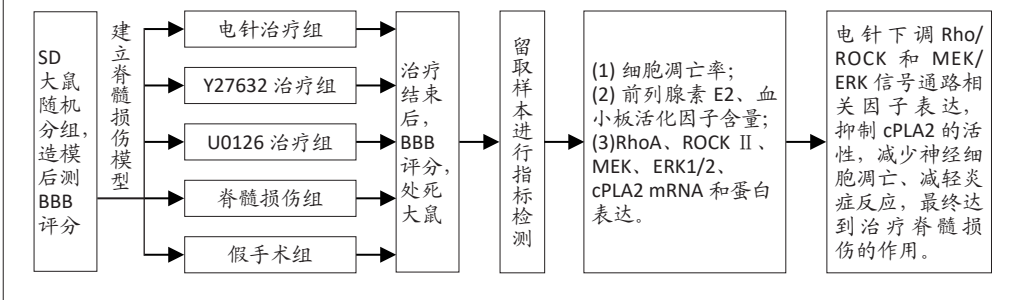
R446; R318; R496

文章编号:

2095-4344(2023)20-03158-09

文献标识码: B

文章快速阅读: 电针调控 Rho/ROCK(Rho kinase) 及 MEK/ERK 信号通路对脊髓损伤大鼠胞浆型磷脂酶 A2 的影响



文题释义:

MEK/ERK信号通路: 细胞外信号调节激酶(extracellular regulated protein kinases, ERK)主要包括ERK1和ERK2。丝裂原活化蛋白激酶激酶(mitogen-activated protein kinase kinase, MEK)是ERK1/2的上游激酶, 受细胞外刺激时, 细胞通过Raf-MEK-ERK1/2激酶级联把丝裂原信号从细胞膜传到细胞核内, 从而介导一系列的生理病理反应。

磷脂酶A2(PLA2): 是一种重要的代谢和调节酶, 它能催化磷脂甘油分子上第二位酰基的水解, 可将磷脂(如磷脂酰胆碱等)水解成以花生四烯酸为主的游离脂肪酸和溶血磷脂, 花生四烯酸等可进一步生成白三烯、前列腺素以及血小板活化因子等, 参与炎症反应、细胞信号传导、凋亡和生殖等。

摘要

背景: 胞浆型磷脂酶A2(cytosolic phospholipase A2, cPLA2)是治疗脊髓损伤的新型策略和靶标, 其受RhoA/Rho kinase及MEK/ERK信号通路的调控。而电针可通过调控RhoA/Rho kinase和MEK/ERK信号通路治疗脊髓损伤。

目的: 探讨电针调控Rho/ROCK(Rho kinase)及MEK/ERK信号通路对脊髓损伤后cPLA2的影响。

方法: 90只雌性SD大鼠, 随机取72只制备脊髓损伤模型, BBB评分后随机分为脊髓损伤组、电针治疗组、U0126治疗组(ERK阻断剂)和Y27632治疗组(ROCK阻断剂), 另18只设为假手术组(只进行椎板咬除, 但不进行脊髓撞击)。电针治疗组大鼠取大椎、腰阳关以及双侧次髂、足三里进行电针治疗, 每天1次, 每次20 min, 共14次; U0126治疗组和Y27632治疗组分别予以U0126和Y27362隔天1次硬膜下腔注射。治疗结束经BBB评分后处死大鼠, 收集脊髓组织, ELISA检测脊髓组织前列腺素E2、血小板活化因子的水平; TUNEL法检测脊髓神经细胞凋亡率; Western blot检测脊髓RhoA、ROCK II、MEK、ERK1/2、p-ERK1/2、cPLA2、p-cPLA2蛋白的表达; qRT-PCR检测脊髓RhoA、ROCK II、MEK、ERK1/2与cPLA2的基因表达。

结果与结论: ①与假手术组比较, 脊髓损伤组大鼠BBB评分明显下降($P < 0.01$), 脊髓组织细胞凋亡阳性细胞数、前列腺素E2和血小板活化因子水平、p-cPLA2蛋白和cPLA2基因的表达均明显升高($P < 0.01$); 除电针治疗组大鼠cPLA2基因表达降低差异无显著性意义外, 各治疗组大鼠上述指标均明显逆转($P < 0.01$); ②与假手术组比较, 脊髓损伤组大鼠脊髓组织RhoA及ROCK II蛋白和基因的表达、MEK和ERK1/2基因的表达、MEK和p-ERK1/2蛋白的表达均明显升高($P < 0.01$), 电针治疗组及其他两治疗组大鼠上述指标均明显降低($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$); ③结果说明, 电针能下调Rho/ROCK和MEK/ERK信号通路相关因子表达, 抑制cPLA2的活性, 减少神经细胞凋亡、减轻炎症反应, 最终达到治疗脊髓损伤的作用。

关键词: 电针, 脊髓损伤, Rho/ROCK信号通路, MEK/ERK信号通路, 胞浆型磷脂酶A2

缩略语: 胞浆型磷脂酶A2: cytosolic phospholipase A2, cPLA2; 细胞外信号调节激酶: extracellular regulated protein kinases, ERK; 丝裂原活化蛋白激酶激酶: mitogen-activated protein kinase, MEK

Effects of Santong electroacupuncture on the activity of cytoplasmic phospholipase A2 in rats with spinal cord injury via the Rho/Rho kinase and MEK/ERK signaling pathways

Yao Haihua¹, Min Youjiang^{1,2}, Hong Dongying³, Wang Li², Lu Xiuyun², Yang Yihua²

¹Shanghai Eighth People's Hospital, Shanghai 200235, China; ²School of Traditional Chinese Medicine, Nanchang Medical College, Nanchang 330052, Jiangxi Province, China; ³Shunchang Hospital of Huangpu District, Shanghai 200025, China

¹上海市第八人民医院, 上海市 200235; ²南昌医学院中医学院, 江西省南昌市 300052; ³上海市黄浦区顺昌医院, 上海市 200025

第一作者: 姚海华, 女, 1981年生, 2012年贵阳中医药大学毕业, 硕士, 主治医师, 主要从事神经系统及皮肤疾病中医药治疗与研究。

通讯作者: 闵友江, 博士, 主任医师, 硕士生导师, 上海市第八人民医院, 上海市 200235; 南昌医学院中医学院, 江西省南昌市 300052

https://orcid.org/0000-0002-3855-395X(姚海华)

基金资助: 国家自然科学基金青年项目(81904289), 项目负责人: 姚海华

引用本文: 姚海华, 闵友江, 洪冬英, 王立, 鹿秀云, 杨宜花. “三通针法”电针调控 Rho/ROCK(Rho kinase) 及 MEK/ERK 信号通路对脊髓损伤大鼠胞浆型磷脂酶 A2 的影响 [J]. 中国组织工程研究, 2023, 27(20):3158-3166.



Yao Haihua, Master, Attending physician, Shanghai Eighth People's Hospital, Shanghai 200235, China

Corresponding author: Min Youjiang, MD, Chief physician, Master's supervisor, Shanghai Eighth People's Hospital, Shanghai 200235, China; School of Traditional Chinese Medicine, Nanchang Medical College, Nanchang 330052, Jiangxi Province, China

Abstract

BACKGROUND: Cytoplasmic phospholipase A2 (cPLA2) is a novel strategy and target for the treatment of spinal cord injury. cPLA2 is regulated by RhoA/Rho kinase and mitogen-activated protein kinase (MEK)/extracellular regulated protein kinases (ERK) signaling pathways. Electroacupuncture can treat spinal cord injury by regulating the RhoA/Rho kinase and MEK/ERK signaling pathways.

OBJECTIVE: To investigate the effects of electroacupuncture on the activity of cPLA2 after spinal cord injury by regulating Rho/ROCK (Rho kinase) and MEK/ERK signaling pathways.

METHODS: After spinal cord injury modeling and Basso, Beattie, Bresnahan scoring, 72 female Sprague-Dawley rats were randomly divided into model group, electroacupuncture group, U0126 treatment group and Y27632 treatment group, with 18 rats in each group. Another 18 rats were used as sham operation group, in which only laminectomy was performed without spinal cord impingement. In the electroacupuncture group, *Dazhui* (GV 14), *Yaoyangguan* (GV 3), bilateral *Ciliao* (BL 32) and *Zusanli* (ST 36) were treated with electroacupuncture, once a day, 20 minutes each time, 14 times in total. Rats in the U0126 and Y27632 treatment groups were given U0126 and Y27632 subdural injection every other day, respectively. At the end of treatment, the rats were sacrificed after Basso, Beattie, Bresnahan scoring, and the spinal cord tissue was collected to detect the content of prostaglandin E2 and platelet activating factor by ELISA. TUNEL assay was used to detect the apoptosis rate of spinal cord nerve cells. Western blot was used to detect the protein expression of RhoA, ROCK II, MEK, ERK1/2, p-ERK1/2, cPLA2 and p-cPLA2 in the spinal cord. qRT-PCR was used to detect the mRNA expression of RhoA, ROCK II, MEK, ERK1/2 and cPLA2 in the spinal cord.

RESULTS AND CONCLUSION: Compared with the sham operation group, Basso, Beattie, Bresnahan score was significantly decreased in the model group ($P < 0.01$), while the number of apoptotic cells, the levels of prostaglandin E2 and platelet activating factor, and the expression of p-cPLA2 protein and cPLA2 mRNA in spinal cord tissue were significantly increased in the model group ($P < 0.01$). After treatment, the above indexes were significantly reversed in all the treatment groups except for the mRNA expression of cPLA2 in the electroacupuncture group ($P < 0.01$). Compared with the sham operation group, the expression of RhoA, ROCK II, and MEK protein and gene, the mRNA expression of ERK1/2, and the protein expression of p-ERK1/2 were significantly increased in the model group ($P < 0.01$). After treatment, the above indexes were significantly decreased in the three treatment groups ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). To conclude, electroacupuncture can down-regulate the expression of factors related to Rho/ROCK and MEK/ERK signaling pathways, inhibit the activity of cPLA2, reduce the apoptosis of nerve cells, alleviate inflammatory responses, and finally achieve the therapeutic effect on spinal cord injury.

Key words: electroacupuncture; spinal cord injury; Rho/Rho kinase signaling pathway; MEK/ERK signaling pathway; cytoplasmic phospholipase A2

Funding: the National Natural Science Foundation of China (Youth Program), No. 81904289 (to YHH)

How to cite this article: YAO HH, MIN YJ, HONG DY, WANG L, LU XY, YANG YH. Effects of Santong electroacupuncture on the activity of cytoplasmic phospholipase A2 in rats with spinal cord injury via the Rho/Rho kinase and MEK/ERK signaling pathways. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2023;27(20): 3158-3166.

0 引言 Introduction

脊髓损伤是一种创伤所致的中枢神经系统疾病,近年来随着交通、建筑、采矿业的发展,脊髓损伤发病率呈逐年升高趋势,且以中青年患者最多见^[1-2]。脊髓损伤容易造成严重性伤残且没有有效治疗的药物和方法,医疗费用高昂,给社会和家庭带来沉重的负担^[1-3]。脊髓损伤发病中原发性(机械性)损伤不可避免,但一般认为继发性损伤若治疗及时是可逆的^[3]。目前认为炎症反应、缺血、缺氧、氧化应激等既是继发性损伤病理因素,这些因素又进一步加重了继发性脊髓损伤;它们激活了多种信号通路的级联反应,导致神经细胞的死亡,显著扩大了原发性损伤的范围与程度^[4-5]。有研究表明胞浆型磷脂酶A2(cytosolic phospholipase A2, cPLA2)是介导脊髓继发性损伤炎症反应和细胞凋亡等多种关键机制的中心或交叉汇合的重要分子^[6-7]。LIU等^[6]实验研究表明,阻断RhoA、Rho激酶可分别降低cPLA2的活性,也可以减少cPLA2下游产物花生四烯酸释放;免疫沉淀发现,ROCK I或ROCK II直接与cPLA2和p-cPLA2绑定在一起;体内实验也显示,ROCK阻断剂Y27632可减少或降低cPLA2的表达和活性。他们进一步研究发现,p-cPLA2与p-ERK1/2(p-p42和p-p44)共存于神经元胞质中,且cPLA2的活性与细胞外信号调节激酶(extracellular regulated protein kinases, ERK)ERK1/2呈正相关,经ERK阻断剂U0126阻断后,cPLA2的活性与表达明显下降^[8]。石胜柳等^[9]研究表明神经生长因子通过调控Raf/丝裂原活化蛋白激酶激酶(mitogen-activated protein kinase, MEK)/ERK1/2对创伤性脊髓损伤大

鼠膀胱功能和轴突损伤修复产生作用,而邵杨等^[10]研究发现甘草苷通过抑制丝裂原活化蛋白激酶通路抑制炎症和神经细胞凋亡治疗脊髓损伤;也有研究表明,cPLA2介导的线粒体途径细胞凋亡受Ras/Raf/MEK/ERK信号通路的调控^[11]。目前研究显示,中医药可通过ERK/cPLA2信号通路治疗膜性肾病的实验报道^[12-13],尚没有MEK/ERK1通路调控cPLA2治疗脊髓损伤的报道。

脊髓损伤又称为截瘫,属中医“痿证”范畴^[14],其病机早期主要为“督脉瘀阻不通为本、肠腑和膀胱功能失调为标”。目前针灸治疗脊髓损伤多采用督脉或夹脊电针;有研究表明,这一针灸治疗方法对于脊髓损伤所造成的截瘫特别是不完全性截瘫的恢复有肯定的促进作用^[14-16]。目前认为电针治疗的机制可能在于电针能有效抑制脊髓损伤后炎症反应、改善微循环、促进营养因子分泌、抑制细胞凋亡、促进神经轴突再生、减少胶质瘢痕形成等^[17-18]。有人根据脊髓损伤早期或恢复期的病机特点,采用一种以“通督、通(肠)腑、通调膀胱”为取穴特点的“三通针法”电针治疗脊髓损伤取得了较好的疗效^[16, 19],且他们的前期研究表明“三通针法”电针通过抑制RhoA/Rho kinase信号通路相关因子表达和cPLA2的活性来改善脊髓损伤神经功能^[20-22]。时素华等^[23]研究表明电针通过抑制脊髓损伤MEK、p-ERK1的表达从而达到治疗脊髓损伤的目的。据此,作者提出如下假说,电针治疗脊髓损伤可能是通过调控RhoA/Rho kinase和MEK/ERK信号通路相关因子,抑制cPLA2的活性,减轻炎症反应和降低神经细胞凋亡而发挥治疗脊髓损伤的作用。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照动物实验,盲法评估。组间比较采用单因素方差分析,方差齐采用 LSD 多重比较,方差不齐采用 Dunnett's T3 多重比较。

1.2 时间及地点 实验于 2020 年 11 月至 2021 年 10 月在基尔顿(上海)生物科技有限公司完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 雌性健康清洁级 Sprague-Dawley(SD)大鼠 90 只,2 月龄,体质量(200±20)g,许可证号:SYXK(沪)2013-0016,购自上海交通大学医学院实验动物中心。标准配方杆状饲料喂养,保持室温 20-25℃,自然光照、自由进食及饮水。所有大鼠适应性饲养 3 d 后开始实验。

实验方案得到上海市第六人民医院动物伦理委员会的批准(批准号:2020-0427)。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。

1.3.2 主要试剂与仪器 Trizol:美国 invitrogen 公司;SYBR Green PCR 试剂盒、反转录试剂盒:美国 Thermo 公司;RNase I:美国 Fermentas 公司;阻断剂 Y27632、U0126:

上海 SIGMA-ALDRICH 公司;前列腺素 E2 和血小板活化因子酶联免疫试剂盒:武汉华美生物工程有限公司;鼠抗 RhoA、ROCK II、ERK1/2、p-ERK1/2、GAPDH 一抗:美国 Proteintech 公司;兔抗 cPLA2、p-cPLA2 一抗:美国 Cell Signaling Technology 公司;羊抗兔及羊抗小鼠 HRP 标记二抗:上海碧云天生物试剂有限公司。PS-9 电转仪:大连竞迈科技有限公司;低温冷冻离心机:上海卢湘仪器有限公司;Tanon-5200 凝胶成像系统:上海天能科技有限公司;PE 10 导管:英国 Smiths Medical 公司(ID:0.28 mm;OD:0.61 mm);Real-time 检测仪:美国 ABI(ABI-7300)公司;石蜡切片机:德国徕克公司(型号:SQ2125);大脑皮质挫伤撞击仪:美国 Flexcell International,美国 INC. 公司;90N-102 世新雕刻机:韩国 Sae Shin 精密有限公司;华佗牌无菌针灸针(直径 0.3 mm、长 13 mm)及华佗牌电针治疗仪:苏州医疗器械厂。

1.4 实验方法

1.4.1 脊髓损伤模型制备 90 只 SD 大鼠予以 3% 戊巴比妥钠 40 mg/kg 腹腔注射麻醉后,俯卧位固定于手术台上,备皮、碘伏消毒,以 T₁₀ 棘突为中心在背部正中依次切开皮肤、皮下组织,切口长约 2 cm,分离脊柱两侧肌肉及筋膜,显露 T₉-T₁₁ 椎体棘突及椎板。用世新雕刻机刀形磨头在近椎弓根处磨切 2.0-3.0 mm 的小口,磨切时注意滴水降温,以免产生的热量灼伤脊髓,然后用咬骨钳小心咬除 T₁₀ 棘突及椎板,充分暴露硬脊膜。72 只大鼠参照改良 Allen 重物打击法制备 T₁₀ 脊髓损伤动物模型^[20-21]:将撞击仪的撞击头(直径约 3 mm)对准脊髓背部中心位置,将其贴近硬脊膜表面后回缩撞击头;设定撞击参数:深度 1.5 mm、速度 5 m/s、滞留时间 0.5 s,实施撞击。模型成功判断标准:撞击处硬脊膜快速

水肿瘀血,同时伴大鼠尾巴痉挛性摆动,或后肢回缩性颤动,或身体痉挛性抽动。同法咬除 L₅-S₁ 关节处棘突并暴露脊髓,将 PE10 软管夹扁插入蛛网膜腔隙并缝合固定于筋膜处,外用导丝封闭^[21]。术后用生理盐水和青霉素清洗伤口并单独分笼饲养。术后 1 周内每日 2 次给予腹腔注射青霉素 20 万单位以抗感染,每日按摩膀胱 3 次至其排尿反射恢复为止。

组织工程实验动物造模过程中的相关问题:	
造模目的	探讨电针调控 Rho/ROCK(Rho kinase) 及 MEK/ERK 信号通路对脊髓损伤后 cPLA2 的影响
构建动物模型	T ₁₀ 节段脊髓创伤所致的脊髓损伤大鼠模型
选择动物的条件	雌性健康清洁级 SD 大鼠,2 月龄,体质量(200±20)g
模型与所研究疾病的关系	雌性大鼠尿道短,造模后易于排尿、尿路感染少、死亡率低,并且雌雄大鼠在组织学、行为学方面无明显差异 ^[6] 。大鼠模型基本真实再现临床上脊髓损伤的发病、发展和转归
造模技术描述	大鼠参照改良 Allen 重物打击法制备 T ₁₀ 脊髓损伤动物模型 ^[20-21] :将撞击仪的撞击头(直径约 3 mm)对准脊髓背部中心位置,将其贴近硬脊膜表面后回缩撞击头;设定撞击参数:深度 1.5 mm、速度 5 m/s、滞留时间 0.5 s,实施撞击
动物数量及分组方法	大鼠随机分为脊髓损伤组、电针治疗组、U0126 治疗组和 Y27632 治疗组,另设立假手术组,每组 18 只
造模成功评价指标	撞击处硬脊膜快速水肿瘀血,同时伴大鼠尾巴痉挛性摆动,或后肢回缩性颤动,或身体痉挛性抽动
造模后实验观察指标	大鼠 BBB 评分;脊髓前列腺素 E2、血小板活化因子的含量;脊髓神经细胞凋亡率;脊髓 RhoA、ROCK II、MEK、ERK1/2、cPLA2 mRNA 和蛋白表达
造模过程中动物死亡原因	实验过程中,电针治疗组、U0126 治疗组、Y27632 治疗组和模型组各有 1, 2, 2, 2 只大鼠死亡
如何补充造模过程中缺失的动物	未做补充
造模后动物处理中的用药	治疗结束后第 2 天对大鼠行 BBB 评分,每组随机选取 6 只大鼠,麻醉后以断颈法处死大鼠,取出以 T ₁₀ 为中心向头、尾端各长约 0.5 cm 的脊髓,-80℃ 冰箱中保存备用
伦理委员会批准	实验方案经上海市第六人民医院动物伦理委员会的批准(No:2020-0427)

1.4.2 分组与处理 造模前后对所有实验大鼠进行 Basso-Beattie-Bresnahan(BBB) 评分^[15]。将 BBB 评分在 0-1 分的大鼠纳入实验,模型大鼠按照信封随机法分为 4 组,每组 18 只;另外设立假手术组 18 只;共 5 组。

(1) 电针治疗组:造模成功当天开始进行电针治疗。根据文献^[20-21]选取大鼠大椎、腰阳关以及双侧次髎、足三里,穴位定位参考《实验针灸学》相关内容^[24],穴位局部备皮,进针 0.5-0.7 cm,大椎及腰阳关接一对电极,双侧次髎、足三里各接一对电极,正极在上,负极在下,电针参数选择疏密波,频率为 100/2 Hz,交替持续时间为 1.5 ms,波宽 0.4 ms,电流强度以肢体肌肉出现轻微跳动为度,持续时间 20 min,每天 1 次,共治疗 14 次^[20-21]。

(2) U0126 治疗组:将 18 μg ERK 通路阻断剂 U0126 冻干粉溶解于 30 μL 磷酸盐缓冲盐水中(pH 7.4)通过微量进药器

经自制 PE10 导管缓慢推注, 隔日 1 次, 共治疗 7 次^[21]。

(3) Y27632 治疗组: ROK 通路阻断剂 Y27632 给予硬膜下腔注射^[21], 方法同 (2)。

(4) 脊髓损伤组: 不进行任何治疗, 只进行与治疗组相同的固定。

(5) 假手术组: 只进行椎板咬除, 但不进行脊髓撞击。不进行任何治疗, 只进行与治疗组相同的固定。

1.4.3 脊髓样品提取及切片制作 治疗结束后第 2 天行 BBB 评分, 之后每组随机选取 6 只大鼠, 麻醉后行心脏灌注, 采集各组实验动物以 T₁₀ 为中心长约 1 cm 的脊髓, 体积分数 4% 的甲醛固定 48 h, 常规石蜡包埋, 连续 4-7 μm 厚度切片, 用于 TUNEL 检测。每组余下的大鼠分别用于 Western-blot、实时荧光定量 PCR 检测。麻醉后以断颈法处死大鼠, 取出以 T₁₀ 为中心向头、尾端各长约 0.5 cm 的脊髓, 中间切断并分别保存于 -80 °C 冰箱中备用。

1.5 检测指标

1.5.1 BBB 评分 治疗前后采用盲法对所有实验动物进行 BBB 评分, 让每只大鼠在空旷平地上自由活动, 每次评 3 min, 每只大鼠评 3 次, 取平均值。完全截瘫为 0 分, 正常为 21 分。

1.5.2 原位末端转移酶标记 (TUNEL) 法检测大鼠脊髓神经细胞凋亡率 从每组每只大鼠切片中随机抽取 6 张, 通过二甲苯脱蜡, 梯度乙醇洗脱后, 浸入 H₂O₂ 封闭液中, 室温封闭 10 min, 取蛋白酶 K 溶液加到组织切片上孵育 30 min, PBS 冲洗后, 取等量生物素化核苷酸和末端脱氧核糖核酸转移酶, 加入平衡缓冲液获得 rTdT 溶液。取 50-100 μL rTdT 溶液加到组织切片上。37 °C 避光孵育 60 min, 然后缓冲液冲洗中止反应, 将辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的链霉亲和素加入切片中, 室温孵育 30 min。DAB 显色, 根据背景颜色控制反应时间, 显微镜下 200 倍视野观察、每张切片随机取 5 个视野计数、拍照, 结果以 TUNEL 阳性细胞数表示。

1.5.3 ELISA 方法检测脊髓组织血小板活化因子、前列腺素 E2 的含量 低温保存的脊髓解冻后剪碎, 加预冷的 10% 三氯醋酸, 冰浴匀浆; -20 °C 放置 1 h 后离心; 沉淀物用含 0.1% DTT 的丙酮溶液洗 2 次, 真空干燥; 各沉淀用等量蛋白溶液溶解, 匀浆, 离心, 取上清检测。具体操作参照试剂盒说明书进行。用酶标仪在 450 nm 波长测量各样品的 A 值。

1.5.4 Western-blot 检测 每组随机取 6 份冷冻样品, 解冻后脊髓组织用 300 μL 的裂解缓冲液匀浆裂解。将样品溶于装载液中, 煮沸 5 min, 离心, 收集蛋白上清。样品匀浆后采用 BCA 法测定总蛋白浓度。将 PAGE 胶放入电泳槽中, 加入电泳缓冲液至其充分浸入, 拔掉梳子。根据先前蛋白定量结果决定取量, 每孔上样量为 80 μg 蛋白, 加入相应上样缓冲液调至相等的浓度, 将其煮沸变性后离心, 取上清上样, 将准备好的样品加入对应孔中。电泳条件: 8% 浓缩胶恒压 800 V, 20 min; 15% 分离胶恒压 120 V, 60 min, 当染料移动到凝胶底部时, 停止电泳, 取下凝胶, 半干转的电转法将蛋白

转移至 PVDF 膜上, 将其置于丽春红染色工作液 (2% 的丽春红贮备液 1 : 10 稀释, 即加 9 倍的 ddH₂O) 中, 染色 5-10 min, 随后用大量的水洗膜直至蛋白条带出现, 将膜浸没在 TBST 溶解的 5% 脱脂奶粉中, 37 °C 振荡封闭 1 h, 依次加入 RhoA (1 : 500)、ROCK II (1 : 5 000)、MEK (1 : 1 000)、ERK1/2 (1 : 2 000)、p-ERK1/2 (1 : 2 000)、cPLA2 (1 : 1 000)、p-cPLA2 (1 : 1 000) 兔抗鼠多克隆一抗和辣根过氧化物酶标记山羊抗兔二抗 (1 : 1 000) 进行结合反应; ECL 增强化学发光显色、压片、曝光、显影、冲洗胶片, 采用凝胶成像仪采集图像^[22]。使用分析软件对相关条带的灰度值进行分析, 以 GAPDH 为内参照, 求 RhoA、ROCK II、MEK、ERK1/2、p-ERK1/2、cPLA2、p-cPLA2 与 GAPDH 的灰度比值表示相对蛋白水平。

1.5.5 实时荧光定量 PCR 检测 首先用 Trizol 抽提总 mRNA, 以反转录 (RT 法) 先合成 cDNA, 具体方法是: ①总 RNA 中 DNA 的消除: DNase I 1 μL; 10×DNase I Buffer 1 μL; 总 RNA ≤ 1 ng; 加入 DEPC-H₂O 使总体积为 10 μL。反应条件为 37 °C, 30 min; Hold, 加 1 μL 的 EDTA; 65 °C, 10 min。②反转录: 按以下体系加入 RNA-Primer Mix 12 μL; 5×RT Reaction Buffer 5 μL; 25 mmol/L dNTPs 1 μL; 25 U/μL RNase Inhibitor 1 μL; 200 U/μL M-MLV Rtas 1 μL; Oligo(dt)18 1 μL; ddH₂O (DNase-free) 4 μL; 总体积: 25 μL。反应程序: 37 °C, 60 min; 85 °C, 5 min; 4 °C, 5 min; 置于 -20 °C 保存。③ Real-time PCR 扩增: 将制备好的 cDNA 进行 PCR 扩增。扩增体系如下: SYBRGreen Mix 12.5 μL; 上游引物 F 0.5 μL; 下游引物 R 0.5 μL; ddH₂O 9.5 μL; cDNA 模板 2 μL; 总体积: 25 μL。PCR 扩增反应条件: 94 °C 预变性 5 min, 然后 95 °C 15 s, 60 °C 45 s, 72 °C 30 s, 40 个循环, 在 60 °C 时收集荧光信号, 荧光通道选择 SYBR, 最后延伸 72 °C 7 min。相对 mRNA 表达水平的计算数据分析采用 ABI Prism 7300 SDS Software。每个样品中靶基因的相对 mRNA 表达水平采用以下公式计算: 相对 mRNA 表达 = 2^{-ΔΔCt} × 100%, 其中 ΔCt = 靶基因 Ct 值 - 管家基因 Ct 值^[21]。引物由上海基尔顿生物科技有限公司合成, 引物序列见表 1。

表 1 | 引物序列

Table 1 | Primer sequences

基因	引物序列 (5'-3')	产物大小 (bp)
RhoA	上游引物: GCT GGA CAG GAA GAT TAT GAC	158
	下游引物: ATG ATG GGC ACA TTT GGA C	
ROCK II	上游引物: ATG ATG GGC ACA TTT GGA C	171
	下游引物: TCA TAG AAG GCA GTT AGC	
cPLA2	上游引物: TCA ACC TTC AAC TTC CAG TAT C	108
	下游引物: CTC AAC AAT GGC ATC CTT TAT C	
ERK1	上游引物: CGA TTC CAG CCA GGA TAC AG	139
	下游引物: GGA GTC AAG AGT GGG TAA GC	
ERK2	上游引物: TGC TCC TAC CTG CTC CTT CTC	282
	下游引物: GCG GTC ATA GCC CTT CCA TTC	
GAPDH	上游引物: GGA GTC TAC TGG CGT CTT CAC	237
	下游引物: ATG AGC CCT TCC ACG ATG C	

1.6 主要观察指标 ①盲法 BBB 评分；②脊髓神经细胞凋亡率；③脊髓前列腺素 E2、血小板活化因子的含量；④脊髓 RhoA、ROCK II、MEK、ERK1/2、p-ERK1/2、cPLA2、p-cPLA2 蛋白的表达；⑤脊髓 RhoA、ROCK II、cPLA2、MEK、ERK1/2 mRNA 的表达。

1.7 统计学分析 实验结果采用 SPSS 20.0 统计软件进行分析，所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示，组间比较采用单因素方差分析，方差齐采用 LSD 多重比较，方差不齐采用 Dunnett's T3 多重比较。取 $P < 0.05$ 为显著性水平， $P < 0.01$ 为差异有非常显著性意义。文章统计学方法已经南昌医学院生物统计学专家审核。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 实验过程中，电针治疗组、U0126 治疗组、Y27632 治疗组和脊髓损伤组各有 1, 2, 2, 2 只大鼠死亡，共有 83 只大鼠进入结果分析。

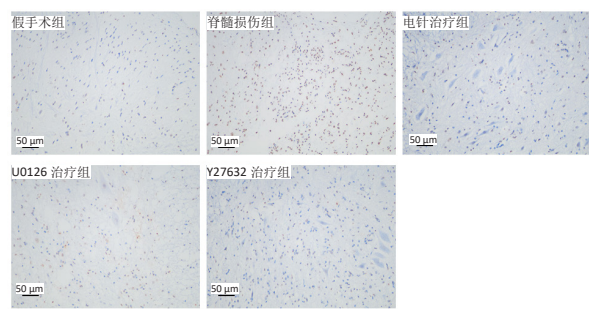
2.2 大鼠神经功能 BBB 评分比较 治疗前、后脊髓损伤大鼠 BBB 评分明显低于假手术组 ($P < 0.01$)；各治疗组大鼠 BBB 评分都明显高于脊髓损伤组 ($P < 0.01$)，见表 2。

表 2 | 各组大鼠 BBB 评分比较 ($\bar{x} \pm s$)
Table 2 | Comparison of Basso, Beattie, Bresnahan scores in rats

组别	n	治疗前	治疗后
假手术组	18	20.67±0.49	21.00±0.00
脊髓损伤组	16	0.28±0.46 ^a	2.38±0.89 ^a
电针治疗组	17	0.28±0.46 ^a	5.06±1.52 ^{ab}
U0126 治疗组	16	0.39±0.50 ^a	5.19±1.47 ^{ab}
Y27632 治疗组	16	0.39±0.50 ^a	5.00±1.59 ^{ab}

表注：与假手术组比较，^a $P < 0.01$ ；与脊髓损伤组比较，^b $P < 0.01$

2.3 大鼠脊髓组织细胞凋亡比较 凋亡的阳性细胞呈棕黄色或浅褐色颗粒状。假手术组中只有少量浅褐色的凋亡细胞，而在脊髓损伤组中则有密集的呈棕黄色颗粒状的阳性细胞，经半定量分析显示，脊髓损伤组中阳性细胞计数明显高于假手术组 ($P < 0.01$)；各治疗组脊髓组织中也有较多棕黄色或浅褐色颗粒状的阳性细胞分布，它们的数量明显多于假手术组而少于脊髓损伤组 ($P < 0.01$)。电针治疗组阳性细胞数明显少于 Y27632 和 U0126 治疗组 ($P < 0.01$ 或 0.05)，而 Y27632 和 U0126 治疗组阳性细胞数比较差异则无显著性意义 ($P > 0.05$)，见图 1，表 3。



图注：脊髓损伤组中阳性细胞计数明显高于假手术组 ($P < 0.01$)；各治疗组阳性细胞数量明显多于假手术组而少于脊髓损伤组；电针治疗组阳性细胞数明显少于 Y27632 治疗组和 U0126 治疗组

图 1 | 各组大鼠脊髓组织神经细胞凋亡图 (TUNEL 法)

Figure 1 | Apoptosis of nerve cells in the spinal cord of rats (TUNEL method)

表 3 | 各组大鼠脊髓组织凋亡阳性细胞数比较 (TUNEL 法) ($\bar{x} \pm s$, $n=6$, 个)
Table 3 | Comparison of the number of apoptotic cells in the spinal cord of rats (TUNEL method)

组别	阳性细胞数
假手术组	11.64±2.81
脊髓损伤组	131.28±10.56 ^a
电针治疗组	64.42±9.14 ^{ab}
U0126 治疗组	89.06±7.30 ^{abc}
Y27632 治疗组	83.06±13.01 ^{abd}

表注：与假手术组比较，^a $P < 0.01$ ；与脊髓损伤组比较，^b $P < 0.01$ ；与电针治疗组比较，^c $P < 0.01$ ，^d $P < 0.05$

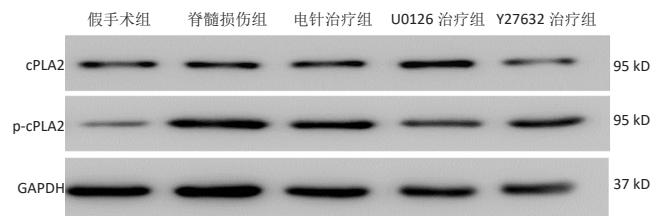
2.4 大鼠脊髓组织前列腺素 E2、血小板活化因子含量比较 脊髓损伤组大鼠脊髓组织前列腺素 E2 和血小板活化因子含量明显高于假手术组 ($P < 0.01$)；各治疗组大鼠脊髓组织前列腺素 E2 和血小板活化因子含量都明显低于脊髓损伤组 ($P < 0.01$)；U0126 和 Y27632 治疗组大鼠脊髓组织血小板活化因子含量明显低于电针治疗组 ($P < 0.01$)；U0126 和 Y27632 治疗组之间比较，脊髓组织血小板活化因子含量无显著性差异 ($P > 0.05$)，见表 4。

表 4 | 各组大鼠脊髓组织前列腺素 E2 和血小板活化因子含量比较 ($\bar{x} \pm s$, $\mu\text{g/g}$)
Table 4 | Comparison of the levels of prostaglandin E2 and platelet activating factor in the spinal cord of rats

组别	n	前列腺素 E2	血小板活化因子
假手术组	12	0.221 3±0.031 1	0.266 4±0.037 9
脊髓损伤组	10	0.509 6±0.041 3 ^a	1.001 5±0.089 8 ^a
电针治疗组	11	0.429 3±0.035 1 ^{ab}	0.839 0±0.148 5 ^{ab}
U0126 治疗组	10	0.375 3±0.040 3 ^{ab}	0.678 5±0.100 7 ^{abc}
Y27632 治疗组	10	0.368 3±0.059 7 ^{ab}	0.648 9±0.137 9 ^{abc}

表注：与假手术组比较，^a $P < 0.01$ ；与脊髓损伤组比较，^b $P < 0.01$ ；与电针治疗组比较，^c $P < 0.01$

2.5 大鼠脊髓组织 cPLA2、p-cPLA2 蛋白表达比较 脊髓损伤组大鼠脊髓组织 p-cPLA2 蛋白表达水平明显高于假手术组 ($P < 0.01$)；治疗后除电针治疗组外，U0126 和 Y27632 治疗组大鼠脊髓组织 p-cPLA2 蛋白表达水平都明显低于脊髓损伤组 ($P < 0.01$)；cPLA2 蛋白表达水平在所有组之间差异均无显著性意义 ($P > 0.05$)，见图 2，表 5。



图注：cPLA2 为胞浆型磷脂酶 A2

图 2 | 各组大鼠脊髓组织 cPLA2、p-cPLA2 蛋白表达条带图

Figure 2 | Bands of the protein expressions of cPLA2 and P-CPLA2 in the spinal cord of rats

2.6 大鼠脊髓组织 cPLA2 基因表达比较 脊髓损伤组大鼠脊髓组织 cPLA2 基因表达水平明显高于假手术组 ($P < 0.01$)；U0126 治疗组和 Y27632 治疗组大鼠脊髓组织 cPLA2 基因表达水平明显低于脊髓损伤组 ($P < 0.01$)；各治疗组之间比较则无明显差异 ($P > 0.05$)，见表 6。

表 5 | 各组大鼠 cPLA2、p-cPLA2 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 5 | Comparison of the expressions of cPLA2 and p-cPLA2 proteins in rats

组别	cPLA2/GAPDH	p-cPLA2/GAPDH
假手术组	0.810 2±0.113 0	0.256 0±0.110 9
脊髓损伤组	0.822 4±0.231 9	1.109 1±0.144 2 ^a
电针治疗组	0.741 3±0.112 4	0.812 6±0.241 9 ^{ab}
U0126 治疗组	0.688 5±0.303 6	0.609 3±0.197 6 ^{ab}
Y27632 治疗组	0.834 1±0.239 4	0.764 7±0.244 4 ^{ab}

表注: 与假手术组比较, ^a $P < 0.01$; 与脊髓损伤组比较, ^b $P < 0.01$ 。cPLA2: 胞浆型磷脂酶 A2

表 6 | 各组大鼠 cPLA2 基因相对表达量比较 ($\bar{x}\pm s$)

Table 6 | Comparison of the gene expression of cPLA2 in the spinal cord of rats

组别	n	cPLA2/GAPDH
假手术组	12	0.793±0.301
脊髓损伤组	10	2.010±0.370 ^a
电针治疗组	11	1.725±0.526 ^a
U0126 治疗组	10	1.053±0.370 ^b
Y27632 治疗组	10	1.070±0.299 ^b

表注: 与假手术组比较, ^a $P < 0.01$; 与脊髓损伤组比较, ^b $P < 0.01$ 。cPLA2: 胞浆型磷脂酶 A2

2.7 大鼠脊髓组织 RhoA、ROCK II 蛋白表达比较 脊髓损伤组大鼠脊髓组织 RhoA、ROCK II 蛋白表达水平明显高于假手术组 ($P < 0.01$); 治疗后, 除 U0126 治疗组 RhoA 蛋白表达外, 各治疗组大鼠脊髓组织 RhoA、ROCK II 蛋白表达水平都明显低于脊髓损伤组 ($P < 0.01$ 或 0.05), 见图 3, 表 7。

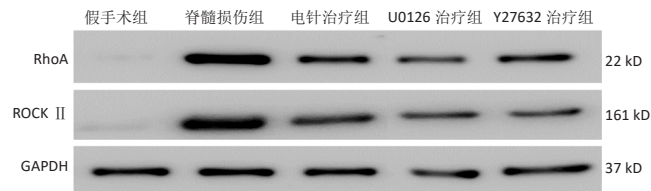


图 3 | 各组大鼠脊髓组织 RhoA、ROCK II 蛋白表达条带图
Figure 3 | Bands of the protein expressions of RhoA and ROCK II in the spinal cord of rats

表 7 | 各组大鼠 RhoA、ROCK II 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 7 | Comparison of the protein expressions of RhoA and ROCK II in rats

组别	RhoA/GAPDH	ROCK II /GAPDH
假手术组	0.371 2±0.328 9	0.367 0±0.245 7
脊髓损伤组	1.433 1±0.456 8 ^a	1.649 0±0.324 3 ^a
电针治疗组	0.926 1±0.326 0 ^{bc}	0.930 3±0.492 2 ^{ab}
U0126 治疗组	1.027 0±0.484 0 ^a	1.114 4±0.385 0 ^{bc}
Y27632 治疗组	0.881 8±0.353 3 ^{bc}	0.810 2±0.348 7 ^{ab}

表注: 与假手术组比较, ^a $P < 0.01$; 与脊髓损伤组比较, ^b $P < 0.01$, ^c $P < 0.05$

2.8 大鼠脊髓组织 RhoA、ROCK II 基因表达比较 脊髓损伤组大鼠脊髓组织 RhoA、ROCK II 基因表达水平明显高于假手术组 ($P < 0.01$); 各治疗组大鼠脊髓组织 RhoA、ROCK II 基因表达水平明显低于脊髓损伤组 ($P < 0.01$ 或 0.05); U0126 和 Y27632 治疗组大鼠脊髓组织 RhoA、ROCK II 基因表达水平明

显低于电针治疗组 ($P < 0.01$), 但 U0126 和 Y27632 治疗组之间比较差异无显著性意义 ($P > 0.05$), 见表 8。

表 8 | 各组大鼠脊髓组织 RhoA、ROCK II 基因相对表达量比较 ($\bar{x}\pm s$)

Table 8 | Comparison of the gene expressions of RhoA and ROCK II in the spinal cord of rats

组别	n	RhoA/GAPDH	ROCK II /GAPDH
假手术组	12	0.673±0.140	1.056±0.295
脊髓损伤组	10	1.797±0.458 ^a	2.707±0.698 ^a
电针治疗组	11	1.484±0.240 ^{cd}	2.283±0.432 ^{cd}
U0126 治疗组	10	0.922±0.255 ^{bce}	1.378±0.275 ^{ce}
Y27632 治疗组	10	0.892±0.175 ^{ce}	1.132±0.377 ^{ce}

表注: 与假手术组比较, ^a $P < 0.01$, ^b $P < 0.05$; 与脊髓损伤组比较, ^c $P < 0.01$, ^d $P < 0.05$; 与电针治疗组比较, ^e $P < 0.01$

2.9 大鼠脊髓组织 MEK、ERK1/2、p-ERK1/2 蛋白表达比较 脊髓损伤组大鼠脊髓组织 MEK、p-ERK1/2 蛋白表达水平明显高于假手术组 ($P < 0.01$); 各治疗组大鼠脊髓组织 MEK、p-ERK1/2 蛋白表达水平明显都明显低于脊髓损伤组 ($P < 0.01$); U0126 和 Y27632 治疗组大鼠脊髓组织 p-ERK1/2 蛋白表达水平明显低于电针治疗组 ($P < 0.01$ 或 0.05), 但 U0126 和 Y27632 治疗组之间比较差异无显著性意义 ($P > 0.05$), 见图 4, 表 9。

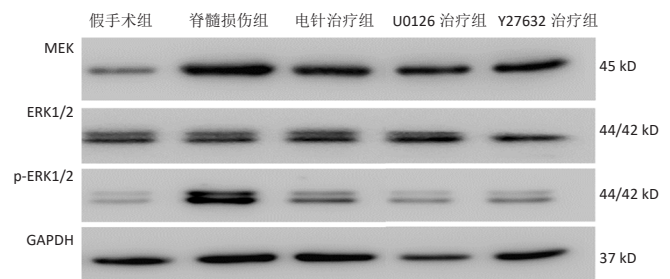


图 4 | 各组大鼠脊髓组织 MEK、ERK1/2、p-ERK1/2 蛋白表达条带图
Figure 4 | Bands of the protein expressions of MEK, ERK1/2, and p-ERK1/2 in the spinal cord of rats

表 9 | 各组大鼠 MEK、ERK1/2、p-ERK1/2 蛋白相对表达量比较 (/GAPDH) ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 9 | Comparison of the protein expressions of MEK, ERK1/2, and p-ERK1/2 in rats

组别	MEK/GAPDH	ERK1/2/GAPDH	p-ERK1/2/GAPDH
假手术组	0.196 5±0.056 0	0.892 8±0.222 7	0.228 2±0.087 2
脊髓损伤组	1.069 5±0.148 5 ^a	0.869 8±0.256 0	1.073 2±0.148 8 ^a
电针治疗组	0.729 0±0.155 7 ^{ab}	0.854 6±0.252 2	0.673 1±0.104 4 ^{ab}
U0126 治疗组	0.676 6±0.207 5 ^{ab}	0.918 0±0.396 4	0.443 0±0.102 4 ^{abc}
Y27632 治疗组	0.737 8±0.270 3 ^{ab}	0.739 0±0.217 0	0.463 8±0.207 4 ^{abd}

表注: 与假手术组比较, ^a $P < 0.01$; 与脊髓损伤组比较, ^b $P < 0.01$; 与电针治疗组比较, ^c $P < 0.01$, ^d $P < 0.05$

2.10 大鼠脊髓组织 MEK、ERK1/2 基因表达比较 脊髓损伤组大鼠脊髓组织 MEK、ERK1/2 基因表达水平明显高于假手术组 ($P < 0.01$); U0126 治疗组脊髓组织 MEK、ERK1/2 基因表达水平明显低于脊髓损伤组 ($P < 0.05$), Y27632 治疗组脊髓组织 ERK1/2 基因表达水平明显低于脊髓损伤组 ($P < 0.05$), 见表 10。

表 10 | 各组大鼠脊髓组织 MEK、ERK1/2 基因相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)
Table 10 | Comparison of the gene expressions of MEK and ERK1/2 in the spinal cord of rats

组别	n	MEK/GAPDH	ERK1/2/GAPDH
假手术组	12	0.711±0.184	1.179±0.332
脊髓损伤组	10	1.369±0.434 ^a	2.293±0.661 ^a
电针治疗组	11	1.249±0.307 ^a	1.955±0.495 ^a
U0126 治疗组	10	0.977±0.362 ^b	1.603±0.493 ^b
Y27632 治疗组	10	0.996±0.287	1.690±0.522 ^b

表注：与假手术组比较，^a $P < 0.01$ ；与脊髓损伤组比较，^b $P < 0.01$

3 讨论 Discussion

脊髓损伤临床症状多表现为损伤平面以下肢体不同程度的运动、感觉障碍和尿便功能障碍；病因多为外力损伤，中医病机为“督脉瘀阻不通、肠腑和膀胱功能失调”^[14]。当督脉受外力损伤，导致督脉虚损、瘀血阻滞、经络不通，使皮肉筋骨节失于濡养，故出现肢体萎软、麻木等；瘀血内留，腑气不畅，肠腑气血阻滞，传导失司，膀胱开合失权，固摄无力，致二便异常。关于脊髓损伤的治疗，目前临床治疗主要有早期的激素治疗、促神经生长因子等药物、干细胞移植、基因芯片、康复训练等手段，但长期治疗的费用和药物的不良反应已成为患者严重的负担^[25]。近年来临床报道，督脉或夹脊电针治疗早期或恢复期脊髓损伤患者，特别是不完全性截瘫取得了比较满意的疗效^[14-16]。根据脊髓损伤病机特点，课题组前期采用“通督、通(肠)腑、通调膀胱”为取穴特点的“三通针法”来治疗脊髓损伤患者取得较好的疗效^[14, 26]。

此次动物实验采用“三通针法”治疗脊髓损伤符合中医辨证论治的核心思想，实验取督脉经穴“大椎”“腰阳关”，符合外伤性截瘫之督脉痹阻病机，乃“经脉所过，主治所及”之意；针刺“大椎”“腰阳关”可疏通督脉经气，使之上下贯通，构建督脉与脏腑经脉(肾与脑髓)之间功能联系，恢复气血津液精髓运行，从而治疗脊髓损伤。“足三里”为足阳明胃经合穴、下合穴，为治疗胃肠疾病的要穴，《四总穴歌》就有“肚腹三里留”治疗经验的总结；且阳明经为多气多血之经，中医有“治痿独取阳明”的治疗原则，故选择“足三里”以调胃健脾，通调肠腑。“次髎”位于第二骶后孔，属“八髎”之一，为膀胱经的要穴，针刺可通畅肠腑、通调膀胱，使尿便功能逐渐恢复。上述穴位合用，达到通督、通(肠)腑、通调膀胱之功效^[14, 27]。在针刺上述穴位的基础上再予以电针的持续刺激，特别是督脉“大椎”“腰阳关”，电针能使脊髓损伤局部形成脉冲电场，通过电针刺激改善损伤局部组织的血液微循环，且又能促进脑脊液流动，减轻脊髓损伤部位水肿和血肿的压迫，扼制脊髓继发性损伤的进行和神经细胞的凋亡^[28-29]。另外有研究表明电针还能增强脊髓损伤后尼氏体的恢复，促进脊髓损伤后神经的修复与再生和肢体功能的恢复^[30]。此次研究结果显示，脊髓损伤后大鼠 BBB 评分明显下降，经电针治疗后大鼠 BBB 评分都明显升高。这一研究结果与以往的研究结果是一致的^[20-21]。目前实验报道中选用夹脊穴电针治疗脊髓损伤是比较多见的方法，他们

一般是选取损伤局部上、下棘突间隙旁开的夹脊穴，电针仪的导线连接同侧的穴位，正极在上，负极在下(近尾端)^[31]。这种取穴方法只考虑了局部的穴位，而此次研究取穴是针对脊髓损伤的病机特点而设定的，即针对“督脉瘀阻不通为本”的病机，又兼顾“肠腑和膀胱功能失调为标”的病机，符合中医的整体观和辨证论治的核心思辨方略；这种取穴方法来源于临床，也更符合临床取穴特点，尽管动物实验取穴不如临床上多，但基本萃取了临床取穴的精华；这对验证临床电针治疗脊髓损伤的疗效、指导临床治疗更有实际意义。

cPLA2 是磷脂酶 A2 家族中重要的一个分型，它可将磷脂(如磷脂酰胆碱、磷脂酰肌醇等)水解成以花生四烯酸为主的游离脂肪酸和溶血磷脂，花生四烯酸等继而在环氧化酶和脂氧化酶进一步催化下生成白三烯、前列腺素 E2 以及血小板活化因子等具有强烈生物活性的物质^[32]。MARUSIC 等^[33]研究发现，实验性自身免疫性脑脊髓炎小鼠损伤的间隙中存在 cPLA2 的初始产物如前列腺素 E2、白三烯、血小板活化因子等物质。其中，cPLA2 的产物之一，前列腺素 E2 介导了促炎症反应；另外 cPLA2 作用于磷脂生成的另一种代谢产物溶血磷脂转变为有活性的分子——血小板活化因子，血小板活化因子可以激活小胶质或者免疫细胞，使这些细胞表达生长因子和黏附分子，改变膜的通透性后血小板活化因子更容易穿过内皮，导致脱髓鞘炎症反应以及细胞的凋亡^[34]。KOPPER 等^[35]观察到小鼠胸部挫伤脊髓损伤后 cPLA2 的激活以及巨噬细胞内富含脂质的髓磷脂碎片的积累，这些物质增加了 M1 巨噬细胞中促炎细胞因子、活性氧和一氧化氮的产生水平，以及 M1 介导的神经毒性；AACOCF3 (cPLA2 抑制剂)阻断髓磷脂的有害作用。这些研究说明 cPLA2 在脊髓损伤继发性损伤中起到非常重要的作用。此次实验研究结果显示，脊髓损伤后大鼠脊髓组织前列腺素 E2、血小板活化因子较假手术组明显升高，脊髓组织棕黄色颗粒状的阳性细胞密集分布，细胞凋亡率明显升高；cPLA2 基因表达及 p-cPLA2 蛋白表达明显升高，说明这些指标与上述文献分析的结果是一致的。另外此次研究结果显示，经电针治疗后，上述指标都有明显的下降；作者前期的研究结果表明电针能够降低脊髓损伤后脊髓组织 caspase-3 蛋白的表达和 cPLA2 的活性。除了前期研究，目前尚没有发现电针通过调控 cPLA2 治疗脊髓损伤的研究报道。

ROCK(Rho 激酶)是 Rho 的效应剂，Rho 能与 ROCK 的 α 卷曲螺旋结构域结合，激活 ROCK，激活后的 ROCK 进一步激活其底物，使肌球蛋白收缩，影响细胞骨架的稳定性，最终导致生长锥塌陷、神经凋亡^[36-37]。此次研究结果显示，脊髓损伤后脊髓组织 RhoA、ROCK II 蛋白和基因表达明显升高，说明 Rho/ROCK 信号通路在脊髓损伤的发病过程中起到非常重要的作用；经 Y27632 阻断后，脊髓组织 RhoA、ROCK II 蛋白和基因表达都明显下降；电针能够产生类似阻断剂 Y27632 的效果，且它们能不同程度地降低 cPLA2 基因及 p-cPLA2 蛋白表达，降低脊髓组织前列腺素 E2、血小板活化因子的水平和减少神经细胞的凋亡。Y-27632 是细胞可渗

透、高效、高选择性的 ROCK 相关蛋白激酶选择性抑制剂,其通过与 ATP 竞争结合催化位点来抑制 ROCKI 和 ROCKII,对各种原因导致的神经损伤均具有保护作用,可增加神经元的存活和神经突起的延长^[38]。李晓宁等^[39]研究发现,夹脊电针能够显著提高急性脊髓损伤大鼠 BBB 功能评分,并且认为可能与夹脊电针抑制大鼠脊髓损伤组织微环境 RhoA、ROCK II 等蛋白表达有关,这与此次研究结果是一致的,但他们没有研究 Rho/ROCK 信号通路对 cPLA2 的影响,也没有观察这一信号通路是否对炎症反应和细胞凋亡等产生影响。LIU 等^[6]研究发现,阻断 RhoA、Rho 激酶可分别降低 cPLA2 活性 66%, 60%; ROCK 阻断剂 Y27632 可减少或降低 cPLA2 的表达和活性。这与此次研究的结果类似,虽然此研究未具体计算下降的比例。

丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPKs)在细胞分化、发育、成活和凋亡过程中发挥重要的调节作用^[40]。丝裂原活化蛋白激酶 MEK 是 ERK 的上游激酶,细胞受细胞外刺激时,通过 Raf/MEK/ERK1/2 激酶级联把丝裂原信号从细胞浆膜传到胞核,活化 MEK,磷酸化 ERK1/2,活化的 ERK 的靶点之一是 cPLA2, cPLA2 通过 CaLB/C2 区域的直接激活因子 C-1-P 和间接激活因子 A23187,调节细胞内自由钙的浓度从而影响着 Bcl-2、Bax、细胞色素 C、caspase-3 凋亡诱导信号的功能^[11, 41]。此次研究结果显示,脊髓损伤后大鼠脊髓组织 MEK、ERK1/2 基因和 MEK、p-ERK1/2 蛋白表达表达明显升高,说明 MEK/ERK 信号通路在脊髓损伤的发病过程中也起到非常重要的作用;经 U0126 治疗后,脊髓组织 MEK、ERK1/2 基因表达和 MEK、p-ERK1/2 蛋白表达明显降低,电针治疗组大鼠脊髓组织 p-ERK1/2 蛋白表达明显高于 U0126,说明电针能产生类似阻断剂 U0126 的效果,但电针对 ERK1/2 活化作用要弱于 U0126。U0126 即 1, 4-二氨基-2, 3-二氧基-1, 4-双(邻氨基苯基)丁二烯,相对分子质量 380.50,分子式为 C₁₈H₁₆N₆S₂, U0126 可以通透细胞,选择性抑制 MEK1/2,从而抑制 MAP 激酶即 ERK1/2(p42 和 p44 丝裂原活化蛋白激酶)的磷酸化和激活^[42]。时素华等^[23]研究表明督脉电针可降低脊髓损伤 Raf/Ras/ERK 信号通路中 MEK2、p-ERK1 蛋白的表达,说明电针治疗能够对 MEK/ERK 产生调控作用。王维等^[43]研究也表明电刺激可通过抑制损伤脊髓 ERK 的表达,对脊髓起到一定的保护作用。而卫哲等^[44]研究认为督脉电针可促进脊髓损伤小鼠 p-ERK1/2、p-Akt 及 MBP 蛋白表达,他们的研究结果与大多数学者及此次研究的结果不一致,具体原因尚待分析。LIU 等^[6]研究发现, cPLA2 的活性与 ERK1/2 呈正相关,经 ERK 阻断剂 U0126 阻断后, cPLA2 的活性与表达明显下降;这与此次研究的部分结果是一致的。另外,此次研究结果还显示,电针和 U0126 能不同程度地降低 cPLA2 基因及 p-cPLA2 蛋白表达,降低脊髓组织前列腺素 E2、血小板活化因子的水平和减少神经细胞的凋亡;虽然没有文献报道抑制 MEK/ERK 通路能降低脊髓组织前列腺素 E2、血小板活化因子的水平,出现此次实验结果可能与

U0126 降低 cPLA2 基因及 p-cPLA2 蛋白的表达有关。

阻断剂 Y27632 和 U0126 能改善脊髓损伤大鼠 BBB 评分,降低脊髓组织阳性细胞数、前列腺素 E2 和血小板活化因子水平,降低 p-cPLA2 蛋白和 cPLA2 基因表达,因为这些结果是阻断这两条信号通路的下游效应。但此次研究发现阻断剂除对特异性信号通路有影响外,还对其他信号通路也有一定的影响,比如,阻断剂 Y27632 是 ROCK II 特异性阻断剂,它还能使 MEK、p-ERK1/2 的表达下调;同样, U0126 是 ERK1/2 特异性阻断剂,它还能使 RhoA、ROCK II 的表达下调,虽然下调的幅度不如阻断剂 Y27632 大,但无统计学意义。ROCK 是 Rho 的下游效应器, Rho 蛋白是 GTP 水解酶 Ras 超家族的一个亚组。Ras 家族成员是小的 GTP 结合蛋白, Ras 激活由丝裂原活化蛋白激酶 KK (Raf)、丝裂原活化蛋白激酶 K (MEK1/2) 和丝裂原活化蛋白激酶 (ERK) 组成的级联效应产生的。Rho/ROCK 和 MEK/ERK 信号通路之间可能存在复杂的相互关系,即 cross-talking。而此次研究的结果也提示, cPLA2 很可能就是这两条通路 cross-talking 的节点细胞因子之一。FU 等^[45]研究表明抑制 ROCK 可通过细胞外信号调节激酶 (ERK) 信号通路增强脊髓小胶质细胞吞噬活性;他们另外的研究发现, ERK 信号通路参与了 Y27632(包括法舒地尔)诱导的小胶质细胞迁移和形态变化^[46]。这些结果强烈表明, ERK 信号通路介导 ROCK 抑制剂诱导的小胶质细胞迁移和相关形态学改变。RhoA 属于 Ras 超家族,而 Ras 激活由 MEK/ERK 通路的级联效应产生, MEK/ERK 是 Rho/ROCK 的上游信号通路;而 FU 等的研究则认为 ERK 是 Rho/ROCK 通路的下游信号。此次实验研究表明 Rho/ROCK 和 MEK/ERK 信号通路可能是平行关系。以上研究分析, Rho/ROCK 和 MEK/ERK 信号通路之间可能存在复杂的交互,鉴于研究内容及设计方案的局限性,它们之间的复杂关系有待于课题组在今后研究中深入探讨和解析。

综上所述,电针通过抑制 Rho/ROCK 和 MEK/ERK 信号通路相关因子表达,降低 cPLA2 的活性,减少神经细胞凋亡、减轻脊髓损伤炎症反应,最终达到治疗脊髓损伤的作用。Rho/ROCK 和 MEK/ERK 信号通路之间的复杂关系有待今后深入探讨和解析。

作者贡献: 实验设计为第一作者完成,通讯作者负责质量控制,其他作者参与动物实验、数据采集、资料整理等,论文由第一作者完成,通讯作者负责审核。

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中不存在利益冲突。

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。

版权转让: 文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

出版规范: 文章撰写遵守了《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。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。

4 参考文献 References

- [1] CANOSA-HERMIDA E, MORA-BOGA R, CABRERA-SARMIENTO JJ, et al. Epidemiology of traumatic spinal cord injury in childhood and adolescence in Galicia, Spain: report of the last 26-years. *J Spinal Cord Med.* 2019;42(4):423-429.
- [2] GBD 2016 traumatic brain injury and spinal cord injury collaborators. Global, regional, and national burden of traumatic brain injury and spinal cord injury, 1990-2016: a systematic analysis for the global burden of disease study 2016. *Lancet Neurol.* 2019;18(1):56-87.
- [3] 张姣姣, 于石成, 么鸿雁, 等. 1990-2017年中国创伤性脊髓损伤疾病负担特点分析 [J]. *中华创伤杂志*, 2020,36(11):1004-1009.
- [4] 贺宝荣, 郑博隆. 中国脊髓损伤规范化治疗和修复机制研究概况 [J]. *中华创伤杂志*, 2020,36(4):289-292.
- [5] 吕威, 姚海江, 莫雨平, 等. 脊髓损伤后神经再生相关信号通路研究进展 [J]. *中国康复理论与实践*, 2016,22(3):293-298.
- [6] LIU NK, DENG LX, ZHANG YP, et al. Cytosolic phospholipase A2 protein as a novel therapeutic target for spinal cord injury. *Ann Neurol, Spinal Cord.* 2014;75(5):644-658.
- [7] WISSING D, MOURITZEN H, EGEBLAD M, et al. Involvement of caspase-dependent activation of cytosolic phospholipase A2 in tumor necrosis factor-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA, Spinal Cord.* 1997; 94(10):5073-5077.
- [8] WU X, WALKER CL, LU Q, et al. RhoA/Rho kinase mediates neuronal death through regulating cPLA2 activation. *Molecular Neurobiology.* 2017;54(9):6885-6895.
- [9] 石胜柳, 丁桃, 孙瑜, 等. 神经生长因子对创伤性脊髓损伤大鼠膀胱功能和轴突损伤修复的作用 [J]. *西安交通大学学报*, 2021,42(5): 700-705.
- [10] 邵杨, 安丹蕾, 杨杨, 等. 脊髓损伤小鼠中甘草苷通过抑制 MAPK 通路抑制炎症和神经元凋亡 [J]. *中国医科大学学报*, 2022,51(6):518-523.
- [11] CERVELLINI I, GALINO J, ZHU N, et al. Sustained MAPK/ERK activation in adult schwann cells impairs nerve repair. *Molecular Neurobiology.* 2018;38(3):679-690.
- [12] 薛丕良, 李丽琦, 徐梅秀, 等. 参芪蛭龙汤通过 ERK/cPLA2 信号通路对膜性肾病小鼠的治疗作用及机制研究 [J]. *海南医学院学报*. <https://doi.org/10.13210/j.cnki.jhmu.20220424.001> 网络首发日期: 2022-04-25
- [13] 丁秀, 袁军, 邹新蓉, 等. 基于 ERK/cPLA2 信号通路探讨膜肾方对膜性肾病大鼠模型的干预作用及其机制 [J]. *时珍国医国药*, 2021, 32(10):2234-2236.
- [14] 闵友江, 程立红, 高洁. 三通针法治疗脊髓损伤恢复期截瘫患者临床观察 [J]. *上海针灸杂志*, 2013,32(10):1010-1013.
- [15] 李娜娜, 杨志鹏, 杨卫卫. 针灸结合康复治疗时机对不同程度脊髓损伤患者神经功能恢复的作用观察 [J]. *临床医学*, 2020,40(9): 108-109.
- [16] 杨悦, 谢娜, 张建梅. 针灸联合康复护理促进脊髓损伤后神经源性膀胱功能恢复临床观察 [J]. *四川中医*, 2020,38(6):197-200.
- [17] 孙志人, 卢英琦, 胡其回, 等. 电针治疗脊髓损伤动物实验研究进展 [J]. *云南中医学院学报*, 2021,44(3):89-97.
- [18] 田秀燕, 覃业校, 朱世婷, 等. 近五年电针治疗脊髓损伤机制研究进展 [J]. 2021,41(10):1380-1382.
- [19] 闵友江, 程立红, 姚海华, 等. “三通针法”对脊髓损伤大鼠 p75 神经营养素受体表达的影响 [J]. *中国康复理论与实践*, 2017,23(6):621-627.
- [20] XIAO WP, DING LLQ, MIN YJ, et al. Electroacupuncture promoting axonal regeneration in spinal cord injury rats via suppression of Nogo/NgR and Rho/ROCK signaling pathway. *Neuropsych dis treat.* 2019;15: 3429-3442.
- [21] HONG ES, YAO HH, MIN YJ, et al. The mechanism of electroacupuncture for treating spinal cord injury rats by mediating Rho/Rho-associated kinase signaling pathway. *J Spinal Cord Med.* 2021;44(3):364-374.
- [22] 闵友江, 周璇, 余弯, 等. “三通针法”治疗脊髓损伤大鼠的时间窗效应及对胞浆型磷脂酶 A2、前列腺素 E 的影响 [J]. *时珍国医国药*, 2018,29(8):2026-2030.
- [23] 时素华, 吕威, 秦丽娜, 等. 基于 Raf/Ras/ERK 信号通路探讨督脉电针对脊髓损伤 1,7d 后 MEK2、p-ERK1 的影响 [J]. *中华中医药杂志*, 2017,32(7):2919-2923.
- [24] 林文注, 王佩. 实验针灸学 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1991.
- [25] 王子鼻, 宋文慧. 创伤性脊髓损伤药物治疗和细胞治疗研究进展 [J]. *国际骨科学杂志*, 2022,43(1):41-44.
- [26] 闵友江, 姚海华, 孙洁, 等. 磁共振评价“三通针法”对脊髓损伤患者脑功能的影响 [J]. *中国组织工程研究*, 2021,25(29):4600-4607.
- [27] 高洁, 张云杰, 闵友江, 等. 针灸治疗截瘫的腧穴研究及应用 [J]. *江西中医药*, 2013, 44(2):54-56.
- [28] 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.
- [29] 邹恩苗, 高丽萍, 胡洁, 等. 督脉电针对脊髓损伤大鼠神经细胞自噬及凋亡的影响 [J]. *中国中医骨伤科杂志*, 2019,27(11):11-14.
- [30] 杜旭, 王瑞辉. 电针对脊髓损伤大鼠尼氏体和神经功能的影响 [J]. *时珍国医国药*, 2011,22(4):995-996.
- [31] 田洪昭, 尹洪娜, 马育轩, 等. 夹脊电针调节自噬流促进大鼠脊髓损伤修复 [J]. *针灸临床杂志*, 2022,38(5):47-52.
- [32] DESSEN A. Structure and mechanism of human cytosolic phospholipase A2. *Biochimica et Biophysica Acta, Spinal Cord.* 2000;1488(1-2):40-47.
- [33] MARUSIC S, LEACH MW, PELKER JW, et al. Cytosolic phospholipase A2 alpha-deficient mice are resistant to experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med.* 2005;202(6):841-851.
- [34] 赵真, 马政文, 徐晓明. cPLA2 与中枢神经系统损伤的研究进展 [J]. *生理科学进展*, 2009,40(2):172-176.
- [35] KOPPER TJ, ZHANG B, BAILEY WM, et al. The effects of myelin on macrophage activation are phenotypic specific via cPLA2 in the context of spinal cord injury inflammation. *Sci Rep.* 2021;11:6341.
- [36] MIN YJ, DING LLQ, CHENG LH, et al. Effect of electroacupuncture on the mRNA and protein expression of RhoA and Rho-associated kinase II in spinal cord injury rats. *Neural Regen Res.* 2017;12(2):276-282.
- [37] WU XB, XU XM. RhoA/Rho kinase in spinal cord injury. *Neural Regen Res.* 2016;11(1): 23-27.
- [38] JAMES SE, BURDEN H, BURGESS R, et al. Anti-cancer drug induced neurotoxicity and identification of Rho pathway signaling modulators as potential neuroprotectants. *Neurotoxicology.* 2008;29(4):605-612.
- [39] 李晓宁, 梁雪松, 吴磊, 等. 夹脊电针对急性脊髓损伤大鼠脊髓组织微环境 Rho-ROCK II 通路相关因子的影响 [J]. *针刺研究*, 2018, 43(7):445-450.
- [40] 赵明哲, 刘靖华, 李玉花, 等. ERK 信号通路的信号转导调控机制 [J]. *国际病理科学与临床杂志*, 2009,29(1):15-17.
- [41] ZHANG LL, HUO XW, LIAO YH, et al. Zeylenone, a naturally occurring cyclohexene oxide, inhibits proliferation and induces apoptosis in cervical carcinoma cells via PI3K/AKT/mTOR and MAPK/ERK pathways. *Sci Rep.* 2017;7(1):1669.
- [42] 辛灵恩. ERK1/2 信号通路阻断剂 U0126 抑制肺纤维化及对 TGF-β1/Smad3 通路的影响 [D]. 兰州: 兰州大学, 2021.
- [43] 王维, 郭跃, 王文娟, 等. 功能电刺激对脊髓损伤大鼠肢体运动功能及损伤脊髓 ERK 表达的影响 [J]. *中华神经医学杂志*, 2019,18(12): 1224-1227.
- [44] 卫哲, 祝力骋. 督脉电针对脊髓损伤后 MAPK/ERK1/2 信号通路的影响 [J]. *中华物理医学与康复杂志*, 2020,42(1):8-12.
- [45] FU PC, TANG RH, YU ZY, et al. Rho-associated kinase inhibitors promote microglial uptake via the ERK signaling pathway. *Neurosci Bull.* 2016; 32(1):83-91.
- [46] FU PC, TANG RH, YU ZY, et al. The Rho-associated kinase inhibitors Y27632 and fasudil promote microglial migration in the spinal cord via the ERK signaling pathway. *Neural Regen Res.* 2018;13(4):677-683.

(责任编辑: WZH, ZN, ZJP)