

DOI: 10.20135/j.issn.1006-8147.2024.04.0343

论著

督脉电针和高压氧对脊髓损伤大鼠脊髓神经元的作用机制探讨

封怡辉¹, 聂统琨², 王东²

(1.天津医科大学研究生院, 天津 300070; 2.天津市第四中心医院神经外科, 天津 300140)

摘要 目的:探讨督脉电针和高压氧对脊髓损伤大鼠脊髓神经元的作用机制。方法:选择 Wistar 大鼠共 60 只,按随机数字表法分为 5 组,即正常对照组、模型组、督脉电针组、高压氧组、高压氧联合督脉电针组,每组 12 只。正常对照组只行椎板切除,不造成脊髓损伤;其余组用脊髓横断的方法损伤大鼠胸髓背侧部位,以构建实验模型。高压氧组于造模清醒 4 h 后,置于高压氧舱内氧疗,持续 75 min/次,治疗 4 次/d。督脉电针组分别于造模清醒 4 h 后给予干预,频率 2 Hz;干预时长为 20 min,频率为 1 次/d。高压氧联合督脉电针组使用上述两种方法相结合,对大鼠进行干预。正常对照组和模型组不予治疗。造模后的第 1、3、7 天分别对各组进行 Basso Beattie Bresnahan (BBB) 运动功能评估,记录各组大鼠行为学改变。造模后第 7 天处死各组大鼠,取大鼠脊髓组织,应用 TUNEL 法检测凋亡细胞并计算凋亡指数;免疫荧光检测 Ras 同源基因家族成员 A (RhoA)、Rho 相关卷曲螺旋蛋白激酶 (ROCK) 通路变化;同时采用经典的 RT-PCR 和 Western 印迹测定大鼠脊髓损伤区轴突生长抑制因子 A (Nogo-A)、Nogo-66 受体 (NgR) mRNA 和蛋白的含量。结果:造模后第 1、3 和 7 天,督脉电针组、高压氧组和高压氧联合督脉电针组 BBB 评分均高于模型组 (均 $P < 0.05$),且高压氧联合督脉电针组评分高于督脉电针组与高压氧组 ($P < 0.05$)。TUNEL 染色下模型组脊髓灰质区神经元染色明显阳性,提示细胞凋亡较多,高压氧联合督脉电针组损伤部位细胞凋亡显著减少 ($P < 0.05$);督脉电针组、高压氧组和联合治疗组 RhoA、ROCK 蛋白含量、Nogo-A mRNA 和蛋白表达量、NgR mRNA 和蛋白表达量均低于模型组 ($F = 34.597$ 、 39.230 、 14.783 、 12.370 、 21.435 、 50.435 , 均 $P < 0.05$),且联合组的 Nogo-A mRNA 和蛋白表达量、NgR mRNA 和蛋白表达量均低于督脉电针组和高压氧组 ($F = 13.58$ 、 11.253 、 24.843 、 41.221 , 均 $P < 0.05$)。结论:督脉电针和高压氧对脊髓损伤大鼠脊髓神经元具有保护作用,其机制可能与 RhoA/ROCK 通路有关。

关键词 高压氧;督脉电针;脊髓损伤;RhoA/ROCK 信号通路

中图分类号 R651.2

文献标志码 A

文章编号 1006-8147(2024)04-0343-07

The mechanism of Du meridian electroacupuncture and hyperbaric oxygen on spinal cord neurons in rats with spinal cord injury

FENG Yihui¹, NIE Tongkun², WANG Dong²

(1. Graduate School of Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; 2. The Neurosurgery Department of the Fourth Center Hospital of Tianjin, Tianjin 300140, China)

Abstract Objective: To explore the mechanism of Du meridian electroacupuncture (EA) and hyperbaric oxygen (HBO) treatment on spinal cord neurons in rats with spinal cord injury (SCI). **Methods:** A total of 60 Wistar rats were divided into five groups by random number table method: normal control group, model group, Du meridian EA group, HBO group, HBO combined with Du meridian EA group, with 12 animals in each group. The normal control group only underwent laminectomy without spinal cord injury and the SCI rat model was established by transecting the thoracic spinal cord on the dorsal side. At four hours after wakefulness, the rats of HBO group were placed in the hyperbaric oxygen chamber for 75 minutes and 4 times a day. The electroacupuncture intervention was given the rats of the Du meridian EA group for 20 minutes at four hours after wakefulness, with the frequency of 2 Hz and once a day. The HBO combined with Du meridian EA group received the combination treatment of the above two groups to intervene in rats, while the normal control group and model group did not receive any therapy. Basso Beattie Bresnahan (BBB) scores of spinal cord injury were used to assess motor function in each group at the 1st, 3rd and 7th day after injury, and the behavioral changes in each group of rats were recorded. On the 7th day after injury, all the rats were sacrificed and their spinal cord tissue was harvested. The number of apoptotic cells were assessed with TUNEL staining and the apoptotic index was calculated. The changes of Ras homolog gene family member A (RhoA)/Rho associated coiled-coil forming protein kinase (ROCK) pathway were detected by immunofluorescence. RT-PCR and Western blotting were used to detect the expression of the mRNA and protein of Neurite outgrowth inhibitor-A (Nogo-A) and Nogo-66 receptor (NgR) in the injured spinal cord area. **Results:** On the 1st, 3rd and 7th day after injury, the BBB scores of the Du meridian EA group,

基金项目 天津市卫生局中医中西医结合科研课题 (2021141)

作者简介 封怡辉 (1998-), 男, 硕士在读, 研究方向: 神经外科; 通信作者: 王东, E-mail: pic_wd@126.com。

HBO group and combined treatment group were all higher than those of the model group (all $P < 0.05$), and the scores of the combined treatment group were higher than those of the Du meridian EA group and HBO group ($P < 0.05$). TUNEL staining showed a significant increase of apoptotic neurons in the gray matter area of the spinal cord in the model group while in the HBO combined with Du meridian EA group, the apoptosis at the injury site was significantly reduced ($P < 0.05$). The protein contents of the RhoA and ROCK, the levels of the mRNA and protein expression of Nogo-A and NgR in the Du meridian EA group, HBO group and combined treatment group were all lower than those in model group ($F = 34.597, 39.230, 14.783, 12.370, 21.435, 50.435$, all $P < 0.05$). Furthermore, the levels of the mRNA and protein expression of Nogo-A and NgR in the combined treatment group were lower than those in the Du meridian group and HBO group ($F = 13.58, 11.253, 24.843, 41.221$, all $P < 0.05$). **Conclusion:** The treatment of the Du meridian EA and HBO have protective effects on spinal cord neurons in rats with SCI, and the mechanism may be related to the RhoA/ROCK pathway.

Key words hyperbaric oxygen; Du meridian electroacupuncture; spinal cord injury; RhoA/ROCK pathway

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)是脊柱损伤中最严重的并发症,如不及时治疗,易引起损伤节段以下的肢体功能障碍,给患者带来巨大身心压力、降低其生活质量,SCI还可导致社会经济损失,有效防治SCI成为学术界亟需解决的问题。研究发现,高压氧可以明显抑制与NgR介导信号通路相关mRNA的表达,从而改善受损脊髓周围环境,促进脊髓的生长与修复^[1-2]。电针作为传统的中医康复疗法,技术已经趋于成熟和完善。孙忠人等^[3]概述了电针在SCI中促神经修复的机制可能为通过负调控轴突生长抑制因子Nogo-A、NgR及OMgp的表达,从而减少胶质瘢痕形成、促进轴突髓鞘化及神经干细胞的分化与再生。虽然电针治疗SCI的研究颇有进展,但其治疗机制仍待讨论,目前未能充分指导实践。就大鼠SCI模型而言,改良的Allen's打击法虽然可保持硬脊膜完整性,防止外源性物质进入SCI区域、脊髓暴露及脑脊液外漏,但其所致的脊髓挫伤模型与半横断损伤模型有着共同缺点,即无法较好地确定SCI区域的新生轴突是由损伤的神经再生而来,还是由部分剩余的正常神经组织代偿而成。与之相对,脊髓全横断模型可准确证明轴突再生及确定最有效的治疗策略^[4]。本研究通过督脉电针对大鼠脊髓全横断损伤模型进行干预,通过检测大鼠运动功能及Nogo-A、NgR mRNA和蛋白的表达,探讨督脉电针对SCI后脊髓神经元的保护作用及其可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 选择Wistar大鼠,雌雄各半,体重200~250 g,共60只,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,合格证号[SCXK(京)2021-0011],批号230504605757。大鼠饲养环境温度控制在20~25℃,予标准配方杆状饲料喂养,自由进食水,动物实验伦理批准编号[YSY-DWLL-2021240]。

1.1.2 试剂与仪器 TUNEL试剂盒(MK1025,美国

Bosterbio公司);DAB试剂盒(ZLI-9563,北京中杉金桥生物技术有限公司);无水乙醇(B0301002,北京化工厂);二甲苯(100212,北京化工厂);石蜡(100211,上海天贺生物);苏木素(G1004,武汉servicebio公司);伊红染液(G1005,武汉servicebio公司);中性树胶(ZLI-9555,北京中杉金桥生物技术有限公司);RhoA、ROCK、NogoA、NgR抗体(15596-018,美国Thermo公司);逆转录试剂盒(A5001,美国Promega公司)。显微镜成像系统(日本尼康);超薄石蜡切片机(德国Leica);包埋机(武汉俊杰电子有限公司);PCR仪(美国Biorad公司);生物信号采集处理器(南京美易科技有限公司);华佗牌电针治疗仪、华佗牌针灸针(针灸针直径0.25 mm、长3 mm,苏州医疗用品有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 SCI模型的建立 戊巴比妥腹腔麻醉(40 mg/kg)大鼠,固定其于实验台,以第9胸椎为中心,常规备皮、消毒、铺巾,在后正中部位切开皮肤、皮下,切口长3 cm左右,确定第9胸椎棘突并切除其椎弓根,暴露第9胸髓背侧后将脊髓横断切除2 mm,生理盐水冲洗后逐层缝合,局部碘伏消毒。大鼠出现双后肢迟缓性瘫痪,表明脊髓全横断损伤模型成功。SCI术后按摩大鼠膀胱以助其排尿,3次/d;青霉素(0.2 mL/kg)腹腔注射预防感染。

1.2.2 分组与干预方法 按随机数字表法将大鼠分为正常对照组、模型组、督脉电针组、高压氧组、高压氧联合督脉电针组,每组12只。正常对照组:只行椎板切除,不造成脊髓损伤,不予任何治疗;模型组:建立SCI模型,未接受督脉电针与高压氧治疗;高压氧组:大鼠造模清醒4 h后置于高压氧舱内,纯氧洗舱15 min,再以0.01 Mpa/min匀速加压直至达到0.2 Mpa为止,稳压30 min,然后间断加纯氧将氧浓度控制在96.5%左右,减压至常压,出舱后放回笼中继续喂养。干预频率为4次/d;督脉电针组:大鼠造模清醒4 h后给予督脉电针干预,选取督

脉上的“大椎”、“命门”,频率 2 Hz,强度 1 mA,干预时间 20 min,1 次/d,治疗至术后第 7 天;高压氧联合督脉电针组:予以高压氧联合督脉电针治疗,方法如上所述。

1.2.3 检测指标和方法

1.2.3.1 标本采集 SCI 模型建立后第 7 天,治疗结束后行 Basso Beattie Bresnahan (BBB) 评分,再处死各组大鼠。充分显露大鼠心脏,予升主动脉插管处理后剪开右心耳,先以生理盐水冲洗,再灌注固定,固定液为 4% 的多聚甲醛,在确保脊髓完整无损的前提下,提取损伤区脊髓组织。(1) HE 染色所需切片组织的获得:取脊髓组织长度约 1 cm。(2) 透射电镜所需组织的获得:以 SCI 区为中心,分别于近心端及向心端连续取两段脊髓,长宽分别约为 1 cm、1 mm。(3) 免疫荧光所需组织的获得:剥离损伤区域约 1 cm 的脊髓组织,并将其以甲醇-20℃于玻片上固定。(4) RT-PCR 及 Western 印迹所需组织的获得:快速取得损伤段脊髓组织 1 cm 左右,在 0~4℃高渗透蔗糖溶液中冰冻 3 min 并通以 100% O₂,将脊髓组织切成 400 μm 切片,用低钙羟乙基磺酸钠溶液 (HSSB) 漂洗 3 次,将切片置于 33℃通有 95% O₂ 和 5% CO₂ 混合气体的 Earle's 平衡盐溶液中孵育 1.5 h,而后移至低钙 HSSB 并放入盛有 Hanks 平衡盐溶液的容器中,继续以 100% O₂ 处理。在温度为 33℃的酶溶液中酶解 30 min,样本继续于低钙 HSSB 溶液中反复漂洗。吹打,以充分分散样本,即可得分散的神经元。

1.2.3.2 行为学检测 分别于 SCI 造模术前、术后即刻、术后第 1、3 和 7 天应用 BBB 评分综合评定各组大鼠的运动功能,观察内容如下:早期后肢关节运动情况、中期失调步态、晚期拖着脚趾和躯干失稳等。将实验动物后肢运动分为 22 个等级,后肢完全瘫痪为 0 分,活动正常为 21 分,分数越高对应状况越好。观察人员为熟悉评分标准的非实验人员。

1.2.3.3 TUNEL 法检测神经细胞凋亡 采用经典的 TUNEL 法对大鼠凋亡细胞进行检测, DAB 显色,样本置于显微镜下,细胞核呈现为棕褐色说明已凋亡。选 5 个视野,在镜下数凋亡细胞,在此基础上,进一步确定出阳性率即凋亡指数 (AI),为下一环节的分析提供数据支持。

1.2.3.4 HE 染色 将所取脊髓组织用梯度酒精脱水,石蜡切片厚度为 3 μm。将切片予苏木素染色处理,8 min 后用自来水冲洗,继而予盐酸酒精分化处理 10 s,并再次予自来水冲洗及伊红染色,时间分别为 3 min 及 30 s。最后冲洗、脱水、透明、封片。冲洗

液为自来水,脱水方式为梯度酒精脱水,透明剂为二甲苯,黏合剂为中性树胶。显微镜观察所获损伤区脊髓组织病理变化,放大倍率为物镜下 20 倍。

1.2.3.5 透射电镜观察 将所获脊髓组织予 2.5% 戊二醛固定过夜,次日在 4℃条件下予锇酸固定 2 h 处理并漂洗后,丙酮梯度脱水,之后以醋酸铀染色 4 h,环氧树脂包埋。透射电镜观察并分析神经组织恢复情况。

1.2.3.6 免疫荧光检测 RhoA/ROCK 通路变化 将固定的脊髓组织以免抗大鼠 RhoA、ROCK 抗体 (1:800) 在低温环境下培养 16 h,之后采用准备好的磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 洗涤 30 min,再以山羊抗兔 IgG 抗体 (1:700) 于室温环境下培养 1 h,再次清洗,荧光显微镜检测神经细胞的 RhoA/ROCK 表达情况。

1.2.3.7 凋亡及分化基因检测 分别收集各组 10⁷ 个细胞,缓冲液反复清洗,接着以准备好的 TRIzol 试剂提取各组细胞总 RNA,并进一步逆转录为 cDNA,最后予以 PCR 扩增。加入目标基因相关引物,用以下引物对 Nogo-A、NgR 及 GAPDH 的 cDNA 进行扩增:上游:Nogo-A (145 bp) 5'-TGACACAGAGA AAGAGGACAGAT-3'; NgR (168 bp) 5'-TGCCGACA TGGGTGTTATGG-3'; GAPDH (149 bp) 5'-ACGGCAA GTTCAACGGCAGAG-3'。下游:Nogo-A (145 bp) 5'-CAGAGACAGCAGCAGGAATAAG-3'; NgR (168 bp) 5'-TGCCGTGCAGGAAGATTCTC-3'; GAPDH (149 bp) 5'-GAAGACGCCAGTAGACTCCACGAC-3'。RT-PCR 反应条件:95℃条件下进行 5 min 预变性,95℃条件下 30 s 变性,60℃温度条件下退火处理 30 s,72℃温度条件下延伸 60 s,35 个循环。扩增产物经一定的琼脂糖凝胶电泳后,继续使用高精度凝胶成像仪观察。

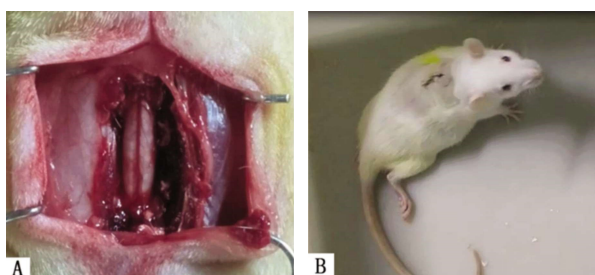
收集各组 10⁷ 个细胞, PBS 冲洗 3 次,提取总蛋白并测定蛋白浓度。60 μg 总蛋白质在 10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后,电转移至 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉 37℃封闭 2 h 后加入 1:1 000 稀释的目标蛋白多克隆一抗与膜孵育 1 h, TBST 洗膜 4 次,每次 15 min; 加入 1:5 000 HRP 标记的二抗和 GAPDH, 37℃孵育 2 h, 清洗后,采用 ECL 试剂盒进行化学发光检测。上述步骤完成后,接着进行 X 光片压片、显影、定影。采用高分辨率的 UVI 凝胶成像系统摄像。用 Image-Pro Plus 7.0 软件分析条带灰度值所得结果。

1.3 统计学处理 应用 SPSS16.0 系统软件处理,符合正态分布的数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。正态分布数据多组间比较采用单因素方差分析,各个实验组的两两比

较采用最小显著性差异法 $LSD-t$ 法,非正态分布数据采用秩和检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 实验动物模型评估 术中暴露脊髓 T₉ 节段,见图 1A。脊髓全横断后,大鼠出现双后肢迟缓性瘫痪,0 级肌力,行走完全依靠前肢负荷,如图 1B 所示,提示 SCI 造模成功,数天后,可以明显的观察到病鼠双后肢弥漫性肌萎缩,精神状态萎靡,从而导致厌食,活动量减少,甚至有部分大鼠在术后 1 周出现压疮、破溃。



注:A:脊髓暴露;B:大鼠后肢迟缓性瘫痪

图 1 SCI 模型的建立

Fig.1 Establishment of SCI model

2.2 BBB 评分 术前所有大鼠 BBB 评分为 21 分,正常对照组大鼠术后评分为 21 分,其余各组 SCI 术后大鼠评分为 0 分,损伤后第 1、3、7 天评分数据经软件处理后实施组间横向对比,具体情况见表 1。模型组评分较对照组降低,差异有统计学意义

($P<0.05$);督脉电针组、高压氧组和高压氧联合督脉电针组 BBB 评分均较模型组升高,且以高压氧联合督脉电针组的升高更明显,存在统计学意义($P<0.05$)。

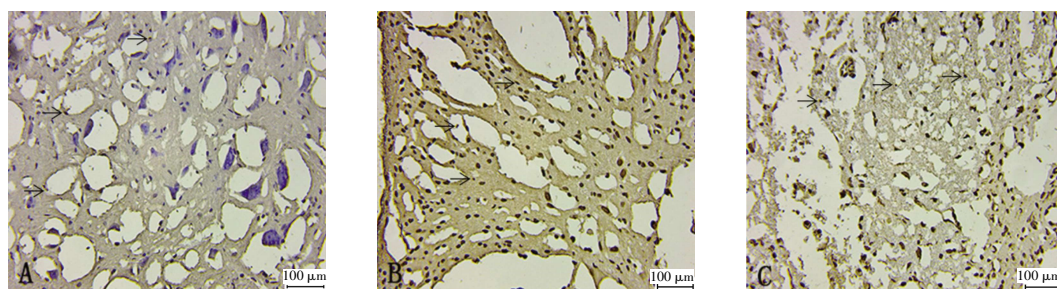
表 1 各组大鼠 BBB 评分比较($\bar{x}\pm s$)

Tab.1 Comparison of the BBB scores in each groups of rats($\bar{x}\pm s$)

组别	例数(只)	BBB 评分(分)		
		术后第 1 天	术后第 3 天	术后第 7 天
正常对照组	12	21±0	21±0	21±0
模型组	12	2.4±0.5*	4.3±0.6*	4.4±0.8*
督脉电针组	12	2.8±0.7**	5.8±0.9**	9.5±0.9**
高压氧组	12	2.7±0.4**	5.3±0.7**	8.5±0.6**
高压氧联合督脉电针组	12	3.7±0.2****	7.3±0.3****	10.5±0.2****
<i>F</i>		14.782	16.021	10.764
<i>P</i>		<0.05	<0.05	<0.05

注:与正常对照组相比,* $P<0.05$;与模型组相比,** $P<0.05$;与高压氧组相比,**** $P<0.05$

2.3 神经细胞凋亡检测 对提取的损伤区脊髓组织行 TUNEL 染色,在 200×显微镜物镜下观察拍照结果如下(图 2)。对照组可观察到较少的 TUNEL 染色阳性细胞数,而模型组的脊髓灰质区神经细胞染色明显呈阳性,且伴有严重的神经细胞凋亡;相较于模型组,高压氧联合督脉电针组神经细胞染色阳性数偏低,脊髓神经元凋亡指数明显下降[(42.81±5.69)%、(18.37±1.43)%、 $F=8.329$, $P<0.05$]。



注:A:正常对照组;B:高压氧联合督脉电针组;C:模型组

图 2 脊髓灰质神经细胞凋亡(200×)

Fig.2 Apoptosis of the spinal gray matter neurons(200×)

2.4 HE 染色结果 在显微镜 20 倍物镜下观察组织形态变化。与正常对照组比较,模型组灰白质病理性出血、水肿、坏死、空泡样化、退变胶质化,神经元和神经胶质细胞显著减少,白质散乱排列,神经束间隙增加,细胞核固缩,神经细胞肿胀、破裂、溶解,大量神经元死亡,已无明显细胞结构神经轴索通过(图 3)。与模型组比较,高压氧联合督脉电针组已经有大量神经元和神经胶质细胞再生,脊髓灰质和白质界限分明,白质中可见大量轴突生长,细胞

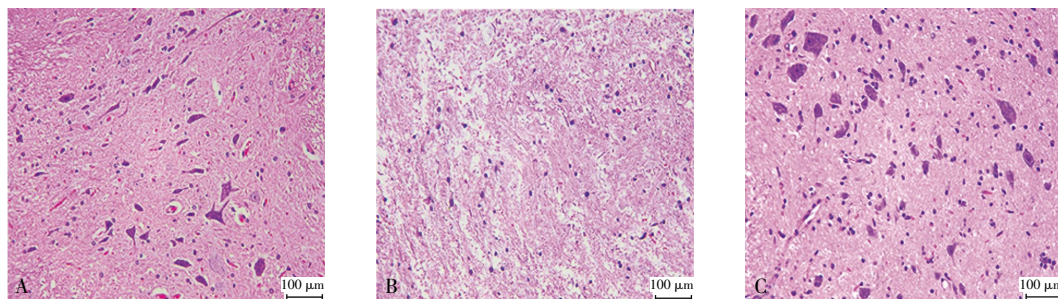
形态结构完整,细胞核清晰可见(图 3C)。

2.5 透射电镜结果 将 SCI 部位组织通过 TEM 方法观察,正常对照组神经纤维束整齐排列,并且可看到完整的神经细胞及细胞核,且线粒体形态及数目正常,溶酶体数量较少,无自噬小体。模型组神经纤维束散乱排列,电镜下可观察到形态异常的线粒体,且肿胀明显、细胞质呈空泡化、异常形态的细胞核、溶酶体及自噬小体,且数量较其他两组明显升高。高压氧联合督脉电针组电镜下可观察到肿胀的

神经细胞,线粒体形态稍微不规则,核形正常,核内染色质欠均匀。与模型组比较,游离核糖体及溶酶体的数量水平有所下降,见图4。

2.6 RhoA/ROCK 表达水平结果 各组与模型组相比较的 RhoA、ROCK 蛋白表达见图5,模型组脊髓

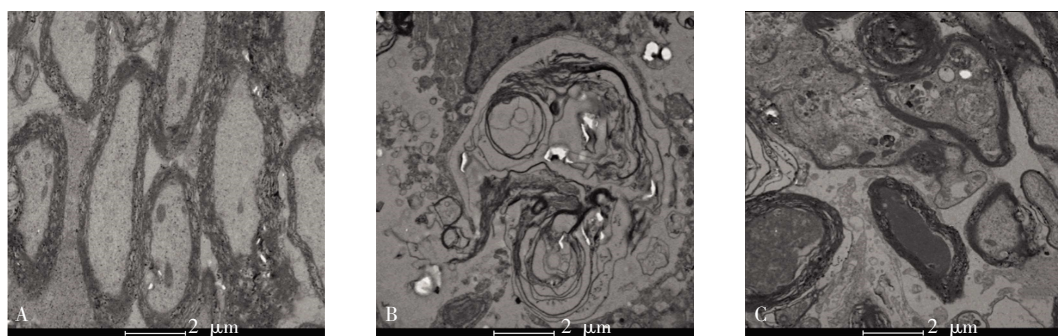
组织 RhoA、ROCK II 蛋白表达水平明显高于正常对照组(均 $P<0.05$);经干预后,督脉电针组、高压氧组和高压氧联合督脉电针组大鼠脊髓组织 RhoA、ROCK II 蛋白表达水平都明显低于模型组($F=34.597, 39.230$, 均 $P<0.05$)。



注:A:正常对照组;B:模型组;C:高压氧联合督脉电针组

图3 脊髓组织 HE 染色(20×)

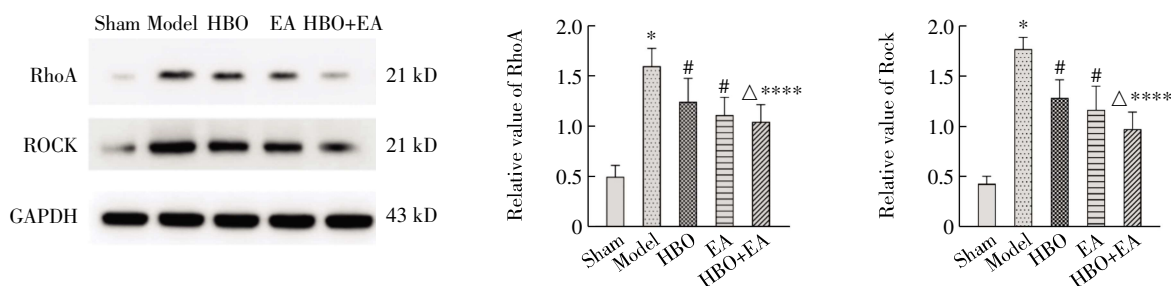
Fig.3 Spinal cord tissue under the HE staining(20×)



注:A:正常对照组;B:模型组;C:高压氧联合督脉电针组

图4 脊髓组织透射电镜

Fig.4 Spinal cord tissue under the TEM



注:Sham:正常对照组;Model:模型组;HBO:高压氧组;EA:督脉电针组;HBO+EA:高压氧联合督脉电针组;与正常对照组相比,* $P<0.05$;与模型组相比,* $P<0.05$;与督脉电针组相比,[△] $P<0.05$;与高压氧组相比,**** $P<0.05$

图5 RhoA、ROCK 蛋白的表达

Fig.5 Protein expression of RhoA and ROCK

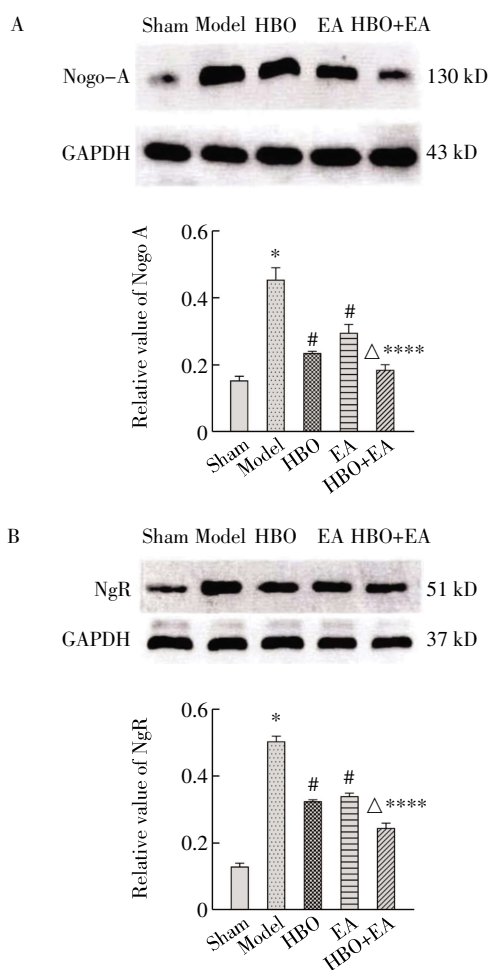
2.7 Nogo-A、NgR mRNA 及蛋白表达结果 经单因素方差分析和 $LSD-t$ 检验后得出各组间比较的基因及蛋白表达浓度均值(表3、图6),模型组大鼠脊髓组织 Nogo-A、NgR 的 mRNA 和蛋白表达水平均明显高于正常对照组(均 $P<0.05$);治疗后,督脉电

针组、高压氧组和高压氧联合督脉电针组大鼠脊髓组织 Nogo-A、NgR 的 mRNA 和蛋白表达水平均较模型组明显降低,以高压氧联合督脉电针组的降低更加显著,差异具有统计学意义($F=14.783, 21.435, 12.370, 50.435$, 均 $P<0.05$)。

表 3 各组大鼠 Nogo-A、NgR mRNA 及蛋白表达水平比较($\bar{x}\pm s$)Tab.3 Expression of Nogo-A and NgR mRNA and protein in each group of rats($\bar{x}\pm s$)

组别	例数(只)	Nogo-A		NgR	
		mRNA(Nogo-A/GAPDH)	蛋白(Nogo-A/GAPDH)	mRNA(Nogo-A/GAPDH)	蛋白(Nogo-A/GAPDH)
正常对照组	12	15.9±3.5	0.14±0.025	6.6±1.1	0.12±0.02
模型组	12	48.2±8.5*	0.42±0.07*	29.8±6.1*	0.49±0.03*
督脉电针组	12	30.2±2.5**	0.27±0.05**	19.1±3.0**	0.33±0.02**
高压氧组	12	31.2±1.5**	0.23±0.01**	18.1±2.0**	0.32±0.01**
高压氧+督脉电针组	12	25.1±0.5****	0.17±0.03****	16.1±2.0****	0.23±0.03****
<i>F</i>		14.783	12.370	21.435	50.435
<i>P</i>		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

注:与正常对照组相比,* $P<0.05$;与模型组相比,** $P<0.05$;与高压氧组相比,**** $P<0.05$



注:Sham:正常对照组;Model:模型组;HBO:高压氧组;EA:督脉电针组;HBO+EA:高压氧联合督脉电针组;A:Nogo-A的Western印迹实验;B:NgR的Western印迹实验;与正常对照组相比,* $P<0.05$;与模型组相比,# $P<0.05$;与督脉电针组相比,Δ $P<0.05$;与高压氧组相比,**** $P<0.05$

图 6 Nogo-A 及 NgR 的蛋白表达

Fig.6 Protein expression of Nogo-A and NgR

3 讨论

电针治疗可促进 SCI 的修复,在临床运用中取得不错的治疗效果,但其分子生物学机制比较复

杂,并不十分明确。其可能的机制为促进神经修复、抑制炎症以及改善微环境等^[5-7]。细胞凋亡是生物体的自然规律,在维持神经内环境稳定中起着重要作用,是 SCI 的主要诱发因素^[8-9]。当中枢神经系统损伤时,神经细胞凋亡在神经功能丧失这一过程中可能起到了主导作用^[10-11]。本研究显示,SCI 组术后凋亡细胞数明显升高,由此推测 SCI 过程中存在细胞凋亡。病鼠给予督脉电针干预后,其神经元细胞凋亡得到明显抑制,动物身体恢复更快,这与以往研究结论一致^[12]。但对督脉电针激活人类自噬的机制尚未完全阐明,还需进行更深入的探讨。

SCI 后,在中枢神经系统髓鞘中有 3 种主要影响神经轴突再生和修复的髓鞘相关抑制因子,分别是 Nogo 蛋白、髓鞘相关糖蛋白(MAG)和少突胶质细胞髓鞘糖蛋白(OMgp)^[13-14]。拮抗或阻断这些抑制因子的信号通路,可促进中枢神经损伤后的轴突再生。相关抑制因子中以 Nogo 蛋白作用最为突出,Nogo-A 是神经生长抑制因子中最为常见的一种异构体。现代医学研究表明,其受体 NgR 位于神经元表面,能够与配体 Nogo-66 结合,从而将信息传输至神经元胞体内,并在下游信号通路的参与下,起到阻止轴突生长的效用^[15-16]。一系列研究结果表明,给予电针治疗可以较大程度抑制病鼠脊髓组织中 Nogo-A mRNA 的水平^[10]。近年来的一些研究发现,该方法是通过阻止 Nogo-A 和 NgR 的表达来发挥 SCI 治疗作用^[7]。当前比较公认的是对于 SCI 治疗应争取“三早”原则,即早期用药和手术,及早控制病情^[17]。但如何界定“早期”的概念,如何达到早期的治疗,并无确切的判定标准^[18]。实验研究方面,动态观察 SCI 大鼠 BBB 评分和电针对 Nogo-A、NgR 时相表达的影响,即时间窗效应,可能是解决如何判定“早期”的途径之一。李启超等^[19]构建了脊髓全横断模型,同时设置对照组;之后对病鼠组织进行检

测,显示 Nogo-A 蛋白表达呈递增趋势,两周后达到峰值;对病鼠进行电针治疗后 Nogo-A 水平显著降低。研究发现,模型组 Nogo-A、NgR mRNA 等指标水平均有不同程度的升高;经电针治疗后各指标水平均较不予干预的对照组更低。由此推测,电针于 SCI 恢复期介入疗效可能更佳。这一研究结果与高连军等^[20]研究有相同之处。根据以往的临床经验来看,SCI 患者早期往往存在多脏器的功能障碍,及早干预有助于缓解病情,但有学者指出术后病情稳定时的疗效可能更理想。尽管高连军等^[20]的研究结论是 SCI 后电针刺激介入的时间越早,治疗效果越好,但从研究报道的具体内容来推断,这一结论有待商榷。根据实际情况,临床上 SCI 患者通常在手术拆线后接受针灸干预。本文通过构建动物模型,对其进行一系列 BBB 评分并予以电针治疗,之后检测病鼠 Nogo-A、NgR 表达水平,发现该疗法在 SCI 早期介入能够控制病情,但是恢复期介入可能疗效更显著。

参考文献:

- [1] 梅运运,张建军,王东. 高压氧联合 NgR 基因沉默骨髓间充质干细胞移植治疗大鼠脊髓损伤[J]. 中国组织工程研究, 2022, 26(1): 12-19.
- [2] 谢晓娟,彭慧平,焦泽琦,等. 高压氧联合电针治疗对脊髓损伤大鼠 Nogo-A 及 NgR 受体的影响[J]. 中华航海医学与高气压医学杂志, 2020, 27(3): 265-269.
- [3] 孙忠人,田洪昭,徐思禹,等. 电针治疗脊髓损伤机制研究概述[J]. 针灸临床杂志, 2019, 35(4): 84-88.
- [4] 谢亮,沈忆新,范志海. 大鼠脊髓全横断损伤模型的建立及相关问题[J]. 脊柱外科杂志, 2010, 8(6): 377-380.
- [5] 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]. 吉林中医药, 2021, 41(10): 1380-1382.
- [6] 孙忠人,栾逸先,尹洪娜,等. 夹脊电针通过调控细胞死亡治疗脊髓损伤的相关机制研究进展[J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(4): 2213-2215.
- [7] 付瑞莲,江娇. 基于电针治疗脊髓损伤康复疗效的研究进展[J]. 实用中医内科杂志, 2022, 36(3): 103-106.
- [8] 王延雷,齐英娜,董春科,等. 脊髓减压联合督脉电针对急性脊髓压迫损伤大鼠疗效影响的实验研究[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2018, 26(2): 3-7.
- [9] 王迪,王德军,魏庆双,等. 电针治疗脊髓损伤抗凋亡机制的研究进展[J]. 针灸临床杂志, 2019, 35(3): 74-76.
- [10] ZHAO H, JAFFER T, EGUCHI S, et al. Role of necroptosis in the pathogenesis of solid organ injury[J]. Cell Death Dis, 2015, 6(11): e1975.
- [11] 齐英娜,谭明生,王延雷,等. 补阳还五汤对急性脊髓损伤大鼠内质网应激相关因子影响的研究[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2018, 26(2): 8-12.
- [12] CHEN H C, FONG T H, HSU P W, et al. Multifaceted effects of rapamycin on functional recovery after spinal cord injury in rats through autophagy promotion, anti-inflammation, and neuroprotection[J]. J Surg Res, 2013, 179(1): 203-210.
- [13] RAIKER S J, LEE H, BALDWIN K T, et al. Oligodendrocyte-myelin glycoprotein and Nogo negatively regulate activity-dependent synaptic plasticity[J]. J Neurosci, 2010, 30(37): 12432-12435.
- [14] 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): 445-449, 455.
- [15] MCGEE A W, STRITTMATTER S M. The Nogo 66 receptor: focusing myelin inhibition of axon regeneration[J]. Trends Neurosci, 2003, 26(4): 193-198.
- [16] SCHOLZE A R, BARRES B A. A Nogo signal coordinates the perfect match between myelin and axons[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012, 109(4): 1003.
- [17] 闵友江,孙洁,贾永忠,等. 脊髓损伤大鼠 NogoA、NgR mRNA 和蛋白的时相表达及电针治疗时间窗[J]. 中国康复理论与实践, 2018, 24(6): 621-628.
- [18] 张鸥. 创伤性脊髓损伤康复治疗最佳介入时间窗观察[J]. 按摩与康复医学, 2021, 12(18): 24-26, 29.
- [19] 李启超,刘义富,窦静敏,等. 督脉电针结合超短波疗法对大鼠脊髓全横断损伤后脑源性神经生长因子和神经轴突生长抑制剂-A 表达的影响[J]. 中国康复医学杂志, 2017, 32(9): 977-983.
- [20] 高连军,孙迎春,李建军,等. 不同时间电针刺激对大鼠脊髓损伤后磁共振弥散张量纤维束成像部分各向异性值均值的影响[J]. 中国康复理论与实践, 2014, 20(8): 728-735.

(2023-10-17 收稿)