

· 基础研究 ·

电针对大鼠急性脊髓损伤后神经细胞凋亡及相关功能的影响

李长明¹, 谢尚举¹, 王拓¹, 杜伟斌¹, 杨宗保³, 全仁夫²

(1. 浙江中医药大学, 浙江 杭州 310053; 2. 浙江省萧山中医院, 浙江 杭州 310009; 3. 厦门大学医学院, 福建 厦门 361102)

【摘要】 目的: 探讨电针对大鼠急性脊髓损伤后膀胱功能改善的影响及作用机制。方法: 取健康成年雄性 SPF 级 SD 大鼠 60 只, 体重 220~250 g, 适应性饲养 1 周后, 将大鼠按照随机数字表法随机分为假手术组、模型组、电针组和电针对照组, 各 15 只。假手术组不予任何刺激, 模型组、电针组和电针对照组大鼠采用改良 Allens 法制作脊髓损伤中度损伤 SD 大鼠模型, 模型组不予治疗, 电针组给予秩边与水道穴电针治疗, 电针对照组给予秩边与水道穴旁开 0.5 寸电针治疗, 频率 2/100 Hz, 电流 1 mA, 刺激 15 min, 电针左右隔次交替, 每日 1 次, 共 7 次; 分别于术后 1、7 d 观察大鼠残余尿量、排尿量的变化; 术后 7 d 处死大鼠取伤段脊髓观察各组大鼠凋亡情况, 检测 Bcl-2、Bax、Bad 含量的变化。结果: 造模后 3 组大鼠均出现不同程度的膀胱功能障碍。术后 7 d, 电针组、电针对照组残余尿量较术后 1 d 明显降低 ($P < 0.001$), 且电针组与电针对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 电针组、电针对照组较模型组在术后 7 d 排尿量增加, 且电针组与电针对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.001$); TUNEL 发现电针可以抑制脊髓神经细胞的凋亡, 电针组、电针对照组与模型组相比在术后 7 d 脊髓神经细胞凋亡率显著增加 ($P < 0.01, P < 0.05$), 且电针组与电针对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 电针组、电针对照组 Bax、Bad 的阳性表达率降低 ($P < 0.01, P < 0.05$), 而 Bcl-2 的阳性表达率升高 ($P < 0.01$); 且电针组与电针对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论: 电针能明显促进急性脊髓损伤的修复, 其机制可能为通过增加 Bcl-2、抑制 Bax、Bad 的表达, 从而抑制脊髓神经元细胞的凋亡发生作用的。

【关键词】 电针; 脊髓损伤; 细胞凋亡; 动物实验

DOI: 10.3969/j.issn.1003-0034.2015.08.013

Effects of electro-acupuncture on neuronal apoptosis and associative function in rats with spinal cord injury LI Chang-ming, XIE Shang-ju, WANG Tuo, DU Wei-bin, YANG Zhong-bao, and QUAN Ren-fu*. *Traditional Chinese Medical Hospital of Xiaoshan, Hangzhou 310009, Zhejiang, China

ABSTRACT **Objective:** To explore the effect of electro-acupuncture to improve the bladder function after acute spinal cord injury in rats and its possible mechanism. **Methods:** Sixty healthy adult male SD rats of SPF grade, with body weight of 220 to 250 g, one week after feeding adaptation, were randomly divided into sham operation group, model group, electro-acupuncture group, electro-acupuncture control group with 15 rats in each group. Sham operation group underwent no stimulation, and the moderate damage model of spinal cord injury were made in other three groups according to modified Allens method. The model group were not treated, electro-acupuncture group were treated with electro-acupuncture on *Zhibianxue* and *Shuidaoxue*, and electro-acupuncture control group were treated with electro-acupuncture on 0.5 inch next to *Zhibianxue* and *Shuidaoxue*. The frequency of 2/100 Hz, current of 1 mA, stimulation time of 15 min, once a day, left and right alternately stimulate every time, for a total of 7 times. The changes of residual urine volume and urine output in rats at the 1st and the 7th days after operation were observed. And 7 d later, the rats were sacrificed and the injured spinal cord were taken out to observe the apoptosis, and to detect the changes of Bcl-2, Bax, Bad content. **Results:** After modeling, the rats of three groups showed different bladder dysfunction. In electro-acupuncture group and electro-acupuncture control group, the residual urine volume of the 7th day after operation was significant lower than the 1st day after operation ($P < 0.001$), and there was statistically significant difference on the 7th day after operation between two groups ($P < 0.001$). Compared with model group, the urine output of electro-acupuncture group and electro-acupuncture control group was significantly increased on the 7th day after operation, and there was sig-

基金项目: 浙江省中医药科研计划项目 (编号: 2008CB067)

Fund program: Zhejiang Province's Traditional Chinese Medicine Research Project (No.2008CB067)

通讯作者: 全仁夫 E-mail: quanrenf@263.net

Corresponding author: QUAN Ren-fu E-mail: quanrenf@263.net

nificant difference between electro-acupuncture group and electro-acupuncture control group ($P<0.001$). Electro-acupuncture can inhibit apoptosis of spinal cord neurons by TUNEL detection. Postoperative at 7 d, the rate of nerve cell apoptosis in electro-acupuncture group and electro-acupuncture control group was significant increased than model group ($P<0.01, P<0.05$), and there was significant difference between electro-acupuncture group and electro-acupuncture control group ($P<0.005$). Compared with model group, the positive expression rate of Bax, Bad decreased ($P<0.01, P<0.05$), and Bcl-2 increased ($P<0.01$) in electro-acupuncture group and electro-acupuncture control group, there was significant difference between electro-acupuncture group and electro-acupuncture control group ($P<0.01$). **Conclusion:** Electro-acupuncture can obviously promote the repair of acute spinal cord injury, its mechanism may be through increasing Bcl-2, inhibiting the expression of Bax, Bad, which inhibits the apoptosis of spinal cord neurons.

KEYWORDS Electric acupuncture; Spinal cord injury; Apoptosis; Animal experimentation

Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2015, 28(8):733-738 www.zggszz.com

急性脊髓损伤发生机制复杂,且没有一种确切的疗法,成为当今医学界研究热点。近年来,中医药用于神经退行性疾病的研究越来越多,具有显著的临床效果^[1-3]。本实验以电针秩边与水道穴,观察干预后大鼠膀胱功能变化,脊髓神经元细胞凋亡, Bcl-2、Bax、Bad 含量的变化,探讨其可能的作用机制。

1 材料与方 法

1.1 实验动物与分组

健康成年雄性 SD 大鼠 60 只,购自厦门大学动物实验中心,许可证编号:SYXK(闽)2013-0006。体重 220~250 g,适应性饲养 1 周后,将大鼠按照随机数字表法分为假手术组、模型组、电针组、电针对照组,每组 15 只。术后 7 d 处死大鼠,并取伤段脊髓上下各 0.5 cm 用于检测。

1.2 主要试剂与仪器

Bcl-2 (BIOWORLD, 美国), Bax (BIOWORLD, 美国), Bad (BIOWORLD, 美国), TUNEL 试剂盒(北京中山试剂公司),一次性华佗牌针灸针(苏州医疗用品厂),电针仪(苏州医疗用品厂),4%多聚甲醛 PBS(磷酸盐缓冲液)固定液。

1.3 造模方法

采用改良 Allens 法制作脊髓损伤中度损伤 SD 大鼠模型。实验前禁食 8 h,实验顺序随机进行,动物采用 10%水合氯醛(0.3 ml/100 mg)进行腹腔注射麻醉。取胸背部正中切口,长约 2.5 cm,逐层切开皮肤及皮下组织,暴露上下各一个锥体长度,咬除 T₉-T₁₀ 棘突及全部椎板,暴露 0.5 cm 宽硬膜。用质量为 10 g 的克氏针沿带有刻度的导管从 60 mm 高处垂直自由下落,打击在直径 4 mm、宽 2 mm 的由薄塑料材料制成的半圆片上,致伤后迅速移开打击物,造成大鼠脊髓后角中度损伤,逐层缝合。整个实验过程在(37±0.5)℃的温度下进行,术后 4~0 丝线逐层缝合。术后每天青霉素 8 万 U 腹腔注射预防感染,分笼饲养,保持室温在 20°~25°,给予充足的食物和水。每天 2 次膀胱 Crede 手法按摩协助排尿,直至建立反射性

膀胱排空。模型成功的判定标准:打击后,损伤处脊髓出血水肿,大鼠出现摆尾反射,双下肢及躯体回缩样扑动,麻醉清醒后双下肢呈弛缓性瘫痪。

1.4 干预措施

假手术组只手术不造模,其他 3 组造模;模型组与假手术组不予治疗。电针组和电针对照组待造模成功麻醉苏醒后再进行电针治疗。电针组选取秩边与水道穴治疗,电针对照组采用秩边与水道各旁开 0.5 寸进行治疗。穴位根据世界卫生组织制定的国际标准穴位进行选择:秩边(BL54),臀外下部,股骨大转子与荐椎尾椎结合部连线外 1/3 与中 1/3 交点处;水道(ST28),腹部,耻骨联合与胸剑联合中点连线(13 等分)耻骨联合上 3 等分旁开约 2 cm 处。针刺部位备皮消毒,不锈钢针灸针(0.25 mm 直径)针刺穴 4~5 mm 的深度,捻转 1 min 并留针 15 min,并使同侧秩边、水道组成一回路连接于 JL2B 型电脉冲刺激仪上,治疗仪参数:频率 2/100 Hz,电流 1 mA,刺激 15 min^[4],电针左右隔次交替,每日 1 次。

1.5 检测项目与方法

1.5.1 膀胱残余尿量的测定 分别于术后 1、7 d 进行手法挤压膀胱排尿尿量测定:将大鼠抓起使之直立位后,通常大鼠可出现自主排尿。在其自立并排尿后,两手食指从上向下挤压腹部到大鼠骨盆处,重复动作 3 次,在此过程中下方放置吸水纸,放置前先行称重,当手法挤压结束后,再次称重,吸水纸增加的质量(g)就可以估算为大鼠的排尿量(ml)。因为尿液的密度值与水接近 $\rho \approx 1$ 。

1.5.2 大鼠排尿量的检测 分别于术后 1、7 d 将大鼠仰卧位固定于自制的鼠板上,碘伏消毒大鼠尿道外口及肛门。两根导管置入前均用无菌生理盐水充盈并排出导管中的气体,先将 1 根灭菌处理的 F3 输尿管用石蜡油润滑后从大鼠尿道外口缓缓置入尿道和膀胱,深度 4.0~5.0 cm,其后将另 1 根 F3 导管石蜡油润滑后沿着前 1 根导管后方缓慢插入,深度同前。用 Crede 手法辅助排尿把大鼠膀胱中的残余

尿量从导管中完全排出后,用 1 ml 的注射器抽取无菌生理盐水缓缓推入膀胱灌注管,密切观察另 1 根平放于鼠板的溢出管,直到有液体溢出时停止灌注,记录推入的生理盐水容量总和即为膀胱的最大功能容量。排尿量=膀胱最大容量-残余尿量。

1.5.3 脊髓组织取材 造模 7 d 后,10%的水合氯醛(0.3 ml/100 g)腹腔注射麻醉后开胸,自左心室插管至主动脉,然后剪开右心耳,先灌注生理盐水 150 ml,再用 4%的多聚甲醛 250 ml 灌注,固定。2 h 后取出以伤段为中心上下各 0.5 cm 节段脊髓组织,放入相同的固定液继续固定,24 h 后常规石蜡包埋。连续切片,片厚约 6 μm,分别做 HE 染色,TUNEL 法及免疫组化检测。

1.5.4 TUNEL 检测凋亡细胞 每只大鼠取 3 张切片,切片二甲苯脱蜡和再水化,将切片用 Proteinase K 工作液处理 20 min,再用 PBS 洗涤 3 次,加 50 μl TUNEL 反应混合液于标本上(1 号试剂 2 好试剂以 1:14 混合),加盖玻片或封口膜在暗湿盒中 37 ℃ 1 h。然后将其用 PBS 洗涤。滴加 50 μl 3 号试剂 37 ℃ 30 min,然后 PBS 洗涤,再滴加 100 μl 新鲜配制的 DAB 工作液,显微镜下观察随时终止反应。苏木素复染,中性树脂胶封固。每张切片随机取 5 个视野计数 TUNEL 阳性和阴性细胞,结果以 TUNEL 阳性细胞数占总细胞的百分比表示。记录阳性细胞数,测定凋亡指数(AI),AI=凋亡细胞核数/总细胞核数。

1.5.5 免疫组化 每只大鼠取 3 张切片,按 SP 试剂盒说明书测定 Bcl-2、Bad、Bax 的表达,常规脱蜡至水,3%过氧化氢处理、高温修复、血清封闭、滴加一抗过夜(浓度为 1:150),并同时用 PBS 代替一抗作为阴性对照,4 ℃ 孵育过夜、隔日滴加二抗孵育 20 min、SABC 37 ℃ 孵育 20 min,继而 DAB 显色,镜下观察显色背景。以上各步骤间均用 0.01 mol/L PBS 漂洗 3 次,每次 5 min,梯度乙醇逐级脱水,二甲苯透明,中性树脂封片,光镜下观察脊髓组织变化。

1.6 统计学处理

采用 SPSS 13.0 统计软件进行统计学处理。计数资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,同一时间点组间比较若满足正态性且方差齐时采用单因素方差分析,并用 LSD 法进行多重比较,同组不同时间点比较采用 *t* 检验。以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 残余尿量结果

术后 1 d,模型组、电针组、电针对照组残余尿量比较差异无统计学意义(*P*>0.05)。术后 7 d,电针组、电针对照组残余尿量较术后 1 d 有明显降低;术后 7 d,模型组、电针组、电针对照组比较差异有统计学

意义,其中电针组、电针对照组与模型组比较差异有统计学意义(*P*<0.001),且电针组与电针对照组比较差异有统计学意义(*P*<0.01)。结果见表 1。

表 1 不同时间点各组大鼠残余尿量比较($\bar{x} \pm s$)

Tab.1 Comparison of residual urine volume of rats of three groups in the different time points($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数(只)	术后 1 d	术后 7 d	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
假手术组	15	0.32±0.04	0.34±0.04	1.676	0.128
模型组	15	2.02±0.20	1.86±0.13*	2.072	0.068
电针组	15	1.99±0.15	1.14±0.09**	15.213	0.000
电针对照组	15	2.00±0.16	1.23±0.06#	13.026	0.000
<i>F</i> 值	-	0.036	137.781	-	-
<i>P</i> 值	-	0.965	0.000	-	-

注: *与**比较,*t*=14.22,*P*<0.001; *与#比较,*t*=12.25,*P*<0.001; **与#比较,*t*=3.27,*P*<0.01

Note: *vs**,*t*=14.22,*P*<0.001; *vs#,*t*=12.25,*P*<0.001; **vs#,*t*=3.27,*P*<0.01

2.2 大鼠排尿量变化

术后 1 d 进行膀胱容量检测,7 d 治疗后再对各组大鼠进行膀胱容量测定。术后 1 d,模型组、电针组、电针对照组大鼠排尿量比较差异无统计学意义。术后 7 d,电针组、电针对照组大鼠排尿量较术后 1 d 有明显升高;术后 7 d,模型组、电针组、电针对照组比较差异有统计学意义,其中电针组、电针对照组与模型组比较差异有统计学意义,且电针组与电针对照组比较差异有统计学意义。结果见表 2。

表 2 不同时间点各组大鼠排尿量比较($\bar{x} \pm s$)

Tab.2 Comparison of maximal capacity of rats of three groups in the different time points($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数(只)	术后 1 d	术后 7 d	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
假手术组	15	5.73±0.38	5.74±0.35	0.055	0.957
模型组	15	1.57±0.27	1.73±0.13*	1.671	0.129
电针组	15	1.41±0.38	2.79±0.12**	10.990	0.000
电针对照组	15	1.51±0.42	2.02±0.10#	3.788	0.004
<i>F</i> 值	-	0.464	227.981	-	-
<i>P</i> 值	-	0.634	0.000	-	-

注: *与**比较,*t*=19.27,*P*<0.001; *与#比较,*t*=6.09,*P*<0.001; **与#比较,*t*=15.60,*P*<0.001;

Note: *vs**,*t*=19.27,*P*<0.001; *vs#,*t*=6.09,*P*<0.001; **vs#,*t*=15.60,*P*<0.001

2.3 TUNEL 检测细胞凋亡结果

TUNEL 实验结果显示,除假手术组未损伤脊髓,仅存在少量脊髓神经凋亡细胞,着色的细胞数量

少(图 1a);模型组、电针组、电针对照组脊髓组织中存在大量的神经元和神经胶质细胞凋亡(图 1b,1c,1d)。TUNEL 染色的典型变化是细胞体积缩小,凋亡细胞胞质浓缩,细胞核染色质固缩,细胞膜内陷形成凋亡小体。术后 7 d,模型组、电针组、电针对照组凋亡率比较差异有统计学意义,其中电针组、电针对照组与模型组比较差异有统计学意义 ($P<0.01, P<0.05$),且电针组与电针对照组比较差异有统计学意义($P<0.05$)。结果见表 3。

表 3 术后 7 d 各组大鼠 TUNEL 检测结果($\bar{x}\pm s$)

Tab.3 The results of rats by TUNEL detection at the 7th after operation among three groups($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数(只)	AI(凋亡指数)
假手术组	15	0.082±0.02
模型组	15	0.953±0.02*
电针组	15	0.691±0.06**
电针对照组	15	0.838±0.04#
F 值	-	39.286
P 值	-	0.000

注: *与**比较, $t=8.56, P<0.01$; *与#比较, $t=5.02, P<0.05$; **与#比较, $t=4.29, P<0.05$

Note: *vs**, $t=8.56, P<0.01$; *vs#, $t=5.02, P<0.05$; **vs#, $t=4.29, P<0.05$

2.4 免疫组化结果

免疫组化染色切片上,免疫阳性染色呈棕褐色。免疫组化结果显示,在脊髓损伤后 7 d, Bcl-2 的阳性细胞数明显减少, Bax、Bad 的阳性细胞数明显增加,电针秩边与水道穴后 Bcl-2 的阳性细胞数明显增

加, Bax、Bad 的阳性细胞数明显减少。术后 7 d, 模型组、电针组、电针对照组 Bad 表达差异有统计学意义,其中电针组、电针对照组与模型组比较差异有统计学意义 ($P<0.01, P<0.05$),而电针组与电针对照组比较差异有统计学意义 ($P>0.05$);术后 7 d,模型组、电针组、电针对照组 Bax 表达差异有统计学意义,其中电针组、电针对照组与模型组比较差异有统计学意义 ($P<0.001, P<0.05$),且电针组与电针对照组比较差异有统计学意义 ($P<0.05$);术后 7 d,模型组、电针组、电针对照组 Bcl-2 表达差异有统计学意义,其中电针组、电针对照组与模型组比较差异有统计学意义 ($P<0.01$),且电针组与电针对照组比较差异有统计学意义 ($P<0.05$)。结果见表 4。

3 讨论

3.1 脊髓损伤后膀胱功能障碍的机制

脊髓作为初级排尿中枢,控制着尿道外括约肌和逼尿肌的功能活动,同时连接脊髓上有关的高级排尿中枢的神经纤维与膀胱尿道。急性脊髓损伤后,脑桥排尿中枢与下级排尿中枢受到影响,在急性期膀胱反射消失表现为无张力性膀胱,休克期过后,膀胱开始出现反射,但逼尿肌收缩无力及尿道外括约肌的痉挛性收缩,导致大量的残余尿产生。本实验损伤大鼠 T₉-T₁₀,胸腰段脊髓损伤占全部脊髓损伤的 60%以上,而该段为脊髓圆锥马尾集中交界处,常会引起不同类型的神经损伤,导致伴有逼尿肌反射消失或逼尿肌收缩无力,引起膀胱最大容量减少,膀胱顺应性下降等病理生理变化。

3.2 脊髓损伤膀胱功能障碍的治疗

临床上对于脊髓损伤后膀胱功能障碍患者,病

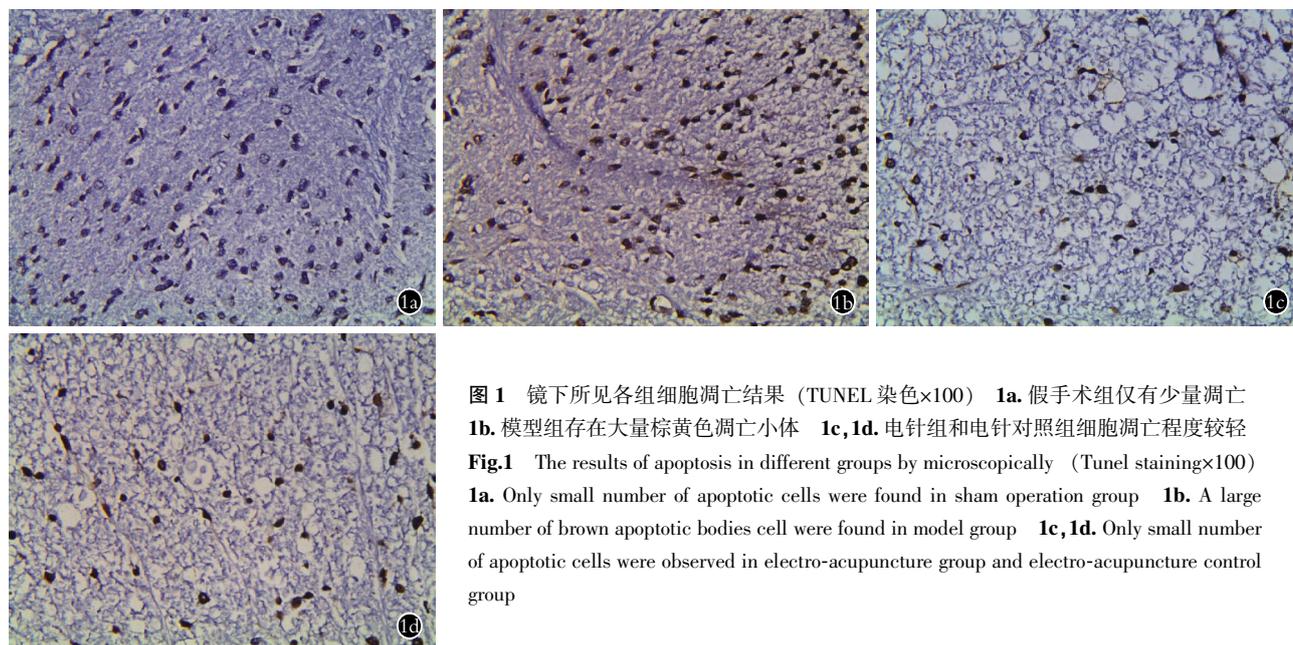


图 1 镜下所见各组细胞凋亡结果 (TUNEL 染色×100) 1a.假手术组仅有少量凋亡 1b.模型组存在大量棕黄色凋亡小体 1c,1d.电针组和电针对照组细胞凋亡程度较轻
Fig.1 The results of apoptosis in different groups by microscopically (Tunel staining×100) 1a. Only small number of apoptotic cells were found in sham operation group 1b. A large number of brown apoptotic bodies cell were found in model group 1c,1d. Only small number of apoptotic cells were observed in electro-acupuncture group and electro-acupuncture control group

表 4 术后 7 d 各组大鼠 Bax、Bad、Bcl-2 的免疫组化结果 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.4 Results of immunohistochemistry expression of Bax, Bad, Bcl-2 at the 7th day after operation among three groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	Bad	Bax	Bcl-2
假手术组	15	0.040±0.006	0.027±0.004	0.087±0.006
模型组	15	0.128±0.021*	0.150±0.003*	0.104±0.014*
电针组	15	0.055±0.008**	0.077±0.004•	0.227±0.021 [○]
电针对照组	15	0.066±0.009#	0.118±0.018♦	0.173±0.004 [◇]
F 值	-	32.724	44.664	71.268
P 值	-	0.000	0.000	0.000

注: *与**比较, $t=6.63, P<0.01$; *与#比较, $t=5.54, P<0.05$; **与#比较, $t=1.73, P>0.05$; *与•比较, $t=26.25, P<0.001$; *与♦比较, $t=3.50, P<0.05$; •与♦比较, $t=4.37, P<0.05$; *与[○]比较, $t=9.87, P<0.01$; *与[◇]比较, $t=9.65, P<0.01$; [○]与[◇]比较, $t=5.04, P<0.05$

Note: *vs**, $t=6.63, P<0.01$; *vs#, $t=5.54, P<0.05$; **vs#, $t=1.73, P>0.05$; *vs•, $t=26.25, P<0.001$; *vs♦, $t=3.50, P<0.05$; •vs♦, $t=4.37, P<0.05$; *vs[○], $t=9.87, P<0.01$; *vs[◇], $t=9.65, P<0.01$; [○]vs[◇], $t=5.04, P<0.05$

情程度不一, 治疗方法及其疗效也各异。通过刺激局部的传入神经、兴奋逼尿肌和膀胱内括约肌, 抑制受损的膀胱组织细胞凋亡, 促进神经生长因子的表达, 修复受损的神经和细胞, 从而改善膀胱功能状态。目前临床上针对各类膀胱功能障碍的治疗花样繁多, 以膀胱功能训练配合口服药物治疗为主^[5]。从古至今, 针灸对膀胱功能障碍的治疗作用不容小觑, 临床报道较多, 秩边与水道对泌尿生殖系统疾病临床也早有报道^[6-7]。本实验采用秩边与水道穴治疗大鼠急性脊髓损伤后发现, 术后 7 d 电针组、电针对照组残余尿量较术后 1 d 有明显降低 ($P<0.001$), 且电针组与电针对照组比较差异有统计学意义 ($P<0.01$); 电针组、电针对照组较模型组在术后 7 d 排尿量增加, 且电针组与电针对照组比较差异有统计学意义 ($P<0.001$), 表明电针秩边与水道穴对急性脊髓损伤的疗效是确切的, 但是其机制还需进一步探讨。

3.3 电针治疗急性脊髓损伤的机制

脊髓损伤的治疗一直是临床难题。电针具有针刺和电刺激双重功效, 本实验选取秩边与水道穴, 秩边为膀胱经穴之一, 膀胱经内属膀胱, 为膀胱经气流注之路径。通过刺激膀胱经腧穴以达到调节膀胱功能的目的。创伤性脑损伤、脊髓损伤、中风等都伴随着有细胞凋亡的发生^[8-10]。唐祎周等^[11]发现电针可能通过降低 IRE1 的表达来降低脊髓损伤后继发性细胞凋亡。本实验发现, 脊髓损伤后模型组和治疗组均可见大量处于凋亡状态的神经细胞, 7 d 治疗结束后电针组凋亡细胞数较模型组和电针对照组下降明显。Bcl-2 在脊髓损伤后表达水平较低, 而给予电针

治疗 7 d 后其表达水平较模型组和电针对照组明显升高, 这与刘智斌等^[12]的研究结果一致。脊髓损伤后 Bax 和 Bad 的表达明显增加, 而电针干预后其表达明显降低。脊髓损伤后 Bcl-2、Bax 和 Bad 蛋白的相互调控可以抑制神经细胞的凋亡, 电针秩边与水道穴治疗后促进脊髓修复的原因之一可能是电针可刺激交感神经及盆丛神经, 通过神经反馈到脊髓中枢或大脑皮质, 促进损伤区域脊髓神经的重连, 改善脊髓局部微环境, 激活线粒体酶活性, 恢复神经内外电压梯度, 诱导神经轴突的生长, 改善了逼尿肌超微结构, 促进了 Bcl-2 的表达, 降低乐 Bax 和 Bad 的表达, 使 Bcl-2/Bax 的比例发生改变, 从而降低细胞凋亡程度。

综上, 本实验发现电针秩边与水道穴对脊髓损伤后相关功能具有明显的促进作用, 其作用机制之一可能是通过抑制促凋亡基因 Bax、Bad 的表达和促进抑凋亡基因 Bcl-2 的表达。但细胞凋亡的发生是一个复杂的调节过程, 包括基因调控、信号转导和凋亡效应执行等 3 个阶段, 最终消除不必要的或不正常的细胞。处于细胞凋亡的早期阶段的信号转导通路的激活, 是细胞凋亡发生的必要前提, 近年来也被越来越多的研究在神经系统疾病上。因此, 电针治疗对脊髓损伤修复促进作用的具体机制有待于更进一步的研究。

参考文献

- [1] Rojo LE, Gaspar PA, Maecioni RB. Molecular targets in the rational design of AD specific PET tracers: tau or amyloid aggregates [J]. *Curr Alzheimer Res*, 2011, 8(6): 1-7.
- [2] Weinmann S, Roll S, Schwarzbach C, et al. Effects of Ginkgo biloba in dementia: systematic review and meta-analysis [J]. *BMC Geriatr*, 2010, 10: 1-14.
- [3] 黄金海. 镇肝熄风汤联合美多巴治疗帕金森氏病的临床疗效观察 [J]. *中国实用医药*, 2013, 8(8): 142-143. Huang JH. Clinical observation on the therapeutic effect of liver-settling wind-extinguishing decoction combine with madopar for parkinsonism syndrome [J]. *Zhongguo Shi Yong Yi Yao*, 2013, 8(8): 142-143. Chinese.
- [4] Liu F, Zou Y, Liu S, et al. Electro-acupuncture treatment improves neurological function associated with downregulation of PDGF and inhibition of astrogliosis in rats with spinal cord transection [J]. *J Mol Neurosci*, 2013, 51(2): 629-635.
- [5] 金锡御, 宋波, 杨勇, 等. 膀胱过度活动症临床指导原则 [J]. *中华泌尿外科杂志*, 2002, 23(5): 311-313. Jin XY, Song B, Yang Y, et al. Guiding principles for clinical application of overactive bladder (OAB) [J]. *Zhonghua Mi Niao Wai Ke Za Zhi*, 2002, 23(5): 311-313. Chinese.
- [6] 全仁夫, 陈荣良, 许世超, 等. 芒针透刺秩边-水道穴对脊髓损伤后尿潴留膀胱尿动力学的影响 [J]. *中国骨伤*, 2013, 26(1): 54-58. Quan RF, Chen RL, Xu SC, et al. Awn needle therapy on the impact of urinary retention after spinal cord injury [J]. *Zhongguo Gu Shang*

- China J Orthop Trauma, 2013, 26(1):54-58. Chinese with abstract in English.
- [7] 王淑颖. 杨兆钢用针刺秩边透水道治愈前列腺增生 1 例[J]. 世界中医药, 2011, 6(3): 206.
- Wang SY. One case of prostatic hyperplasia cured by Yang Zhao-gang used Zhibian through Shuidao points acupuncture treatment [J]. Shi Jie Zhong Yi Yao, 2011, 6(3): 206. Chinese.
- [8] Hwang L, Choi IY, Kim SE, et al. Dexmedetomidine ameliorates intracerebral hemorrhage-induced memory impairment by inhibiting apoptosis and enhancing brain-derived neurotrophic factor expression in the rat hippocampus [J]. Int J Mol Med, 2013, 31(5): 1047-1056.
- [9] Sung YH, Kim SC, Hong HP, et al. Treadmill exercise ameliorates dopaminergic neuronal loss through suppressing microglial activation in Parkinson's disease mice [J]. Life Sci, 2012, 91(25-26): 1309-1316.
- [10] Kim DH, Ko IG, Kim BK, et al. Treadmill exercise inhibits traumatic brain injury induced hippocampal apoptosis [J]. Physiol Behav, 2010, 101: 660-665.
- [11] 唐祎周, 孙忠人, 张翀. 夹脊电针对脊髓损伤大鼠内质网应激相关因子 IRE1 影响的实验研究 [J]. 针灸临床杂志, 2013, 29(8): 55-58.
- Tang YZ, Sun ZR, Zhang C. Experimental study on the apoptosis and IRE1 protein expression in spinal cord injury (SCI) rats by electroacupuncture (EA) [J]. Zhen Jiu Lin Chuang Za Zhi, 2013, 29(8): 55-58. Chinese.
- [12] 刘智斌, 牛文民, 杨晓航, 等. “嗅三针”对阿尔茨海默病大鼠海马 Bcl-2 和 Bax 表达的干预效应 [J]. 针刺研究, 2011, 36(1): 7-11.
- Liu ZB, Niu WM, Yang XH, et al. Effect of "Xiusanzhen" on expression of hippocampal Bcl-2 and Bax proteins in Alzheimer disease rats [J]. Zhen Ci Yan Jiu, 2011, 36(1): 7-11. Chinese.

(收稿日期: 2014-12-24 本文编辑: 李宜)

油红 O 染色在大鼠脊髓损伤中的应用

张舵, 寨旭, 贺西京

(西安交通大学第二附属医院骨二科, 陕西 西安 710004)

【摘要】 目的: 探讨油红 O 染色在评价大鼠脊髓损伤中的应用价值。方法: 选取体重 220~260 g 的 SD 雄鼠 24 只, 编号后简单随机抽样分为正常对照组与脊髓横断组, 正常对照组 6 只, 脊髓横断组 18 只。脊髓横断组于 T₁₀ 节段横断脊髓。于术后 1、2、4 周在脊髓横断组分别随机各抽取 6 只处死, 以横断部位为中心取脊髓组织标本。正常组取相同部位脊髓组织标本, 行冰冻切片, 进行油红 O 染色观察。结果: 正常对照组大鼠脊髓白质均匀着色, 与灰质有较明显的区分。脊髓横断组在术后 1、2、4 周时白质着色不均匀, 断端液化坏死灶呈进行性扩大, 油红 O 染色逐渐明显。结论: 油红 O 染色能够较明显的区分白质及灰质, 在一定程度上反映了白质的完整程度。断端坏死灶内油红 O 染色随脊髓损伤时间的延长逐渐明显反映了脂质在脊髓损伤过程中起着重要作用。

【关键词】 油红 O; 脊髓损伤; 大鼠; 动物实验

DOI: 10.3969/j.issn.1003-0034.2015.08.014

Application of oil red O staining in spinal cord injury of rats ZHANG Duo, ZHAI Xu, and HE Xi-jing. The Second Department of Orthopaedics, the Second Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an, 710004 Shaanxi, China

ABSTRACT Objective: To explore the value of the application of oil red O staining in spinal cord injury (SCI) of rats. **Methods:** With simple randomization, 24 Spargue-Dawley male rats were divided into normal control group including 6, and SCI group including 18. Spinal cord was transected at spinal lever T₁₀ to build SCI model. Six rats of SCI group were sacrificed randomly at 1, 2, 4 weeks after surgery. After the spinal cord tissue sections were made, oil red O staining methods were used to observe the changes at the end of transected spinal cord. Images were analyzed by Image-Pro Plus 6.0 and SPSS 20.0 software. **Results:** The oil red O staining of normal control group showed that white matter surrounded by myelin sheath was clear and obviously distinctive from grey matter. Uneven and strengthened staining in oil O was observed in grey matter of SCI group at 1, 2, 4 weeks post-SCI. **Conclusion:** It is a good method to label the myelin sheath in spinal cord and distinct white matter from grey matter by oil red O staining. Analysis of the images showed that lipid may become another target for drugs, which needs more researches.

KEYWORDS Oil red O; Spinal cord injury; Rats; Animal experimentation

Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2015, 28(8): 738-742 www.zggszz.com

通讯作者: 贺西京 E-mail: xijing_h@vip.tom.com

Corresponding author: HE Xi-jing E-mail: xi-jing_h@vip.tom.com