

电针刺激对脊髓损伤大鼠 NF₂₀₀ GFAP 表达的影响

乔鸿飞¹ 兰宾尚¹ 刘亦恒¹

摘要 目的:探讨脊髓损伤后电针刺激对 NF₂₀₀、GFAP 表达的影响。方法:将大鼠分为正常对照组、空白对照组、模型对照组和电针刺激组。神经元的鉴定采用甲苯胺蓝染色法,脊髓 NF₂₀₀、GFAP 抗体采用免疫组化染色。结果:正常对照组和空白对照组的大鼠脊髓灰质中的神经元数量无显著性差异($P>0.05$);模型对照组脊髓灰质中神经元数量同正常对照组、空白对照组、电针刺激组相比均少,有显著性差异($P<0.05$)。模型对照组的 NF₂₀₀ 阳性神经元数量、GFAP 阳性面积显著低于电针刺激组($P<0.05$)。电针刺激脊髓损伤 4 周后大鼠脊髓灰质中神经元数量显著较模型对照组增多;NF₂₀₀ 阳性神经元数量、GFAP 阳性面积较正常大鼠明显增多。结论:电针刺激可促进脊髓损伤大鼠 NF₂₀₀ 与 GFAP 的表达,可能有助于脊髓功能的恢复。

关键词 脊髓损伤;电针;神经微丝蛋白质类 NF₂₀₀;神经胶质原纤维酸性蛋白质;大鼠

中图分类号:R651.2,R245 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2008)-07-0635-03

Effects of electroacupuncture on the expressions of NF₂₀₀ and GFAP in adult rats with spinal cord injuries/
QIAO Hongfei, LAN Binshan, LIU Yiheng//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2008, 23(7): 635—637

Abstract Objective: To investigate the effects of electroacupuncture (EA) on the expressions of NF₂₀₀ and GFAP in adult rats with spinal cord injuries. **Method:** Male Sprague-Dawley rats were randomly divided into 4 groups: normal control group, blank control group, model control group and EA treatment group. The expressions of NF₂₀₀ and GFAP and the number of neurons of different groups were shown with analytical system of photographs, immunohistochemistry and toluidine blue staining. **Result:** There was no marked difference between normal control group and blank control group in the number of neuron in gray matter of spinal cord ($P>0.05$); In model control group the number of neurons were lower than that in EA group, normal control group and blank control group remarkably ($P<0.05$). In model control group the amount of positive neuron cells of NF₂₀₀ and the area of positive GFAP were lower than those in EA group remarkably ($P<0.05$). In EA group at the fourth week of EA the number of neuron in gray matter of spinal cord were higher than that in model control group remarkably and the amount of positive nerve cell of NF₂₀₀ and the area of positive GFAP were higher than those in normal control group obviously. **Conclusion:** Electroacupuncture can promote the expressions of NF₂₀₀ and GFAP in rats with spinal cord injury and would be helpful to the spinal cord function recovery.

Author's address Dept. of Orthopedic, the Second Affiliated Hospital, Xi'an Jiaotong University, Xi'an, 710004

Key words spinal cord injuries; electroacupuncture; neurofilament proteins NF₂₀₀; glial fibrillary acidic protein; rat

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)是严重危害人类健康的脊柱脊髓疾患,常致严重伤残,引起各种并发症,严重影响患者的身心健康和生存质量,甚至危及生命。脊髓损伤的程度不仅与脊髓瞬间受力所致的初发损伤有关,还与初期创伤的病理生理反应所致的继发性损伤有关。绝大多数急性脊髓损伤为非离断伤,表现为挫裂伤、出血、水肿和微循环障碍等,造成脊髓缺血、氧自由基生成、离子转移、脂质过氧化和细胞凋亡等^[1]。针刺能改善脊髓损伤后的感觉和运动功能障碍及其他并发症,是治疗 SCI 的重要手段^[2]。本研究选用电针刺激夹脊穴、足三里穴、三阴交穴、百会穴,探讨电针对脊髓损伤大鼠神经生长的改善作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物

健康雄性 SD 大鼠 50 只,成年 8 周龄,体重 240—260g。第 1 组为正常对照组(10 只),第 2 组为空白对照组(10 只),第 3 组为模型对照组(15 只),第 4 组为电针刺激组(15 只)。SD 大鼠由西安交通大学动物实验中心提供。

1.2 仪器与试剂

C-6805-1 型电针治疗仪(青岛);促肾上腺皮质激素(ACTH)、皮质醇(cortisol)放射免疫分析药盒(北京);神经胶质原纤维酸性蛋白质(glial fibrillary acidic protein, GFAP)、NF₂₀₀ 免疫组化试剂盒(北京)。

1.3 模型的建立

1 西安交通大学第二医院骨科, 710004

作者简介:乔鸿飞,女,硕士

收稿日期:2007-11-19

50 只 SD 大鼠随机分为 4 组:第 1 组正常对照组。第 2 组空白对照组,10 只大鼠用 3% 的苯巴比妥钠经腹腔麻醉 (30mg/kg),将动物俯卧,固定于拱形手术台上,背部剪毛,碘伏消毒,以 T8 为中心,沿背部正中切开,切口长约 2cm,咬除 T7—T9 棘突及椎板,暴露出 8mm×3mm 的硬膜,然后分层缝合。第 3 组模型对照组及第 4 组电针刺激组,两组 30 只大鼠采用动脉瘤夹压迫法建立成年大鼠脊髓损伤动物模型,采用同空白对照组的方法暴露出 8mm×3mm 的硬膜。以 T8 脊髓节段为中心,在显微镜帮助下用宽度 1.2mm,压迫力约为 98N 的动脉瘤夹压迫脊髓 3min,术后分层缝合。

1.4 分组干预

正常对照组 10 只大鼠喂养 4 周。电针刺激组于造模后 0.5h 电针刺激夹脊穴、足三里穴、百会穴、三阴交穴,连续脉冲电流,频率 2Hz,电压 0.5V。刺激 30min,随后在第 2.5h、5.5h、7.5h 电针针刺上述穴位 15min,第 2 天电针刺激上述穴位 30 min,每日 1 次。模型对照组、空白对照组于造模术后 0.5h 腹腔注射 8ml/kg 生理盐水,以后于第 2.5h、5.5h、7.5h 各注射半量,第 2 天起注射全量,每日 1 次。

取穴:夹脊穴(在距损伤段上下端三个椎体的棘突间隙旁开后正中中线约 3—4mm 处取穴,用 30 号 1 寸毫针垂直刺入约 4—5mm,使针尖触及椎板,上下连接正负电极),双侧足三里穴(位于后肢膝关节外下方当腓骨小头下约 5mm 处),百会穴(位于顶骨正中)三阴交穴(位于内踝上 10mm,胫骨后 1mm),依据试验针灸所描述取穴^[9]。疗程为 4 周。

1.5 神经元甲苯胺蓝染色、免疫组化染色

实验结束时,将动物记录体重后麻醉,开胸暴露心脏,4℃生理盐水 250ml、4%多聚甲醛 200ml 先后快速灌注,见动物四肢变硬,口唇、内脏变白后,4%多聚甲醛静滴 30min 固定后,取脊髓损伤处及上下 1cm 处。在 4℃下将脊髓移入 4%的多聚甲醛里固定 12—24h,然后做神经元的鉴定甲苯胺蓝染色法、免疫组化染色,在显微镜下观察神经元细胞、NF₂₀₀、GFAP 表达情况。

1.6 统计学分析

数据以均数±标准差表示,应用 SPSS 10.0 统计分析软件,两组均数比较用 *t* 检验,多组均数比较用单因素方差分析,对数据进行统计分析;*P*<0.05 为差异有显著性。

2 结果

2.1 神经元甲苯胺蓝染色结果

正常对照组大鼠脊髓神经元胞体和突起轮廓清晰,胞核为深蓝色数量较多(图 1,见前置彩色插页 7)。空白对照组大鼠脊髓神经元同样呈现出胞体和突起轮廓清晰、胞核为深蓝色数量较多见,脊髓灰质中神经元数量同正常对照组比较无显著性差异(*P*>0.05)。模型对照组中大、中型神经元数量明显减少,神经元胞浆呈深蓝色,尼氏体模糊或消失,胞体塌陷皱缩或碎裂呈空泡状,胞核椭圆或三角形,染成淡蓝至深蓝色,偶有胞体和突起轮廓清晰的脊髓神经元出现,脊髓灰质中神经元数量同正常对照组、空白对照组、电针刺激组相比均有显著性差异(*P*<0.05)(图 2,见前置彩色插页 7)。电针刺激组大、中型神经元数量较模型对照组明显增多,胞体和突起轮廓清晰的神经元也较阴性对照组增多,呈现出与胞体塌陷皱缩、胞浆破裂的神经元共存的现象脊髓灰质中神经元数量与模型对照组有显著性差异(*P*<0.05),与正常对照组空白对照组相比有显著性差异(*P*<0.05),见表 1。

表 1 各组动物甲苯胺蓝染色灰质神经元数量结果比较

	正常对照组	空白对照组	模型对照组	电针刺激组
第 4 周	94.10±1.20 ^②	93.90±1.18 ^②	62.80±1.23 ^①	84.20±1.93 ^{①②}

①与正常对照组比较 *P*<0.05;②与模型对照组比较 *P*<0.05

2.2 免疫组化染色结果比较

GFAP 阳性细胞判断标准为细胞核和(或)胞浆内出现棕黄色细颗粒者。NF₂₀₀ 阳性轴突判断标准为轴突内深紫色点及细胞核和(或)胞浆内出现紫色细颗粒者并计数每张切片的 NF₂₀₀ 阳性神经元数。正常对照组与空白对照组相比较,NF₂₀₀ 阳性神经元数量、GFAP 阳性面积无显著性差异(*P*>0.05)。模型对照组与电针刺激组相比较,NF₂₀₀ 阳性神经元数量、GFAP 阳性面积显著低于电针刺激组(*P*<0.05)。模型对照组、电针刺激组与空白对照组、正常对照组的 NF₂₀₀ 阳性神经元数量、GFAP 阳性面积相比较有显著差异(*P*<0.05),见图 3—6(见前置彩色插页 7),见表 2。

3 讨论

本研究采用健康成年雄性 SD 大鼠为研究对象。对脊髓损伤大鼠采用电针夹脊穴、足三里穴、三阴交穴、百会穴,观测脊髓灰质中神经元形态及数量的改变,NF₂₀₀ 阳性神经元的表达及 GFAP 的阳性面积。电针刺激能从组织形态学、神经生化以及分子生物学等方面有效抑制体内有害物质的释放和促进有益物质的释放,从而减轻脊髓继发性损伤和促进脊髓神经再生。现代研究认为脊髓损伤后应尽早进行

表 2 各组动物的 NF₂₀₀ GFAP 表达情况 ($\bar{x} \pm s$)

组别	NF ₂₀₀ 阳性神经元数量 (神经元数/切片)	GFAP 阳性面积 (s/ μm^2)
正常对照组	4.10 $\pm$ 1.20 ^②	977.70 $\pm$ 46.81 ^②
空白对照组	4.00 $\pm$ 1.25 ^②	985.10 $\pm$ 42.46 ^②
模型对照组	54.8 $\pm$ 5.01 ^①	4038.10 $\pm$ 290.40 ^①
电针刺激组	72.30 $\pm$ 5.19 ^{①②}	4797.40 $\pm$ 1771.98 ^{①②}

①与正常对照组比较 $P < 0.05$; ②与模型对照组比较 $P < 0.05$ 。S 为: 每张切片取 5 个视野, 在高倍镜下摄取图像, 采用图像分析系统, 测定每张图像的面积(S_1)和图像中免疫阳性区域的面积(S_2), 计算其相对面积($S=S_2/S_1$)

电针刺激促进中枢神经递质释放^[4]。电针刺激对受损脊髓的作用为: ①使神经细胞的周围环境发生极化, 对神经纤维有接触导向作用^[5]。②在脊髓损伤后, 伤段脊髓组织 Ca^{2+} 超载, 而电刺激可降低 Ca^{2+} 、 Na^+ 及含水量, 稳定膜结构, 增加线粒体酶活性, 阻断脊髓继发性病变^[6]。③抵消损伤电流, 阻断继发性病变^[7], 通过调控神经递质-甘氨酸的含量来影响脊髓的兴奋性^[8]。④电针刺激大鼠足三里 30min, 可不同程度地降低 nNOS mRNA、iNOS mRNA 的表达, 降低 NOS 活性。电针早期刺激可能通过降低 NO 的形成减轻脊髓继发性损伤, 达到神经保护作用^[9], 电针刺激足三里穴的应激大鼠的胃黏膜损伤指数明显小于单纯应激大鼠; 同时免疫组织化学观察发现, 配合针刺的应激大鼠腰膨大后角浅层中 GFAP 和 OX42 阳性免疫反应产物明显高于未行针刺的应激动物, 且胶质细胞胞体变大, 突起变长, 染色变深, 反映出该部位的星形胶质细胞和小胶质细胞功能已处于“激活”状态, 提示电针保护胃黏膜损伤作用与腰膨大后角浅层星形胶质细胞和小胶质细胞功能活动有关^[10]。督脉电针和神经干细胞移植联合应用使受损伤的脊髓组织 cAMP 维持较高水平, 使受损伤脊髓组织产生神经生长活性物质^[11]成年哺乳动物脊髓损伤后的神经再生是指轴突的再生, 轴突无合成蛋白的能力, 所需功能和结构蛋白均由神经元胞体合成经轴浆转运供给, 故神经元的功能状态可以反映神经纤维再生的情况。神经丝蛋白(neurofilament protein, NF)是构成神经元胞体和神经轴突细胞骨架的主要成分, 在维护神经元的功能和轴浆转运等一系列与脊髓损伤修复相关的病理生理变化中发挥着重要作用^[12]。NF₂₀₀ 在正常情况下只存在于轴索中, 而胞体不含或很少含有, 故正常时 NF₂₀₀ 染色, 胞体为阴性。当脊髓损伤后, 损伤区的神经细胞受创伤及继发因素的直接影响出现变性坏死, 结构破坏及细胞崩解, 失去对创伤的反应能力。而损伤区外的邻近神经元在创伤刺激及多种诱导因子的作用下, 开始大量合成及积存 NF₂₀₀, 以适应神经的再生的需要。NF₂₀₀ 积存胞体而使胞体着色。有研究表明脊髓不完全损伤后 NF₂₀₀ 阳性神经元数量及神经元胞体着色的程度与

后肢的功能恢复情况有密切的关系^[13], 说明 NF₂₀₀ 染色不仅能显示伤后神经元的形态, 也能反映其功能状态。本试验选择损伤邻近段脊髓作为观测对象能较好地反映神经细胞在创伤后的修复反应。4 周时电针刺激组的 NF₂₀₀ 表达阳性神经元数量明显多于阴性对照组说明电针可促进神经功能的恢复。GFAP 是构成神经胶质细胞的主要细胞骨架蛋白, 其表达的高低可反映胶质细胞的功能状态。脊髓损伤后星形胶质细胞明显功能活跃及胶质化, 表现为增生、肥大、突起增多, 并分泌多种神经诱导因子促使神经再生^[14]。本试验中观察到伤后 4 周电针刺激组较阴性对照组 GFAP 的表达也同样显著增高, 但有文献指出星形胶质细胞的功能持续活跃在损伤后期则表现为胶质细胞过度增生^[15], 形成胶质瘢痕而对神经纤维生长及神经再通起着机械和化学性的阻碍作用。GFAP 增高到何种程度就对神经生长有障碍作用有待于进一步的深入研究。

参考文献

- [1] 姜金利. 脊髓损伤的治疗[J]. 中国现代神经疾病杂志, 2004, 10(5): 280.
- [2] Nayak S, Matheis RJ, Agostinelli S, et al. The use of complementary and alternative therapies for chronic pain following spinal cord injury: a pilot survey [J]. J Spinal Cord Med, 2001, 24(1): 54—62.
- [3] 李忠仁主编. 实验针灸学试验指导及技能训练[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2007, 10(1): 62.
- [4] 顾陈峰, 胡军, 蔡云彪. 电针刺激参数的研究进展[J]. 中国针灸, 2003, 23 (8): 489—490.
- [5] 王新家, 孔抗美. 电刺激与脊髓再生研究进展[J]. 汕头大学医学院学报, 2002, 15 (1): 58—60.
- [6] 楚佳梅, 范文双. 夹脊电针治疗大鼠脊髓损伤的实验研究[J]. 中医药学刊, 2003, 21 (3): 408—411.
- [7] Richard BB, Ernesto R, Melvin JC. Enhanced spinal cord regeneration in lamprey by applied electric fields [J]. Science, 1981, 213(7): 611—617.
- [8] 闫丽萍, 马骋, 刘跃光, 等. 土的宁背景下电针对大鼠不同脊髓节段甘氨酸含量的影响[J]. 中国临床康复, 2004, 8 (19): 3813—3814.
- [9] 张志英, 崔云华, 严振国. 电针对脊髓损伤后细胞凋亡的影响[J]. 中国临床康复, 2002, 6(6): 818—821.
- [10] 秦明, 饶志仁, 王景杰, 等. 椎管注射氟柠檬酸对针刺保护高湿热应激大鼠胃黏膜作用的影响 [J]. 针刺研究, 2007, 32(3): 158—162.
- [11] 李晓滨, 曾园山, 陈玉玲, 等. 督脉电针与神经干细胞移植联合应用促进脊髓组织产生神经生长活性物质[J]. 解剖学报, 2006, 37 (6): 622—626.
- [12] Uchida K, Baba H, Maezawa Y, et al. Progressive changes in neurofilament proteins and Growth-associated protein-43 immunoreactivities at the site of cervical spinal cord compression in spinal hyperostotic mice [J]. Spine, 2002, 27(5): 480.
- [13] 胥少汀, 郭世绂. 脊髓损伤基础与临床[M]. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 205.
- [14] Cheng H, Wu J P, Tzeng S F. Neuroprotection of glial cell line-derived neurotrophic factor in damaged spinal cords following contusive injury[J]. J Neurosci Res, 2002, 69(3): 397.
- [15] Baldwin S A, Broderick R, Blades D A, et al. Alterations in temporal/spatial distribution of GFAP and vimentin-positive astrocyte after spinal cord contusion with the New York University spinal cord injury device [J]. J Neurotrauma, 1998, 15(12): 1015.