

· 基础研究 ·

电针刺激对脊髓损伤大鼠免疫功能及HPA轴功能的影响

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大鼠免疫功能、HPA轴功能的影响。方法:将50只大鼠分为正常对照组(10只)、电针刺激组(15只)、阴性对照组(15只)、空白对照组(10只)。采用免疫荧光染色(溶血免疫法)流式细胞仪检测淋巴细胞亚群CD4、CD8、CD3、CD4/CD8(%)。采用同位素放射免疫法检测血浆促肾上腺皮质激素(ACTH)、血清皮质醇(CORT)。结果:正常对照组与空白对照组、电针刺激组组间比较,CD3、CD4、CD8、CD4/CD8(%)各组间差异无显著性($P>0.05$)。阴性对照组与电针刺激组、空白对照组、正常对照组各组间相比较,CD3、CD4、CD4/CD8(%)显著低于后三组($P<0.05$),CD8显著高于后三组($P<0.05$)。阴性对照组与电针刺激组和空白对照组相比较,血浆ACTH、血清CORT显著高于后两组($P<0.05$)。结论:电针刺激脊髓损伤大鼠能改善其免疫功能使CD3、CD4、CD4/CD8(%)升高,CD8降低。脊髓损伤后大鼠血浆ACTH和血清CORT较正常对照组明显升高,说明脊髓损伤后大鼠HPA轴功能紊乱。电针刺激使脊髓损伤大鼠血浆ACTH和血清CORT较阴性对照组明显降低,恢复HPA轴功能状态。

关键词 脊髓损伤;电针;淋巴细胞亚群;下丘脑-垂体-肾上腺轴;大鼠

中图分类号:R651.2,R245 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2008)-09-0828-03

Effect on immune function and hypothalamus-pituitary-adrenal axis of electroacupuncture in adult rats with spinal cord injuries/QIAO Hongfei, LAN Binshang, LIU Yiheng/Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2008, 23(9): 828-830

Abstract Objective: To investigate the effect of electroacupuncture (EA) on immune function and hypothalamus-pituitary-adrenal axis (HPA) function in adult rats with spinal cord injuries. **Method:** Fifty Male SD rats were randomly divided into 4 groups: the normal control group, the blank control group, the negative control group, the electroacupuncture treatment group. The changes in peripheral T-lymphocyte subsets (CD4, CD8, CD3, CD4/CD8 ratio) were evaluated by flow cytometry. Serum cortisol (CORT) and plasma adrenocorticotrophic hormone (ACTH) levels of all subjects were determined. **Result:** The CD3, CD4, CD8, CD4/CD8 ratio had no marked difference among the normal control group, the blank control group and the electroacupuncture treatment group ($P>0.05$). Negative control group compared to EA treatment group normal control group and blank control group's CD3, CD4, CD4/CD8 ratio rate were remarkable lower than the last three groups ($P<0.05$). CD8 was remarkable higher than the last three groups ($P<0.05$). Negative control group compared to electroacupuncture treatment group and blank control group's plasma ACTH rate and serum CORT rate was remarkable higher than the last two groups ($P<0.05$). **Conclusion:** EA could improve the immune function in adult rats with spinal cord injuries. EA treatment increased CD3, CD4, CD4/CD8 ratio and decrease CD8. The rate of plasma ACTH and serum CORT of mice is increase after spinal cord injury to show the turbulence of HPA function. EA could improve the HPA function in adult rats with spinal cord injuries.

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

Key words spinal cord injury; electroacupuncture; T lymphocyte subsets; hypothalamus-pituitary-adrenal axis; rat

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)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]。随着现代创伤急救技术的提高,脊髓损伤的早期病死率已明显下降,

而创伤治疗后期因感染直接或间接导致的死亡则相对升高,脊髓损伤可引起机体非特异及特异性免疫功能障碍,本研究选用电针夹脊穴、足三里穴、百会穴、三阴交穴,探讨电针对脊髓损伤患者免疫功能、下丘脑-垂体-肾上腺轴(hypothalamus-pituitary-adrenal, HPA)轴功能的改善作用。

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

1 材料与方法

1.1 动物与分组

健康雄性 SD 大鼠 50 只, 成年 8 周龄, 体重 240—260g。第一组为正常对照组(10 只), 第二组为空白对照组(10 只), 第三组为阴性对照组(15 只), 第四组为电针刺激组(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(中国青岛); 双色直标单克隆抗体异硫氰酸荧光素(FITC)-IgG1/PE(藻红蛋白)-IgG (对照物)、FITC-CD3/PE-CD 4、FITC-CD3/PE-CD8 及溶血素, 均购于美国 BD 公司。促肾上腺皮质激素(ACTH)、皮质醇(cortisol)放射免疫分析药盒(北京市福瑞生物工程公司)。

1.3 模型的建立

50 只 SD 大鼠随机分为 4 组: 第一组正常对照组。第二组空白对照组, 用 3% 的苯巴比妥钠经腹腔麻醉(30mg/kg)大鼠, 将其俯卧, 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, 分层缝合。第三组阴性对照组及第四组电针刺激组, 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, 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

正常对照组喂养 4 周。电针刺激组于造模后 0.5h 电针夹脊穴、足三里穴治疗 30min, 随后 2.5h、5.5h、7.5h 电针刺激上述穴位 15min, 第二天起上述穴位电针刺激 30min, 每日 1 次。

参数: 连续脉冲电流, 频率 2Hz, 电压 0.5V。取穴: 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^[2]。疗程为 4 周。

阴性对照组、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 2.5h、5.5h、7.5h 各注射半量, 第二天起注射全量, 每日 1 次。

1.5 静脉全血淋巴细胞亚群、血清及血浆激素水平检测

1.5.1 免疫荧光染色(溶血免洗法): 取三只流式专

用试管, 每管依次加入相应剂量的 FITC-IgG1/PE-IgG、大鼠单抗 FITC-CD3/PE-CD4 和 FITC-CD3/PE-CD8 (严格按照说明书操作); 加入待检的血 50μl, 充分混匀, 室温置暗处 15min; 加入溶血素 100μl, 轻轻摇匀并置室温暗处 15 min; 加入双蒸水 1ml 混匀, 置暗处室温 5min, 离心 2 次; 加入 0.5ml 磷酸盐缓冲液(PBS), 24 h 内检测。

1.5.2 流式细胞仪检测: 以 Flow Check 校准仪器光路, 调整荧光补偿和光电倍增管电压。在设置适当的电门后, 用 BD 公司的 CELL quest 软件进行测定和分析。

1.5.3 取制好 -20℃ 血浆测定肾上腺皮质激素(adrenocorticotrophic hormone, ACTH)、血清测定皮质醇(cortisol, CORT)前, 使样本置于室温或冷水中复融, 再次 4℃, 3000 r/min 离心 5min, 取上清测定。待测血浆 ACTH、血清 CORT 浓度、按照测定程序加入试剂后, 混匀, 2—8℃放置 15min, 离心(3500r/min)15min, 吸去上清液, 测各管沉淀的放射性计数。

1.6 统计学分析

应用 SPSS 10.0 统计分析软件, 数据以均数±标准差表示, 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; 数据均以 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 淋巴细胞亚群测定结果

见表 1。正常对照组与空白对照组、电针刺激组组间比较, CD3(%) 各组间无显著性差异($P > 0.05$)。阴性对照组与电针刺激组、空白对照组、正常对照组各组间相比较, CD3(%) 显著低于后三组($P < 0.05$)。正常对照组与空白对照组、电针刺激组组间比较, CD4(%) 各组间无显著性差异($P > 0.05$)。阴性对照组与电针刺激组、空白对照组、正常对照组各组间相比较, CD4(%) 显著低于后三组($P < 0.05$)。正常对照组与空白对照组、电针刺激组组间比较, CD4/CD8(%) 各组间无显著性差异($P > 0.05$)。阴性对照组与电针刺激组、空白对照组、正常对照组各组间相比较, CD4/CD8(%) 显著低于后三组($P < 0.05$)。正常对照组与空白对照组、电针刺激组组间比较, CD8(%) 各组间无显著性差异($P > 0.05$)。阴性对照组与电针刺激组、空白对照组、正常对照组各组间相比较, CD8(%) 显著高于后三组($P < 0.05$)。采用流式细胞仪进行测定标本前, 取 1 份血测定 10 次 CD3 值, 结果求得为 52.39 ± 2.30 , 变异系数 $CV = 2.03/52.39 = 4.38\%$, 说明流式细胞仪测得的结果比较可靠。四组大鼠血

CD4、CD8、CD3、CD4/CD8 比值。

2.2 样本一般情况

术后一般情况观察结果:本试验中电针刺激组术后死亡 5 只;阴性对照组术后死亡 5 只。两组死亡比例相同;死亡原因为尿潴留或/和泌尿系感染,余 40 只大鼠通过规律人工排尿和辅助应用抗生素,存活情况良好。各组均有 10 只存活。

术后各组动物均出现体重减轻。术后 1 周,电针刺激组动物体重恢复至术前重量,此后逐渐增加。术后 4 周,阴性对照组与电针刺激组动物体重比较有显著差异($P<0.05$)见表 2。

2.3 各组血清及血浆激素水平检测情况

脊髓损伤后 4 周正常对照组与空白对照组、电针刺激组组间比较,血浆 ATCH、血清 CORT,各组间无显著性差异($P>0.05$)。阴性对照组与电针刺激组、空白对照组、正常对照组比较,血浆 ATCH、血清 CORT 显著高于后 3 组($P<0.05$),见表 3。

表 1 四组大鼠血 CD3、CD4、CD8、CD4/CD8 的比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	CD3(%)	CD4(%)	CD8(%)	CD4/CD8(%)
正常对照组	53.31±4.03 ^②	36.45±2.73 ^②	15.53±2.49 ^②	2.39±0.30 ^②
空白对照组	52.57±6.29 ^②	36.02±2.44 ^②	15.62±2.59 ^②	2.35±0.31 ^②
阴性对照组	43.06±6.15 ^①	28.64±2.24 ^①	24.66±2.37 ^①	1.17±0.15 ^①
电针刺激组	51.31±2.22 ^②	36.96±2.79 ^②	15.56±2.82 ^②	2.43±0.33 ^②

①与正常对照组比较 $P<0.05$;②与阴性对照组比较 $P<0.05$

表 2 各组动物试验前后体重、周龄比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	体重(g)		周龄	
	试验前	试验后	试验前	试验后
正常对照组	244.50±12.34	279.00±5.68 ^②	8	12
空白对照组	241.50±8.510	268.00±8.88 ^{①②}	8	12
阴性对照组	236.00±12.87	243.50±5.30 ^①	8	12
电针刺激组	233.00±11.75	278.50±4.47 ^②	8	12

①与正常对照组比较 $P<0.05$;②与阴性对照组比较 $P<0.05$

表 3 各组血浆 ATCH 血清 CORT 情况 ($\bar{x}\pm s$)

组别	血浆 ATCH(pg/ml)	血清 CORT(nmol/L)
正常对照组	29.89±5.42 ^②	20.60±5.93 ^②
空白对照组	28.28±5.16 ^②	20.31±6.13 ^②
阴性对照组	49.67±10.50 ^①	33.35±8.56 ^①
电针刺激组	29.82±5.05 ^②	19.92±6.69 ^②

①与正常对照组比较 $P<0.05$;②与阴性对照组比较 $P<0.05$

3 讨论

本研究采用健康成年雄性 SD 大鼠为研究对象。在本试验中 SCI 后动物的体重变化是衡量术后动物总体状况的重要指标。间接反映手术损伤的程度、动物截瘫后进食及排泄功能,也可以间接评价脊髓功能恢复情况。本实验所有手术动物于术后均出现体重减轻。在术后 1 周时,电针刺激组动物的体重逐渐增加;术后 4 周时,电针刺激组较阴性对照组体重比较有显著差异($P<0.05$)。电针刺激组动物的总体状况优于阴性对照组。这可能与电针刺激组受损脊髓的功能恢复,免疫状况及 HPA 轴功能的改善

有关。

随着现代创伤急救技术的提高,脊髓损伤的早期病死率已明显下降,而创伤治疗后期因感染直接或间接导致的死亡则相对升高,脊髓损伤可引起机体非特异及特异性免疫功能障碍,而在特异性免疫中尤以细胞免疫功能受损为重,主要是 T 细胞的功能及自然杀伤细胞(NK 细胞)的功能等受到抑制,表现在机体外周血 T 淋巴细胞转化作用及活化作用降低、CD4/CD8 降低、对促细胞分裂剂增殖反应降低、可溶性 IL-2 受体水平升高、CD3 CD56 细胞的数量及细胞毒性降低等,这些是导致伤后机体容易发生感染的主要原因。若机体发生了感染,则会导致脊髓损伤区淋巴细胞浸润增强,又进一步加重了脊髓损伤。在 T 淋巴细胞分类中,CD3 代表总 T 淋巴细胞,CD4 代表 T 辅助细胞而 CD8 代表 T 抑制细胞和 T 杀伤细胞。CD4 T 淋巴细胞本身是免疫反应的中心细胞;CD8 T 淋巴细胞是免疫反应的效应细胞。内源性阿片肽不仅可以调节 T 细胞、B 细胞、自然杀伤细胞和巨噬细胞等多种免疫细胞功能,而且可以参与免疫应答的全部环节^[3]。因此,内源性阿片肽系统被认为是除 HPA 轴之外的另一条联系神经-内分泌-免疫系统的通路。目前认为,脊髓损伤后应尽早电针刺激。但不同频率的刺激能促进不同的中枢神经递质释放^[4],低频率刺激促进脑啡肽释放,而高频率则促进强啡肽释放^[5]。大量研究资料表明,针灸能改变机体的特异和非特异性免疫功能,对免疫细胞和免疫分子均有明显的影响,在防治变态反应性疾病、抗感染、抗炎和抗肿瘤等方面均发挥了积极的作用,而且这种作用以整体性和双向性为其规律和特点^[6]。针刺对免疫功能的调节作用,是在中枢神经系统各级水平的参与整合下,通过神经-内分泌-免疫系统的介导而实现的。针刺可能通过内源性阿片肽、副交感神经系统等途径介导对免疫功能的正性调节,通过 HPA 轴等通路介导对免疫功能的负性调节^[7]。本实验中,采用电针大鼠“足三里”来提高大鼠免疫功能^[8],试验结果表明“足三里”能明显提高 SCI 后大鼠 T 细胞免疫功能,使得 SCI 后大鼠的淋巴细胞亚群功能得到了明显改善。

一般认为,心理应激发生后,首先作用于大脑,改变脑的内分泌功能,其中最重要的途径是 HPA 轴被激活。肾上腺皮质激素与情绪的关系至为密切,其中尤以糖皮质激素中的皮质酮、可的松及皮质醇的作用更为显著^[9]。本实验模型组大鼠血浆 ACTH、血清 CORT 水平均明显高于正常对照组,表明 SCI 过

(下转 840 页)