

不同局部穴位电针对大鼠受损伤脊髓组织降钙素基因相关肽表达的影响*

李淑敏¹ 李文杰² 曾园山² 阮经文^{1,3}

摘要

目的:观察不同局部穴位电针对大鼠受损伤脊髓组织降钙素基因相关肽 CGRP 表达和分布的影响。

方法:将 25 只 SD 大鼠分为 5 组:正常对照组、脊髓损伤组、非穴位电针组、夹脊穴电针组和督脉穴电针组。在显微镜下予脊髓全横断术(正常对照组除外),自术后第 7 天分别采用局部选取电针非穴位、电针夹脊穴和电针督脉穴的方法治疗 3d(脊髓损伤组不予任何治疗),取材并以免疫荧光组织化学染色的方法观察脊髓背角 CGRP 阳性染色区面积变化,用蛋白免疫印迹杂交法检测脊髓 CGRP 含量变化。

结果:非穴位电针组和夹脊穴电针组的脊髓背角 CGRP 含量与脊髓损伤组比较,均有所升高($P<0.05$),但其 CGRP 阳性染色区面积没有明显差异($P>0.05$)。督脉穴电针组的脊髓背角 CGRP 含量和 CGRP 阳性染色区面积与非穴位电针组、夹脊穴电针组和脊髓损伤组比较,有明显增高、增大($P<0.05$)。

结论:不同局部穴位电针对大鼠受损伤脊髓组织表达 CGRP 有不同的影响,其中督脉穴电针能够明显促进大鼠受损伤脊髓组织表达 CGRP。

关键词 电针;督脉;脊髓损伤;降钙素基因相关肽

中图分类号:R651.2, R245 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2010)-09-0823-05

Effects of different local points of electroacupuncture on the expression of calcitonin gene-related peptide in rats with spinal cord injury/LI Shumin, LI Wenjie, ZENG Yuanshan, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2010, 25(9): 823—827

Abstract

Objective: To observe the effects of electroacupuncture (EA) at different local points on the expression and distribution of calcitonin gene-related peptide(CGRP) in the rats with spinal cord injury(SCI).

Method: Twenty-five SD rats were divided into five groups: normal control group, SCI group, non-point area(npa)-EA group, Jiaji-point(Jiaji)-EA group and DU-meridian point(DUmp)-EA group. The SCI model was established by spinal cord transection under microscope. The treatment of npa-EA, Jiaji-EA and DUmp-EA were applied for 3 days from the 7th day after operation (SCI group no treatment). The spinal cord tissues were taken out and stained with immunofluorescence histochemistry technique to observe the changes of CGRP-positive area in spinal cord dorsal horn. The changes of contents of CGRP in spinal cord were detected by Western blot technique.

Result: Compared with SCI group, the contents of CGRP in npa-EA and Jiaji-EA groups were higher ($P<0.05$), but there was no statistically significant difference in CGRP-positive staining areas in spinal cord dorsal horn ($P>0.05$). In DUmp-EA group CGRP-positive staining areas in spinal cord dorsal horn were larger and contents of CGRP in spinal cord were higher than those in npa-EA group, Jiaji-EA group and SCI group($P<0.05$).

Conclusion: EA at different local points had different effect on the expression of CGRP in rats with SCI and

DOI10.3969/j.issn.1001-1242.2010.09.002

* 基金项目:广东省自然科学基金资助项目(C03050309);广东省中医药管理局科研基金(2007109)

1 中山大学附属第一医院针灸科,广州,510080; 2 中山大学中山医学院组织胚胎学教研室神经科学教研室; 3 通讯作者

作者简介:李淑敏,女,硕士研究生,住院医师; 收稿日期:2010-05-01

DUMP-EA can obviously promote the expression of CGRP in rats with SCI.

Author's address Dept. of Acu-moxibustion, the First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou, 510080

Key words electroacupuncture; DU meridian; ; spinal cord injury; calcitonin gene-related peptide

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)是神经系统的严重创伤性疾病之一,它所造成的伤残是严重且难以修复的,其并发症如呼吸衰竭与呼吸道感染、泌尿生殖系的感染和结石、压疮、体温失调等也严重影响了患者的生活质量。目前,尽管还没有一种方法能够完全治愈SCI所造成的后遗症^[1],但经过研究者几十年特别是近十年的努力,已探索出多种可行的改善SCI症状、促进其功能修复的方法,如皮质类固醇激素及神经营养因子的应用、生长抑制因子的封闭、电刺激治疗、外周神经移植、干细胞移植、基因治疗等。其中电刺激促进SCI后功能修复的作用已得到实验证实^[2],在临床研究中也已取得重大进步^[3],而将电刺激与细胞移植结合等多种治疗方式联合应用也受到研究者越来越多的重视^[4]。实际上,穴位与电刺激相结合的方法在针灸临床中早已得到普遍应用^[5-6],并取得了良好的治疗效果。同时,研究证实^[7],早期穴位电针治疗可以减少SCI继发性损伤,后期治疗则能降低并发症的发生率,从而有利于脊髓损伤的功能修复。问题是,这种结合所产生的疗效仅是电刺激的作用,而非针灸穴位的作用?为了验证穴位在SCI治疗中的作用,本课题组曾设立无电刺激因素的督脉穴艾灸组,其实验结果与督脉穴电针组无差异,显然穴位的治疗作用是毋庸置疑的。按照针灸处方原则,创伤性疾病的治疗应以局部取穴为主,SCI的局部选穴包括督脉穴、夹脊穴和局部阿是穴(或非穴位)。那么,这些不同局部穴位的治疗效果之间是否存在差异?为此,本研究试图借助局部选穴施行电针,观察局部非穴位、夹脊穴、督脉穴等不同局部穴位电针对大鼠受损伤脊髓组织CGRP表达和分布的影响,并探讨其临床意义。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

选用200—250g雌性Sprague Dowley(SD)大鼠25只,分为5组:①正常对照组(normal):不损伤,不治疗;②脊髓损伤组(spinal cord injury, SCI):行脊

髓全横断术后存活10d,不做任何治疗;③非穴位电针组(non-point-area electroacupuncture, npa-EA):自SCI术后第7天起,非穴位电针治疗3d;④夹脊穴电针组(Jiaji point electroacupuncture, Jiaji-EA):自SCI术后第7天起,夹脊穴电针治疗3d;⑤督脉穴电针组(Du meridian point-electroacupuncture, Dump-EA):自SCI术后第7天起,督脉穴电针治疗3d。非穴位电针组、夹脊穴电针组和督脉穴电针组针刺方法相同,取穴位置不同。各组存活时间均为10d。

1.2 大鼠全横断性SCI模型建立

实验大鼠经腹腔注射1%戊巴比妥钠(25—30mg/kg)麻醉后,固定于自制的手术台上,切开皮肤,暴露T8—T10,在手术显微镜下咬骨钳撬除T9椎板,暴露T10脊髓节段,快速全横断脊髓。术后腹腔注射青霉素(每日50000U/kg,连续3d),人工排尿至取材或恢复自主排尿功能。

1.3 治疗方法

1.3.1 取穴:非穴位电针组取距离脊髓损伤段上下端两个椎体的棘突间隙后正中线旁开约10—13mm处取穴;夹脊穴电针组取距离脊髓损伤段上下端两个椎体的棘突间隙后正中线旁开约3—4mm处取穴;督脉穴电针组取距离脊髓损伤段上下端两个椎体的棘突间隙(T7和T11棘突下方)处取穴。

1.3.2 操作:每处各刺入一枚毫针,进针深度为3—5mm(切勿刺入胸腹腔或椎管),连接G6805-2A低频电子脉冲治疗仪,疏密波,频率2Hz,强度15mV,20min/次。每天1次电针治疗,疗程为3d。

1.4 脊髓取材

动物处死后,置于冰盒上,撬开椎板,暴露脊髓,迅速取出T8—T12脊髓节段置于-70℃下保存。取T9—T11脊髓节段用于蛋白免疫印迹杂交法(Western blot, WB)检测,T8与T12用于免疫荧光组织化学检测。

1.5 免疫组化

冰冻切片后冰丙酮固定10min,0.01mol/L PBS

漂洗后,10%正常山羊血清在 37℃孵育 30min,甩去血清,降钙素基因相关肽 (calcitonin gene-related peptide, CGRP)一抗 4℃过夜。弃一抗,PBS 漂洗后加入二抗,37℃孵育 1h。弃二抗,PBS 漂洗后 60%甘油封片。以 PBS 代替一抗作为阴性对照。脊髓背角 CGRP 免疫阳性反应区占脊髓背侧 1/2 面积的比率,采用 ip 6.0 图像分析软件分析。

1.6 蛋白免疫印迹杂交法

分别裂解各组脊髓组织,考马斯亮蓝法测定蛋白质的浓度,按每个电泳孔道加入 25μg 蛋白混合样品。聚丙烯酰胺凝胶电泳:灌胶、制样、电泳、转膜,5%脱脂奶封闭 1h,加入一抗 4℃过夜,0.01mol/L PBS 漂洗 3 次,加入二抗,室温孵育 2h,PBS 漂洗 3 次,显色反应,暗室内曝光、显影、定影。

1.7 统计学分析

检测资料用均数±标准差表示,各样本均数比较采用 SPSS13.0 统计软件进行随机分组设计的单因素方差分析。

2 结果

不同局部穴位电针组在治疗 3d 后,分别与脊髓损伤组、督脉电针组和正常对照组比较,脊髓背角 CGRP 阳性染色区面积及其含量变化见表 1。

2.1 各组脊髓背角 CGRP 阳性染色区面积对比

与脊髓损伤组(图 1B)比较,非穴位电针组(图

1C)、夹脊电针组(图 1D)CGRP 阳性染色区面积有所增加,但差异无显著性意义(图 2, $P>0.05$);而正常对照组(图 1A)、电针督脉组(图 1E)CGRP 阳性染色区面积较脊髓损伤组(图 1B)明显增加,且差异有显著性意义(图 2, $P<0.05$)。此外,电针督脉组(图 1E)与正常对照组(图 1A)CGRP 阳性染色区面积相近,差异无显著性意义(图 2, $P>0.05$)。

2.2 各组脊髓背角 CGRP 含量的变化

脊髓损伤组的 CGRP 条带与正常对照组、非穴位、夹脊和督脉电针组相比,出现明显窄小变化(图 3A),其灰度比值的比较差异均具有显著性意义(图 3B, $P<0.05$);督脉电针组 CGRP 条带与非穴位和夹脊电针组相比,宽度显著增加,且其灰度比值的比较差异均具有显著性意义(图 3B, $P<0.05$)。此外,与正常对照组相比,督脉电针组 CGRP 条带的宽度无明显变化(图 3A),其灰度比值比较差异无显著性意义(图 3B, $P>0.05$)。

表 1 各组脊髓背角 CGRP 阳性染色区面积比率及其含量对比 ($\bar{x}\pm s$)

组别	面积	含量
SCI	0.034939±0.005161	0.668149±0.073298
npa-EA	0.043997±0.014126	0.857805±0.132414 ^{①③}
Jiaji-EA	0.044336±0.009537	0.906058±0.140711 ^{①③}
Dump-EA	0.058581±0.006941 ^①	1.579893±0.159371 ^②
正常	0.058236±0.007044 ^①	1.527093±0.095643 ^②

与脊髓损伤组比较:① $P<0.05$,② $P<0.01$;与督脉电针组比较:③ $P<0.05$ 。

图 1 各组脊髓背角 CGRP 阳性染色区面积

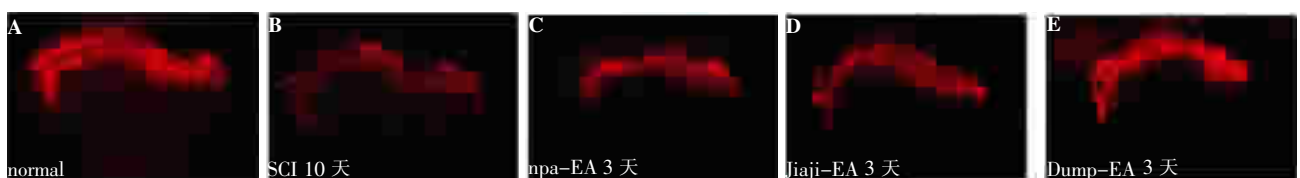
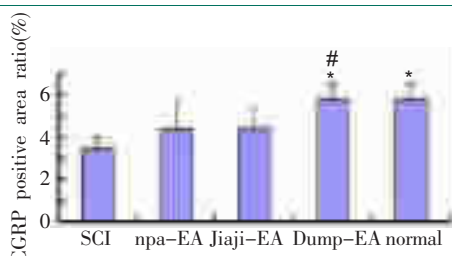


图 2 各组脊髓背角 CGRP 阳性染色区面积比率对比

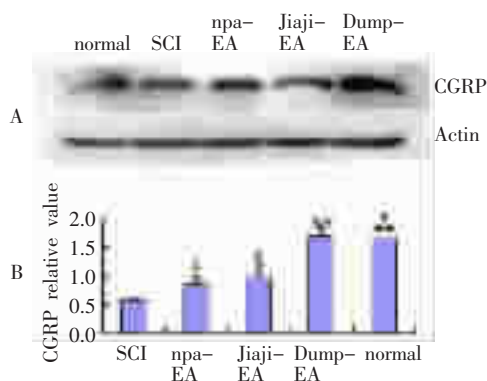


与脊髓损伤组比较,* $P<0.05$;与正常对照组比较,# $P>0.05$

3 讨论

CGRP 即降钙素基因相关肽,广泛分布于脑内及与体表感觉有关的脊髓背角和初级传入纤维,特别是感觉神经元的胞体和末梢内^[8]。而 CGRP 神经纤维的分布则几乎见于整个中枢神经系统,尤其在脊髓后角,CGRP 纤维密集成网,主要分布在 I、II、III、IV 层和 Lissauer 束。这种分布形式在人、大鼠、小鼠、猫、马等动物是一致的。据研究推测,CGRP 表达

图3 各组脊髓背角 CGRP 含量对比



注:与脊髓损伤组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与督脉电针组比较: & $P < 0.05$, # $P > 0.05$

的变化可能与神经损伤和再生修复相关^[9]。单独应用 CGRP 或联合神经营养因子,对鼠神经的缺血性损伤具有保护作用,且二者之间有协同效应^[10]。我们的前期研究发现^[11-12],督脉电针能够促进 CGRP 的表达,从而有助于 SCI 的修复。从传统医学的角度分析,督脉电针是以毫针与电刺激相结合作用于督脉相应腧穴部位,以达到通经活络、行气止痛的疗效,进而促进 SCI 的修复。那么,非穴位电针能否促进 CGRP 的表达?不同穴位电针对 CGRP 表达和分布的影响是否存在差异?

本实验数据显示,脊髓全横断术后,脊髓背角 CGRP 阳性染色区面积及其含量较正常对照组明显减少($P < 0.01$);经非穴位电针或夹脊电针治疗后脊髓背角 CGRP 含量较脊髓损伤组有所增加($P < 0.05$),其阳性染色区面积也有增加趋势,但差异无显著性意义($P > 0.05$);督脉电针治疗后,脊髓背角 CGRP 阳性染色区面积及其含量较脊髓损伤组显著增加($P < 0.01$);督脉电针组与非穴位电针组、督脉电针组与夹脊电针组 CGRP 阳性染色区面积及其含量之间的差异有显著性意义($P < 0.05$);督脉电针组与正常对照组 CGRP 阳性染色区面积及其含量之间的差异无显著性意义($P > 0.05$)。以上数据表明,非穴位电针、夹脊电针治疗均有促进脊髓背角 CGRP 的表达和分布的趋势,督脉电针治疗则可以明显促进脊髓背角 CGRP 的表达和分布,并使其接近正常水平,从而有助于脊髓损伤的修复。电针督脉对脊髓背角 CGRP 表达和分布的促进作用明显优于非穴位电针和夹脊电针。

针灸处方的选穴原则包括近部取穴和远部取穴,即局部选穴与经络选穴。本实验中的夹脊穴、非穴位组均为局部选穴,而督脉穴组既是局部选穴,又是经络选穴。据实验结果推测,不同局部穴位电针对 SCI 的治疗效果不尽相同,其中可能以督脉经穴电针的治疗效果最显著。按照针灸处方原则,SCI 的治疗应以局部取穴为主,而督脉循行部位与脊髓所在部位完全重叠,也就是说督脉经穴是局部选穴中最贴近损伤部位的。夹脊穴和局部非穴位也在脊髓附近,但不如督脉经穴更接近损伤处。另外,作为经穴的督脉穴的作用优于非经穴的夹脊穴,也证明了经络的特殊治疗作用。

因此,在针灸临床实践中,我们可以采用以督脉穴为主、夹脊穴及局部阿是穴为辅或间或使用夹脊穴的治疗方案,以避免长期针刺督脉穴与夹脊穴可能引起的穴位疲劳现象^[13-14],达到事半功倍的效果。

另外,在本实验中,蛋白免疫印迹杂交法 WB 与免疫组化检测结果不完全相同,但其总的趋势是一致的。究其原因可能有以下几个方面:首先,取材部位不同。WB 的取材部位为以损伤处为中心上下各一个脊髓阶段,而免疫组化的取材部位为损伤处远端上下各一个脊髓阶段,WB 所取脊髓阶段更靠近损伤部位,更能反映损伤脊髓组织中 CGRP 的变化。其次,WB 是定量分析,而免疫组化只是定性的观察神经元分布范围。再次,量效关系。本实验中仅电针治疗 3d,夹脊穴与非穴位电针组免疫组化阳性染色区面积相对于损伤组有增加趋势,但差异无显著性意义。鉴于针灸治疗效应启动慢而持续时间久的特点^[15-16],那么,它们之间的差异是否会随着治疗时间的延长而更显著呢?结论如何有待进一步验证。

参考文献

- [1] Ragnarsson KT. Functional electrical stimulation after spinal cord injury: current use, therapeutic effects and future directions[J]. Spinal Cord, 2008, 46: 255—274.
- [2] 徐江,王熠钊,黄晓琳,等.硬膜外脊髓电刺激结合减重跑台训练对脊髓损伤大鼠运动功能的影响[J]. 中华物理医学与康复杂志, 2008,30(7):437—440.
- [3] 杨幸华,燕铁斌,彭树秀,等.盆底肌电刺激用于治疗脊髓损伤患者神经源性膀胱的观察[J]. 中国康复医学杂志,2009,24(8):715—718.
- [4] 何丽娜,袁章,陈炜,等.电刺激治疗脊髓损伤的实验及临床研究进



- 展[J].中国康复理论与实践,2009,15(8):720—722.
- [5] 刘志顺,王晶.电针治疗脊髓源性逼尿肌活动过度尿失禁的疗效观察[J].中国康复医学杂志,2009,24(1):79—80.
- [6] 陈丽贤,段俊峰,詹欣荣,等.电针结合耳针治疗急性脊髓损伤的临床研究[J].中国康复理论与实践,2005,11(11):934—935.
- [7] 牛晓梅,刘智斌,牛文民,等.督脉、夹脊电针治疗急性脊髓损伤实验研究进展分析[J].陕西中医学院学报,2009,32(3):53—56.
- [8] Ma W, Chabot JG, Powell KJ, et al. Localization and modulation of calcitonin gene-related peptide-receptor component protein-immunoreactive cells in the rat central and peripheral nervous systems[J].Neuroscience, 2003, 120(3):677—694.
- [9] Chen LJ, Wang PJ, Li F, et al. Calcitonin gene-related peptide in anterior and posterior horns of spinal cord after brachial plexus injury[J].Neural Regen Res, 2007, 2(4): 211—216.
- [10] Jin DC, Wang TM, Fang XB. The effect of calcitonin gene related peptide and nerve growth factor on the expression of caspase-3 protein in striate cortex of rats with transient global cerebral ischemia/reperfusion [J].Shen jing Jie pou xue Za zhi, 2004, 20(3):296—300.
- [11] Ding Y, Yan Q, Ruan JW, et al. Electro-acupuncture promotes survival, differentiation of the bone marrow mesenchymal stem cells as well as functional recovery in the spinal cord-transected rats[J].BMC Neurosci, 2009, 10: 35.
- [12] Yan Q, Ruan J W, Ding Y, et al. Electro-acupuncture promotes differentiation of mesenchymal stem cells, regeneration of nerve fibers and partial functional recovery after spinal cord injury [J].Exp and Toxicol Pathol, 2009, [Epub ahead of print].
- [13] 王竹行,高跃华,赵鸿鸣,等.脉痹针刺镇痛临床观察[J].中国针灸,1996,(8):14—16.
- [14] Chen XH, Han JS. Analgesia induced by electroacupuncture of different frequencies is mediated by different types of opioid receptors: another cross-tolerance study[J]. Behav Brain Res, 1992, 47:143—149.
- [15] 潘朝宠,沈德凯,金文秀,等.穴位针感与神经肽相关的研究[J].皖南医学院学报,1993,12(2):82—85.
- [16] 马勤耘,潘朝宠,汪克明,等.经线——脏腑联系途径与神经肽类物质相关的研究[J].针刺研究,2000,25(2):117—120.

全国神经肌肉电刺激临床应用研讨会暨第三期临床应用推广学习提高班通知

国家级医学继续教育项目【2010-16-00-070(国)】

神经肌肉电刺激是近年来发展比较快的一种实用型治疗新技术,使用方便、疗效可靠,在治疗脑和脊髓损伤后的吞咽障碍、肢体瘫痪、尿失禁等方面具有良好的社会效益和经济效益。我科经过长期的临床实践,在神经肌肉电刺激临床应用和理论方面总结出一套成功的经验。为推广神经肌肉电刺激临床应用,使广大临床医务工作者全面了解神经肌肉电刺激的临床应用,现定于2010年11月26—29日在广州举办全国神经肌肉临床应用研讨会暨第三期临床应用推广学习提高班。研讨会将邀请临床应用神经肌肉电刺激具有丰富经验的境外及国内专家主讲,学习班采取系统理论讲授和现场示范操作的方法,详细介绍神经肌肉电刺激的理论知识和临床应用,学习班结束后学员将获得国家级继续医学教育Ⅰ类学分8分。现通知如下:

研讨会及学习班内容:专题讲座:①神经肌肉电刺激的电学基础;②痛症的评估及神经肌肉电刺激治疗;③吞咽障碍的评估及神经肌肉电刺激治疗;④偏瘫肢体瘫痪评估及神经肌肉电刺激治疗;⑤上肢康复机器人与功能性电刺激在脑卒中的应用;⑥脊髓损伤后尿失禁的评估及神经肌肉电刺激的应用;⑦脊髓损伤后肢体瘫痪评估及神经肌肉电刺激治疗;⑧神经肌肉电刺激在儿童脑瘫中的应用;⑨神经肌肉电刺激的基础研究;⑩康复机器人与虚拟现实技术在康复医学中的应用。操作和演示:①现场操作示范(吞咽、尿失禁、肢体电刺激分3组实习);②各种电刺激设备演示。

参加对象:康复科、神经科、骨科、儿科等相关科室专业医护人员。**报到时间:**2010年11月26日9:00—18:00。**报到地点:**广州市沿江西路113号爱群大厦(次日报到地点在上课会场),总台电话:020-81866668,81038220。**上课时间:**2010年11月27—28日。**上课地点:**中山大学孙逸仙纪念医院岭南楼26楼海珠厅。**收费标准:**学费800元(含资料费、证书费、实习费),食宿由会务组统一安排,费用自理。**报名办法:**请于2010年11月12日前电邮至:liminhua06@126.com 或传真:020-81332880。有关学习班回执也可从中山大学孙逸仙医院康复医学科网站新闻动态栏目中下载(www.gdrehab.com)。联系人:林老师,电话/传真 20-81332880。