

·基础研究·

经皮电刺激对大鼠脊髓损伤后白细胞介素-1 α 、肿瘤坏死因子- α 表达变化的影响*

杨彪¹ 李红军¹ 李俊岑¹ 刘曾平¹ 刘川宁¹ 杨拯² 张晓^{2,3}

摘要

目的:探究经皮电刺激对大鼠脊髓损伤后白细胞介素-1 α (IL-1 α)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 表达变化的影响及意义。

方法:48只SD大鼠,随机分为对照组、电刺激组,采用改良Allen脊髓损伤打击模型,术后不同时间点采用BBB评分进行行为功能评估,用病理学和免疫组织化学方法定位、定性的检测对照组、电刺激组的损伤段脊髓组织中IL-1 α 、TNF- α 的变化情况。

结果:BBB评分显示,术后第1—3天,对照组及电刺激组BBB评分值均为0—1分,电刺激组在损伤后第5天及第7天时BBB评分值与对照组相应时间点比较,组间差异明显($P<0.05$);免疫组织化学显示,损伤后第1—7天,两组IL-1 α 、TNF- α 免疫反应阳性神经元数目和平均积分光密度值强度呈递增趋势,且于第7天时达峰值,进一步分析得出,电刺激组IL-1 α 、TNF- α 免疫反应阳性神经元数目及平均积分光密度值强度均明显低于对照组($P<0.05$)。

结论:经皮电刺激可抑制脊髓损伤后IL-1 α 、TNF- α 表达,减轻脊髓继发性炎症反应,促进功能恢复。

关键词 脊髓损伤;经皮电刺激;白细胞介素-1 α ;肿瘤坏死因子- α

中图分类号:R493 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-1242(2012)-08-0738-03

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)是因各种因素致中枢神经系统的损害,可造成损伤平面以下感觉、运动功能丧失,改善和促进运动功能恢复是SCI患者康复治疗的首要目标^[1]。目前电刺激已成为临床SCI康复治疗的有效手段,Kapadia NM等^[2]认为,电刺激可“启动”早期SCI的神经肌肉系统,促进神经恢复;Gater DR等^[3]指出,电刺激调节膀胱或肠括约肌收缩。但关于经皮电刺激在减轻继发性SCI方面的报道很少,尤其是白细胞介素-1 α (interleukin-1-alpha, IL-1 α)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor-alpha, TNF- α) 在活体内表达部位和时间差异未完全明确。因此,本研究应用组织病理学及免疫组化标记方法检测大鼠SCI后脊髓内IL-1 α 、TNF- α 表达变化,探究经皮电刺激对脊髓继发性损伤作用的机制,为临床治疗SCI提供参考资料。现报道如下:

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

SD大鼠64只,体重200—300g,随机分为对照组、电刺激组,每组32只。

1.2 方法

1.2.1 模型制备:用Allen打击法制作急性SCI模型。主要操作:3%戊巴比妥钠麻醉,背部剪毛,常规消毒,切开皮肤,剥离肌肉,暴露及咬除T9棘突及椎板,显露T9脊髓,用10g金属棒从25mm高处垂直落下,正中打击T9制作急性SCI模型。

1.2.2 行为功能评估:采用BBB运动功能评分(Basso, Beattie and Bresnahan locomotor rating scale, BBB scale)^[4]。将大鼠后肢运动分为22个等级^[5],后肢全瘫为0分,完全正常为21分,两者之间根据功能分别定为1—20分。

1.2.3 干预:采用SDZ-IV型电刺激仪行经皮电刺激治疗。参数设置:刺激时间30min,频率10Hz,电流3mA,波形为疏密波,电压以刺激患肢有肌收缩为准,正极电极夹夹于大鼠T9棘突下后正中线右侧旁开约2cm处皮肤,负极电极夹夹于右膝关节后外侧、腓骨小头下方约5mm处皮肤,按上述方法刺激治疗。

1.2.4 免疫组织化学染色:切片用二甲苯脱蜡,各级乙醇至水洗,采用高压修复抗原2—3min,滴加3% H₂O₂,室温孵育10min;用蒸馏水冲洗,山羊血清封闭,室温孵育10min,用IL-1 α 抗体和TNF- α 抗体标记,37℃孵育1h,PBS冲洗,滴

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2012.08.011

*基金项目:四川省科技厅课题(06J13-023);成都医学院创新实验项目(CX2010021)

1 成都医学院,成都,610083; 2 成都医学院实验技术教研室; 3 通讯作者

作者简介:杨彪,男,在读学生; 收稿日期:2011-09-09

加羊抗兔二抗,37℃孵育40min,PBS冲洗,滴加DAB-H₂O₂显色充分,PBS冲洗,苏木素复染,梯度酒精逐级脱水,二甲苯透明,中性树脂封片。

1.3 图像采集及统计学分析

用OLYMPUS数码照相机采集图像,计数两组IL-1α、TNF-α阳性细胞数,测量阳性产物积分光密度值;阳性细胞数和积分光密度值数据以均数±标准差表示,用方差分析LSD法比较。

2 结果

2.1 BBB评分结果

术前所有大鼠BBB评分值为21分,术后第1—3天,两组均为0—1分,于第3—7天,两组恢复幅度加大,且电刺激组更明显,且电刺激组在术后第5、第7天时与对照组比较有显

著差异($P < 0.05$)。见表1。

表1 术后两组大鼠BBB评分值比较 ($\bar{x} \pm s, n=6$)				
组别	术后第1天	术后第3天	术后第5天	术后第7天
对照组	0.01 ± 0.21	0.33 ± 0.73	1.14 ± 1.35 ^①	2.33 ± 2.29 ^①
电刺激组	0.09 ± 0.38	0.67 ± 1.49	3.71 ± 4.52 ^①	6.75 ± 5.50 ^①

电刺激组与对照组比较:① $P < 0.05$

2.2 白细胞介素-1α变化

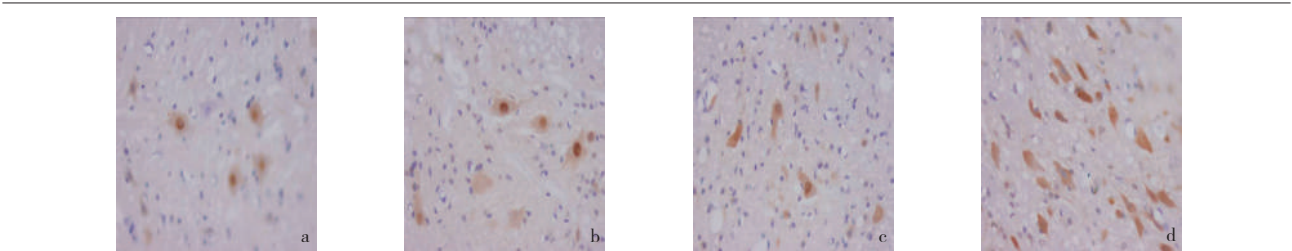
两组IL-1α免疫阳性神经元主要分布于脊髓前角和损伤处,周围伴中性粒细胞浸润;术后第1—7天两组IL-1α免疫阳性神经元数量及平均积分光密度值呈递增趋势,至第7天时达峰值;进一步分析发现,在损伤后第5、第7天时,电刺激组IL-1α阳性细胞数及平均积分光密度值均明显低于对照组($P < 0.05$)。见表2,图1—2。

2.3 肿瘤坏死因子-α变化

表2 术后两组大鼠IL-1α阳性神经元数及平均积分光密度值 ($\bar{x} \pm s, n=6$)								
组别	阳性神经元数				平均积分光密度值			
	术后第1天	术后第3天	术后第5天	术后第7天	术后第1天	术后第3天	术后第5天	术后第7天
对照组	11.50 ± 1.05	12.17 ± 0.75	12.00 ± 1.10 ^①	18.80 ± 0.89 ^①	1.68 ± 0.13	2.88 ± 0.49	4.24 ± 0.42 ^①	4.82 ± 0.92 ^①
电刺激组	3.17 ± 1.17	8.83 ± 1.17	9.00 ± 1.10 ^①	15.00 ± 0.89 ^①	0.98 ± 0.15	1.84 ± 0.21	2.36 ± 0.21 ^①	3.48 ± 0.31 ^①

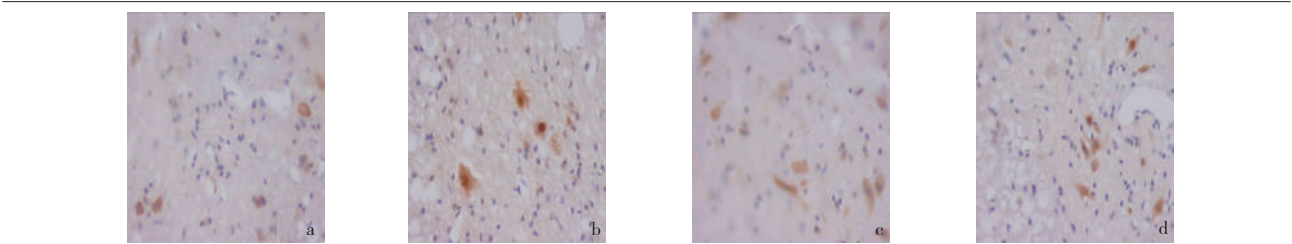
电刺激组与对照组比较:① $P < 0.05$

图1 术后1、3、5、7d时对照组大鼠T9脊髓节段前角及损伤区IL-1α免疫反应阳性物表达 (免疫组化, ×400)



注:a、b、c、d分别代表术后第1、3、5、7天时

图2 术后第1、3、5、7天时电刺激组大鼠T9脊髓节段前角及损伤区IL-1α免疫反应阳性物表达 (免疫组化, ×400)



注:a、b、c、d分别代表术后第1、3、5、7天时

两组大鼠脊髓损伤部位均存在TNF-α免疫阳性神经元,伴大量中性粒细胞浸润;SCI后第1—7天,随着时间的推移,上述两组TNF-α免疫反应阳性神经元数目及免疫阳性积分光密度值强度呈递增趋势,于第7天时达峰值,且电刺激组TNF-α阳性神经元数目及平均积分光密度在损伤后第5、第7天时均明显低于对照组($P < 0.05$)。见表3,图3—4。

3 讨论

目前SCI治疗关键在于减轻脊髓炎症反应,促进运动功能恢复。相关研究发现,在SCI早期,脊髓组织出现炎性水肿、变性等^[6]。因此,如何有效减轻炎症反应对SCI康复治疗具有重要意义。

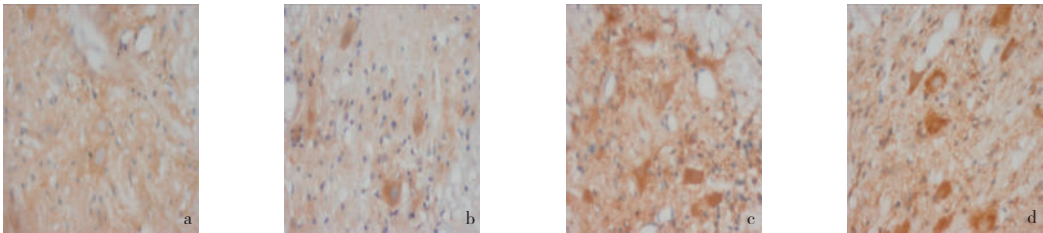
IL-1α属于IL-1家族,过量的IL-1α也可介导病原微生

表3 术后两组大鼠 TNF-α阳性神经元数及平均积分光密度值 (x̄±s,n=6)

组别	阳性神经元数				平均积分光密度值			
	术后第1天	术后第3天	术后第5天	术后第7天	术后第1天	术后第3天	术后第5天	术后第7天
对照组	4.17±0.75	7.00±0.89	11.33±1.21 ^①	16.17±1.47 ^①	5.04±2.16	6.55±0.39	7.69±0.12 ^①	8.85±1.46 ^①
电刺激组	3.67±1.03	4.50±1.05	7.00±0.89 ^①	8.83±0.75 ^①	2.50±0.62	2.93±0.17	3.33±0.15 ^①	4.28±1.21 ^①

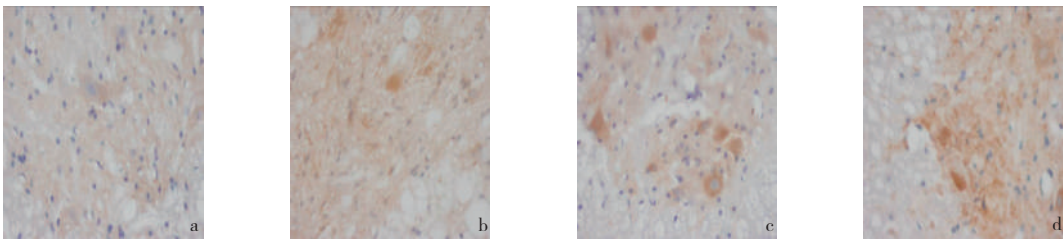
电刺激组与对照组比较:①P<0.05

图3 术后第1、3、5、7天时对照组大鼠 T9脊髓节段损伤区 TNF-α免疫反应阳性物表达 (免疫组化, ×400)



注:a、b、c、d分别代表术后第1、3、5、7天时

图4 术后第1、3、5、7天时电刺激组大鼠 T9脊髓节段损伤区 TNF-α免疫反应阳性物表达 (免疫组化, ×400)



注:a、b、c、d分别代表术后第1、3、5、7天时

物入侵、炎症发生、机体发热、组织损伤的发生。锁志刚等^[7]认为,IL-1 局限表达在损伤区及其邻近组织;李想等^[8]研究表明,IL-1 β 呈单峰表达,于损伤后 12h 达到峰值,直到第 7 天仍高于对照组。本研究表明,术后第 1—7 天,两组 IL-1 α 免疫阳性表达持续增加,至第 7 天时达峰值,提示 IL-1 α 可能是参与 SCI 早期的细胞因子;进一步分析发现,损伤后第 5、第 7 天时,电刺激组 IL-1 α 明显低于对照组(P<0.05),这种差异可能是由于经皮电刺激抑制了大鼠的免疫系统如巨噬细胞,减少了 IL-1 α 的释放,减轻炎症反应。相关研究表明,IL-1 由激活的巨噬细胞和其他细胞释放,可通过调节 CRF 因子释放,进而发挥激活 HPA 轴的作用^[9]。TNF 是一种多效性细胞因子,可促进炎症反应,导致水肿、炎症反应和缺血缺氧的恶性循环^[10]。赵彦平^[11]发现,SCI 后第 1 天 TNF-α 仅表达上调,脊髓灰质内含大量 TNF-α,于第 3 天到达高峰,至第 7 天仍高于正常水平;吕志刚等^[12]发现,TNF-α 于 SCI 后第 6 小时迅速升高,至第 24 小时接近于基础水平;第 3 天上升至第二个峰值,至第 5 天有所下降,但仍高于正常水平;本研究发现,SCI 后第 1—7 天,TNF-α 免疫反应阳性表达呈递增趋势,且于第 7 天时到峰值。本研究还得出,电刺激组 TNF-α 在损伤后第 5、第 7 天时均明显低于对照组(P<0.05),这可能

是经皮电刺激抑制细胞—单核巨噬细胞的活性,减少 TNF-α 的产生和释放,进而削弱 TNF-α 增多导致炎症连锁反应。一些研究发现,苗巍巍等^[13]认为在脑缺血再灌注损伤过程中,TNF-α 能够刺激血管内皮细胞表达黏附分子,介导白细胞与血管内皮细胞的黏附,促进白细胞在缺血区的聚集和浸润,造成微循环的阻塞,引起病变组织无复流,同时聚集浸润的白细胞还可释放大量的细胞毒素如氧自由基、蛋白水解酶等,导致缺血的组织进一步损伤。上述研究结果差异可能是由于实验方法及干预不同所致。

综上所述,本研究表明,对 SCI 模型大鼠给予经皮电刺激治疗,可抑制损伤脊髓的 IL-1 α、TNF-α 表达,减轻炎症反应,对运动功能恢复有一定的作用和意义。

参考文献

[1] 丁晓晶,王红星,王彤.脊髓损伤大鼠运动训练方式的研究进展[J].中国康复医学杂志,2010,25(6):589.
[2] Kapadia NM, Zivanovic V, Furlan JC, et al. Functional electrical stimulation therapy for grasping in traumatic incomplete spinal cord injury: randomized control trial[J]. Artificial Organs, 2011, 35(3):212—216.
[3] Gater DR Jr, Dolbow D, Tsui B, et al. Functional electrical

(下转第 743 页)