

不同波形电针对脊髓损伤大鼠运动功能恢复的影响*

张尧¹ 邱有波¹ 杨拯^{2,5} 李禹呈¹ 谢少华¹ 龚都³ 曹德琦⁴ 江明礼⁴ 梁楠² 张晓²

摘要

目的:比较不同波形电针对脊髓损伤大鼠运动功能恢复的影响,并初步探讨相应机制。

方法:将48只健康成年大鼠均制成T9水平脊髓损伤模型,随机分为疏密波电针组(A组)、连续波电针组(B组)、断续波电针组(C组)、造模组(D组)4组,每组12只。于术后第1天、第3天、第7天对各组大鼠进行后肢功能的BBB评分、斜板试验、血清中丙二醛(MDA)含量和超氧化物歧化酶(SOD)活性测定。

结果:大鼠脊髓损伤后第1天,A、C组BBB评分优于造模组($P < 0.05$),斜板试验角度A组优于造模组($P < 0.05$)和C组($P < 0.01$);第3天,BBB评分A、B、C组优于造模组($P < 0.05$),斜板试验角度A组显著优于造模组($P < 0.05$);第7天,BBB评分A、B、C组优于造模组($P < 0.05$),斜板试验角度A、B、C组均优于造模组($P < 0.05$),其余两组间比较无显著性差异。大鼠脊髓损伤后第1天,SOD活性A、B、C组较造模组明显增高($P < 0.05$),MDA含量较造模组显著降低($P < 0.01$);第3天,A、B、C组较造模组SOD活性显著升高($P < 0.05$),A组明显高于C组($P < 0.05$),A、B、C组MDA含量低于造模组($P < 0.05$);第7天,A、B、C组SOD活性优于造模组($P < 0.05$),MDA含量低于造模组($P < 0.05$),其余两组间比较无显著性差异。

结论:三种波形电针对于脊髓损伤大鼠运动功能的恢复均具有促进作用,其中疏密波能明显通过促进脊髓损伤大鼠神经的再生和修复,加快自由基的清除,加强血液循环,减少脊髓损伤的继发损伤等方面促进脊髓损伤大鼠运动功能的恢复。

关键词 脊髓损伤;电针;疏密波;连续波;断续波

中图分类号:R744, R246 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2012)-12-1097-05

The effect of electroacupuncture with different waveforms on the motor function recovery of spinal cord injury rats/ZHANG Yao, QIU Youbo, YANG Zheng, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2012,27(12): 1097—1101

Abstract

Objective: To investigate the effects of electroacupuncture(EA) with different waveforms on motor function recovery in rats with spinal cord injury(SCI), and explore its' corresponding mechanism.

Method: Forty-eight healthy adult rats were produced SCI model at T9 level and randomly divided into 4 groups: loose-dense wave EA group (group A), continuous wave EA group (group B), intermittent wave EA group (C group), model group (group D), each group with 12 rats (including male and female). At the 1st d, 3rd d, 7th d post operation BBB scores of hind limb function, tilted plane test, content of serum malondialdehyde (MDA), and activity of superoxide dismutase (SOD) were measured.

Result: At the 1st d after SCI BBB scores in group A and group C were better than that in group D($P < 0.05$); the angle of tilted plane test in group A was higher than that in group D($P < 0.05$) and group C ($P < 0.01$); at the 3rd d after SCI BBB scores in groups A, B, C were better than that in group D($P < 0.05$), the angle of tilted plane test in group A was significantly higher than that in group D($P < 0.05$); at the 7th d BBB scores in groups

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2012.12.003

*基金项目:成都医学院创新性实验项目资助(CX2010036)

1 成都医学院临床医学系,成都,610081; 2 成都医学院基础医学院实验技术教研室; 3 成都医学院药物制剂系; 4 成都医学院检验医学系; 5 通讯作者

作者简介:张尧,男,本科生; 收稿日期:2012-03-02

A, B, C were better than that in group D($P < 0.05$), the angle of tilted plane test in groups A, B and C were higher than that in group D($P < 0.05$), the other two groups showed no significant difference. At the 1st d after SCI SOD activity in groups A, B, C compared with group D was significantly higher ($P < 0.05$), MDA content compared with group D was significantly lower ($P < 0.01$); at the 3rd d in groups A, B, C compared with group D SOD activity elevated significantly($P < 0.05$), that in group A was significantly higher than that in group C ($P < 0.05$), MDA contents in groups A, B, C were lower than that in group D($P < 0.05$); at the 7th d SOD activity in group A, B, C were better than that in group D($P < 0.05$), MDA content were lower than that in group D($P < 0.05$), the other two groups showed no significant difference.

Conclusion: This study showed that EA with three kinds of waveforms could promote the recovery of motor function in SCI rats. EA with loose-dense wave can significantly promote nerve regeneration and repair of SCI rats, speed up the removal of free radicals, enhance blood circulation, reduce the secondary injury of SCI to promote the recovery of motor function significantly.

Author's address Clinical Medicine College, Chengdu Medical College, Chengdu, 610081

Key word spinal cord injury; electroacupuncture; loose-dense wave; continuous wave; intermittent wave

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)所造成的外伤性截瘫是最严重的外伤之一。严重影响患者的生存质量,并给家庭造成沉重的经济负担。据有关资料显示,全世界范围内SCI的发病率大约20—40例/100万人/年^[1]。随着工伤与交通事故的增加,临床上脊柱外伤合并SCI的病例有逐年增多的趋势。因此,SCI的病理生理的实验研究及治疗方法的探索受到了更广泛的关注。有研究表明,继发损伤是造成脊髓损伤严重程度的重要因素之一,氧自由基与脊髓损伤后的继发损伤关系密切。研究发现^[2],氧自由基是含有丰富脂质的脊髓组织膜损伤后产生和释放的,它可作用于细胞膜上的多不饱和脂肪酸,造成细胞膜通透性改变,致使溶酶体崩解、溶酶外溢而导致细胞坏死,从而造成脊髓损伤的继发性损害。丙二醛(malondialdehyde, MDA)作为氧自由基生物膜不饱和脂肪酸发生脂质过氧化反应的最终产物,可间接反映脊髓组织中氧自由基含量^[3]。超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)是细胞内主要的抗氧化酶和自由基清除剂,通过抗氧化及清除自由基,对损伤的组织细胞起到保护作用。大量的临床实验表明,电针对于脊髓损伤有一定的疗效。但并没有针对不同波形电针对脊髓损伤疗效的研究,也不清楚在相同条件下,各不同波形电针对于脊髓损伤疗效的差异。本实验通过不同波形电针对于脊髓损伤的治疗,观察不同波形电针对脊髓损伤疗效的差异,为临床上脊髓损伤的治疗提供新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

选用体重(200 ± 20)g的清洁健康成年SD大鼠48只,不计雌雄,由四川大学实验动物中心提供,许可证号:SCXK(川)-10-2006。将48只大鼠按随机数表法随机分为疏密波电针组(A组)、连续波电针组(B组)、断续波电针组(C组)、造模组(D组),每组12只。每组按术后第1天、术后第3天、术后第7天分成三个亚组,每个时间点4只。

1.2 试剂和仪器

1.2.1 主要试剂。丙二醛(MDA)试剂盒:南京建成生物工程研究所,批号:20100719;超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒:南京建成生物工程研究所,批号:20100719;戊巴比妥钠(德国进口分装):北京化学试剂公司,批号:090205;注射用青霉素钠:石药集团中诺药业(石家庄)有限公司产品,批号:09119209;氯化钠注射液:安徽双鹤药业有限责任公司,批号:1001021E。

1.2.2 所用仪器。SDZ-IV型电针治疗仪:苏州医疗用品厂有限公司;721E型可见分光光度计:上海光谱仪器有限公司;台式离心机:上海安亭科学仪器厂;自制数字式脊髓损伤动物模型制备仪。

1.3 模型的制备

实验前选取正常SD大鼠,术前对所选大鼠进行常规行为能力测试,以确定在脊髓损伤造模前大鼠的运动功能正常。用1.5%戊巴比妥钠(30mg/kg体重)经腹腔麻醉,麻醉后将大鼠俯卧(采用五点法)固

定于自制手术台上,背部去毛,碘伏常规消毒,铺上纱布。在无菌条件下,初步定位T9,再沿正中线切开大鼠背部皮肤(切口约1.5cm)。根据大鼠解剖图谱,先找出最突出的T11、T12的棘突,明确T9的具体位置后,用手术刀沿紧靠棘突的两边切开背部肌肉,然后小心切开并去除T9椎骨上的肌肉。随后行椎板切除术,用有齿镊剥离T9棘突和椎间软组织,然后用无齿镊慢慢剥开椎板(切勿损伤硬脊膜),暴露脊髓,并适当修剪两侧椎板以获得良好显露,用自制数字式脊髓损伤动物模型制备仪打击器打击T9段脊髓制成脊髓损伤模型(Allen法),打击强度为 $10\text{g} \times 25\text{mm}$,打击后即刻见大鼠双后肢发生不同程度抽动、摆尾,随后完全松弛,标志模型制备成功。造模成功后,常规消毒,并逐层缝合切口。由于手术过程中不可避免地会有一定程度的出血,从而使大鼠血容量发生改变,因此术后各组立即按 9ml/kg 体重的量腹腔注射0.9%氯化钠注射液补液,并同时注射青霉素抗感染。待动物清醒后放回饲养笼中饲养,这段时间注意保持大鼠体温。术后大鼠自由进食、饮水,定时清洁笼具,更换垫料,保持适宜室温。每天挤压膀胱排尿3次,到膀胱功能恢复为止;术后每天腹腔注射青霉素 $8 \times 10^4\text{U}$,连续3d。

1.4 实验方法

电针组大鼠均采用固定状态下电针,于术后6h开始治疗,将大鼠俯卧,四肢及头部固定于自制鼠板上,选取损伤段上下2个椎体的“夹脊穴”作为电针穴位,正极接近头端,负极接近尾端,疏密波频率为10/50Hz,连续波、断续波频率均为50Hz,其中断续波间隔时间约1.5s。均留针20min,之后每天定时电针1次。A组给予疏密波电针治疗,B组给予连续波电针治疗,C组给予断续波电针治疗,电流0.5—1mA,以背部肌肉出现轻微抽动或尾巴摆动为度。造模组造模成功后,在电针组大鼠接受治疗时与电针组大鼠同时绑在鼠板上相同时间,但仅注射青霉素、0.9%氯化钠注射液1ml和5%葡萄糖注射液1ml,不给予任何治疗措施。

1.5 指标检测

1.5.1 后肢功能评价:4组实验动物均于术后第1天、第3天和第7天进行BBB评分和斜板试验,采用Basso报道的BBB评分法^[4]和Rivlin的斜板试验^[5]对

大鼠后肢的运动功能进行评价。为避免评分者主观因素的干扰,本研究所有评分人员均为熟悉本评分标准且又不清楚本实验目的人员。

1.5.2 血清中MDA和SOD测定。于术后第1天、第3天和第7天(每天4只)经右心室取血3ml后,立即3000r/min离心15min,取上清液,存于 -20°C 冰箱,1周内分析完毕。测定仪器为可见光分光光度计。SOD活性和MDA含量分别用SOD和MDA试剂盒测定,MDA按硫代巴比妥酸法测定,SOD采用黄嘌呤氧化酶法测定,操作方法按试剂盒说明进行^[6]。

1.6 统计学分析

实验结果采用SPSS 17.0统计软件进行处理,以均值 $\pm$ 标准差表示。组间两两比较采用SNK法(q 检验)。

2 结果

2.1 大鼠损伤后一般情况

大鼠苏醒后,表现为静卧少动,气息微弱而缓慢,双后肢感觉迟钝、肌力明显下降,运动功能基本丧失,无进食及进水需求,出现尿失禁或下腹部膨隆、尿潴留等不完全脊髓损伤的表现。6h后实验组大鼠后肢关节可出现轻微活动,能够自主饮水;对照组后肢无任何运动表现,有进水需求。造模后前3d,大鼠活动较少,进食少,尿潴留现象比较严重,伴血尿及腹部胀气。术后1周内所有大鼠均需人工排尿。实验过程中A组大鼠死亡1只,B组死亡2只,C组死亡2只,D组无死亡,总死亡率约10.4%,死亡原因未知,推测可能与严重的血尿、膀胱破裂、严重的腹水及多脏器衰竭有关。及时补充同批次实验动物,使每组实验动物的数量保持一致。

2.2 大鼠后肢运动功能评价

2.2.1 BBB评分。术前所有大鼠评分均为正常21分。术后第1天A、C组BBB评分高于造模组($P < 0.05$);第3天BBB评分A、B、C组均高于造模组($P < 0.05$);第7天BBB评分A、B、C组与造模组相比,BBB评分高于造模组($P < 0.05$)。见表1。

2.2.2 斜板试验。术后第1天斜板试验评分A组斜板试验临界角度高于造模组($P < 0.05$),A组斜板试验临界角度高于C组($P < 0.01$);术后第3天斜板试验评分A组斜板试验临界角度高于造模组($P <$

0.01),其他两组间相比无显著性差异;造模后第7天斜板试验评分A、B、C组斜板试验临界角度高于造模组($P < 0.01$),A组斜板试验临界角度高于其他治疗组($P < 0.05$)。可见,实验组与对照组相比对脊髓损伤大鼠运动功能的恢复疗效显著,其中A组疗效较其他组更为明显。见表2。

2.3 MDA和SOD的测量结果

2.3.1 SOD测定。术后第1天电针组SOD活性明显高于造模组($P < 0.05$);第3天A、B、C组SOD活性高于造模组($P < 0.05$),A组SOD活性明显高于C组($P < 0.05$),其余两组间比较无显著性差异;第7天A、B、C组SOD活性显著高于造模组($P < 0.05$)。说明电针组的脊髓损伤的保护作用明显优于D组,其中A组在第3天相对于其他实验组疗效更为显著。见表3。

2.3.2 MDA测定。术后第1天电针组与D组相比,MDA含量显著降低($P < 0.01$),电针组间无显著性差异;第3天A、B、C组与D组相比,MDA含量明显降低($P < 0.05$);第7天A、B、C组与D组相比,MDA含量明显降低($P < 0.05$),其余各组间两两比较无显著性差异。说明在不同电针波形对脊髓损伤运动功能疗效显著,以A组最为明显。见表4。

表1 脊髓损伤大鼠术后BBB评分结果 ($\bar{x} \pm s$)

组别	第1天	第3天	第7天
A组	0.59 ± 0.54^{①}	1.33 ± 0.79^{②}	6.47 ± 2.92^{②}
B组	0.36 ± 0.30	1.23 ± 0.68^{①}	5.48 ± 1.49^{①}
C组	0.52 ± 0.25^{①}	1.13 ± 0.31^{①}	5.70 ± 2.41^{①}
D组	0.16 ± 0.21	0.45 ± 0.52	2.63 ± 0.48

与D组比较:① $P < 0.05$;② $P < 0.01$

表2 脊髓损伤大鼠术后斜板试验评分结果 ($\bar{x} \pm s$)

组别	第1天	第3天	第7天
A组	32.25 ± 2.06^{①④}	35.02 ± 2.22^{②}	38.18 ± 2.44^{①③④}
B组	31.63 ± 1.85	33.33 ± 2.00	36.50 ± 1.19^{②}
C组	29.77 ± 2.40	31.60 ± 2.91	35.86 ± 1.36^{②}
D组	30.26 ± 1.09	32.20 ± 1.07	33.08 ± 1.09

与D组比较:① $P < 0.05$;② $P < 0.01$;与B组比较:③ $P < 0.05$;与C组比较:④ $P < 0.01$

表3 脊髓损伤大鼠术后SOD活性测定 ($\bar{x} \pm s$)

组别	第1天	第3天	第7天
A组	125.40 ± 6.09^{①}	151.18 ± 6.64^{①③}	157.82 ± 17.83^{①}
B组	126.33 ± 3.25^{①②}	137.22 ± 9.30^{①}	149.70 ± 1.85^{①}
C组	112.63 ± 16.09^{①}	132.41 ± 2.11^{①}	148.69 ± 11.37^{①}
D组	84.37 ± 10.45	111.58 ± 11.38	123.85 ± 7.66

与D组比较:① $P < 0.05$;② $P < 0.01$;与C组比较:③ $P < 0.05$

表4 脊髓损伤大鼠术后MDA含量的测定 ($\bar{x} \pm s$)

组别	第1天	第3天	第7天
A组	4.34 ± 0.45^{②}	2.18 ± 0.16^{②}	1.28 ± 0.39^{②}
B组	4.30 ± 0.29^{②}	3.15 ± 0.15^{①}	2.88 ± 0.27^{①}
C组	4.55 ± 0.17^{②}	3.17 ± 0.68^{①}	2.14 ± 0.00^{②}
D组	6.04 ± 0.82	5.25 ± 1.33	4.18 ± 0.65

与D组比较:① $P < 0.05$;② $P < 0.01$

3 讨论

脊髓损伤患者的康复治疗,首要目标是改善和促进SCI患者运动功能的恢复^[7]。电针具有针刺和电刺激的双重治疗作用,能改善和促进SCI患者运动功能的恢复^[8]。目前研究认为电针促进SCI修复的机制如下:①改善血液循环,抵抗自由基,减少继发性损害^[9];②降低 Ca^{2+} 含量,保护损伤神经^[10-11];③促进受损伤神经元的轴突再生^[12-13];④影响神经元的发育和生长,加速轴突再生和功能恢复^[14];⑤维护神经元的自我保护机制^[15];⑥抑制细胞凋亡^[16-17];⑦恢复神经元兴奋性等。而使用不同电针波形对脊髓损伤的治疗在机制上也存在差异,有研究报道,疏密波能通过提高神经营养因子(NT-3)、mRNA在神经组织中的表达,加快NT-3与胞体中受体(Trk受体)的结合速度以促进神经的再生和修复^[18],同时能加强血液循环,改善组织营养,消除炎性水肿^[19],并且疏密波不易被机体所适应,能有效的维持刺激量,进而提高疗效^[20]。断续波能消除水肿,加快清除局部坏死组织和崩解产物的速度,同时能改善血液循环,为神经细胞的再生提供充足的氧供,进而促进受损神经的修复;此外,断续波在保持肌纤维收缩和舒张特性、促进新陈代谢、减缓肌蛋白的变性等方面也有疗效,因此可用于防止脊髓损伤时因运动减少而致的肌萎缩^[21]。故脊髓损伤时采用适当的电针波形进行治疗至关重要。

长期的临床研究表明,电针对于脊髓损伤的治疗具有较好的疗效^[22],但并不清楚何种波形疗效更佳,本研究旨在比较不同波形对于脊髓损伤疗效的差异并初步探讨其相关机制。本研究以BBB评分、斜板试验、SOD活性、MDA含量为指标,研究结果表明:在BBB评分和斜板试验中,电针组脊髓损伤大鼠的后肢运动功能相对于造模组在整体水平上有明显提高;电针治疗脊髓损伤具有增高SOD活性,降

低MDA含量的作用,从而增强对自由基的抵抗能力,减少脊髓损伤后的继发损伤,有助于保护脊髓组织,进而改善和促进脊髓损伤大鼠运动功能的恢复。在电针治疗过程中,我们可以看出,不同波形电针对于脊髓损伤的疗效存在较大差异,据实验结果显示,在电针治疗过程的前阶段,三种波形对于脊髓损伤的疗效相当,在治疗过程的中后阶段,A组疏密波相对于其他波形疗效更为显著。在实验结果中,损伤后第1天和第7天的斜板试验A组斜板试验临界角度高于C组($P < 0.01$),第7天斜板试验A组高于B组($P < 0.05$),其余组两两比较无显著性差异,表明在脊髓损伤后期疏密波电针组较其他实验组有较好的疗效。损伤后第3天SOD活性A组高于C组($P < 0.05$),其余组两两比较均无显著性差异,表明在脊髓损伤中期疏密波电针组相对于其他实验组疗效更为显著。综上所述,A组疏密波对脊髓损伤运动功能恢复的影响在治疗过程的中后期整体上优于其他实验组。由此推测,在脊髓损伤中后期疏密波主要通过促进神经的再生和修复,加强血液循环,清除自由基,减少脊髓损伤的继发损伤等发挥治疗作用。但其具体机制仍需更深入的研究。

不同波形电针在治疗脊髓损伤时,从一定程度上均可以提高后肢的运动功能,增高SOD活性,降低MDA含量,从而减少其对脊髓组织的继发损伤。虽然疏密波对SCI的作用在实验室得到较好的证明并且优于其他波形,临床上,患者的情况不尽相同,实际应用的过程中,还需进一步深入研究。

参考文献

- [1] Beattie MS, Farooqui AA, Bresnahan JC. Review of current evidence for apoptosis after spinal cord injury[J]. J Neurotrauma, 2000, 17(10):915—925.
- [2] 郑望苟,潘卫红,陈家禄.脊髓损伤后脊髓内丙二醛含量变化及其与神经功能损害的关系[J].中国康复医学杂志,2004,19(2):103—104.
- [3] 陈志刚,张烽.早期大剂量甲基强的松龙治疗急性脊髓损伤32例[J].南通大学学报(医学版),2007,27(3):209—210.
- [4] Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC, et al. MASCIS evaluation of open field locomotor scores: effects of experience and teamwork on reliability. Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study[J]. J Neurotrauma, 1996, 13(7):343—359.
- [5] Rivlin AS, Tator CH. Objective clinical assessment of motor function after experimental spinal cord injury in rat[J]. J Neurosurg, 1977, 47(4):577—581.
- [6] 夏建华,石学银,曹莉,等.普鲁泊福对大鼠急性脊髓损伤的治疗作用[J].第二军医大学学报,2004,25(11):1212—1215.
- [7] 王瑾,王红星,王彤.运动对脊髓损伤功能改善作用机制的研究进展[J].中国康复医学杂志,2008,23(8):753—755.
- [8] 杨拯,何彦芳,陈建敏,等.电针在脊髓损伤功能康复中的研究[J].时珍国医国药,2011,22(1):249—250.
- [9] 邓娜,高敏.电针治疗脊髓损伤的基础理论研究[J].甘肃中医,2009,22(3):11—12.
- [10] 李志刚,刘如春,耿直,等.电针对急性脊髓损伤大鼠差异表达基因及钙离子作用的实验研究[J].北京中医药大学学报,2008,31(7):486—489.
- [11] 雷毅,熊利泽,张龙芳,等.电针预处理对兔脊髓缺血再灌注损伤细胞内 Ca^{2+} 变化的影响[J].中国针灸,2004,24(4):279—282.
- [12] 黄洁萍,翁金森,王锋,等.骨髓间充质干细胞移植对急性脊髓损伤大鼠神经功能恢复及Nogo-A表达的影响[J].中国康复医学杂志,2009,24(7):582—586.
- [13] 刘丽霞,邵浩清.电针对脊髓损伤作用机制的研究[J].长春中医药大学学报,2011,27(3):405—406.
- [14] 郭召,丁文元.脊髓损伤治疗的最新研究进展[J].颈腰痛杂志,2010,31(2):139—142.
- [15] 张奎渤,刘辉,郑召民.甲基强的松龙在脊髓损伤中应用的回顾与现状[J].脊柱外科杂志,2008,6(3):181—183.
- [16] 李晓宁,田旭升,刘芳.电针对大鼠脊髓损伤后细胞凋亡相关基因Caspase-9的研究[J].中医药信息,2009,26(1):61—63.
- [17] 李文洁,杨拯.Caspase-3与脊髓损伤的相关治疗[J].中国康复医学杂志,2010,25(10):1017—1020.
- [18] 牙组蒙,王建华,李忠禹,等.面神经损伤后穴位电刺激对神经组织中神经营养因子-3及其受体表达的影响[J].中国中医基础医学杂志,2000,6(1):59—61.
- [19] 颜少敏,王金都,王荣坡.2种频率电针对神经根型颈椎病的镇痛效应比较[J].福建中医药,2011,42(5):44.
- [20] 王威,董勤,胡津丽.不同波形电针治疗单纯性肥胖病的临床对比观察[J].中医杂志,2011,52(22):1939—1942.
- [21] 葛林宝,陈莲芳.断续波治疗神经损伤的临床研究[J].针灸临床杂志,1994,10(5):25.
- [22] 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.