

夹脊、督脉电针对大鼠脊髓损伤前炎性细胞因子表达的影响*

王 赛¹ 邹恩苗¹ 林海燕¹ 屠文展¹ 李江茹¹ 程 博¹ 蒋松鹤^{1,2}

摘要

目的:观察夹脊、督脉不同配穴的电针对脊髓损伤(SCI)后的大鼠前炎性细胞因子表达的影响。

方法:SD大鼠32只随机分为4组:假模组(n=8)、模型对照组(n=8)、夹脊电针组(n=8)、督脉电针组(n=8)。夹脊电针组、督脉电针组于SCI后0.5h和4h分别在夹脊与督脉的穴位进行1次电针治疗。SCI后8h,每组8只大鼠行Western-blot检测脊髓IL-1 β 、IL-6、TNF- α 蛋白含量的表达。

结果:假模组、夹脊电针组、督脉电针组IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的蛋白含量均低于模型对照组,差异有显著性意义($P<0.05$)。夹脊电针组、督脉电针组之间差异无显著性意义($P>0.05$)。

结论:夹脊、督脉电针可以通过抑制SCI后IL-1 β 、IL-6、TNF- α 3种前炎性细胞因子的表达,抑制SCI急性期的炎症反应来保护脊髓,减轻损伤的发生,起到神经保护作用。

关键词 脊髓损伤;电针治疗;夹脊;督脉;神经保护

中图分类号:R651.2,R245 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2013)-05-0389-04

Impaction of Jiaji and Du Meridian electroacupuncture treatment on expressions of pro-inflammatory cytokines in spinal cord injury of rats/WANG Sai,ZOU Enmiao,LIN Haiyan, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2013, 28(5): 389—392

Abstract

Objective: To observe the expressions of pro-inflammatory cytokines of spinal cord injury(SCI) rats undertaking electroacupuncture treatment(EA) at Jiaji and Du Meridian.

Method: Thirty-two SD rats were randomly divided into four groups: sham module group(n=8), control module group (n=8), Jiaji EA group (n=8), Du Meridian EA group (n=8). Jiaji EA group and Du Meridian EA group were treated with EA treatment at points of Jiaji and Du Meridian 0.5h and 4h after SCI, respectively. 8h after SCI, Western-blot was used to detect the expressions of IL-1 β , IL-6 and TNF- α protein in SCI section.

Result: Compared with control module group, the expressions of IL-1 β , IL-6 and TNF- α proteins SCI sections were significantly lower than those in the sham module group, Jiaji EA group, and Du Meridian EA group($P<0.05$). No significant difference was detected between Jiaji EA group and Du Meridian EA group($P>0.05$).

Conclusion: Jiaji and Du Meridian EA could inhibit high expressions of IL-1 β , IL-6 and TNF- α after SCI, inhibit inflammatory response in acute phase of SCI to protect the spinal cord, reduce the occurrence of injury, to play neuroprotective effect.

Author's address Dept. of Rehabilitation Medicine, The Second Hospital of Wenzhou Medical College, 325027

Key word spinal cord injury; electroacupuncture; Jiaji; Du Meridian; neuroprotective effect

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2013.05.001

*基金项目:温州市科技局资助项目(Y20110069)

1 温州医学院附属第二医院康复科,325027; 2 通讯作者

作者简介:王赛,女,硕士研究生; 收稿日期:2012-09-30

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)是中枢神经系统的严重损伤,近年来针灸干预受到国内外关注。针灸作为一种促进神经功能恢复且无毒副作用的中医康复疗法,发展潜力较大。研究显示:电针督脉穴与夹脊穴临床治疗SCI均有显著疗效^[1-2],能减轻疼痛^[3]并且提高急性脊髓损伤手术后疗效^[2],也可配合其他康复治疗获得显著效果^[4]。但这两种电针配穴在对急性期SCI治疗过程中的分子机制尚不十分明确^[1-2]。白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)是常见的前炎性细胞因子,它们在SCI的继发性损伤中发挥着诱导和进一步加重炎症反应的作用,因此本实验通过检测电针夹脊穴、督脉穴治疗大鼠SCI过程中IL-1 β 、IL-6、TNF- α 3种前炎性细胞因子是否有所变化,探讨两种电针配穴对SCI过程中前炎性细胞因子表达的影响及其作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物与材料

健康纯系SD大鼠(SPF级、雄性、体重180—220g)32只,由温州医学院实验动物中心提供。实验动物固定采用柔性大鼠固定器^[5],专利号201110021482.5,由温州医学院创业园温州原上草医疗科技公司提供。Western-blot所用试剂:兔抗TNF- α 多克隆抗体(ab66579)及鼠抗IL-6单克隆抗体(ab25072)由上海博蕴公司代理的abcam公司提供;山羊抗IL-1 β 多克隆抗体(Rat IL-1 β /IL-1F2)由上海博蕴公司代理的R&D公司提供。电针治疗所用韩氏治疗仪,由南京济生医疗科技有限公司提供。

1.2 实验步骤

1.2.1 动物分组及模型制备:实验所用健康纯系SD大鼠32只随机分为4组:假模组(n=8)、模型对照组(n=8)、夹脊电针组(n=8)、督脉电针组(n=8)。**①假模组:**仅行椎板切除术,未打击脊髓;**②模型对照组:**致伤脊髓,不进行针刺;**③夹脊电针组:**致伤脊髓,进行受损脊髓节段上下两对夹脊穴治疗;**④督脉电针组:**致伤脊髓,进行受损脊髓节段上下两个督脉穴电针治疗。

模型制备:选用T10节段为致伤部位,将大鼠应用5%水合氯醛麻醉生效后,以T10节段为中心,消毒、切开皮肤,分离肌肉及软组织,切除椎板,暴露脊髓,以改良Allen's撞击伤法,采用脊髓打击器(MASCIS Impactor, W.M. Keck Center of Rutgers University, USA)设定25cm高度制做SCI模型^[6]。造模成功后逐层缝合。

1.2.2 电针方法:夹脊电针及督脉电针组,于模型制备成功后,将大鼠移至柔性大鼠固定台,于打击后0.5h用0.20mm $\times$ 15mm毫针选取相应穴位针刺(夹脊电针组选取受损脊髓节段上下两对夹脊穴,督脉电针组选取受损脊髓节段上下两个督脉穴),进针采用手法进针并结合韩氏治疗仪进行1次电针治疗:采用连续脉冲,频率2Hz,输出电流0.6—1mA,电流选择以局部出现轻度跳动且大鼠可以耐受为准,每次治疗时间30min。模型成功后第4h进行第2次电针治疗,各项参数与第1次电针治疗一致,共进行2次电针治疗。

1.2.3 Western-blot定量检测:于SCI后8h,每组8只大鼠处死,生理盐水行心脏灌注,新鲜取材T10为中心的损伤段脊髓组织约1cm, -80℃冰箱保存,用于进行Western-blot检测脊髓IL-1 β 、IL-6、TNF- α 蛋白含量的表达。蛋白定量后,以50 μ g蛋白进行SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转膜、封闭后分别以不同抗体孵育过夜:TNF- α 用兔抗TNF- α 多克隆抗体(1:1000, abcam公司);IL-6用鼠抗IL-6单克隆抗体(1:500, abcam公司);IL-1 β 用山羊抗IL-1 β 多克隆(1:2000, R&D公司)。次日洗膜3次,用辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育2h,再次洗膜3次后ECL显影。

1.3 统计学分析

实验数据以均数 $\pm$ 标准差表示,运用SPSS16.0统计软件对观测指标进行多样本均数的单因素方差分析,组间采用 q 检验。 $P<0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

造模后出现大鼠尾巴痉挛摆动及躯体回缩扑动后,双下肢迟缓性瘫痪,并可从计算机获得标准打击图像。

以 GAPDH 为内参,将 IL-1 β、IL-6、TNF- α 等指标浓度值与对应内参浓度值取比值后进行统计。结果见图 1、表 1:模型对照组 IL-1 β、IL-6、TNF- α 等指标分别与假模组、夹脊组、督脉组比较,其各组

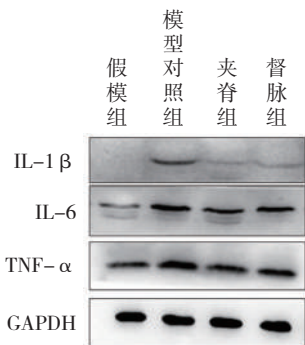
间差异有显著性意义 ($P<0.05$);夹脊组、督脉组 IL-1 β、IL-6、TNF- α 等指标分别与假模组比较,各组间差异无显著性意义 ($P>0.05$)。夹脊组与督脉组之间各指标比较差异无显著性意义 ($P>0.05$)。

表 1 SCI 后 8h 各组前炎性细胞因子的 Western-blot 结果* (x±s)

组别	动物数	IL-1 β	IL-6	TNF- α
假模组	8	0.1007 ± 0.0667 ^①	0.1315 ± 0.0582 ^①	0.2625 ± 0.1708 ^①
模型对照组	8	0.5077 ± 0.0884	0.4927 ± 0.1120	0.9889 ± 0.2742
夹脊组	8	0.1576 ± 0.0739 ^{①②}	0.2027 ± 0.1023 ^{①②}	0.3036 ± 0.2226 ^{①②}
督脉组	8	0.1686 ± 0.0987 ^{①②}	0.2045 ± 0.0951 ^{①②}	0.3753 ± 0.2121 ^{①②}

①与模型对照组比较 $P<0.05$;②与假模组比较, $P>0.05$; *指标浓度值与对应内参浓度值取比值

图 1 SCI 后 8h 各组前炎性细胞因子的 Western-blot 结果



3 讨论

SCI 神经损害的病理生理过程包括一个初始的机械性损伤,称为原发性损伤;之后是一连串 of 细胞和分子事件,构成二次损伤,称为继发性损伤^[6]。继发性损伤包括水肿、离子毒性、自由基生成、脂质过氧化作用、炎症反应,继而导致细胞坏死、凋亡、神经脱髓鞘和轴突变性等。在继发性损伤中,自身免疫炎症反应扮演关键角色,损伤后立即发生并保持数周至数月^[6-7]。过度的炎症反应会伤害正常组织,阻碍 SCI 后功能恢复。在继发性损伤中起关键起始作用的一些细胞因子被称作前炎性细胞因子,主要包括 IL-1 β、IL-6 和 TNF- α 等^[8]。在其诱导下,小胶质细胞可以向损伤区迁移,并分泌蛋白质,增加毛细血管的渗透率和内皮连接黏附分子的表达,促进白细胞迁移到损伤部位,加剧炎症反应^[9-11]。

IL-1 和 IL-6 等细胞因子都是细胞间信号传导的介质,能够参与调控中枢神经系统外伤、炎症、自身免疫,参与调节细胞功能,维持内环境稳定。① IL-1 β:脊髓损伤后,IL-1 能够参加小胶质细胞和巨

噬细胞活化过程^[12]。IL-1 β 通过与其受体结合导致细胞内信号转导发挥作用。SCI 后 1h 损伤局部 IL-1 β 水平开始迅速升高,SCI 后 6—12h 达峰值,SCI 后 72h 仍显著高于正常组织水平^[13]。②IL-6:在正常人体,IL-6 保持一定浓度能够维持神经细胞的正常生长和生存,同时还会影响神经细胞的分化。IL-6 能够通过激活神经元内在生长途径和促进突出形成达到促进 SCI 后皮质脊髓束再生和功能恢复的作用^[14]。但是,在 IL-1、IL-6 等细胞因子大量表达时,细胞因子通过信号转导途径作用,不仅导致神经元损害和星形细胞的凋亡,还可诱发全身性的细胞因子级联反应,使血清中和脑脊液中 IL-6 和 TNF- α 等细胞因子水平明显升高^[15]。SCI 后 1h 损伤局部 IL-6 水平开始迅速升高,SCI 后 6—12h 达峰值,SCI 后 72h 仍显著高于正常组织水平^[13]。③TNF- α:TNF- α 在损伤和炎症过程中起重要的作用,能够起到调控其他细胞因子产生的作用,引起局部的炎症级联反应。研究表明,在缺血时,中枢神经系统内神经元、胶质细胞、单核巨噬细胞等均可产生和释放具有广泛生物学活性的 TNF- α。目前认为,TNF- α 在中枢神经系统缺血后的白细胞浸润和组织损伤中起重要作用。研究发现,SCI 后 30min 受损脊髓组织中 TNF- α 水平明显升高,TNF- α mRNA 表达明显增强,SCI 后 4h 受损脊髓组织中 TNF- α 水平达峰值,且其表达水平与创伤严重程度相关^[16]。根据以上内容^[11-15]中的 IL-1 β、IL-6、TNF- α 等前炎性细胞因子的变化规律可知:在 SCI 后 8h 左右三者都在峰值附近,且在其峰值时对脊髓损伤均可致进一步创伤,因此选取此时间点观测 3 者 IL-1 β、IL-6、TNF- α 蛋白的表达,对于研究电针治疗 SCI 的相关

机制更有意义。

目前关于SCI的研究多集中于SCI后数日至数周的功能改变^[17]以及治疗数周后的相关检测指标的改变^[18-19]。本实验主要观察SCI后数小时(早期)针刺干预,两种配穴方案结果显示,在SCI后8h,夹脊组与督脉组IL-1 β 、IL-6、TNF- α 等前炎性细胞因子均较模型对照组低($P<0.05$),表明夹脊与督脉电针治疗均能抑制前炎性细胞因子的表达,从而减轻炎症反应对脊髓造成的继发性损伤;而与假膜组比较 $P>0.05$,进一步表明夹脊与督脉电针显著降低脊髓损伤后的炎症反应,降低炎症反应对脊髓的继发性损伤,达到保护脊髓的作用。夹脊组与督脉组之间,前炎性细胞因子的表达差异无显著性意义($P>0.05$),表示此两种配穴电针治疗在对炎症因子抑制方面作用相似。本实验选取的夹脊穴和督脉穴,都是在损伤脊髓阶段附近选取即受损脊髓节段上下两对夹脊穴,以及受损脊髓节段上下两个督脉穴。研究认为,穴位和神经根距离较近时,可以直接刺激脊神经根部,引起针感传导反应,直达病灶部位,改善局部血液循环,消除炎性水肿,改善神经赖以存活的内环境,提高神经存活率^[20]。临床研究^[1-2]和本研究结果均表明,电针督脉穴与夹脊穴治疗SCI效果显著。今后如能深入研究电针治疗SCI过程中更多重要因子随时间的表达变化情况,将能进一步阐释电针治疗SCI的机制。

参考文献

- [1] 邓聪,老锦雄. 夹脊穴电针治疗不完全性脊髓损伤疗效观察[J]. 山西中医, 2012,28(5):30.
- [2] 白晔,庄明华,谢泽宇,等. 电针辅助治疗对急性不完全性脊髓损伤的疗效[J]. 中国康复理论与实践, 2005, 11(7):582.
- [3] 樊留博,马利中,王韵. 电针夹脊穴治疗脊髓损伤后中枢性疼痛疗效观察[J]. 上海针灸杂志, 2011,30(3):149.
- [4] 王金玲,白田雨,王欣. 电针配合康复训练治疗脊髓损伤疗效观察[J]. 上海针灸杂志, 2010,29(6):369.
- [5] 陶涛涛,林海燕,屠文展,等. 水中活动平板训练对脊髓损伤大鼠体感、运动诱发电位及运动功能的影响[J]. 中国康复医学杂志, 2011, 26(11): 1020.
- [6] Park E, Velumian AA, Fehlings MG. The role of excitotoxicity in secondary mechanisms of spinal cord injury: a review with an emphasis on the implications for white matter degeneration[J]. J Neurotrauma, 2004, 21(6):754.
- [7] Baptiste DC, Fehlings MG. Emerging drugs for spinal cord injury[J]. Expert Opin Emerg Drugs, 2008,13(1):63.
- [8] Pineau I, Lacroix S. Proinflammatory cytokine synthesis in the injured mouse spinal cord: multiphasic expression pattern and identification of the cell types involved[J]. J Comp Neurol, 2007,500(2):267.
- [9] Weber C, Fraemohs L, Dejana E. The role of junctional adhesion molecules in vascular inflammation[J]. Nat Rev Immunol, 2007,7(6):467.
- [10] Aloisi F. Immune function of microglia[J]. Glia. 2001,36(2): 165.
- [11] Davies AL, Hayes KC, Dekaban GA. Clinical correlates of elevated serum concentrations of cytokines and autoantibodies in patients with spinal cord injury[J]. Arch Phys Med Rehabil, 2007,88(11):1384.
- [12] Sato A, Ohtaki H, Tsumuraya T, et al. Interleukin-1 participates in the classical and alternative activation of microglia/macrophages after spinal cord injury[J]. J Neuroinflammation, 2012,9:65.
- [13] Streit WJ, Sempere-Rowland SL, Hurley SD, et al. Cytokine mRNA profiles in contused spinal cord and axotomized facial nucleus suggest a beneficial role for inflammation and gliosis[J]. Exp Neurol, 1998,152(1):74.
- [14] Yang P, Wen H, Ou S, et al. IL-6 promotes regeneration and functional recovery after cortical spinal tract injury by reactivating intrinsic growth program of neurons and enhancing synapse formation[J]. Exp Neurol, 2012, 236(1):19.
- [15] Yokota S, Imagawa T, Miyamae T, et al. Hypothetical pathophysiology of acute encephalopathy and encephalitis related to influenza virus infection and hypothermia therapy[J]. Pediatr Int, 2000,42(2):197.
- [16] Ip WK, Wong CK, Lam CW. Tumour necrosis factor- α -induced expression of intercellular adhesion molecule-1 on human eosinophilic leukaemia EoL-1 cells is mediated by the activation of nuclear factor- κ B pathway[J]. Clin Exp Allergy, 2003,33(2):241.
- [17] 李兵奎,曾彬,常巍. 督脉电针对大鼠脊髓损伤后神经功能恢复的影响[J]. 中国康复理论与实践, 2012,18(7):619.
- [18] 禹金海,袁章,杨拯,等. 电针对脊髓损伤后蛋白质表达影响的研究[J]. 实用医学杂志, 2009,25(24):4242.
- [19] 宋琳,李晓宁,王莹威,等. 电针对急性脊髓损伤大鼠氧化应激反应的影响[J]. 针灸临床杂志, 2011,27(1):55.
- [20] 于丽萍. 电针夹脊穴为主治疗腰椎间盘突出症的研究[D]. 长春中医药大学, 2009.