

# 运动点电针对急性脊髓损伤大鼠半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶3和降钙素基因相关肽表达的影响\*

柯晓华<sup>1,2</sup> 葛杜鹃<sup>3</sup> 王文春<sup>1</sup> 庞日朝<sup>1</sup> 袁青<sup>2</sup> 秦慧慧<sup>2</sup>  
李蓓<sup>1</sup> 刘素贞<sup>2</sup> 刘建成<sup>2</sup> 崔银洁<sup>2</sup> 张安仁<sup>1,4</sup>

## 摘要

**目的:**探讨运动点电针对急性脊髓损伤大鼠半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶3(caspase-3)和降钙素基因相关肽(CGRP)表达的影响。

**方法:**将60只SD大鼠随机分为4组,每组15只。A组:运动点电针组;B组:非运动点电针组;C组:模型组;D组:假手术组。采用改良的Allen法建立大鼠急性脊髓损伤模型。A、B组分别于术后立即开始下肢运动点和非运动点进行电针治疗;C、D组不做任何治疗。各组大鼠分别于1、4、7d行BBB评分,通过免疫组织化学方法(IHC)观察各组caspase-3和CGRP阳性细胞的表达情况。

**结果:**60只SD大鼠均进入结果分析。BBB评分结果显示:A组评分明显高于B、C组( $P < 0.05$ );免疫组化结果显示:①caspase-3的表达:损伤后各组均可见阳性细胞表达,D组仅见少量的阳性细胞。其中A、B组阳性细胞表达明显低于C组( $P < 0.05$ );而A组的表达又明显低于B组( $P < 0.05$ );②CGRP的表达:各组均可见阳性细胞表达,A、B组明显高于C组( $P < 0.05$ ),而A组又明显高于B组( $P < 0.05$ )。

**结论:**运动点电针可抑制caspase-3和促进CGRP的表达,可能有助于脊髓功能的恢复。

**关键词** 脊髓损伤;电针;运动点;半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶3;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(2014)-10-0913-05

**The impact of electroacupuncture at motor points on caspase-3 and calcitonin gene related peptide expression of rats with acute spinal cord injury/KE Xiaohua, GE Dujuan, WANG Wenchun, et al//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2014, 29(10): 913—917**

## Abstract

**Objective:** To discuss the impact of electroacupuncture at motor points on caspase-3 and calcitonin gene related peptide(CGRP) expressions of rats with acute spinal cord injury.

**Method:** Sixty SD rats with spinal cord injury were randomly divided into four groups, 15 rats in each group: group A: electroacupuncture at motor points; group B: electroacupuncture at non-motor points; group C: model group; group D: sham-operated group. Modified Allen's method was used to establish rats model of acute spinal cord injury. Rats in groups A and B acupuncture therapy were administered at motor points and non-motor points immediately after spinal cord injury. Rats in groups C and D received no treatment. At day 1,4 and 7, BBB(Basso-Beattie-Bresnahan) scores were assessed in each group,Then the expressions of caspase-3 and CGRP positive cells of rats after acute spinal cord injury in each group were observed by immunohistochemistry method.

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2014.10.003

\*基金项目:全军医学科技“十二五”面上项目(CWS11J284);成都军区医学科学技术“十二五”计划重点项目(B12016);成都军区总医院管课课题(2011YG-B14;2013YG-A009)

1 成都军区总医院康复医学科,成都,610083; 2 成都中医药大学针灸推拿学院; 3 北京市怀柔区中医医院; 4 通讯作者

作者简介:柯晓华,男,硕士研究生; 收稿日期:2013-11-08

**Result:** BBB scores: In group A BBB scores were significantly higher than that in groups B and C ( $P < 0.05$ ). Immunohistochemical results: ①Caspase-3: The expressions of positive cells emerged in all groups after injury, in group D only small amount of positive cells emerged. The expressions of positive cells in groups A and B were significantly lower than that in group C ( $P < 0.05$ ), and the expression of positive cells in group A was lower than that in group B ( $P < 0.05$ ). ②CGRP: The expressions of positive cells emerged in all groups. The expressions of positive cells in groups A and B were significantly higher than that in group C ( $P < 0.05$ ), and the expression of positive cells in group A was higher than that in group B ( $P < 0.05$ ).

**Conclusion:** Electroacupuncture at motor points can suppress the expression of caspase-3 and promote the expression of CGRP and would be helpful for the spinal cord function recovery.

**Author's address** Department of Rehabilitation Medicine, General Hospital of Chengdu Military Region of PLA, Chengdu, 610083

**Key word** spinal cord injury; electroacupuncture; motor point; caspase-3; calcitonin gene related peptide

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)是由于各种致病因素引起脊髓结构、功能的损害,造成损伤平面以下脊髓段支配的运动、感觉、括约肌和自主神经功能障碍。目前,还没有一种方法能够完全治愈SCI所造成的后遗症<sup>[1]</sup>。现代医学研究指出半胱氨酸蛋白酶3(caspase-3)的激活在神经损伤后诱发的脊髓细胞凋亡早期的启动与执行过程中起着重要作用,是细胞凋亡的早期生化指标,而降钙素基因相关肽(calcitonin gene related peptide, CGRP)是重要的内源性神经营养因子,它参与、介导了脊髓损伤后神经的重塑,与神经再生关系密切;综合近年来的临床和动物实验研究<sup>[2]</sup>可以发现,电针在脊髓损伤后造成的截瘫恢复方面取得了毋庸置疑的作用。高燕玲等<sup>[3]</sup>研究发现电针伸腕、伸指功能的肌肉运动点可以明显改善偏瘫手运动功能;而本实验组前期研究亦证实肌肉运动点电针对脑卒中后肢体运动功能恢复有独特疗效<sup>[4]</sup>。故本实验通过采用免疫组织化学的方法观察运动点电针对急性脊髓损伤大鼠caspase-3和CGRP表达的情况,探讨针刺下肢肌肉运动点的作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物与分组

选用 $220 \pm 10$ g 雌性健康SD大鼠60只(由成都达硕实验动物有限公司提供,清洁级,许可证号为:SCXK(川)2008-24),随机分为4组,A组:运动点电针组(15只),B组:非运动点电针组(15只),C组:模型组(15只),D组:假手术组(15只)。每组又分为1d、4d、7d 3个时间点观察,每个时间点随机抽取5

只。

### 1.2 大鼠SCI模型的建立

所有大鼠采用3.6%水合氯醛作腹腔麻醉(1ml/100g),后路暴露T10段脊

髓用改良的Allen撞击法<sup>[5]</sup>以30g·cm打击量撞击T10段脊髓,造成该段的急性中度脊髓损伤,然后冲洗伤口,逐层缝合损伤区域。造模成功的标志:Allen装置撞击脊髓的瞬间可以听到局部钝性撞击声,可以看到以下3个征象:①身体痉挛性颤动;②尾巴痉挛性摇动;③硬脊膜内充血或水肿。3个征象出现其二即为造模成功。术后处理:①在腹腔注射青霉素(10万U/d)以抗感染;②保持室温在20—23℃,湿度50%—60%;③每日按摩膀胱2次至其出现自主排尿为止。假手术组仅切除椎板,不损伤脊髓。

### 1.3 治疗方法

**1.3.1 器具:**华佗牌一次性针灸针(苏州医疗用品有限公司生产),常州产长城脉冲电疗仪 KWD-808 I,外周神经电刺激仪(型号SY-708 A,江苏苏云医疗器材有限公司生产)。

**1.3.2 关键肌运动点定位:**使用外周神经电刺激仪及刺激针,对髂腰肌、股直肌、胫前肌、趾长伸肌、腓肠肌进行运动点定位。先选择体表模式探测运动点,即采用笔状表面探测电极,初步确定运动点或神经干的体表投影位置。而后用体内模式,即采用一次性外周神经丛刺激针在运动点或神经干的体表投影位置穿刺进入体内,再施加预定初始强度的电刺激,观察到靶肌肉的收缩活动后,逐步降低电刺激强度,达到预定的靶强度,以确认针尖已经在预定的运动点或神经干部位,标记明确并记录深度、角度值。

**1.3.3 操作:** A组于术后立即开始下肢运动点针刺,将大鼠固定在自制固定板上,按照上述运动点定位选取标准,常规消毒后,进行针刺。运动点针刺时采用30号0.5寸毫针,根据不同大鼠髂腰肌、股直肌、胫前肌、腓肠肌、趾长伸肌运动点的标记及进针深度进行针刺,针刺后股直肌与髂腰肌连接一组导线,趾长伸肌与胫前肌连接一组导线,腓肠肌2个运动点连接一组导线;分别上下连接针柄,正极在上,负极在下,连接KWD-808II型脉冲电针仪,疏密波,频率为1—3Hz,电流输出强度以肌肉出现轻微抽动为度,15min/次,1次/d; B组于大鼠双后肢肌肉运动点外侧旁开2mm非运动点处针刺进行电针治疗,针刺频率、波形、电流强度同A组; C组和D组分别为模型组和假手术组故术后不做任何干预治疗措施。

**1.4 取材**

各组大鼠于术后1、4、7d麻醉(用3.6%的水合氯醛腹腔注射1ml/100g,每次每组取5只大鼠),行开胸术暴露心脏,用12号灌注针头沿左心室插入主动脉,迅速剪破右心耳,同时用37℃生理盐水约200ml经左心室主动脉灌注,待右心耳流出的液体变澄清后,改用4%多聚甲醛溶液继续灌注,先快后慢,直至大鼠肝脏发白及全身出现去大脑强直症状后停止灌注;打开椎弓管,切除T9—T11段脊髓,放入4%多聚甲醛固定24h后行脱水,石蜡包埋,冠状面连续切片,片厚5μm,连续5张进行贴片、烤片,备用。

**1.5 免疫组织化学染色**

非生物素二步法进行caspase-3和CGRP免疫组化染色。将各组切片置于二甲苯中脱蜡,梯度酒精水化,高压热抗原修复,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>封闭内源性过氧化物酶,正常山羊血清封闭非特异性抗原。滴加caspase-3和CGRP抗体(效价1:100),4℃冰箱过夜。用兔抗鼠二抗37℃恒温孵育60min,在切片上加入DAB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>显色液,室温下反应,显微镜下显色充分,及时用0.01 mol/LPBS漂洗;苏木素复染,梯度酒精逐级脱水,二甲苯透明,树胶封片。使用安装有数字图像分析系统的OLYMPUS-CX31光学显微镜观察caspase-3和CGRP的表达并拍片,拍片后,在Image-proplus6.0专业数码成像与分析系统下,观察阳性细胞分布部位及表达特征,统计400倍视野下同一解剖部位、5个不同视野内阳性细胞表达量,每组共25

个数据,进行统计学分析。

**1.6 统计学分析**

数据以平均值±标准差表示,结果用SPSS 13.0统计学软件统计,多组间比较用单因素完全随机设计方差分析,两两比较采用q检验,P<0.05为差异具有显著性意义。

**2 结果**

**2.1 行为学观察结果**

各组大鼠分别于第1、4、7天进行BBB评分,结果见表1。

**2.2 各组caspase-3免疫组化结果**

假手术组仅见少量的阳性细胞表达,脊髓损伤后各组均可见阳性细胞表达,脊髓灰质前角中阳性神经元数量较多,表达为棕黄色,主要集中在胞浆和胞核部位表达,胞核着色更深(见图1—4)。各组大鼠脊髓前角组织中caspase-3表达阳性细胞数结果见表2。

表1 各组大鼠治疗1d、4d、7d BBB评分结果 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	鼠数	第1天	第4天	第7天
A组	5	0.88±0.211 <sup>①</sup>	2.10±0.321 <sup>①②③</sup>	8.20±0.470 <sup>①②③</sup>
B组	5	0.40±0.326 <sup>①</sup>	1.50±0.303 <sup>①②</sup>	6.55±0.351 <sup>①②</sup>
C组	5	0.35±0.209 <sup>①</sup>	1.10±0.265 <sup>①</sup>	2.70±0.570 <sup>①</sup>
D组	5	18.46±1.076	19.40±0.540	20.15±0.876

①与D组比较P<0.05,②与C组比较P<0.05,③与B组比较P<0.05

表2 各组大鼠1d、4d、7d脊髓前角组织中caspase-3表达阳性细胞数 ( $\bar{x} \pm s$ , 个)

组别	片数	第1天	第4天	第7天
A组	25	26.06±1.534 <sup>①②</sup>	37.26±1.356 <sup>①②③</sup>	26.05±1.773 <sup>①②③</sup>
B组	25	27.36±1.585 <sup>①②</sup>	38.40±2.098 <sup>①②</sup>	26.23±1.457 <sup>①②</sup>
C组	25	33.20±2.088 <sup>①</sup>	48.86±3.863 <sup>①</sup>	31.67±2.845 <sup>①</sup>
D组	25	2.68±0.866	1.67±0.824	1.87±1.058

①与D组比较P<0.05,②与C组比较P<0.05,③与B组比较P<0.05

**2.3 各组CGRP免疫组化结果**

A、B、C、D各组均可见阳性细胞表达,假手术组可见脊髓灰质的前角和后角的CGRP表达都很活跃,后角阳性神经元数量较多,阳性表达为棕黄色,主要集中在胞浆及胞体突起部位表达(见图5—8)。各组大鼠脊髓后角组织中CGRP表达阳性细胞数结果见表3。

表3 各组大鼠1d、4d、7d脊髓后角组织中 CGRP表达阳性细胞数 ( $\bar{x}\pm s$ , 个)

组别	片数	第1天	第4天	第7天
A组	25	11.433±2.026 <sup>①②</sup>	13.36±2.326 <sup>①②③</sup>	15.467±2.667 <sup>②③</sup>
B组	25	11.152±2.166 <sup>①②</sup>	12.023±2.305 <sup>①②</sup>	14.133±2.119 <sup>②</sup>
C组	25	8.506±1.326 <sup>①</sup>	7.696±2.104 <sup>①</sup>	6.201±2.316 <sup>①</sup>
D组	25	15.935±1.688	16.166±1.512	15.328±1.588

①与D组比较 $P < 0.05$ , ②与C组比较 $P < 0.05$ , ③ $P < 0.05$

图1 A组7d后 caspase-3 表达 (×400)

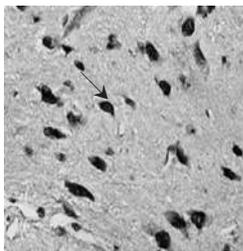


图2 B组7d后 caspase-3 表达 (×400)

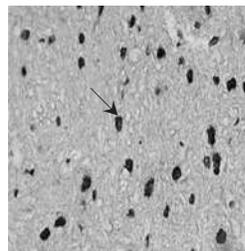


图3 C组7d后 caspase-3 表达 (×400)

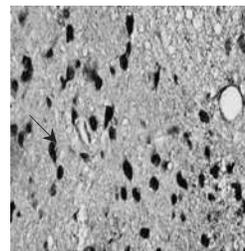


图4 D组7d后 caspase-3 表达 (×400)

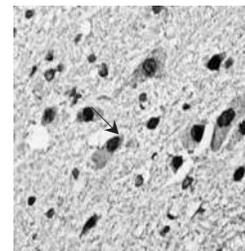


图5 A组7d后 CGRP 表达 (×400)

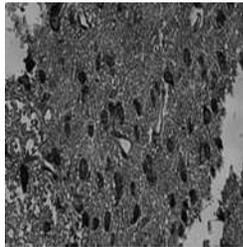


图6 B组7d后 CGRP 表达 (×400)

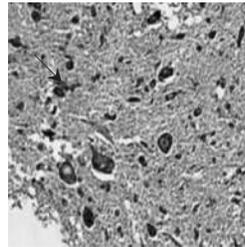


图7 C组7d后 CGRP 表达 (×400)

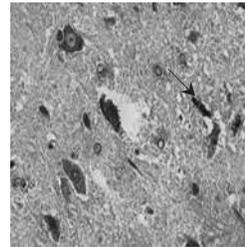
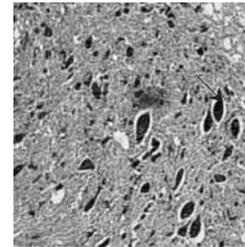


图8 D组7d后 CGRP 表达 (×400)



功能稍有降低,后接近正常,可能与手术创伤引起的疼痛等不良刺激有关;C组大鼠较A、B组大鼠BBB评分降低,差异具有显著性意义( $P < 0.05$ ),说明脊髓损伤后严重影响了大鼠的运动功能,而两种不同干预措施可能抑制 caspase-3 和促进 CGRP 的表达,减少脊髓继发性损伤,促进脊髓损伤修复,从而提高下肢运动功能。当肌肉出现萎缩或改善时,CGRP 会随之发生变化,是反映运动终板退变程度较为敏感的指标<sup>[7]</sup>,A组在改善下肢运动功能上较B组优越,提示运动点电针可通过神经兴奋性调节改变远端肌肉的可塑性,从而促进运动功能的恢复。

### 3.2 对急性脊髓损伤大鼠 caspase-3 表达的影响

caspase 是一类天冬氨酸特异性的半胱氨酸蛋白酶,在 caspases 家族中,caspase-3 的激活可诱导细胞发生凋亡,在细胞凋亡早期启动与执行过程中发挥着重要作用<sup>[8]</sup>。Springer<sup>[9]</sup>等研究发现在缺血和外

## 3 讨论

### 3.1 对急性脊髓损伤大鼠下肢运动功能的影响

BBB评分法<sup>[6]</sup>是Basso等在1995年提出的一种分级为21级的、较为精细详尽的、专门用于评价大鼠胸髓损伤后后肢运动功能的恢复情况的神经功能评定法。

本实验BBB评分结果显示:D组大鼠后肢运动

伤性SCI动物模型中,神经细胞的凋亡与 caspase-3 的激活有关。

李晓宁<sup>[10]</sup>等研究指出电针通过抑制 caspase-3 在大鼠脊髓损伤神经元中表达,抑制神经细胞凋亡,减轻了脊髓继发性损伤,促进神经功能恢复。本实验观察到假手术组仅见少量的阳性细胞表达,脊髓损伤后各组均可见阳性细胞表达,第1、4、7天与D组比较,脊髓损伤各组阳性细胞表达量明显增多,差异具有显著性意义( $P < 0.05$ ),说明急性脊髓损伤后存在自发细胞凋亡现象;A、B组各时间点大鼠脊髓组织中 caspase-3 阳性细胞表达明显低于模型组( $P < 0.05$ ),而A组又明显低于B组( $P < 0.05$ ),进一步证实运动点电针可下调急性脊髓损伤大鼠 caspase-3 的表达,从而抑制神经细胞的凋亡,减轻继发性损伤,促进神经功能恢复。

### 3.3 对急性脊髓损伤大鼠 CGRP 表达的影响

CGRP是一种含有37个氨基酸的生物活性肽,参与介导神经细胞的重塑,具有神经保护作用<sup>[11-12]</sup>,与神经再生关系密切,表现为初级传入神经纤维在脊髓内分布和突触联系的增多。

本实验观察到各组均可见阳性细胞表达;脊髓损伤1d后,与D组比较,所有脊髓损伤大鼠脊髓后角CGRP的阳性细胞表达明显减少;从C组CGRP的阳性细胞数表达看,随着脊髓损伤时间的延长,CGRP的阳性细胞表达逐渐减少,与C组比较,A、B组的CGRP阳性细胞表达量明显增加( $P < 0.05$ ),而A组又明显高于B组( $P < 0.05$ );说明运动点电针和非运动点电针均有促进CGRP表达的趋势,运动点电针则可明显促进脊髓损伤后CGRP的表达,并使其接近正常水平,从而有助于脊髓损伤的修复。其机制可能是通过CGRP的合成和释放改变脊髓损伤后血管痉挛,增强血液供应,保护受损神经元的存活,促进了神经细胞的兴奋性及神经元的再生;以及参与运动终板的可塑,营养靶肌肉细胞,促进受损脊髓神经功能的恢复,从而促进脊髓损伤大鼠后肢运动功能的恢复。

### 3.4 运动点电针治疗急性脊髓损伤大鼠的机制

运动点电针治疗急性脊髓损伤大鼠可能通过以下途径产生效应:运动点电针与促进神经保护因子CGRP的表达,抑制细胞凋亡因子caspase-3的表达有关,从而达到促进轴突生长发芽,启动潜伏通路,增加轴浆运输,保护残存神经元,抑制神经细胞凋亡及星形胶质细胞持续反应性增生,以减轻继发性损伤。运动点的本质为终末小神经密集区而非运动终板密集区<sup>[13]</sup>,它作为肌肉中神经末梢集中的地方,也是兴奋性最高的部位,其特点是使用最小的电刺激就可引起肌肉有节律地收缩、运动。电针下肢关键肌运动点,可能会通过有效的刺激(牵拉、震动、电刺激、针刺等),激活损伤平面以下的脊髓中枢模式发生器(CPG环),保持损伤部位以下神经环路的完整性,产生运动样模式,加速血液循环,促进神经纤维再生,增加新陈代谢及炎症渗出物的吸收,从而改善神经冲动的传导,引起其功能性活动。针刺运动

点刺激了皮内的触痛觉感受器,产生各种冲动,通过触痛觉传导束将冲动最后投射到大脑皮质中央后回,经各级神经中枢整合后由锥体系或锥体外系的运动传导路传出,支配相应的骨骼肌防止肌肉萎缩。

### 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] 李志刚,刘书坤. 近十年电针治疗脊髓损伤的临床和实验研究概况[J]. *中国中医药科技*, 2004, 11(6): 386.
- [3] 高燕玲,陈立典,陶静. 电针肌肉运动点对脑卒中患者手功能障碍的影响[J]. *中国康复医学杂志*, 2011, 26(12): 1167—1168.
- [4] 王文春,宋庆军,王倩,等. 拮抗肌运动点电针治疗脑卒中后肢体偏瘫痉挛的研究[J]. *中国康复医学杂志*, 2011, 26(5): 438—442.
- [5] Wrathall JR, Pettegrew RK, Harvey F, et al. Spinal cord contusion in the rat production of graded reproducible injury groups[J]. *Exp Neurol*, 1985, 88(1): 108—112.
- [6] Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. Graded histological and locomotor outcomes after spinal cord contusion using NYU weight drop device versus transection[J]. *Exp Neurol*, 1996, 139: 244—256.
- [7] Sato T, Shimizu Y, Kano M, et al. Increase of CGRP expression in motor endplates within fore and hind limb muscles of the degenerating muscle mouse (Scn8a(dmu)) [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2011, 31(1): 155—161.
- [8] Cheng EH, Kirsch DG, Clem RJ, et al. Conversion of bcl-2 to Bax-like death effector by caspases[J]. *Science*, 1997, 278(5345): 1966—1968.
- [9] Springer JE, Azbill RD, Knapp PE. Activation of the caspase-3 apoptotic cascade in traumatic spinal cord injury[J]. *Nat*, 1999, 5: 943—946.
- [10] 李晓宁,刘玲玲. 电针对大鼠脊髓损伤后细胞凋亡Caspase-3影响的研究[J]. *中医药信息*, 2011, 28(3): 119—121.
- [11] 章菲菲,吕有灵,童菊芳,等. 降钙素基因相关肽刺激体外培养脊髓神经细胞c-fos的表达[J]. *胃肠病学*, 2006, 11(5): 286—289.
- [12] 胡魁. 急性脊髓损伤大鼠自主神经异常反射与CGRP关系的研究[D]. 济南: 山东大学, 2007.
- [13] 毛雅君,励建安,李冰,等. 兔骨骼肌运动点与运动终板的形态学研究及临床意义[J]. *中国康复医学杂志*, 2011, 26(11): 1014—1019.