

电针对坐骨神经损伤大鼠背根神经节中神经营养因子-3及其受体TrkC的影响*

潘 璠¹ 于天源^{1,2} 吴剑聪¹ 高玉峰¹ 鲁梦倩¹ 李小琴¹ 于 跃¹ 耿 楠¹ 冼思彤¹ 张林峰¹

摘要

目的:观察电针对坐骨神经损伤大鼠行为学、神经生长因子-3及其受体TrkC的影响,探讨电针治疗坐骨神经损伤的生物学机制。

方法:建立大鼠坐骨神经夹持损伤模型,观察各组大鼠的行为学改变与背根神经节(DRG)中NT-3与TrkC表达情况。

结果:模型组、模型对照组的大鼠行为学检测表明,造模后大鼠的感觉功能显著下降($P < 0.05$),电针治疗后有显著改善($P < 0.05$),与正常组无显著差异;电针组的NT-3与TrkC表达显著升高($P < 0.05$),第20天时模型组与正常组相比,NT-3分泌显著增多($P < 0.05$)。

结论:电针治疗可以通过提高NT-3与TrkC的表达,维持神经元存活,促进受损神经修复,改善坐骨神经损伤大鼠的感觉功能。

关键词 电针;坐骨神经损伤;神经营养因子-3;酪氨酸激酶受体

中图分类号:R245 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2014)-12-1109-04

Investigation of electroacupuncture on NT-3 and TrkC expression in dorsal root ganglia in rats with sciatic nerve injury/PAN Fan, YU Tianyuan, WU Jiancong, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2014,29(12):1109—1112

Abstract

Objective: To observe the influence of electroacupuncture on ethology, expressions of neurotrophic factor-3(NT-3) and tyrosine kinase receptor type C(TrkC) receptor of NT-3 in dorsal root ganglia(DRG) of rats with sciatic nerve injury, and to investigate the biological mechanisms of electroacupuncture in sciatic nerve injury.

Method: Sciatic nerve clamping injury were used as the model. The thermal withdraw latency tests were operated to observe the behavior changes. The level of NT-3 and TrkC in DRG was measured by immunohistochemistry.

Result: The sensory function of model group and model control group reduced significantly($P < 0.05$). The score of thermal withdraw latency(PWL) increased significantly after electroacupuncture therapy($P < 0.05$). The expressions of NT-3 and TrkC in electroacupuncture group increased significantly compared with other four groups ($P < 0.05$). On the 20th d the expression of NT-3 in model group increased significantly compared with normal group ($P < 0.05$).

Conclusion: Electroacupuncture could promote neuron survival, stimulate the recovery of injured nerve and improve sensory function by increasing the release of NT-3 and TrkC in rats with sciatic nerve injury.

Author's address School of Acupuncture-Moxibustion and Tuina, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing, 100029

Key word electroacupuncture; sciatic nerve injury; neurotrophic factor-3; tyrosine kinase receptor type C

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2014.12.002

*基金项目:国家自然科学基金资助项目(81373759);博士点专项科研基金资助项目(20130013110016);北京市自然科学基金资助项目(7142097)

1 北京中医药大学针灸推拿学院,北京,100029; 2 通讯作者

作者简介:潘璠,女,博士研究生;收稿日期:2014-01-18

神经营养因子-3(neurotrophic factors, NT-3)是神经营养因子家族的主要成员之一,它通过TrkC和p75NTR两种受体介导神经细胞的生长和凋亡。NT-3主要通过与其高亲和力受体TrkC结合,刺激受体自身磷酸化,分别激活磷脂酶C(phospholipase C type, PLC- γ),磷脂酰肌醇三激酶(PI3K/Akt)与有丝分裂激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)三条信号转导通路发挥维持神经元存活、促进神经元分化、诱导轴突生长及加快神经修复的作用^[1]。课题组前期研究发现电针治疗能促进坐骨神经损伤大鼠脊髓中神经生长因子、脑源性神经营养因子等神经营养因子^[2]及背根神经节中生长相关蛋白的表达^[3]。本次实验旨在考察电针对坐骨神经损伤模型大鼠背根神经节(dorsal root ganglia, DRG)内NT-3与TrkC的影响,探讨电针治疗周围神经损伤的机制。

1 材料与方法

1.1 动物

本动物实验过程均遵守美国国立卫生院倡导的实验动物关怀和使用指导原则和以减少(reduction)、替代(replacement)和优化(refinement)为核心的动物实验“3R”原则。采用清洁级健康SD品系雄性大鼠,质量(150 $\pm$ 10)g,购自维通利华实验动物技术有限公司,合格证号:SCXK(京)2011-0001。饲养条件:室内温度(20 $\pm$ 1) $^{\circ}$ C,湿度(45 $\pm$ 5)%,日光灯光照,普通清洁级鼠饲料,自由饮用自来水。

1.2 仪器

韩氏电针仪LH-202H型,北京华卫产业开发公司;毫针(0.35mm $\times$ 25mm),苏州环球针灸医疗器械有限公司;热刺痛仪PL-200,成都泰盟软件有限公司;显微镜,麦克奥迪BA400;恒温培养箱,黄石市恒丰医疗器械有限公司SKP-02.600;病理石蜡包埋机,沈阳市龙首电子仪器有限公司LS-100;石蜡切片机,北京弘泰嘉业科技发展有限公司Finesse 325。

1.3 试剂

NT-3抗体(Anti-NT-3 antibody),生产厂家:Abcam,编号:ab65804;TrkC抗体(Anti-TrkC antibody),生产厂家:Abcam,编号:ab75174。

1.4 分组

采用两次随机分组法对大鼠进行随机分组:第一次:利用随机表法将大鼠随机分为正常组24只,假手术组24只,造模组56只;第二次:造模后第7天每组随机取8只进行行为学评价以确定造模成功;再次用随机表法将造模组剩余48只大鼠随机分为模型组、模型对照组、电针组,每组16只。

1.5 模型制备

采用神经夹持损伤法制造坐骨神经损伤模型大鼠,具体方法如下:水合氯醛麻醉;手术区常规消毒;于右侧臀股交界处切开皮肤、止血、钝性分离暴露梨状肌下缘及坐骨神经;用10号持针钳,夹持梨状肌下缘5mm处的坐骨神经,满扣夹持5s,造成长约2mm的损伤点;术后常规缝合。

1.6 干预方式

造模后第7天开始干预。电针干预时将大鼠俯卧固定,取损伤侧环跳、殷门、阳陵泉、承山,两电针正极接环跳和殷门,负极接阳陵泉和承山,采用电针仪干预,电流2mA,频率为2/100Hz,疏密波,1次9min,每日1次。正常组、假手术组与模型组不做特殊干预;模型对照组大鼠每天俯卧位束缚9min。

1.7 实验检测

1.7.1 光热耐痛阈测定:首先将大鼠置于热刺痛仪检测盒内;其次待其适应环境后,将辐射灯光源放置在足跖部中后1/3处,同时按下开始按钮;最后待大鼠自动抬脚时计时自动停止,记录仪器上的时间,以此作为大鼠热痛缩腿反应潜伏期(paw withdraw latency, PWL)。整个测试过程中保持安静,室温为20 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C,同时设定切断时间为21s,防止大鼠组织灼伤。每侧测定3次,取平均值。

1.7.2 免疫组化:大鼠灌注固定,取L3—L5背根神经节,再入4%多聚甲醛溶液固定,石蜡包埋、切片,经脱蜡、水化,抗原修复,SABC法染色,脱水、透明、封片、镜检,观察蛋白表达,并用Image-Pro Plus 6.0图像软件进行平均光密度半定量统计。

1.8 统计学分析

数据均以均值 $\pm$ 标准差表示。采用SPSS17.0进行统计学分析,组间比较采用一维方差分析,两两比较采用SNK法,以 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 热痛阈实验

如表1所示,模型组、模型对照组大鼠的PWL与正常组相比明显延长($P < 0.05$),说明坐骨神经损伤后大鼠对热痛感觉的灵敏度下降;电针组与模型组相比PWL明显缩短($P < 0.05$),与正常组相比无显著差异,说明电针治疗具有改善坐骨神经损伤大鼠感觉功能的作用。

2.2 NT-3表达

结果见图1与表2。经Image-Pro Plus 6.0进行平均光密度检测,如表2所示,治疗10次时,电针组的平均光密度与其他四组相比,明显升高($P <$

0.05),正常组与模型组相比无显著差异。治疗20次时,电针组的平均光密度高于其他四组($P < 0.05$);模型组与正常组相比,平均光密度明显升高,具有显著性差异($P < 0.05$)。

2.3 TrkC表达

见图1与表3。经Image-Pro Plus 6.0进行平均光密度检测,如表3所示,电针组的平均光密度比其他4组相比,明显升高($P < 0.05$),正常组与模型组相比无显著差异。

3 讨论

坐骨神经损伤属于中医的“痹症”、“痿症”范

表1 电针干预10次、20次的热痛阈结果

($\bar{x} \pm s$)

	正常组	假手术组	模型组	模型对照组	电针组
干预10次	6.67±0.37	6.81±1.71 ^②	9.40±1.12 ^①	9.21±0.26 ^①	6.95±1.83 ^②
干预20次	6.60±0.40	6.76±0.97 ^②	9.53±0.18 ^①	9.48±1.17 ^①	6.77±0.93 ^②

①与正常组比较 $P < 0.05$;②与模型组比较 $P < 0.05$

表2 电针干预10次、20次的NT-3平均光密度

($\bar{x} \pm s$)

	正常组	假手术组	模型组	模型对照组	电针组
干预10次	10.69±2.90	9.92±3.96	9.68±1.73	11.27±4.17	19.01±6.62 ^{①②}
干预20次	8.94±3.37 ^②	9.68±3.21 ^②	15.33±5.85 ^①	15.07±4.80 ^①	21.38±5.72 ^{①②}

①与正常组比较 $P < 0.05$;②与模型组比较 $P < 0.05$

表3 电针干预10次、20次的TrkC平均光密度

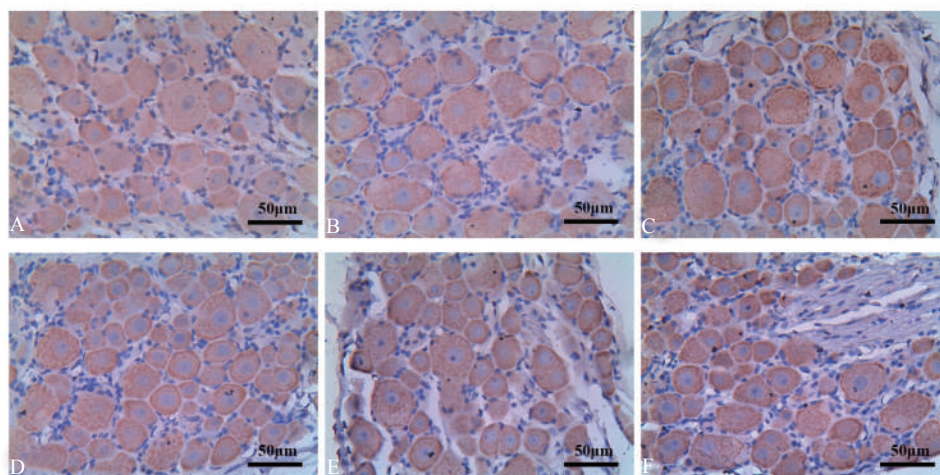
($\bar{x} \pm s$)

	正常组	假手术组	模型组	模型对照组	电针组
干预10次	8.75±1.84	10.31±2.13	10.88±3.17	9.95±2.55	19.55±1.55 ^{①②}
干预20次	10.47±4.33	10.62±3.53	11.88±4.91	13.76±4.29	18.95±6.85 ^{①②}

①与正常组比较 $P < 0.05$;②与模型组比较 $P < 0.05$

图1 治疗20次 NT-3与TrkC免疫组化SABC染色结果

($\times 400$)



A:正常组NT-3; B:模型组NT-3; C:电针组NT-3; D:正常组TrkC; E:模型组TrkC; F:电针组TrkC

畴。在临床与文献检索基础之上,选取环跳、殷门、阳陵泉、承山四穴作为电针干预的穴位。环跳穴属足少阳胆经,是治疗坐骨神经损伤的经验穴,针灸古籍与现代文献多采用该穴位治疗腰腿痛。殷门属足太阳膀胱经,位于大腿后面,承扶与委中连线上,承扶下6寸,在解剖学上是坐骨神经干的位置,支配股二头肌。阳陵泉是足少阳胆经的合穴,“筋会阳陵泉”,具有舒筋活络之功效;在解剖学上阳陵泉位于坐骨神经分支腓总神经上,支配胫前肌。承山穴为足太阳膀胱经的穴位,位于坐骨神经分支胫神经上,其深层为腓肠肌,是坐骨神经支配的靶肌肉。上述穴位的选择既与针灸学局部取穴、循经取穴的原则相符,又契合了现代医学神经与肌肉的解剖结构。以上4穴是能够同时刺激“穴位-神经-肌肉”的最佳点。

NT-3在神经系统主要分布于DRG、脊髓、小脑和海马等^[4]。在中枢神经系统中,NT-3的mRNA表达水平起伏较大,在大鼠出生后1周达到高峰,成年后逐渐减少,提示NT-3对发育中的神经元的存活和分化起主要作用^[5]。NT-3与NGF、BDNF、NT-4/5同属于神经营养因子家族,并具有与其他家族成员相似的一级结构和生化特点。而不同的神经营养因子诱导出的神经元种类有所差异,如NGF对交感与感觉神经元的分化具有关键作用,NT-3主要维持DRG中部分感觉神经元和本体感受神经元的存活^[6]。本次实验中,正常组大鼠DRG中NT-3呈弱表达,说明生理状态下机体对NT-3依赖程度不强。坐骨神经夹持损伤后,模型组与模型对照组NT-3表达随时间推移有增高趋势,说明周围神经损伤促使机体NT-3的分泌;经过电针干预,大鼠的“穴位-神经-肌肉”区域得到良性刺激,使内源性NT-3呈高表达状态,发挥其营养神经元、加快损伤神经修复的作用。

酪氨酸激酶受体TrkC (tyrosine kinase receptor type C)是原癌基因Trk的产物,是NT-3的高亲

和力受体。NT-3与其结合,引起受体二聚化,使受体胞浆内酪氨酸激酶区域活化,形成蛋白质结合位点,激活3个信号转导通路,组织神经元凋亡^[7]。本次实验中,电针干预后,TrkC表达显著增高,与其配体NT-3表达呈现一致性。同时,行为学结果显示,电针干预对坐骨神经损伤大鼠的感觉功能恢复起到了促进作用。

本次试验中,在电针干预下,NT-3与TrkC蛋白表达均显著性增高,共同维持神经元的存活、促使受损神经修复,但神经营养因子与其高亲和力受体相结合后信号通路的选择仍有待进一步研究。

4 结论

电针治疗可以提高坐骨神经损伤大鼠DRG内神经营养因子NT-3的分泌,并促进NT-3高亲和力受体TrkC的释放,进而维持感觉神经元存活,最终改善坐骨神经损伤大鼠的感觉功能。

参考文献

- [1] Reyes O, Soas I, Kuffler DP. Neuroprotection of spinal neurons against blunt trauma and ischemia[J]. PR Health Sci J, 2003,22(3):278—284.
- [2] 张晓晖.电针治疗对坐骨神经损伤大鼠NGF、CNTF、BDNF、bFGF表达的影响[J].北京:北京中医药大学,2011:65—66.
- [3] 鲁梦倩.电针对坐骨神经损伤大鼠感觉运动传导通路中GAP-43表达影响的研究[J].北京:北京中医药大学,2013:63—65.
- [4] Ernfors P. Identification of cells in rat brain and peripheral tissue expressing mRNA for members of the nerve growth factor family[J].Neuro,1990,5:511.
- [5] Antonov I,Chang S,Zakharenko S,et al.Distribution of neurotransmitter secretion in growing axons[J].Neuroscience,1999, 90(3):976—980.
- [6] 韩济生.神经科学[M].第3版.北京:北京大学医学出版社,2009: 486—487.
- [7] Nakamura M, Bregman BS. Differences in neurotrophin factor gene expression[J]. Experimental Neurology,2001,169(2): 410—413.