

·基础研究·

督脉电针与夹脊电针对受损伤的大鼠脊髓背核神经元存活及其 NOS 表达的影响比较*

丁 英¹ 曾园山^{1,2,3} 陈雅云¹ 张燕青¹ 陈穗君¹

摘要 目的:比较督脉电针和夹脊电针对受损伤的脊髓背核神经元存活及其表达 NOS 的影响。方法:将 10 只 SD 雌性大鼠(180—200g)分为督脉电针组和夹脊电针组。将两组动物制备全横断脊髓损伤模型,术后第 5d 进行电针治疗,一组行督脉电针治疗,另一组行夹脊电针治疗。电针治疗 30d 后,将两组动物灌注、固定和取材,冰冻切片,做 NADPH-黄递酶组织化学染色检测脊髓背核神经元一氧化氮合酶(NOS)的活性。分别计数 L1 脊髓背核存活神经元数目及其表达 NOS 神经元数。结果:督脉电针组 L1 脊髓背核存活神经元数目是 218.50 ± 7.23 , 表达 NOS 的神经元数是 8.20 ± 0.82 , 夹脊电针组 L1 脊髓背核存活神经元数目是 188.60 ± 6.48 , 表达 NOS 的神经元数是 17.80 ± 1.79 。督脉电针组 L1 脊髓背核存活神经元数目多于夹脊电针组($P < 0.05$), 并且督脉电针组 L1 脊髓背核表达 NOS 的神经元数明显少于夹脊电针组($P < 0.05$)。结论:督脉电针比夹脊电针能够更好地促进受损伤的脊髓背核神经元存活以及抑制受损伤的脊髓背核神经元表达 NOS。

关键词 电针; 脊髓损伤; 背核; 神经元存活; 一氧化氮合酶

中图分类号: R245.97, R651.2, R49 文献标识码: A 文章编号: 1001-1242(2006)-01-0008-03

A comparison of the effects of electric acupuncture stimulation between Dumai and Jiaji on the neuronal survival and expression of nitric oxide synthase at Clarke's nucleus in injured spinal cord/DING Ying, ZENG Yuanshan, CHEN Yayun, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2006, 21(1): 8—10

Abstract Objective: To compare the effects of electric acupuncture (EA) stimulation between Dumai and Jiaji on the neuronal survival and expression of nitric oxide synthase(NOS) at Clarke's Nucleus(CN) in injured spinal cord. **Method:** Ten Sprague Dowley(SD) female rats(180—200g) were divided into Dumai EA group and Jiaji EA group. The spinal cord was completely transected in the two groups. At 5th day after operation, the animals of Dumai EA group were performed EA stimulation of Dumai acupoint, while the animals of Jiaji EA group were performed EA stimulation of Jiaji acupoint. At 30th day after EA stimulation, the animals of two groups were perfused and fixed. L1 spinal segment was cut coronally on a cryostat. The activity of NOS in CN neurons of spinal cord was detected by NADPH-diaphorase histochemistry. The number of surviving CN neurons and NOS-expressing neurons was counted respectively in L1 spinal segment. **Result:** In the Dumai EA group, the number of surviving CN neurons and NOS-expressing neurons was respectively 218.50 ± 7.23 and 8.20 ± 0.82 in L1 spinal segment. In the Jiaji EA group, the number of surviving CN neurons and NOS-expressing neurons was respectively 188.60 ± 6.48 and 17.80 ± 1.79 . The number of surviving CN neurons in L1 spinal segment in the Dumai EA group was more than that in the Jiaji EA group($P < 0.05$), and the number of NOS-expressing neurons at Clarke's nucleus in L1 spinal segment in the dumai EA group was less than that in the Jiaji EA group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Compared with EA stimulation of Jiaji acupoint, EA stimulation of Dumai acupoint is a more effective way to promote the survival of neurons and inhibit NOS-expressing of neurons at Clarke's nucleus in injured spinal cord.

Author's address Division of Neuroscience, Dept. of Histology and Embryology, Zhongshan Medical College, Sun Yat-sen University, Guangzhou, 510080

Key words electric acupuncture; spinal cord injury; Clarke's nucleus; survival of neurons; nitric oxide synthase

临床上有用督脉电针治疗脊髓损伤患者,并观察到有些患者的症状得到改善,同时伴随有一定的功能恢复^[1],但缺乏有说服力的形态学依据。本研究组先前的研究发现,督脉电针能够促进大鼠全横断损伤的脊髓部分结构及其功能修复^[2-3]。其他学者的研究以及临床上已证实督脉电针和夹脊电针都可以

* 基金项目:国家自然科学基金(30472132);广东省中医药管理局科研基金(101139 和 303013)

1 中山大学中山医学院组织胚胎学教研室神经科学教研室,广州市中山二路 74 号,510080

2 中山大学脊髓损伤研究所

3 通讯作者:曾园山(中山大学中山医学院组织胚胎学教研室神经科学教研室,广州市中山二路 74 号,510080)

作者简介:丁英,女,硕士,助教

收稿日期:2005-07-01

改善受损伤脊髓的功能和促进受损伤脊髓的神经再生^[4-6]。但对督脉电针和夹脊电针这两种方式在治疗大鼠脊髓全横断损伤方面哪一种更有效果, 目前还未见文献报道。为此, 本研究试图比较督脉电针与夹脊电针对受损伤的脊髓背核神经元存活及其表达 NOS 的影响, 为临床更有效地应用电针治疗脊髓损伤患者提供实验资料。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

采用 180—200g 雌性 Sprague Dowley (SD) 大鼠 (中山大学北校区实验动物中心提供) 10 只, 随机分为 2 组: 督脉电针组和夹脊电针组。用 1% 的戊巴妥钠 (40mg/kg) 经腹腔注射麻醉大鼠, 固定于自制的手术台上, 切开皮肤, 暴露 T8—T10, 在手术显微镜下咬骨钳撬除 T9 椎板, 暴露 T11 脊髓段, 制备脊髓全横断损伤模型。术后第 5d 对两组大鼠进行电针治疗。督脉电针组取距离脊髓损伤段上下端两个椎体的棘突间隙阿是穴、腰俞穴和长强穴各刺入一枚毫针, 连接电针仪, 断续波, 强度 15mV, 频率 2Hz, 持续 20min。夹脊电针组是在距离脊髓损伤段上下端两个椎体的棘突间隙旁开后正中线约 3—4mm 处取穴, 在腰俞穴和长强穴位旁约 3—4mm 处取穴, 各刺入一枚毫针, 连接电针仪, 断续波, 强度 15mV, 频率 2Hz, 持续 20min。隔天 1 次电针治疗, 疗程为 30d。

1.2 灌注、固定、取材合酶组织化学染色

在术后 30d 用 1% 的戊巴妥钠 (40mg/kg) 经腹腔注射麻醉大鼠, 开胸, 经左心室主动脉插管, 先灌注生理盐水 180ml, 随后灌注含 4% 多聚甲醛的 0.1mol/L 磷酸盐 (PBS) 缓冲液 (pH7.4) 400ml 固定动物。取 T9—L2 脊髓段, 放入新鲜的固定液内后固定 4h, 再入 30% 蔗糖溶液, 置 4℃ 下至沉底。取 L1 脊髓段做冰冻切片, 片厚 25μm。做尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸黄递酶 (NADPH-d) 酶组织化学染色。将脊髓横切片置入下述反应液: 1mmol/L NADPH, 1mmol/L 硝基氮蓝四唑 (NBT) 和 0.3% TritonX-100 的 0.1mol/L PBS (pH8.0) 中, 37℃ 下孵育 60min 后, 经 0.01mol/L PBS (pH7.4) 漂洗, 终止反应, 贴片晾干。随后进行尼氏染色, 切片在 1% 中性红溶液中染色 5min, 蒸馏水分数, 梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 中性树脂封片。

1.3 细胞计数及统计学分析

将每只大鼠 L1 脊髓段连续切片隔 5 张取 1 张, 每一个标本共 15 张切片, 在光镜下 (10×20) 计数每张切片背核内神经元数目。在计数时, 只计算具有细胞核的神经元胞体。同时计数背核内 NADPH-d 酶

组化染色阳性的神经元数目。上述各组间数据用两样本的 *t* 检验处理。

2 结果

2.1 督脉电针和夹脊电针对全横断脊髓损伤的大鼠背核神经元存活的影响

背核位于脊髓灰质中央管的背外侧, 相当于脊髓 VII 板层的一部分。L1 背核的边界较明显, 其中可见被中性红染成红色的大小不等的神经元胞体。督脉电针组 L1 脊髓背核存活神经元数目是 218.50 ± 7.23 , 夹脊电针组 L1 脊髓背核存活神经元数目是 188.60 ± 6.48 , 督脉电针组 L1 脊髓背核存活神经元数目多于夹脊电针组 ($P < 0.05$) (见表 1)。而且, 督脉电针组 L1 背核内可见一些胞体较大的神经元, 但夹脊电针组 L1 背核内较少见到这种大神经元。

表 1 两组大鼠脊髓背核内神经元存活数目及其表达 NOS 的神经元数的比较

组别	例数	神经元存活数(个数)	NOS 阳性神经元数(个数)
督脉电针组	5	18.50 ± 7.23^{①}	8.20 ± 0.82^{①}
夹脊电针组	5	88.60 ± 6.48	17.80 ± 1.79

①与夹脊电针组比较 $P < 0.05$

2.2 督脉电针和夹脊电针对全横断脊髓损伤的大鼠背核神经元表达 NOS 的影响

在 NADPH-d 染色下, 脊髓灰质 NOS 阳性细胞呈紫蓝色。这些 NOS 阳性细胞主要为神经元, 它们伸出明显的突起, 主要位于脊髓中央管周围的灰质和中间外侧带, 前角和后角也有神经元表达 NOS。我们以前的实验观察到没有受损伤的脊髓背核不呈现 NADPH-d 活性, 但当脊髓损伤时, 受损伤的背核神经元则能显示 NADPH-d 活性。在本实验中, 督脉电针组 L1 脊髓背核表达 NOS 的神经元数是 8.20 ± 0.82 , 夹脊电针组 L1 脊髓背核表达 NOS 的神经元数是 17.80 ± 1.79 。督脉电针组 L1 脊髓背核表达 NOS 的神经元数明显少于夹脊电针组 ($P < 0.05$)。见表 1 和图 1—2。

3 讨论

目前对急性脊髓损伤治疗的焦点集中在阻止或减少继发性损伤的发生, 最大限度地保存受伤脊髓的功能。近年来研究发现, 脊髓损伤后早期就出现 nNOSmRNA 的表达及其活性的升高^[7], 这一反应可能是机体的一种代偿机制, 脊髓损伤早期主要表现为局部缺血, 从而需要大量的 NO 来维持局部血供, 以达到内环境的稳定。脊髓损伤后也可导致大量的钙离子内流, 而 nNOS 是钙依赖性酶, 导致其活性增加。脊髓损伤的后期 iNOSmRNA 的表达也增加,

图1 督脉电针组 L1 脊髓背核存活神经元和
表达 NOS 的神经元(箭头) 图标尺为 20 μ m

NOS 的活性显著增高,NO 产生显著增多。NO 可介导谷氨酸的神经毒性,进一步加重细胞损害作用。张志英等^[8]研究表明电针的早期治疗可降低 nNOSmRNA、iNOSmRNA 的表达,也可降低 NOS 的活性,减少 NO 的产生。从而认为电针通过机体内在的调节机制来调节 NOS 表达的,减少 NO 的产生,起到一定的神经保护作用。崔晓军等^[9]通过电针百合治疗脊髓损伤,观察到电针百合能上调脊髓灰质 eNOS 表达,同时下调脊髓损伤所致 nNOS、iNOS 的异常表达,从而减少总 NO 的生成量,降低损伤引起的毒性作用,对脊髓组织具有一定的保护作用。他们推测电针通过释放内源性阿片肽,一方面抑制传入神经末梢谷氨酸、P 物质的释放,影响 NMDA 受体的激活,另一方面与神经元上阿片受体结合,抑制钙通道活性,影响钙离子内流,使细胞内 NOS 不能被激活。在本研究中,我们通过用两种不同穴位电针方式治疗全横断脊髓损伤大鼠,观察受损伤的脊髓背核神经元存活及其表达 NOS 情况。结果显示,督脉电针组的受损伤背核神经元存活明显多于夹脊电针组,而且督脉电针组表达 NOS 的受损伤背核神经元数量明显少于夹脊电针组。电针督脉是一种脉冲电场具有针刺和电场双重作用。本实验结果提示,应用督脉电针治疗全横断脊髓损伤能更有效地降低脊髓背核受损伤神经元表达 NOS,从而减少 NO 的生成,进而

图2 夹脊电针组 L1 脊髓背核存活神经元和
表达 NOS 的神经元(箭头) 图标尺为 20 μ m

减少 NO 的毒性作用,使背核受损伤神经元的存活数目多于夹脊电针组。因此,本实验结果表明督脉电针比夹脊电针更有效地降低脊髓背核受损伤神经元表达 NOS,促进背核神经元的存活。

参考文献

- [1] 许健鹏,王明久,刘学茹,等. 以督脉电针为主治疗脊髓损伤 80 例的临床观察[J]. 针灸临床杂志, 1994,10(6):13.
- [2] 郭家松,曾园山,陈玉玲,等. 督脉电针治疗大鼠全横断性脊髓损伤的实验研究[J]. 中国针灸, 2003,23(6):351.
- [3] 李晓滨,曾园山,陈玉玲,等. 督脉电针与神经干细胞移植对脊髓全横断大鼠后肢功能恢复的影响 [J]. 解剖学报,2004,35(6):582.
- [4] 李晓滨,曾园山,陈玉玲,等. 督脉电针与神经干细胞移植联合应用促进全横断脊髓损伤组织产生内源性神经生长活性物质的研究[J]. 解剖学报,2005,36(1):56.
- [5] 曾园山,李晓滨,郭家松,等. 督脉电针与神经干细胞移植在脊髓损伤修复中的作用[J]. 中国康复医学杂志, 2005, 20(6):468.
- [6] 楚佳梅,范文双. 夹脊电针治疗大鼠脊髓损伤的实验研究[J]. 中医药学刊,2003,21(3):407.
- [7] Hamada Y, Ikata T, Katoh S, et al. Roles of nitric oxide in compression injury of rat spinal cord [J]. Free Radic Biol Med, 1996,20(1):1.
- [8] 张志英,严振国. 电针对脊髓损伤后一氧化氮合酶表达的影响 [J]. 中国临床康复,2002,6(2):206.
- [9] 崔晓军,李伊为,陈东风,等. 电针百合对脊髓损伤大鼠脊髓组织 3 种亚型 NOS 表达及 NO 含量的影响 [J]. 中医药学刊, 2003,21(8):1270.