

# 电针刺激对大鼠脊髓损伤后炎症反应的影响

邹恩苗<sup>1</sup> 胡洁<sup>1</sup> 高丽萍<sup>1</sup> 屠文展<sup>1</sup> 林海燕<sup>1△</sup>

**[摘要]** 目的:观察不同配穴电针方式对脊髓损伤(SCI)大鼠 IL-1 $\beta$ , IL-6 及 IL-10 表达的影响,探讨电针在脊髓损伤修复过程中的作用机制。方法:48 只 SD 大鼠随机分为 4 组:假手术组(12 例)、对照组(12 例)、夹脊电针组(12 例)、督脉电针组(12 例)。术后第 7 天对各组大鼠进行 BBB 运动功能评分,并采用苏木精-伊红及 Nissle 染色观察组织细胞形态变化,采用实时荧光定量 PCR 法检测白介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ),白介素-6(IL-6)和白介素-10(IL-10) mRNA 的表达情况。结果:术后第 7 天对照组、夹脊电针组、督脉电针组 BBB 评分均低于假手术组( $P < 0.05$ ),夹脊电针组、督脉电针组 BBB 评分均高于对照组( $P < 0.05$ );对照组、夹脊电针组、督脉电针组 IL-1 $\beta$ , IL-6 及 IL-10 mRNA 的表达含量均高于假手术组( $P < 0.05$ );夹脊电针组、督脉电针组 IL-1 $\beta$ , IL-6 mRNA 的表达含量均低于对照组( $P < 0.05$ );夹脊电针组、督脉电针组 IL-10 mRNA 的表达含量均高于对照组( $P < 0.05$ );夹脊电针组与督脉电针组 IL-1 $\beta$ , IL-6 及 IL-10 mRNA 的表达差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。结论:夹脊、督脉电针均可以改善大鼠 SCI 后下肢运动功能,降低 IL-1 $\beta$  和 IL-6 的表达,增加 IL-10 的表达,抑制 SCI 后炎症反应。

**[关键词]** 脊髓损伤;电针;白介素-1 $\beta$ ;白介素-6;白介素-10

**[中图分类号]** R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2018)10-0010-04

## Effects of Electroacupuncture on Inflammatory Response in Spinal Cord Injury of Rats

ZOU Enmiao<sup>1</sup> HU Jie<sup>1</sup> GAO Liping<sup>1</sup> TU Wenzhan<sup>1</sup> LIN Haiyan<sup>1△</sup>

<sup>1</sup>Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325027, Zhejiang China.

**Abstract Objective:** To observe the effect of electroacupuncture treatment(EA)at different acupoints on the expression of IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-10 in rats with spinal cord injury(SCI)and discuss the role and mechanism of electroacupuncture in the repair process of spinal cord injury. **Methods:** A total of 48 SD rats were randomly divided into 4 groups: sham operation group( $n=12$ ), control group( $n=12$ ), Jiaji EA group( $n=12$ ), and Du Meridian EA group( $n=12$ ). Scores of Basso Beattie Bresnahan(BBB)motor functions were assessed at 7th days after operation. Histopathological changes were observed by HE and Nissle staining. The expressions of IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-10 mRNA were detected by quantitative real time-PCR (qRT-PCR). **Results:** The BBB scores of the control group, Jiaji EA group, and Du meridians EA group were lower than the sham operation group on the 7th day after operation( $P < 0.05$ ). The BBB scores of Jiaji EA group and Du meridians EA group were higher than the control group( $P < 0.05$ ). The expression levels of IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-10 mRNA in the control group, Jiaji EA group and Du meridians EA group were higher than those in the sham operation group( $P < 0.05$ ). The expression levels of IL-1 $\beta$  and IL-6 mRNA in the Jiaji EA group and Du meridian EA group were lower than those in the control group( $P < 0.05$ ). The expression levels of IL-10 mRNA in Jiaji EA group and Du meridians EA group were high than those in the control group( $P < 0.05$ ). The expressions of IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-10 mRNA in Jiaji EA group and Du meridian EA group had no statistical significance( $P > 0.05$ ). **Conclusion:** Jiaji and Du Meridian EA could improve the motor function of the SD rats' lower limb, reduce the expression of IL-1 $\beta$  and IL-6 and increase expression of IL-10 and inhibit the inflammatory response after SCI.

**Keywords:** spinal cord injury; electroacupuncture; interleukin-1 $\beta$ ; interleukin-6; interleukin-10

基金项目:浙江省温州市科技局资助项目(Y20110105)

<sup>1</sup>温州医科大学附属第二医院(育英儿童医院)(浙江 温州, 325027)

<sup>△</sup>通信作者 E-mail:linhaiyan107@163.com

脊髓损伤(Spinal Cord Injury, SCI)病情严重复杂,预后差,易造成终生残疾或危及生命。脊髓损伤包括原发性损伤阶段和继发性损伤阶段,炎症反应在调

节脊髓损伤的发生机制中起核心作用,是继发性损伤阶段的重要组成部分<sup>[1]</sup>。减轻脊髓损伤后早期炎症反应,可抑制继发性损伤,并促进脊髓神经机能恢复<sup>[2,3]</sup>。针灸是中国传统医学的重要组成部分,其中电针治疗,针刺同时结合低频直流电,在临床中可应用于许多疾病的治疗。研究发现,电针可促进神经系统疾病的神经功能恢复<sup>[4,5]</sup>。本实验建立大鼠急性脊髓损伤模型,分别电针夹脊、督脉穴对其进行治疗,观察脊髓组织细胞形态变化,检测 IL-1 $\beta$ , IL-6 和 IL-10 mRNA 表达的变化,以及脊髓损伤后大鼠运动功能变化,探讨电针对脊髓损伤后神经保护作用的可能机制,并分析不同配穴电针方式对大鼠脊髓损伤的影响差异。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

雄性、清洁级 SD 大鼠 48 只,体质量 180~220 g,中位数 208 g,购自温州医科大学实验动物中心,实验动物许可证号 SYXK(浙)2010-0150,于温度 20~25℃,湿度 42%~50%中分笼饲养。

### 1.2 实验试剂

Harris 苏木素液(北京中杉金桥生物技术有限公司),尼氏染色液,Trizol Reagent(invitrogen 公司),Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit(TaKaRa 公司)。

### 1.3 实验仪器

MASCIS Impactor(NYU, USA),韩氏穴位神经刺激仪(南京济生医疗科技有限公司),LightCycler 实时荧光定量 PCR(美国 Roche 公司),薄壁无裙边 96 孔板(矮管)(汉爵克斯贸易(上海)有限公司),680 型全自动酶标仪(美国 Bio-Rad 公司)。

### 1.4 方法

**1.4.1 模型制备** SD 大鼠腹腔注射 5%水合氯醛 7 mL/kg,麻醉后以 T<sub>10</sub> 为中心,正中切开皮肤,咬除 T<sub>9</sub>~T<sub>11</sub> 棘突及全部椎板,暴露 T<sub>10</sub> 脊髓,保持硬脊膜完整,使用 NYU Impactor 精确撞击<sup>[6]</sup>,制作大鼠 SCI 中度损伤(T<sub>10</sub>, 10 g, 25 mm)模型。模型成功标准:1)双下肢及躯体回缩扑动;2)大鼠尾巴痉挛摆动;3)双下肢迟缓性瘫痪。术后第 1~3 天予青霉素腹腔注射(0.2 mL/kg)预防感染,术后人工协助排尿 3 次/d。

**1.4.2 动物分组及治疗方法** 48 只大鼠随机分为假手术组、对照组、夹脊电针组、督脉电针组,每组 12 只。假手术组只打开椎板,无脊髓损伤及电针治疗;对照组 SCI 后不予以电针治疗;夹脊电针组 SCI 后,电针于损伤脊髓节段上下两对夹脊穴;督脉电针组 SCI 后,电针于损伤脊髓节段上下两个督脉穴。电针组均于打击

损伤成功后 30 min 内进行首次电针治疗,持续 30 min,1 次/d,总共电针 7 d。电针治疗仪参数:采用连续脉冲,频率 2 Hz,输出电流 0.6~1.0 mA,以大鼠针刺部位出现轻度跳动且大鼠无明显挣扎为准(见图 1)。

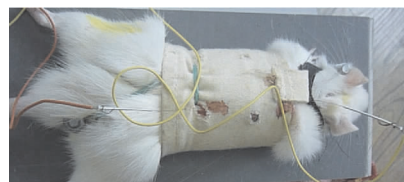


图 1 电针刺刺激示意图

**1.4.3 BBB 运动功能评分评价大鼠 SCI 后下肢运动功能变化** 各组分别于术前及术后第 7 天行 BBB(Basso, Beattie and Bresnahan)评分,最低分 0 分,最高分 21 分。每次评分均采用双人、双盲独立观察记录,最后取平均值。

**1.4.4 苏木精-伊红及 Nissle 染色** 大鼠术后第 7 天取损伤中心脊髓,4%多聚甲醛中 4℃浸过夜、梯度酒精脱水、二甲苯透明、石蜡包埋、切片。按苏木精-伊红及 Nissle 试剂盒说明书进行操作,光学显微镜下观察损伤脊髓组织细胞形态变化。

**1.4.5 实时荧光定量 PCR 法测定 IL-1 $\beta$ , IL-6 及 IL-10 mRNA 表达** 大鼠术后第 7 天以损伤区为中心取 5 mm 脊髓至 -80℃超低温冰箱保存。依据说明书,Trizol 法提取总 RNA,测定浓度后取 1  $\mu$ g RNA,根据 TaKaRa 公司逆转录试剂盒(RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit)说明书逆转录合成 cDNA。参考 TaKaRa 公司荧光实时定量 PCR 试剂盒(SYBR® Premix Ex Taq™(Perfect Real Time))说明书行实时荧光定量 PCR 反应, GAPDH 为内参照基因。所有标本均被重复检测 3 次。分析融链曲线,用 CT 值比较法来计算损伤脊髓组织内 IL-1 $\beta$ , IL-6 及 IL-10 mRNA 的相对表达量。

### 1.5 统计学方法

采用 SPSS18.0 统计学软件进行数据分析,计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间比较运用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验,方差齐性检验采用 Levene 检验。 $P < 0.05$  差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 后肢 BBB 运动功能评分比较

术前各组大鼠 BBB 评分均为 21 分,术后第 7 天对照组、夹脊电针组、督脉电针组 BBB 评分降低,均低于假手术组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );夹脊电针组、督脉电针组 BBB 评分均高于对照组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。夹脊电针组与督脉电针组差异无统计学意义,见表 1。

表 1 术后第 7 天 BBB 运动功能评分比较(̄±s)

组别	鼠数	BBB 运动功能评分
假手术组	12	21.00±0.00
对照组	12	5.96±0.62 <sup>1)</sup>
夹脊电针组	12	8.79±0.58 <sup>1)2)</sup>
督脉电针组	12	8.75±0.58 <sup>1)2)3)</sup>
F		2 033.76
P		<0.01

注:1)与假手术组比较, P 值分别为<0.01(对照组)、<0.01(夹脊电针组),<0.01(督脉电针组);2)与对照组比较, P 值分别为<0.01(夹脊电针组),<0.01(督脉电针组);3)与夹脊电针组比较, P 值为 0.844(督脉电针组), P>0.05.

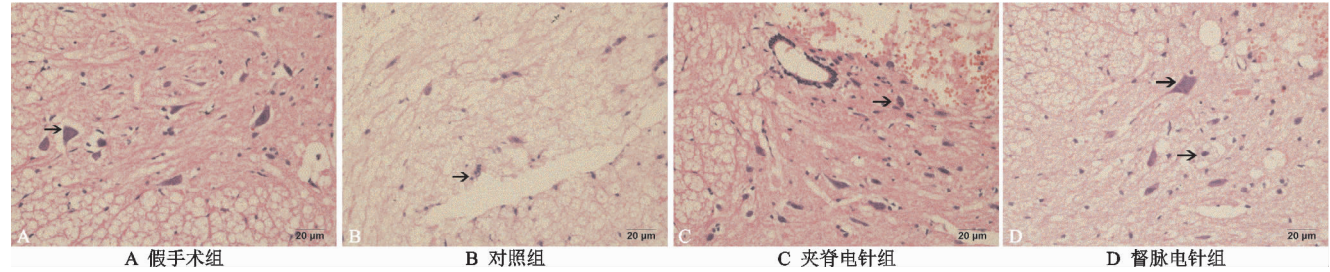


图 2 电针后脊髓苏木精-伊红染色病理变化(50×)

2.3 电针后脊髓 Nissle 染色病理变化

光镜下可见:假手术组可见尼氏体神经细胞经甲苯胺蓝染色后呈浓密的蓝色颗粒完整结构,神经元细胞数目多(见图 3A)。对照组可见尼氏体神经元数量显著降

2.2 电针后脊髓苏木精-伊红染色病理变化

光镜下观察假手术组脊髓结构完整,灰白质边界清楚。可见前角运动神经元细胞类圆形,胞浆丰富,边界清晰,周围有较多的中小型神经细胞及胶质细胞(见图 2A)。对照组可见脊髓结构破坏,灰质中可见缺损区,大量神经元核固缩(见图 2B)。夹脊电针组(见图 2C)和督脉电针组(见图 2D),神经元的损伤范围介于假手术组和对照组之间;脊髓构造欠清晰,出血、坏死和周边组织水肿较对照组轻,神经元残留,但染色模糊,结构不清。

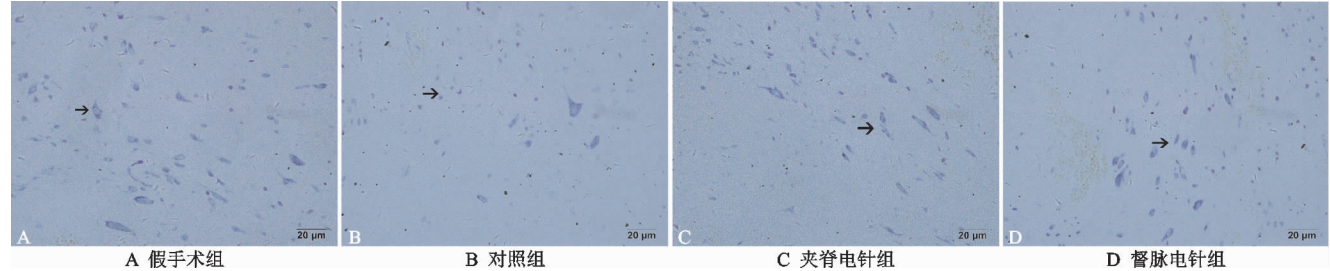


图 3 电针后脊髓 Nissle 染色病理变化(50×)

2.4 电针后脊髓 IL-1β, IL-6 及 IL-10 mRNA 的表达

实时荧光定量 PCR 定量显示,造模 7 d 后假手术组、对照组、夹脊电针组及督脉电针组 IL-1β mRNA 的相对表达含量分别为 1.59±0.90, 6.43±1.02, 4.60±0.34 及 4.71±0.36; IL-6 mRNA 的相对表达含量分别为 0.58±0.06, 5.68±0.32, 3.73±0.32 及 4.30±0.21; IL-10 mRNA 的相对表达含量分别为 0.57±0.18, 2.92±0.44, 3.48±0.59 及 3.48±0.59。对照组、夹脊电针组、督脉电针组 IL-1β, IL-6 及 IL-10 mRNA 的表达含量均高于假手术组,差异有统计学意义(P<0.05);夹脊电针组、督脉电针组 IL-1β 和 IL-6 mRNA 的表达含量均低于对照组,差异有统计学意义(P<0.05);夹脊电针组、督脉电针组 IL-10 mRNA 的表达含量均高于对照组,差异有统计学意义(P<0.05);夹脊电针组与督脉电针组受损组织 IL-1β, IL-6 及 IL-10 mRNA 表达比较无统计学意

低,神经元形态显示不规则,甲苯胺蓝染色也显著变浅,色泽暗淡(见图 3B)。在夹脊电针组(见图 3C)和督脉电针组(见图 3D),均可见神经元数量介于假手术组和对照组之间,细胞质呈染色较浅的颗粒状形态。

义(P>0.05),见图 4.

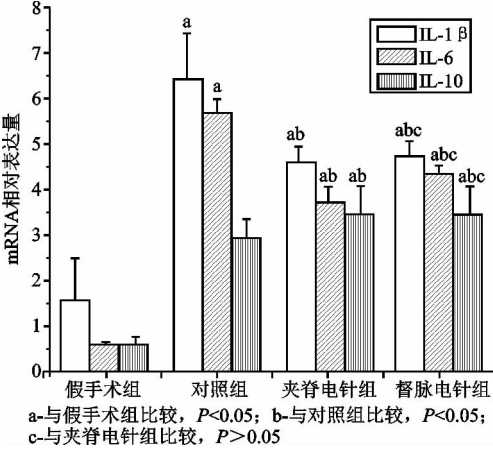


图 4 电针后脊髓 IL-1β, IL-6 及 IL-10 mRNA 相对表达量

3 讨论

众所周知,过度炎症反应将会导致严重的脊髓继发性损伤,加剧脊髓组织损伤及神经元细胞的凋亡,影

响 SCI 后神经的修复和功能的改善。IL-1 $\beta$  是一种具有多种生物学功能的炎性细胞因子,SCI 后 IL-1 $\beta$  表达升高,启动凋亡基因表达,诱导细胞凋亡,引起细胞水肿,加重炎症反应<sup>[7,8]</sup>。IL-6 可在内毒素、IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  刺激下由多种细胞反应产生,可诱导硫酸软骨素蛋白多糖表达上调,促进胶质瘢痕的形成,抑制轴突生长<sup>[9]</sup>。IL-10 是一种抗炎细胞因子,具有免疫调节作用,其上调能抑制 IL-1 $\beta$ ,IL-6 及 TNF- $\alpha$  等炎症因子的过度表达和释放<sup>[10]</sup>。在中枢神经系统中,过多炎症介质的产生可能导致细胞水肿,细胞代谢应激及组织坏死<sup>[11]</sup>。因此,采取各种措施防止或抑制炎症的过程已经成为 SCI 治疗的关键手段之一。

已有研究表明,针刺治疗能够改善 SCI 后脊髓供血,抑制神经细胞凋亡,促进神经功能恢复<sup>[12,13]</sup>。电针具有针刺和电刺激双重功效,其治疗 SCI 的机理更加复杂,本实验选取电针夹脊穴及督脉穴,考虑夹脊及督脉穴分别属于节段叠加配穴范畴和中轴贯通配穴范畴<sup>[14]</sup>,对上述穴位进行有效针刺并加以电刺激,可以疏通督脉,振奋阳气,达到阴阳调和的作用。脊髓损伤伴随着炎症反应的发生,而 Yang 等研究<sup>[15,16]</sup>表明,电针治疗具有抑制炎症、减轻细胞受损、抗凋亡及镇痛等作用。本研究发现,SCI 后大鼠 IL-1 $\beta$ ,IL-6 及 IL-10 表达明显增高,经电针夹脊、督脉穴治疗后均可明显降低脊髓损伤组织中 IL-1 $\beta$  和 IL-6 的浓度,升高 IL-10 的表达,提示脊髓损伤后电针夹脊、督脉穴通过减少脊髓组织炎性细胞因子 IL-1 $\beta$  和 IL-6 生成,增加抗炎细胞因子 IL-10 的表达,减轻脊髓神经组织的炎症反应,从而可能促进受损神经的恢复或延缓继发性损害,具有神经保护作用。此外,本研究结果发现,夹脊电针组与督脉电针组受损伤脊髓组织中 IL-1 $\beta$ ,IL-6 及 IL-10 mRNA 表达差异无统计学意义,提示电针夹脊和电针督脉治疗 SCI 的炎症反应的效果无明显差异。

脊髓损伤是一个多系统的复杂过程,在以后的实验研究中,需要进一步研究针灸具体可靠的作用机制,为临床治疗提供有效的实验依据。

## 参考文献

- [1] Anwar MA, Shehabi TSA, Eid AH. Inflammogenesis of secondary spinal cord injury[J]. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 2016, 10(98): 1-24.
- [2] Mao X, Miao G, Tao X, et al. Saikosaponin a protects TBI rats after controlled cortical impact and the underlying mechanism[J]. *American Journal of Translational Research*, 2016, 8(1): 133-141.
- [3] Kim Y, Jo S, Wan HK, et al. Antioxidant and anti-inflammatory effects of intravenously injected adipose derived mesenchymal stem cells in dogs with acute spinal cord injury[J]. *Stem Cell Research & Therapy*, 2015, 6(1):

- 229.
- [4] Kang YT, Liao YS, Hsieh CL. Different effects of transcutaneous electric nerve stimulation and electroacupuncture at ST36-ST37 on the cerebral cortex[J]. *Acupuncture in Medicine Journal of the British Medical Acupuncture Society*, 2015, 33(1): 36-41.
- [5] 吴明莉,冯晓东,王永福. 夹脊穴、督脉穴电针治疗脊髓损伤患者的疗效观察[J]. *中华物理医学与康复杂志*, 2016, 38(11): 858-859.
- [6] Jin HP, Kim JH, Oh SK, et al. Analysis of equivalent parameters of two spinal cord injury devices: the new york university impactor versus the infinite horizon impactor[J]. *Spine Journal*, 2016, 16(11): 1392-1403.
- [7] Zhou W, Yuan T, Gao Y, et al. IL-1 $\beta$ -induces NF- $\kappa$ B and upregulates microRNA-372 to inhibit spinal cord injury recovery[J]. *Journal of Neurophysiology*, 2017, 117(6): 2282-2291.
- [8] Boato F, Rosenberger K, Nelissen S, et al. Absence of IL-1 $\beta$  positively affects neurological outcome, lesion development and axonal plasticity after spinal cord injury[J]. *Journal of Neuroinflammation*, 2013, 10(1): 1-11.
- [9] Balduino L FM. Spinal cord injury: from inflammation to glial scar[J]. *Surgical Neurology International*, 2011, 2(1): 112.
- [10] Zhou Z, Peng X, Insolera R, et al. IL-10 promotes neuronal survival following spinal cord injury[J]. *Experimental Neurology*, 2009, 220(1): 183-190.
- [11] Ren G, Zhao X, Zhang L, et al. Inflammatory cytokine-induced intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in mesenchymal stem cells are critical for immunosuppression[J]. *Journal of Immunology*, 2010, 184(5): 2321-2328.
- [12] 李华南,张海明,顾兵,等. 针刺促进脊髓损伤后神经功能恢复的机制及相关信号通路的作用[J]. *中国康复理论与实践*, 2017, 23(6): 641-644.
- [13] Ma R, Liu X, Clark J, et al. The impact of acupuncture on neurological recovery in spinal cord injury: a systematic review and meta-analysis[J]. *J Neurotrauma*, 2015, 32(24): 1943-1957.
- [14] 陈荣良,杜伟斌,全仁夫,等. 针刺夹脊穴及督脉穴对急性脊髓损伤神经传导通路影响的研究[J]. *中国中医急症*, 2016, 25(4): 619-622.
- [15] Yang JH, Lv JG, Wang H, et al. Electroacupuncture promotes the recovery of motor neuron function in the anterior horn of the injured spinal cord[J]. *Neural Regen Res*, 2015, 10(12): 2033-2039.
- [16] 刘建敏,王福川,周亚净,等. 电针刺激对脊髓挫伤模型大鼠神经细胞凋亡的影响[J]. *中国组织工程研究*, 2016, 20(5): 616-621.