

督脉电针治疗对脊髓损伤大鼠神经细胞自噬及凋亡的影响

邹恩苗¹ 高丽萍¹ 胡洁¹ 林海燕¹ 屠文展^{1△}

[摘要] 目的:探讨电针治疗对脊髓损伤大鼠神经细胞自噬、凋亡及运动功能的影响。方法:将 36 只 SD 大鼠按照随机数字表法分为假手术组、脊髓损伤组、督脉电针组,每组 12 只。采用 MASCIS Impactol 精确撞击制作脊髓损伤模型。假手术组只行椎板切除术,不造成脊髓损伤;脊髓损伤组采用 MASCIS Impactol 法制作脊髓损伤模型,不进行干预治疗;督脉电针组在脊髓损伤后给予督脉电针治疗。于损伤后第 1,3,7 天分别对各组大鼠进行 BBB 运动功能评分。损伤后第 7 天取脊髓组织,用 Western Blot 法检测微管相关蛋白 1 轻链 3(LC3-Ⅱ)的变化,用 TUNEL 法检测细胞凋亡情况。结果:损伤后第 3 天和第 7 天,督脉电针组 BBB 评分为(5.8±0.9)和(9.5±0.9),与脊髓损伤组(4.1±0.8)和(6.4±0.7)分比较显著升高,差异有统计学意义($P<0.05$),而术后第 1 天两者评分为(2.8±0.7)和(2.4±0.5),差异无统计学意义($P>0.05$)。与假手术组相比,脊髓损伤组 LC3-Ⅱ 表达明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$),细胞凋亡显著增加,差异有统计学意义($P<0.05$);与脊髓损伤组相比,督脉电针组 LC3-Ⅱ 显著升高,差异有统计学意义($P<0.05$),细胞凋亡显著降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。结论:督脉电针治疗能增强脊髓损伤大鼠神经细胞自噬,减少凋亡,改善大鼠运动功能。

[关键词] 督脉电针;脊髓损伤;细胞凋亡;自噬;微管相关蛋白 1 轻链 3-Ⅱ

[中图分类号] R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2019)11-0011-04

Effect of Du Meridian Electro Acupuncture on Autophagy and Apoptosis after Spinal Cord Injury in Rats

ZOU Enmiao¹ GAO Liping¹ HU Jie¹ LIN Haiyan¹ TU Wenzhan^{1△}

¹ The Second Affiliated Hospital (Yuying Children's Hospital) of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325027, Zhejiang China.

Abstract Objective: To explore the effect of electro acupuncture(EA) on autophagy, apoptosis and locomotor function after spinal cord injury in rats. **Methods:** Thirty-six adult female SD rats were randomly divided into three groups: Sham surgery group, spinal cord injury(SCI) group and Du meridian EA group, with 12 rats in each group. Spinal cord injury model was established using precision impacting with MASCIS Impactol. The Sham group only received laminectomy. The rats in SCI group were sustained SCI and were given no intervention. The rats in Du meridian EA group received Du meridian EA treatment after SCI. Scores of Basso Beattie Bresnahan(BBB) motor functions were assessed at 1, 3, 7 d after the injury. Then the rats were sacrificed at 7 d after the injury, the expression of LC3-Ⅱ in spinal cord was detected with Western Blot, and the number of apoptotic cells were assessed with TUNEL staining. **Results:** Scores of BBB scale at 3, 7 d after injury in Du meridian EA group(5.8±0.9, 9.5±0.9) were increased compared with those in Sham group(4.1±0.8, 6.4±0.7) ($P<0.05$), but there were no significant difference between two groups(2.8±0.7 vs 2.4±0.5, $P>0.05$) at 1 d after injury. The expression of LC3-Ⅱ and the number of apoptotic cells in SCI group were increased compared with those in Sham group ($P<0.05$). The expression of LC3-Ⅱ were increased while the number of apoptotic cells were decreased in Du meridian EA group compared with those in SCI group ($P<0.05$). **Conclusion:** Du meridian electro acupuncture may enhance autophagy and inhibit apoptosis to improve the locomotor function after spinal cord injury in rats.

Keywords: Du meridian electro acupuncture; spinal cord injury; apoptosis; autophagy; microtubule-associated protein 1 light chain 3-Ⅱ

基金项目:浙江省医药卫生科技计划项目(2017KY482)

¹ 温州医科大学附属第二医院(育英儿童医院)

(浙江 温州, 325027)

[△]通信作者 E-mail: tuwenzhan@163.com

脊髓损伤(Spinal Cord Injury, SCI)是一种并发症多、致残率高、预后极差的疾病,可以导致运动功能、感觉功能及自主神经功能的障碍,会给患者带来一系列精神上、经济上、社会上的巨大压力^[1,2]。继发性损伤是导致脊髓损伤病理生理变化主要机制之一^[3],近年来,电针作为传统的中医康复治疗手段在脊髓损伤的治疗中得到广泛应用,但电针治疗脊髓损伤的相关基础研究仍相对薄弱。研究表明 SCI 与细胞自噬密切相关^[4,5],增强神经细胞自噬能减少 SCI 后神经细胞凋亡,利于神经细胞的存活,促进大鼠运动功能的恢复^[6,7]。本研究通过督脉电针对 SCI 大鼠模型进行干预,通过检测神经细胞自噬及大鼠运动功能,研究督脉电针对脊髓损伤后脊髓神经元的保护作用及其可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

雌性、清洁级健康 SD 大鼠 36 只,体质量 200~300 g,中位数 245 g,由温州医科大学实验动物中心提供,实验动物许可证号为 SYXK(浙)2010-0150。

1.2 主要仪器与试剂

MASCIS Impactor (University, USA); TUNEL 试剂盒(美国 Roche 公司);DAB 显色试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司);GAPDH 抗体(Bio-world),LC3-II (SIGMA-ALDRICH);光学显微镜(日本奥林巴斯公司)。

1.3 模型制备

采用 MASCIS Impactor 精确撞击制作 SCI 模型(10 g×2.0 cm 致伤力,损伤 T₁₀ 脊髓平面)。将大鼠称重后,计算所需 5%水合氯醛的量(7 mL/kg),腹腔注射水合氯醛麻醉大鼠,备皮,碘伏消毒,铺洞巾,正中切开大鼠背部皮肤及皮下组织,暴露棘突,定位 T₁₀ 棘突后,分离椎旁肌肉,将椎板(T₉, T₁₀)咬除,暴露脊髓(见图 1)。应用 MASCIS Impactor 撞击^[8]制作中度 SCI 模型(见图 2)。打击成功标志:打击到脊髓瞬间可见摇尾反射、双下肢抽搐,随后出现双下肢瘫痪。打击后,逐层缝合创口,常规消毒表面。术后需人工协助排尿 3 次/d,连续 3 d 给予大鼠腹腔注射青霉素(0.2 mL/kg)预防感染。

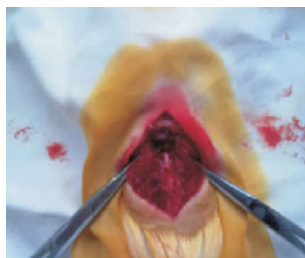


图 1 暴露脊髓



图 2 制作中度 SCI 模型

1.4 实验分组及治疗方法

按随机数字表法将 36 只 SD 大鼠随机分为假手术组、脊髓损伤组、督脉电针组,每组 12 只。1)假手术组:行椎板切除术,不打击大鼠脊髓,未予任何干预治疗。2)脊髓损伤组:椎板切除后制备 SCI 模型,不进行电针治疗。3)督脉电针组:椎板切除后制备 SCI 模型,取穴为受损脊髓节段上下两个督脉穴。采用连续脉冲,输出电流 0.6~1.0 mA(大鼠针刺部位出现轻度跳动),频率 2 Hz,治疗时间 30 min/次。电针组每天同一时间重复治疗 1 次。

1.5 BBB 运动功能评分观察大鼠 SCI 后后肢运动功能变化

各组分别于术后第 1,3,7 天对大鼠下肢运动功能进行 BBB(Basso, Beattie and Bresnahan)评分,分为 22 个等级,后肢全瘫为 0 分,完全正常为 21 分,两者间根据运动功能情况分为 1~20 分。每次评分均采用双人、双盲独立观察记录,最后取平均值。

1.6 原位末端转移酶标记(TUNEL)染色计数脊髓凋亡细胞数

于术后第 7 天,予温热生理盐水心脏灌注冲洗,快速暴露取出损伤区的脊髓组织,石蜡标本切片厚度为 4 μm,脱蜡至双蒸水;组织上滴加 20 μg/mL 蛋白酶 K 工作液,室温下孵育 15 min。组织上滴加 0.3% Triton X-100,常温下孵育 10 min。PBS 洗涤 3 次;将切片置于 3% H₂O₂ 溶液中,湿盒内室温孵育 20 min;取 TUNEL 试剂盒试剂 1(TdT)和试剂 2(dUTP)按 1:9 的比例混合均匀,滴加到切片上,在暗湿盒中 37 °C 水浴锅孵育 60 min;滴加试剂 3(Coverter-POD)50 μL 于组织上,放置在暗湿盒中 37 °C 于水浴锅内孵育 30 min;滴加 100 μL DAB 显色液,镜下观察染色反应,当胞核呈现棕黄色时,停止反应,PBS 冲洗 3 次;苏木素复染约 4 min,盐酸酒精分化 30 s,脱水,透明,中性树胶封片;用光学显微镜拍照,通过专业图像分析软件(Image-pro Plus, IPP6.0)计算凋亡指数(Apoptosis Index, AI)进行分析,每个玻片组织随机选取 5 张切片,计算视野内 TUNEL 染色阳性的神经元细胞数及视野内所有神经元细胞数,两者比值即为 AI。

1.7 Western Blot 检测 LC3-II 蛋白相对表达量

于术后第 7 天,予温热生理盐水心脏灌注冲洗,快速暴露取出损伤区的脊髓组织,用天平称取约 100 mg 的脊髓组织,用预冷 RIPA 裂解液提取总蛋白,BCA 蛋白浓度试剂盒(上海碧云天生物公司)测所得蛋白浓度。严格按照试剂说明书经过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)、转膜、封闭、一抗孵育、二抗孵育后,使用 ECL 试剂曝光,AlphaEaseFC4.0 软件系统检测条带灰度值,以 GAPDH 蛋白条带作为内

参照,计算 LC3-II 蛋白相对表达量。

1.8 统计学方法

实验结果采用 SPSS18.0 统计软件进行数据分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,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 大鼠后肢 BBB 运动功能评分比较

表 1 术后第 1,3,7 天 BBB 运动功能评分比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	术后时间		
		第 1 天	第 3 天	第 7 天
假手术组	12	21	21	21
脊髓损伤组	12	2.4±0.5 ¹⁾	4.1±0.8 ¹⁾	6.4±0.7 ¹⁾
督脉电针组	12	2.8±0.7 ¹⁾	5.8±0.9 ¹⁾²⁾	9.5±0.9 ¹⁾²⁾
F		1373.03	537.46	409.64
P		<0.01	<0.01	<0.01

注:1)与假手术组比较, $P < 0.05$;2)与脊髓损伤组比较, $P < 0.05$ 。

2.2 TUNEL 染色及凋亡指数

假手术组可见少量 TUNEL 染色阳性细胞数,督脉电针组及脊髓损伤组的大鼠脊髓灰质区神经细胞染色阳性较强,神经细胞凋亡较多;督脉电针组神经细胞染色阳性数少于脊髓损伤组(见图 3)。假手术组、督

术后第 1,3,7 天,脊髓损伤组 BBB 评分分别为(2.4±0.5),(4.1±0.8),(6.4±0.7),督脉电针组 BBB 评分分别为(2.8±0.7),(5.8±0.9),(9.5±0.9),均低于假手术组,差异有统计学意义($P < 0.05$);术后第 1 天督脉电针组 BBB 评分与脊髓损伤组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),术后第 3 天和第 7 天督脉电针组 BBB 评分与脊髓损伤组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

脉电针组、脊髓损伤组大鼠脊髓神经元凋亡指数分别为(8.65%±0.79%),(24.37%±4.63%)和(42.81%±5.69%),术后第 7 天督脉电针组与脊髓损伤组及假手术组脊髓神经元凋亡指数差异有统计学意义($P < 0.05$)。

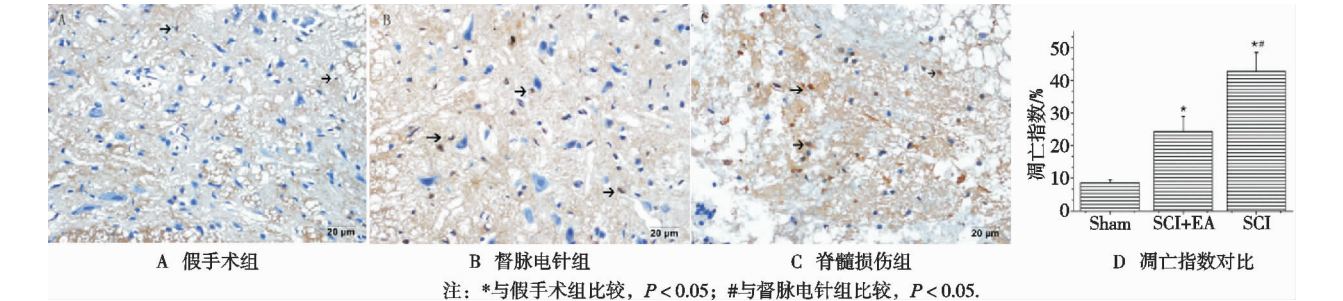


图 3 术后第 7 天假手术组、脊髓损伤组和督脉电针组 TUNEL 染色及凋亡指数对比

2.3 Western Blot 检测结果比较

术后第 7 天假手术组、督脉电针组、脊髓损伤组 LC3-II 蛋白相对表达量分别为(0.36±0.06),(2.21±0.23),(0.89±0.09),见图 4。脊髓损伤组、督脉电针组与假手术组比较,LC3-II 在术后第 7 天表达均升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。督脉电针组与脊髓损伤组比较,LC3-II 在术后第 7 天表达升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

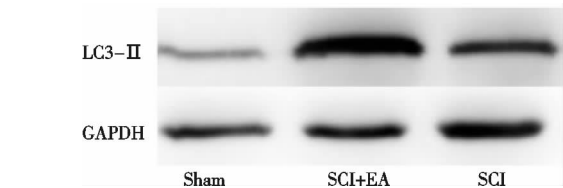


图 4 术后第 7 天假手术组、脊髓损伤组和督脉电针组 Western Blot 检测 LC3-II 蛋白表达情况

3 讨论

电针治疗可促进脊髓损伤的修复已经得到证实,

在临床中运用取得不错的治疗效果,但其分子生物学机制比较复杂,并不十分明确。其可能的分子机制包括促进神经修复、抑制损伤区域炎症反应、改善损伤区域微循环及微环境等^[9-11]。而细胞自噬是目前最热的研究方向之一。

研究证实继发性 SCI 广泛存在着神经细胞自噬(Autophagy)现象^[12]。细胞自噬是一种新的程序性细胞死亡方式,又称为 II 型细胞死亡,是细胞在自噬相关基因(Autophagyrelated Gene, Atg)的调控下利用溶酶体降解自身受损的细胞器和大分子物质的过程^[13]。研究表明在正常情况下自噬低水平表达,而在各种损伤刺激下自噬被诱导上调,可利用溶酶体降解自身受损的细胞器和大分子物质,对细胞起到一定的保护作用^[14]。LC3 是检测自噬活性的一个标志性蛋白,有 I 型和 II 型之分,当自噬发生时, I 型 LC3 可与自噬体膜表面的磷脂酰乙醇胺(PE)结合,形成 II 型 LC3, II

型 LC3 含量的多少代表自噬发生的程度^[15]。Kanno 等^[4]发现脊髓损伤大鼠的神经细胞、星形胶质细胞、少突胶质细胞中都能检测到自噬激活^[16],表明自噬在脊髓损伤过程中可能发挥重要作用。在本研究中,假手术组 LC3-Ⅱ低水平表达,而脊髓损伤组与假手术组比较,LC3-Ⅱ在术后第 7 天表达明显升高,提示脊髓损伤后细胞自噬被激活上调,以维持细胞稳态;与脊髓损伤组相比,督脉电针组 LC3-Ⅱ显著升高,与此对应的大鼠具有更高的 BBB 评分,提示电针通过增强自噬对大鼠 SCI 具有保护作用。

细胞凋亡是生物体的自然规律,在维持神经内环境稳定中起着重要作用,是脊髓继发性损伤的重要病理机制之一^[16,17]。当中枢神经系统损伤时,神经细胞凋亡在神经功能丧失这一过程中可能起到了主导的作用^[18,19]。本研究发现,脊髓损伤组术后第 7 天凋亡细胞数与假手术组及督脉电针组比较明显升高,这再次验证了细胞凋亡是存在于脊髓损伤的病理变化中的。同时与此对应的大鼠 BBB 评分也较高,提示凋亡是影响 SCI 后神经功能恢复的重要原因之一,而督脉电针组与脊髓损伤组比较,术后第 7 天 LC3-Ⅱ表达增高,提示电针通过激活自噬,可以抑制细胞凋亡,发挥神经保护作用。而 Wang 等^[6]发现在 SCI 早期应用自噬激活剂雷帕霉素(Rapamycin)可增强神经元自噬,减少神经元细胞凋亡,从而促进大鼠运动功能的恢复^[20],这与本文的结论相符。但督脉电针激活自噬的机制尚不明确,因此,督脉电针的神经保护作用机制尚需进一步研究。

参考文献

- [1] ALLISON D J, GABRIEL D A, KLENTROU P, et al. The influence of chronic inflammation on peripheral motor nerve conduction following spinal cord injury: a randomized clinical trial[J]. *Topics in Spinal Cord Injury Rehabilitation*, 2017, 23(4): 377-385.
- [2] BIGFORD G, NASH M S. Nutritional health considerations for persons with spinal cord injury[J]. *Topics in Spinal Cord Injury Rehabilitation*, 2017, 23(3): 188-206.
- [3] DUMONT R J, VERMA S, OKONKWO D O, et al. Acute spinal cord injury, part II: contemporary pharmacotherapy[J]. *Clinical Neuropharmacology*, 2001, 24(5): 265-279.
- [4] KANNO H, OZAWA H, SEKIGUCHI A, et al. Induction of autophagy and autophagic cell death in damaged neural tissue after acute spinal cord injury in mice[J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2011, 36(22): 1427-1434.
- [5] 于晨, 刘刚, 刘佳, 等. 脊髓损伤中细胞自噬的研究进展[J]. *临床和实验医学杂志*, 2014, 13(19): 1645-1648.
- [6] WANG Z Y, LIU W G, MUHARRAM A, et al. Neuro-

- protective effects of autophagy induced by rapamycin in rat acute spinal cord injury model[J]. *Neuroimmunomodulation*, 2014, 21(5): 257-267.
- [7] YU H, LI L, LIU R, et al. Autophagy in long propriospinal neurons is activated after spinal cord injury in adult rats[J]. *Neurosci Lett*, 2016, 634(12): 138-145.
- [8] JIN H P, KIM J H, OH S K, 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.
- [9] 张林, 孙忠人, 陈晨, 等. 近 10 年电针治疗脊髓损伤机制的实验研究进展[J]. *针灸临床杂志*, 2012, 28(1): 62-65.
- [10] 谭龙旺, 张海波, 杨利学, 等. 电针联合嗅鞘细胞移植对大鼠脊髓损伤区脑源性神经营养因子表达的影响[J]. *中国中医骨伤科杂志*, 2014, 22(8): 4-8.
- [11] 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.
- [12] GAO S, ZHANG Z M, SHEN Z L, et al. Atorvastatin activates autophagy and promotes neurological function recovery after spinal cord injury[J]. *Neural Regeneration Research*, 2016, 11(6): 977-982.
- [13] SCHAAF M B E, KEULERS T G, VOOIJS M A, et al. LC3/GABARAP family proteins: autophagy-(un)related functions[J]. *The FASEB Journal*, 2016, 30(12): 3961-3978.
- [14] MIZUSHIMA N, KOMATSU M. Autophagy: renovation of cells and tissues[J]. *Cell*, 2011, 147(4): 728-741.
- [15] KABEYA Y, MIZUSHIMA N, UENO T, et al. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing[J]. *EMBO J*, 2000, 19(21): 5720-5728.
- [16] 王延雷, 齐英娜, 董春科, 等. 脊髓减压联合督脉电针对急性脊髓压迫损伤大鼠疗效影响的实验研究[J]. *中国中医骨伤科杂志*, 2018, 26(2): 3-7.
- [17] 李晓宁, 单筱淳, 吴磊, 等. 急性脊髓损伤后最佳干预时间窗的实验研究[J]. *中国中医急症*, 2017, 26(7): 1213-1214.
- [18] ZHAO H, JAFFER T, EGUCHI S, et al. Role of necroptosis in the pathogenesis of solid organ injury[J]. *Cell Death and Disease*, 2015, 6(11): e1975.
- [19] 齐英娜, 谭明生, 王延雷, 等. 补阳还五汤对急性脊髓损伤大鼠内质网应激相关因子影响的研究[J]. *中国中医骨伤科杂志*, 2018, 26(2): 8-12.
- [20] CHEN H C, FONG T H, HSU P W, et al. Multifaceted effects of rapamycin on functional recovery after spinal cord injury in rats through autophagy promotion, anti-inflammation, and neuroprotection[J]. *Journal of Surgical Research*, 2013, 179(1): 203-210.

(收稿日期: 2019-07-06)