

推拿对坐骨神经损伤大鼠运动功能和神经丝蛋白-M 的影响

高玉峰 吴剑聪 耿楠 于天源

【摘要】目的 从坐骨神经损伤大鼠行为学和神经丝蛋白 M(NF-M)的角度,探讨推拿治疗坐骨神经损伤的起效机制。**方法** 采用夹持法建立坐骨神经损伤模型,将大鼠随机分为正常组、假手术组、模型组、模型对照组、推拿组,以按摩推拿手法模拟仪进行干预,通过斜板实验观察各组大鼠行为学变化;通过免疫组织化学染色观察各组大鼠 L3~L5 脊髓内 NF-M 表达情况。**结果** 模型组、模型对照组大鼠斜板实验评分与正常组比较均有明显降低,推拿治疗后斜板实验评分与模型组比较有明显提高,并在治疗 20 天后与正常组无显著性差异($P > 0.05$);模型组、模型对照组及推拿组 NF-M 免疫组化表达与正常组比较均有明显提高,推拿组与模型组比较有显著性差异($P < 0.05$)。**结论** 推拿治疗坐骨神经损伤可能是通过提高神经元骨架蛋白 NF-M 在脊髓内的表达,从而促进轴浆运输功能的恢复,促进神经元的存活,最终改善坐骨神经损伤大鼠的运动功能。

【关键词】 推拿; 坐骨神经损伤; 斜板实验; 神经丝蛋白-M

【中图分类号】 R244.1 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2013.12.004

Effect of Tuina therapy on motor function and scaffolding proteins NF-M in neurons of sciatic nerve injury rat models GAO Yu-feng, WU Jian-cong, GENG Nan, et al. School of Acupuncture-moxibustion and Tuina, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China
Corresponding author: YU Tian-yuan, E-mail: yutianyuan@sina.com

【Abstract】Objective To discuss the principal mechanisms for tuina therapy on Sciatic Nerve Injury from the viewpoint of behavioristics and scaffolding proteins NF-M in neurons of Sciatic Nerve Injury rat models. **Methods** Use the clamping method to induce the sciatic nerve injury model. And then to observe the behavioral changes by oblique board test and the expression of scaffolding proteins NF-M in L3-L5 spinal cord by immunohistochemical staining in normal group, sham-operated group, model group, model control group and Tuina group rats intervened with massage simulator. **Results** Inclined plate test scores of model group, model control group rats compared with that of the normal group were significantly lower. After being treated for 20 days ($P > 0.05$), compared with normal group there is no significant differences. Model group, model control group and the massage group's immunohistochemical expressions of NF-M compared with that of the normal group were significantly increased, and there is statistically significant difference between massage group and model group ($P < 0.05$). **Conclusion** The massage therapy promote the axoplasmic transport function, accelerate neuronal survival and ultimately improve the motor function of sciatic nerve injury model rats by the expression of scaffolding proteins NF-M in spinal cord.

【Key words】 Tuina; Sciatic nerve injury; Oblique board test; Neurofilament-M

神经丝蛋白(neurofilament proteins)作为神经元的细胞骨架蛋白之一,与神经轴突再生有密切关系。研究表明神经丝蛋白-M(neurofilament-M, NF-M)在神经细胞的氧化应激后表达发生明显的改变,

基金项目:北京中医药大学自主课题(532/0100604213)

作者单位:100029 北京中医药大学针灸推拿学院[高玉峰(博士研究生)、吴剑聪(博士研究生)、耿楠(硕士研究生)、于天源]

作者简介:高玉峰(1979-),2011 级在读博士研究生。研究方向:针灸推拿治疗周围神经损伤机理研究。E-mail: nmgaoyufeng@163.com

通讯作者:于天源(1966-),教授,主任医师,博士生导师,研究方向:针灸推拿治疗周围神经损伤机理研究。E-mail: yutianyuan@sina.com

起到促进神经元功能恢复的作用^[1]。本课题组前期研究发现,推拿治疗周围神经损伤疗效显著,能促进损伤后神经元的存活,本次实验主要研究周围神经损伤后,通过推拿治疗,观察受损神经相应阶段脊髓中 NF-M 的表达情况,探讨推拿治疗周围神经损伤的作用机理,为临床治疗周围神经损伤提供客观的实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

清洁级 SD 雄性大鼠 80 只[北京维通利华实验动物技术有限公司提供,许可证编号:SCXK(京)2012-0001,体重约(150±10)g。购入后适应性饲养 1 周。

动物分组:将实验动物随机分为正常组、假手术组、模型组、模型对照组、推拿组,每组各 16 只。

1.2 仪器及试剂

仪器:按摩推拿手法模拟仪(中华人民共和国发明专利号 200710187403.1),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)、显微镜(麦克奥迪 BA400)等。

试剂:Nf-M 抗体(Anti-NF-M antibody)生产厂家 santa,编号 sc-58561。

1.3 模型制备

坐骨神经夹持损伤模型:先将大鼠用 10% 水合氯醛以 0.35 ml/100g 的剂量腹腔注射麻醉;然后俯卧位固定,手术区(右侧臀股交界处)剪毛、常规消毒,用手术剪沿坐骨神经走行方向剪开大约 1 cm 的皮肤切口,止血,用止血钳钝性分离肌肉层,暴露梨状肌下缘及坐骨神经;用弯钩镊确认所暴露的组织确为坐骨神经后,用小号持针器在距梨状肌下缘 5 mm 处满扣夹持坐骨神经 5 秒,然后逐层缝合,碘伏消毒。假手术组:预处理及显露坐骨神经的方法同造模方法,但不做夹持。除了正常组不造模外,其余各组步骤同模型组。

1.4 干预方法

各组均在造模后第 7 天开始干预。推拿组使用手法模拟仪(按摩头为直径 10 mm 的圆形光滑接触面)依次刺激束缚后大鼠右侧殷门、承山、阳陵泉穴;手法模拟为点法、拨法、揉法;刺激力量为 4 N。每穴每法 1 分钟,总计 9 分钟。正常组、假手术组、模型组不作干预;模型对照组大鼠每天束缚 9 分钟。

治疗次数:每天 1 次,每治疗 10 次休息 1 天。

取材时间点:于治疗 10 次及 20 次后进行行为学及免疫组织化学检测。

1.5 实验检测

行为学检测:按 Rivlin 法制倾斜板,由两块矩形的合金板通过铰链于一端相连而成,一块作底板,另一块为移动板,表面铺一块约 6 mm 厚的橡胶垫。斜板从水平位置起绕轴旋转,斜面角度可以测出。在室温、安静状态下,将大鼠头向前,身体纵轴与斜板纵轴平行放置,角度从小到大渐增,直至大鼠停留 5 秒而不跌落的最大角度来做斜板实验行为学评分,每只大鼠重复测量 3 次,取平均值。各组分别于治疗 10 次和 20 次做斜板实验行为学评分。

免疫组织化学检测:各组分别于治疗 10 次和 20 次后,大鼠灌注固定,取患侧 L3~L5 脊髓,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,链霉亲和素-生物素复合物(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 图像软件进行积分光密度统计分析。

1.6 统计学处理

采用 SPSS 17.0 统计软件包,对斜板实验结果进行比较以及对脊髓中 NF-M 在不同时间点中的免疫染色结果进行比较。所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组数据成正态分布且方差齐,统计采用单因素方差分析进行组间比较,两两比较采用 SNK 法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 斜板实验结果

治疗 10 次、20 次后,模型组和模型对照组大鼠斜板实验评分与正常组相比明显降低($P < 0.05$),推拿组与模型组相比明显升高($P < 0.05$),与正常组相比差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 推拿治疗后斜板实验结果($\bar{x} \pm s$)

组别	n	斜板实验评分(度)	
		治疗 10 次(n=8)	治疗 20 次(n=8)
正常组	16	52.59 ± 3.39	53.02 ± 3.24
假手术组	16	51.63 ± 2.32	52.70 ± 3.55
模型组	16	43.42 ± 2.50 ^a	45.24 ± 2.91 ^a
模型对照组	16	44.06 ± 3.51 ^a	45.95 ± 2.79 ^a
推拿组	16	47.50 ± 3.22 ^{ab}	51.20 ± 2.86 ^b

注:与正常组比较,^a $P < 0.05$;与模型组比较^b $P < 0.05$ 。

2.2 免疫组化结果

免疫组化的表达情况见图 1、图 2。经 Image-Pro Plus 6.0 软件进行积分光密度检测,经比较,治疗 10 次、20 次后,模型组和模型对照组 NF-M 积分光密度与正常组相比明显升高($P < 0.05$),推拿组与模型组相比明显升高($P < 0.05$),与正常组相比明显升高($P < 0.05$)。见表 2。

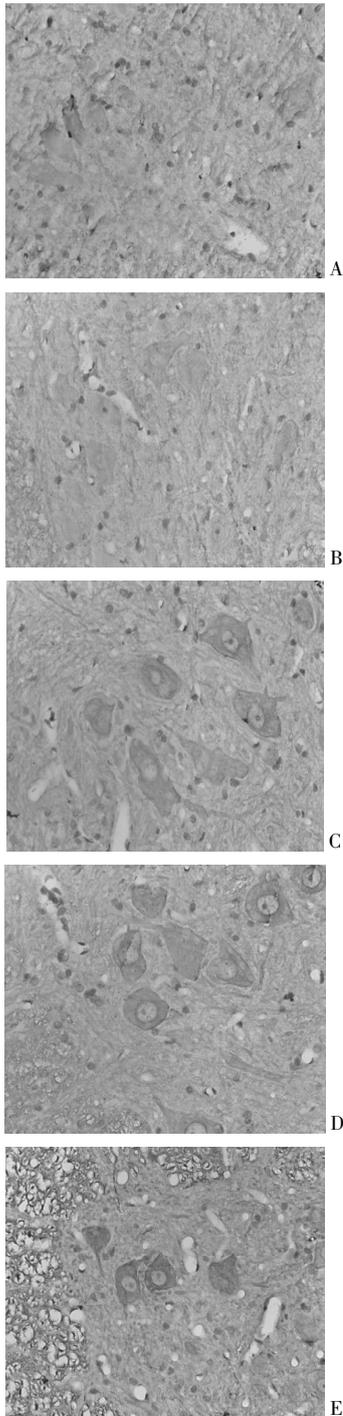


图 1 治疗 10 次后 NF-M 免疫组化结果(×400)

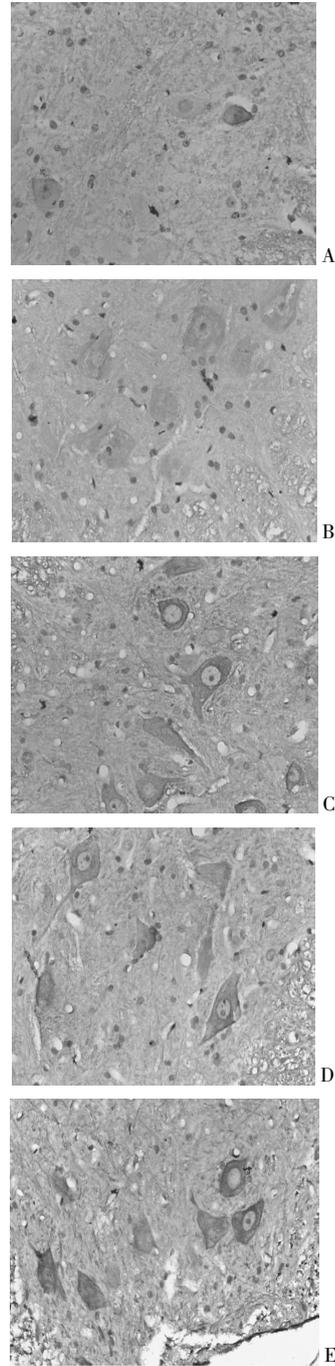


图 2 治疗 20 次后 NF-M 免疫组化结果(×400)

表 2 推拿治疗后 NF-M 积分光密度结果($\bar{x} \pm s$)

组别	n	NF-M(积分光密度)	
		治疗 10 次(n=8)	治疗 20 次(n=8)
正常组	16	6.20 ± 0.89	6.36 ± 0.94
假手术组	16	6.38 ± 0.96	6.50 ± 1.05
模型组	16	8.80 ± 0.82 ^a	8.67 ± 0.73 ^a
模型对照组	16	8.70 ± 0.90 ^a	8.78 ± 0.75 ^a
推拿组	16	10.27 ± 1.03 ^{ab}	10.82 ± 0.91 ^{ab}

注:与正常组比较,^a $P < 0.05$;与模型组比较,^b $P < 0.05$ 。

3 讨论

周围神经通过神经元将信息沿着感觉和运动纤维传递,参与躯体与内脏的运动、感觉和植物功能调节^[2]。人体内外环境的剧烈变化可使其受到损伤,神经损伤段的近、远端将出现一系列的病理、生理变化,其神经元胞体、轴突、髓鞘、末梢感受器均会发生改变,从而发生感觉、运动功能的障碍^[3]。

神经丝属于中间丝家族中的第IV类型,广泛分布在动物成熟神经元中。由 200 kDa 的 NF-H、160 kDa 的 NF-M 及 68 kDa 的 NF-L 三个亚单位按一定比率组装而成^[4]。研究表明,NF-L、NF-M 首先在周围、中枢神经系统神经元表达后 NF-H 才逐渐被表达,其出现使轴突的结构更趋于稳定,认为神经丝蛋白的代谢紊乱可能是周围神经轴索病变的主要发病机制^[5-6]。神经丝也可通过稳定细胞骨架和抑制轴突回缩而促进轴突延长,神经丝的破坏可导致神经元的损伤甚至引起神经元死亡。研究表明,脊髓损伤后神经丝蛋白阳性神经元的数量及神经元胞体着色的程度与后肢运动功能恢复情况有密切关系^[7]。

本实验发现,模型组的斜板实验行为学评分明显低于正常组,治疗组的斜板实验行为学评分高于模型组,说明推拿干预能够帮助大鼠患侧肢体的运动功能的恢复,促进损伤坐骨神经的恢复。各组大鼠 L3 ~ L5 脊髓内免疫组织化学结果显示,模型组的 NF-M 表达高于正常组表明机体在自我修复,推拿治疗组大鼠脊髓内的 NF-M 表达有显著性提高,与正常组、模型组比较有显著性差异,表明推拿治

疗可促进神经元 NF-M 的表达。结合行为学和形态学指标,可以认为推拿治疗周围神经损伤时,可能通过提高 NF-M 在受损神经相应节段脊髓内的表达,促进轴浆运输功能的恢复,减轻受损轴突残端周围营养物质的堆积,促进神经元的存活,最终改善坐骨神经损伤大鼠的运动功能。

参 考 文 献

- [1] Chiasson K, Lahaie-Collins V, Bournival J, et al. Oxidative stress and 17-alpha- and 17-beta-estradiol modulate neurofilaments differently[J]. *Mol Neurosci*, 2006, 30(3):297-310.
- [2] 张立新,佟晓杰,贾桦,等. 超短波对大鼠周围神经缺损修复术后神经再生的影响[J]. *中国康复医学杂志*, 2009, 24(8):695-98.
- [3] Tom VJ, Sandrow-Feinberg HR, Miller K, et al. Combining peripheral nerve grafts and chondroitinase promotes functional axonal regeneration in the chronically injured spinal cord[J]. *J Neurosci*, 2009, 29(47):14881-14890.
- [4] 翟中和,王喜忠,丁明孝. 细胞生物学[M]. 北京:高等教育出版社,2012:221-226.
- [5] 赵秀兰,于丽华,谢克勤. 甲胺磷对母鸡坐骨神经中神经丝蛋白的影响[J]. *中华预防医学杂志*, 2005, 39(3):171-174.
- [6] 王频,谢克勤. 2,5-HD 对大鼠 DRG 神经元神经丝蛋白表达的影响[J]. *病理学杂志*, 2008, 22(4):275-279.
- [7] Yabe JT, Wang FS, Chylinski T, et al. Selective accumulation of the high molecular weight neurofilament subunit within the distal region of growing axonal neurites[J]. *Cell Motil Cytoskeleton*, 2001, 50(1):1-12.

(收稿日期:2013-09-05)

(本文编辑:刘群)

· 信息之窗 ·

欢迎订阅 2014 年《环球中医药》杂志

《环球中医药》杂志(CN 11-5652/R, ISSN 1674-1749)由国家卫生和计划生育委员会主管,中华国际医学交流基金会主办。本刊为中国科技核心期刊,美国《化学文摘》收录期刊。张伯礼院士担任总编辑,以国内外中医药专业人员为主要读者。

本刊为月刊,大 16 开本,每期 80 页,每月 6 日出版。每期定价 10 元,每年 120 元。本刊 2014 年杂志可在全国各地邮局订购,国内邮发代号:80-726。海外发行由中国国际图书贸易总公司代办(北京 399 信箱,100044),代号 M8788。

本刊核心影响因子为 0.603

据 2013 年 9 月 27 日中国科技信息研究所每年一次发布的《2013 年版中国科技期刊引证报告(核心版)》显示,《环球中医药》核心影响因子为 0.603(2011-2012),比去年统计的 0.338 有较大的提升,在 29 种中医药类中国科技核心期刊中排名第 5。在 1930 种中国科技核心期刊中,《环球中医药》影响因子排名从原来的 1149 位上升到 523 位,综合评价总分从原来的 1358 位上升到 617 位。

同期,本刊扩展影响因子 0.821,扩展他引率 0.89,扩展 H 指数 6(至少有 6 篇文章被引不低于 6 次)。