

电针影响坐骨神经损伤大鼠脊髓前角神经营养因子-3 表达的研究

于跃 吴剑聪 李小琴 耿楠 高玉峰 潘璠 鲁梦倩 冼思彤 张林峰 于天源

【摘要】 目的 观察电针对坐骨神经损伤大鼠神经营养因子-3 表达的影响,探究分析电针促进坐骨神经损伤的修复机制。**方法** 采用大鼠坐骨神经夹持损伤模型,依据随机数字表分为正常组、假手术组、模型组、模型对照组、电针组,通过免疫组化和积分光密度测定脊髓前角神经营养因子-3 表达,通过 BBB(Basso Beattie Bresnahan)评分、坐骨神经功能指数观察大鼠的行为学变化,综合分析坐骨神经损伤大鼠运动功能的改变。**结果** 造模后 7 天,采用单因素 ANOVA 进行组间比较及 SNK 法进行两两比较。模型组、电针组与正常组相比行为学检测提示坐骨神经损伤大鼠的运动功能明显降低($P < 0.05$)。电针干预后,电针组与模型组相比 BBB 评分明显升高($P < 0.05$),神经功能恢复情况优于模型组;坐骨神经功能指数取值高于模型组,但无统计学差异($P > 0.05$)。模型组、电针组神经营养因子-3 表达与正常组相比均有统计学差异($P < 0.05$),电针组神经营养因子-3 表达与模型组相比有显著差异($P < 0.05$)。**结论** 电针可以通过促进神经营养因子-3 的表达,抑制神经细胞凋亡,促进周围运动传导通路再通和功能恢复,最终改善坐骨神经损伤大鼠的运动功能。

【关键词】 坐骨神经损伤; 电针; 神经营养因子-3

【中图分类号】 R245 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2014.04.006

Investigation the effect of electro-acupuncture on NT-3 expression in ventricolumna of sciatic nerve injury rats YU Yue, WU Jian-cong, LI Xiao-qin, et al. Academy 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 investigate the effect of electro-acupuncture on expression of NT-3 in sciatic nerve injury rats and the mechanism of nerve restoration. **Methods** Use the nerve clamping method to make the model, according to Random number table, all the rats divided into normal group(N), sham operation group(S), model group(M), model control group(MC), electro-acupuncture group(E). To observe the expression of NT-3 distributed in ventricolumna by Immunohistochemistry, integrated optical density and the behavioral evidences from the BBB score, sciatic nerve function index (SFI). **Results** 7 days after modeling, on the basis of behavioral test, movement function of SNI rats(E and M) decreased significantly. After electro-acupuncture intervention, compared with M group, BBB score was significantly higher of E group, the recovery of neurological function is better than that of the M group; SFI is higher than the M group, while there is not significant difference. The expression of NT-3 in M group and E group compared with the N group, there are significant differences. The E group has significant differences while compared with the M group. **Conclusion** Electro-acupuncture can promote the expression of NT-3 and inhibit the apoptosis of nerve cells, advance the recovery of peripheral motor conduction pathways, improve the motor function of sciatic nerve injury rats ultimately.

【Key words】 Sciatic nerve injury; Electro-acupuncture; Neurotrophic factor 3

基金项目:高等学校博士学科点专项科研基金资助课题(20100013110005)

作者单位:100029 北京中医药大学针灸推拿学院[于跃(硕士研究生)、吴剑聪(博士研究生)、李小琴(硕士研究生)、耿楠(硕士研究生)、高玉峰(博士研究生)、潘璠(博士研究生)、鲁梦倩(博士研究生)、冼思彤(硕士研究生)、张林峰(硕士研究生)、于天源]

作者简介:于跃(1988-),女,2011 级在读硕士研究生。研究方向:针灸推拿治疗周围神经损伤机理研究。E-mail: betterxiaoyu@163.com

通讯作者:于天源(1965-),博士,教授,主任医师。研究方向:针灸推拿治疗周围神经损伤的机理研究。E-mail: yutianyuan@sina.com

神经营养因子-3 (neurotrophin-3, NT-3) 属神经生长因子 (neurotrophic factors, NTFS) 家族的成分之一,最早发现于海马组织,随后发现其广泛存在于中枢神经系统及周围组织^[1]。其属于典型的靶源性神经营养因子^[2],虽然存在自分泌和旁分泌,但主要由靶组织骨骼肌产生,通过轴突末端受体介导,经神经细胞轴突逆向运输到胞体^[3-4]。对神经元的生长发育、增殖分化和损伤修复有营养支持和促进作用,能促进神经嵴细胞进行有丝分裂并诱导其分化,参与神经突触的形成和促进轴突的出芽式生长^[5],对机体感觉、运动功能的发育和修复均有重要意义。课题组前期研究结果显示电针干预能促进坐骨神经损伤大鼠 (sciatic nerve injury, SNI) 脊髓中神经生长因子 (nerve growth factor, NGF)、脑源性神经生长因子 (brain derived neurotrophic factor, BDNF) 等及背根神经节 (dorsal root ganglia, DRG) 中生长相关蛋白 43 (growth associated protein-43, GAP-43) 的表达从而发挥促进周围神经损伤修复的作用。本次实验旨在通过研究电针对 SNI 大鼠脊髓前角运动神经元 NT-3 表达的影响,进一步探讨电针治疗周围神经损伤的机理。

1 材料与方法

1.1 实验动物

遵从减少 (Reduction)、替代 (Replacement) 和优化 (Refinement) 动物实验“3R”原则。采用清洁级健康雌性 SD 大鼠 104 只,质量 (150 ± 10) g,动物批号 SCXK (京) 2012-000,购自维通利华实验动物技术有限公司。

1.2 实验仪器

毫针 (0.35 mm × 25 mm, 苏州环球针灸医疗器械有限公司); 韩氏电针仪 LH-202 型 (北京华卫产业开发公司)。

1.3 实验试剂

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

1.4 实验分组

采用二次随机分组法: 第一次依据随机数字表法将大鼠分为正常组 24 只, 假手术组 24 只, 造模组 56 只, 造模 7 天后每组随机抽取 8 只进行行为学检测评定造模成功; 第二次依据随机数字表法将造模组剩余 48 只大鼠分为模型组、模型对照组和电针组。

1.5 造模方法

1.5.1 麻醉 在造模前一天禁食、水, 称重后, 用 10% 水合氯醛以 0.4 ml/100 g 的剂量进行腹腔注射麻醉, 大鼠角膜反射消失视为麻醉完成。

1.5.2 模型制备 将大鼠俯卧位固定于手术台上, 备皮后手术区常规消毒, 用手术剪于右侧臀股交界处沿坐骨神经走行方向形成长约 1 cm 的皮肤切口, 止血后钝性分离肌肉层, 暴露坐骨神经, 用 10 号持针器将距梨状肌下缘 5 cm 处的坐骨神经进行满扣夹持, 持续 5 秒松开, 造成约 2 mm 的损伤点, 碘伏消毒后缝合。

1.5.3 干预方式 予正常组、假手术组、模型组: 常规喂养。模型对照组和电针治疗组造模后 7 天开始干预。

模型对照组: 常规喂养的同时, 和治疗组动物同期束缚干预 10 分/次/天。

电针治疗组: 常规喂养的同时予电针干预。将大鼠俯卧位固定, 依据大鼠穴位定位取损伤侧环跳、殷门、阳陵泉、承山穴。两电针正负极分别接环跳和阳陵泉, 殷门和承山, 采用电针仪治疗, 疏密波, 频率为 2/100 Hz, 电流 2 mA, 强度以肢体微微抖动为度, 10 分/次/天。

1.6 检测项目

1.6.1 行为学检测 BBB (Basso Beattie Bresnahan) 运动功能评分: 将大鼠后肢运动分为 22 个等级, 对其运动功能进行评分。后肢全瘫为 0 分, 正常为 21 分, 依据功能划分标准行主观评测。基本内容包括关节活动的数目和范围, 负重程度、前后肢协调性以及尾部活动情况。观察时间为 4 分钟。

坐骨神经功能指数 (sciatic functional index, SFI): 采用 SFI 测定方法检测损伤神经的恢复率。自制大鼠行走通道, 内铺打印纸, 大鼠双后足染色后于通道上, 留下 3 ~ 4 对足印。具体方法为: 标记大鼠手术侧足为 E, 正常侧足为 N, 选择印迹清晰的足印分别测量 E 和 N 的 3 个指标: (1) 足印长度 (PL) (2) 足趾宽度 (TS) (3) 中间足趾距离 (IT)。将数据代入 Bain 公式: $SFI = -38.3[(EPL - NPL)/NPL] + 109.5[(ETS - NTS)/NTS] + 13.3[(EIT - NIT)/NIT] - 8.8$ 。以 SFI = 0 为正常值, SFI ≤ -100 为神经完全断离, 计算 SFI 的恢复率 (%)。

1.6.2 免疫组化 大鼠全身 4% 多聚甲醛灌注固定后, 取 L3 ~ L5 脊髓, 再入 4% 多聚甲醛溶液固定, 经石蜡包埋、切片, 再经二甲苯脱蜡、梯度酒精水

化,抗原修复,链霉亲和素—生物素复合物(streptavidin-biotin complex, SABC)法充分染色,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分析。

1.7 统计学处理

采用 SPSS 17.0 统计软件包,对行为学检测结果以及脊髓前角 NT-3 在不同取材时间点的免疫组化染色结果进行比较。统计采用单因素方差分析进行组间比较,所有数据用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。

2 结果

2.1 行为学检测结果

2.1.1 BBB 运动功能评分 统计采用单因素 ANOVA 进行组间比较及 SNK 法进行两两比较。如表 1 所示,造模后 7 天模型组 BBB 运动功能评分与正常组、假手术组相比明显降低($P < 0.05$);干预后电针组与模型组、正常组相比均有统计学意义($P < 0.05$),高于模型组低于正常组。

表 1 五组大鼠 BBB 运动功能评分结果($\bar{x} \pm s$)

组别	造模后 7 天	干预 10 次	干预 20 次
正常组($n=24$)	21.00 \pm 0.00 ^b	21.00 \pm 0.00 ^b	21.00 \pm 0.00 ^b
假手术组($n=24$)	20.50 \pm 0.53 ^b	20.25 \pm 0.71 ^b	20.25 \pm 0.71 ^b
模型组($n=24$)	8.88 \pm 1.64 ^a	14.88 \pm 2.53 ^a	14.88 \pm 0.99 ^a
模型对照组($n=16$)	—	15.38 \pm 0.74 ^a	14.25 \pm 1.39 ^a
电针组($n=16$)	—	17.25 \pm 0.71 ^{ab}	18.00 \pm 1.31 ^{ab}

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

2.1.2 SFI 测定结果 统计采用单因素 ANOVA 进行组间比较及 SNK 法进行两两比较。如表 2 所示,造模后 7 天负值模型组与正常组、假手术组相比明显降低($P < 0.05$);干预后电针组与正常组相比有

统计学差异($P < 0.05$),与模型组、模型对照组相比没有统计学意义($P > 0.05$)

表 2 五组大鼠 SFI 测定结果($\bar{x} \pm s$)

组别	造模后 7 天	干预 10 次	干预 20 次
正常组($n=24$)	-5.28 \pm 8.01 ^b	-2.67 \pm 21.37 ^b	-5.6 \pm 10.4 ^b
假手术组($n=24$)	-11.71 \pm 8.06 ^b	4.88 \pm 16.71 ^b	-12.46 \pm 11.97 ^b
模型组($n=24$)	-83.6 \pm 8.15 ^a	-49.98 \pm 10.12 ^a	-44.5 \pm 3.18 ^a
模型对照组($n=16$)	—	-50.15 \pm 20.26 ^a	-44.78 \pm 9.17 ^a
电针组($n=16$)	—	-35.25 \pm 13.83 ^a	-35.07 \pm 11.93 ^a

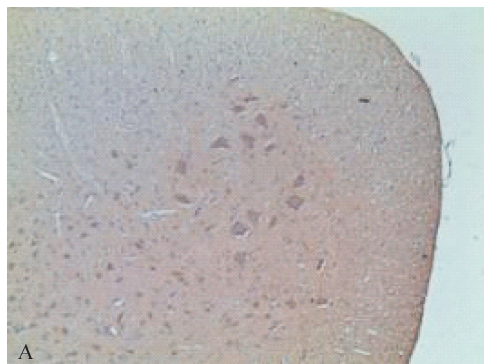
注:与正常组比较,^a $P < 0.05$;与模型组比较,^b $P < 0.05$

2.1.3 免疫组化 NT-3 表达结果 统计采用单因素 ANOVA 进行组间比较及 SNK 法进行两两比较,经 Image-Pro Plus 6.0 进行平均光密度检测。如表 3 所示,干预 10 次后,电针组与正常组、模型组相比 NT-3 平均光密度明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$),模型组、模型对照组与正常组相比没有统计学意义($P > 0.05$);干预 20 次后,电针组与正常组、模型组相比 NT-3 平均光密度明显升高($P < 0.05$),模型组、模型对照组与正常组相比明显升高($P < 0.05$)。结果如图 1、2 所示。

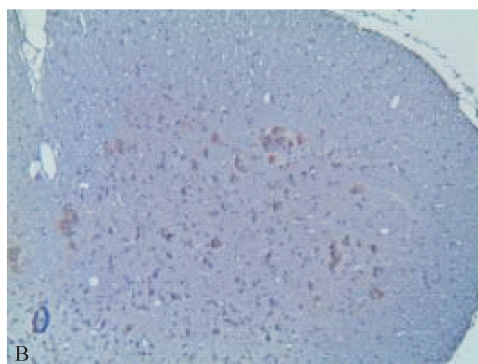
表 3 五组大鼠免疫组化后 NT-3 平均光密度检测结果($\bar{x} \pm s$)

组别	干预 10 次	干预 20 次
正常组($n=16$)	9.81 \pm 2.61	10.73 \pm 3 ^b
假手术组($n=16$)	10.19 \pm 2.45	10.85 \pm 3.48 ^b
模型组($n=16$)	14.79 \pm 3.25	15.87 \pm 3.71 ^a
模型对照组($n=16$)	13.82 \pm 3.36	15.80 \pm 3.3 ^a
电针组($n=16$)	24.24 \pm 8.76 ^{ab}	33.81 \pm 6.67 ^{ab}

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



A 模型组



B 电针组

图 1 干预 10 次后 NT-3 免疫组化结果($\times 100$)

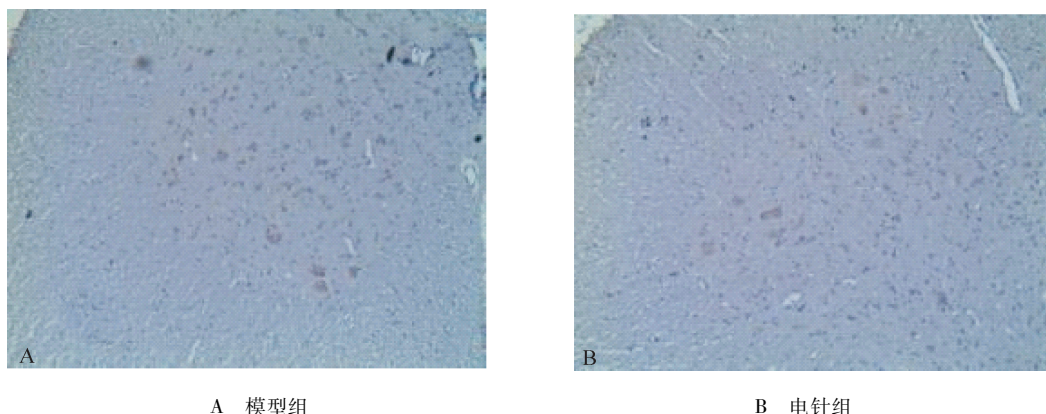


图 2 干预 20 次后 NT-3 免疫组化结果(×100)

3 讨论

3.1 选穴理论依据

基于中西医理论,临床和相关文献检索。根据中医循经取穴原则,循足少阳胆经选取环跳、阳陵泉,现代文献与针灸古籍记载环跳为治疗坐骨神经痛要穴,而阳陵泉为筋会且为胆经双合穴;循足太阳膀胱经选取殷门、承山,均为治疗腰腿痛的常用穴位。根据解剖关系,这些穴位正好分布于坐骨神经干(殷门)和其分支胫神经(承山)、腓总神经(阳陵泉)上;穴位同时位于神经及分支所支配的肌肉区,股二头肌(殷门)、腓肠肌(承山)、胫前肌(阳陵泉)。通过分析行为学数据,从运动方面分析电针对坐骨神经损伤作用效果和机理^[6]。

3.2 结果剖析

SFI 主要用于评估大鼠精细动作而 BBB 用于评估后肢运动功能的恢复情况。行为学检测结果显示造模后 7 天模型组与正常组、假手术组相比有统计学差异,反映模型组运动功能下降,提示造模成功。电针干预 10 次后,电针组与模型组相比,BBB 评分($P < 0.05$)与 SFI($P > 0.05$)统计结果提示运动功能恢复差异,可能原因在于 BBB 评分存在主观意识参与,SFI 结果反映相对客观,造成阴性结果的原因可能是取材时间间隔短,神经功能尚未恢复。

免疫组化结果显示,电针干预 10 次后,电针组 NT-3 表达明显高于正常组和模型组,而模型组、模型对照组均值略高于正常组,但没有统计学差异,由前者可以推论电针促进 NT-3 高表达,后者可以推论 NT-3 无论是自分泌、旁分泌抑或靶组织逆向转运都于损伤后活跃。电针组 NT-3 高表达的同时,结合行为学结果显示电针组优于模型组、模型对照组,

由此正向推论电针能有效促进 NT-3 表达,NT-3 表达可能是促进下运动神经元修复的机制之一。但尚不能明确脊髓前角神经元内 NT-3 来源,可考虑损伤点下位神经点注射 NT-3,荧光标记物或放射物示踪,观察是否沿再通神经逆向转运,从而得到电针促进神经修复的直接证据。

综上,电针可以通过提高脊髓前角 NT-3 的表达,从而抑制细胞凋亡,促进周围运动传导通路再通和功能恢复,最终改善坐骨神经损伤大鼠的运动功能。

参 考 文 献

- [1] 石向群,范明,陆兵勋,等. 周围神经损伤对脊髓运动神经元 NT-3 表达的影响[J]. 西北国防医学杂志,2001,22(1): 15-17.
- [2] 李志全. 神经营养素 3 对神经细胞凋亡的保护作用机制研究[D]. 西安:第四军医大学,2008.
- [3] Bouter H, Schippers EF, Luelmo SA, et al. No effect of preoperative selective gut decontamination on endotoxemia and cytokine activation during cardiopulmonary bypass: a randomized, placebo controlled study[J]. Crit Care Med, 2002, 30(1): 38.
- [4] Murawaki Y, Kobayashi M, Koda M, et al. Effects of lactulose on intestinal bacterial flora and fecal organic acids in patients with liver cirrhosis[J]. Hepatol Res, 2000, 17(1): 56.
- [5] 魏良浩,潘庆,张跃明.《金匱》肾气丸对阿尔兹海默病模型大鼠额叶皮质神经元 NT-3 表达的影响[J]. 中国中医急症, 2013, 22(2): 211-213.
- [6] 梅旭晖,吴剑聪,于天源. 推拿对坐骨神经损伤大鼠神经生长因子受体 TrkA 的影响[C]//中华中医药学会推拿分会. 第十三次中医推拿学术年会暨推拿手法治疗脊柱相关疾病高级培训班论文汇编,安徽,2012.

(收稿日期:2014-01-06)

(本文编辑:蒲晓田)