

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2016.06.018

芒针偶刺秩边与水道穴对脊髓损伤大鼠神经功能的影响

李长明¹, 谢尚举¹, 全仁夫^{1*}, 杨宗保²

(1. 杭州市萧山区中医院, 浙江省杭州市萧山区育才路 152 号, 310009; 2. 厦门大学医学院)

摘要 目的 观察芒针偶刺秩边与水道穴对大鼠脊髓损伤后神经功能的影响及可能作用机制。方法 30 只 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组、芒针治疗组各 10 只。模型组、芒针治疗组采用改良 Allen's 法制作脊髓损伤模型。芒针治疗组大鼠手术苏醒后即刻给予芒针秩边和水道穴, 用偶刺法针刺大约 2 cm 深度, 捻转 1 min, 并使同侧秩边、水道组成一回路连接于电针仪上, 电针 30 min, 每日 1 次, 假手术组和模型组正常饲养。5 日后采用 BBB 评分法观察各组大鼠后肢运动功能情况, 取脊髓组织行组织学观察、计算细胞凋亡指数、检测 Bcl-2、Bax 表达情况。结果 与假手术组比较, 模型组大鼠 BBB 运动功能评分明显降低, 神经细胞凋亡指数升高, 脊髓组织 Bax、Bcl-2 阳性细胞百分率升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。芒针治疗组大鼠 BBB 运动功能评分较模型组明显升高、神经细胞凋亡指数降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 芒针治疗组脊髓组织 Bax 阳性细胞百分率显著低于模型组, Bcl-2 阳性细胞百分率显著高于模型组 ($P < 0.01$)。结论 芒针偶刺秩边与水道穴可能通过调控凋亡相关基因 Bax、Bcl-2 的表达, 减少神经细胞凋亡, 从而促进神经功能恢复。

关键词 脊髓损伤; 芒针; 偶刺法; 水道穴; 秩边穴; 神经功能; 细胞凋亡

随着现代工业的发展, 脊髓损伤的发病率逐年升高, 脊髓损伤后患者 25 年病死率为 49%^[1], 严重危及患者的生命。有研究表明, 芒针具有取穴少、透穴多、针感强、传导快等特点, 对病位较深的疾病或神经、肌肉、筋膜疾病具有良好的疗效^[2-4]。因此, 本研究通过建立大鼠脊髓中度损伤模型, 苏醒后即刻进行芒针治疗, 观察其对脊髓损伤大鼠细胞凋亡, Bcl-2、Bax 表达及功能恢复的影响, 探讨芒针对脊髓损伤是否存在神经保护作用, 为脊髓损伤的治疗提供新的途径。

1 材料与方法

1.1 动物

健康成年雄性 SD 大鼠 30 只, 清洁级, 体重 220 ~ 250 g, 购自厦门大学动物实验中心, 实验动物许可证号: SCXK (闽) 2008-0001。每笼 5 只分笼饲养, 温度 20 ~ 22℃, 相对湿度 65% ~ 70%, 自然光暗周期适应性饲养 1 周后进行实验。

1.2 主要仪器与试剂

一次性针灸针 (0.35 mm × 75 mm, 批号:

140110, 苏州医疗用品厂); 华佗牌电针治疗仪 (SDZ-II 型, 苏州医疗用品厂); 克氏针 (1.0 mm × 100 mm, 批号: YZB/津/0462-2011, 天津市宇通医疗器械厂); TUNEL 试剂盒 (批号: 11684817910, 罗氏生物科技有限公司); 兔抗鼠 Bcl-2 多克隆抗体 (批号: IB-0021, Bioword 公司); 兔抗鼠 Bax 多克隆抗体 (批号: IB-0061, Bioword 公司); 二甲苯 (批号: 10023418, 国药集团化学试剂有限公司); 无水乙醇 (批号: B0301002, 北京华腾化工有限公司); 水合氯醛 (批号: 20131021, 上海国药集团); 青霉素 (批号: 030011248, 河北远征药业有限公司)。

1.3 造模方法

采用改良 Allens 法^[5]制作脊髓损伤大鼠模型。大鼠于实验前禁食 8 h, 以 10% 水合氯醛 (0.3 ml/100 mg) 进行腹腔注射麻醉。以第 11 肋为标志, 取胸背部正中切口, 长约 2.5 cm, 钝性分离椎旁肌肉, 暴露上下各一个椎体长度, 咬除第 9 ~ 第 10 胸椎棘突及全部椎板, 暴露 0.5 cm 宽硬膜。用自制的改良打击装置 (质量为 10 g 的克氏针沿带有刻度的透明管从 60 mm 高处垂直自由下落, 致伤量为 60 g/cm), 致伤后迅速移开打击物, 造成大鼠

基金项目: 浙江省中医药科研计划 (2008CB067)

* 通讯作者: quanrenfu@126.com, (0571) 83812008

T9 - T10 节段脊髓后角中度损伤, 逐层缝合。大鼠出现痉挛性摆动、摆尾反射、双下肢迟缓性瘫痪表示造模成功。术后每天青霉素 8 万单位腹腔注射预防感染, 每天 2 次膀胱 Crede 手法按摩^[8]协助排尿, 直至建立反射性膀胱排空。

1.4 分组及处理

30 只大鼠按照随机数字表法分为假手术组、模型组、芒针治疗组, 每组 10 只。模型组和芒针治疗组建立脊髓损伤大鼠模型, 假手术组咬除第 9 - 第 10 胸椎棘突及全部椎板, 暴露 0.5 cm 宽硬膜, 不予损伤脊髓。术后每天青霉素 8 万单位腹腔注射预防感染, 持续 5 天。芒针治疗组大鼠手术苏醒后即刻给予芒针秩边和水道穴, 取穴及偶刺法参考《实验针灸学》^[9], 秩边: 臀外下部, 股骨大转子与荐椎尾椎结合部连线外 1/3 与中 1/3 交点处; 水道: 腹部, 耻骨联合与胸剑联合中点连线 (分 13 等份) 耻骨联合上 3 等份旁开 2 寸处。在对大鼠两侧穴位用络合碘消毒后, 用偶刺法针刺大约 2 cm 的深度, 捻转 1 min, 并使同侧秩边、水道组成一回路连接于 SDZ-II 型电针仪上, 应用疏密波 (密波时间 10 s, 疏波时间 5 s) 输出脉冲幅度: 接 500 Ω 负载时 2 ~ 4 V; 输出脉冲宽度: 0.5 ms, 疏波 4 Hz, 密波 50 Hz, 强度以针灸针出现轻度颤动为限, 电针 30 min, 每日 1 次, 持续 5 天。假手术组和模型组正常饲养。

1.5 观察指标及方法

1.5.1 行为学观察 造模后 5 天, 各组大鼠采用 BBB 运动功能评分法^[10]进行评分。根据大鼠昼夜活动的习性, 所有评分均在晚上 8:00 进行。评分前将大鼠膀胱反射性排空, 采用双人双盲的方式进行, 观察 4 min, 尽量保持在大鼠活动范围的中心区域活动, 确保评分的可靠性。

1.5.2 组织学观察 将脊髓组织置于 4% 多聚甲醛中, 4℃ 过夜固定, 不同浓度乙醇梯度脱水, 石蜡包埋, 连续切片, 片厚 6 μ m, 做好标记, -20℃ 冻存备用。每组取 3 张切片 60℃ 烤箱过夜, 常规二甲苯脱蜡, 梯度酒精水化, 水洗, 行苏木素染色 5 min, 再用双蒸水洗去片上多余染液, 1% 盐酸酒精浸泡分色 1 min, 碱性溶液促蓝后流水冲洗, 伊红复染 2 min, 脱水, 中性树胶封片, 于 400 倍光镜下观察。

1.5.3 细胞凋亡检测 按照 TUNEL 试剂盒说明进行操作。切片二甲苯脱蜡和再水化, 将切片用 Proteinase K 工作液处理 20 min, 然后用 PBS 洗涤 3 次, 加 50 μ l TUNEL 反应混合液于标本上, 加封口

膜在暗湿盒中孵育 1 h, PBS 洗涤。再滴加 50 μ l 3 号试剂孵育 30 min, PBS 洗涤, 再滴加 100 μ l 新鲜配制的 DAB 工作液, 显微镜下观察随时终止反应。苏木素复染, 中性树胶封固。每张切片在损伤区边缘向吻、尾两侧各 2 mm 范围内, 选取 5 个 400 倍镜下视野, 对凋亡细胞进行计数。凋亡指数 = 凋亡细胞核数/总细胞核数。

1.5.4 Bax、Bcl-2 阳性细胞检测 采用免疫组织化学法, 石蜡包埋制备 6 μ m 厚的组织切片, 然后二甲苯脱蜡和再水化, 经微波抗原修复, 每张切片加 50 μ l 的 3% 过氧化酶阻断剂, 内源性过氧化物酶的活性被阻断, 室温下孵育 10 min; 加 50 μ l 正常非免疫血清, 37℃ 孵育 10 min; 加 50 μ l 的第一抗体; 加 50 μ l 生物素标记的山羊抗兔 IgG, 37℃ 孵育 40 min; 加 50 μ l 辣根过氧化物酶标记链亲和素溶液, 37℃ 孵育 40 min; 加 100 μ l 新鲜配制的 DAB 工作液, 显微镜下观察随时终止反应。每一步期间进行 0.01 M PBS 浸泡 5 min/次, 3 次。苏木素复染, 中性树胶封固。显微镜下观察脊髓组织阳性细胞数变化, 以胞浆呈棕黄色或棕褐色着色为阳性细胞。每张切片在损伤区边缘向吻、尾两侧各 2 mm 范围内, 选取 5 个 400 倍镜下的视野, 计数阳性细胞。按以下公式计算 Bax、Bcl-2 阳性细胞百分率, 阳性细胞百分率 = (阳性细胞数/总细胞数) $\times$ 100%。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 17.0 软件进行分析, 计量数据以均数和标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用单因素方差分析, 并做多组间两两均数比较 ($LSD-t$), 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠 BBB 运动功能评分比较

假手术组大鼠因未损伤脊髓, 后肢运动功能无明显障碍; 模型组和芒针组造模后均出现摆尾反射、后肢瘫痪。表 1 示, 与假手术组比较, 模型组大鼠 BBB 运动功能评分明显降低, 而芒针治疗组大鼠 BBB 运动功能评分较模型组明显升高 ($P < 0.01$)。

2.2 各组大鼠脊髓组织神经细胞凋亡指数比较

TUNEL 染色结果显示, 假手术组脊髓组织仅见极少量散在的阳性细胞; 模型组阳性细胞数显著增多, 主要位于灰质中, 灰质结构破坏严重, 仅有少量神经细胞存活, 以胶质细胞为主; 芒针治疗组的阳性细胞较模型组明显减少。表 1 示, 与假手术

组比较,模型组凋亡指数明显升高,而芒针治疗组凋亡指数较模型组显著降低,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表 1 各组大鼠 BBB 运动功能评分及脊髓组织神经细胞凋亡指数比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	BBB 运动功能评分 (分)	凋亡指数
假手术组	10	21.00 $\pm$ 0.00	0.07 $\pm$ 0.01
模型组	10	3.90 $\pm$ 1.10 **	0.96 $\pm$ 0.01 *
芒针治疗组	10	6.20 $\pm$ 1.23 $\Delta\Delta$	0.67 $\pm$ 0.05 Δ

注:与假手术组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

2.3 各组大鼠脊髓组织 Bax、Bcl-2 阳性细胞百分率比较

表 2 示,与假手术组比较,模型组大鼠脊髓中 Bax、Bcl-2 阳性细胞百分率升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较,芒针治疗组 Bax 阳性细胞百分率降低, Bcl-2 阳性细胞百分率升高 ($P < 0.01$)。

表 2 各组大鼠脊髓组织 Bcl-2、Bax 阳性细胞百分率比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	Bcl-2	Bax
假手术组	10	3.46 $\pm$ 0.01	2.55 $\pm$ 0.21
模型组	10	9.92 $\pm$ 1.25 *	15.19 $\pm$ 0.15 *
芒针治疗组	10	17.50 $\pm$ 0.31 Δ	7.79 $\pm$ 0.85 Δ

注:与假手术组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.01$

2.4 各组大鼠脊髓组织 HE 染色结果

图 1 示,假手术组因未损伤脊髓,显微镜下可见脊髓形态结构完整,灰质神经细胞形态正常,分布均匀,细胞膜、细胞核及组织间隙均正常,白质纤维分布均匀,髓鞘形态完整,排列整齐。模型组脊髓形态不完整,神经组织残缺;组织重度出血,存在大量血细胞;组织疏松水肿,细胞空泡变性,部分细胞核固缩,神经纤维溶解、消失;灰质神经细胞数量减少,灰质神经细胞肿胀、核裂解甚至消失,细胞周围基质消失呈空泡状;白质纤维减少,分布不均匀,脱髓鞘,形态不完整、相互融合。芒

针治疗组与模型组比较,其脊髓形态结构基本完整,组织中散在血细胞,组织无水肿;灰质神经细胞形态基本正常,空泡变性减轻,部分细胞仍存在空泡变性,细胞核无明显固缩,白质纤维分布基本均匀,形态完整、无脱髓鞘。

3 讨论

芒针系由古代“九针”中的“长针”发展而来,具有取穴少、透穴多、针感强、传导快等特点,尤其在治疗病位深、病势急、病因复杂而难愈的顽疾发挥出一般针灸无法达到的疗效^[9-11]。偶刺出自《黄帝内经》中十二刺之一,又称阴阳刺。有研究发现,秩边与水道穴常用于治疗脊髓损伤后尿潴留^[1],秩边穴位于背部,具有舒筋活络、强壮腰膝、调理下焦的功效;水道穴位于腹部,属于足阳明胃经。脊髓损伤属中医学“痿证”范畴,治痿独取阳明,故本研究通过制作大鼠脊髓中度损伤模型,在大鼠脊髓损伤后立即给予芒针对刺秩边与水道穴进行治疗。BBB 运动功能评分结果显示,芒针治疗组大鼠瘫痪肢体的运动功能障碍较模型组有所恢复,脊髓凋亡细胞数明显少于模型组,表明芒针对大鼠脊髓损伤具有一定保护作用。

细胞凋亡是细胞在某种特定刺激和诱导下产生的一种程序性死亡方式,研究认为细胞凋亡存在于整个脊髓损伤过程,细胞凋亡受到许多基因调控,其中 Bcl-2 家族在细胞凋亡的基因调控过程中发挥着至关重要的作用, Bcl-2 家族可以分为抑凋亡基因以 Bcl-2 基因为代表,和促凋亡基因以 Bax 基因代表,他们在受到某种刺激后通过激活一系列下游基因调控凋亡作用^[12]。Bcl-2 是一种胞浆蛋白,神经组织损伤后,通过一定形式的诱导作用可以增加损伤部位神经的表达从而促进受损的神经系统组织修复^[13]。Bax 和 Bcl-2 基因是与凋亡关系最密切的凋亡调控基因,且作用相反, Bax 与 Bcl-2 的比值是决定对细胞凋亡抑制作用强弱的关键因素^[14]。

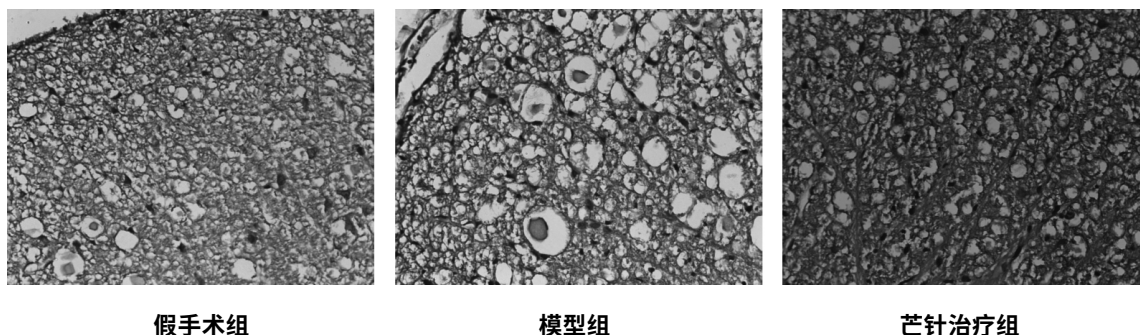


图 1 各组大鼠脊髓组织 HE 染色病理图 ($\times 400$)

本实验发现, 脊髓损伤后模型组 Bax、Bcl-2 水平升高, 促进了脊髓神经元的进一步凋亡, 而芒针偶刺治疗后 Bax 水平降低, Bcl-2 水平升高, 抑制了脊髓神经元细胞的凋亡, 说明早期芒针偶刺秩边与水道穴能调控凋亡相关基因 Bax、Bcl-2 的表达, 减少神经细胞凋亡, 对损伤脊髓有一定保护作用。

参考文献

- [1] BARTEL P, KREBS J, WÖLLNER J, et al. Bladder stones in patients with spinal cord injury: a long-term study [J]. Spinal Cord, 2014, 52(4): 295-297.
- [2] 钮铭, 薛明新, 张仕年, 等. 芒针透刺配合被动屈髋屈膝治疗急性腰扭伤 40 例 [J]. 中国针灸, 2013, 33(8): 737-738.
- [3] 魏文著, 阮永队, 宁晓军, 等. 芒针结合隔药灸治疗腰椎间盘突出症临床研究 [J]. 中国针灸, 2013, 33(8): 673-677.
- [4] 何春, 全仁夫, 陈荣良, 等. 芒针透刺对急性脊髓损伤兔脊髓细胞凋亡受体 Fas 及 Caspase-3 的影响 [J]. 中医杂志, 2014, 55(18): 1588-1591.
- [5] KHART T, HAVEY RM, SAYERS ST, et al. Animal models of spinal cord contusion injuries [J]. Lab Anim Sci, 1999, 49(2): 161-172.
- [6] ROYO MV, CANALES CL, MORENO FG, et al. Urinary retention in immunocompetent patient: acute transverse

myelitis [J]. An Sist Sanit Navar, 2011, 34(3): 523-526.

- [7] 李忠仁. 实验针灸学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2007: 235-237.
- [8] SCHEFF SW, SAUCIER DA, CAIN ME. A statistical method for analyzing rating scale data: the BBB locomotor score [J]. J Neurotrauma, 2002, 19(10): 1251-1260.
- [9] 李佩芳, 齐慧萍, 董赞, 等. 芒针透刺结合肌张力平衡促通技术治疗脑卒中后痉挛性瘫痪 [J]. 针灸临床杂志, 2010, 26(3): 1-5.
- [10] 郭阿文, 李佩芳, 孙培养. 芒针透刺躯干肌治疗脑卒中后平衡障碍的临床观察 [J]. 中医外治杂志, 2014, 23(1): 34-35.
- [11] 彭秀娟, 梁琪, 张永臣, 等. 针灸治疗尿潴留常用腧穴文献研究 [J]. 中医杂志, 2013, 54(23): 2046-2048.
- [12] KÖNIG HG, COUGHLAN KS, KINSELLA S, et al. The Bcl-2 family protein Bid is critical for pro-inflammatory signaling in astrocytes [J]. Neurobiol Dis, 2014, 70: 99-107. doi: 10.1016/j.nbd.2014.06.008.
- [13] HOU Q, CYMBALYUK E, HSU SC, et al. Apoptosis modulatory activities of transiently expressed Bcl-2: roles in cytochrome C release and Bax regulation [J]. Apoptosis, 2003, 8(6): 617-629.
- [14] BROOKS C, DONG Z. Regulation of mitochondrial morphological dynamics during apoptosis by Bcl-2 family proteins: a key in Bak? [J]. Cell Cycle, 2007, 6(24): 3043-3047.

Effects of Elongated Needle with Paired Needling “Shuidao” (ST28) and “Zhibian” (BL54) on Neurological Function of Spinal Cord Injury Rats

LI Changming¹, XIE Shangju¹, QUAN Renfu¹, YANG Zongbao²

(1. Chinese Medicine Hospital of Xiaoshan District, Hangzhou, 310009; 2. Medical College of Xiamen University)

ABSTRACT Objective To observe effects and possible mechanism of elongated needle with paired needling “Shuidao” (ST28) and “Zhibian” (BL54) on neurological function of spinal cord injury rats. **Methods** Thirty SD rats were randomly divided into control group, model group and treatment group, 10 rats in each group. The model group and the treatment group were used improved Allen’s method to make models of spinal cord injury. In the treatment group, when rats revived after operation, the researchers immediately used elongated needle to needle “Shuidao” (ST28) and “Zhibian” (BL54) with method of paired needling to acupuncture the rats, about 2 cm depth and twirl for 1 min and made two ipsilateral acupoints to form a loop connected to electric acupuncture apparatus, electric acupuncture for 30 min, once per day. After 5 days the researchers used BBB scoring method to observe motor function of rats’ hind limbs and took tissue of spinal cord to make histological observation, count apoptotic index and detect expression of the Bcl-2 and Bax. **Results** Compared with the control group, in the model group, BBB motor function score significantly decreased but nerve cell apoptotic index and percentage of positive cells about Bax and Bcl-2 of spinal cord tissue increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with the model group, in the treatment group, BBB motor function score significantly increased but nerve cell apoptotic index decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); And percentage of positive cells about Bax of spinal cord tissue significantly decreased but percentage of positive cells about Bcl-2 significantly increased ($P < 0.01$). **Conclusion** Elongated needle with paired needle “Shuidao” (ST28) and “Zhibian” (BL54) may promote neural functional to recover by regulating the expression of apoptotic gene that Bax and Bcl-2 to reduce apoptosis of nerve cells.

Keywords spinal cord injury; elongated needle; method of paired needling; Shuidao (ST28); Zhibian (BL54); neurological function; apoptosis

(收稿日期: 2015-05-05; 修回日期: 2015-08-04)

编辑: 邓 媛