

针刺对慢性脊髓损伤大鼠神经递质和营养因子表达的影响

王新家 孔抗美* 齐伟力

[摘要] 目的 探讨针刺治疗慢性脊髓损伤的机理。方法 建立后路渐进性脊髓压迫大鼠模型,然后手术减压,进行电针治疗,观察联合行为评分(CBS)及胆碱乙酰转移酶(ChAT)、脑源性神经营养因子(BDNF)及其受体 TrkB 的免疫组化检测结果。结果 初次术后 90 d,电针组大鼠 CBS 评分优于减压组($P < 0.05$),ChAT 免疫组化染色阳性细胞数多于减压组($P < 0.05$),神经元和胶质细胞增强的 BDNF 和 TrkB 表达得到恢复。结论 电针治疗可能通过影响 BDNF 及其受体的表达,促进 ChAT 表达和增强其活性而对大鼠慢性脊髓损伤起治疗作用。

[关键词] 电针;脊髓损伤;脑源性神经营养因子;胆碱乙酰转移酶

Effect of acupuncture on the expression of nerve transmitter and neurotrophic factor in rats with chronic spinal cord injury WANG Xin-jia, KONG Kang-mei, QI Wei-li. Department of Spine Surgery, The Second Affiliated Hospital, Shantou University Medical College, Shantou 515041, Guangdong, China

[Abstract] Objective To explore the mechanism of electroacupuncture (EA) on chronic spinal cord injury. Methods An animal model of moderate chronic progressive compression on spinal cord was made. Then the animals were decompressed and treated with EA. The combined behavioral scores (CBS) were tested, and the expressions of choline acetyltransferase (ChAT), brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and its receptor TrkB on the section of the rats spinal cord were examined with immunohistochemical method. Results 90 days after injury, the CBS of EA group was significantly better than that of decompression group ($P < 0.05$) and the number of positive ChAT cells in ventral horn of spinal cord in EA group was more than that in decompression group ($P < 0.05$). The expressions of BDNF and TrkB enhanced after injury were recovered in the EA group. Conclusion The electroacupuncture may be effect on chronic spinal cord injury in rats by influencing the expressions of BDNF and its receptor, and improves the expression and activity of ChAT.

[Key words] electroacupuncture (EA); spinal cord injury (SCI); brain-derived neurotrophic factor (BDNF); choline acetyltransferase (ChAT)

中图分类号: R651.2, R246.2 文献标识码: A 文章编号: 1006-9771(2005)02-0094-02

[本文著录格式] 王新家,孔抗美,齐伟力.针刺对慢性脊髓损伤大鼠神经递质和营养因子表达的影响[J].中国康复理论与实践,2005,11(2):94-95.

慢性压迫性脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)是中老年常见病之一,可导致截瘫和四肢瘫,手术解除压迫虽能明显改善症状,但往往遗留部分功能障碍。针刺虽对慢性 SCI 有治疗作用,但机理尚不清楚。本实验通过 SCI 动物模型,探讨手术减压后电针(electroacupuncture, EA)治疗慢性 SCI 的机理。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组 60 只 2 月龄 Wistar 大鼠(由河南省实验动物中心提供),体重 220~270 g,雌雄各半,分笼饲养,随机分为假手术组 15 只、模型组 45 只。

1.2 动物模型制作 后路渐进性脊髓压迫大鼠模型的建立采用作者以往的方法^[1,2],造成中度压迫(30%~60%)慢性 SCI 模型。手术后再随机将模型组动物分为 3 组(每组 15 只):①压迫组:保留压迫装置;②减压组:于造模后 60 d 取出压迫装置,做捆绑对照;③ EA 组:在手术减压的基础上,于手术减压后第 2 天开

始,采用 G6805-2 多用治疗仪治疗。治疗方法为,将动物 4 肢捆绑于固定板上,于损伤节段上、下棘突间隙,相当于 $T_6 \sim T_7$ 及 $T_{11} \sim T_{12}$ 部位,各刺入 1 毫针,深度达硬膜外,接通治疗仪,近侧极板接阳极导线,远侧极板接阴极导线,疏密波,频率 0.5 ms。每天治疗 30 min,6 d 为 1 个疗程,间隔 2 天进行下 1 个疗程,共 4 个疗程。造模时 2 只动物死亡,渐进性致压过程中 1 只动物死亡,予以剔除。

1.3 免疫组化染色 造模后 90 d,将动物麻醉后自左心室插管至主动脉,灌注 40 g/L 多聚甲醛 250 ml,固定 2 h 后取出以损伤段为中心长约 30 mm($T_8 \sim T_{10}$)脊髓组织,放入相同固定液中继续固定 2 h,再放入 0.2 kg/L 蔗糖中过夜,直至标本沉入瓶底。冰冻切片。免疫组化染色采用 SP 法,胆碱乙酰转移酶(choline acetyltransferase, ChAT)抗血清为小鼠抗大鼠 IgG1 单抗(美国 Chemicon 公司产品),脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)和 TrkB 抗血清为免抗大鼠 IgG 多抗(美国 Santa Cruz 公司产品),SP 试剂盒购自北京中山生物技术公司。ChAT 抗体工作浓度为 1:100;BDNF 或 TrkB 抗体工作浓度为 1:500;2 抗和 3 抗工作浓度为 1:200。

1.4 动物行为功能评定 于造模后减压前(60 d)处

基金项目:1.广东省自然科学基金重点项目(No. 013216);2.广东省中医药局课题资助项目(No. 1040096)。

作者单位:515041 广东汕头市,汕头大学医学院第二附属医院脊柱外科。作者简介:王新家(1964-),男,河南商城县人,博士,副主任医师,主要研究方向:脊柱脊髓损伤。*通讯作者:孔抗美。

死动物前(90 d)采用联合行为评分(combined behavioral scores, CBS)对动物进行行为功能评定。

1.5 统计学处理 所得数据以($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 10.0 统计软件做两样本均数 *t* 检验或多样本均数单因素方差分析及多样本均数两两比较 *q* 检验。

2 结果

2.1 一般情况 造模后 60 d 摄 X 线侧位片显示,椎管侵占率约 30%~60%(平均 44.5%)。CBS 功能评分实验开始前所有动物均正常,60 d 时模型组可见双后肢神经功能障碍,90 d 时 EA 组 CBS 评分低于减压组($P < 0.05$),见表 1。

表 1 90 d 时组间 CBS 评分及 ChAT 阳性细胞计数比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	CBS	ChAT
假手术组	14	9.53 ± 4.58	67.43 ± 27.64
压迫组	14	30.56 ± 10.39	43.86 ± 14.57
减压组	14	20.24 ± 8.88	91.79 ± 24.09
EA 组	14	4.29 ± 6.05 ^a	130.43 ± 19.98 ^a

注:a:与假手术组和减压组比较, $P < 0.05$;与压迫组比较, $P < 0.01$ 。

2.2 免疫组化检测 假手术组大鼠脊髓前角运动神经元及大小神经元均有 ChAT 阳性表达,分布较均匀,各细胞染色强度也较一致(见封 3 图 3.1)。压迫组大鼠受压脊髓阳性细胞数明显减少,染色强度减弱。减压组大鼠脊髓阳性细胞数较压迫组明显增多,染色强度增加。EA 组大鼠阳性细胞数较减压组增多,且染色强度增强,与压迫组和减压组比较均有显著性差异($P < 0.05 \sim 0.01$),见表 1。ChAT 阳性细胞数与 CBS 值比较呈负相关($r = -0.975, P = 0.05$)。

BDNF 和 TrkB 反应物质几乎存在于假手术组大鼠脊髓组织所有神经元胞浆中。BDNF 呈棕黄色,核浆界线清楚,无神经元胞核染色。灰白质中胶质细胞染色明显。TrkB 在胞浆、胞核中均呈棕黄色。压迫组大鼠压迫节段和压迫嘴、尾端脊髓组织神经元和胶质细胞的 BDNF 与 TrkB 表达显著增强(见封 3 图 3.2、3.3)。减压组大鼠 BDNF 和 TrkB 阳性反应神经元和胶质细胞减少。EA 组大鼠受压节段脊髓组织 BDNF 和 TrkB 阳性染色细胞明显恢复,压迫嘴、尾端阳性染色细胞数也明显减少,且强度减弱。

3 讨论

研究表明,脊髓前角运动神经元以乙酰胆碱为神经递质发挥其正常功能。ChAT 是细胞内催化乙酰胆碱合成的酶,该酶的活性变化能直接影响神经元内乙酰胆碱合成,从而影响正常的神经功能,因而可作为胆碱能神经元的明确标志^[3],并能最好地反映脊髓运动神经元功能。Yoshiyuki 等研究发现,慢性 SCI 大鼠 ChAT 阳性神经元减少,ChAT 免疫荧光强度与侵占率呈负相关^[4]。本实验显示,慢性压迫性 SCI 大鼠脊髓受压后,ChAT 阳性染色细胞数减少,染色强度减

弱,与上述研究结果一致。

BDNF 是广谱神经营养因子,能挽救损伤的脊髓运动神经元和感觉神经元,TrkB 为其受体。慢性 SCI 后,受压迫水平的运动神经元胞体和树突 BDNF 免疫反应增强,压迫嘴端的前角细胞 BDNF 免疫反应亦增强,胞体扩大,且与慢性机械性压迫严重程度成比例,这可能对神经保留和存活有作用^[5]。本研究显示,SCI 后,压迫节段神经元及胶质细胞 BDNF 表达增强,阳染的胶质细胞增多,与上述实验结果一致。

大量实验显示,SCI 后给予外源性神经营养因子可以促进脊髓神经再生。为此,我们曾设想 EA 促进脊髓神经功能恢复的作用可能是由于增加 BDNF 的表达。但本实验 EA 组大鼠 BDNF 的表达较压迫组明显下降。Longo 等发现,切断大鼠坐骨神经后神经生长因子表达增加,给予脉冲电磁场治疗后神经节段损伤神经纤维(尤其是远端)神经生长因子活性显著降低^[6]。我们推测,这可能是由于 EA 治疗促进了神经纤维的主动活动,使神经细胞的各种酶类活性增加,轴突运输加强,代谢旺盛,加速神经营养因子的转运,利于神经再生和神经功能的恢复;或者是 EA 促进了脊髓神经的再生,从而对神经营养因子的需求量减少。

本研究显示经 EA 治疗后,慢性 SCI 大鼠脊髓组织 ChAT 阳性细胞明显增多,表达增强;同时,神经元 BDNF 及其受体 TrkB 的表达增强,而 EA 治疗后表达减弱,且 BDNF 与 ChAT 呈负相关,与 Bakhit 等在急性 SCI 研究中的发现相似^[3]。因此我们认为,ChAT 表达的恢复与神经营养因子的表达有关,而 EA 治疗大鼠慢性 SCI 的机制之一可能是通过增强 BDNF 的运输及 ChAT 的表达和活性,促进运动功能的恢复。

[参考文献]

[1] 孔抗美,齐伟力,周强.慢性压迫性脊髓损伤细胞凋亡的实验研究[J].中华创伤杂志,2001,17(3):158—160.
[2] 王新家,孔抗美,齐伟力.减压对慢性压迫性脊髓损伤大鼠 ChAT 表达的影响[J].中国脊柱脊髓杂志,2003,13(3):157—159.
[3] Bakhit C, Armanini M, Wong WLE, et al. Increase in nerve growth factor-like immunoreactivity and decrease in choline acetyltransferase following contusive spinal cord injury[J].Brain Res,1991,554:264—271.
[4] Yoshiyuki Y, Yoshikazu F, Masaya N, et al. Decreased choline acetyltransferase activity in the murine spinal cord motoneurons under chronic mechanical compression[J].Spinal Cord,1997,35:729—734.
[5] Uchida K, Baba H, Maezawa Y, et al. Histological investigation of spinal cord lesions in the spinal hyperostotic mouse (twy/twy): morphological changes in anterior horn cells and immunoreactivity to neurotrophic factor[J].J Neurol, 1998,245(12):781—793.
[6] Longo FM, Yang T, Hamilton S, et al. Electromagnetic fields influence NGF activity and levels following sciatic nerve transection[J].J Neuroscience Research,1999,55:230—237.
(收稿日期:2004-11-12)

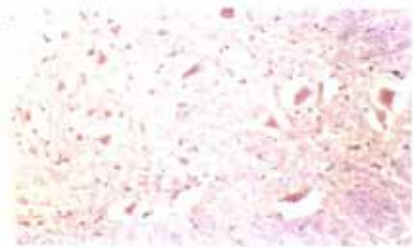


图3.1 假手术组脊髓前角运动神经元及大小神经元均有ChAT 阳性表达。分布较均匀、各细胞染色强度也较一致

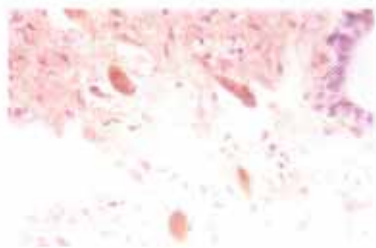


图3.2 压迫组脊髓组织神经元和胶质细胞的BDNF 表达显著增强



图3.3 压迫组脊髓组织神经元和胶质细胞的TrkB 表达显著增强