

电针对大鼠脊髓损伤后损伤处远端少突胶质细胞的影响

李经辉¹⁾, 黄 辉¹⁾, 李娟娟²⁾, 吴海鹰³⁾, 余化霖¹⁾, 白 鹏¹⁾

(1) 昆明医科大学第一附属医院神经外二科, 云南昆明 650032; 2) 昆明医科大学基础学院, 云南昆明 650500; 3) 昆明医科大学第一附属医院急诊科, 云南昆明 650032)

[摘要] **目的** 探讨电针对大鼠脊髓损伤后损伤处少突胶质细胞的影响, 为探索电针治疗脊髓损伤提供实验依据. **方法** 将 60 只 SD 大鼠随机分为 3 组, 即电针治疗组 (EA)、脊髓损伤组 (SCI)、对照组 (SHAM), 每组各 20 只大鼠. EA 组接受 SCI 手术 +EA 治疗; SCI 组接受 SCI 手术; SHAM 组仅接受椎板切除术. 在术后 24 h, 术后 7 d、14 d、21 d、28 d 取脊髓损伤处组织行免疫组化染色, 测定 APC 阳性细胞数的表达变化. **结果** 同一时间点不同组之间, 少突胶质细胞数目比较, 电针组明显高于其他组; 组之间的对比差异有统计学意义 ($P < 0.05$). 电针组之间不同时间点对比, 随着电针时间的增长, 细胞数不断增长; 不同时间点之间的差异有统计学意义 ($P < 0.05$). **结论** 电针能促使大鼠脊髓损伤后损伤处远端少突胶质细胞的增殖与分化.

[关键词] 脊髓损伤模型; 电针; 少突胶质细胞

[中图分类号] R651.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095 - 610X (2015) 04 - 0019 - 04

Effect of Electro-acupuncture Treatment on Oligodendrocyte in the Remote Segment of Spinal Cord Injury Rats

LI Jing-hui¹⁾, HUANG Hui¹⁾, LI Juan-juan²⁾, WU Hai-yin³⁾, YU Hua-lin¹⁾, BAI Peng¹⁾

(1) *Second Dept. of Neurosurgery, First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650032*; 2) *School of Basic Medicine, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650500*; 3) *Dept. of Emergency, First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650032, China*)

[Abstract] **Objective** The study was aimed to research the expression of oligodendrocyte in the remote segment of the spinal cord injury (SCI) rats model after the electro-acupuncture treatment, in order to provide an experimental basis for electro-acupuncture treatment of SCI. **Methods** 60 SD rats were randomly divided into the SCI group, the SHAM group and the electro-acupuncture (EA) group. The tissue materials of acute SCI model were obtained on the 7th, 14th, 21st and 28th day respectively after the injury. The expression of the oligodendrocyte in the injured spinal cord tissue in each group was observed by DAB staining. **Results** At the same time, the number of oligodendrocyte in EA group was significantly higher than that in other groups, and the difference had statistical significance ($P < 0.05$). In EA group, the number of cells had increased gradually as treatment time growing, and there were significant differences between different time points ($P < 0.05$). **Conclusion** Electric-acupuncture could induce the proliferation and differentiation of oligodendrocyte and its precursor cells in the remote segment of SCI rats.

[Key words] Spinal Cord Injury Model; Electric-acupuncture; Oligodendrocyte

[基金项目] 云南省教育厅一般基金资助项目 (2013y287); 云南省教育厅重大专项基金资助项目 (Zd2012001)

[作者简介] 李经辉 (1978 ~), 男, 云南昆明市人, 医学博士, 副主任医师, 主要从事神经外科临床工作. 吴海鹰和李经辉对本文有同等贡献.

[通讯作者] 余化霖. E-mail: yuhl308@126.com; 白鹏. E-mail: frogprincea@163.com

脊髓损伤 (spinal cord injury, SCI) 是一种严重的神经系统创伤。随着社会的进步, 脊髓损伤的发病率逐年升高, 是神经外科临床中的常见病、多发病^[1]。中医针灸是我国传统医学瑰宝, 加以改进, 利用电流激活治疗脊髓损伤在临床上已开展^[2]。少突胶质细胞是中枢神经系统能形成髓鞘的主要细胞, 在 SCI 的病理过程中, 少突胶质细胞死亡是造成轴突脱髓鞘的主要原因。减少其的丢失及促进其再生, 实现轴突髓鞘再生重建就成为 SCI 神经功能修复的基础^[3-5]。本研究拟通过电针对大鼠脊髓损伤处远端脊髓的 APC 表达的实验研究, 进一步明确电针对大鼠脊髓损伤后少突胶质细胞的影响, 为祖国传统针灸医学治疗脊髓损伤提供理论基础。

1 材料

1.1 实验动物

成年健康雌性大鼠 60 只, 体重为 (250 ± 20) g, 由昆明医科大学动物中心提供。

1.2 主要仪器及试剂

华佗牌电针仪 SDZ-V 型 (苏州医疗用品厂有限公司)、冰冻切片 (德国 Leica 公司)、倒置相差显微镜 (德国 Leica 公司)、DAB 显色试剂盒: DAB-1031 (SANTA cruz biotechnology 公司)、APC 抗体 (Millipore 公司, USA)

1.3 方法

1.3.1 实验动物分组 本实验将 60 只 SD 大鼠随机分为 3 组, 电针治疗组 (EA 组)、脊髓损伤组 (SCI 组)、对照组, 每组各 20 只大鼠。EA 组接受 SCI 手术 +EA 治疗; SCI 组接受 SCI 手术; SHAM 组仅接受椎板切除术。3 组分 4 个时间组 (术后 7 d、14 d、21 d、28 d) 测定损伤后局部脊髓组织内的 APC 阳性细胞数的表达变化。

1.3.2 大鼠 SCI 模型建立 术前 SD 大鼠称重, 按照每 100 g 0.3 mL 10% 水合氯醛腹腔内注射, 麻醉生效后, 大鼠俯卧位固定在手术台上, 常规消毒铺巾确定 T₁₀ 棘突位置, 术野备皮, 用碘伏消毒, 精细咬骨钳咬去 T₁₀ 椎板, 暴露硬脊膜。充分止血, 垂直于脊膜, 置入瘤夹 (标定力量为 70 g), 垂直完全横跨脊髓, 完全夹住脊髓, 持续 60 s, 取出瘤夹。每日定时膀胱挤压排尿两次, 给与截瘫护理^[6]。

1.3.3 治疗 电针组在造模后第 3 天选取“命门” (第 2 腰椎棘突下, 向上斜刺)、“大椎” (第 7 颈

椎棘突下, 向下斜刺), 进针约 0.5 ~ 0.7 cm, 双侧“环跳” (在股骨大转子与尾骨之间, 向臀部斜刺), 进针约 0.5 ~ 0.7 cm, 使用华佗牌电针治疗仪器 SDZ-V 型, 持续脉冲电流, 波形为疏密波 (疏波工作 5 s, 密波工作 9 s, 疏波与密波频率之比为 1:5)、频率 10 Hz, 强度 0.75 mA, 治疗时间为 30 min, 输出强度以大鼠双侧大腿肌肉轻微抽动为准。EA 组术后第 3 天直到术后第 28 天, 每天电针 1 次。SCI 组和 SHAM 组不做任何处理, 仅给予其托起紧握一下, 模拟电针组给予大鼠的应激状态。疏密波 (疏波工作 5 s, 密波工作 9 s, 疏波与密波频率之比为 1:5)

1.4 脊髓组织的免疫组织化学染色^[7,8]

1.4.1 取材与固定 麻醉动物后立即取下脊髓组织投入预先配好的固定液中 (4% 的多聚甲醛)。

1.4.2 脱水 分别用 10%、20%、30% 浓度的蔗糖作脱水剂, 待其沉底后, 进行冰冻切片。

1.4.3 冰冻切片 用 Leica 冷冻包埋剂 OTC 包埋。连续冰冻切片 (厚 15 ~ 20 μm), 粘贴于铬矾明胶处理过的洁净载玻片上风干, 4 °C 冰箱保存备用。

1.5 图像采集

组化图片在 Leica 显微镜下放大 400 倍采图, 脊髓损伤远端 4 mm 处同一部位不同点取 5 张图片, 以 5 张切片的阳性细胞数的均数代表该大鼠的阳性细胞数。数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示在同一视野下人工计算细胞数目, 将所得的细胞数进行统计分析。

1.6 统计学分析

运用 SPSS Statistics 统计学软件对所测得数据进行分析, 所得数据以均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。采用单因素方差分析多样本均数间多重比较, 对资料方差齐性 Levene 检验, 按 $\alpha = 0.10$ 水准, $P < 0.05$ 作为统计学差异显著性的标准。

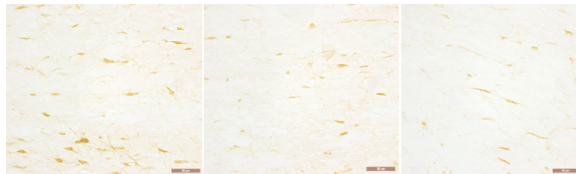
2 结果

在 EA 组中, 随着电针时间的延长, APC 阳性细胞表达增高 (图 1), 各时间点之间的对比有统计学差异 ($P < 0.05$); EA 组与 SCI 组阳性细胞数在损伤早、中期没有统计学差异 ($P > 0.05$); 随着时间的延长, 晚期 EA 组表达明显增高, EA 组与 SCI 组阳性细胞数高于 SHAM 组, 各组之间的比较具有统计学差异 ($P < 0.05$), 见表 1。

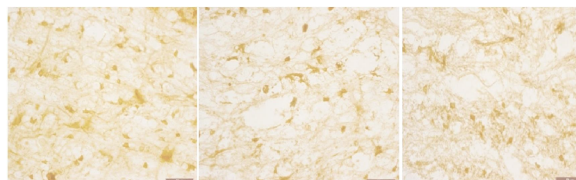
表 1 各组损伤后 APC 阳性细胞数目的比较 $[(\bar{x} \pm s), \text{个}]$ Tab. 1 The change of positive oligodendrocyte counts after SCI $[(\bar{x} \pm s), \text{个}]$

组别	n	7 d	14 d	21 d	28 d
EA 组	5	38.00 ± 3.54*	51.20 ± 7.73**	64.00 ± 7.81**	81.80 ± 4.66**
SCI 组	5	37.80 ± 7.40*	46.20 ± 3.56*	50.20 ± 3.83**	59.80 ± 3.11**
SHAM 组	5	32.40 ± 3.58	32.20 ± 2.68#	34.00 ± 2.45#	33.80 ± 3.63#

与 SCI 组比较, * $P < 0.05$; 与 SHAM 组比较, # $P < 0.05$.



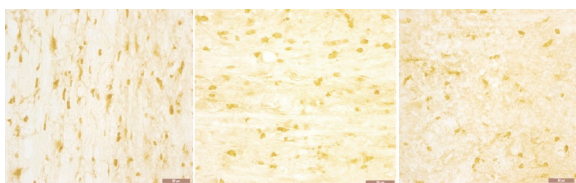
AE 组 SCI 组 SHAM 组
各组大鼠术后 7 d APC 阳性细胞的免疫组化切片观察图



AE 组 SCI 组 SHAM 组
各组大鼠术后 14 d APC 阳性细胞的免疫组化切片观察图



AE 组 SCI 组 SHAM 组
各组大鼠术后 21 d APC 阳性细胞的免疫组化切片观察图



AE 组 SCI 组 SHAM 组
各组大鼠术后 28 d APC 阳性细胞的免疫组化切片观察图

图 1 脊髓组织不同时间 APC 阳性细胞免疫组化图片 ($\times 400, 50 \mu\text{m}$)

Fig. 1 The cell immunohistochemistry of positive oligodendrocyte in different time points ($\times 400, 50 \mu\text{m}$)

3 讨论

中国传统医学认为, 督脉具有总督一身之阳经、起到调节经气的作用, 电针督脉不仅能调经、通气血, 而且也是电场脉冲, 局部具有银针刺刺激与电场刺激的双重作用. 电针治疗 SCI 有较好的临床疗效已得到医学界广泛认可^[9,10].

研究证实, 电针能使大鼠脊髓损伤的神经功能恢复. 电针对损伤的脊髓可以改善局部微循环, 加快组织水肿的消退, 阻止氧自由基的产生, 降低兴奋性氨基酸的产生, 抑制细胞凋亡和阻止细胞的坏死, 促进轴突, 细胞的再生和修复^[11,12]. 电针能够保护脊髓组织免受损伤, 促使细胞的再生, 为再修复创造了有利条件并调高神经营养因子的表达^[3-6], 而有实验发现脑源性神经营养因子与神经营养素 3 能促使少突胶质细胞的增殖与成熟. 少突胶质细胞死亡进一步引起神经轴突脱髓鞘改变, 髓鞘改变和髓鞘形成细胞的功能异常都将影响神经轴突的正常功能发挥^[16,17]. Totoiu 等^[17]研究表明 SCI 后损伤脊髓经历了长期的轴突脱髓鞘变化过程, 并指出干预轴突脱髓鞘改变对 SCI 治疗有重要的意义. 近来不少研究表明促进轴突髓鞘化、提高脱髓鞘轴突的神经传导功能有助于损伤脊髓神经功能的恢复. 补充丢失的少突胶质细胞, 改善残留神经轴突髓鞘化将有利于损伤脊髓的神经功能改善. 目前, 关于少突胶质细胞移植促使轴突髓鞘化、治疗 SCI 的研究尚处于起步阶段, 疗效尚未肯定^[17].

本实验结果提示电针治疗后大鼠脊髓组织局部 APC 阳性细胞数目明显多于 SCI 组与 SHAM 组, 术后第 7 d 少突胶质细胞数明显高于假手术组, 说明了电针治疗可刺激少突胶质细胞的增生. 而对于增生的少突胶质细胞的来源考虑两个方面: 一方面考虑为少突胶质细胞前体细胞分化成熟^[18]; 另一方面增多的细胞考虑为成熟少突胶质细胞逆分化所致^[19]. 因此, 电针可以促使大鼠脊髓损伤后各个时间段少突胶质细胞的增殖并抑制其凋亡, 从而保护残存神经纤维的功能, 进而保护脊髓, 改善其功能. 为祖国传统医学中医针灸理论治疗脊髓损伤提供科学, 客观的基础理论支持.

[参考文献]

- [1] HAGEN E M, REKAND T, GILHUS NEVV, et al. Traumatic spinal cord injuries—incidence, mechanisms and course [J]. Tidsskr Nor Laegeforen, 2012, 132(7):831–837.

- [2] 何竟,李齐寅,丁明甫. 针灸治疗脊髓损伤文献计量分析[J]. 中国医学康复杂志,2010,25(11):1 093.
- [3] ANCHEZ I, HASSINGER L, PASKEVICH P A, et al. Oligodendroglia regulate the regional expansion of axon caliber and local accumulation of neurofilaments during development independently of myelin formation [J]. *J Neurosci*, 1996, 16:5 095 – 5 105.
- [4] SMITH P M, JEFFERY N D. Histological and ultrastructural analysis of white matter damage after naturally-occurring spinal cord injury [J]. *Brain Pathol*, 2006, 16:99 – 109.
- [5] LABOMBARDA F, GONZLEZ S, LIMA A, et al. Progesterone attenuates astro- and microgliosis and enhances oligodendrocyte differentiation following spinal cord injury [J]. *Exp Neurol*, 2011, 231(1):135 – 146.
- [6] 李经辉,黄辉,余化霖,等. 大鼠钳夹脊髓损伤模型的磁共振影像与感觉诱发电位的相关研究[J]. 昆明理工大学学报(自然科学版),2013,38(1):80 – 84.
- [7] LEE S M, YUNE T Y, KIM S J, et al. Minocycline reduces cell death and improves functional recovery after traumatic spinal cord injury in the rat [J]. *J Neurotrauma*, 2003, 20: 1 017 – 1 027.
- [8] MCDONALD J W, BELEGU V. Demyelination and remyelination after spinal cord injury [J]. *J Neurotrauma*, 2006, 23(3-4):345 – 359.
- [9] 杨成,刘同慎,吴洪华. 电针对脊髓损伤后少突胶质细胞再髓鞘化的影响[J]. 解剖学杂志,2005, 28(4): 392.
- [10] 何丽娜,袁章,陈炜. 电刺激治疗脊髓损伤的实验及临床研究进展[J]. 中国康复理论与实践,2009, 15(8): 720.
- [11] 李连欣,张进禄,周东生. 电针对实验性脊髓损伤后兴奋性氨基酸含量的影响[J]. 中国针灸,2000,(12): 741 – 742.
- [12] 吴永刚,孙忠人,李志刚,等. 针刺对实验性脊髓损伤早期大鼠自由基改变的影响[J]. 中医杂志,1999,40(10):620 – 621.
- [13] QUN L I, MARCEL BRUS-RAMER, JOHN H, et al. Electrical stimulation of the medullary pyramid promotes proliferation and differentiation of oligodendrocyte progenitor cells in the corticospinal tract of the adult rat [J]. *Neurosci Lett*, 2010, 479(2):128 – 133.
- [14] YANG W O, HUANG Y L, DA C D, et al. Electroacupuncture reduces rat's neuronal ischemic injury and enhances the expression of basic fibroblast growth factor [J]. *Acupunct Electrother Res*, 1999, 24(1):1 – 10.
- [15] 王新家,孔抗美,齐伟力. 针刺影响慢性脊髓损伤大鼠 BDNF 及其受体 TrkF3 的表达[J]. 汕头大学医学院学报,2002, 15(1):20 – 22.
- [16] TOTOIU M O, KEIRSTEAD H S. Spinal cord injury is accompanied by chronic progressive demyelination [J]. *J Comp Neurol*, 2005, 486:373 – 383.
- [17] KEIRSTEAD H S, NISTOR G, BERNAL G, et al. Human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitor cell transplants remyelinate and restore locomotion after spinal cord injury [J]. *J Neurosci*, 2005, 25:4 694 – 4 705.
- [18] ISHII K, TODA M, NAKAI Y, et al. Increase of oligodendrocyte progenitor cells after spinal cord injury [J]. *J Neurosci Res*, 2001, 65(6):500 – 507.
- [19] MCTIGUE D M, HORNER P J, STOKES B T, et al. Neurotrophin-3 and brain-derived neurotrophic factor induce oligodendrocyte proliferation and myelination of regenerating axons in the contused adult rat spinal cord [J]. *J Neurosci*, 1998, 18(14):5 354 – 5 365.

(2015-01-17 收稿)