

弩药针刺对大鼠脊髓损伤后运动功能及 BDNF 表达的影响

田志¹, 黄军^{*1}, 王钊², 黄纯海², 张方³

1. 中南大学湘雅医院神经外科, 湖南 长沙 410008

2. 吉首大学第一附属医院神经外科, 湖南 吉首 416000

3. 吉首大学第一附属医院康复科, 湖南 吉首 416000

摘要: **目的** 研究弩药针刺在大鼠脊髓损伤后运动功能变化以及 BDNF 表达的变化。 **方法** 采用脊髓半横断损伤模型。100 只 SD 大鼠随机分为对照组、假手术组、脊髓损伤组、单纯针刺组、弩药针刺组, 每组分为 3 天、7 天、14 天、21 天共 4 个亚组, 每组 5 只。BBB 法评定大鼠后肢运动功能变化, 免疫组化法检测大鼠脊髓中 BDNF 的表达变化。 **结果** BBB 评分显示弩药针刺组的各时间点评分均高于脊髓损伤组 ($P < 0.05$), 弩药针刺组 7、14、21 d 的 BDNF 表达均高于脊髓损伤组 ($P < 0.05$), 且与 BBB 评分呈正相关 ($r = 0.717, P < 0.05$)。 **结论** 弩药针刺可明显改善脊髓损伤大鼠的运动功能, 并可明显促进大鼠脊髓损伤后 BDNF 的表达。

关键词: 弩药针刺; 大鼠; 脊髓损伤; 运动功能; BDNF

DOI: 10.16636/j.cnki.jinn.2017.02.013

Effect of crossbow medicine needle therapy on motor function and expression of brain-derived neurotrophic factor after spinal cord injury in rats

TIAN Zhi¹, HUANG Jun^{*1}, WANG Zhao², HUANG Chun-hai², ZHANG Fang³. 1 Department of Neurosurgery, Xiangya Hospital of Central South University, Changsha, 410008, China. 2 Department of Neurosurgery, The First Affiliated Hospital of Jishou University, Jishou, 416000, China. 3 Department of Rehabilitation, The First Affiliated Hospital of Jishou University, Jishou, 416000, China

Abstract: **Objective** To investigate the effect of crossbow medicine needle therapy on motor function and expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) after spinal cord injury in rats. **Methods** A rat model of hemisection spinal cord injury was established. A total of 100 Sprague-Dawley rats were randomly divided into control group, sham-operation group, spinal cord injury group, simple acupuncture group, and crossbow medicine needle therapy group, and each group was further divided into 3-, 7-, 14-, and 21-day subgroups, with 5 rats in each subgroup. The BBB method was used to evaluate the changes in hindlimb motor function, and Immunohistochemistry was used to measure the changes in the expression of BDNF in the spinal cord. **Results** Compared with the spinal cord injury group, the crossbow medicine needle therapy group had a significantly higher BBB score at all time points ($P < 0.05$) and significantly higher expression of BDNF at 7, 14, and 21 days ($P < 0.05$), which was positively correlated with BBB score ($r = 0.717, P < 0.05$). **Conclusions** Crossbow medicine needle therapy can significantly improve motor function and promote the expression of BDNF after spinal cord injury in rats.

Key words: Crossbow medicine needle therapy; Rat; Spinal cord injury; Motor function; Brain-derived neurotrophic factor

脊髓损伤 (spinal cord injury, SCI) 一直是神经科学的研究热点和难点之一。SCI 的治疗方法较多, 临床研究发现针刺疗法能防止继发性损伤, 促进脊髓损伤的恢复^[1-3]。弩药针刺是众多针刺疗法中的一种, 但该疗法的现代临床研究、运用却相对

偏少, 疗效缺乏系统的评价, 其对脊髓损伤后神经保护作用机制尚无相关报道。脑源性神经营养因子 (brain derived neurotrophic factor, BDNF) 与神经元的生长、发育、分化、成熟有很大关系^[4], 在中枢神经损伤后再生修复和防止神经细胞退化性变等多

基金项目: 湖南省科技厅科技计划项目 (应用基础研究科技专项: 2011FJ6050); 湖南省科技创新平台与人才计划 - 临床医疗技术示范基地 (项目编号: 2016SK4007)

收稿日期: 2017-01-27; **修回日期:** 2017-03-20

作者简介: 田志 (1981-), 男, 副主任医师, 在读硕士, 主要从事脊髓损伤、脑胶质瘤的基础及临床研究。

通讯作者: 黄军 (1968-), 男, 副教授, 硕士生导师, 博士, 主要从事脑血管病、脑胶质瘤及颅脑脊髓损伤的基础及临床研究。

方面发挥着至关重要的作用^[5]。本研究通过随机对照研究,观察脊髓半横断损伤后弩药针刺对大鼠后肢运动功能变化的影响,以及对 BDNF 表达变化的影响,为探讨弩药针刺对脊髓损伤后神经保护作用的可能机制提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 主要仪器和试剂

兔抗鼠 BDNF 购自北京博奥森公司, TritonX-100 购自上海远慕公司,其它化学试剂为国产分析纯试剂。弩药针的制备:改良为针灸针。弩药的制备:参考祝炯奎等人^[6]的方法制作。

1.2 动物及实验分组

健康雄性清洁级 SD 大鼠 100 只,购自中南大学湘雅医学院实验动物中心,质量 (200 ± 20) g,适应性饲养 5 d 后进入实验。按随机数字法将大鼠分为 5 组:正常对照组、假手术组、脊髓损伤组、单纯针刺组、弩药针刺组,各组严格按照实验动物福利准则饲养,且饲养条件相同。

1.3 模型制备

30 g/L 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,固定于手术台上,备皮,碘伏消毒后,定位 T10 后采取后正中切口,切开皮肤后分离肌肉显露 T10 段的棘突及椎板,咬除棘突及椎板,暴露脊髓后用尖刀横断半脊髓,然后分层缝合皮下组织及皮肤,麻醉苏醒后即刻出现一侧后肢瘫痪、拖地行走,但无排尿及排便失禁^[7,8]。术后分别单笼饲养。

1.4 干预方法

正常对照组:不造模,不做任何干预。

假手术组:仅去除 T10 段的棘突及椎板,不横断半脊髓,术后不做任何干预。

脊髓损伤组:造模,术后不做任何干预。

单纯针刺组:造模,术后参照《大鼠穴位图谱的研制》选择 SCI 平面上下的华佗夹脊穴、足三里、阳陵泉及三阴交^[9],用针直刺或斜刺,运针得气后留针 20 min,期间捻转两次,拔针。每天 1 次。

弩药针刺组:造模,术后选择 SCI 平面上下的华佗夹脊穴、足三里、阳陵泉及三阴交穴,将弩药针浸入弩药液中,然后直刺或斜刺,运针得气后留针 20 min,期间捻转两次,拔针。每天 1 次。

所有针刺治疗均由具备针灸资质执业医师进行。

1.5 运动功能评分

采用 BBB 评分:将动物放入一开口盆,轻敲盆壁,使其爬行,观察动物的臀、膝、踝关节行走、躯

干运动及其协调情况。评分时间为晚上 7 点至 8 点,为避免主观影响,本研究采用三人独立观察记录,单盲情况下三人独立用 BBB 运动功能评分法进行评分,取三人均值为准。

1.6 灌注、固定及取材

5 组分 3 天、7 天、14 天、21 天共 4 个亚组,每组 5 只。大鼠麻醉后迅速开胸、心内插管、并将右心耳剪开,随即用生理盐水灌注至肝脏变为灰白色且从心脏流出为透明清亮液体时停止,改用 40 g/L 多聚甲醛磷酸缓冲液灌注,直至大鼠四肢抽搐、全身僵硬及肝脏变硬时停止灌注。取下损伤同侧 T10-11 段半脊髓标本,立即放入 4% 多聚甲醛溶液中固定,4 h 后石蜡包埋行连续切片,切片厚 4 μ m。

1.7 免疫组织化学染色

间断取片,贴于已包被的载玻片上。脱蜡至水后,放入枸橼酸盐缓冲液中,行抗原修复,当容器的温度达 92℃ 后持续 15 min,然后端离电炉,室温冷却 30 min 后用蒸馏水冲洗,再行 PBS 漂洗。将已证实的脊髓神经元的组织切片行免疫组化染色(ABC 法)。0.01 M PBS 漂洗 3 次;0.15 体积分数的 H_2O_2 /0.01 M PBS 漂洗 30 min;0.01 M PBS 再次漂洗 3 次;0.05 体积分数的羊血清/0.01 M PBS 行背景封闭(37℃,15 min);I 抗(BDNF 抗血清 1:500)4℃ 置 48 h;0.01 M PBS 漂洗 3 次;II 抗(1:200)37℃ 置 1.5 h;0.01 M PBS 漂洗 3 次;AB 复合物(1:100)37℃ 置 1.5 h;0.01 M PBS 漂洗 3 次;Tris-HCL 缓冲液 37℃ 孵育 15 分钟;DAB 显色 5 分钟;蒸馏水漂洗。对照组除用 0.01 M PBS 代替 I 抗外其余步骤与其他组相同。自来水冲洗充分后,苏木素轻度复染,用梯度乙醇脱水和二甲苯脱水、透明,最后中性树脂胶封片。

1.8 结果判定及统计分析

光镜下 BDNF 免疫组织化学染色的阳性产物呈现为稍高于背景的棕黄色或棕褐色颗粒。每只大鼠随机取 5 张切片,在光镜下对腹侧灰质中有明显细胞核的阳性细胞数进行计数。结果采用 SPSS 22.0 统计分析软件包处理数据,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。根据数据资料的特征,多组样本行组间比较采用单因素方差分析,如方差齐性时采用 SNK-q 进行检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组的运动功能变化

实验前各组大鼠的后肢体运动功能 BBB 评分

均为 21.0 分,正常组和假手术组 BBB 评分一直无明显变化。脊髓损伤后大鼠立即出现单侧后肢瘫痪, BBB 评分均为 0-1 分,随后逐步升高,7d 后单纯针刺组及弩药针刺组与 SCI 组比较有差异 ($P < 0.05$),弩药针刺组与单纯针刺组两组之间对比也有差异 ($P < 0.05$),到 21 d 接近正常但未能完全恢复。各组大鼠 3 d,7 d,14 d 及 21 d BBB 评分情况比较,结果见表 1。

表 1 各组大鼠 BBB 评分情况比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	3 d	7 d	14 d	21 d
正常组	5	20.00 ± 1.00	20.00 ± 1.00	20.00 ± 1.00	20.00 ± 1.00
假手术组	5	20.00 ± 1.00	20.00 ± 1.00	20.00 ± 1.00	20.00 ± 1.00
模型组	5	0.73 ± 0.28	3.00 ± 0.23	9.93 ± 0.55	15.27 ± 0.60
单纯针刺组	5	1.73 ± 0.28*	5.93 ± 0.28*	12.40 ± 0.28*	16.33 ± 0.34*
弩药针刺组	5	2.27 ± 0.36*	8.40 ± 0.28*	14.80 ± 0.38*	18.34 ± 0.47*

注:与模型组比较,* $P < 0.05$

2.2 脊髓损伤后病理形态改变

常规苏木精-伊红染色后光镜下行病理学观察。对照组和假手术组脊髓形态未见异常。SCI 组术后 3 天可见脊髓水肿、出血,部分神经元坏死;术后 7 天坏死加重,脊髓呈暗褐色、变细,见少量瘢痕;光镜下可见灰质神经元数量明显减少或皱缩,并有组织坏死和胶质增生;术后 21 天可见明显的胶质增生,损伤脊髓上下端由白色较韧的瘢痕连接,部分轴突及髓鞘退变形成空泡,神经元数目无继续减少。单纯针刺组和弩药针刺组,术后 3 天

对比 SCI 组可见脊髓水肿出血、炎性细胞浸润、胶质细胞增生减轻;术后 7 天神经元数量较脊髓损伤组增多,神经元核固缩、变性等明显减少,灰质中囊腔较少;术后 21 天神经元形态尚完好丰满,无明显皱缩。

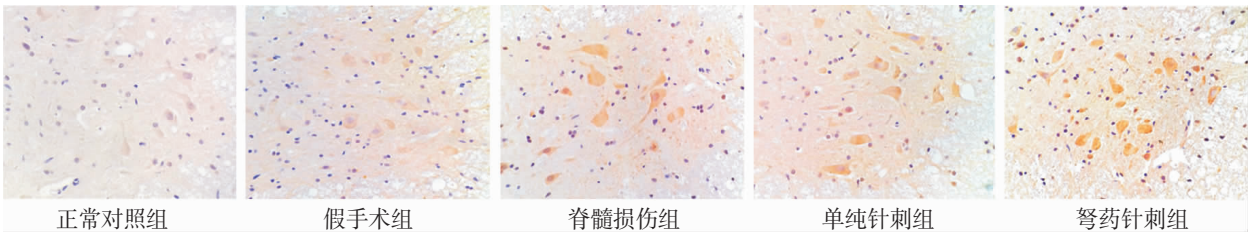
2.3 BDNF 在脊髓组织中的定位及损伤后的表达变化

结果显示,光镜下 BDNF 阳性产物主要分布于脊髓腹角的运动神经元胞浆中,正常组和假手术组脊髓灰质神经元存在 BDNF,呈稍高于背景的阳性表达,胶质细胞未见明显免疫阳性着色,两组之间各时间差异均不明显 ($P > 0.05$)。脊髓损伤后,SCI 组、单纯针刺组及弩药针刺组神经元 BDNF 免疫阳性产物表达随着时间推移着色加深,且 BDNF 阳性神经元数逐渐增加,7 d 时达到高峰,21 d 时下降,7 d,14 d,21 d 时相单纯针刺组、弩药针刺组与 SCI 组相比均具有明显差异 ($P < 0.05$),弩药针刺组与单纯针刺组相比也有差异 ($P < 0.05$),结果见表 2,各组 BDNF 表达情况见附图。

表 2 各实验组 BDNF 阳性运动神经元计数比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	3 d	7 d	14 d	21 d
正常组	5	7.40 ± 0.55	8.00 ± 0.71	7.60 ± 0.55	8.00 ± 0.71
假手术组	5	7.20 ± 0.45	7.60 ± 0.55	8.40 ± 0.55	7.80 ± 0.45
模型组	5	8.40 ± 0.55	10.80 ± 0.84	8.80 ± 0.45	7.60 ± 0.89
单纯针刺组	5	9.80 ± 0.84	12.80 ± 0.84*	11.40 ± 0.89*	10.80 ± 0.84*
弩药针刺组	5	10.00 ± 0.71	16.20 ± 0.84*	14.80 ± 0.84*	12.60 ± 0.89

注:与模型组比较,* $P < 0.05$



附图 术后 7 天各组脊髓 BDNF 免疫组化染色 ($\times 100$)

2.4 BDNF 与 BBB 相关性分析

因 BDNF 阳性神经元数在 21 d 时明显下降,故通过对弩药针刺组大鼠 3 d,7 d,14 d BDNF 阳性神经元计数及 BBB 评分进行相关性分析,相关系数 $r = 0.717$ ($P < 0.05$),表明两者呈高度正相关。

3 讨论

BDNF 是由德国神经化学家 Barde 等人^[10]于 1982 年首次从猪脑中分离纯化出来的一种具有促

进神经生长活性的蛋白质,是成熟的中枢及周围神经系统的神经元维持生存及正常生理功能所必需的因子,并能防止神经元受损伤死亡、改善神经元的病理状态,具有促进受损伤神经元再生及分化等生物效应^[11,12]。体内外的研究表明,BDNF 对 SCI 后脊髓神经元轴索及髓鞘的再生具有促进作用^[13-15]。

弩药针刺疗法由针具和药物两部份配合组成,适宜疾病广,疗效显著,现代临床运用弩药针刺治

疗膝骨性关节炎、神经根型颈椎病、腰椎间盘突出症等疾病,已证实确有明显疗效^[6, 16-18]。然而遗憾的是以往对弩药针刺的研究多集中在该疗法的毒理药理、临床适应症及禁忌症方面,但对该疗法的分子作用机制尚无相关报道。本研究发现弩药针刺组的各时间点 BBB 评分均高于 SCI 组,特别是在造模并干预 7d 后效果更加显著($P < 0.05$);通过镜下观察 SCI 大鼠受损脊髓组织,发现切片中呈现出明显的出血、水肿以及神经元的变性坏死等现象,其损伤的主要病理变化以灰质神经元数量明显减少或皱缩为主,与国内外学者的研究结果相一致^[19-21],而弩药针刺治疗后的 SCI 大鼠脊髓水肿出血、炎性细胞浸润、胶质细胞增生明显减轻且神经元数量较脊髓损伤组增多,神经元核固缩、变性等明显减少;镜下所见 BDNF 阳性灰质神经元数量与 SCI 组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),提示弩药针刺能增加 SCI 大鼠脊髓 BDNF 的表达,且与 BBB 评分呈高度正相关($r = 0.717, P < 0.05$)。表明该法具有保护运动神经元,减轻变性坏死,改善 SCI 后肢体运动功能的作用。

本研究首次通过系统科学的研究发现弩药针刺疗法可通过促进 BDNF 表达来保护存活的神元,减少脊髓的继发性损失,对脊髓损伤发挥神经保护作用,从而改善脊髓损伤后的运动功能。该法通过本研究改良后可作为 SCI 瘫痪患者的康复治疗的一项重要措施,为脊髓损伤提供了新的治疗策略。同时为挖掘传统民族医学新价值提供了新的方法及思路。

参 考 文 献

- [1] 刘悦,郝学君. 郝学君针刺联合电针督脉穴治疗脊髓损伤后遗症[J]. 实用中医内科杂志,2014,28(7):24-25.
- [2] 李晓宁,迟蕾. 夹脊配合督脉电针治疗脊髓损伤后功能障碍临床观察[J]. 上海针灸杂志,2015,32(10):972-975.
- [3] 刘妍妍,陆贵中,张立峰. 电针夹脊穴配合康复训练治疗脊髓损伤患者的临床研究[J]. 上海针灸杂志,2015,32(1):45-47.
- [4] Henderson CE. Role of neurotrophic factors in neuronal development[J]. Current opinion in neurobiology,1996,6(1):64-70.
- [5] Gage FH. Mammalian neural stem cells[J]. Science,2000,287(5457):1433-1438.
- [6] 祝炯奎,祝有学. 论毕节地区苗族弩药针刺法的形成和发展[J]. 中国民族民间医药杂志,1996,5(1):5-6.
- [7] 黄纯海,李学军,黄军,等. 大鼠脊髓全横断损伤模型的建立[J]. 国际神经病学神经外科学杂志,2008,35(2):103-106.
- [8] 齐超,李夏青,张宏. 一种新的大鼠脊髓半离断损伤模型[J]. 中国医学创新,2015,12(7):14-17.
- [9] 华兴邦,周浩良. 大鼠穴位图谱的研制[J]. 实验动物与动物实验,1991,2(1):1-5.
- [10] Barde YA, Edgar D, Thoenen H. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain[J]. EMBO J,1982,1(5):549-553.
- [11] Wetmore C, Olson L, Bean AJ. Regulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) expression and release from hippocampal neurons is mediated by non-NMDA type glutamate receptors[J]. J Neurosci,1994,14(3 Pt 2):1688-1700.
- [12] Yan Q, Rosenfeld RD, Matheson CR, et al. Expression of brain-derived neurotrophic factor protein in the adult rat central nervous system[J]. Neuroscience,1997,78(2):431-448.
- [13] Lu P, Jones LL, Tuszynski MH. BDNF-expressing marrow stromal cells support extensive axonal growth at sites of spinal cord injury[J]. Exper Neurol,2005,191(2):344-360.
- [14] Jakeman LB, Wei P, Guan Z, et al. Brain-derived neurotrophic factor stimulates hindlimb stepping and sprouting of cholinergic fibers after spinal cord injury[J]. Exper Neurol,1998,154(1):170-184.
- [15] 余科炜,叶晓健,曲伸,等. 脑源性神经营养因子基因修饰细胞移植治疗大鼠脊髓损伤的电生理研究[J]. 中华外科杂志,2001,39(9):724-727.
- [16] 刘向阳,杜江. 苗医弩药针疗法治疗神经根型颈椎病的初步探索[J]. 中国民族医药杂志,2009,15(7):39-40.
- [17] 王政,杨豫川,王贵春,等. 苗医弩药针疗法治疗腰椎间盘突出症 50 例临床研究[J]. 中国民族医药杂志,2013,19(11):17-18.
- [18] 熊芳丽,冯斌,武红艳,等. 苗医弩药针疗法对膝骨性关节炎的临床研究及滑液含量的影响[J]. 中华中医药杂志,2014,2(1):306-308.
- [19] Borgens RB, Liu-Snyder P. Understanding secondary injury. The Quarterly Review of Biology,2012,87(2):89-127.
- [20] David S, Lopez-Vales R, Wee Yong V. Harmful and beneficial effects of inflammation after spinal cord injury: potential therapeutic implications[J]. Handbook of Clinical Neurology,2012,109(5):485-502.
- [21] Jiang SH, Tu WZ, Zou EM, et al. Neuroprotective effects of different modalities of acupuncture on traumatic spinal cord injury in rats[J]. Evid-Based Complement alternat Med,2014,2014:431580.