

电针督脉对实验性脊髓损伤大鼠 水通道蛋白-4 的影响

韩清民 谢 杰 柴生颀 方 坚 刘庆思

摘要 目的 电针督脉对大鼠脊髓损伤后水通道蛋白-4(AQP-4)表达和后肢功能恢复的影响。方法 取 SD 大鼠 150 只,分为正常组(50 只)、模型组(50 只)、电针组(50 只),模型组和电针组用改良的 Allen 法制成脊髓损伤模型,于模型成功后,电针组针刺督脉上大椎和命门穴 3min,每天 1 次,连续 7 天。于实验第 1、3、7、14、21 天分别对大鼠后肢功能进行 BBB 评分,应用免疫组织化学技术检测脊髓组织 AQP-4 的表达,用图像分析仪进行定量分析。**结果** 脊髓损伤后第 1 天,模型组和电针组受损脊髓灰质、白质中 AQP-4 的表达明显增加;第 3 天时均达到高峰,但电针组低于模型组($P<0.05$)。第 7、14、21 天,与模型组比较,电针组 AQP-4 表达也较低($P<0.01$)。**结论** 电针督脉使脊髓损伤后 AQP-4 表达减少,这可能有利于抑制脊髓水肿、消除脊髓继发性损伤,保存了残存正常脊髓组织并促进神经组织重建。

关键词 电针;督脉;实验性脊髓损伤;水通道蛋白-4

Effect of Governor Meridian Electro-Acupuncture on Water Channel Aquaporin-4 in Experimental Spinal Cord Injured Rats HAN Qing-min, XIE Jie, CHAI Sheng-ting, et al *The Third Hospital Affiliated to Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou (510360)*

Abstract Objective To investigate effects of electro-acupuncture (EA) on Du Meridian on the water channel aquaporin-4 (AQP-4) expression and hind limbs function recovery in experimental spinal cord injured rats. **Methods** One hundred and fifty SD rats were divided into the normal group, the model group and the EA group, with 50 rats in each group, modified Allen method was used to establish spinal cord injury model in the model and EA group. Rats in the EA group was EA on Dazhui and Ming men acupoints after modelling successfully. At the 1st, 3rd, 7th, 14th and 21th day after injury, the hind limbs function of rats was evaluated by BBB scales respectively, and the AQP-4 expression in spinal cord tissue was determined by immunohistochemistry technique and quantity analysed with image analyzer. **Results** At the 1st day after spinal cord injury, the AQP-4 expression was significantly increased in gray matter and white matter of spinal cord in the model group and the EA group, which reached the peak at the 3rd day, but showed significant difference between the two groups ($P<0.05$), and the difference at the 7th, 14th and 21th day became more significant ($P<0.01$). **Conclusion** EA on Du Meridian can down-regulate AQP-4 expression after spinal cord injury, inhibit spinal cord edema for alleviating secondary spinal cord lesion, so as to protect the residual normal spinal cord tissues and promote the rebuilding of nervous tissues.

Key words electro-acupuncture; Du Meridian; experimental spinal cord injury; water channel aquaporin-4

水通道蛋白-4(Aquaporin-4, AQP-4)又称为汞不敏感水通道蛋白(mercury insensitive water channel, MIWC)^[1],其主要分布在中枢神经系统包括脑和脊髓^[2]。在对鸡胚胎的脑 AQP-4 表达的研究中发现, AQP-4 的表达是与中枢神经系统的血-脑(脊髓)屏

障的成熟和功能相关^[3]。但目前还不清楚 AQP-4 表达是有利于清除还是加重水肿液体的形成。本课题通过观察电针督脉对脊髓损伤条件下 AQP-4 表达的影响,以期能有助于解释脊髓继发性损伤中细胞分子水平的病理机制,为保护残存的脊髓神经组织拓展新的思路,同时能更进一步为电针督脉治疗脊髓损伤所致外伤性截瘫提供理论支持。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 30371837)

作者单位:广州中医药大学第三附属医院(广州 510360)

通讯作者:谢 杰, Tel: 020-81552593, E-mail: xiejie782@163.com

材料与方法

1 材料

1.1 动物 健康普通级 SD 大鼠,体重 200 ~ 250g,雌雄各半,雌鼠无孕,由广州中医药大学实验动物中心提供。

1.2 主要试剂 水合氯醛为中国医药集团上海化学试剂公司产品,Rabbit anti-Aquaporin-4、SABC 免疫组化染色试剂盒、DAB 显色试剂盒均为武汉博士德生物有限公司产品;Mayer 苏木素为 Sigma 公司产品。

2 方法

2.1 实验分组 分为 3 组:即正常组、模型组和电针组,每组 50 只;每组再分为 1、3、7、14、21 天 5 个不同时间段小组,每组 10 只。

2.2 脊髓损伤动物模型制作 用改良 Allen 方法,大鼠自由饮食、饮水,用 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉(0.3ml/100g);以 T12 棘突为中心作后背部 5 ~ 6cm 长的正中切口,切开皮肤及肌肉,剥离附着在棘突和椎板上的软组织,之后咬除 T12 棘突和全部椎板及相邻 T11、T13 上下各半个椎板,椎管打开至椎弓根部,充分暴露 10 mm 长的脊髓,使硬脊膜完整。缝合皮肤,用 10 g 重量的物体于 10 cm 的固定高度呈自由落体落下至创口,致伤能量为 100 g/cm,造成大鼠不完全性损伤的撞击伤模型。造模成功的标志:大鼠双下肢呈回缩性扑动,尾巴出现痉挛性摆动。正常组不作处理。

2.3 电针督脉 造模成功后电针督脉,即大椎(C7 棘突下)、命门(L2 棘突下)穴各刺入一枚毫针,针刺深度 0.5cm。大椎穴接正极,命门穴接负极,电针 3min,电针频率 20Hz,持续脉冲电流,强度以双下肢出现规律性收缩抖动为准。此后,每天电针 1 次,连续 7 天为 1 个疗程。

2.4 脊髓取材 模型组及电针组于术后 1、3、7、14、21 天麻醉动物(用 10% 的水合氯醛腹腔注射,每组取 10 只大鼠),行开胸术暴露心脏,用 12 号灌注针头沿左心室插入主动脉,迅速剪破右心耳,同时用 37℃ 生理盐水约 200ml 经左心室主动脉灌注冲洗血液,至右心耳流出淡红色液体后,用 4℃ 含 4% 多聚甲醛的 0.1mol/L 磷酸缓冲液(pH = 7.4)250ml 快速灌注固定。取胸、腰段脊髓浸入上述同样浓度固定液中,固定于 4℃ 冰箱内约 24 ~ 48h(根据所取灌注固定组织

的情况而异)。

3 神经功能检测 按 BBB 评分项目表^[4]。

4 AQP-4 检测 脊髓组织经石蜡包埋,切片机将蜡块切成厚度约 5μm 的石蜡切片,采用免疫组化染色检测 AQP-4 的表达^[3]。

5 染色积分光密度(integrated optical density, IOD)检测 每只大鼠取 12 张切片,用北京航空航天大学病理图像分析系统(3.0)分析各片的 IOD,12 张切片均值为该大鼠脊髓的 AQP-4 染色 IOD。

6 统计学方法 采用 SPSS 10.0 统计软件包进行统计处理,采用单因素方差分析。

结 果

1 电针督脉对脊髓损伤大鼠后肢神经功能的影响 见图 1。手术后第 1 天,模型组、电针组大鼠均表现为后肢瘫痪;第 3、7 天时,电针组大鼠功能开始改善,与模型组大鼠比较差异有显著性($P < 0.05$);第 14、21 天时电针组大鼠已能在平地行走,模型组大鼠则行走较困难。

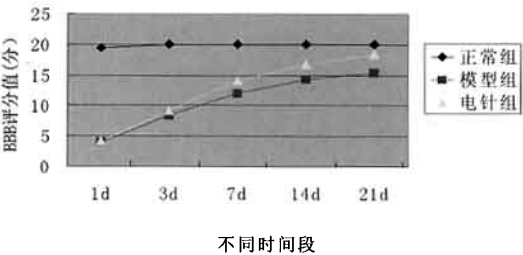


图 1 3 组大鼠不同时间段后肢功能的 BBB 评分比较
2 损伤脊髓 AQP-4 的表达

2.1 各组大鼠免疫组化染色结果 正常组大鼠第 1、3、7、14、21 天的脊髓切片中在脊髓灰质和白质均可见一定量 AQP-4 表达,阳性细胞胞膜呈棕黄色;阳性细胞主要位于神经胶质细胞胞膜及临近毛细血管的星形胶质细胞突起末端的脚板膜上(血脑屏障的重要组成部分之一)及白质髓鞘周围的神经胶质细胞(主要是少突胶质细胞)膜上和胶质界膜也有表达,而神经元膜上几乎无表达(图略)。

2.2 AQP-4 免疫组化 IOD 测定结果 见表 1。术后第 1 天,电针组和模型组大鼠脊髓灰质白质中可见神经胶质细胞膜上棕黄色免疫标记明显增加,与正

表 1 3 组大鼠术后不同时间 AQP-4 免疫组化 IOD 比较 (IOD 值, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	AQP-4 免疫组化 IOD				
		1	3	7	14	21(天)
正常	50	96.74 ± 25.38	105.27 ± 24.63	101.35 ± 29.14	100.12 ± 27.39	102.43 ± 27.39
模型	50	194.33 ± 58.42 *	358.45 ± 37.19 **	353.76 ± 25.69 **	275.24 ± 21.57 **	263.95 ± 23.83 **
电针	50	170.56 ± 29.27 *	256.32 ± 30.21 ** △	177.61 ± 48.05 * △ △	172.89 ± 34.32 * △ △	151.78 ± 37.63 △ △

注:与正常组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较,△ $P < 0.05$,△△ $P < 0.01$

常组比较差异有显著性($P < 0.05$);两组在第 3 天, AQP-4 表达均达峰值,且白质中 AQP-4 表达强于灰质,少数神经元膜上也出现弱阳性,与正常组比较差异有显著性($P < 0.01$),而电针组表达又弱于模型组($P < 0.05$);术后第 3、7、14、21 天电针组 AQP-4 表达与模型组比较,进一步降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),第 21 天时电针组 AQP-4 表达已经接近正常。

讨 论

近年来脊髓继发性损伤的机制已经受到重视,而脊髓损伤后血管和神经生化机制又被认为是脊髓继发性损伤的两个基本要点。这对脊髓损伤基础与临床提供了一些新的研究方向。

中医学认为,脊髓损伤所致外伤性截瘫属于“截瘫”、“痿痹”的范畴,而按经络学说原理外伤性截瘫当属“督脉损伤”,故外伤性截瘫患者,损其督脉是实质。针刺督脉能直达病所,符合“治病必求其本”之说,故治瘫当首取督脉。徐斌^[5]认为电针督脉治疗外伤性截瘫的机理之一可能为改善局部血液微循环,改变脑脊液的流动,减轻脊髓损伤部位水肿、血肿的压迫,减少脊髓继发性损伤的加重因素。我们采用电针督脉治疗实验性大鼠脊髓损伤,就是为对这一机制进行试证性研究和探讨。

AQP-4 作为近 10 年来神经科学方面的最新研究成果而受到了医学界的重视。Manley, GT 等^[6]于 2000 年报道了 AQP-4 基因剔除大鼠在急性水中毒和中脑动脉栓塞所致的局部缺血性中风的条件下,脑组织的水含量和黏附在毛细血管周围的星形胶质细胞足突肿胀会明显减轻,提示了拮抗 AQP-4 这一中枢神经水液运输的关键角色可以成为减轻脑水肿新的治疗方法。

本实验从大鼠神经功能学评定来看角度,与模型

组比较,电针组在第 3、7、14、21 天大鼠神经功能逐渐恢复,这与脊髓损伤后 AQP-4 表达的减少几乎呈同步进行,说明电针督脉通过使脊髓损伤后 AQP-4 表达的减少,可能抑制脊髓水肿的程度来消除脊髓的继发性损伤,保护了残存的正常脊髓组织并促进其神经组织的重建。本实验还观察到脊髓继发性损伤中脊髓组织水肿病理机制之一是损伤诱发了血脑屏障的星形胶质细胞膜上 AQP-4 的表达,促进了水液能迅速通过毛细血管进入神经组织间隙所造成的,并且使少数神经元上有了 AQP-4 非正常表达。

参 考 文 献

- 1 Hasegawa H, Ma T, Skach W, et al. Molecular cloning of a mercurial-insensitive water channel expressed in selected water-transporting tissues. *J Biol Chem* 1994; 269(8): 5497—5500.
- 2 Frigeri A, Gropper MA, Umenishi F, et al. Localization of MI-WC and GLIP water channel homologs in neuromuscular, epithelial and glandular tissues. *Cell Sci* 1995; 108(9): 2993—3002.
- 3 Nico B, Frigeri A, Nicchia GP, et al. Role of aquaporin-4 water channel in the development and integrity of the blood-brain barrier. *Cell Sci* 2001; 114(7): 1297—1307.
- 4 Faden AI, Jacobs TP, Smith MT, et al. MASCIS evaluation of open field locomotor scores: effects of experience and teamwork on reliability. *Neurotrauma* 1996; 13(2): 343—354.
- 5 徐 斌. 脊髓针为主综合治疗法治疗外伤性截瘫 286 例疗效观察. *中国针灸* 1990; (2): 7—9.
Xu B. Observation on clinical efficacy of spinal cord acupuncture in 286 patients with traumatic paraplegia. *Chin Acupuncture Moxibustion* 1990; (2): 7—9.
- 6 Manley GT, Fujimura M, Ma T, et al. Aquaporin-4 deletion in mice reduces brain edema after acute water intoxication and ischemic stroke. *Nat Med* 2000; 6(2): 159—163.

(收稿:2005-01-04 修回:2005-03-22)

首届全国中西医结合传染病学术会议征文通知

中国中西医结合学会主办的首届全国中西医结合传染病学术会议拟于 2005 年 12 月在广东省深圳市召开,现将有关征文事项通知如下。

1 征文内容 (1)各种传染病的中西医结合诊疗和实验研究。(2)中西药和中西医结合防治传染病的经验总结。(3)中西医结合防治传染病的研究方法、思路和发展战略。(4)中医药和中西医结合诊疗传染病的进展和评价。(5)运用多种疗法(如针灸、气功等)、多种给药途径(栓剂、保留灌肠、皮肤给药、器官给药、腧穴给药等)治疗各种传染病的应用和配合研究。(6)各种肝病动物模型、病理机制、检测技术、诊断标准的最新进展及动态。

2 征文要求 稿件要求 5 000 字以内未发表过的论文及 500 字摘要各 1 份,注明作者姓名、单位、地址及邮编或 E-mail。稿件可邮寄,地址:深圳市布新路 2019 号深圳市东湖医院(邮编:518020)聂广收。亦可通过 E-mail 发来。E-mail: dhyy@21cn.com,并注明“会议征文”。截稿日期:2005 年 9 月 30 日。联系人:蒋小玲、张瑛;电话:0755-25604034。