

## · 基础研究 ·

## 夹脊电针对脊髓损伤小鼠运动功能及凋亡蛋白的影响

卫哲<sup>1,2</sup> 周赞华<sup>1</sup>

**摘要 目的** 观察夹脊电针对脊髓损伤小鼠模型运动功能及凋亡蛋白的影响。**方法** 96 只 C57BL/6 雌性小鼠随机分为假手术组、模型组、针刺组和电针组[疏密波(2/100 Hz), 0.2 mA, 15 min], 每组 24 只, 采用腹腔注射麻醉剂制备 T10SCI 模型。选择 T8 和 T12 两对夹脊穴进行针刺治疗, 每天 1 次, 干预 28 d。观察 CatWalk 步态分析, 采用 Western Blot 测定脊髓 P53、Bax、Bcl-2 蛋白表达。**结果** 与模型组同期比较, 电针组 14、28 d 小鼠爪印面积、支撑时相比增加, P53 表达降低, 28 d 下肢摆动速度加快( $P < 0.05$ ); 针刺组 28 d 小鼠下肢摆动速度、支撑时相比增加, 7、14、28 d P53 表达降低( $P < 0.05$ ); 电针组和针刺组 3~28 d Bax 表达降低, 7~28 d Bcl-2 表达升高( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ )。与针刺组同期比较, 电针组 28 d 爪印面积变大、支撑时相比增加, P53 表达降低, 7、14 d Bax 表达降低, 7、28 d Bcl-2 表达升高( $P < 0.05$ )。**结论** 夹脊电针可促进脊髓损伤小鼠运动功能恢复, 抑制 P53、Bax 和促进 Bcl-2 表达。

**关键词** 脊髓损伤; 电针; 夹脊穴; 运动功能; 凋亡蛋白

Effects of Electroacupuncture at Jiaji Points (EX-B2) on the Expression of Apoptosis Proteins and the Motor Function in Spinal Cord Injury Mice WEI Zhe<sup>1,2</sup> and ZHOU Zan-hua<sup>1</sup> 1 Medical and Health College, Lishui College, Zhejiang (323000); 2 Medical College, Shantou University, Guangdong (515041)

**ABSTRACT Objective** To observe the effects of electroacupuncture (EA) at Jiaji points (EX-B2) on the expression of apoptosis proteins and the motor function in spinal cord injury (SCI) mice. **Methods** Ninety-six female C57BL/6 mice were randomly divided into Sham group, model group, acupuncture (AP) group and EA group (dense-disperse wave of 2/100 Hz frequency, 0.2 mA, 15 min), 24 in each group. SCI model was prepared by intraperitoneal injection of anesthetics. Jiaji points (EX-B2) at T8 and T12 were selected. EA and AP were performed every day and continued for 28 days. CatWalk gait analysis were detected. The expression of P53, Bax and Bcl-2 were determined by Western Blot. **Results** Compared with the model group, print area and duty cycle were enhanced in the EA group at day 14 and day 28, the expression of P53 were decreased ( $P < 0.05$ ); the swing speed was increased at day 28 ( $P < 0.05$ ). The swing speed and duty cycle were enhanced in the AP group at day 28 ( $P < 0.05$ ), the expression of P53 were decreased at day 7-28 ( $P < 0.05$ ); the expression of Bax in the EA and AP group were decreased at day 3-28, the expression of Bcl-2 were increased at day 7-28 ( $P < 0.05$ ). Compared with the AP group, print area and duty cycle were enhanced in the EA group at day 28, the expression of P53 were decreased ( $P < 0.05$ ); the expression of Bax in the EA group were decreased at day 7 and 14, the expression of Bcl-2 were increased at day 7 and 28 ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** EA at jiaji points (EX-B2) could promote the recovery of locomotor function, inhibit the expression of Bax and P53, and promote the expression of Bcl-2.

**KEYWORDS** spinal cord injury; electroacupuncture; Jiaji points (EX-B2); motor function; apoptosis proteins

## 脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)后患者生活质

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(No. 81503639); 黑龙江省自然科学基金面上项目(No. H2016070)

作者单位: 1. 丽水学院医学与健康学院(浙江 323000); 2. 汕头大学医学院(广东 515041)

通讯作者: 卫哲, Tel.: 13836024687, E-mail: weizhe315@126.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20170805.308

量明显下降, 给社会和家庭造成了巨大的经济负担<sup>[1]</sup>。目前, 越来越多的医学工作者关注于 SCI 后神经再生机制的研究。神经细胞黏附分子 L1 (neural cell adhesion molecule L1, L1) 在 SCI 后的神经再生中发挥了重要作用<sup>[2-4]</sup>。肿瘤抑制蛋白 P53 (tumor suppressor protein 53) 为 L1 的下游分子, L1 可激活酪氨酸激酶 2 $\alpha$  亚基而导致 P53 的抑制, 从而促进神经元的存活水平和神

经神经元生长的新通路。目前,关于 P53 的研究大多集中在肿瘤疾病和脑血管疾病方面,而对于 SCI 后 P53 分子机制的研究尚需进一步深入探讨。

鉴于针灸在神经修复和神经再生中所发挥的作用,笔者在前期研究中首次提出“针灸与 SCI 后 L1 表达的相关性”假说,研究结果表明,电针华佗夹脊穴可以诱导 SCI 小鼠 L1 的表达,促进神经修复,从而发挥针灸对 SCI 神经再生分子的调控作用<sup>[5]</sup>。在此基础上,本研究观察 SCI 后不同时间点电针对 P53 及凋亡蛋白 Bax、Bcl-2 的影响,分析电针在 SCI 后抗细胞凋亡机制中发挥的作用。

## 材料与方 法

1 实验动物 野生型 SPF 级雌性 C57BL/6 小鼠,10 周龄,购自广东省医学实验动物中心,96 只,体重(22±5)g,动物质量合格证号为 SCXK(粤)2008-0002。实验动物饲养于汕头大学医学院实验动物中心,室内环境恒定温度 25℃,每 12 h 黑暗/光照循环交替,动物自由摄食、饮水。所用动物实验操作均遵循汕头大学医学院实验动物伦理委员会的相关规定。

2 主要试剂及仪器 KWD808 I 电脉冲治疗仪(广州英迪电子医疗设备公司);针灸针 0.25×13 mm(中研太和医药公司);抗小鼠 P53 抗体(美国 Santa Cruz 公司,sc-47698);抗兔 Bax 抗体(美国 Santa Cruz 公司,sc-6236);抗小鼠 Bcl-2 抗体(美国 Santa Cruz 公司,sc-509);氯胺酮(福建宁德古田制药公司);甲苯噻嗪(德国西格玛公司);预染蛋白 Marker(德国 Thermo Scientific 公司)。

3 分组及模型制备 实验小鼠按随机数字表分为假手术组、脊髓损伤组(模型组)、针刺组及电针组,每组 24 只。假手术组:仅给予小鼠椎板切除术。其余各组采用腹腔注射麻醉剂制备 T10SCI 模型<sup>[6]</sup>。造模成功的判定:致伤瞬间小鼠痉挛性摆尾,双下肢及躯体回缩扑动后双下肢瘫痪。术后小鼠分笼饲养,每天进行 2 次人工挤压膀胱排尿,并观察皮肤有无压疮或感染。

4 干预方法 针刺组:行单纯手针治疗,取穴方法参照《实验动物学》及《针灸实验动物图谱》,选择 T8 和 T12 两对夹脊穴每 5 min 捻针 10 s,每天 1 次,每 5 天休息 1 天,治疗 28 天。电针组:第 2 天进行电针治疗,取穴方法同针刺组,针刺后连接 KWD808 I 电脉冲治疗仪,疏密波(2/100 Hz),强度为 0.2 mA,治疗 15 min,每天 1 次,每 5 天休息 1 天,治疗 28 天。

5 检测指标及方法 在 SCI 后的 3、4、14 及 28

天,每组取 6 只小鼠,用异戊烷吸入麻醉后,仰卧位固定于动物手术台上,沿前正中线剪开皮肤、肌肉、胸膜,打开胸腔,暴露心脏,迅速将输液针刺入心尖部,注意防止用力过猛,戳破主动脉壁,灌注 PBS 缓冲液(pH7.4),剪开左心耳,流出血液冲洗干净后灌入 4%多聚甲醛,直到脏器固定、四肢有僵硬感,取出脊髓,分离以脊髓损伤核心区为中心的脊髓喙部及尾部的区域各 0.5 cm,总长 1 cm 脊髓组织为新鲜组织样本,置于 -80℃ 冰箱保存待测定。

5.1 CatWalk 步态分析系统测定 于术前 2 周对大鼠进行行为学训练,训练程序参照参考文献[7]进行。CatWalk 行为学测试选择的时间点为干预 14 及 28 天,指标包括:爪印面积、步周长、下肢摆动速度、下肢支撑时相比,每只大鼠测试至少 3 次有效跑动结果以用于最后的统计分析。参与实验记录的人员对实验的内容并不了解,以避免人为误差的发生。

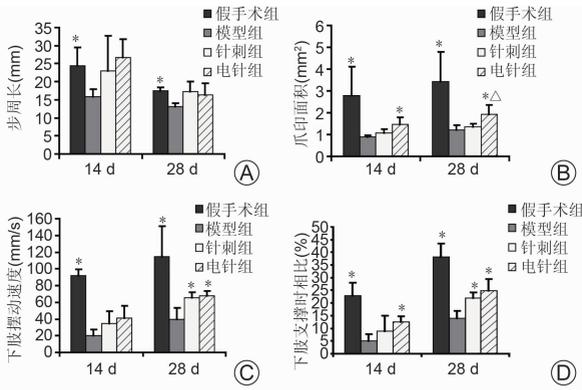
5.2 P53、Bax、Bcl-2 蛋白检测 分别在后 3、7、14 和 28 天(d3、d7、d14、d28)对小鼠损伤脊髓采用 Western Blot 测定 P53、Bax、Bcl-2 的表达。RIPA 蛋白抽提试剂,加入蛋白酶抑制剂及 0.1 mol/L PMSF(比例 1:9),选择以损伤脊髓为中心包括脊髓喙端和尾端 0.5 cm 的脊髓组织(总共 1 cm 脊髓组织),加入裂解液,电动组织匀浆器 15 000 r/min 转速进行匀浆,4℃ 离心,13 000 r/min,20 min。离心完成后取上清,分装保存,待测。以 BCA 法测蛋白浓度,以 RIPA 调整蛋白浓度,蛋白煮沸变性 10 min。配备 12% 的分离胶,浓缩胶浓度为 5%,待测蛋白样品上样量为 10 μg/孔,电泳条件选择 80~120 V。选择湿转法转膜,转膜条件为 300 mA,时间为 3 h,转膜后丽春红染色试剂对膜进行染色,观察转膜效果。将膜置于 3% BSA-TBST 中室温轻摇 1 h 封闭。将膜以 3% BSA-TBST 稀释 P53(1:9 800)、Bax(1:91 000)、Bcl-2(1:91 000)、Actin(1:91 000)及 GAPDH(1:91 000)一抗孵育,于 4℃ 冰箱中轻摇过夜。次日,TBST 洗膜 3 次,每次 5 min,3% BSA-TBST 稀释抗一抗种属来源的二抗(1:91 000),室温轻摇 1 h, TBST 洗膜 3 次,每次 5 min。ECL 显色液显色,曝光。蛋白的定量分析通过 Image J 软件实现。

6 统计学方法 所有数据由 SPSS 19.0 统计软件包处理。数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用单因素方差分析、Turkey 检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

1 各组 CatWalk 步态分析结果比较(图 1) 与

假手术组比较,模型组 14、28 d 各指标降低 ( $P < 0.05$ )。与模型组比较,电针组 14、28 d 爪印面积增大 ( $P < 0.05$ ),电针组 14 d 下肢支撑时相比升高,两个干预组 28 d 下肢摆动速度及下肢支撑时相比升高 ( $P < 0.05$ )。与针刺组比较,电针组 28 d 爪印面积增大 ( $P < 0.05$ )。



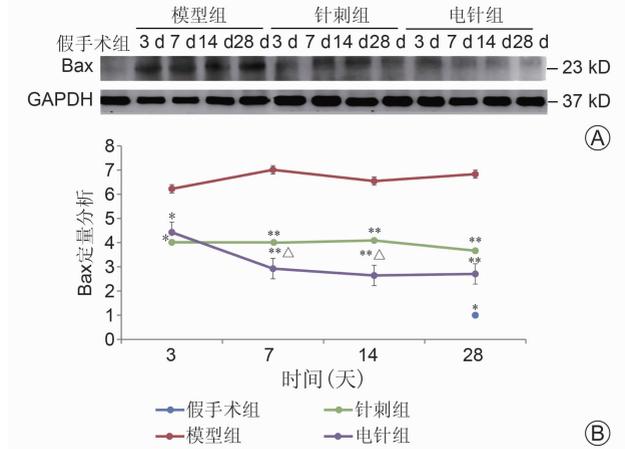
注:A 为步周长;B 为爪印面积;C 为下肢摆动速度;D 为下肢支撑时相比;与模型组比较,  $*P < 0.05$ ; 与针刺组比较,  $\Delta P < 0.05$ ;  $n = 5$

图 1 各组 CatWalk 步态分析结果比较

2 各组小鼠脊髓 P53 表达比较(图 2) 与模型组同期比较,电针组 14、28 d 小鼠脊髓 P53 表达降低 ( $P < 0.05$ );针刺组 7、14、28 d 小鼠脊髓中 P53 表达

降低 ( $P < 0.05$ )。与针刺组同期比较,电针组 28 d 小鼠脊髓中 P53 表达降低 ( $P < 0.05$ )。

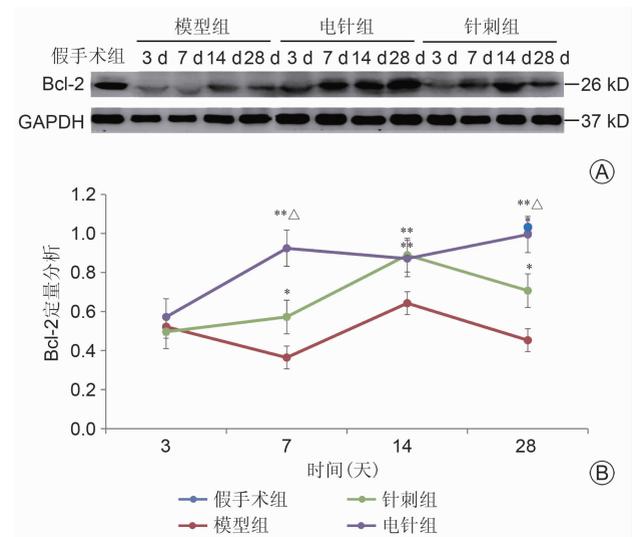
3 各组小鼠脊髓 Bax 比较(图 3) 与模型组同期比较,电针组和针刺组 3~28 d 小鼠脊髓 Bax 表达降低 ( $P < 0.01, P < 0.05$ )。与针刺组同期比较,电针组 7、14 d 小鼠脊髓 Bax 表达降低 ( $P < 0.05$ )。



注:A 为各组不同时间点的蛋白印迹图;B 为各组不同时间点的 Bax 表达的定量分析;与模型组比较,  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ ; 与针刺组比较,  $\Delta P < 0.05$ ;  $n = 4$

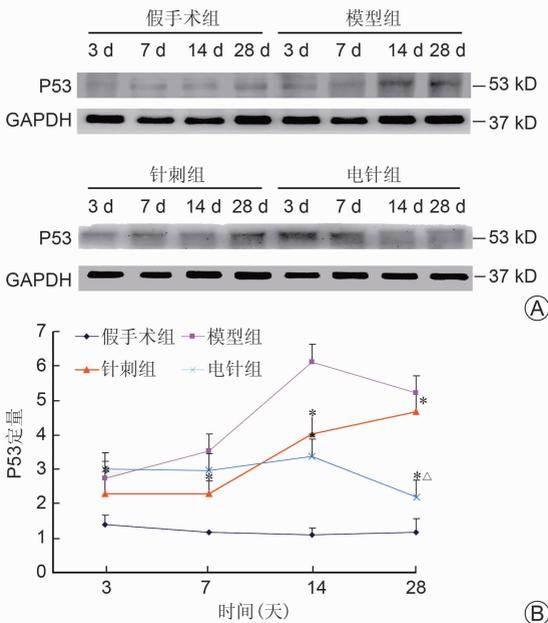
图 3 各组小鼠脊髓 Bax 表达比较

4 各组小鼠脊髓 Bcl-2 比较(图 4) 与模型组同期比较,电针组和针刺组 7~28 d 小鼠脊髓 Bcl-2 表达升高 ( $P < 0.01, P < 0.05$ )。与针刺组同期比较,电针组 7、28 d 小鼠脊髓 Bcl-2 表达升高 ( $P < 0.05$ )。



注:A 为各组不同时间点的蛋白印迹图;B 为各组不同时间点的 Bcl-2 表达的定量分析;与模型组比较,  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ ; 与针刺组比较,  $\Delta P < 0.05$ ;  $n = 4$

图 4 各组小鼠脊髓 Bcl-2 表达比较



注:A 为各组不同时间点的蛋白印迹图;B 为各组不同时间点的 P53 表达的定量分析;与模型组比较,  $*P < 0.05$ , 与针刺组比较,  $\Delta P < 0.05$ ;  $n = 4$

图 2 各组小鼠脊髓 P53 表达比较

## 讨 论

SCI 的治疗多选择督脉电针的方法<sup>[8,9]</sup>。为了更深入地探讨针灸对 SCI 治疗的作用机制,寻求更有效的针刺穴位,本研究选择电针华佗夹脊穴对 SCI 小鼠进行治疗。马睿杰等<sup>[10]</sup>研究发现,夹脊电针能减少髓鞘生长抑制因子少突胶质细胞髓鞘糖蛋白的表达,从而促进 SCI 后轴突的再生及大鼠后肢运动功能恢复。本研究选择小鼠损伤脊髓附近的上下段两组夹脊穴进行电针治疗,能够在脊髓内产生较强的电场,并且由于夹脊穴特定的解剖学位置,相对于督脉穴位来讲,治疗效果更为有效。

细胞凋亡是 SCI 后损伤加重、神经元细胞发生不可逆改变的重要原因。细胞的凋亡是由许多基因共同参与调控的程序性死亡,其中 Bcl-2 基因家族是目前认为与凋亡密切相关的基因。P53 对神经细胞的分化、神经突、轴突等的生长调节也有极其重要的作用<sup>[11]</sup>。另有研究表明,P53 可以结合到 L1CAM 或 NCAM 基因启动子上<sup>[12]</sup>。小 RNA 干扰 P53 可以在 SCI 模型中,维护神经元生长锥的重建,以及维持神经突的长度,从而达到改善小鼠 SCI 后神经功能损伤的效果。电针可以抑制血管性痴呆大鼠海马区的 P53 和 Noxa 表达而发挥抗细胞凋亡的作用,从而提高学习和记忆能力<sup>[13]</sup>。目前,针灸治疗的基础研究大多关注于神经损伤后 Bax、Bcl-2 等蛋白分子参与细胞凋亡机制中的作用,而针灸对于神经损伤后 P53 表达的调控作用尚未见相关报道。

据此,在前期电针对 SCI 后 L1 表达的调控研究基础上,本研究进一步观察 SCI 后电针对 L1 下游分子 P53 及凋亡蛋白 Bax、Bcl-2 表达的影响。结果显示,电针和针刺在 SCI 后不同时间点抑制小鼠脊髓中 P53 的表达,SCI 后不同时间点电针和针刺可以分别抑制小鼠脊髓中 Bax 的表达和促进小鼠脊髓中 Bcl-2 的表达,发挥 SCI 后抗细胞凋亡作用。研究结果表明,电针疗法可以调控 L1 下游分子 P53 的表达,而对于 L1 参与的调节细胞分化增殖及抑制细胞凋亡的重要信号转导通路的研究还有待于进一步深入。

利益冲突:作者声明无利益冲突。

## 参 考 文 献

[1] Readdy WJ, Chan AK, Matijakovich DJ, et al. A review and update on the guidelines for the acute non-operative management of cervical spinal cord injury [J]. *J Neurosurg Sci*, 2015, 59(2): 119-128.

- [2] Tang DY, Yu Y, Zhao XJ, et al. Single chain fragment variable antibodies developed by using as target the 3rd fibronectin type III homologous repeat fragment of human neural cell adhesion molecule L1 promote cell migration and neuritogenesis [J]. *Exp Cell Res*, 2015, 330(2): 336-345.
- [3] Lutz D, Wolters-Eisfeld G, Schachner M, et al. Cathepsin E generates a sumoylated intracellular fragment of the cell adhesion molecule L1 to promote neuronal and Schwann cell migration as well as myelination [J]. *J Neurochem*, 2014, 128(5): 713-724.
- [4] Guseva D, Loers G, Schachner M. Function-triggering antibodies to the adhesion molecule L1 enhance recovery after injury of the adult mouse femoral nerve [J]. *PLoS One*, 2014, 9(11): e112984.
- [5] Wei Z, Wang Y, Zhao W, et al. Electro-Acupuncture modulates L1 adhesion molecule expression after mouse spinal cord injury [J]. *Am J Chin Med*, 2017, 45(1): 37-52.
- [6] Pan HC, Shen YQ, Loers G, et al. Tegaserod, a small compound mimetic of polysialic acid, promotes functional recovery after spinal cord injury in mice [J]. *Neuroscience*, 2014, 277: 356-366.
- [7] Zhou M, Zhang W, Chang J, et al. Gait analysis in three different 6-hydroxydopamine rat models of Parkinson's disease [J]. *Neurosci Lett*, 2015, 584: 184-189.
- [8] 徐家淳,程素利,王剑歌,等. 火针对急性脊髓损伤 24h 后 ERK 通路基因影响[J]. *针灸临床杂志*, 2015, 31(10): 68-70.
- [9] 何娟,王忠华. 电针对脊髓损伤大鼠星形胶质细胞的影响及机制[J]. *西安交通大学学报*, 2013, 34(2): 253-257.
- [10] 马睿杰,张柳娟,孙连珠. 夹脊电针干预脊髓损伤大鼠 OMgp 表达的研究[J]. *中华中医药学刊*, 2014, 6(9): 56-59.
- [11] Lee DH, Luo X, Yungher BJ, et al. Mammalian target of rapamycin's distinct roles and effectiveness in promoting compensatory axonal sprouting in the injured CNS [J]. *J Neurosci*, 2014, 34(46): 15347-15355.
- [12] Guo JD, Li L, Shi YM, et al. Genetic ablation of receptor for advanced glycation end products promotes functional recovery in mouse model of spinal cord injury [J]. *Mol Cell Biochem*, 2014, 390(1-2): 215-223.
- [13] Zhu Y, Zeng Y. Electroacupuncture protected pyramidal cells in hippocampal CA1 region of vascular dementia rats by inhibiting the expression of P53 and Noxa [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2011, 17(6): 599-604.

(收稿:2017-02-15 在线:2017-08-23)

责任编辑:赵芳芳