

·基础研究·

电针预处理对兔脊髓缺血再灌注损伤后炎性因子的影响

姚梦莉¹,陈向华²,陈朝晖^{2*},王海³

1 安徽中医药大学研究生院,安徽 合肥 230038;

2 安徽中医药大学针灸推拿学院,安徽 合肥 230038;

3 徐州市中医院,江苏 徐州 221000

* 通信作者:陈朝晖,E-mail:czhn007@163.com

收稿日期:2020-07-08;接受日期:2020-09-22

基金项目:国家自然科学基金项目(81674076);安徽省教育厅自然基金重点项目(KJ2018A0273)

DOI:10.3724/SP.J.1329.2020.06007

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



摘要 目的:观察电针预处理对兔脊髓缺血再灌注损伤后脊髓组织病理变化以及白细胞介素-1β(IL-1β)、白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、白细胞介素-1受体拮抗剂(IL-1Rα)等炎性细胞因子表达的影响,探讨电针对脊髓缺血再灌注损伤的保护作用机制。**方法:**24只新西兰大白兔采用随机数字表法分为模型组、假手术组、电针组,每组8只。模型组与电针组兔均采用Zivin造模法进行造模,耳缘静脉注射麻醉后打开腹腔,暴露分离腹主动脉并临时夹闭,使其缺血30 min建立脊髓缺血再灌注损伤兔模型。假手术组模型制备及实验动物处理同模型组,但只暴露分离并不夹闭腹主动脉。在兔脊髓缺血再灌注模型诱导前30 min,电针组采用SDZ-II型电针仪针刺双侧“悬钟”“阳陵泉”穴进行干预,时间为30 min。干预12 h后处死全部动物,取兔L_{2~5}段脊髓组织,采用HE染色观察3组脊髓组织病理变化;采用免疫组化法观察IL-1β、IL-6、TNF-α的定位及含量变化;采用酶联免疫吸附法(ELISA)检测造模前及缺血再灌注后4、8、12 h 4个时间点血清中IL-1β、IL-6、TNF-α、IL-1Rα的含量。**结果:**①HE染色结果:与假手术组比较,模型组脊髓组织中神经元的数目减少,细胞胞核及胞浆颜色均变浅,核膜的边界不清晰,严重者核溶解甚至出现核仁消失,细胞周围存有透亮区,轴突出现扩大、肿胀、消失等不同程度的变性;与模型组比较,电针组神经元的数量增加,大部分神经元的结构较为清晰,核仁、胞核萎缩程度较轻,只有少量出现变形、坏死,细胞的破坏程度较轻,存活神经元的密度增加。②免疫组化法结果:与假手术组比较,模型组兔脊髓组织中IL-1β、IL-6、TNF-α的表达均明显上升($P<0.05$);与模型组比较,电针组兔脊髓组织中IL-1β、IL-6、TNF-α的含量明显降低($P<0.05$)。③ELISA结果:造模前,3组间比较差异无统计学意义($P>0.05$);与造模前比较,3组缺血再灌注后4、8、12 h 血清中IL-1β、IL-6、TNF-α、IL-1Rα的表达均有不同程度的升高,差异具有统计学意义($P<0.05$);与假手术组同一时间比较,模型组再灌注后4、8、12 h IL-1β、IL-6、TNF-α、IL-1Rα的表达均明显升高($P<0.05$);与模型组同一时间点比较,电针组再灌注后4、8、12 h IL-1β、TNF-α的表达均明显降低($P<0.05$)。**结论:**电针预处理可有效减轻脊髓组织病理损伤,对脊髓缺血再损伤具有良好的保护作用,其机制可能与抑制IL-1β、IL-6、TNF-α的表达,促进IL-1Rα的表达有关。

关键词 脊髓缺血再灌注损伤;电针;预处理;炎症细胞因子;病理变化

脊髓缺血再灌注损伤(spinal cord ischemic reperfusion injury, SCII)是脊髓组织经历一段时间缺血再次恢复血供后,脊髓组织功能结构损伤加重,甚

至脊髓神经元发生不可逆性损伤^[1]。它是一种严重的继发性损伤,是临幊上造成主动脉瘤、脊柱骨折、骶管肿瘤等手术后截瘫的最主要原因,其发生率

引用格式:姚梦莉,陈向华,陈朝晖,等.电针预处理对兔脊髓缺血再灌注损伤后炎性因子的影响[J].康复学报,2020,30(6):452-458.

YAO M L, CHEN X H, CHEN Z H, et al. Effect of electroacupuncture preconditioning on inflammatory factors of rabbits after spinal cord ischemia-reperfusion injury [J]. Rehabilitation Medicine, 2020, 30(6):452-458.

DOI:10.3724/SP.J.1329.2020.06007

可达 10%~40%, 对患者的身心健康造成严重危害。SCII 与脊髓组织的原发性损伤不同, 其属于二次损伤, 具有可预见性, 因此早预防、早治疗十分必要。已有研究证实, 炎症反应是影响 SCII 病理进程的重要因素^[2], 因此抑制炎症反应是治疗 SCII 的可行策略之一。目前电针广泛应用于脊髓损伤的临床治疗, 疗效显著, 对于其在 SCII 的应用多集中于基础研究^[2-3]。有研究表明, 电针具有减轻炎症反应、缓解疼痛, 改善脊髓水肿、保护神经元等功效^[4]。功能性磁共振成像(functional magnetic resonance imaging, fMRI)和弥散张量纤维束成像(diffusion tensor imaging, DTI)则显示^[5-6], 电针可激活脊柱功能区, 调整脊柱纤维束形态, 恢复脊柱功能结构。本研究通过电针预处理 SCII 模型兔, 观察不同时点白细胞介素-1β(IL-1β)、白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)等致炎因子和白细胞介素-1受体拮抗剂(IL-1Rα)抗炎因子的变化, 进一步明确电针预处理 SCII 的免疫机制, 为临床治疗 SCII 提供依据。

1 实验材料与方法

1.1 实验动物

安徽中医药大学实验动物中心提供成年健康 SPF 级新西兰大白兔 24 只, 雌雄各半, 单笼饲养, 自由饮水摄食, 体质量 2.0~2.5 kg。实验遵循《实验动物管理与使用指南》^[7], 并通过安徽中医药大学医学伦理委员会批准(批号: AHUCM-rabbits-2019010)。

1.2 主要实验试剂与设备

乌拉坦(武汉久安药业有限公司);30%过氧化氢(武汉久安药业有限公司);DAB 染色剂和 IL-1β+bs-0812R(均购自上海苏懿化学试剂有限公司);兔 IL-1β 试剂盒、兔 IL-6 试剂盒、兔 TNF-α 试剂盒、兔 IL-1Rα 试剂盒(均购自上海三发科学仪器有限公司);光学显微镜(日本奥林巴斯公司, Nikon 牌);毫针(合肥有为康设备有限公司, 华佗牌 1.5 寸);酶标仪(深圳雷杜生命科学股份有限公司, RT-6000);电针仪(合肥有为康设备有限公司, SDZ-II 型)。

1.3 分组及模型制备

1.3.1 实验分组 将 24 只新西兰大白兔按照随机数字表法分为模型组、假手术组、电针组, 每组 8 只。

1.3.2 模型制备 采用 Zivin 法^[8]进行造模。术前禁食 12 h。20%的乌拉坦(6 mL/kg)耳缘静脉注射麻醉, 兔仰卧位固定, 手术范围内备皮, 常规消毒, 气管插管, 保持呼吸道。距兔剑突下约 1 寸处行腹部正中切口, 切口长度约 3~4 cm, 清洁纱布包裹大网膜和胃肠管, 推开并暴露腹主动脉, 钝性分离约

0.5 cm, 以肾上腺为标志, 靠近右肾动脉的近心端起始部夹闭腹主动脉, 当触及腹主动脉远端波动感消失开始计时, 用血管钳把切口进行临时夹闭, 30 min 后取出动脉夹, 确定腹主动脉远端搏动恢复后, 无菌纱布清除腹腔渗出液, 复位胃肠等器官, 逐层缝合, 关闭腹腔。假手术组不夹闭腹主动脉, 其余步骤相同。保持室内温度 22 ℃, 注意动物保暖直至清醒, 术后予以青霉素抗感染治疗 4 d, 正常饮水摄食。

1.4 实验动物处理

1.4.1 模型组 造模成功后, 连续 4 d 给予青霉素 20 万 U/d 肌肉注射, 饲料喂养, 正常饮水、自由活动。

1.4.2 假手术组 模型制备及实验动物处理同模型组, 但不夹闭腹主动脉。

1.4.3 电针组 兔脊髓缺血再灌注模型诱导前 30 min 进行电针干预治疗, 采用 SDZ-II 型电针仪, 参照《实验针灸学》^[9]的操作方法, 针刺双侧“悬钟”和“阳陵泉”2 个穴位。电针参数:疏密波, 10 Hz, 电针强度要让肢体保持轻微颤动, 治疗时间为 30 min^[10]。

1.5 观察指标及方法

1.5.1 IL-1β、IL-6、TNF-α 和 IL-1Rα 检测 分别于造模前 0 h 及缺血再灌注后 4、8、12 h 这 4 个时间点采集兔股静脉血 2 mL 于试管中, 静置 30 min 后以 3 000 r/min 的速度将血液离心 20 min, 然后移液器取上清液, 置于-20 ℃冰箱中保存待测。采用 ELISA 法检测血清中 IL-1β、IL-6、TNF-α 和 IL-1Rα 的表达, 检测严格按照 ELISA 试剂盒说明书进行操作。

1.5.2 脊髓组织变化观察 取血完成后采用耳缘静脉空气栓塞法处死兔, 确定 L₂₋₅ 的位置, 使用咬骨钳咬断棘突和椎板, 手术刀清理脊柱周围软组织, 手术剪剪断附着的脊神经根, 取出 L₂₋₅ 段的脊髓组织后, 用生理盐水冲洗干净, 固定于 10% 的福尔马林溶液中, 再经过脱钙、脱水、透明、石蜡包埋等步骤将标本制作成蜡块, 切片, 厚度约为 5 mm, 行苏木精-伊红染色(HE 染色), 光学显微镜下观察脊髓组织变化并采集照片。

1.5.3 IL-1β、IL-6、TNF-α 定位及表达检测 取上述蜡块, 切片、脱蜡, 3% H₂O₂ 水孵育 5 min, 磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)冲洗干净, 滴加一抗后 PBS 冲洗, 接着滴加二抗室温孵育 10 min, PBS 再次冲洗, 然后使用 DAB 溶液让脊髓组织显色, 经过冲洗、复染、脱水、封片步骤, 最后在光学显微镜下观察并采集照片。兔脊髓组织中 IL-1β 的表达以间质及胞浆被染成棕褐色为阳性表达, IL-6、TNF-α 的阳性表达则为神经元胞浆及突起中被染成棕褐色。

1.6 统计学方法

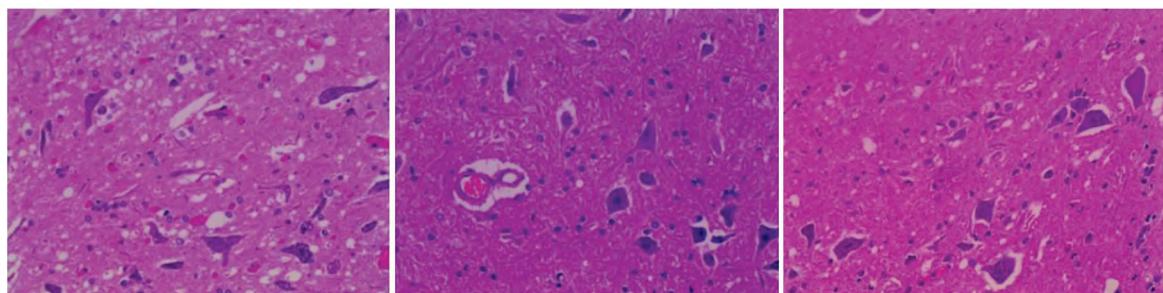
利用 SPSS 23.0 统计软件进行统计分析。计量资料服从正态分布采用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 各组兔血清中多时点炎症因子含量符合正态分布, 采用重复测量方差分析, 两两比较采用 LSD-t 法; 各组兔脊髓组织中蛋白平均灰度值满足独立、正态、方差齐性, 组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD-t 法。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 3 组兔脊髓组织形态学变化

研究结果显示, 假手术组兔脊髓组织中神经元

轮廓清晰, 胞体较大且圆润, 胞浆染色均匀, 胞核及核仁完整清楚, 树突、轴突完整存在, 整个组织的结构较为清楚、完整。模型组兔脊髓组织中神经元数目减少, 细胞胞核及胞浆染色变浅, 胞核固缩或消失, 核膜的边界不清晰, 或者核破碎、或者核溶解甚至出现核仁消失, 轴突出现扩大或肿胀或消失等病理改变, 神经细胞的周围存有透亮区, 甚至坏死后留下空腔。与模型组比较, 电针组神经元的数目增加, 变形、坏死减少, 其结构也更为清晰, 细胞胞核及胞浆染色变深, 胞核及核仁轻度肿胀, 萎缩减轻, 神经元的存活密度增加, 整体破坏程度减轻。见图 1。



注:A 为假手术组;B 为模型组;C 为电针组。

Note: A is the sham operation group; B is the model group; C is the electroacupuncture group.

图 1 3 组兔脊髓组织病理显微结构(HE 染色 $\times 400$)

Figure 1 Pathological microstructure of spinal cord tissue in three groups of rabbits (HE staining $\times 400$)

2.2 3 组兔炎症因子表达变化

2.2.1 3 组 IL-1 β 含量比较 见表 1。

2.2.2 3 组 IL-6 含量比较 见表 2。

2.2.3 3 组 TNF- α 含量比较 见表 3。

表 1 3 组兔脊髓缺血再灌注损伤 IL-1 β 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

匹克/毫升

Table 1 Comparison of IL-1 β level in spinal cord ischemia-reperfusion injury of rabbits in three groups ($\bar{x} \pm s$)

pg/mL

组别	n	缺血前	再灌注后		
			4 h	8 h	12 h
假手术组	8	24.38 \pm 1.49	23.86 \pm 1.09	25.10 \pm 1.05	24.83 \pm 1.38
模型组	8	24.42 \pm 2.20	42.90 \pm 1.97 ¹⁽²⁾	66.24 \pm 1.76 ¹⁽²⁾	67.53 \pm 2.07 ¹⁽²⁾
电针组	8	24.16 \pm 1.59	28.36 \pm 1.00 ²⁽³⁾	37.97 \pm 1.35 ²⁽³⁾	41.03 \pm 1.59 ²⁽³⁾

注:与模型组缺血前比较, 1) $P < 0.05$; 与假手术组同一时间点比较, 2) $P < 0.05$; 与模型组同一时间点比较, 3) $P < 0.05$ 。

Note: Compared with the model group before ischemia, 1) $P < 0.05$; Compared with the sham operation group at the same time,

2) $P < 0.05$; Compared with the model group at the same time, 3) $P < 0.05$.

2.2.4 3 组 IL-1R α 含量比较 见表 4。

2.3 3 组兔促炎因子定位及表达变化

假手术组无特殊阳性表达, 着色均匀。模型组胞核着色不均或不着色, IL-1 β 大量表达在细胞间质及胞浆中, IL-6 和 TNF- α 则大量表达在神经元胞浆及突起中。电针组间质及胞浆中 IL-1 β 、IL-6、

TNF- α 的表达明显减少, 见图 2、图 3、图 4。与假手术组同一时间点比较, 模型组与电针组 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的含量表达均明显上升, 模型组含量最高, 电针组次之; 与模型组同一时间点比较, 电针组 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的含量表达明显下降, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。见表 5。

表 2 3 组兔脊髓缺血再灌注损伤 IL-6 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)
Table 2 Comparison of IL-6 level in spinal cord ischemia-reperfusion injury of rabbits in three groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	缺血前	再灌注后			pg/mL
			4 h	8 h	12 h	
假手术组	8	123.51 ± 4.66	121.92 ± 2.67	125.97 ± 3.74	127.78 ± 1.82	
模型组	8	119.47 ± 5.63	174.24 ± 6.02 ¹⁽²⁾	205.40 ± 4.25 ¹⁽²⁾	252.77 ± 3.42 ¹⁽²⁾	
电针组	8	120.85 ± 3.70	193.74 ± 2.52 ²⁽³⁾	231.91 ± 3.27 ²⁽³⁾	227.24 ± 2.25 ²⁽³⁾	

注:与模型组缺血前比较,1) $P < 0.05$;与假手术组同一时间点比较,2) $P < 0.05$;与模型组同一时间点比较,3) $P < 0.05$ 。

Note: Compared with the model group before ischemia, 1) $P < 0.05$; Compared with the sham operation group at the same time, 2) $P < 0.05$; Compared with the model group at the same time, 3) $P < 0.05$.

表 3 3 组兔脊髓缺血再灌注损伤 TNF- α 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)
Table 3 Comparison of TNF- α level in spinal cord ischemia-reperfusion injury of rabbits in three groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	缺血前	再灌注后			pg/mL
			4 h	8 h	12 h	
假手术组	8	173.28 ± 3.40	176.31 ± 4.37	174.43 ± 3.92	176.54 ± 4.93	
模型组	8	170.90 ± 6.67	438.14 ± 5.12 ¹⁽²⁾	479.51 ± 4.28 ¹⁽²⁾	447.66 ± 8.50 ¹⁽²⁾	
电针组	8	172.24 ± 5.04	376.95 ± 4.57 ²⁽³⁾	416.88 ± 2.83 ²⁽³⁾	380.78 ± 8.86 ²⁽³⁾	

注:与模型组缺血前比较,1) $P < 0.05$;与假手术组同一时间点比较,2) $P < 0.05$;与模型组同一时间点比较,3) $P < 0.05$ 。

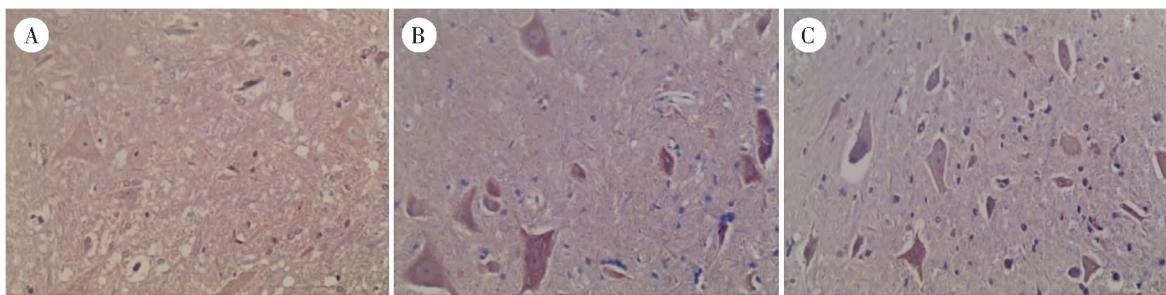
Note: Compared with the model group before ischemia, 1) $P < 0.05$; Compared with the sham operation group at the same time, 2) $P < 0.05$; Compared with the model group at the same time, 3) $P < 0.05$.

表 4 3 组兔脊髓缺血再灌注损伤 IL-1R α 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)
Table 4 Comparison of IL-1R α level in spinal cord ischemia-reperfusion injury of rabbits in three groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	缺血前	再灌注后			pg/mL
			4 h	8 h	12 h	
假手术组	8	97.20 ± 2.68	99.47 ± 3.15	98.86 ± 2.96	96.15 ± 2.17	
模型组	8	98.00 ± 3.19	131.07 ± 2.98 ¹⁽²⁾	136.24 ± 4.31 ¹⁽²⁾	101.13 ± 2.87	
电针组	8	97.37 ± 4.96	148.46 ± 8.15 ²⁽³⁾	133.75 ± 7.83 ²	108.05 ± 3.22 ²	

注:与模型组缺血前比较,1) $P < 0.05$;与假手术组同一时间点比较,2) $P < 0.05$;与模型组同一时间点比较,3) $P < 0.05$ 。

Note: Compared with the model group before ischemia, 1) $P < 0.05$; Compared with the sham operation group at the same time, 2) $P < 0.05$; Compared with the model group at the same time, 3) $P < 0.05$.

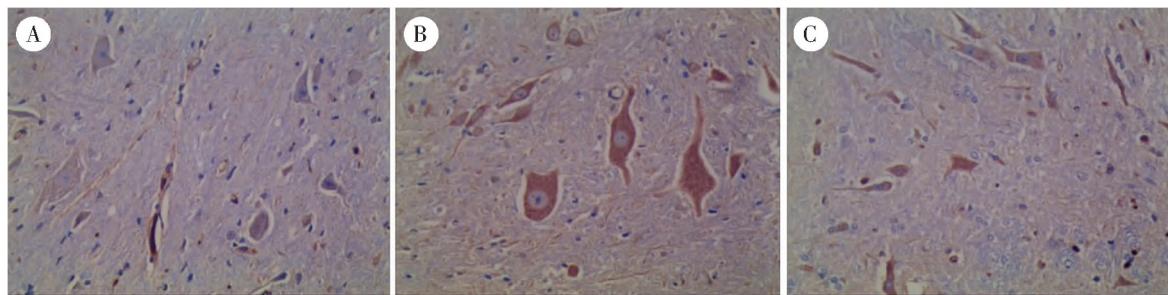


注:A 为假手术组;B 为模型组;C 为电针组。

Note: A is the sham operation group; B is the model group; C is the electroacupuncture group.

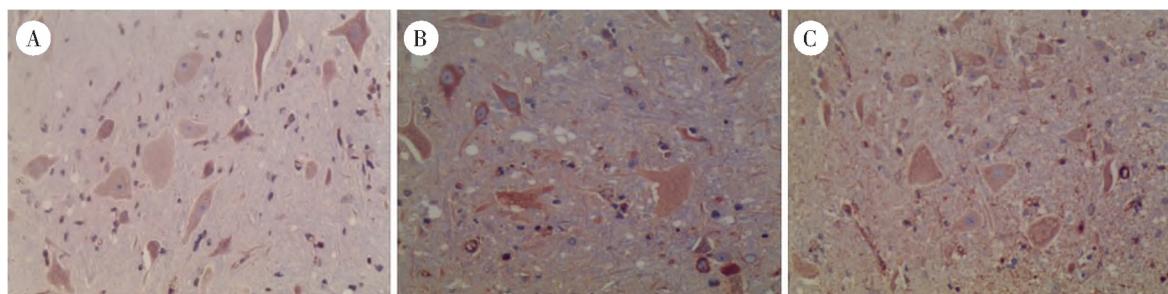
图 2 3 组兔脊髓组织 IL-1 β 阳性表达 ($\times 200$)

Figure 2 Positive expression of IL-1 β in spinal cord tissue of rabbits in three groups ($\times 200$)



注:A 为假手术组;B 为模型组;C 为电针组。

Note: A is the sham operation group; B is the model group; C is the electroacupuncture group.

图 3 3 组兔脊髓组织 IL-6 阳性表达($\times 200$)Figure 3 Positive expression of IL-6 in spinal cord tissue of rabbits in three groups ($\times 200$)

注:A 为假手术组;B 为模型组;C 为电针组。

Note: A is the sham operation group; B is the model group; C is the electroacupuncture group.

图 4 3 组兔脊髓组织 TNF- α 阳性表达($\times 200$)Figure 4 Positive expression of TNF- α in spinal cord tissue of rabbits in three groups ($\times 200$)表 5 3 组兔脊髓 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 阳性 AOD 值比较($\bar{x} \pm s$)Table 5 Comparison of positive AOD values of IL-1 β , IL-6 and TNF- α in spinal cord of rabbits in three groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	IL-1 β	IL-6	TNF- α
假手术组	5	0.36±0.002 8	0.35±0.003 0	0.23±0.002 2
模型组	5	0.48±0.002 8 ¹⁾	0.44±0.004 1 ¹⁾	0.49±0.001 3 ¹⁾
电针组	5	0.39±0.002 6 ^{1,2)}	0.39±0.002 9 ^{1,2)}	0.33±0.002 4 ^{1,2)}

注:与假手术组比较,1) $P<0.05$;与模型组比较,2) $P<0.05$ 。Note: Compared with the sham operation group, 1) $P<0.05$; Compared with the model group, 2) $P<0.05$.

3 讨 论

炎症因子分为促炎因子和抑炎因子两部分,在发生损伤的早期阶段,机体会分泌适量的促炎因子建立防御机制,抵御伤害。在各种因素的影响下,机体自身的调节功能失衡,会产生过量的促炎因子,引起瀑布样炎症反应,导致炎症反应失控,引发全身炎症反应综合征,甚至多器官功能障碍综合征等严重后果,造成器官和躯体损害。SCI就是脊髓炎症反应失控的一种表现,在脊髓缺血再灌注过程中,免疫炎症反应倾向于造成脊髓损伤。

3.1 脊髓缺血再灌注损伤后 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 及 IL-1R α 等炎症因子表达明显上升

ELISA 法检测结果显示,与假手术组比较,模型

组促炎因子 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 与抑炎因子 IL-1R α 在再灌注 4、8、12 h 均有不同程度的上升;此外,免疫组化分析结果显示模型组促炎因子表达也明显上升,其表达位置集中在神经元胞浆中。这提示促炎因子与抑炎因子均参与了脊髓炎症反应。炎症反应发生可能会造成脊髓组织损伤,本研究的 HE 染色结果证实了这一观点。模型组兔脊髓组织光镜下显示脊髓组织中神经元数量减少,细胞胞核及胞浆着色较浅,胞核固缩或消失等病理变化。IL-1R α 是一种天然抗炎剂,其与 IL-1 β 受体结合切断 IL-1 β 生物活性,具有很好的抗炎作用。IL-1R α 水平在再灌注后 4 h 有明显表达,再灌注后 8 h 时达到高峰,再灌注后 12 h 时呈下降趋势;而 IL-1 β 在再灌注后 4、8、12 h 均上升,但在再灌注后 12 h 时

上升幅度减小,证实 IL-1R α 对 IL-1 β 具有明显抑制作用,这提示 IL-1R α 只在再灌注后 8 h 内发挥最大的保护作用,因此其抗炎作用有限。

TNF- α 作为机体内多种细胞因子的启动因子,具有协同放大炎症级联反应的作用^[11]。本研究结果显示,模型组 TNF- α 的表达在再灌注后 8 h 达最高峰,这与苏权等^[12]研究结果一致。而安民等^[13]实验研究结果则显示,脊髓组织中的 TNF- α 在再灌注后 6、12、24 h 均保持高水平的表达,在再灌注后 12 h 时达最高峰,这种差异可能与检测材料、观察时间点不同有关。这提示,TNF- α 在不同时间点脊髓炎症反应中均具有重要的意义。在再灌注后 4、8、12 h 3 个时间点 TNF- α 的变化规律与 IL-1R α 一致,但这种变化规律究竟是由于 IL-1R α 的影响,还是 TNF- α 本身的变化规律尚不明确,需要后续进一步研究。

IL-6 是具有促炎作用的细胞因子,在 SCII 早期即有明显表达,可以进一步加剧炎症反应,损伤脊髓^[14]。本研究结果显示,IL-6 在再灌注后 4、8、12 h 3 个时间点的表达均呈现上升趋势,这与 TNF- α 的变化趋势不同。这提示,IL-6 在脊髓炎症反应中可能发挥更重要的作用。因此,平衡炎症因子表达,抑制炎症反应是减轻脊髓缺血再灌注损伤的主要策略。

3.2 电针预处理有助于抑制脊髓缺血再灌注损伤后炎症反应

本研究结果显示,与模型组同一时间比较,电针组 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的表达均明显改变,再灌注损伤后 4、8、12 h 电针组 IL-1 β 、TNF- α 表达均明显降低,而 IL-6 在再灌注损伤后 4、8 h 表达明显上升,12 h 表达明显下降,这提示电针可有效抑制 IL-1 β 、TNF- α 的表达,具有良好的抑炎作用,但对 IL-6 的抑制作用不明显;与模型组再灌注 4 h 比较,电针组 IL-1R α 的表达上升,之后呈逐渐降低趋势,这与 IL-1 β 、TNF- α 的表达趋势相反,这提示电针促进 IL-1R α 的表达具有时间窗效应。因此,临幊上可以通过电针疗法抑制炎症反应,有效减轻脊髓损伤后的继发性损害,保护脊髓组织,但在治疗时应注意时间窗效应。

HE 染色结果显示,与模型组比较,电针组脊髓组织出现神经元数量增加,细胞胞核、核仁萎缩减轻,细胞破坏程度下降等良好变化,这与唐能能等^[15]的研究结果一致。这可能与本研究充分发挥针与电的双重作用,从而提高治疗效果有关。本研究电针参数设置如下:疏密波,频率 10 Hz,强度以保持肢体轻微震颤为度,时间 30 min。疏密波可以更

加快速地清除自由基,促进脊髓损伤大鼠运动功能的恢复;而频率 1~100 Hz 疏密波可以有效促进局部组织血液循环,改善神经组织营养,提高新陈代谢,促进炎症吸收。这与张尧等^[16~18]研究结果一致。此外,本研究采用电针针刺悬钟穴、阳陵泉穴,这 2 个穴位均分布于足少阳胆经,属于八会穴,分别是筋与髓的精气汇聚之处。针刺这 2 个穴位可以有效激发脏腑经络之气,促进气血流通,濡养经脉,从而缓解肌肉痉挛,改善肢体运动功能障碍^[19]。这与陈向华等^[20]研究结果一致。

4 小 结

本研究证实电针阳陵泉穴、悬钟穴干预 SCII,对脊髓组织具有良好的保护作用,而这可能是通过介导免疫炎症反应发挥作用,其具体作用机制可能是在特定时间点电针通过上调 IL-1R α 的表达,降低 TNF- α 、IL-1 β 及 IL-6 的水平,从而发挥对脊髓组织的免疫保护作用。这可为临床早期开始治疗 SCII 提供一定的理论依据。

参考文献

- PANNU R, CHRISTIE D K, BARBOSA E, et al. Post-trauma Lipitor treatment prevents endothelial dysfunction, facilitates neuroprotection, and promotes locomotor recovery following spinal cord injury [J]. J Neurochem, 2007, 101(1): 182~200.
- 代妮, 黄思琴, 唐成林, 等. 电针对脊髓损伤小鼠运动功能及炎性和氧化应激反应的影响 [J]. 针刺研究, 2019, 44(11): 781~786, 804.
- 程先宽, 孙迎春. 电针治疗脊髓损伤神经源膀胱尿失禁临床研究 [J]. 上海针灸杂志, 2019, 38(6): 646~649.
- 吕威, 李冰, 景泉凯, 等. 电针“大椎”“命门”对脊髓损伤大鼠神经元细胞凋亡及 JNK 信号通路相关蛋白表达的影响 [J]. 针刺研究, 2017, 42(1): 14~19.
- 马思明, 同超群, 吴仁华, 等. 基于低位脊髓功能磁共振技术电针刺激天枢穴和足三里穴神经通路机制可行性的探讨 [J]. 时珍国医国药, 2019, 30(1): 217~219.
- 高连军, 孙迎春, 李建军, 等. 不同时间电针刺激对大鼠脊髓损伤后磁共振弥散张量纤维束成像部分各向异性值均值的影响 [J]. 中国康复理论与实践, 2014, 20(8): 728~733.
- 贺争鸣, 李根平, 朱德生. 实验动物管理与使用指南 [M]. 北京: 科学出版社, 2016: 142~150.
- ZIVIN J A, DEGIROLAMI U. Spinal cord infarction: a highly reproducible stroke model [J]. Stroke, 1980, 11(2): 200~202.
- 林文注, 王佩. 实验针灸学 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 227~282.
- 于文艳. 电针对脊髓缺血再灌注损伤 IL-1/JNK/AP-1 信号通路及 IL-1、JNK、AP-1 表达影响 [D]. 合肥: 安徽中医药大学, 2017: 16~17.
- GUAN B, CHEN R, ZHONG M, et al. Protective effect of Oxy-matrine against acute spinal cord injury in rats via modulating oxidative stress, inflammation and apoptosis [J]. Metab Brain Dis, 2020, 35(1): 149~157.

- [12] 苏权,党晓谦,王坤正,等.大鼠脊髓缺血再灌注后早期脊髓内促炎因子及抗炎因子的表达[J].陕西医学杂志,2016,45(10):1285-1287,1315.
- [13] 安民,刘丹彦,吴会生,等.辛伐他汀预处理对大鼠脊髓缺血再灌注损伤后炎症介质及 NOS 的影响[J].重庆医科大学学报,2010,35(12):1801-1805.
- [14] SUN Z X,ZHAO T Y,LYU S,et al. Dexmedetomidine attenuates spinal cord ischemia-reperfusion injury through both anti-inflammation and anti-apoptosis mechanisms in rabbits [J]. J Transl Med,2018,16(1):209.
- [15] 唐能能,李毓吉.高压氧联合电针治疗脊髓损伤运动功能障碍患者的疗效观察[J].中华航海医学与高气压医学杂志,2020,27(3):349-350.
- [16] 张尧,邱有波,杨拯,等.不同波形电针对脊髓损伤大鼠运动功能恢复的影响[J].中国康复医学杂志,2012,27(12):1097-1101.
- [17] 林洁,吴广文.疏密波在骨性关节炎康复治疗中的应用研究[J].康复学报,2016,26(1):58-62.
- [18] 眭明红,李晶晶,向云,等.电针对炎性痛大鼠镇痛作用的观察[J].康复学报,2018,28(3):32-36,41.
- [19] 郭斌,王彭汉,黄麟萍,等.电针曲池-阳陵泉对脑卒中痉挛大鼠的解痉作用[J].康复学报,2020,30(1):52-57,63.
- [20] 陈向华,张俐,王和鸣,等.丹参酮及电针对脊髓缺血再灌注损伤细胞因子 IL-1 β 、IL-1R α 、IL-8 的影响[J].中华中医药杂志,2012,27(4):987-991.

Effect of Electroacupuncture Preconditioning on Inflammatory Factors of Rabbits after Spinal Cord Ischemia-Reperfusion Injury

YAO Mengli¹, CHEN Xianghua², CHEN Zhaohui^{2*}, WANG Hai³

¹ Graduate School of Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei, Anhui 230038, China;

² College of Acupuncture and Massage, Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei, Anhui 230038, China;

³ Xuzhou City Hospital of Traditional Chinese Medicine, Xuzhou, Jiangsu 221000, China

* Correspondence: CHEN Zhaohui, E-mail:czhn007@163.com

ABSTRACT Objective: To observe the effects of electroacupuncture preconditioning on the pathological changes of spinal cord tissue and the expression of inflammatory cytokines such as interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 receptor antagonist (IL-1R α) after spinal cord ischemia-reperfusion injury, and to explore the protective mechanism of electroacupuncture on spinal cord ischemia-reperfusion injury in rabbits. **Methods:** A total of twenty-four New Zealand white rabbits were randomly divided into the sham operation group, the model group and the electroacupuncture group according to the random number table method, with eight cases in each group. The model was made by Zivin method in the model group and the electroacupuncture group, the abdominal cavity was opened after intravenous anesthesia at ear margin, the abdominal aorta was exposed and temporarily clamped, and the rabbit model of spinal cord ischemia-reperfusion injury was established after ischemia for thirty minutes. The model preparation and experimental animal treatment of the sham operation group were the same as those of the model group, however, the dissection was fully exposed without clamping the abdominal aorta. At thirty minutes before the induction of rabbit spinal cord ischemia-reperfusion model, SDZ-II electroacupuncture instrument was used to acupuncture bilateral "Xuanzhong" and "Yanglingquan" acupoints in the electroacupuncture group, intervention for thirty minutes. All rabbits were killed after intervention for twelve hours, and the L2-5 segments of spinal cord tissue were captured. HE staining method was used to observe the pathological changes of spinal cord tissues in the three groups; Immunohistochemical method was used to observe the localization and content changes of IL-1 β , IL-6 and TNF- α ; Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the contents of IL-1 β , IL-6, TNF- α and IL-1R α in serum before modeling and 4, 8, 12 hours after ischemia-reperfusion. **Results:** ① HE staining results: compared with the sham operation group, the number of neurons in spinal cord tissue in the model group decreased, the color of nucleus and cytoplasm of cells became lighter, and the boundary of nuclear membrane was not clear. In severe cases, the nucleus dissolved or even nucleolus disappeared, there were transparent areas around cells, and axons showed different degrees of degeneration such as enlargement, swelling and disappearance; compared with the model group, the number of neurons in the electroacupuncture group increased, the structure of most neurons was clear, the atrophy degree of nucleolus and nucleus was light, only a small amount of cells became deformed and necrosis, the damage degree of cells were lighter, and the density of surviving neurons increased. ② Immunohistochemistry results: compared with the sham operation group, the expressions of IL-1 β , IL-6 and TNF- α of spinal cord tissue in the model group were significantly increased ($P<0.05$); compared with the model group, the contents of IL-1 β , IL-6 and TNF- α in the spinal cord of rabbits in the electroacupuncture group were significantly decreased ($P<0.05$). ③ ELISA results: Before modeling, there was no significant difference in the three groups ($P>0.05$); compared with before modeling, the expressions of IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-1R α in serum of the three groups increased in different degrees at 4, 8 and 12 h after ischemia-reperfusion, with significantly significance ($P<0.05$); compared with the sham operation group at the same time, the expressions of IL-1 β , IL-6, TNF- α and IL-1R α in the model group increased significantly at 4, 8 and 12 h after reperfusion ($P<0.05$); compared with the model group at the same time, the expression of IL-1 β and TNF- α in the electroacupuncture group decreased significantly at 4, 8, 12 h after reperfusion ($P<0.05$). **Conclusion:** Electroacupuncture pretreatment can effectively alleviate the pathological injury of spinal cord and has a good protective effect on spinal cord ischemia-reperfusion injury, which may be related to inhibit the expression of IL-1 β , IL-6 and TNF- α and promote the expression of IL-1R α .

KEY WORDS spinal cord ischemia-reperfusion injury; electroacupuncture; pretreatment; inflammatory cytokines; pathological change

DOI: 10.3724/SP.J.1329.2020.06007