

夹脊电针通过抑制 Notch 信号通路 对脊髓损伤大鼠运动功能的影响

魏江曼¹, 安郁坤², 胡梦萱¹, 陈和木¹

摘要 目的 探究夹脊电针对脊髓损伤(SCI)后运动功能和 Notch 信号通路的影响。方法 将 72 只质量(250 ± 20)g 的 SD 雄性大鼠随机分为假手术组、SCI 组、电针组和针刺组,每组 18 只。采用改良 Allen's 法制备胸 10 节段 SCI 模型。电针组和针刺组分别接受夹脊穴电针和普通针刺治疗,15 min/次,1 次/d。在连续干预 3、7、14 d 后,采用 Basso、Beattie 和 Bresnahan(BBB)评分法评估大鼠后肢运动功能,苏木精-伊红染色观察脊髓组织的病理恢复变化,实时定量 PCR 和蛋白免疫印迹法分别检测 *Hes 3*、*Notch 3*、*Notch 4* 的 mRNA 和蛋白表达水平;免疫组化检测第 14 天时胶质纤维酸性蛋白(GFAP)的表达情况。结果 与假手术组相比,SCI 术后大鼠 BBB 评分降低($P < 0.05$),脊髓组织出现明显出血、结构破坏和变性,电针组和针刺组的 BBB 评分和损伤程度均较 SCI 组轻($P < 0.05$);*Hes 3*、*Notch 3*、*Notch 4* 的 mRNA 和蛋白表达水平以及 GFAP 的表达水平,SCI 组均明显高于假手术组($P < 0.05$),而电针组较 SCI 组均降低($P < 0.05$)。结论 夹脊电针可以改善 SCI 大鼠的运动功能,其机制可能与抑制 GFAP 的表达和抑制 Notch 信号通路的激活有关。

关键词 脊髓损伤;夹脊穴;电针;*Hes 3*;Notch;GFAP

中图分类号 R 338.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2023)08-1280-07
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.08.006

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)包括脊髓结构与功能的损伤,一般由脊柱骨折等外伤性因素引起,造成损伤部位微环境的改变及损伤平面以下运动感觉功能、胃肠道功能等障碍^[1]。电针(electroacupuncture, EA)作为一种中医治疗方法,已被证实对 SCI 具有积极的治疗效果,如改善损伤部位局部微环境、减轻水肿和炎症反应、抑制神经元凋亡和瘢痕形成等^[2]。但既往研究^[3]多在督脉,而对于脊髓

两旁夹脊穴的研究较少。夹脊穴的解剖学位置与脊髓旁神经根位置重合,夹脊电针对 SCI 的治疗作用已被初步证实,但其治疗机制尚不完全清楚。该研究探索夹脊穴电针干预与 Notch 信号通路的关系,以进一步揭示其治疗 SCI 的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物与分组 健康清洁级雄性大鼠 72 只,体质量(250 ± 20)g,均由安徽医科大学实验动物中心提供,生产许可证号:LLSC20221105。将 72 只大鼠随机分为假手术(sham)组、SCI 组、电针(SCI + EA)组和针刺(SCI + AP)组,每组 18 只。每组按术后时间分为 3 个亚组,3 天亚组、7 天亚组和 14 天亚组,每个亚组 6 只。sham 组只接受胸 10 节段(T10)的椎体切除术。其他 3 组中:SCI 组只造成 SCI,不做其他治疗干预,SCI + EA 组在损伤后第 2 天开始接受电针治疗;SCI + AP 组在损伤后第 2 天开始接受针刺治疗。大鼠自由获得水和食物,并给予 20 ~ 25 °C 温度、50% ~ 65% 湿度条件和 12 h/12 h 明暗照明。实验过程均遵循《关于善待实验动物的指导性意见》规定。

1.1.2 试剂与仪器 Notch 3 一抗购自武汉 Proteintech Group 公司;Hes 3 一抗、Notch 4 一抗和胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)一抗购自美国 Affinity 公司;通用型二抗试剂盒、DAB 显色试剂盒购自北京 Zsbio 公司;TRIzol 试剂盒购自美国 Invitrogen 公司;SYBR Green PCR 试剂盒和逆转录试剂盒购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司;ECL Plus 发光试剂盒、裂解液购自上海碧云天公司。徕卡切片机构购自德国 Leica 公司(货号:RM2016);生物组织自动包埋机构购自湖北贝诺医疗科技有限公司(货号:ZT-12M);显微镜购自日本 OLYMPUS 公司(货号:CX43)、Real-time PCR 仪购自瑞士 Roche 公司(货号:Lightcycler 96)、电泳凝胶成像仪购自美国 Bio-RAD 公司(货号:ChemiDoc XRS + System)。一次性无菌针灸针购自吉林长春爱康

2023-05-30 接收

基金项目:安徽省高等学校科学研究项目(编号:2022AH051160)

作者单位:¹安徽医科大学第一附属医院康复医学科,合肥 230022

²河北省儿童医院神经康复科,石家庄 050000

作者简介:魏江曼,女,硕士研究生;

陈和木,男,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail:

chenhemu123@126.com

医疗器械有限公司(0.25 mm × 13 mm);电针仪购自江苏佳健医疗器械股份有限公司(型号:CMNS6-1)。

1.2 实验方法

1.2.1 造模方法 造模前所有动物禁食 8 h,称重后给予 10% 水合氯醛(0.3 ml/100 g)腹腔注射麻醉。以下手术过程在无菌条件下进行:将大鼠固定在手术台上,剃除手术区域毛发,并进行常规消毒。以 T10 段为中心,从脊柱正中做纵行切口,逐层剥离皮下组织,去除 T10 及部分 T9、T11 的椎板,充分暴露该节段背侧硬脊膜。用自制 Allen 脊髓撞击器以 10 g × 5 cm 的能量垂直撞击 T10 段脊髓,造成脊髓的急性压迫性损伤。以大鼠局部脊髓出现充血、全身痉挛、痉挛性摆尾作为造模成功的标志,然后逐层缝合被切开组织。术后予腹腔注射青霉素(100 U/d),连续 3 d 抗感染治疗,每日早晚予腹部按摩 2 次,帮助大鼠二便的排泄。sham 组仅切除椎板暴露脊髓组织,不损伤脊髓,其余 3 组均在切除椎板的基础上损伤脊髓。

1.2.2 针刺和电针治疗方法 将大鼠于俯卧位固定于自制的鼠板上,并暴露损伤的脊髓节段。SCI + AP 组在术后第 2 天,取距损伤处上下端两个椎体的棘突间隙距中线旁开 3 ~ 4 mm 的夹脊穴,用针灸针向内斜刺 4 ~ 5 mm 深,使针尖触及椎板。然后将 SCI + EA 组连接电针仪,同一导线的两个夹子夹持在同侧上下两个针灸针柄处,治疗频率为 2/100 Hz,电流强度为 1 ~ 2 mA,以治疗部位肌肉轻微颤动但未引起病理损伤为宜,1 次/d,15 min/次,连续 14 d。sham 组和 SCI 组大鼠仅用相同方法固定于板上 15 min,不进行针刺。

1.3 观察指标及检测方法

1.3.1 体质量与运动功能 分别在术前和术后第 3、7、14 d 记录每组大鼠的体质量,并在第 3、7、14 d 使用 Basso、Beattie 和 Bresnahan(BBB)^[4] 开放场运动测试评估大鼠的后肢运动功能,其满分为 21 分,最低 0 分。评估方法为将大鼠放在 1 个开口容器中,测试者敲击容器壁观察大鼠后肢各关节的运动情况。此过程由 2 名不知情专业人员记录 2 次独立 BBB 评分,计算出每只大鼠的平均值。

1.3.2 取材 术后第 3、7、14 天,在 BBB 测试完成后,用过量 10% 水合氯醛对大鼠行腹腔麻醉。开胸,从左心室插管,剪开右心耳,然后灌注生理盐水,直到有澄清液从右心耳流出,再灌注 4% 多聚甲醛 1 h。打开椎弓管,取出损伤段约 1 cm 长的脊髓,浸泡

在多聚甲醛中固定 24 h。然后放入生物组织自动包埋机处理。对于需要做实时定量聚合酶链反应(real time quantitative polymerase chain reaction, qPCR)和免疫印迹分析的大鼠,在用相同方法灌注完生理盐水后打开椎弓管,取出损伤段约 1 cm 长脊髓组织,在液氮中快速冷冻,并在 -80 °C 下储存待用。

1.3.3 苏木精-伊红(hematoxylin eosin, HE)染色

将包埋后的组织切成 4 μm 厚的切片,放入烤箱烤干。烤干后依次进行脱蜡、苏木精溶液和伊红溶液的染色、脱水、二甲苯透明和封片。最后经显微镜镜检后进行图像采集分析。

1.3.4 qPCR

使用 qPCR 法检测 *Hes 3*、*Notch 1*、*Notch 3* 和 *Notch 4* 的 mRNA 表达水平。制备好脊髓组织匀浆后,使用 TRIzol 溶液自各组大鼠脊髓样本中分离 RNA。使用带有 SYBR Green 的 qPCR 系统和针对每个目标基因的引物对每个样本进行 qPCR 反应。qPCR 引物序列见表 1。实时 qPCR 的步骤为:在 95 °C、10 min 激活,95 °C、15 s、60 °C、45 s、40 个循环。甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)被作为内在阳性对照和正常化因子。每组设置 3 个重复孔,使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法检测目标基因的表达。

表 1 引物序列

引物名称	序列(5'-3')	长度(bp)
GADPH	F: AGGTCGGTGTGAACGGATTTG R: GGGGTCGTTGATGGCAACA	95
<i>Hes 3</i>	F: CGCATCAACCTGTCACTGGA R: CGCTCAGCTCCAGGATATCG	106
<i>Notch 1</i>	F: ACTGCCCTCTGCCCTATACA R: GACACGGGCTTTTCACACAC	189
<i>Notch 3</i>	F: CCATCTCCTGAGTCCCAGA R: GAGGGAGGGAGGGAACAGAT	157
<i>Notch 4</i>	F: GGGATGGACAGGGTCTCTCT R: AACTTGCCCTCGAATCCAGG	159

1.3.5 免疫印迹分析 将匀浆后的组织加入裂解液进行裂解,离心后取上清液进行 BCA 法蛋白浓度测定。将等量蛋白质使用聚丙烯酰胺凝胶电泳进行蛋白质分离,然后转移到聚偏二氟乙烯膜(polyvinylidene fluoride, PDVF)膜上,并室温封闭 1 h。在 4 °C 下孵育一抗兔多抗隆抗体 *Hes 3*(1 : 1 000)、*Notch 3*(1 : 1 000)、*Notch 4*(1 : 1 000)和内参 GAPDH(1 : 1 000)摇床过夜,然后,在室温下孵育二抗 2 h。使用 ECL 发光试剂盒,经凝胶成像仪显影。使用 Image J 软件进行图像量化分析,计算 *Hes 3*、*Notch 3*

和 Notch 4 蛋白的相对表达量。

1.3.6 免疫组织化学染色 从石蜡块上切下连续 4 μm 厚的切片。将切片与胶质纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP, 1 : 100) 一抗抗体在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜, 然后滴加辣根过氧化物酶标记的高敏小鼠通用二抗, 在室温下孵育 50 min。随后在显微镜下进行 DAB 显色, 然后使用苏木精染色液对细胞核复染。最后在显微镜下观察切片, 并收集图像。用苏木精染色的细胞核为蓝色, DAB 的阳性表达为棕黄色。用 Image J 软件分析每张切片的 GFAP 表达区域图像, 并统计阳性表达面积。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 16.0 进行统计分析, 所有数据采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。组间比较采用单因素方差分析, 两组间比较选择 LSD 法。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠的体质量和 BBB 评分比较 各组大鼠的体质量变化和 BBB 评分统计结果见表 2、3, 折线图见图 1A、B。如体质量曲线 (图 1A) 所示, 从整体趋势来看, sham 组大鼠的体质量呈现上升趋势, 其余 3 组则为下降趋势, 且通过斜率可以看出, 在术后前 3 d 体质量的下降速度最快, 这可能与手术麻醉和创口的影响有关; 与 sham 组相比, 其余 3 组的体质量均下降 ($P < 0.01$); 第 7 天和第 14 天时, SCI + EA 和 SCI + AP 组高于 SCI 组 ($P < 0.01$), 且 SCI + EA 组比 SCI + AP 组更高 ($P < 0.05$)。以上结果说明, 电针和普通针刺能缓解 SCI 术后大鼠体质量的下降, 而且电针的作用效果优于普通针刺。如 BBB 评分曲线 (图 1B) 所示, 术后第 1 天, 除 sham 组外, 其余 3 组的评分均为 0, 表示造模成功; 术后第 3 天时, SCI + EA、SCI + AP 和 SCI 组之间差异无统计学意义; 在术后第 7 天时, SCI + EA 的 BBB 评分略高于 SCI 组 ($P < 0.05$) 和 SCI + AP 组 ($P < 0.05$), 到术后第 14 天时, SCI + EA 组高于 SCI 组 ($P < 0.01$) 和 SCI + AP 组 ($P < 0.01$), 且 SCI + AP 组也显示出高于未进行干预的 SCI 组 ($P < 0.05$) 的趋势。这些结果说明, 电针和普通针刺在不同程度上都能起到促进 SCI 大鼠后肢运动功能恢复的作用, 电针的起效时间比普通针刺快, 且对后肢功能的恢复效果更明显。

2.2 各组大鼠 HE 染色比较 假手术组大鼠的脊髓切片显示正常的中央管、灰质和白质, 无出血性坏死、水肿或变性。前角神经元的细胞核大而圆, 核仁

表 2 4 组大鼠术后不同时间段体质量统计 ($g, n = 6, \bar{x} \pm s$)

组别	造模前	第 3 天	第 7 天	第 14 天
sham	252.17 \pm 8.78	252.58 \pm 7.66	261.25 \pm 11.41	269.17 \pm 11.77
SCI	249.33 \pm 10.89	215.25 \pm 8.97	187.92 \pm 3.48	175.75 \pm 9.14
SCI + EA	253.58 \pm 6.09	233.33 \pm 6.89	213.5 \pm 4.15	206.17 \pm 8.26
SCI + AP	249.75 \pm 6.53	224.42 \pm 6.61	200.5 \pm 2.55	188.92 \pm 5.64
F 值	0.35	26.48	148.45	127.51

表 3 4 组大鼠术后不同时间段 BBB 评分统计 (分, $n = 6, \bar{x} \pm s$)

组别	第 1 天	第 3 天	第 7 天	第 14 天
sham	21	21	21	21
SCI	0	0.58 \pm 0.49	2.17 \pm 0.26	3.83 \pm 0.52
SCI + EA	0	0.83 \pm 0.41	3.67 \pm 0.41	7.50 \pm 0.45
SCI + AP	0	0.58 \pm 0.49	2.50 \pm 0.48	5.25 \pm 0.61
F 值	—	0.58	25.77	73.12

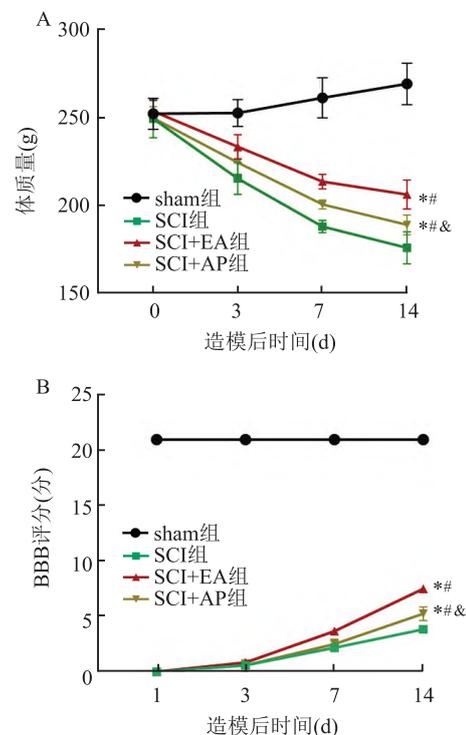


图 1 各组大鼠体质量 (A) 和 BBB 评分 (B) 折线图

与 sham 组比较: * $P < 0.05$; 与 SCI 组比较: # $P < 0.05$; 与 SCI + EA 比较: & $P < 0.05$

清晰。而其他 3 组的脊髓结构均被破坏, 中央管、灰质和白质出现不同程度的出血, 灰质中的前角神经元发生核固缩。在术后第 3 天, SCI 组损伤区周围的灰质和白质出现水肿和结构破坏, 灰质边界模糊, 灰质和白质之间可见空泡, 并可见白质大量出血。此外, 神经元的结构被破坏, 神经元肿胀, 部分神经元出现核固缩。术后第 7 天, 灰质和白质水肿, 结构紊乱, 模糊不清, 中央受损区周围的灰质和白质之间仍可见空泡。术后第 14 天, 灰质和白质之间的界限模糊, 出血消失, 但空泡仍然可见。相比于 SCI 组,

SCI + EA 组和 SCI + AP 组在第 7 天和第 14 天的脊髓的形态学恢复程度更好。经电针和针刺治疗后, 脊髓的水肿减轻, 受损区的中央管、灰质和白质的出血减少, 结构也有所恢复。并且 SCI + EA 组的恢复效果优于 SCI + AP 组。这些结果表明, 电针和针刺干预都能促进 SCI 大鼠的脊髓结构恢复, 减轻水肿和出血, 且电针的效果优于普通针刺。见图 2。

2.3 各组大鼠脊髓组织 *Hes 3*、*Notch 1*、*Notch 3* 和 *Notch 4* mRNA 的表达水平比较 与 sham 组相比,

其他 3 组的 *Hes 3*、*Notch 1*、*Notch 3* 和 *Notch 4* 的 mRNA 表达水平明显增高 ($P < 0.05$), 在第 7 天时达到最高水平, 第 14 天时显示出回落趋势。与 SCI 组相比, SCI + EA 组和 SCI + AP 组的 *Hes 3*、*Notch 1*、*Notch 3* 和 *Notch 4* 降低 ($P < 0.05$), 且在第 7 天和第 14 天时, SCI + EA 组比 SCI + AP 组更低 ($P < 0.05$)。见图 3 和表 4。

2.4 各组大鼠脊髓组织 *Hes 3*、*Notch 3* 和 *Notch 4* 蛋白表达水平比较 各组大鼠脊髓组织 *Hes 3*、

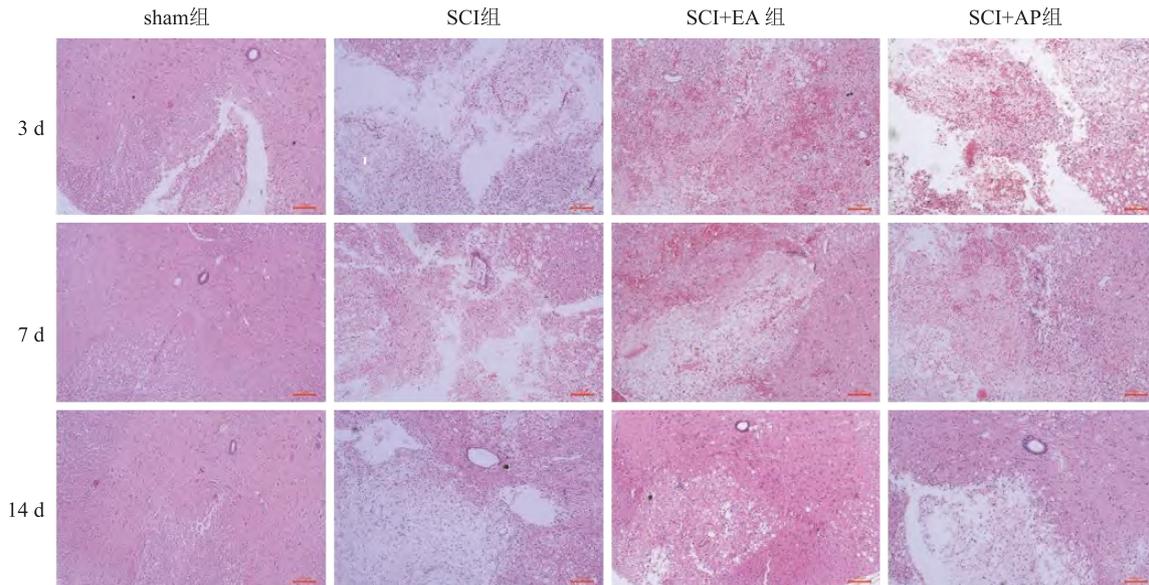


图 2 各组大鼠脊髓组织 HE 染色情况 ×100

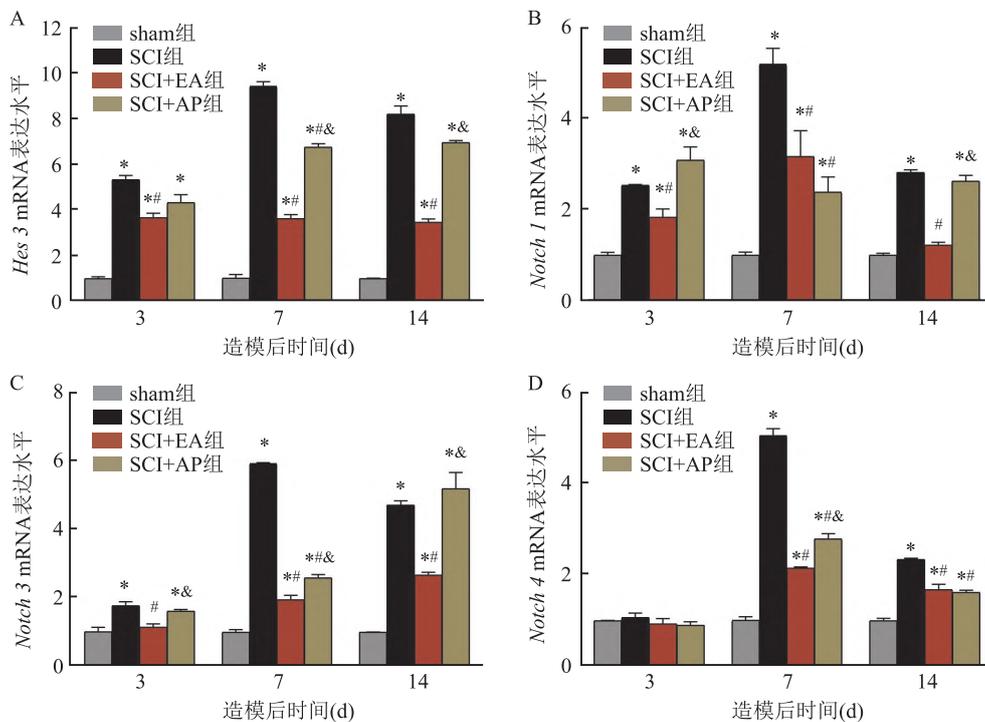


图 3 各组大鼠 *Hes 3*、*Notch 1*、*Notch 3* 和 *Notch 4* 的 mRNA 表达水平

A: *Hes 3*; B: *Notch 1*; C: *Notch 3*; D: *Notch 4*; 与 sham 组比较: * $P < 0.05$; 与 SCI 组比较: # $P < 0.05$; 与 SCI + EA 比较: & $P < 0.05$

表 4 4 组大鼠术后不同时间 *Hes 3*、*Notch 1*、*Notch 3*、*Notch 4* 的实时定量 PCR 表达情况统计 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

术后时间	Sham 组	SCI 组	SCI + EA 组	SCI + AP 组	F 值
<i>Hes 3</i>					
第 3 天	1.00 ± 0.13	5.32 ± 0.32	3.65 ± 0.35	4.32 ± 0.61	66.83
第 7 天	1.02 ± 0.26	9.41 ± 0.34	3.62 ± 0.30	6.75 ± 0.26	464.42
第 14 天	1.00 ± 0.02	8.18 ± 0.62	3.46 ± 0.24	6.95 ± 0.16	277.95
<i>Notch 1</i>					
第 3 天	1.00 ± 0.10	2.53 ± 0.04	1.83 ± 0.31	3.08 ± 0.51	26.37
第 7 天	1.00 ± 0.11	5.18 ± 0.61	3.16 ± 0.98	2.38 ± 0.58	21.74
第 14 天	1.00 ± 0.07	2.82 ± 0.97	1.22 ± 0.11	2.62 ± 0.22	142.00
<i>Notch 3</i>					
第 3 天	1.01 ± 0.22	1.78 ± 0.20	1.45 ± 0.17	1.62 ± 0.08	13.14
第 7 天	1.00 ± 0.12	5.92 ± 0.05	1.95 ± 0.22	2.59 ± 0.16	602.00
第 14 天	1.00 ± 0	4.72 ± 0.20	2.66 ± 0.16	5.19 ± 0.83	59.95
<i>Notch 4</i>					
第 3 天	1.00 ± 0.02	1.07 ± 0.17	0.93 ± 0.20	0.90 ± 0.14	0.75
第 7 天	1.01 ± 0.14	5.06 ± 0.26	2.15 ± 0.04	2.79 ± 0.21	262.67
第 14 天	1.00 ± 0.09	2.34 ± 0.05	1.68 ± 0.20	1.62 ± 0.09	61.85

Notch 3 和 *Notch 4* 蛋白的表达与 mRNA 表达呈现一致的趋势,即在 SCI 术后增高 ($P < 0.01$),在第 7 天时达到最高水平,第 14 天时显示出回降趋势。见图 4。与 sham 组相比,SCI + EA 组和 SCI + AP 组 *Hes 3*、*Notch 3*、*Notch 4* 蛋白表达减少 ($P < 0.05$),且在第 7 天和第 14 天时 SCI + EA 组比 SCI + AP 组更低 ($P < 0.05$),与 qPCR 的结果一致。以上结果说明夹脊电针具有显著抑制 SCI 术后 Notch 信号通路和 *Hes 3* 表达的作用,夹脊针刺也具有相同作用,但效果次于电针。

2.5 第 14 天时各组大鼠脊髓 GFAP 免疫组化染色结果 在第 14 天时对大鼠脊髓组织的 GFAP 进行免疫组化检测,染色结果见图 5A,阳性表达面积统计结果见图 5B。与 sham 组相比,SCI 组的 GFAP 表达增多 ($P < 0.05$);而与 SCI 组相比,SCI + EA 组

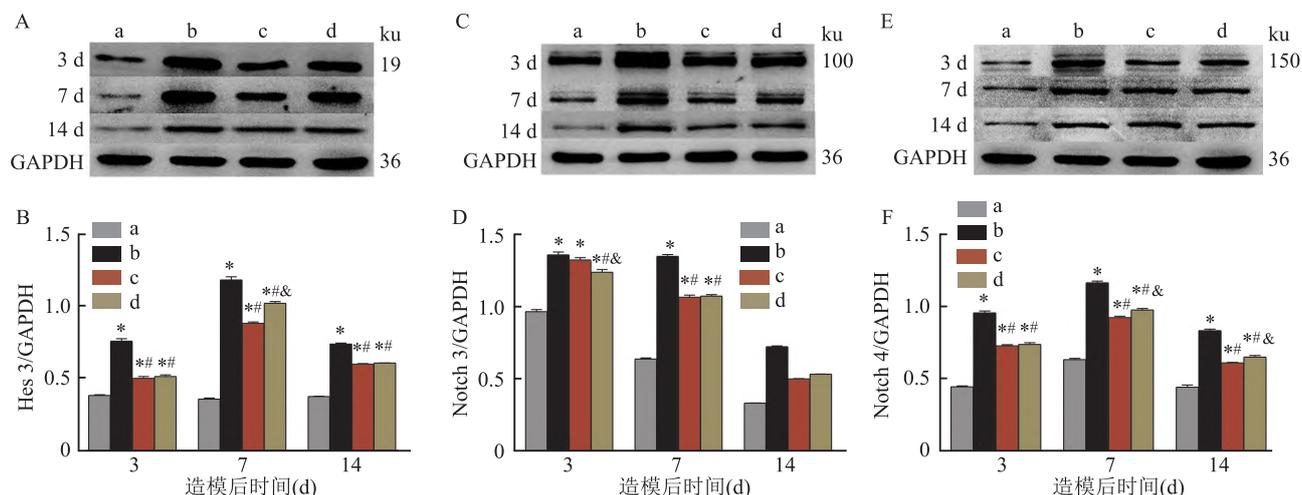


图 4 各组大鼠 *Hes 3*、*Notch 3* 和 *Notch 4* 的蛋白条带曝光图及灰度值统计结果

A、B: *Hes 3*; C、D: *Notch 3*; E、F: *Notch 4*; a: sham 组; b: SCI 组; c: SCI + EA 组; d: SCI + AP 组; 与 sham 组比较: * $P < 0.05$; 与 SCI 组比较: # $P < 0.05$; 与 SCI + EA 比较: & $P < 0.05$

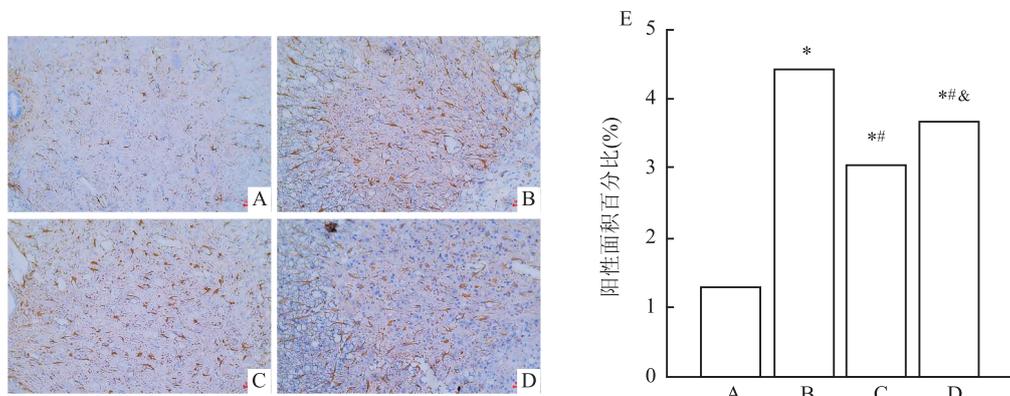


图 5 术后第 14 天时各组大鼠 GFAP 的免疫组化阳性表达情况和阳性表达面积统计结果 × 200

A: sham 组; B: SCI 组; C: SCI + EA 组; D: SCI + AP 组; E: 各组阳性表达面积百分比统计结果; 与 sham 组比较: * $P < 0.05$; 与 SCI 组比较: # $P < 0.05$; 与 SCI + EA 比较: & $P < 0.05$

($P < 0.05$)和 SCI + AP($P < 0.05$)组 GFAP 表达减少,但仍高于 sham 组($P < 0.05$),且 SCI + EA 组低于 SCI + AP 组($P < 0.05$)。以上结果说明,SCI 术后第 14 天时,夹脊电针和针刺能减少受损区域 GFAP 的出现,且电针的抑制效果比普通针刺强。

3 讨论

SCI 后会经历急性期、亚急性期和慢性期三个阶段,急性期主要表现为组织水肿和炎症,之后神经元凋亡逐渐增多,过渡到亚急性期,而到了慢性期后,星形胶质细胞会大量生成瘢痕组织,阻碍神经元再生^[5]。

神经干细胞是一种具有自我复制和分化多能性的细胞,在中枢神经系统受损、缺血时,能分化为星形胶质细胞^[6]。SCI 后,机械压力导致胶质细胞迅速死亡。随后,损伤部位出现炎症反应,并使幼稚的星形胶质细胞被激活并大量分化,此后一系列分化导致瘢痕形成性星形胶质细胞出现且大量增多,最终形成胶质瘢痕^[7]。GFAP 是星形胶质细胞的一种独特结构蛋白,在 SCI 后,迅速释放到生物流体中,被认为是星形胶质细胞独特的生物标志物^[8]。本实验用 GFAP 标记星形胶质细胞,发现夹脊电针抑制了 GFAP 的生成,其机制可能是由于其抑制了神经干细胞向星形胶质细胞的转化。

电针在诱导神经元的分化中起到了积极作用,这一过程与 Notch 信号通路有关^[9]。Notch 信号通路是一种高度保守的信号转导通路,包括 Notch 受体、Notch 配体和相关蛋白^[10]。Notch 途径的活性由碱性螺旋-环-螺旋(basic helix loop helix, *bHLH*)基因控制,*bHLH* 基因是 Notch 信号通路的直接靶基因,分为促进型和抑制型。促进型包括 *Mash1* 等,其主要功能是促进神经干细胞分化为神经元;抑制型包括 *Hes 3* 等,其会抑制神经干细胞分化为神经细胞,保持神经干细胞的特性,使其分化为星形胶质细胞^[11],最终形成瘢痕组织。SCI 后,脊髓微环境中的 Notch 配体上调,受体和配体结合激活这一途径,因此,抑制 Notch 信号通路的激活是促进 SCI 恢复的关键。本实验对 Notch 通路相关信号因子 *Notch 3*、*Notch 4* 和抑制性 *bHLH* 基因家族 *Hes 3* 的基因水平和蛋白水平进行双重检测,研究表明,夹脊电针能抑制 Notch 通路的激活和 *Hes 3* 基因的表达,从而减少 GFAP 的生成,促进脊髓功能的恢复。

夹脊穴为经外奇穴,《中国针灸学》将夹脊穴定位于 T1-L5 棘突下,左右旁开 0.5 寸,位于督脉与

足太阳膀胱经之间,是沟通两条经脉的枢纽。督脉为阳脉之海,总督一身阳气,而膀胱经,通过背俞穴与五脏六腑相连,因此,通过针刺夹脊穴,可以同调两经气血,激发两经经气,进而调节全身阳气^[12]。后世医家认为,相较于足太阳膀胱经,夹脊穴与督脉关系更密切,并将夹脊穴归属于督脉,与督脉一起,形成“督脉带”^[13],明确了督脉和夹脊穴的整体性。对于神经系统疾病如 SCI 的治疗,已经从督脉电针扩展到了夹脊电针,并且疗效显著^[14]。

本实验选取的夹脊穴,是受损脊髓节段上下的两对夹脊穴,靠近脊神经根位置。有研究^[15-16]认为,穴位和神经根距离较近时,更有利于引起针感传导反应,直达病灶部位。本研究表明,夹脊电针和针刺虽然都对 SCI 的恢复有积极作用,但电针对脊髓的恢复程度和对 Notch 信号通路的抑制作用都比普通针刺效果明显。这可能是由于,相较于针刺,电针不但可以产生机械性物理刺激,还对穴位产生脉冲电流刺激^[17]。当脉冲电流施加于受损脊髓时,会使细胞内外的离子产生定向移动,从而使细胞内外的离子浓度和分布发生显著变化,进而消除细胞膜极化状态,引起神经元兴奋^[18]。此外,为了减少适应性耐受导致疗效减弱,该研究选择了 2/100 Hz 的疏密波模式(疏波 2 Hz,密波 100 Hz)。然而,该研究只讨论了夹脊电针对 SCI 急性期的影响,而夹脊电针对 SCI 大鼠的长期影响有待继续探究。

参考文献

- [1] 欧阳率,王先斌,张 谦,等. 跑台训练脊髓损伤模型大鼠小肠功能恢复与肠道细胞凋亡的关系[J]. 中国组织工程研究, 2023, 27(32): 5178-83.
- [2] 姚海华,闵友江,洪冬英,等. “三通针法”电针调控 Rho/ROCK (Rho kinase)及 MEK/ERK 信号通路对脊髓损伤大鼠胞浆型磷脂酶 A2 的影响[J]. 中国组织工程研究, 2023, 27(20): 3158-66.
- [3] Xu H, Yang Y, Deng Q W, et al. Governor vessel electro-acupuncture promotes the intrinsic growth ability of spinal neurons through activating calcitonin gene-related peptide/ α -calcium/calmodulin-dependent protein kinase/neurotrophin-3 pathway after spinal cord injury[J]. J Neurotrauma, 2021, 38(6): 734-45.
- [4] Basso D M, Beattie M S, Bresnahan J C. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats[J]. J Neurotrauma, 1995, 12(1): 1-21.
- [5] 程黎明. 脊髓损伤分子病理机制研究进展与思考[J]. 中华创伤杂志, 2020, 36(5): 403-7.
- [6] Xue W, Fan C, Chen B, et al. Direct neuronal differentiation of neural stem cells for spinal cord injury repair[J]. Stem Cells, 2021, 39(8): 1025-32.

- [7] Hou J, Bi H, Ge Q, et al. Heterogeneity analysis of astrocytes following spinal cord injury at single-cell resolution[J]. *FASEB J*, 2022,36(8):e22442.
- [8] Li D, Liu X, Liu T, et al. Neurochemical regulation of the expression and function of glial fibrillary acidic protein in astrocytes[J]. *Glia*, 2020,68(5):878-97.
- [9] Wang X, Wang Q, Tian H, et al. Electroacupuncture in promoting neural repair after spinal cord injury: Inhibiting the Notch signaling pathway and regulating downstream proteins expression[J]. *Anat Rec (Hoboken)*, 2021,304(11):2494-505.
- [10] Siebel C, Lendahl U. Notch signaling in development, tissue homeostasis, and disease[J]. *Physiol Rev*, 2017,97(4):1235-94.
- [11] Ohtsuka T, Sakamoto M, Guillemot F, et al. Roles of the basic helix-loop-helix genes *Hes1* and *Hes5* in expansion of neural stem cells of the developing brain[J]. *J Biol Chem*, 2001,276(32):30467-74.
- [12] 刘继生,张泓,许明,等. 基于“督脉乃脑之经络”理论探讨脊髓损伤对大脑的影响及其治疗方法的思考[J]. *中华中医药杂志*, 2016,31(8):2968-71.
- [13] 刘力源,张建斌,金传阳,等. 华佗夹脊穴的归经探索:督脉[J]. *针刺研究*, 2018,43(11):744-6.
- [14] 仇会玉,秦晓光,雒明栋. 华佗夹脊穴临床应用研究进展[J]. *中医药学报*, 2020,48(1):67-71.
- [15] 于丽萍. 电针夹脊穴为主治疗腰椎间盘突出症的研究[D]. 长春:长春中医药大学, 2009.
- [16] 杨书蔚,马铁明,陶星,等. “环跳”穴深浅部电刺激对坐骨神经损伤大鼠背根神经节磷酸化 p38 及 p53 蛋白表达的影响[J]. *针刺研究*, 2019,44(10):729-34.
- [17] 陈肖峰,吕伟,康丽娟,等. 手针与电针对穴区局部影响的比较研究[J]. *针灸临床杂志*, 2022,38(7):6-9.
- [18] 何伟,吴美玲,景向红,等. 穴位的本态:穴位组织细胞化学的动态变化[J]. *中国针灸*, 2015,35(11):1181-6.

The effect of electroacupuncture at Jiaji points on motor function of spinal cord injury rats by inhibiting Notch signal pathway

Wei Jiangman¹, An Yukun², Hu Mengxuan¹, Chen Hemu¹

(¹Dept of Rehabilitation, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;

²Dept of Neurological Rehabilitation, Hebei Children's Hospital, Shijiazhuang 050000)

Abstract Objective To investigate the effect of electroacupuncture (EA) treatment at pinch points (EX-B2) on motor function and Notch signaling pathway after spinal cord injury (SCI). **Methods** Seventy-two Sprague-Dawley (SD) male rats weighing (250 ± 20) g were randomly divided into sham operation group, SCI, electroacupuncture group (SCI + EA) and acupuncture group (SCI + AP), with 18 rats in each group. A rat acute SCI model of T10 was established by the modified Allen's method. The SCI + EA and SCI + AP groups received 15 minutes of electroacupuncture or acupuncture treatment per day. The motor function of the hind limbs of rats was assessed by Basso, Beattie and Bresnahan (BBB) scoring method, the pathological recovery changes of spinal cord tissues were observed by Hematoxylin-eosin (HE) staining, and the mRNA and protein expression levels of *Hes 3*, *Notch 3* and *Notch 4* were detected by real-time quantitative PCR and western blot method, respectively, after 3, 7 and 14 days of intervention. The expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP) was detected by immunohistochemistry after 14 days of intervention. **Results** Compared with the sham group, the BBB scores were reduced in rats after SCI surgery and there was significant hemorrhage, structural destruction and degeneration of spinal cord tissue ($P < 0.05$), while the SCI + EA and SCI + AP groups were milder than the SCI group ($P < 0.05$). The mRNA expression levels and protein expression levels of *Hes 3*, *Notch 3* and *Notch 4* as well as the expression levels of GFAP appeared significantly higher in the SCI group compared with the sham group ($P < 0.05$), while the SCI + EA group appeared lower compared with the SCI group ($P < 0.05$). **Conclusion** EA of EX-B2 can improve the locomotor function of rats with SCI, which may be related to inhibiting the expression of GFAP and the activation of Notch signaling pathway.

Key words spinal cord injury; Jiaji; electroacupuncture; *Hes 3*; *Notch*; GFAP