

· 基础研究 ·

电针对大鼠坐骨神经截断后髓鞘再生修复的影响

李庆雯 郭义

【摘要】 目的 观察电针对大鼠坐骨神经截断后髓鞘再生修复的影响,从而探讨电针治疗周围神经损伤的可能机制。方法 将实验大鼠坐骨神经截断后构建神经再生室模型,分别给予 5 Hz 和 100 Hz 电针刺激,应用砂罗铬花青染色、HE 染色、免疫组化染色和图像分析半定量测定方法,观察电针刺激对大鼠损伤坐骨神经髓鞘结构、神经纤维结构及雪旺细胞 S-100 蛋白表达的影响。结果 5 Hz 及 100 Hz 电针刺激均能显著促进坐骨神经截断后髓鞘再生,加快神经纤维形态恢复正常,提高雪旺细胞的 S-100 蛋白的表达水平,其中以 5 Hz 电针刺激的改善效应较显著。结论 电针刺激对周围神经损伤的治疗效果显著,能明显促进雪旺细胞增殖与髓鞘组织再生,并且其治疗效果与电针作用频率密切相关。

【关键词】 电针; 周围神经损伤; 髓鞘再生; S-100 蛋白

Effects of electro-acupuncture on remyelination of the transected sciatic nerve in rats Li Qing-wen*, GUO Yi. * Department of Health and Exercise Science, Tianjin University of Sport, Tianjin 300381, China

【Abstract】 Objective To investigate the effects of electro-acupuncture (EA) on remyelination after sciatic nerve was transected in rats, so as to explore the possible mechanism of EA in treatment of peripheral nerve injury. **Methods** After transection of rat's sciatic nerve, the nerve regeneration chamber was built, then the rats were given EA stimulation at frequencies of 5 Hz and 100 Hz, respectively, and Solochrome Cyanine staining, HE staining of nerve fibers, immunohistochemical staining and semi-quantitative image analysis technique were employed to observe the remyelination of the nerve fibers and S-100 protein expression of Schwann cells. **Results** EA could significantly promote remyelination of the nerve fibers, elevate S-100 protein expression of Schwann Cells in repairing process of transected sciatic nerve of rats. The therapeutic effect of 5 Hz EA group was better than that of 100 Hz EA group. **Conclusion** EA is an effective way for the treatment of peripheral nerve injury. It can promote proliferation of Schwann cells and nerve fiber myelination. The therapeutic effects of EA are frequency-dependent.

【Key words】 Electro-acupuncture; Peripheral nerve injury; Remyelination; S-100 protein

神经髓鞘的再生修复与周围神经损伤后神经纤维的再生关系密切。本研究将大鼠坐骨神经截断后构建神经再生室模型,观察电针刺激对大鼠受损坐骨神经髓鞘结构、神经纤维结构及 S-100 蛋白表达的影响,从而探讨电针促进周围损伤神经再生的可能机制。现报道如下。

材料与方法

一、实验动物及分组

共选取 40 只清洁级 Wistar 大鼠,由解放军军事医学科学院第四研究所动物中心提供,动物合格证编号:SCXK-(军)2002-001,雌雄各半,体重 180 ~ 220 g,经普通饲料适应性喂养 1 周后,随机分为正常组、模型

组、5 Hz 电针治疗组和 100 Hz 电针治疗组,每组 10 只;其中正常组不作特殊处理,模型组只进行手术造模操作,不给予电针治疗;两电针治疗组于造模结束后给予相应电针刺激。

二、大鼠坐骨神经损伤模型制作

采用神经套接技术构建神经再生室造模方法^[1-3]制作坐骨神经截断损伤模型,具体操作步骤如下:经 3% 戊巴比妥钠(1 ml/kg 体重)腹腔麻醉后,将大鼠俯卧位固定于鼠板上,剪去尾根及左下肢鼠毛,常规备皮消毒,自坐骨结节至大腿外上方连线内 1/3 处切口,暴露坐骨神经,在无菌条件下通过手术显微镜(10 倍)切断股方肌下缘 3 mm 以下、长约 5 mm 的一段神经组织,用 9-0 无创缝合线使神经断端组织套接入长约 8 mm 的硅胶管(硅胶管外径 2 mm,内径 1 mm)内,两神经断端间距 5 mm;用 1 ml 注射器将生理盐水注入硅胶管内神经断端间及周围神经组织中,逐层缝合切口。大鼠术后局部肌肉注射庆大霉素(80 mg/ml) 0.5 ml,连续注射 3 d。各组大鼠于手术苏醒后继续给

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2009.02.004

基金项目:日本高教科技部资助项目(文高助第 343 号)

作者单位:300381 天津,天津体育学院运动人体科学系康复医学与体育保健教研室(李庆雯);天津中医药大学针灸系(郭义)

予普通饲料喂养。

三、电针刺激方法

5 Hz 电针治疗组和 100 Hz 电针治疗组于术后第 5 天即开始电针治疗,将清醒状态下的大鼠固定于自制装置中,患肢外露,取患侧环跳、足三里、三阴交穴,选用长为 15 mm 的 32 号毫针(苏州产),针刺深度约 5~7 mm。待针刺完毕后接通电针仪(韩氏多用电针治疗仪,WQ-1002F 型,北京产),两正极分别连接大鼠环跳穴和足三里穴,两负极连接三阴交穴。5 Hz 电针治疗组和 100 Hz 电针治疗组的电针刺激频率分别为 5 Hz 和 100 Hz,电刺激强度以患肢轻微颤动为度,波形选用连续波,电针治疗每次 10 min,隔日 1 次,每周治疗 3 次,共治疗 14 周。模型组及正常组大鼠亦于相同时间段将其固定(方法同上),但期间不给予电针刺激。

四、标本染色方法

各组大鼠于术后 14 周时采用颈椎脱位法处死后取材,模型组和两电针治疗组取实验侧硅胶管内神经组织(即神经再生组织),正常组取同侧相同部位的神经组织,标本组织经 10% 甲醛液固定、石蜡包埋后行 5 μm 切片(纵切),然后行 HE 染色、砂罗铬花青染色和 S-100 免疫组化染色。

1. 神经髓鞘砂罗铬花青法(改良 Page 法):切片标本脱蜡到水,加砂罗铬花青染液于切片上,室温染色 30 min,倾去染液,用流水冲洗 2 min;经 10% 硫酸铁铵水溶液分化 3 min,至胶原纤维和肌纤维接近无色或淡灰色、神经髓鞘呈清晰蓝色为宜,然后用自来水冲洗 10 min,荧光桃红染液复染 10 s,稍经水洗后各级酒精脱水、二甲苯透明、中性树脂封固。

2. 神经组织 HE 染色:切片脱蜡到水,行苏木-伊红染色。

3. S-100 免疫组化染色:采用 SABC 法, I 抗工作液为兔抗鼠多克隆抗体,生物素山羊抗兔 IgG(II 抗),辣根酶标记链亲合素(III 抗)。DA 血清液封闭,室温孵育 10 min,滴加 1:100 的 I 抗工作液,4℃ 过夜,滴加生物素标记的 II 抗工作液,室温孵育 30 min,滴加 III 抗工作液,室温孵育 30 min,DAB 显色、复染、封片。在显微镜下观察 S-100 蛋白表达情况,将所得图像通过 PE60 型显微镜摄像系统导入计算机,利用 Pixera Pro Plus 图像分析系统(美国产)半定量检测 S-100 蛋白表达情况,以神经组织出现深棕色为阳性反应,每张切片均随机选取 5 个高倍镜(×400)视野,采用颜色分割技术自动测量 S-100 蛋白的面积百分比(Pre-area)。

五、统计学分析

本研究所得数据以($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 11.0

版统计学软件,组间计量资料比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

结 果

一、各组大鼠神经髓鞘砂罗铬花青染色结果分析

砂罗铬花青染色是显示神经髓鞘结构的特异性染色方法,可观察神经髓鞘组织的排列与再生情况。正常组大鼠神经组织髓鞘镜下呈蓝色,神经细胞胞质、肌纤维及胶原纤维呈鲜红色,胞核和核仁为蓝色,髓鞘排列整齐,无断裂。模型组髓鞘结构排列紊乱,方向性差,髓鞘化程度低,两电针治疗组大鼠神经髓鞘结构较模型组排列整齐、致密,髓鞘化程度较高,其中以 5 Hz 电针治疗组的改善幅度较显著,可见该组大鼠神经髓鞘着色较深,数量增多,排列整齐,方向性好,详见图 1~4。

二、各组大鼠神经组织 HE 染色结果分析

正常组镜下观察可见神经由大小不同的神经束组成,外被有神经束膜和外膜,平直排列,可见稀疏的雪旺细胞(Schwann cell,SC)胞核。模型组神经纤维较正常组排列紊乱,成纤维细胞和 SC 增殖明显,神经束间有较多肉芽组织形成;两电针治疗组的神经纤维排列较整齐,方向性好,SC 增殖更加明显,其中以 5 Hz 电针治疗组的改善幅度较显著,镜下可见大量郎飞氏节,详见图 5~8。

三、各组大鼠 S-100 蛋白表达及面积百分比测定结果比较

S-100 蛋白阳性表达为细胞浆表达,镜下免疫组化染色呈深棕色,各组大鼠 S-100 蛋白表达详见图 9~12。经图像分析系统处理,发现两电针治疗组大鼠 S-100 阳性表达率明显增高,提示电针刺激能促进 SC 增殖,其 S-100 面积百分比结果详见表 1,从表中数据可知,两电针治疗组 S-100 面积百分均较模型组明显增加,差异具有统计学意义($P < 0.05$);进一步分析发现,5 Hz 电针治疗组 S-100 面积百分显著大于 100 Hz 电针治疗组,差异具有统计学意义($P < 0.05$),表明 5 Hz 或 100 Hz 电针刺激均能促进 SC 增殖,其中以 5 Hz 电针的促 SC 增殖效应较显著。

表 1 各组大鼠 S-100 蛋白表达面积百分比(Pre-area)比较(%, $\bar{x} \pm s$)

组 别	只数	S-100 面积百分比
正常组	10	0.287 ± 0.074
模型组	10	0.439 ± 0.140 ^a
5 Hz 电针治疗组	10	0.581 ± 0.071 ^{ab}
100 Hz 电针治疗组	10	0.519 ± 0.082 ^{abc}

注:与正常组比较,^a $P < 0.05$;与模型组比较,^b $P < 0.05$;与 5 Hz 电针治疗组比较,^c $P < 0.05$

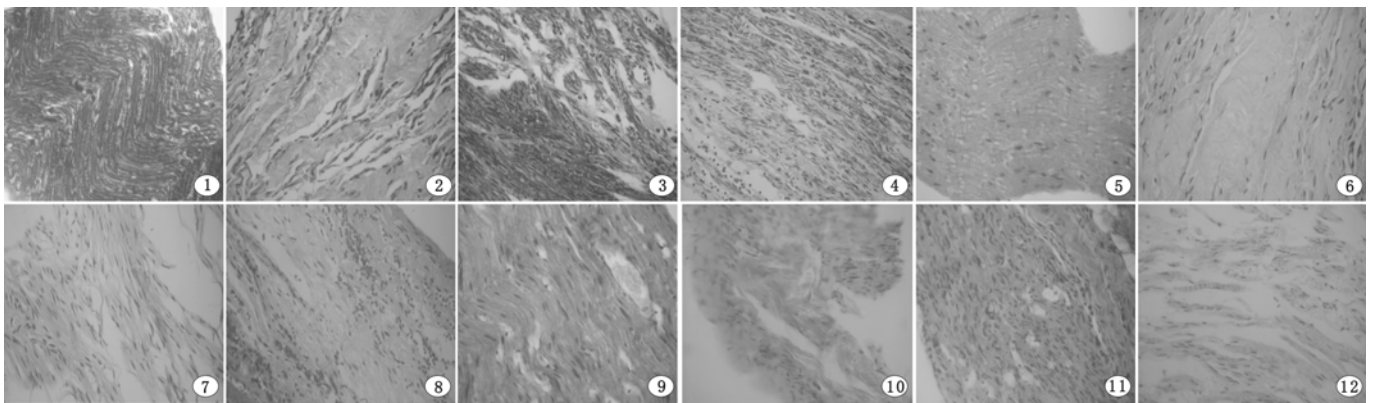


图 1 正常组大鼠神经纤维纵切面观察(砂罗铬花青染色, $\times 400$); 图 2 模型组大鼠神经纤维纵切面观察(砂罗铬花青染色, $\times 400$); 图 3 5 Hz 电针治疗组大鼠神经纤维纵切面观察(砂罗铬花青染色, $\times 400$); 图 4 100 Hz 电针治疗组大鼠神经纤维纵切面观察(砂罗铬花青染色, $\times 400$); 图 5 正常组大鼠神经纤维纵切面观察(HE 染色, $\times 400$); 图 6 模型组大鼠神经纤维纵切面观察(HE 染色, $\times 400$); 图 7 5 Hz 电针治疗组大鼠神经纤维纵切面观察(HE 染色, $\times 400$); 图 8 100 Hz 电针治疗组大鼠神经纤维纵切面观察(HE 染色, $\times 400$); 图 9 正常组大鼠神经纤维纵切面 S-100 蛋白表达(免疫组化染色, $\times 400$); 图 10 模型组大鼠神经纤维纵切面 S-100 蛋白表达(免疫组化染色, $\times 400$); 图 11 5 Hz 电针治疗组大鼠神经纤维纵切面 S-100 蛋白表达(免疫组化染色, $\times 400$); 图 12 100 Hz 电针治疗组大鼠神经纤维纵切面 S-100 蛋白表达(免疫组化染色, $\times 400$)

讨 论

多年来临床及实验研究表明,针灸治疗周围神经损伤具有确切疗效,特别是电针的临床应用^[4,7]。电针穴位刺激对机体组织有一定穿透能力,对组织再生、免疫功能及内分泌等均有积极作用^[8,9]。电针发出的电脉冲在电极间产生弱电场效应,有利于损伤神经再生^[10,11];有研究发现,受损神经在电场刺激条件下再生的速度是未给予电场刺激时的 10 倍^[12]。本研究选用沿坐骨神经走行的环跳、足三里和三阴交穴,将电针阳极连接环跳和足三里穴,阴极连接三阴交穴,有利于神经从肢体近端向远端生长,也符合神经在电场中向阳极生长的特性^[13]。

周围神经多为有髓神经,髓鞘的再生、修复与神经纤维再生密切相关,一方面神经纤维能调控髓鞘再生^[14];另一方面髓鞘为神经纤维生长提供通路^[15]。SC 是周围神经系统中特有的胶质细胞,在周围神经发生、发育、形态、功能维持等方面具有重要作用;有研究证实,电场作用可加速 SC 代谢、有丝分裂及移行等^[10]。S-100 蛋白是一种酸性钙结合蛋白,可反映 SC 的数量和活性。免疫组织化学对其定位研究后发现^[16],S-100 蛋白主要存在于周围神经 SC 中,其表达与神经功能密切相关;神经损伤后 S-100 蛋白含量下降,而在有再生轴突长入的神经中,S-100 蛋白则持续保持阳性表达。本实验通过髓鞘特染砂罗铬花青染色并结合神经纤维 HE 染色观察 S-100 蛋白表达,发现电针治疗组大鼠神经髓鞘化程度高,神经纤维排列整齐,S-100 蛋白阳性表达率明显增强,表明电针刺激能促进 SC 增殖,从而加快髓鞘再生修复。

本实验采用的神经完全切断后构建神经再生室模型,是目前研究周围神经损伤较为成熟且广泛使用的实验模型之一^[1-3],其优点是能为再生神经提供一个相对独立和稳定的环境,可避免神经纤维被周围增殖速度相对较快的其它组织所阻断,并能诱导其方向性生长;同时神经被完全切断后,其实验结果也相对较客观。

影响电针疗效的因素较多,其中电针频率和作用时间是较显著的影响因素。有研究发现,不同频率电针刺激对不同类型神经纤维具有各异的兴奋作用,促进中枢神经释放的递质也不尽相同^[13],因此研究不同频率电针与周围神经损伤修复间的关系对指导临床治疗具有重要意义。本研究主要目的之一是筛选电针刺激的治疗频率,即通过观察、对比高频(100 Hz)电针和低频(5 Hz)电针的治疗效果,从而为临床治疗提供可靠参数,本研究结果表明,5 Hz 电针刺激对神经髓鞘的促修复作用较 100 Hz 电针刺激显著。

参 考 文 献

- [1] 吕德成,袁先厚,张卫国,等. 利用神经再生室观察 FK506 促进神经再生的实验研究. 中华医学杂志, 2005, 28: 1978-1981.
- [2] 刘玉玲,黄德武. 再生室修复神经缺损实验模型的研究. 安徽医学, 2004, 3: 39-41.
- [3] 王相利,杨琳,李振华,等. 补阳还五汤对周围神经再生影响的实验研究. 山东医科大学学报, 1999, 37: 41-431.
- [4] 韩肖华,吴绪平,刘又香,等. 低频电针对吗啡依赖大鼠免疫功能康复的影响. 中华物理医学与康复杂志, 2002, 24: 687-689.
- [5] 庄明华,白晔,丁山,等. 电针刺激筋缩穴对癫痫大发作和癫痫持续状态动物模型脑电图的影响. 中华物理医学与康复杂志, 2006, 28: 673-675.
- [6] 江红,温新义,史庭慧,等. 电针刺激治疗腔隙性脑梗死后抑郁状

态的疗效观察. 中华物理医学与康复杂志, 2006, 28: 807-809.

[7] 余茜, 李晓红, 雷晴, 等. 电针对大鼠损伤坐骨神经再生的影响. 中国临床康复, 2000, 25: 2496-2497.

[8] 宋海涛, 贾连顺, 陈哲宇, 等. 大鼠坐骨神经切断后 GDNF mRNA 在其向心端及脊髓表达的变化. 第二军医大学学报, 2002, 23: 602.

[9] 王跃秀, 袁斌, 唐敬师. 不同参数电针对大鼠脊髓背角神经元伤害感受性反应的影响. 西安交通大学学报(医学版), 2003, 24: 531.

[10] 李青峰, 顾玉东. 电场对周围神经再生的影响. 中华整形烧伤外科杂志, 1997, 13: 43-47.

[11] Bar KJ, Saldanha GJ, Kennedy AJ, et al. GDNF and its receptor component in injured human nerves and dorsal root ganglia. Neuroreport, 1998, 9: 43.

[12] Williams LR, Longo FM, Powell HC. Spatial-temporal progress of pe-

ripherial nerve regeneration within a silicone chamber parameters for a bioassay. J Comp Neurol, 1983, 218: 460-470.

[13] 孔天瀚. 电针对胫神经中不同纤维成分再生的促进作用. 针刺研究, 1993, 2: 6-8.

[14] 何继银, 劳杰. 周围神经损伤后雪旺细胞生存与凋亡的动态平衡. 中华创伤骨科杂志, 2004, 3: 331-332.

[15] 何继银, 劳杰. 再生周围神经轴突髓鞘化分子机制研究进展. 国外医学骨科分册, 2007, 26: 245-246.

[16] Spreca A, Rambotti MG, Rende M, et al. Immunocytochemical localization of S-100b protein in degenerating and regenerating rat sciatic nerves. J Histochem Cytochem, 1989, 37: 441.

(收稿日期: 2008-01-10)
(本文编辑: 易 浩)

· 短篇论著 ·

综合康复治疗急性期神经根型颈椎病的临床研究

宋清焕 张福华 孙朝辉

神经根型颈椎病是颈椎病中发病率最高的一型, 其急性期症状重, 疼痛剧烈, 严重影响患者的生活和工作。目前, 临床对神经根型颈椎病的保守疗法很多, 但其急性期的治疗仅限于常规的脱水疗法, 即甘露醇加地塞米松, 虽能有效缓解症状, 但不良反应多, 复发率较高。我们于 2005 年 7 月至 2007 年 7 月采用电针、红外线、牵引并超短波治疗急性期神经根型颈椎病患者 42 例, 并与常规治疗者进行对照研究, 报道如下。

一、资料和方法

1. 诊断标准: ①具有比较典型的症状和体征, 临床检查, 如压顶、叩顶试验, 臂丛神经牵拉试验等检查阳性; ②颈椎 X 线、CT 或 MRI 检查证明椎间盘退变, 并压迫神经、血管; ③影像学检查显示存在神经、血管压迫, 且与临床表现具有明确的因果关系^[1]。

2. 一般资料: 84 例均为我院门诊患者, 男 39 例, 女 45 例; 年龄 37~55 岁, 平均 43 岁; 急性发病 28 例, 发病前无颈部不适及手臂麻木, 慢性病急性发作 56 例, 患者原有颈部不适及手部麻木短时间内急性加重; 所有病例均有剧烈的颈、肩、臂部痛或向上肢放射痛, 16 例伴手指麻木, 21 例伴无力; 颈椎 X 线片见椎体生理弯曲变直、不同程度的增生样改变或椎间隙狭窄, 椎间孔变小。排除脊髓空洞、前斜角肌综合征、颈肋综合征等疾病。将全部病例随机分成治疗组与对照组, 每组 42 例, 2 组临床资料比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 具有可比性, 见表 1。

3. 治疗方法: 治疗组应用电针、红外线、牵引并超短波治疗等物理治疗方法, 并于前 3 天用 20% 甘露醇 125 ml 快速静滴, 每日 1 次; 对照组用 20% 甘露醇 125 ml 快速静滴, 地塞米

表 1 2 组临床资料比较

组别	例数	性别(例)		年龄(岁)	发病情况(例)		伴随手指麻木或无力(例)
		男	女		急性发病	慢性发作	
治疗组	42	19	23	42.6 ± 1.6	13	29	18
对照组	42	20	22	43.5 ± 2.5	15	27	19

松 5 mg 加入甘露醇内, 每日 2 次。治疗以 7~10 d 为 1 个疗程, 共治疗 2~3 个疗程。若症状仍未消失, 后续治疗最多不超过 15 d。物理治疗的具体方法为: ①电针和红外线治疗: 取穴病变椎体两侧阳性反应点或其上下椎体患侧的夹脊穴, 疼痛麻木沿阳明经放射者加曲池、合谷穴; 疼痛麻木沿少阳经放射者加外关、中渚穴; 疼痛麻木沿太阳经放射者加后溪穴。选用 45~70 mm 长毫针, 颈夹脊穴向脊柱方向斜刺, 行针至穴位周围产生酸麻胀重感, 以传导至上肢及手的疼痛部位为佳, 余穴均常规刺法。然后在针柄上接上海产 G-6805 电针仪导线, 选用连续波, 频率 20 Hz, 电流以患者舒适度为度, 同时加红外线灯照射, 留针 20 min。②牵引: 采用坐式枕颌带持续性牵引, 牵引重量一般从 3~4 kg 开始, 逐渐增大至 7~8 kg, 以患者感觉舒适且能减轻症状为准, 但以不超过体重的 20% 为宜; 牵引角度视病情及 X 线检查而定, 每次 15~20 min。③超短波疗法: 患者仰卧, 采用上海产 80 型超短波治疗机, 频率 40.68 Hz, 电极 2 块, 大小 22 cm × 15 cm, 颈肩部对置, 无热量, 每次 20 min。以上治疗均每日 1 次。在治疗期间, 2 组患者均用颈围护颈制动, 保持颈椎稳定。

4. 疗效评定标准: 治愈为主要症状和体征消失, 能正常工作; 显效为主要症状消失, 体征大部分消失, 基本能坚持工作; 好转为症状和体征减轻, 工作受影响; 无效为症状和体征无改善。2 组均在入选时、治疗 1 周及治疗结束后, 分别采用目测类比分法 (Visual Analogue Scale, VAS) 进行临床疼痛评定^[2]。

5. 统计学分析: 采用 SPSS 12.0 版统计软件进行 χ^2 检验

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2009.02.005

作者单位: 462002 漯河, 河南省漯河医学高等专科学校物理教研室 (宋清焕); 河南省漯河医学高等专科学校第三附属医院疼痛科 (张福华、孙朝辉)