

不同频率督脉电针促进不完全脊髓损伤大鼠运动功能重建的比较研究

刘莹莹, 刘伟

摘要 **目的:**比较低、中、高频督脉电针对不完全脊髓损伤(iSCI)模型大鼠运动功能的影响。**方法:**采用随机数字表法将50只Wistar大鼠随机均分为假手术组,模型组和低、中、高频电针组(G1、G2、G3组),除假手术组外(仅行椎板全切除)均采用美国NYU脊髓冲击损伤仪制作大鼠T₁₁节段iSCI模型。G1、G2、G3组分别用低频(2 Hz, 2 mA)、中(50 Hz, 2 mA)、高频(100 Hz, 2 mA)电针“大椎、命门”30 min, 1次/d,共治疗2周。观察各组大鼠痛超敏行为学并采用von Frey hair法进行痛阈测定;记录股二头肌(BF)和股直肌(RF)的肌电积分值(IEMG)BF-TEMG和RF-TEMG;采用玻片法和断尾法观凝血时间(CT)和出血时间(BT);采用凝血因子生成实验检测凝血酶、内/外源性凝血因子Xa活性;采用Basso Beattie Bresnahan(BBB)评分和斜板实验评价运动功能恢复情况。**结果:**与模型组相比,G1、G2和G3组大鼠BF-TEMG和RF-TEM升高,内/外源性凝血因子Xa和凝血酶生成明显降低,CT和BT延长,对损伤躯干下端机械性轻触皮肤、轻压皮肤、机械轻压右前爪的机械痛痛阈阈值等3项指标提高,搔抓、舔咬损伤平面以下部位并对尾部及后肢出现自噬及自发嘶叫等异常行为学改变明显减少,BBB评分和斜板倾斜度升高($P<0.05$);但G1组的各项改变幅度均大于G2、G3组($P<0.05$)。**结论:**低、中、高频电针均可促进iSCI大鼠运动功能重建,但低频督脉电针的作用优于中、高频。**关键词** 督脉电针;不完全脊髓损伤;痛超敏行为学;凝血功能;痛阈;运动功能

中图分类号 R741;R741.05;R744 **文献标识码** A **DOI** 10.16780/j.cnki.sjssgncj.20210088

本文引用格式:刘莹莹, 刘伟. 不同频率督脉电针促进不完全脊髓损伤大鼠运动功能重建的比较研究[J]. 神经损伤与功能重建, 2021, 16(4): 191-194.

作者单位
湖北省十堰市太和医院(湖北医药学院附属医院)中医部
湖北 十堰 442000
基金项目
湖北省十堰市太和医院院级课题(No. 2018JJXM120)
收稿日期
2021-02-08
通讯作者
刘伟
38702578@qq.com

A Comparative Study of Du Meridian Electroacupuncture with Different Frequencies in Promoting Reconstruction of Motor Function in Rats with Incomplete Spinal Cord Injury LIU Ying-ying, LIU Wei. Department of traditional Chinese Medicine, Taihe Hospital, Hubei University of Medical, Hubei Shiyan 442000, China

Abstract Objective: Compare the effects of low, medium, and high frequency Du meridian acupuncture on the motor function of rats with incomplete spinal cord injury (iSCI). **Methods:** Using the random number table method, 50 Wistar rats were randomly divided into the sham operation group; model group; and low, medium, and high frequency electroacupuncture groups (G1, G2, and G3 groups). The iSCI model of the rat T₁₁ segment was made with the NYU spinal cord impact injury device for all groups aside from the sham operation group (which only underwent a total lamina resection). The G1, G2, and G3 groups were treated with low (2 Hz, 2 mA), medium (50 Hz, 2 mA), and high frequency (100 Hz, 2 mA) electroacupuncture at the Dazhui and Mingmen points for 30 minutes once a day for a total of 2 weeks. We observed the behaviors of pain hypersensitivity in rats in each group and used the von Frey hair method to measure pain threshold. We recorded the biceps femoris (BF) and rectus femoris (RF) myoelectric integral value (IEMG), BF-TEMG and RF-TEMG, respectively. The slide method and tail-docking method were used to observe clotting time (CT) and bleeding time (BT). The coagulation factor test was conducted to detect thrombin and endogenous/exogenous coagulation factor Xa activity. The Basso Beattie Bresnahan (BBB) score and inclined board test were used to evaluate the recovery of motor function. **Results:** Compared with the model group, the G1, G2, and G3 groups showed an increase in BF-TEMG and RF-TEM; decrease in production of endogenous/exogenous coagulation factor Xa and thrombin; prolonged CT and BT; increased pain threshold in 3 indexes including light touch and light pressure on the skin in the lower portion of the injured trunk and light pressure on the right forepaw; reduction in scratching, licking and biting the area below the plane of injury, appearance of autophagy on the tail and hind limbs, and spontaneous hissing; and increased BBB score and inclined plate slope ($P<0.05$). Furthermore, the G1 group showed a greater difference in each of the above measurements compared to the G2 and G3 groups ($P<0.05$). **Conclusion:** Low, medium, and high frequency electroacupuncture can promote the reconstruction of motor function in rats with iSCI, but the effect of low frequency Du meridian electroacupuncture is superior to that of medium and high frequencies.

Key words Du meridian electroacupuncture; incomplete spinal cord injury; hyperalgesia behavior; blood coagulation function; pain threshold; motor function

不完全性脊髓损伤(incomplete spinal cord injury, iSCI)是脊髓损伤中相对较轻的一类致残性疾病,多表现为损伤平面以下神经节段感觉区域顽固性触发性疼痛、自发性痛或痛觉过敏(痛超敏)及运动功能障碍^[1,2]。本研究通过观察低、中、高频督脉电针对iSCI模型大鼠凝血功能、痛超敏行为学的影响,探讨其改善运动功能的可能机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与材料

1.1.1 实验动物及分组 SPF级雄性Wistar大鼠50只,7周龄,体质量(230.5 ± 5.5)g,由湖北省实验动物中心提供[合格证号:SCX K(鄂)2019-0005,福利伦理审批号2017-59]。采用随机数字表法将大鼠随机分为假手术组,模型组和低、中、高频电针组(G1、G2、G3组),各组10只。实验遵守3R原则,需满足动物福利。

1.1.2 实验器材及药品 主要有:旷场实验分析系统(上海洛维生物科技有限公司,型号:XR-XZ301);Noraxon表面肌电测试仪(美国,上海涵飞医疗器械有限公司,型号:MyoTraceTM 400);von Frey hair(纤毛机械刺激针,瑞典);风途FT-SY96A酶联检测仪(山东风途物联网科技有限公司);LH202H-四导韩氏穴位神经刺激仪(北京华运安特有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 造模 3%戊巴比妥钠(1 mL/kg)麻醉大鼠,固定;定位T₁₁棘突,标记T₉~T₁₂手术区域,常规备皮、碘伏消毒、铺无菌巾。以T₁₁棘突为中心区行脊正中皮肤纵行切口,分离浅肌层,暴露T₉~T₁₂棘突和椎板,游离T₁₁椎板上下缘并咬去椎板棘突暴露T₁₁节段脊髓,用美国NYU脊髓冲击损伤仪的击打(250 g·mm)悬空固定的T₁₁节段脊髓^[3]。造模成功标志参考文献^[4,5]:脊髓表面肉眼可见圆形或椭圆形血肿,击打脊髓时鼠尾出现一过性摆动、后肢痉挛性抽搐后完全松弛。假手术组仅行椎板全切除术。术后缝合皮肤、碘伏消毒。肌注20万U青霉素,1次/d,共3 d。

1.2.2 治疗 术后第7天,用大鼠固定器固定清醒G1、G2、G3组大鼠,参照《实验针灸学》,于第7颈椎与第1胸椎背部正中选“大椎穴”;第2、3腰椎棘突间背部正中选“命门穴”。用0.3 mm×1 mm毫针,用捻针法缓慢进针,进针深度应达硬膜外。然后接四导韩氏穴位神经刺激仪(大椎接正极,命门接负极),分别予低(2 Hz, 2 mA)、中(50 Hz, 2 mA)、高(100 Hz, 2 mA)频电针治疗,连续波,以双下肢肌肉出现节律性收缩或下肢轻微

抖动为度,30 min/次,1次/d,共治疗2周。假手术组和模型组固定30 min,但不治疗。

1.2.3 痛超敏行为学观察 以治疗结束后大鼠出现自发嘶叫及对T₁₁节段以下躯体、后肢和尾部舔咬、搔抓甚至自噬等异常行为学改变为阳性体征,并记录发生次数。

1.2.4 痛阈检测 治疗结束后采用标准化 von Frey hair 痛阈测定方法,测量损伤躯干下端机械性轻触皮肤、轻压皮肤、机械轻压右前爪的机械痛阈阈值3项指标。

1.2.5 行为学实验 ①斜板实验:治疗结束后将大鼠头朝左横放于与纵轴垂直的斜板上,然后从0°起、每次增加5°,逐渐增大斜板斜角,期间以大鼠停留在木板上5 sec不滑落的斜角为有效角度,实验重复3次取其平均值。②BBB(Basso Beattie Bresnahan)功能评分:治疗结束后将大鼠放入旷场内适应环境1周,由专门训练的实验人员进行评定,BBB分值越高说明运动功能恢复的越好^[6]。

1.2.6 表面肌电测试 治疗结束后固定清醒大鼠,剃去右后肢鼠毛、酒精脱脂。在股直肌在膝关节与髌前上棘连线中点,股二头肌在腘窝中点与股骨大转子连线分别接测试电极,用Noraxon表面肌电测试仪记录股二头肌(biceps femoris, BF)和股直肌(reoctns femoris, RF)的肌电积分值(integoted, IEMG):BF-TEMG和RF-TEMG。

1.2.6 凝血功能检测 在表面肌电测试完成后进行。①断尾、用玻片接少量血液,用5号针头轻轻挑起,以出现丝状物为凝血时间(clotting time, CT);以断尾处不再出血为出血时间(bleeding time, BT)。②凝血酶和内/外源性凝血因子Xa活性检测:断尾后准确吸取200 μL,取上述全血中10⁵个全血细胞,分别加入含5 mmol/L CaCl₂及1 nmol/L凝血酶原的缓冲液孵育10 min,加EDTA终止,然后加入0.8 mmol/L的S2238,酶标仪波长405 nm,测定凝血酶。再取10⁵个全血细胞加入0.2 nmol/L凝血酶(IIa)、1 nmol/L因子IXa、5 nmol/L因子VIII和130 nmol/L因子X的缓冲液孵育,10 min后用7 mmol/L的EDTA终止;加显色底物,405 nm波长分别测定内/外源性凝血因子Xa^[7]。

1.3 统计学处理

采用SPSS 21.0软件,符合正态分布以及方差齐性的计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,单因素方差分析,两两比较采用采用SNK-q检验;不满足方差齐性的数据采用Dunnett C检验和Games-Howell检验;P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同频率督脉电针对iSCI大鼠运动功能的影响

模型组斜角和BBB评分显著低于假手术组($P<0.05$)。G1、G2和G3组斜角和BBB评分高于模型组($P<0.05$)；G1组斜角和BBB评分高于G2和G3组($P<0.05$)，G2和G3组间差异无统计学意义($P>0.05$)，见表1。

表1 各组大鼠BBB评分和斜板实验结果比较($\bar{x}\pm s$)

组别	只数	BBB/分	斜角/度
假手术组	10	18.90±1.19	66.04±5.21
模型组	10	7.68±0.54 ^①	28.08±1.47 ^①
G3组	10	11.78±1.47 ^②	43.55±2.73 ^②
G2组	10	12.09±0.92 ^②	41.78±1.98 ^②
G1组	10	14.75±1.42 ^{②③④}	52.05±4.64 ^{②③④}

注：与假手术组比较，^① $P<0.05$ ；与模型组比较，^② $P<0.05$ ；与G3组比较，^③ $P<0.05$ ；与G2组比较，^④ $P<0.05$

2.2 不同频率督脉电针对iSCI大鼠痛超敏行为学异常改变的影响

模型组大鼠出现搔抓、舔咬损伤平面以下部位并对尾部及后肢出现自噬及自发嘶叫现象较假手术组增多($P<0.05$)。G1、G2和G3组大鼠的上述现象则较模型组明显降低($P<0.05$)；G1组大鼠的上述现象低于G2和G3组($P<0.05$)，但G2和G3组间差异无统计学意义($P>0.05$)，见表2。

表2 各组大鼠痛超敏行为学异常改变比较(次， $\bar{x}\pm s$)

组别	只数	自发嘶叫	搔抓
假手术组	10	0.54±0.01	4.59±0.24
模型组	10	12.01±1.17 ^①	19.60±1.53 ^①
G3组	10	9.01±0.90 ^②	13.67±1.36 ^②
G2组	10	8.73±0.85 ^②	14.91±0.95 ^②
G1组	10	6.46±0.22 ^{②③④}	10.80±1.59 ^{②③④}

组别	舔咬	自噬
假手术组	1.50±0.04	0.00±0.00
模型组	15.69±1.65 ^①	9.60±1.24 ^①
G3组	11.81±1.52 ^②	8.91±1.01 ^②
G2组	10.61±1.93 ^②	8.79±0.58 ^②
G1组	8.90±0.92 ^{②③④}	6.87±0.71 ^{②③④}

注：与假手术组比较，^① $P<0.05$ ；与模型组比较，^② $P<0.05$ ；与G3组比较，^③ $P<0.05$ ；与G2组比较，^④ $P<0.05$

2.3 不同频率督脉电针对iSCI大鼠机械痛阈值的影响

模型组大鼠机械痛阈值明显降低，其对损伤躯干下端机械性轻触皮肤、轻压皮肤、机械轻压右前爪的机械痛痛阈均较假手术组显著降低($P<0.05$)。G1、G2和G3组大鼠的上述阈值均高于模型组($P<0.05$)；G1组高于G2和G3组($P<0.05$)，但G2和G3组间差异

无统计学意义($P>0.05$)，见表3。

表3 各组大鼠机械痛阈值比较(g， $\bar{x}\pm s$)

组别	只数	机械轻压右前爪
假手术组	10	65.90±4.89
模型组	10	17.56±1.87 ^①
G3组	10	33.78±1.80 ^②
G2组	10	34.65±2.10 ^②
G1组	10	40.76±4.29 ^{②③④}

组别	轻触皮肤	轻压皮肤
假手术组	72.50±4.09	65.32±5.27
模型组	15.69±1.38 ^①	8.69±1.45 ^①
G3组	24.78±2.04 ^②	29.04±3.07 ^②
G2组	25.69±1.97 ^②	28.64±2.95 ^②
G1组	31.82±2.37 ^{②③④}	34.81±2.74 ^{②③④}

注：与假手术组比较，^① $P<0.05$ ；与模型组比较，^② $P<0.05$ ；与G3组比较，^③ $P<0.05$ ；与G2组比较，^④ $P<0.05$

2.4 不同频率督脉电针对iSCI大鼠BF-TEMG和RF-TEM的影响

模型组BF-TEMG和RF-TEM较假手术组明显降低($P<0.05$)。G1、G2和G3组大鼠的BF-TEMG和RF-TEM高于模型组($P<0.05$)；G1组高于G2和G3组($P<0.05$)，但G2和G3组间差异无统计学意义($P>0.05$)，见表4。

表4 各组大鼠BF-TEMG和RF-TEM检测结果比较(μv ， $\bar{x}\pm s$)

组别	只数	BF-TEMG	RF-TEM
假手术组	10	120.86±7.39	176.23±11.24
模型组	10	66.18±3.70 ^①	75.03±5.57 ^①
G3组	10	94.54±5.61 ^②	121.57±9.36 ^②
G2组	10	96.02±4.98 ^②	123.91±7.45 ^②
G1组	10	113.98±7.43 ^{②③④}	147.70±8.56 ^{②③④}

注：与假手术组比较，^① $P<0.05$ ；与模型组比较，^② $P<0.05$ ；与G3组比较，^③ $P<0.05$ ；与G2组比较，^④ $P<0.05$

2.5 不同频率督脉电针对iSCI大鼠凝血功能的影响

与假手术组相比，模型组内/外源性凝血因子Xa和凝血酶生成明显增多，CT和BT缩短($P<0.05$)。与模型组相比，G1、G2和G3组大鼠内/外源性凝血因子Xa和凝血酶生成降低，CT和BT延长($P<0.05$)；G1组改变幅度大于G2和G3组($P<0.05$)，但G2和G3组间差异无统计学意义($P>0.05$)，见表5。

3 讨论

SCI是一种严重的中枢神经系统疾病，致残率高^[8]。中医学将其归属于“痿证”范畴。督脉属奇经八脉之首，汇集全身阳气。脊髓与督脉的功能相似，iSCI与

表5 各组 iSCI 大鼠凝血功能改变比较($\bar{x}\pm s$)

组别	只数	CT/s	BT/s	凝血酶/U	内源性凝血因子 Xa/(pg/mL)	外源性凝血因子 Xa/(pg/mL)
假手术组	10	78.84±5.39	816.75±32.75	9.41±0.96	49.81±2.09	42.09±2.76
模型组	10	67.64±4.26 ^①	633.45±29.07 ^①	17.53±2.46 ^①	60.59±4.13 ^①	54.38±3.80 ^①
G3 组	10	70.31±5.07 ^②	707.84±30.02 ^②	14.73±1.08 ^②	55.07±1.22 ^②	48.79±1.30 ^②
G2 组	10	70.75±4.27 ^②	710.19±33.45 ^②	13.92±1.67 ^②	57.78±2.74 ^②	47.48±2.83 ^②
G1 组	10	74.50±3.44 ^{②③④}	780.71±27.86 ^{②③④}	10.37±0.95 ^{②③④}	53.23±2.80 ^{②③④}	45.15±1.67 ^{②③④}

注:与假手术组比较,^① $P<0.05$;与模型组比较,^② $P<0.05$;与 G3 比较,^③ $P<0.05$;与 G2 组比较,^④ $P<0.05$

“痿证”相符,也可视之为“督脉损伤”^[9]。比较不同刺激频率督脉电针治疗 iSCI 有一定的临床指导意义。

本实验模型组大鼠出现典型的“督脉损伤”,如痛超敏行为学异常、痛阈阈值降低、凝血功能异常亢进等现象。大鼠肌力和肢体协调性下降、运动功能损伤严重。经治疗,G1、G2、G3 组大鼠凝血功能恢复,痛超敏行为学、BF-TEMG、RF-TEM 及痛阈阈值均有不同程度改善,大鼠运动功能也明显恢复。提示低、中、高频电针均可改善微环境并促进 iSCI 大鼠运动功能恢复,但低频督脉电针(G1 组)的作用优于中、高频。研究表明,督脉电针可改善脑部血液循环,促进脑脊液流动和 SCI 部位水肿消退,使运动和感觉得到一定程度的恢复^[10,11]。另外,iSCI 可导致下肢骨骼肌萎缩及微循环障碍,表现为肌力下降,肢体协调性降低,如斜板倾斜度及 BF-TEMG、RF-TEM 降低^[12,13];而后者可能形成严重的下肢静脉血栓,也是影响运动功能恢复的重要因素^[14]。低频督脉电针可能是通过改善凝血功能,使损伤部位血液流动性增强,减少因凝血亢进而引起的气血淤堵现象,化生气血促进损伤部位血液循环和神经功能的恢复。也可通过提高大鼠痛阈而减轻 iSCI 痛超敏行为学改变,这有利于损伤部位神经水肿及炎症消除。电针仪输出电流可唤醒受损脊髓神经元的觉醒,恢复其兴奋和传导,这有利于肢体运动功能的恢复,“既可培补真阳,又可疏通脏腑经气,阳气上下贯通”^[15]。

综上所述,督脉电针改善 iSCI 大鼠运动功能的可能机制是:改善亢进凝血功能-化生气血促进损伤部位血液循环和神经功能的恢复-提高痛阈-减轻 iSCI 痛超

敏-肌力增强-逐步恢复运动功能。在这一作用过程中,低频督脉电针疏通“督脉损伤”引起的淤阻、改善微环境及增强肢体协调性以促进运动功能重建方面作用优于中、高频督脉电针。

参考文献

[1] 郭文,冷军笃,魏方月,等.关键肌电刺激法对不完全性脊髓损伤患者下肢运动功能恢复的影响[J]. 康复学报,2020,30: 64-68, 73.

[2] Burke D, Fullen BM, Stokes D, et al. Neuropathic pain prevalence following spinal cord injury: A systematic review and meta-analysis[J]. Eur J Pain, 2017, 21: 29-44.

[3] Young W. Spinal cord contusion models[J]. Prog Brain Res, 2002, 137: 231- 255.

[4] 冯杰扬,陈杨霞,郭磊,等.减重步行训练对不完全脊髓损伤大鼠脚桥核可塑性影响的研究[J].中国康复医学杂志,2017,32: 64-63.

[5] 魏荣志,王玉玦,闫景龙,等.大鼠脊髓损伤模型研究进展概述[J].神经损伤与功能重建,2020,15: 274-277.

[6] 马善峰,马奎,吕合作,等.运动诱发电位和 BBB 评分在大鼠脊髓损伤功能评价中的相关性研[J].中华解剖与临床杂志,2019,24: 299-304.

[7] 戴红伟,周娇.槲皮素对急性淋巴细胞白血病模型小鼠凝血功能的影响[J].中国中医急症,2018,27: 970-973.

[8] 刘胜文,王煜,雷霆,等.神经干细胞移植治疗脊髓损伤研究新进展[J].神经损伤与功能重建,2021,16: 27-28.

[9] 杜晓伟,滕秀英,高长乐,等.夹脊电针干预对大鼠脊髓损伤区巨噬细胞 NgR 表达的影响[J].中国中医药科技,2020,27: 5-8.

[10] 张弛,李幼德,洪方业,等.虚拟现实训练辅助督脉电针对不完全性脊髓损伤患者肢体活动及平衡力的影响[J].临床和实验医学杂志,2019,18: 1314-1317.

[11] 孙忠人,田洪昭,徐思禹,等.电针治疗脊髓损伤机制研究概述[J].针灸临床杂志,2019,35: 84-88.

[12] 范蕊,吴宗辉,陈晓琳,等.电针对创伤性脊髓损伤大鼠下肢骨骼肌萎缩相关蛋白表达的影响[J].中国康复理论与实践,2019,25: 1133-1139.

[13] 魏瑞晗,饶家声,赵璨,等.恒河猴脊髓半切损伤后下肢节段功能表现的研究[J].神经损伤与功能重建,2019,14: 608-610, 625.

[14] 刘亚梅,刘岩,毛淑芳,等.脊髓损伤患者康复过程中监测下肢深静脉血栓形成的策略研究[J].重庆医学,2018,47: 4655-4657.

[15] 李晓宁,迟蕾.夹脊配合督脉电针治疗脊髓损伤后功能障碍临床观察[J].上海针灸杂志,2015,34: 972-975.

(本文编辑:唐颖馨)