

夹脊电针结合神经松动术对兔坐骨神经损伤后下肢运动功能的影响及其相关机制

王艳¹ 郭子楠² 董传菲² 朱路文¹ 刘波¹ 陈慧杰¹ 赵彬¹ 裴飞¹ 陈程程²

¹黑龙江中医药大学附属第二医院康复中心, 哈尔滨 150001; ²黑龙江中医药大学研究生院康复医学与理疗学专业, 哈尔滨 150040

通信作者: 王艳, Email: 358940151@qq.com

【摘要】目的 夹脊电针结合神经松动术对兔坐骨神经损伤后下肢运动功能以及 Ras 相关 C3 肉毒素底物 1 的 mRNA 和蛋白表达的影响。**方法** 采用随机数表法将 180 只新西兰家兔分为正常对照组、模型对照组、夹脊电针组、神经松动术组、夹脊电针结合神经松动术组。每组 36 只, 再按取材时间点分为治疗 1 周、2 周、4 周后共 3 个亚组, 每个亚组 12 只新西兰家兔。模型对照组、夹脊电针组、神经松动术组、夹脊电针结合神经松动术组均采用钳夹法造成坐骨神经损伤模型, 正常对照组、模型对照组不做任何干预, 神经松动术组行神经松动术治疗, 夹脊电针组进行夹脊电针治疗, 夹脊电针结合神经松动术组进行夹脊电针和神经松动术治疗。于治疗 1、2、4 周后采用趾张反射评分和改良的 Tarlov 评分评定 5 组大鼠新西兰家兔的下肢功能恢复情况。并于治疗 1、2、4 周后, 每组均抽取 12 只新西兰家兔放血处死后取坐骨神经和相应节段脊髓(L₄-L₆ 段), 采用聚合酶链反应(PCR)检测和免疫印迹(Western blot)检测 Ras 相关 C3 肉毒素底物 1 mRNA 及蛋白的表达。**结果** 治疗后 1、2、4 周后, 夹脊电针组、神经松动术组和夹脊电针结合神经松动术组新西兰家兔的坐骨神经功能均优于模型对照组同时时间点, 但均弱于正常对照组同时时间点, 差异均有统计学意义($P < 0.05$); 且夹脊电针结合神经松动术组各时间点的坐骨神经功能均优于夹脊电针组和神经松动术组同时时间点, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。经 PCR 灰度分析, 治疗 1、2、4 周后, 夹脊电针结合神经松动术组节段脊髓和坐骨神经中 Ras 相关 C3 肉毒素底物 1 mRNA 的表达量高于夹脊电针组和神经松动术组同时时间点, 差异均有统计学意义($P < 0.01$)。经 Western blot 灰度分析, 治疗 1 周后, 夹脊电针结合神经松动术组节段脊髓 Ras 相关 C3 肉毒素底物 1 蛋白的表达量显著高于夹脊电针组, 差异有统计学意义($P < 0.01$); 治疗 2、4 周后, 夹脊电针结合神经松动术组节段脊髓 Ras 相关 C3 肉毒素底物 1 蛋白的表达量显著高于夹脊电针组和神经松动术组同时时间点, 差异均有统计学意义($P < 0.01$)。经 Western blot 灰度分析, 治疗 2、4 周后, 夹脊电针结合神经松动术组坐骨神经中 Ras 相关 C3 肉毒素底物 1 蛋白的表达量显著高于夹脊电针组和神经松动术组同时时间点, 差异均有统计学意义($P < 0.01$)。**结论** 神经松动术结合夹脊电针治疗可促进坐骨神经损伤后轴突再生的作用, 其作用机制可能与上调损伤的坐骨神经和相应脊髓节段 Ras 相关 C3 肉毒素底物 1 基因以及蛋白的表达有关。

【关键词】 坐骨神经损伤; 夹脊电针; 神经松动术; Ras 相关 C3 肉毒素底物 1

基金项目: 国家自然科学基金项目(81674077); 黑龙江中医药大学研究生创新科研项目(yjsex2017045); 黑龙江省自然科学基金项目(H2017062); 哈尔滨市科技局优秀学科带头人项目(2016RAXYJ106)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2019.02.015

Effects of electroacupuncture combined with nerve mobilization on lower limb motor function and mRNA and protein expression of C3 botoxin substrate 1 after sciatic nerve injury

Wang Yan¹, Guo Zinan², Dong Chuanfei², Zhu Luwen¹, Liu Bo¹, Chen Huijie¹, Zhao Bin¹, Pei Fei¹, Chen Chengcheng²

¹Rehabilitation Center of The Second Affiliated Hospital of Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150001, China; ²Rehabilitation and Physiotherapy, Graduate College of Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China

Corresponding author: Wang Yan, Email: 358940151@qq.com

【Abstract】Objective To investigate the effect of combining electroacupuncture with nerve mobilization to improve lower extremity motor function after sciatic nerve injury. And to document any changes in mRNA and protein expression of Ras-related C3 botoxin substrate 1. **Methods** 180 New Zealand rabbits were randomly divided into a normal control group, a model control group, an electroacupuncture group, a nerve mobilization group, and an electroacupuncture combined with nerve mobilization group, each of 36. Sciatic nerve injury was modelled using the clamping method in all except the normal control group. The control group had no intervention, while the nerve mobiliza-

tion group, the electroacupuncture group and the combined group were treated with nerve mobilization, and/or electroacupuncture applied to the rabbit analogue of the jiaji acupoint. After 1, 2, and 4 weeks of treatment, toe reflex scores and modified Tarlov scores were used to assess any functional recovery. After 1, 2, and 4 weeks of treatment, 12 of the rabbits in each group were sacrificed and the sciatic nerve and the L₄-L₆ segments of the spinal cord were resected. The expression of Ras-related C3 botulinum substrate 1 mRNA and protein was detected using the polymerase chain reaction and western blotting. **Results** Sciatic nerve function and the expression of Ras-related C3 botulinum substrate 1 mRNA in the spinal cords and sciatic nerves of the three treatment groups were significantly higher than in the model control group at all three time points, but significantly lower than in the normal control group. The combined group's results were significantly better than with electroacupuncture or nerve mobilization alone. After 1, 2, and 4 weeks of treatment, the average expression of Ras-related C3 botulinum substrate 1 protein in the spinal cords of the three treatment groups was significantly higher than the model control group's average, but significantly lower than that of the normal control group at the same time point. After 1 week of treatment the average expression of Ras-related C3 botulinum substrate 1 protein in the spinal cords of the combined group was significantly higher than that in the group receiving electroacupuncture alone. After 2 and 4 weeks it was also significantly higher than the nerve mobilization group's average. After 1 week of treatment, the average expression of Ras-related C3 botulinum substrate 1 protein in the sciatic nerves of all three treatment groups was significantly lower than that of the control group. However, 1 and 3 weeks later the average protein expression in the sciatic nerves was significantly higher than in the model control group, but significantly lower than in the normal control group at the same time points. The combined group's average was then significantly higher than those of the groups receiving electroacupuncture or nerve mobilization alone at the same time point. **Conclusion** Nerve stimulation combined with electroacupuncture applied to the jiaji acupoint can promote the regeneration of axons after sciatic nerve injury. The mechanism may be related to up-regulation of the Ras-related C3 botulinum substrate 1 gene and protein expression in the injured sciatic nerve and corresponding spinal cord segments.

【Key words】 Sciatic nerve injury; Jiaji acupoint; Electroacupuncture; Nerve mobilization; C3 botulinum substrate 1

Fund program: Natural Science Foundation of China (grant 81674077); a Graduate Innovation research project of Heilongjiang University of Chinese Medicine (no. yjscx2017045); Natural Science Foundation of Heilongjiang Province (grant H2017062); an Excellent Academic Leader project of Harbin's Science and Technology Bureau (no. 2016RAXYJ106)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2019.02.015

周围神经损伤(peripheral nerve injury)可导致运动、感觉、自主神经功能障碍,且会致使其相应的脊髓节段前角运动神经元凋亡,继而影响功能恢复。周围神经损伤在临床上较为常见,且修复缓慢,会给患者的身心造成极大的影响^[1]。Rho 族鸟苷三磷酸酶(guanosine triphosphatases, Rho GTPases)是轴突导向信号通路上的关键调节分子,Rho GTPase 的失衡受排斥和吸引力导向因子的调控,其中 Ras 相关 C3 肉毒素底物 1(Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1, Rac1)是 Rho GTPase 家族中较为重要的一员^[2],类似分子开关调控着细胞活动,可通过细胞间的粘附、细胞迁移和细胞周期等生物学活动方式参与神经的恢复^[3]。

本课题组前期的研究表明,夹脊电针结合神经松动术治疗可有效地促进患肢的运动和感觉功能的恢复,以及轴突的修复与和再生^[4],但具体机制不详。本研究采用夹脊电针和神经松动术对坐骨神经损伤的新西兰家兔进行干预,旨在探讨夹脊电针结合神经松动术对兔坐骨神经损伤的作用机制,以期为临床应用该方法提供理论依据。

材料和方法

一、实验动物及分组

经黑龙江中医药大学附属第二医院医学伦理学会批准,本研究选取健康新西兰家兔 180 只(由沈阳万类生物科技有限公司提供),年龄 7~8 月,体重 2.6~3.8 kg,雌雄各半,采用随机数表法分为正常对照组、模型对照组、夹脊电针组、神经松动术组、夹脊电针结合神经松动术组,每组新西兰家兔 36 只。每组新西兰家兔再按取材时间点分为治疗 1 周、2 周、4 周后 3 个亚组,每个亚组新西兰家兔 12 只。5 组新西兰家兔均依据实验动物管理和保护的相关规定单笼饲养和取材(安乐死),对于意外死亡的动物不予纳入,同时补充新的动物入组。

二、方法

(一)模型制备

模型对照组、夹脊电针组、神经松动术组、夹脊电针结合神经松动术组 4 组新西兰家兔均以 10%水合氯醛(4 ml/kg 体重)腹腔注射麻醉,左股部手术区域常

规备皮、消毒、铺巾。取左股后正中作 1.0 cm 切口,依次剥离皮肤和筋膜,游离并充分暴露坐骨神经股部后行坐骨神经钳夹术^[5],将直头止血钳的头端用输液器滴管套好,垂直深入并对神经干上全齿,时长为 5 min 的钳夹,造成约 2 mm 的损伤,钳夹处肉眼即可观察到损伤处神经纤维断裂,神经扁平且呈透明。损伤远端以 9-0 无损伤缝合线作一标记,逐层缝合。参与造模的新西兰家兔均于造模成功后肌肉注射青霉素,每日 2 次,每次 40 万 U,连续注射 3 d。造模成功标准:行为学观察显示家兔活动量减少,患肢动作减少,出现足背拖地现象,足尖上抬不能,出现足下垂现象,身体重心明显偏移,前行主要靠臀部肌肉发力^[6]。

(二) 干预方法

参照 Wang 等^[6]的研究方法对 5 组新西兰家兔进行干预。

1. 正常对照组和模型对照组干预方法:不做任何干预,与其余各组于相同的环境下常规饲养。

2. 神经松动术组干预方法:于造模成功后第 3 天将新西兰家兔取自然体位固定于实验台上,使左下肢悬空于实验台外。操作者将髋关节固定为外展 45° 位,股骨与胫骨夹角为 30°,沿着坐骨神经走行迅速将膝关节伸展至 130°,然后放松还原至起始体位。每次操作时间 1 s,放松 5 s,每组 10 次,每日 1 组,每周治疗 6 d,连续治疗 4 周。

3. 夹脊电针组干预方法:于造模成功后第 3 天将兔取俯卧位固定于实验台上,采用贵州产长 25 mm,直径 0.25 mm 的无菌毫针,在兔 L₄-L₆ 棘突旁双侧取穴,直刺深度约 0.5 cm,接常州产 KWD-808I 脉冲电针治疗仪,选取疏密波,如见家兔背部针颤动即表明电流强度合适,每次 30 min,每天 1 次,每周治疗 6 d,连续治疗 4 周。

4. 夹脊电针结合神经松动术组干预方法:每日先行夹脊电针治疗(方法同夹脊电针组),然后行神经松动术治疗(方法同神经松动术组),连续治疗 4 周。

三、检测和评估指标

(一) 行为学评估

于治疗 1、2、4 周后采用趾张反射评分^[7]和改良的 Tarlov 评分^[8]评定 5 组大鼠新西兰家兔的下肢功能恢复情况。

1. 趾张反射评分^[7]:操作者捏住新西兰家兔颈部皮肤,将兔提离地面,迅速使其下降但不让其着地,观察患侧脚趾张开情况,1 级(即 1 分)为脚趾张开完全不可见;2 级(即 2 分)为仅可见轻度脚趾分开;3 级(即 3 分)为明显可见脚趾分开(但幅度仍低于正常水平);4 级(即 4 分)为脚趾完全张开达到正常水平。

2. 改良的 Tarlov 评分^[8]:将新西兰家兔放于操作

台上,用针灸针对兔踝部进行针刺,观察兔子的反应;再将兔子放在宽敞的实验室地面上,让其自由行走观察步态。评分标准:0 分为肢体完全瘫痪,针刺无反应;1 分为针刺后可见轻微反应;2 分为损伤侧后肢所有关节有自主运动,被动使足部屈曲时无抵抗;3 分为被动使足部屈曲时有明显抵抗,但走路步态不稳;4 分为行走步态正常。

(二) 聚合酶链反应检测和免疫印迹检测

于治疗 1、2、4 周后,每组均抽取 12 只新西兰家兔进行取材,禁食、禁水 12 h 后采用 10% 水合氯醛 4 ml/kg 体重腹腔注射麻醉,暴露颈动脉,在两端用止血钳夹住,插入套管,然后放松近心端的钳子,轻轻压迫胸部,放血处死。取处死新西兰家兔的坐骨神经(以卡压处为中心长度约 2 cm)和相应节段脊髓(L₄-L₆ 段,约 2 cm)组织,收集入冻存管中,置于-80 °C 冰箱中保存 1~2 个月,以备聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)检测和免疫印迹(Western blot)检测。

1. PCR 检测:①试剂——Super M-MLV 反转录酶(北京 BioTeke 公司), RNase inhibitor(北京 Bio Teke 公司), Powder 琼脂糖(法国 Biowest 公司), 50×TAE(美国 Amresco 公司), 2×Power Taq PCR MasterMix(北京 Bio Teke 公司), TRIpure(北京 Bio Teke 公司)。②引物——由生工生物工程(上海)有限公司合成,引物序列如下——Rac1F 为 5'-GAA GAT TAT GAC AGG TTA CGG C-3'; Rac1R 为 5'-CTC CTT CAG TTT CTC AAT CGT G-3'。③检测方法——用 TRIpure 试剂提取样本总核糖核酸,使用紫外分光光度计测定各样本中核糖核酸的浓度。在冰浴的无核酸酶离心管中加入多聚胸腺嘧啶[oligo(dT)] 151 μl, random 1 μl 和双蒸水(distillation-distillation H₂O, ddH₂O)至总反应体系为 12.5 μl 的反应混合物,将所得核糖核酸样本进行逆转录,合成对应的互补脱氧核糖核苷酸(complementary DNA, cDNA),经 70 °C 加热 5 min 后迅速置于冰上冷却 2 min,然后行简短离心收集反应液后加入三磷酸脱氧核糖核苷(deoxy-ribonucleoside triphosphate, dNTP)(2.5 mM each) 2 μl, 5×Buffer 4 μl, RNase inhibitor 0.5 μl, 轻轻用移液器混匀;25 °C 温浴 10 min, 42 °C 温浴 50 min;80 °C 加热 10 min 后终止反应,将最后得到的 20 μl cDNA 样本置于-20 °C 保存或用于下游实验。循环条件为,95 °C, 5 min, 95 °C, 15 s, 52 °C, 20 s, 72 °C, 30 s, 共 36 个循环,25 °C, 5 min。PCR 产物电泳用 1.5% 的凝胶,电泳后采用凝胶成像系统对得到的凝胶进行拍照。将最终得到的蛋白条带图片采用 Image J 软件进行分析,得出蛋白灰度值(将正常对照组每个时间点的表达量平均值均定为 1)。

2. Western blot 检测:①试剂——一抗二抗去除液

(Wanleibio 公司), Western 洗涤液 (Wanleibio 公司), SDS - PAGE 电泳液 (干粉) (Wanleibio 公司), SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 (Wanleibio 公司), ECL 发光液 (Wanleibio 公司), 预染蛋白分子量标准 (Fermentas 公司), PVDF 膜 (Millipore 公司), Racl antibody (Wanleibio 公司), 羊抗兔 IgG-HRP (Wanleibio 公司), 内参抗体 β -actin (Wanleibio 公司)。

②检测方法——首先对蛋白质抽提, 提前将裂解液置于室温融化, 估算得出实验所用的体积进行分装, 并混入分装体积 1% 的苯甲磺酰基氟化物 (phenylmethylsulfony fluoride, PMSF) 备用。根据每个样本的质量和体积加入相应体积的裂解样本, 冰上静置 5 min 后以 12 000 r/min, 4 ℃, 离心 10 min (离心半径 5 cm), 分离上清为所得的蛋白质抽提物。进行蛋白质定量, 标准曲线制备。将 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 的兔血清白蛋白 (rabbit serum albumin, RSA) 蛋白标准液按照 0、1、2、4、8、12、16、20 μl 的体积分装于酶标板各孔, 剩余体积用磷酸盐缓冲盐水 (phosphate buffer saline, PBS) 缓冲液补齐至 20 μl 。蛋白质定量 (bicinchoninic acid, BCA) 法, A 液 : B 液体积比为 50 : 1, 按每孔 200 μl 将配制好的工作液加入各孔中, 充分混匀进行反应。数据读取方法为, 提前 15 min 启动酶标仪预热, 将酶标板置于载台上, 设定读取波长为 570 nm 进行读取, 记录。以标准蛋白浓度和对应吸光值绘制标准曲线, 计算样本蛋白浓度, 并乘以稀释倍数, 即为样本的蛋白浓度。组装好电泳装置后进行聚丙烯酰胺凝胶制备, 蛋白上样液制备十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)。准备转印, 制备“海绵-滤纸-膜-胶-滤纸-海绵”的“三明治”模型, 将“三明治”铺好后, 电压 80 V 转印 1.5 h。进行封闭、孵育一抗、二抗, 孵育二抗后的聚偏氟乙稀 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜从杂交袋中取出, 浸入洗涤缓冲液中, 摇床摇动 5 min, 重复 6 次, 将 PVDF 背面的水分用滤纸吸干, 平铺于保鲜膜上, 均匀洒上电化学发光 (electrochemi-luminescence, ECL) 液, 静置 5 min, 用另一张保鲜膜覆盖并赶出多余液体, 转入暗盒在暗室中曝光。抗体剥脱。孵育内参抗体、二抗, 进行 ECL 底物发光操作, 将最终得到的蛋白条带图片采用 Image J 软件进行分析, 得出蛋白灰度值 (将正常对照组每个时间点的表达量平均值均定为 1)。

四、统计学分析

采用 SPSS 10.0 版统计学软件对本研究所得数据进行分析, 所有数据用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用方差分析, 两两比较采用最小显著性差异法 (least-significant difference, LSD) 检测, 组间秩和比较用 Kruskal-Wallis 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、行为学评估

治疗后 1、2、4 周后, 夹脊电针组、神经松动术组和夹脊电针结合神经松动术组新西兰家兔的坐骨神经功能均优于模型对照组同时间点, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 但均弱于正常对照组同时间点, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$); 且夹脊电针结合神经松动术组各时间点的坐骨神经功能均优于夹脊电针组和神经松动术组同时间点, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 详见表 1-3。

表 1 5 组新西兰家兔治疗 1 周后坐骨神经功能比较 (只)

组别	只数	趾张反射评分				改良的 Tarlov 评分				
		1分	2分	3分	4分	0分	1分	2分	3分	4分
正常对照组	12	0	0	1	11	0	0	0	1	11
模型对照组	12	10	2	0	0	9	3	0	0	0
夹脊电针组	12	4	8	0	0	4	5	2	1	0
神经松动术组	12	4	4	4	0	3	4	4	1	0
夹脊电针结合神经松动术组	12	1	3	4	4	1	5	4	2	0

注: 经秩和检验, 夹脊电针组、神经松动术组和夹脊电针结合神经松动术组的趾张反射评分和改良的 Tarlov 评分与模型对照组和正常对照组比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 且夹脊电针结合神经松动术组的趾张反射评分和改良的 Tarlov 评分与夹脊电针组和神经松动术组比较, 差异亦均有统计学意义 ($P < 0.01$)

表 2 5 组新西兰家兔治疗后 2 周后坐骨神经功能比较 (只)

组别	只数	趾张反射				改良 Tarlov 评分				
		1分	2分	3分	4分	0分	1分	2分	3分	4分
正常对照组	12	0	0	0	12	0	0	0	0	12
模型对照组	12	8	3	1	0	3	7	2	0	0
夹脊电针组	12	4	2	6	0	2	4	4	2	0
神经松动术组	12	3	5	1	3	0	1	6	4	1
夹脊电针结合神经松动术组	12	0	2	3	7	0	2	3	1	6

注: 经秩和检验, 夹脊电针组、神经松动术组和夹脊电针结合神经松动术组的趾张反射评分和改良的 Tarlov 评分与模型对照组和正常对照组比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 且夹脊电针结合神经松动术组的趾张反射评分和改良的 Tarlov 评分与夹脊电针组和神经松动术组比较, 差异亦均有统计学意义 ($P < 0.01$)

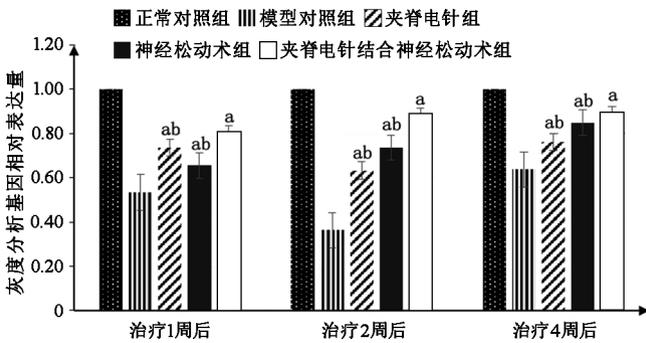
表 3 5 组新西兰家兔治疗后 4 周后坐骨神经功能比较 (只)

组别	只数	趾张反射				改良 Tarlov 评分				
		1分	2分	3分	4分	0分	1分	2分	3分	4分
正常对照组	12	0	0	0	12	0	0	0	0	12
模型对照组	12	2	6	3	1	2	0	4	4	2
夹脊电针组	12	1	3	4	4	0	0	4	5	3
神经松动术组	12	0	2	3	7	0	0	4	5	3
夹脊电针结合神经松动术组	12	0	0	3	9	0	0	3	1	8

注: 经秩和检验, 夹脊电针组、神经松动术组和夹脊电针结合神经松动术组的趾张反射评分和改良的 Tarlov 评分与模型对照组和正常对照组比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 且夹脊电针结合神经松动术组的趾张反射评分和改良的 Tarlov 评分与夹脊电针组和神经松动术组比较, 差异亦均有统计学意义 ($P < 0.01$)

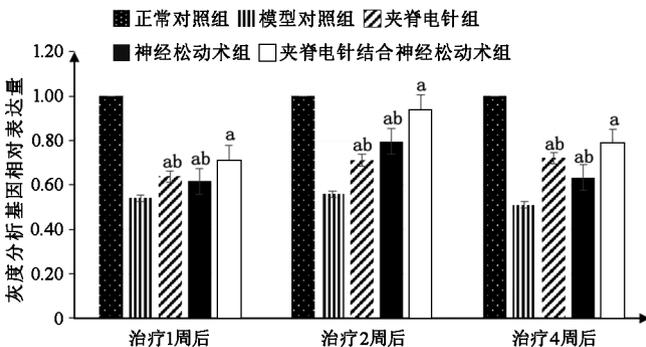
二、PCR 检测 Rac1mRNA 的表达

经 PCR 灰度分析,治疗后 1、2、4 周后,夹脊电针组、神经松动术组和夹脊电针结合神经松动术组节段脊髓和坐骨神经中 Rac1mRNA 的表达量均高于模型对照组同时时间点,但均低于正常对照组同时时间点,差异均有统计学意义($P<0.01$),且夹脊电针结合神经松动术组节段脊髓和坐骨神经中 Rac1mRNA 的表达量高于夹脊电针组和神经松动术组同时时间点,差异均有统计学意义($P<0.01$),详见图 1-2。



注:与模型对照组和正常对照组比较,^a $P<0.01$;与夹脊电针结合神经松动术组比较,^b $P<0.01$

图 1 5 组新西兰家兔不同时间点脊髓节段 Rac1 mRNA 表达的比较

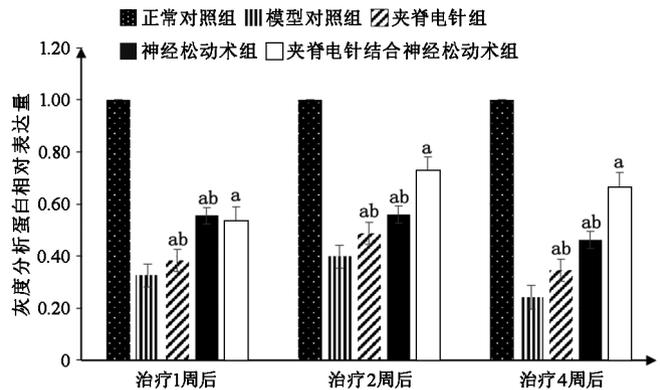
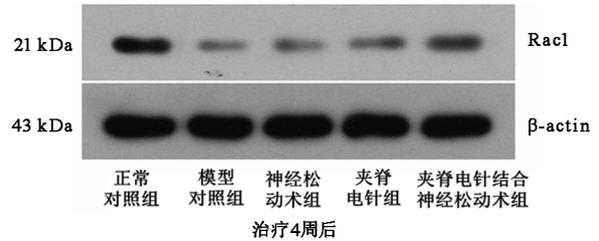
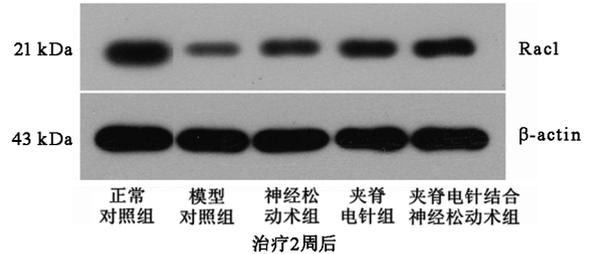
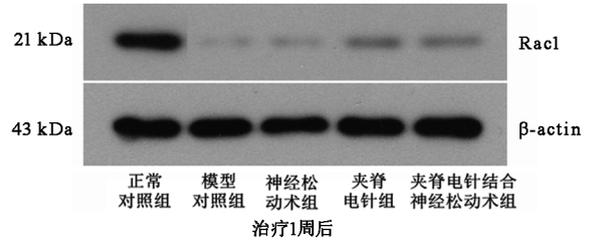


注:与模型对照组和正常对照组比较,^a $P<0.01$;与夹脊电针结合神经松动术组比较,^b $P<0.01$

图 2 5 组新西兰家兔不同时间点坐骨神经 Rac1 mRNA 表达的比较

三、Western blot 检测 Rac1 蛋白的表达

经 Western blot 灰度分析,治疗 1、2、4 周后,夹脊电针组、神经松动术组和夹脊电针结合神经松动术组节段脊髓 Rac1 蛋白的表达量均高于模型对照组同时时间点,但均低于正常对照组同时时间点,差异均有统计学意义($P<0.01$)。治疗 1 周后,夹脊电针结合神经松动术组节段脊髓 Rac1 蛋白的表达量显著高于夹脊电针组,差异有统计学意义($P<0.01$),但与神经松动术组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。治疗 2、4 周后,夹脊电针结合神经松动术组节段脊髓 Rac1 蛋白的表达量显著高于夹脊电针组和神经松动术组同时时间点,差异均有统计学意义($P<0.01$),详见图 3。



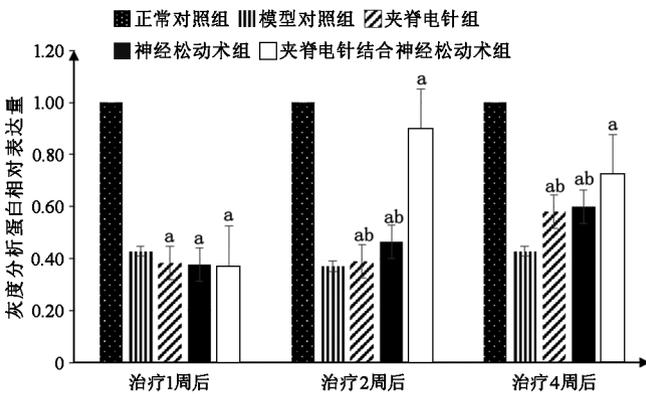
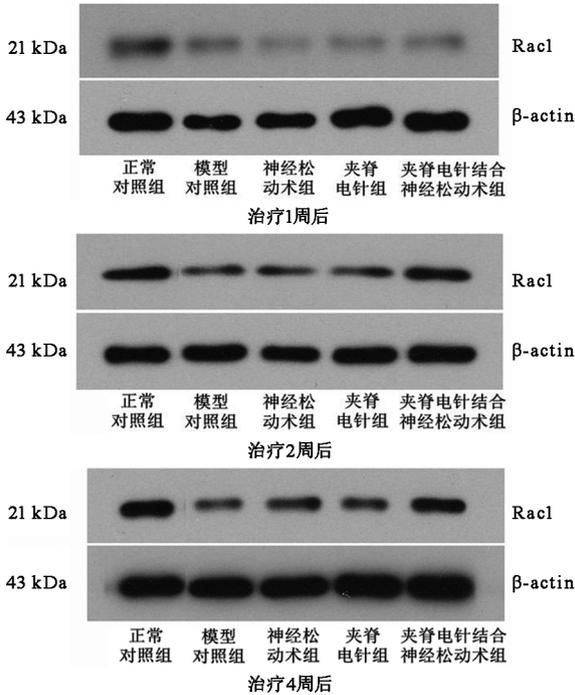
注:与模型对照组和正常对照组比较,^a $P<0.01$;与夹脊电针结合神经松动术组比较,^b $P<0.01$

图 3 5 组新西兰家兔不同时间点脊髓节段 Rac1 蛋白表达的比较

经 Western blot 灰度分析,治疗后 1 周后,夹脊电针组、神经松动术组和夹脊电针结合神经松动术组坐骨神经中 Rac1 蛋白的表达量均低于模型对照组和正常对照组,差异均有统计学意义($P<0.01$)。治疗后 2、4 周后,夹脊电针组、神经松动术组和夹脊电针结合神经松动术组坐骨神经中 Rac1 蛋白的表达量均高于模型对照组同时时间点,低于正常对照组同时时间点,差异均有统计学意义($P<0.01$),且夹脊电针结合神经松动术组坐骨神经中 Rac1 蛋白的表达量显著高于夹脊电针组和神经松动术组同时时间点,差异均有统计学意义($P<0.01$),详见图 4。

讨 论

本研究结果显示,夹脊电针结合神经松动术可促



注:与模型对照组和正常对照组比较,^a*P*<0.01;与夹脊电针结合神经松动手术组比较,^b*P*<0.01

图 4 5 组新西兰家兔不同时间点坐骨神经 Rac1 蛋白表达的比较

进坐骨神经损伤后兔行为学变化以及损伤的坐骨神经和相应脊髓节段的 Rac1 的蛋白及其 mRNA 的表达。该结果提示,夹脊电针结合神经松动手术可改善损伤的坐骨神经功能,促进 Rac1 mRNA 及蛋白的表达,调节树突的形态^[9],进而促进神经生长^[10]。

夹脊穴作为临床中应用较广的经外奇穴,可治疗的疾病种类多且疗效确切。夹脊穴的深层分布有交感神经干、交感神经椎旁节及其与脊神经相联系的灰、白交通支,交感神经干交通支与脊神经的连接处在体表的投影同夹脊穴存在密切的联系^[11]。同时加入电刺激,选用疏密波进行输出,可防治单一波形存在耐受现象,促进局部代谢、胞浆流运输、神经根周围组织对营养汲取^[12]。研究表明,周围神经损伤后神经细胞的凋亡不单单发生于受损部位^[13-14],其相应脊髓节段的神经细胞也会发生凋亡^[15]。李晓宁等^[16]在对急性脊髓

损伤大鼠进行夹脊电针的治疗过程中发现,夹脊电针可以降低细胞凋亡数量。楚佳梅等^[17]采用夹脊电针治疗脊髓损伤的实验研究结果显示,夹脊电针通过拮抗内生性损伤电流而阻止 Ca⁺内流,保持膜结构,促进轴突再生。本研究中,夹脊电针组经治疗后,Rac1 mRNA 和蛋白表达量均高于模型组,说明夹脊电针对周围神经损伤后的轴突再生有积极作用,这与单宝枝等^[18]在电针治疗周围神经损伤治疗后的临床观察研究结果相似。

神经松动手术在周围神经损伤的患者中应用,其原理关键在于改善神经的血供。神经松动手术可降低神经张力,神经张力过高时,易因外界的刺激继而产生疼痛或麻木症状,故神经松动手术目前被广泛应用于周围神经损伤的治疗^[19]。本课题组的前期实验表明,采用神经松动手术将神经拉长约 9%,有利于神经再生并减少肌肉萎缩^[6]。因此,本研究采用夹脊电针结合神经松动手术来促进周围神经损伤的修复。施加加等^[20]将神经松动手术应用于腰间盘突出所致的坐骨神经痛的治疗,发现其可对人体的坐骨神经及其分支进行内部相对的滑动与延展,达到缓解神经内部压迫,改善微循环和神经冲动传递,恢复其生理功能等作用。同时,神经松动手术在坐骨神经的靶组织修复上有正向意义,有研究发现,神经松动手术可促进下肢感觉及运动的康复^[21]。本研究结果显示,神经松动手术组经治疗后,Rac1 mRNA 及蛋白表达量均高于模型对照组,该结果说明,神经松动手术可促进周围神经损伤后的轴突再生,这与课题组的前期采用神经松动手术治疗臂丛神经损伤的临床观察研究结果一致^[6]。

有研究证实^[22],夹脊电针可保护神经细胞进而改善功能,该研究指出,神经松动手术可促进受损神经的血供和轴突的生长,具有外周效应,二者相互促进,可起到事半功倍的效果。本研究中,治疗 4 周后,夹脊电针结合神经松动手术组行为学评分、节段脊髓和坐骨神经样本中 Rac1 mRNA、蛋白的表达量均优于夹脊电针组和神经松动手术组,这与本课题组前期的实验结果一致^[13]。

综上所述,夹脊电针结合神经松动手术可调整失衡的蛋白 Rac1 的表达,从而促进周围神经损伤后轴突再生,改善周围神经损伤后的运动功能障碍。本课题组认为,在 Rac1 对于轴突再生机制的探索中,Rac1 可能是通过 F-actin 的动态变化来调控神经元的形态,因此本课题组将进一步探究 F-actin 在细胞骨架的变化及其在调控神经元形态中的变化。

参 考 文 献

[1] Du B, Ding YQ, Xiao X, et al. CD4+ αβ T cell infiltration into the

- leptomeninges of lumbar dorsal roots contributes to the transition from acute to chronic mechanical allodynia after adult rat tibial nerve injuries[J]. *J Neuroinflammation*, 2018, 15 (1): 81. DOI: 10.1186/s12974-018-1115-7.
- [2] 肖艳归. 鸟苷酸交换因子 Dock4 在神经突分化和发育中的功能及作用机制研究[D]. 广州:暨南大学, 2013.
- [3] Zhang B. Rho GDP dissociation inhibitors as potential targets for anti-cancer treatment[J]. *Drug Resist Updat*, 2006, 9(3):134-141. DOI: 10.1016/j.drug.2006.06.001.
- [4] 刘长辉. 夹脊电针结合康复训练治疗上肢周围神经损伤的临床观察[D]. 哈尔滨:黑龙江中医药大学, 2012.
- [5] 王太一, 韩子玉. 实验动物解剖图谱[M]. 辽宁:辽宁美术出版社, 2000:291.
- [6] Wang Y, Ma M, Tang Q, et al. The effects of different tensile parameters for the neurodynamic mobilization technique on tricipital muscle wet weight and MuRf-1 expression in rabbits with sciatic nerve injury[J]. *J Neuroeng Rehabil*, 2015, 12 (1): 1-7. DOI: 10.1186/s12984-015-0034-4.
- [7] Schmitz HC, Beer GM. The toe-spreading reflex of the rabbit revisited-functional evaluation of complete peroneal nerve lesions. [J] *Lab Anim*, 2001;35(4):340-345 DOI: 10.1258/0023677011911930.
- [8] Shen J, Zhou CP, Zhong XM, et al. MR neurography: T1 and T2 measurements in acute peripheral nerve traction injury in rabbits [J]. *Radiology*, 2010;254(3):729-738 DOI:10.1148/radiol.09091223.
- [9] Tan AM, Chang YW, Zhao P, et al. Rac1-regulated dendritic spine remodeling contributes to neuropathic pain after peripheral nerve injury[J]. *Exp Neurol*, 2011, 232(2):222-233. DOI:10.1016/j.expneurol.2011.08.028.
- [10] Jaffe A B, Hall A. Rho GTPases: biochemistry and biology[J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2005, 21(1):247. DOI: 10.1146/annurev.cellbio.21.020604.150721.
- [11] 张琦. 夹脊电针治疗腰椎间盘突出症的临床研究及其对模型兔退变腰椎间盘 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的影响[D]. 武汉:湖北中医药大学, 2013.
- [12] 王茜. 夹脊电针结合神经松动手术对兔坐骨神经损伤后轴突修复与再生的影响[D]. 哈尔滨:黑龙江中医药大学, 2014.
- [13] 董亮艳, 李婷, 拓炜, 等. 经皮神经肌肉电刺激治疗周围性面瘫患者 36 例的疗效观察[J]. *中华物理医学与康复杂志*, 2017, 39(3). DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2017.03.016.
- [14] Remacle AG, Hullugundi SK, Dolkas J, et al. Acute- and late-phase matrix metalloproteinase (MMP)-9 activity is comparable in female and male rats after peripheral nerve injury[J]. *J Neuroinflammation*, 2018, 15(1):89. DOI:10.1186/s12974-018-1123-7.
- [15] Lu XM, Shu YH, Qiu CH, et al. Protective effects and anti-apoptotic role of nerve growth factor on spinal cord neurons in sciatic nerve-injured rats[J]. *Neurological Research*, 2014, 36(9):84-823. DOI: 10.1179/1743132814Y.0000000333.
- [16] 李晓宁, 吴磊, 迟蕾, 等. 不同治疗周期夹脊电针对急性脊髓损伤大鼠运动功能及细胞凋亡的影响[J]. *针刺研究*, 2016, 41(6):492-496. DOI:10.13702/j.1000-0607.2016.06.003.
- [17] 楚佳梅, 范文双. 夹脊电针治疗大鼠脊髓损伤的实验研究[J]. *中华中医药学刊*, 2003, 21(3):407-408.
- [18] 单宝枝, 邵水金. 电针治疗周围神经损伤的临床观察[J]. *上海针灸杂志*, 1999, 18(2):16-17.
- [19] 裴飞, 王艳. 周围神经松动手术的研究进展[J]. *中国康复*, 2012, 27(6):462-464. DOI:10.3870/zgkf.2012.06.027.
- [20] 施加加, 刘尊武, 蒋丽琴, 等. 神经松动手术对腰椎间盘突出症坐骨神经痛的疗效[J]. *中国康复理论与实践*, 2013, 19(8):759-761. DOI:10.3969/j.issn.1006-9771.2013.08.012.
- [21] Liu D, Mi D, Zhang T, et al. Tubulation repair mitigates misdirection of regenerating motor axons across a sciatic nerve gap in rats: [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1). DOI: 10.1038/s41598-018-21652-y.
- [22] 李晓宁, 单筱淳, 吴磊, 等. 夹脊电针联合甲基强的松龙(MP)对 ASCI 大鼠脊髓组织病理形态学影响的时效关系实验研究[J]. *中国中医急症*, 2017, 26(6):941-943. DOI: 10.3969/j.issn.1004-745X.2017.06.001.

(修回日期:2018-12-01)

(本文编辑:阮仕衡)

• 外刊撷英 •

Dynamic balance and concussion

BACKGROUND AND OBJECTIVE The Centers for Disease Control and Prevention estimates that up to 3.8 million concussions occur annually in the United States. Studies have shown that a history of concussion increases an athlete's risk of sustaining a subsequent concussion. This study investigated the association between dynamic balance performance and concussion injury.

METHODS Subjects were 109 elite Irish rugby players. All participants underwent a baseline Y Balance Test (YBT), with an inertial sensor. The outcome variable of interest was the diagnosis of concussion during the ensuing season, with that diagnosis made using the Head Injury Assessment Tool (HIA) in compliance with the world rugby guidelines. Recorded for each player was a self reported concussion history, playing position, age group and dynamic balance variables.

RESULTS At baseline, 40% of the players reported of history of concussion, while 19.3% of the players sustained a concussion during the study season. There was no significant difference in baseline testing results between those who had a history of concussion and those who did not. Those who sustained a new concussion demonstrated significantly worse dynamic balance when reaching in the anterior direction, as compare to the nonconcussed group. A regression model revealed that, when controlling for concussion history, those with poor balance performance were at a 3.63 greater risk of sustaining a concussion, as compared with those with optimal balance performance.

CONCLUSION This study of elite rugby players found an association between reduced dynamic balance performance and the risk of sustaining another concussion.

【摘自:Johnston W, O'Reilly M, Duignan C, et al. Association of dynamic balance with sports-related concussion. *Am J Sport Med*, 2019, 47(1): 197-205.】