

夹脊穴针刺联合低频电刺激 对脊髓损伤大鼠自噬相关因子及膀胱功能的影响

李格格¹,董宝强¹,焦政²,马铁明¹,陈怡然¹,王树东¹,林星星¹,
王列¹,田辉¹,刘玉丽¹,张淑慧¹,王成龙¹,胡哲¹,马俊杰¹

(1. 辽宁中医药大学针灸推拿学院,辽宁 沈阳 110847;2. 辽宁中医药大学附属医院,辽宁 沈阳 110032)

摘要:目的 观察夹脊穴针刺联合低频电刺激对T7脊髓打击伤大鼠自噬相关因子表达的影响,并探讨其影响膀胱功能的机制。方法 50只雌性SD大鼠随机分为空白组(K)、假手术组(J)、模型组(M)、低频组(D)和低频联合针刺组(DZ),每组10只。D组Allen's打击伤后接受50 Hz低频电刺激治疗,1次/d,每次20 min,连续治疗7 d;DZ组在每日低频电刺激治疗后10 min,直刺夹脊穴。采用尿动力学法检测治疗前后膀胱最大容量的差异;透射电镜观察脊髓组织线粒体自噬情况;免疫荧光法检测微管相关蛋白1A/1B轻链3B(microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B, LC3B)和分选体蛋白1(sequestosome 1, p62)的表达;免疫组化法检测神经生长因子(nerve growth factor, NGF)和酪氨酸蛋白激酶受体A(tyrosine kinase A, TrKA)的表达;蛋白质印迹法检测脊髓组织磷脂酰肌醇3-激酶(phosphatidylinositol-3-Kinase, PI3K)信号通路相关蛋白,LC3B和p62的表达。结果 K组和J组脊髓组织神经细胞核结构完整、线粒体形态正常;M组核膜不清楚、线粒体空泡伴有自噬;D组核膜形态无差异,空泡化线粒体伴有自噬表现;而与M组相比,DZ组核膜形态和线粒体空泡方面无差异,但无明显自噬。与K组相比,J组治疗前最大膀胱容量、治疗后最大膀胱容量、治疗前后膀胱容量差值、NGF、TrKA、PI3K、磷酸化蛋白激酶B(phosphorylated protein kinase B, p-AKT)/蛋白激酶B(Protein Kinase B, AKT)、磷酸化哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(phosphorylated mammalian target of rapamycin, p-mTOR)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)、LC3B和p62表达没有统计学意义($P>0.05$);与J组相比,M组治疗前最大膀胱容量、治疗后最大膀胱容量、治疗前后膀胱容量差值,LC3B表达明显升高($P<0.01, P<0.05$),NGF、TrKA、PI3K、p-AKT/AKT、p-mTOR/mTOR、p62表达显著下降($P<0.01$);与M组相比,D组治疗后最大膀胱容量与LC3B表达显著下降($P<0.01$)、治疗前后膀胱容量差值、NGF($P<0.05$)、TrKA($P<0.05$)、PI3K、p-AKT/AKT、p-mTOR/mTOR、p62明显升高($P<0.01$);与M组相比,DZ组治疗后最大膀胱容量与LC3B表达显著下降($P<0.01$),治疗前后膀胱容量差值、NGF、TrKA、PI3K、p-AKT/AKT、p-mTOR/mTOR、p62表达显著上调($P<0.01$);而DZ组与D组相比,治疗前最大膀胱容量、TrKA、p-mTOR/mTOR差异无统计学意义($P>0.05$),但是治疗后最大膀胱容量与LC3B表达显著下降($P<0.01$),并且治疗前后膀胱容量差值、NGF、PI3K、p-AKT/AKT、p62表达明显增加($P<0.01, P<0.05$)。结论 针刺夹脊穴联合低频电刺激可促进脊髓神经元中NGF及其受体TrKA增殖,通过调节下游PI3K/AKT/mTOR通路有效抑制脊髓损伤后的神经细胞过度自噬反应,保护脊髓神经元,使脊髓自主神经功能得到了重塑,进而显著改善大鼠脊髓损伤伤休克期膀胱功能。

关键词:夹脊穴;针刺;低频电刺激;自噬;磷脂酰肌醇3-激酶

中图分类号:R245.97

文献标志码:A

文章编号:1673-7717(2024)11-0075-11

Effect of Acupuncture at Jiaji Acupoints Combined with Low-Frequency Electrical Stimulation on Autophagy-Related Factors and Bladder Function in Rats with Spinal Cord Injury

LI Gege¹, DONG Baoqiang¹, JIAO Zheng², MA Tieming¹, CHEN Yiran¹, WANG Shudong¹, LIN Xingxing¹,
WANG Lie¹, TIAN Hui¹, LIU Yuli¹, ZHANG Shuhui¹, WANG Chenglong¹, HU Zhe¹, MA Junjie¹

(1. College of Acupuncture and Tuina, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847, Liaoning, China;

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金项目(82305391);辽宁省教育厅青年项目(JYTQN2023461);辽宁中医药大学自然科学类项目(2021LZY017, 2021LZY030)

作者简介:李格格(1994-),女,辽宁沈阳人,讲师,硕士,研究方向:针刺结合现代康复治疗疾病。

通讯作者:董宝强(1969-),男,辽宁本溪人,教授,博士研究生导师,博士,研究方向:针灸推拿结合运动康复防治疾病的机理与临床。E-mail: peterbaoqiang@163.com。

2. Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110032, Liaoning, China)

Abstract: *Objective* To observe the effect of acupuncture at Jiaji acupoints combined with low - frequency electrical stimulation on the expressions of autophagy related factors in T7 spinal cord injury rats, and to explore the mechanism of its effect on bladder function. *Methods* Fifty female SD rats were randomly divided into blank group (K), sham operation group (J), model group (M), low frequency group (D) and low frequency combined acupuncture group (DZ), with 10 rats in each group. Group D was treated with 50 Hz low - frequency electrical stimulation once a day, 20 min for each time, lasting for 7 days after Allen's blow injury. In group DZ, 10 minutes after daily low - frequency electrical stimulation, Jiaji acupoints were directly needled. The difference of maximum bladder volume before and after treatment was detected by urodynamic method. The autophagy of mitochondria in spinal cord was observed by transmission electron microscope. The expressions of LC3B and p62 were detected by immunofluorescence assay. The expressions of nerve growth factor (NGF) and tyrosine kinase A (TrKA) were detected by immunohistochemistry. The expressions of phosphatidylinositol 3 - kinase (PI3K) signaling pathway related proteins, LC3B and p62 were detected by Western blotting. *Results* In group K and group J, the nucleus structure of the spinal cord was intact and the mitochondrial morphology was normal. In group M, the nuclear membrane was unclear and mitochondria vacuole was accompanied by autophagy. There was no difference in the morphology of nuclear membrane in group D, and vacuolated mitochondria were associated with autophagy. Compared with those in group M, there was no difference in nuclear membrane morphology or mitochondrial vacuole in group DZ, but there was no obvious autophagy. Compared with those in group K, there was no significant difference in the maximum bladder volume before treatment, maximum bladder volume after treatment, bladder volume difference before and after treatment, the levels of NGF, TrKA, PI3K, phosphorylated protein kinase B (AKT) protein (p - AKT)/AKT, phosphorylated mammalian target of rapamycin (p - mTOR)/mTOR, LC3B and p62 in group J ($P > 0.05$). Compared with that in group J, LC3B expression was significantly higher in group M in terms of maximum bladder volume before treatment, maximum bladder volume after treatment, and the difference of bladder volume before and after treatment ($P < 0.01$, $P < 0.05$), the expressions of NGF, TrKA, PI3K, p - AKT/AKT, p - mTOR/mTOR and p62 were significantly decreased ($P < 0.01$). Compared with group M, the maximum bladder volume and LC3B expression were significantly decreased in group D after treatment ($P < 0.01$), the difference of bladder volume before and after treatment, the expressions of NGF ($P < 0.05$), TrKA ($P < 0.05$), PI3K, p - AKT/AKT, p - mTOR/mTOR and p62 were significantly increased ($P < 0.01$). Compared with those in group M, the maximum bladder volume and LC3B expression in group DZ were significantly decreased after treatment ($P < 0.01$), the difference of bladder volume, the expressions of NGF, TrKA, PI3K, p - AKT/AKT, p - mTOR/mTOR and p62 before and after treatment were significantly up - regulated ($P < 0.01$). There were no significant differences in maximum bladder volume, or the expressions of TrKA and p - mTOR/mTOR before treatment between group DZ and group D ($P < 0.05$), but the maximum bladder volume and LC3B expression were significantly decreased after treatment ($P < 0.01$), and the difference of bladder volume, the expressions of NGF, PI3K, p - AKT/AKT and p62 were significantly increased before and after treatment ($P < 0.01$, $P < 0.05$). *Conclusion* Acupuncture at Jiaji acupoints combined with low - frequency electrical stimulation can promote the proliferation of NGF and its receptor TrKA in spinal cord neurons, effectively inhibit the excessive autophagy reaction of nerve cells after spinal cord injury by regulating the downstream PI3K/AKT/mTOR pathway, protect spinal neurons, and reconstruct the function of spinal autonomic nerve. It can improve the bladder function during the shock period of spinal cord injury.

Keywords: Jiaji acupoints; acupuncture; low - frequency electrical stimulation; autophagy; phosphatidylinositol 3 - kinase (PI3K)

大多数脊髓损伤 (spinal cord injury, SCI) 是由外伤性脊髓压迫或骨折脱位引起的^[1]。SCI 急性期导致脊髓与较高中枢分离,引起脊髓休克^[2]。脊髓休克时,控制膀胱平滑肌的副交感神经消失,逼尿肌无反应,导致膀胱最大容积增加,膀胱顺应性增加,出现尿潴留症状^[3]。因此,在急性损伤阶段进行神经保护干预至关重要,这些治疗有可能显著促进 SCI 后的长期自主神经功能恢复。神经生长因子 (nerve growth factor, NGF) 不仅对脊髓前角的感觉神经元、交感神经元和运动神经元具有修复作用,而且在 SCI 所致脊髓休克的病理过程中起重要控制作

用^[4]。在 SCI 休克期,损伤脊髓中神经细胞自噬明显激活,自噬水平过度升高,NGF 及其受体酪氨酸蛋白激酶受体 (tyrosine kinase A, TrKA) 水平降低^[5]。研究表明 NGF 可通过激活磷脂酰肌醇 3 - 激酶 (phosphatidylinositol - 3 - kinase, PI3K)/蛋白激酶 B (protein Kinase B, AKT)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 通路调节细胞自噬,保护神经细胞生存^[6]。因此,SCI 后通过有效的治疗增加脊髓内 NGF 的表达,进而激活 PI3K/AKT/mTOR 通路,调控神经细胞自噬,对促进自主神经功能重塑,恢复膀胱功能尤为重

要。本研究探讨了 NGF 调控 SCI 后神经细胞自噬的潜在途径,从而促进 SCI 后神经功能康复。

近年来关于 SCI 的中医治疗试图减少继发性损伤并保护在原发性损伤中存活神经元^[7]。中医学研究表明含 NLR 家族 Pyrin 域蛋白 3(Pyrin domain-containing protein 3 of the NLR family, NLRP3) 的激活是 SCI 后炎症小体激活和炎症反应的关键机制,而 T9-T11 节段夹脊穴电针治疗可通过下调胞嘧啶一磷酸激酶 2(cytosine monophosphate kinase 2, CMPK2) 的表达,抑制 T10 节段 SCI 大鼠 NLRP3 炎症小体的激活,从而改善损伤区的炎症微环境,保护神经元的存活^[8]。同时一些中医辅助疗法如中膺俞针灸在临床上被证明改善 SCI 患者尿潴留症状,恢复自主神经功能疗效显著^[9-10]。研究表明针灸可以通过激活 NGF、脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)、胶质细胞源性神经营养因子(glial cell-derived neurotrophic factor, GDNF) 和 N-钙黏蛋白等相关神经营养因子的逆行转运,促进周围神经轴突萌发^[11]。这表明针灸不仅可以扭转神经系统重构不良的状况,还可以刺激神经系统中神经生长因子等神经营养物质的释放,促进神经功能的恢复。

同样的临床研究表明低频电刺激治疗可以刺激逼尿肌收缩,有效改善 SCI 患者排尿情况,提高患者的膀胱功能^[12]。同时也有研究表明电刺激通过增加以自分泌/旁分泌方式靶向 TrkA 受体的 NGF 表达来介导神经萌芽^[13]。

综上,对于 SCI 后早期针刺以及低频电治疗改善自主神经功能的机制尚不明确。故本研究将观察夹脊穴针刺联合低频电刺激对 SCI 大鼠模型自主神经功能改善的作用,探讨其在脊髓体克期调控神经元自噬的机制,为 SCI 早期提供潜在的有效治疗方法。

1 材料与方法

1.1 实验动物和分组

50 只 SPF 级体质量 220~240 g SD 雌性大鼠,由辽宁长生公司提供。本动物实验由辽宁中医药大学伦理委员会审核(编号:21000042019063)。50 只雌性 SD 大鼠随机分为空白组(K 组)、假手术组(J 组)、模型组(M 组)、低频组(D 组)和低频联合针刺组(DZ 组),每组 10 只。

1.2 主要试剂与仪器

见表 1。

1.3 实验方法

1.3.1 造模方法 腹腔注射 10% 水合氯醛麻醉(0.40 mL/100 g),以第 13 肋为标准,寻找 T7 胸椎棘突,以 T7 胸椎为中心,碘伏消毒,备皮,沿后正中中线切开背部皮肤,用咬骨钳咬除 T7 胸椎和少量椎弓板,暴露脊髓及被膜。自制改良 Allen's^[14] 装置,5 g 砝码通过内径 10.1 mm,长度 10 cm 的管道,抽出穿过管道刻度为 4 cm 孔的铁丝,使砝码从高度 4 cm 自由落下通过撞针撞击 T7 椎板下硬脊膜,损伤直径为 2 mm^[15]。

1.3.2 干预方法 K 组不进行任何处理,J 组仅暴露脊髓组织,不进行打击。M 组 Allen's 打击后不给予特殊治疗。SCI 后 24 h,D 组接受 50 Hz 低频电刺激治疗,治疗部位共 4 个电

极:第 1 组负极放置在耻骨上方的膀胱区,正极放置在第 3 骶骨椎体上;第 2 组正负极片放置于损伤脊髓上下节段的夹脊穴,最大电流强度不超过 50 mA,1 次/d,每次 20 min,连续干预 7 d;DZ 组:24 h 后先给予低频电刺激治疗(治疗方案同 D 组)。10 min 后,使用毫针(0.35 mm×25 mm)直刺双侧 T6、T9、T11 夹脊穴,直刺入约 2 mm,留针 20 min,1 次/d,连续干预 7 d。

表 1 主要试剂与仪器

试剂与仪器名称	厂家
NGF, TrkA	英国 Abcam 公司
LC3B、p62、PI3K、AKT、mTOR、HRP-conjugated goat anti rabbit IgG、HRP-conjugated rabbit anti mouse IgG	武汉三鹰生物
p-AKT、p-mTOR	美国 CST 公司
GAPDH、一抗/二抗稀释液	上海碧云天生物
光学显微镜	日本奥林巴斯 BX53
透射电镜	日本电子 JEM1101
光谱型激光共聚焦显微镜	美国 OLYMPUS
垂直电泳仪、转膜仪	美国 Bio-Rad
华佗牌毫针	苏州医疗用品厂
达佳 6805-A II 电针仪	汕头医用设备厂

1.4 观察指标及检测方法

1.4.1 尿动力学测定 术后第 8 天,人工辅助大鼠排尿后将大鼠固定在手术台上,压力管通过三通管与生物功能测试系统和微灌注泵连接。头皮针经尿道刺入膀胱作为膀胱压力测量管,以 0.1 mL/s 的速度注入生理盐水,当观察到尿道口有液体溢流时,记录注入的生理盐水容量为大鼠的最大膀胱容量。

1.4.2 透射电镜 透射电镜观察脊髓组织的自噬小体。将组织切成 1 mm×1 mm×1 mm 的小块,4% 戊二醛固定 30 min;1% 锇酸氧化 1 h 后,梯度乙醇脱水,100% 丙酮 2×15 min;然后 50% Epon812 包埋剂浸透 2 h,100% Epon812 包埋剂浸透过夜;最后 100% Epon812 包埋剂包埋组织块,60℃ 烤箱聚合 72 h 后超薄切片,厚度为 70 nm,枸橼酸铅染色,电镜下观察脊髓线粒体损伤及自噬小体形成。

1.4.3 免疫组化 石蜡切片脱蜡后用水处理,加入 3% 过氧化氢,室温孵育 8 min。一抗 4℃ 过夜,次日取出复温,摇床磷酸盐缓冲液(Phosphate-Buffered Saline, PBS)洗 5 min×3 次。吸机吸去玻片上多余水分,滴加二抗,在 37℃ 烘箱中放置 30 min,摇床 PBS 洗 5 min×3 次。3,3'-二氨基联苯(3,3'-Diaminobenzidine, DAB)显色,梯度乙醇脱水,二甲苯透明。封片后用光学显微镜拍照,计算每张切片单位面积 NGF、TrkA 阳性细胞表达的平均光密度值并统计。

1.4.4 蛋白质印迹法 使用电泳仪电源调至 80 V 电压电泳 100 min,将 PVDF 膜放置于甲醇中浸泡 1 min,接着用“三明治”夹转印,将电泳仪电源电流调至 250 mA,电转 4 h。封闭液封闭 1 h,孵育一抗在 4℃ 过夜,洗膜 3 次,加入 4 mL 辣根过氧化物酶标记的二抗,增强化学发光(enhanced chemiluminescence, ECL)发光,使用 imageJ 统计蛋白条带的灰度值。

1.4.5 免疫荧光 用 0.3% Triton PBS 稀释的 10% 山羊血清

表2 各组大鼠最大膀胱容量的对比($\bar{x} \pm s$)

单位: mL

组别	n	治疗前	治疗后	治疗前后膀胱容量差值/(d)
空白组(K)	6	1.014 ± 0.107	1.037 ± 0.116	-0.023 ± 0.036
假手术组(J)	6	0.927 ± 0.036	0.937 ± 0.026	-0.010 ± 0.013
模型组(M)	6	4.110 ± 0.165 ^{##△△}	4.023 ± 0.173 ^{##△△}	0.087 ± 0.052 ^{##△△}
低频联合针刺组(DZ)	6	4.114 ± 0.150 ^{##△△}	2.503 ± 0.160 ^{##△△**}	1.611 ± 0.212 ^{##△△***☆}
低频组(D)	6	4.284 ± 0.201 ^{##△△}	3.497 ± 0.277 ^{##△△***☆}	0.786 ± 0.135 ^{##△△***☆}

注:##与K组比较, $P < 0.01$;△△与J组比较, $P < 0.01$;**与M组比较, $P < 0.01$;☆☆与DZ组比较, $P < 0.01$ 。

封闭,于37℃温箱放置30 min。弃掉山羊血清,孵育LC3和p62抗体,4℃过夜。次日于37℃烘箱中孵育同种属二抗1 h,切片清洗3次,加入50μL抗荧光淬灭封片液,即含4',6-二氨基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)密封切片。使用荧光显微镜观察,每张切片选取3个代表区域,统计平均荧光密度。

1.5 统计学分析

采用SPSS 17.0进行统计学分析,统计数据均经正态性检验与方差齐性检验,结果以平均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间相比采用LSD-t检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 最大膀胱容量的比较

治疗前J组与K组的最大膀胱容量未见差异($P > 0.05$);与J组相比,M组显著升高($P < 0.01$);与M组相比,DZ组和D组差异均没有统计学意义($P > 0.05$);与D组相比,DZ组差异没有统计学意义($P > 0.05$)。治疗后,与K组相比,J组的最大膀胱容量和治疗前后膀胱容量差值(d)未见差异($P > 0.05$);与J组相比,M组膀胱容量和治疗前后差值(d)显著升高($P < 0.01$);与M组相比,DZ组和D组膀胱容量均显著降低,治疗前后差值(d)均显著增高($P < 0.01$);与D组相比,DZ组膀胱容量显著降低($P < 0.01$),治疗前后差值(d)均显著增高($P < 0.01$)。见表2。

2.2 透射电镜下脊髓组织形态比较

K组和J组脊髓组织神经细胞核结构完整,核膜清晰,线粒体形态基本正常;与J组相比,M组核膜不清晰,线粒体自噬空泡;与M组相比,D组核膜形态无差异,空泡化线粒体伴有自噬表现;而与M组相比,DZ组核膜形态和线粒体空泡方面无差异,但无明显自噬。见插页XXI图1。

2.3 脊髓中NGF、TrKA表达水平的比较

NGF和TrKA表达主要部位在细胞胞浆和细胞核内,呈棕黄色或褐棕色颗粒。J组与K组NGF和TrKA表达未见差异($P > 0.05$);与J组相比,M组NGF和TrKA表达显著下降($P < 0.01$);与M组相比,DZ组NGF和TrKA表达显著上调($P < 0.01$),D组NGF和TrKA表达上调($P < 0.05$);与D组相比,DZ组NGF表达升高($P < 0.05$),TrKA表达差异没有统计学意义($P > 0.05$)。见插页XXII图2、插页XXIII图3和表3。

2.4 脊髓中PI3K信号通路相关蛋白表达水平的比较

J组与K组PI3K蛋白和AKT、mTOR磷酸化水平没有差异($P > 0.05$);与J组相比,M组PI3K蛋白和AKT、mTOR磷酸

化水平显著下降($P < 0.01$);与M组相比,DZ组、D组PI3K蛋白和AKT、mTOR磷酸化水平均显著上调($P < 0.01$);与D组相比,DZ组PI3K蛋白和AKT磷酸化水平显著升高($P < 0.01$),但mTOR磷酸化水平未见差异($P > 0.05$)。详见图4和表4。

表3 各组大鼠脊髓中NGF、TrKA表达水平的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	NGF	TrKA
空白组(K)	6	621.375 ± 54.255	701.770 ± 26.727
假手术组(J)	6	614.780 ± 43.754	698.174 ± 24.618
模型组(M)	6	473.651 ± 66.564 ^{##△△}	461.207 ± 85.214 ^{##△△}
低频联合针刺组(DZ)	6	597.441 ± 36.070 ^{**}	630.975 ± 66.938 ^{#△**}
低频组(D)	6	545.574 ± 39.440 ^{#△**}	576.011 ± 63.233 ^{##△△**}

注:##与K组比较, $P < 0.05$;##与K组比较, $P < 0.01$;△与J组比较, $P < 0.05$;△△与J组比较, $P < 0.01$;*与M组比较, $P < 0.05$,**与M组比较, $P < 0.01$;☆与DZ组比较, $P < 0.05$ 。

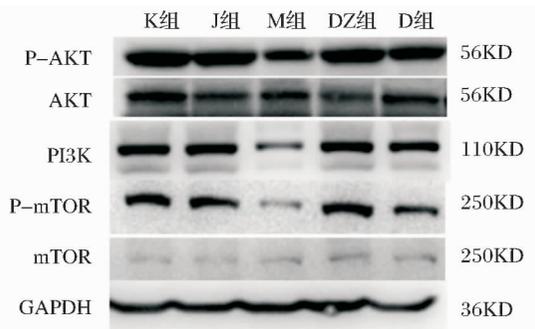


图4 各组大鼠PI3K信号通路相关蛋白表达

2.5 脊髓中LC3B和p62相关蛋白表达水平的比较

微管相关蛋白1A/1B轻链3B(microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B, LC3B)是一个被广泛使用的自噬标记物^[16]。分选体蛋白1(sequestosome 1, p62)由SQSTM1基因编码,是选择性自噬的受体^[17]。结果表明J组与K组LC3B和p62蛋白表达未见差异($P > 0.05$);与J组相比,M组LC3B蛋白表达显著上调,p62蛋白表达显著下降($P < 0.01$);与M组相比,DZ组、D组LC3B蛋白表达均显著下降,p62蛋白表达均显著上调($P < 0.01$);与D组相比,DZ组LC3B蛋白表达显著下降,p62蛋白表达显著增加($P < 0.01$)。见图5和表5。

插页XXIV图6、插页XXV图7可见LC3B和p62在神经细胞胞质中表达,J组与K组LC3B和p62表达未见差异($P > 0.05$);与J组相比,M组LC3B表达上调($P < 0.05$),p62表达显著下降($P < 0.01$);与M组相比,DZ组、D组LC3B表达均显著下降($P < 0.01$),p62表达均显著上调($P < 0.01$);与D组

表 4 各组大鼠脊髓组织内 PI3K、p-AKT、p-mTOR 含量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	PI3K	p-AKT/AKT	p-mTOR/mTOR
空白组(K)	6	1.073 ± 0.024	0.753 ± 0.036	1.099 ± 0.066
假手术组(J)	6	1.068 ± 0.034	0.782 ± 0.034	1.121 ± 0.081
模型组(M)	6	0.487 ± 0.025 ^{##△△}	0.643 ± 0.028 ^{##△△}	0.776 ± 0.035 ^{##△△}
低频联合针刺组(DZ)	6	0.994 ± 0.013 ^{##△△**}	0.788 ± 0.019 ^{**}	1.044 ± 0.040 ^{**}
低频组(D)	6	0.701 ± 0.015 ^{##△△**☆☆}	0.700 ± 0.015 ^{##△△**☆☆}	1.029 ± 0.031 ^{△**}

注:##与K组比较, $P < 0.01$;△与J组比较, $P < 0.05$;△△与J组比较, $P < 0.01$;**与M组比较, $P < 0.01$;☆☆与DZ组比较, $P < 0.01$ 。

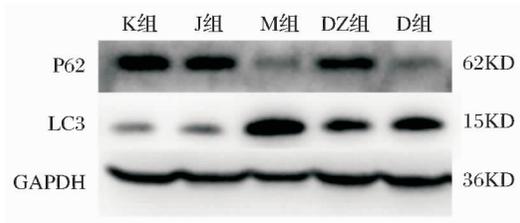


图 5 各组大鼠 LC3B 和 p62 相关蛋白表达

表 5 脊髓组织 LC3B 和 p62 相关蛋白表达水平的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	LC3	p62
空白组(K)	6	0.500 ± 0.009	1.473 ± 0.010
假手术组(J)	6	0.493 ± 0.013	1.472 ± 0.013
模型组(M)	6	1.509 ± 0.020 ^{##△△}	1.033 ± 0.008 ^{##△△}
低频联合针刺组(DZ)	6	0.611 ± 0.017 ^{##△△**}	1.347 ± 0.008 ^{##△△**}
低频组(D)	6	1.099 ± 0.009 ^{##△△**☆☆}	1.093 ± 0.023 ^{##△△**☆☆}

注:##与K组比较, $P < 0.01$;△△与J组比较, $P < 0.01$;**与M组比较, $P < 0.01$;☆☆与DZ组比较, $P < 0.01$ 。

相比,DZ组 LC3B 表达显著下降($P < 0.01$),p62 表达上调($P < 0.05$)。见表 6。

表 6 各组大鼠脊髓组织 LC3B 和 p62 平均光密度比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	LC3	p62
空白组(K)	6	0.608 ± 0.069	0.627 ± 0.045
假手术组(J)	6	0.622 ± 0.284	0.608 ± 0.039
模型组(M)	6	0.969 ± 0.039 ^{##△}	0.362 ± 0.068 ^{##△△}
低频联合针刺组(DZ)	6	0.673 ± 0.043 ^{**}	0.597 ± 0.061 ^{**}
低频组(D)	6	0.776 ± 0.053 ^{##**☆☆}	0.506 ± 0.061 ^{##△△**☆☆}

注:##与K组比较, $P < 0.01$;△与J组比较, $P < 0.05$;△△与J组比较, $P < 0.01$;**与M组比较, $P < 0.01$;☆☆与DZ组比较, $P < 0.05$;☆☆与DZ组比较, $P < 0.01$ 。

3 讨论

SCI 后脊髓休克期由于损伤平面以下的神经功能障碍,导致尿液仍留在膀胱内不能完全排出或排出不足^[18]。从经脉循行探究,“夹脊穴”靠近足太阳膀胱经与督脉,不仅有局部治疗效果,还可以通过刺激来疏通膀胱经气^[19]。本课题组损伤脊髓节段为 T10 与第 7 胸椎体相对应,为了避免损伤部位的二次损伤,选取损伤节段上下的 T6、T9、T11 夹脊穴排刺,不仅通过针刺穴位提振督脉经气,也为神经纤维再生“搭桥铺路”^[20]。有研究认为夹脊穴和背俞穴在同一水平面上,有“位邻气近,经气相通”的特点,相邻两穴配伍,可增加经络运行气血。SCI 导致脊髓损伤平面以下产生运动、感觉功能障碍^[21]。根据脏腑经络理论^[22],T6 夹脊穴与督俞在同一水平面上,具有督俞的功效,督脉的阳气由此输向膀胱经,针刺此穴能够收敛阳气,温通经络,活血通脉;T9 夹脊穴与肝俞相平,肾虚证常取 T9 夹

脊穴,肝肾同源,精血同源,肾为先天之本,主水,肾气能主司和调节全身水液代谢,能调控生尿排尿;又因为夹脊穴靠近膀胱经,具有膀胱经藏津液的相似功效,二者相互协调,优化水液;T11 夹脊穴与脾俞相平,肝主藏血,脾是气血生化之源,两者结合增强气血运行。通过解剖研究发现^[21],交感神经干通过交通支与脊神经的连接点在体表的投影与夹脊穴密切相关,并随脊神经分布到周围器官或脏器,针刺夹脊穴,针尖经竖脊肌沿棘突两侧进入,深达椎体,能够刺激脊神经前支、后支和交感神经干。而针刺夹脊穴刺激下行的神经纤维主要通过脊髓与膀胱相连,负责膀胱的激发和控制排尿的过程。当膀胱内的压力增加或有充盈感时,会触发膀胱壁的感觉神经细胞形成信号,然后通过神经纤维传递给脊髓中的感觉神经元。这些感觉神经元将信号传递给脊髓内的运动神经元,使其通过下行神经纤维传递指令到达膀胱的平滑肌,使其收缩,同时放松膀胱口下的括约肌,从而实现排尿的目的。解剖学表明支配每一夹脊穴的脊神经后支与相邻 1~2 节段的脊神经后支相伴行^[23],因此针刺 T6、T9、T11 夹脊穴,即相当于针刺 T7 夹脊穴,不仅可以调节局部相关的内脏功能,也可刺激其脊髓节段下行的神经纤维进而控制膀胱。结合我们研究结果 DZ 组治疗 7 天显著减少膀胱尿液滞留量,说明低频联合针刺治疗更有助于 SCI 后自主神经功能的恢复。

在中枢神经系统损伤中,神经细胞的过度自噬导致神经元和胶质细胞大量死亡,极大地影响了神经功能恢复^[24]。因此,抑制过度的自噬被提出作为一种合理的策略,以进一步上调神经细胞的存活,保护损伤区域神经元。在自噬过程中,泛素结合蛋白 p62 与泛素化的蛋白质结合^[25],与定位于自噬小体内膜上的 LC3B 蛋白形成复合物,在自噬溶酶体内一同降解^[26],即 p62 蛋白水平与自噬程度呈负相关。这与我们的实验结果相一致,故本研究更进一步证明了低频联合针刺治疗能显著下调神经细胞的过度自噬,促进 SCI 后神经细胞的更多存活。

基础研究表明 mTOR 激酶是两个 mTOR 复合物 mTORC1 和 mTORC2 的组成部分,每个 mTOR 复合物具有不同的蛋白质成分^[27]。PI3K/AKT 是 mTORC1 的上游主要调节通路,参与不同细胞类型的存活和凋亡抑制,而 mTORC1 是自噬的主要负调节因子,因此通过调节 PI3K/AKT/mTOR 通路可以获得有益的结果。而当中枢神经受损时,NGF 的保护作用与激活 PI3K/AKT/mTOR 通路以及自噬相关蛋白的改变有关。研究表明 NGF 可以选择性地与高亲和力受体 TrkA 结合,修复中枢神经系统^[28]。有报道低频电刺激是直接作用于神经元并对脊髓有长期影响的神经调节工具之一^[29],我们的研究结果显示

低频电刺激治疗可以通过介导 NGF 进而诱导 PI3K/AKT/mTOR 信号传导促进神经元存活并阻止导致细胞死亡的过度自噬,然而夹脊穴针刺联合低频电刺激组的结果显示出对神经元起到更大的保护作用。

综上,我们的研究表明夹脊穴针刺联合低频电刺激可调节自噬蛋白表达和 NGF - PI3K/AKT/mTOR 信号通路的表达,有效抑制 SCI 后的神经细胞过度自噬反应,保护脊髓神经元,改善损伤区微环境,使脊髓自主神经功能得到了重塑,进而使 SCI 休克期的膀胱功能得到修复,减少尿潴留症状。本研究组将继续探索针刺联合低频电刺激调节自噬的更深层机制,为临床研究提供更多的参考。

参考文献

- [1] KIRSHBLUM S, SNIDER B, EREN F, et al. Characterizing natural recovery after traumatic spinal cord injury [J]. *J Neurotrauma*, 2021, 38(9): 1267 - 1284.
- [2] RICHARDS J E, HARRIS T, DÜNSER M W, et al. Vasopressors in trauma: a never event? [J]. *Anesth Analg*, 2021, 133(1): 68 - 79.
- [3] JOSHI A D, SHUKLA A, CHAWATHE V, et al. Clean intermittent catheterization in long - term management of neurogenic bladder in spinal cord injury: patient perspective and experiences [J]. *Int J Urol*, 2022, 29(4): 317 - 323.
- [4] WU F Z, WANG P H, WEI X J, et al. Barrier - penetrating liposome targeted delivery of basic fibroblast growth factor for spinal cord injury repair [J]. *Mater Today Bio*, 2023, 18: 100546.
- [5] WANG L, GU S J, GAN J L, et al. Neural stem cells overexpressing nerve growth factor improve functional recovery in rats following spinal cord injury via modulating microenvironment and enhancing endogenous neurogenesis [J]. *Front Cell Neurosci*, 2021, 15: 773375.
- [6] MA L, ZHANG R X, LI D M, et al. Fluoride regulates chondrocyte proliferation and autophagy via PI3K/AKT/mTOR signaling pathway [J]. *Chem Biol Interact*, 2021, 349: 109659.
- [7] HUANG Z H, WANG J Y, LI C, et al. Application of natural antioxidants from traditional Chinese medicine in the treatment of spinal cord injury [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 976757.
- [8] CHEN Y, WU L, SHI M T, et al. Electroacupuncture inhibits NLRP3 activation by regulating CMPK2 after spinal cord injury [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 788556.
- [9] 张淑芹, 李彦杰, 秦合伟, 等. 主刺中髂俞治疗脊髓损伤后尿潴留的临床观察 [J]. *中国中医急症*, 2022, 31(9): 1429 - 1432.
- [10] 何芬, 古柱亮, 哪婧毓, 等. 针灸联合补阳还五汤治疗脊髓损伤后神经源性膀胱的疗效及对尿流动力学影响分析 [J]. *中华中医药学刊*, 2021, 39(4): 224 - 227.
- [11] YANG Y K, RAO C, YIN T L, et al. Application and underlying mechanism of acupuncture for the nerve repair after peripheral nerve injury: remodeling of nerve system [J]. *Front Cell Neurosci*, 2023, 17: 1253438.
- [12] DAIA C, BUMBEA A M, BADIU C D, et al. Interferential electrical stimulation for improved bladder management following spinal cord injury [J]. *Biomed Rep*, 2019, 11(3): 115 - 122.
- [13] LI X L, ZHANG T Y, LI C C, et al. Electrical stimulation accelerates Wallerian degeneration and promotes nerve regeneration after sciatic nerve injury [J]. *Glia*, 2023, 71(3): 758 - 774.
- [14] WU H C, TONG K, LIU X Z, et al. A comparison between two laminectomy procedures in mouse spinal cord injury on Allen's animal model [J]. *J Neurosci Methods*, 2022, 368: 109461.
- [15] 章慧平, 陈忠, 叶章群, 等. 多节段脊髓平面损伤后大鼠神经源性膀胱模型的制备 [J]. *临床外科杂志*, 2007, 15(3): 196 - 197.
- [16] HWANG H J, KIM Y K. The role of LC3B in autophagy as an RNA - binding protein [J]. *Autophagy*, 2023, 19(3): 1028 - 1030.
- [17] KUMAR A V, MILLS J, LAPIERRE L R. Selective autophagy receptor p62/SQSTM1, a pivotal player in stress and aging [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2022, 10: 793328.
- [18] DEWITT - FOY M E, ELLIOTT S P. Neurogenic bladder: assessment and operative management [J]. *Urol Clin North Am*, 2022, 49(3): 519 - 532.
- [19] 张晓丽, 冯琦飏, 王能, 等. 电针华佗夹脊穴 + 中极对脊柱损伤后神经源性尿潴留的治疗作用研究 [J]. *中华中医药学刊*, 2020, 38(8): 170 - 173.
- [20] 冯钰, 肖欣, 袁燕. 基于“温督强肾”思路的中医特色护理在脊髓损伤神经源性膀胱尿潴留的应用研究 [J]. *四川中医*, 2017, 35(10): 200 - 203.
- [21] 谢小男, 董华, 代利利, 等. 针刺夹脊穴治疗杂病验案三则 [J]. *环球中医药*, 2018, 11(12): 1994 - 1996.
- [22] 陈淑渝. 浅谈华佗夹脊穴与脊神经节段性分布的关系 [J]. *内蒙古中医药*, 2010(2): 117.
- [23] 魏玉锁, 赵晓明, 国风琴. 钩活术新夹脊穴腧穴定位的研究 [C]//中国针灸学会经筋诊治专业委员会换届选举大会暨 2016 年学术大会论文集, 北京. 2016: 9 - 12.
- [24] LI Y, LEI Z F, RITZEL R M, et al. Impairment of autophagy after spinal cord injury potentiates neuroinflammation and motor function deficit in mice [J]. *Theranostics*, 2022, 12(12): 5364 - 5388.
- [25] HEGDEKAR N, SARKAR C, BUSTOS S, et al. Inhibition of autophagy in microglia and macrophages exacerbates innate immune responses and worsens brain injury outcomes [J]. *Autophagy*, 2023, 19(7): 2026 - 2044.
- [26] KARPATTHIOU G, DRIDI M, PAPOUDOU - BAI A, et al. The presence of the autophagic markers LC3B and sequestosome 1/p62 in the hydatidiform mole [J]. *Int J Gynecol Pathol*, 2023, 42(3): 301 - 307.
- [27] DELEYTO - SELDAS N, EFEYAN A. The mTOR - autophagy axis and the control of metabolism [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 655731.
- [28] LI Y B, WU F B, ZHOU M K, et al. ProNGF/NGF Modulates Autophagy and Apoptosis through PI3K/Akt/mTOR and ERK Signaling Pathways following Cerebral Ischemia - Reperfusion in Rats [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022: 6098191.
- [29] KARAMIAN B A, SIEGEL N, NOURIE B, et al. The role of electrical stimulation for rehabilitation and regeneration after spinal cord injury [J]. *J Orthop Traumatol*, 2022, 23(1): 2.