

# 芒针治疗对脊髓损伤大鼠 TNF- $\alpha$ 、IL-6 $\beta$ 、IL-1 $\beta$ 、NF-K $\beta$ 表达的影响

## Effects of elongated needle on the expression of TNF- $\alpha$ , IL-6 $\beta$ , IL-1 $\beta$ and NF-K $\beta$ in rats with spinal cord injury

全仁夫<sup>1\*</sup> 李长明<sup>2</sup> 谢尚举<sup>2</sup> 王亚东<sup>3</sup> 杨宗保<sup>3</sup>

(1.浙江省萧山中医院, 浙江 杭州, 310009; 2.浙江中医药大学, 浙江 杭州, 310053; 3.厦门大学, 福建 厦门, 361102)

中图分类号: R245.31 文献标识码: A 文章编号: 1674-7860 (2015) 28-0005-04

**【摘要】**目的: 应用改良 Allen's 造模法制备大鼠急性脊髓损伤 (SCI) 模型, 观察芒针对大鼠急性脊髓损伤 (ASCI) 后脊髓组织中肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、白介素-6 (IL-6), 白介素-1 (IL-1 $\beta$ ) 和核转录因子 K $\beta$  (NF-K $\beta$ ) 含量的影响。方法: 将 72 只 SD 大鼠随机分为两组: 模型组 36 只和芒针组 36 只, 采用改良 Allen's 打击法致伤模型组和芒针组大鼠 T9~T11 脊髓。芒针组采用芒针刺秩边与水道穴, 1 次/d, 共治疗 7d。分别于术后 1d, 3d, 7d 行 BBB 评分测定; 术后 1d, 3d, 7d 取材, 用 ELLSA 法检测脊髓组织中 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 、NF-K $\beta$  的含量。结果: 实验发现 7d 时芒针组 BBB 评分明显高于模型组, 差异具有统计学意义 ( $P<0.05$ ); 脊髓损伤后, 模型组和芒针治疗组 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 、NF-K $\beta$  含量显著升高。经治疗, 与模型组相比, 芒针组受损脊髓组织内 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 、NF-K $\beta$  的表达均降低, 且在 1d, 3d, 7d 的差异具有统计学意义 ( $P<0.01$ )。结论: 早期芒针治疗可显著抑制脊髓损伤炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 、NF-K $\beta$  的表达, 改善局部微环境, 促进损伤后期大鼠运动功能的恢复。

**【关键词】** 芒针; 脊髓损伤; 肿瘤坏死因子  $\alpha$ ; 白介素-6; 白介素-1 $\beta$ ; 核转录因子 K $\beta$

**【Abstract】**Objective: By SCI model, effects of elongated needle on TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 and NF-K $\beta$  were observed. Methods: 72 SD rats are randomly divided into the model group ( $n=36$ ) and the elongated needle treatment group ( $n=36$ ). T9~T11 spinal cord injury model is created by Allen's method. The elongated needle group took ZhiBian and Shuidao acupoint. BBB scores were invested on 1d, 3d, 7d after injury. The expression of TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  and NF-K $\beta$  in the injured spinal cords are examined by ELISA method at 1d, 3d, 7d after injury. Results: In 7 days, BBB scores in the treatment group was higher ( $P<0.05$ ). The expression of TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  and NF-K $\beta$  in two groups were significantly increased after injured. The expression of TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  and NF-K $\beta$  of elongated needle group was significantly lower than that in the model group; in 1d, 3d, 7d, the difference was statistically significant ( $P<0.01$ ). Conclusion: Elongated needle treatment can effectively inhibit the expression of pro-inflammatory cytokine TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  and NF-K $\beta$  in rats of acute spinal cord injuries, improve the micro-environment, and promote functional recovery of acute spinal cord injury rats.

**【Keywords】** Elongated needle; Spinal cord injury; TNF- $\alpha$ ; IL-6; IL-1 $\beta$ ; NF-K $\beta$

doi:10.3969/j.issn.1674-7860.2015.28.002

脊髓损伤 (Spinal Cord Injury, SCI) 属于临床多发病、常见病, 常导致截瘫或四肢瘫。脊髓损伤后历经原发性和继发性损伤的序贯过程, 损伤后脊髓神经周围出现缺血性坏死、水肿和炎症浸润等微环境的改变, 随着时间的发展发生继发性损伤, 多种细胞因子明显上调, 其参与并调节损伤诱导的炎症反应, 影响了神经元轴突的再生和功能的恢复。针灸作为一种促进神经功能恢复且无毒副作用的传统中医疗法, 近年来受到国内外关注。研究显示针灸临床治疗 SCI 均有显著疗效<sup>[1,2]</sup>, 不仅能减轻疼痛, 且可提高术后康复疗效。但是芒针对急性期 SCI 治疗过程中的炎症反应机制尚不十分明确。本研究通过观察脊髓损伤后炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  和 NF-K $\beta$  的含量变化, 探索芒针治疗急性脊髓损伤的炎症反应机制。

### 1 材料与方法

#### 1.1 实验动物与分组

选用 SPF 级 SD 大鼠 72 只, 购自厦门大学动物实验中心 [SYXK (闽) 2013-0006], 体重 (250 $\pm$ 30) g, 雄性, 自由饮水并保证充足的食物, 适应性饲养一周后, 将大鼠按随机数字表法分为模型组、芒针组, 每组分别于术后 1d、3d、7d 处死 12 只, 取伤段脊髓组织上下各 0.5cm 用于 ELISA 检测。

#### 1.2 动物模型制作

造模前禁食 8h, 所有大鼠称重后, 用 10% 水合氯醛 (0.3mL/100mg) 行腹腔注射麻醉。用卵圆钳钳夹大鼠, 待其无四肢反应后取俯卧位固定于自制操作台上, 采用改良 Allens 法制作为急

性脊髓损伤模型<sup>[3]</sup>，取胸背部（T8~T12）正中切口，钝性分离椎旁肌和棘上韧带，暴露上下各一个椎体长度，咬骨钳咬除T9~10棘突及全部椎板，暴露硬膜。用10g的克氏针沿带有刻度的导管从60mm高处垂直自由下落，打击在直径4mm、宽2mm的半圆片上，致伤后迅速移开打击物，造成大鼠脊髓中度损伤，逐层缝合。整个过程维持在（37±0.5）℃的温度下进行，术后用4~0丝线逐层缝合。术后每天青霉素（80U/d）腹腔注射预防感染，单笼饲养，维持室温在25℃，给予充足的食物和水。Crede手法按摩膀胱协助排尿，直至建立反射性膀胱排空。

### 1.3 治疗方法

模型组造模成功后不予治疗。芒针组大鼠用自制的鼠袋将大鼠固定，针灸穴位根据世界卫生组织制定的国际标准穴位进行选择，其位置如下：秩边（BL54）：臀外下部，股骨大转子与荐椎尾椎结合部连线外1/3与中1/3交点处；水道（ST28）：腹部，耻骨联合与胸剑联合中点连线（分13等份）耻骨联合上3等份旁开约2cm处；针刺部位备皮消毒，针灸针（0.25mm直径，华佗牌）针刺穴位大约4~5mm的深度，捻转1min并留针15min，并使同侧“秩边”“水道”组成一回路，连接于JL2B型电脉冲刺激仪（苏州医疗用品厂有限公司）上，参数：频率2/100Hz，电流1mA<sup>[4]</sup>，刺激15min，芒针左右隔次交替，1次/d。

### 1.4 行为学观察及运动功能学评价

各组大鼠于造模后采用BBB(Basso, Beattie and Bresnahan Locomotor Rating Scale, BBB scale)运动功能评分<sup>[5]</sup>进行评分。脊髓损伤后的大鼠，将大鼠放置于直径为100×100的开放区域内进行，观察大鼠后肢的肢体活动，包括大鼠的各关节活动度及前后肢协调能力，评分2分以上的大鼠为造模失败，予以剔除，后期同条件增补。造模后1d、3d、7d进行BBB评分。

### 1.5 脊髓组织取材

模型组和芒针组大鼠分别于1d、3d、7d取材。腹腔注射过量水合氯醛（0.3mL/100mg），待动物麻醉后于冰上迅速剪取损伤区脊髓组织（以损伤段上下各0.5cm）用于ELISA检测。

### 1.6 ELISA检测

组织匀浆后，在酶标包被板上设标准品孔10孔，在第一和第二孔中分别滴加标准品100μL，然后在第一、第二孔中分别加标准品稀释液50μL，混匀；然后从第一孔和第二孔中各取100μL分别加到第三、第四孔，反复对倍稀释至第九、十孔，混匀后从第九、第十孔中各取50μL弃掉。在酶标包被板待测样品孔中先加样品稀释液40μL，然后再滴加待测样品10μL（样品最终稀释浓度为5倍）。将样品滴加于

酶标板孔底部，尽量不触及孔壁，轻轻晃动以混匀（空白对照孔不加样品及酶标试剂）。用封板膜封板后置37℃温育30min，洗涤5次，每孔加入酶标试剂50μL，再温育，洗涤，显色，在酶标仪上于450nm波长处以阴性对照孔调零，检测各孔光密度（OD）值。根据标准液的检测结果得出标准曲线，求出各组样品的实际浓度。

### 1.7 数据统计与分析

所有数据均以均数和标准差（ $\bar{x} \pm s$ ）表示，采用SPSS16.0软件进行统计分析，组间及组内不同时间点比较采用t检验，以P<0.05表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 行为学观察和BBB评分

损伤后，模型组和芒针组大鼠苏醒后双下肢呈迟缓性瘫痪，BBB评分为0~1分，说明造模成功。术后1d，两组大鼠双下肢呈痉挛性瘫痪，未见明显关节活动，模型组与芒针组比较，差异无统计学意义（P>0.05）；术后3d，两组大鼠后肢偶见1~2个关节轻度活动，模型组与芒针组比较，差异有统计学意义（P<0.05）；第7d，模型组大鼠后肢可见髌膝踝关节轻度活动，不足以支撑站立，芒针组大鼠后肢可见髌膝踝3个关节均有大幅运动，部分大鼠可见爪踏面触地，但不能支撑站立，模型组与芒针组比较，差异具有统计学意义（P<0.05），见表1。

表1 两组大鼠不同时间点BBB评分比较（ $\bar{x} \pm s$ ，n=36）

组别	正常	1d	3d	7d
模型组	21±0.00	0.6±0.52	1.9±0.74	3.9±1.20
芒针组	21±0.00	0.7±0.53	2.9±1.10**	7.5±1.58**

注：\*\*术后3d、7d，与模型组相比，P<0.05。

### 2.2 大鼠受损脊髓组织内TNF-α、IL-6和NF-κβ的ELISA检测结果

为了测试芒针治疗是否通过调节炎症细胞因子的分泌调控炎症过程，我们分析了T9~T10节段脊髓组织中的TNF-α、IL-1β、IL-6、NF-κβ的水平。脊髓损伤后1d时，炎症因子TNF-α、IL-1β、IL-6、NF-κβ的含量明显增高；3d时，炎症因子TNF-α、IL-1β、IL-6、NF-κβ的含量较1d时有所下降，差异具有统计学意义（P<0.01）；脊髓损伤7d后，炎症因子TNF-α、IL-1β、IL-6、NF-κβ的含量持续下降，与3d时比较，差异具有统计学意义（P<0.01）；而随着时间的推移，芒针组炎症因子TNF-α、IL-1β、IL-6、NF-κβ的含量与模型组比较，下降的更加明显，差异具有统计学意义（P<0.01）。见表2~表5。

表2 模型组和芒针组受损脊髓组织内TNF-α的表达（ $\bar{x} \pm s$ ，n=36）

组别	正常	1d	3d	7d
模型组	154.61±4.51	237.70±6.68	220.76±4.61*	210.31±3.76**
芒针组	154.61±4.51	183.24±5.62*	177.74±5.47**	154.85±1.99**

注：\*与1d时比较，P<0.01；\*与3d时比较，P<0.01；\*与模型组比较，P<0.01。

表 3 模型组和芒针组受损脊髓组织内 IL-6 的表达 ( $\bar{x} \pm S$ ,  $n=36$ )

组别	正常	1d	3d	7d
模型组	76.67±3.40	116.53±3.88	111.18±3.53*	101.99±3.18**
芒针组	76.67±3.40	95.15±3.04*	87.45±1.87**	78.61±2.32***

注: \*与 1d 时比较,  $P<0.01$ ; \*与 3d 时比较,  $P<0.01$ ; \*与模型组比较,  $P<0.01$ 。

表 4 模型组和芒针组受损脊髓组织内 IL-1 $\beta$  的表达 ( $\bar{x} \pm S$ ,  $n=36$ )

组别	正常	1d	3d	7d
模型组	16.95±0.80	27.69±0.31	26.38±0.33*	23.55±0.85**
芒针组	16.95±0.80	21.01±0.68*	19.91±0.34**	17.17±0.78**

注: \*与 1d 时比较,  $P<0.01$ ; \*与 3d 时比较,  $P<0.01$ ; \*与模型组比较,  $P<0.01$ 。

表 5 模型组和芒针组受损脊髓组织内 NF-K $\beta$  的表达 ( $\bar{x} \pm S$ ,  $n=36$ )

组别	正常	1d	3d	7d
模型组	538.80±14.04	954.57±24.90	872.58±25.79*	812.43±16.33**
芒针组	538.80±14.04	724.35±14.97*	664.19±19.09**	575.40±27.02**

注: \*与 1d 时比较,  $P<0.01$ ; \*与 3d 时比较,  $P<0.01$ ; \*与模型组比较,  $P<0.01$ 。

### 3 讨论

急性脊髓损伤 (Acute Spinal Cord Injury, ASCI) 是一种严重威胁人类生存质量的神经系统创伤性疾病, 常给患者和家庭带来沉重的负担。而继发性损伤是导致脊髓损伤后残余神经受损和功能丧失的首要原因<sup>[6]</sup>。针灸治疗脊髓损伤为时已久, 本文研究发现脊髓损伤后用芒针治疗能促进大鼠后肢运动功能的恢复, 而且 3d 时模型组与芒针组的差异有统计学意义, 说明急性脊髓损伤后, 治疗早对脊髓损伤后神经功能的恢复有明显的治疗效果。

脊髓损伤后病变周围微环境的改变导致多种炎症细胞因子在 ASCI 后表达增高, 通过细胞因子网络介导免疫炎症反应、级联放大炎症反应规模, 进一步破坏受损脊髓组织, 影响脊髓的恢复<sup>[7]</sup>。研究发现受损脊髓组织中能释放大量的炎症因子, 如 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 、NF-K $\beta$  等相互作用, 加重脊髓的损伤<sup>[8,9]</sup>。本文同样证实脊髓损伤后, 炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 、NF-K $\beta$  的含量急剧升高。TNF- $\alpha$  能通过与 TNFR 结合, 促进 NF-kB 的活化和 IL-1 $\beta$ 、IL-6 及 TNF- $\alpha$  自身的分泌, 释放如蛋白水解酶、氧自由基等, 促使损伤的脊髓进一步损伤, 并可通过多种途径诱发凋亡<sup>[10]</sup>。IL-6 已被证实为促炎细胞因子, 在脊髓损伤早期对脊髓神经细胞有损害作用。而 NF-kB 是调节免疫炎症反应最重要的转录因子。研究发现 IL-6、TNF- $\alpha$  等在 ASCI 早期即有明显的升高, 通过级联放大炎症反应, 可诱导凋亡<sup>[11]</sup>, 在本实验中我们亦发现炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 、NF-K $\beta$  在脊髓损伤后 1d 时即有明显的显著升高, 早期抑制 IL-6、TNF- $\alpha$  的释放能有效抑制脊髓神经周围的炎症反应, 因此我们在脊髓损伤后即刻对大鼠进行芒针治疗, 且大量研究证明, 针灸不仅对脊髓损伤有很好的疗效, 且具有镇痛、抗炎、防止细胞受损、抗脂质过氧化等作用<sup>[12,13]</sup>。芒针组在脊髓损伤后给予芒针治疗, 与模型组比较, 随着时间的推移, 发现可明显降低伤段脊髓组织中 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 、NF-K $\beta$  的含量, 具有明显的炎症抑制作用, 有利于脊髓损伤后期大鼠运动功能

的恢复, 但是炎症因子的网络调控也是非常复杂的, 这还需要我们进一步研究。

### 参考文献:

- [1]樊留博,马利中,王韵.电针夹脊穴治疗脊髓损伤后中枢性疼痛疗效观察[J].上海针灸杂志,2011,30(3):149-150
- [2]邓聪,老锦雄.夹脊穴电针治疗不完全性脊髓损伤疗效观察[J].山西中医,2012,28(5):30
- [3]S M Onifer,A G Rabchevsky,S W Scheff. Rat models of traumatic spinal cord injury to assess motor recovery[J].ILARJ,2007,48(4):385-395
- [4]张尧,邱有波,杨拯,等.不同波形电针对脊髓损伤大鼠运动功能恢复的影响[J].中国康复医学杂志,2012,12(27):1097-1101
- [5]Scheff SW,Saucier DA,Cai n M E. A statistical method for analyzing rating scale data: the BBB locomotorscore[J].J Neu-rot rauma,2002,19(10): 1251-1260
- [6]C Boldin,JRaith,FFrankhauser, et al. Predicting Neurologic Recovery in Cervical Spinal Cord Injury with postoperative MR imaging[J].Spine (Phila Pa 1976),2006,31(5):554-559
- [7]Fleming JC,Norenberg MD,Ramsay DA, et al.The cellular inflammatory response in human spinal cords after injury[J].Brain,2006,129(12):3249-3269
- [8]Ankeny DP,Popovich PG. Mechanisms and implications of adaptive immune responses after traumatic spinal cord injury[J].Neuroscience, 2009,158(3):1112-1121
- [9]BerilGH,SolarogluI, Okutan O, et al. Metoprolol treatment decreases tissue myeloperoxidase activity after spinal cord injury in rats[J].J ClinNeurosci, 2007,14(2):138-142
- [10]Genovese T, Mazzon E, Crisafulli C, et al. TNF- $\alpha$  blockage in a mouse model of SCI:evidence for improved outcome[J].Shock,2008,29(1):23-41
- [11]Lu Yu-Ling, Zhao Lu-Ming, Chen Hong-Pei, et al. Effect of electropuncture at Jiajiacupoint on anti-inflammation, analgesia and immunoregulation[J].Chineses Journal of Clinical Rehabilitation,2006,10(19):171-173
- [12]童基均,朱丹华,陈裕泉,等.基于边缘频谱分析的针灸镇痛效果研究[J].浙江大学学报(工学版),2009,43(7):1214-1217

[13]XuJia-nian, Xiao Da, JuJiu-hong, et al. Effect of electro-acupuncture on treatment on spinal cord injuries in rats[J].ChinesesJourna of Clinical Rehabilitation,2006,10(23):180-182

作者简介:

全仁夫, 通讯作者。

基金项目:

浙江省中医药科研计划项目 (2008CB067)。

编辑: 段苏婷 编号: ER-15020209 (修回: 2015-10-03)

# 基于 Markov 模型评价疏肝健脾中药干预桥本式甲状腺炎远期疗效的研究

## Research on long-term efficacy of the Shugan Jianpi prescription on Hashimoto's thyroiditis based on Markov model

苏有玲 耿 峰

(泰安市中医医院, 山东 泰安, 271000)

中图分类号: R581.04 文献标识码: A 文章编号: 1674-7860 (2015) 28-0008-03 证型: IB

**【摘要】** 目的: 基于 Markov 模型评价疏肝健脾中药干预桥本式甲状腺炎的远期疗效。方法: 根据桥本式甲状腺炎疾病的病程建立 Markov 模型。以 12 个月为 1 个 Markov 周期, 比较通过接受中药干预和西医标准治疗干预在 20 个 Markov 周期的状态转移概率, 评价疏肝健脾中药干预桥本式甲状腺炎的优势。结果: 经过 Markov 模型 20 年的预测, 治疗组抗体阳性甲功正常, 抗体阴性甲功正常, 抗体阳性甲减 3 种状态累积转移概率分别为 54.14%, 18.43%, 27.43%。对照组抗体阳性甲功正常, 抗体阴性甲功正常, 抗体阳性甲减 3 种状态累积转移概率分别为 51.58%, 14.06%, 34.36%。结论: 基于 Markov 模型的预测结果, 疏肝健脾中药对桥本式甲状腺炎的远期疗效优于西医标准治疗。

**【关键词】** Markov 模型; 疏肝健脾; 桥本式甲状腺炎

**【Abstract】** Objective: To assess the long-term efficacy of the Shugan Jianpi prescription on hashimoto's thyroiditis based on Markov model. Methods: Markov model was builded according to the course of hashimoto thyroiditis. 12 months were a Markov cycle. In 20 Markov cycles, state transition probabilities by TCM therapy or western medicine were compared. The efficiency of the Shugan Jianpi prescription on hashimoto's thyroiditis was assessed. Results: According to forecasting of Markov model for 20 years, in the treatment group, the positive rate and negative rate of thyroid in antibody were normal. Cumulative transition probabilities of positive hypothyroidism's 3 states in antibody respectively shows 54.14%, 18.43% and 27.43%. In the control group, the positive rate and negative rate of thyroid in antibody were normal. Cumulative transition probabilities of positive hypothyroidism's 3 states in antibody respectively shows 51.58%, 14.06% and 34.36%. Conclusion: Based on predictions of Markov model, the Shugan Jianpi prescription on hashimoto's thyroiditis shows a significant long-term effect.

**【Keywords】** Markov model; Shugan Jianpi; Hashimoto's thyroiditis

doi:10.3969/j.issn.1674-7860.2015.28.003

桥本式甲状腺炎 (Hashimoto's Thyroiditis) 是最常见的甲状腺疾病之一, 在美国和日本等饮食富碘国家, 缺碘被证明是引发甲状腺肿的最重要原因<sup>[1]</sup>。国外报告本病患率为 1%~2%, 女性发病率是男性的 15~20 倍, 高发年龄在 30~50 岁<sup>[2]</sup>。我国学者报告发病率为 1.6%。中医通过辨证论治桥本式甲状腺炎, 疗效可靠, 近年来已得到诸方面的认可。目前中医药干预桥本式甲状腺炎临床研究颇多, 但多集中在临床症状的

改善上, 对其远期疗效的评价的研究偏少。而且目前对中医疗效的评价多局限于中医症状评分和西医理化指标改变, 在一定程度上并不能完全反映中医药的疗效。因此我们需要借助数学模型, Markov 模型由俄国著名数学家马尔可夫在 1906 年提出, 它依据某些变量的现在状态及动向预测某些变化趋势的动态随机数学模型<sup>[3]</sup>, 从 20 世纪 70 年代就已经应用于慢性病的研究<sup>[4]</sup>。基于此, 本研究提出针对 HT 治疗的多状态