

督脉电针与 NSCs 移植联合应用对大鼠脊髓全横断损伤组织 NT-3 含量及受体表达的影响*

陈雅云¹ 曾园山^{1,2,3} 张 伟¹ 陈玉玲⁴ 陈穗君¹

摘要 目的:探讨督脉电针与神经干细胞(NSCs)联合应用对大鼠脊髓全横断损伤组织神经营养-3(NT-3)含量及其受体表达的影响。**方法:**将 30 只成年大鼠分为对照 14d 组、督脉电针 14d 组(电针 14d 组)、神经干细胞移植 14d 组(NSCs 14d 组)、督脉电针+神经干细胞移植 14d 组(电针 NSCs 14d 组)、神经干细胞移植 30d 组(NSCs 30d 组)和督脉电针+神经干细胞移植 30d 组(电针 NSCs 30d 组)6 组,所有动物均实施 T10 段脊髓全横断手术,其中电针组和电针 NSCs 组于术后 5d 进行电针治疗。**结果:**①电针 NSCs14d 组受损伤的脊髓组织含有较高水平的 NT-3,其次是电针 14d 组和 NSCs14d 组,对照 14d 组受损伤的脊髓组织含有较低水平的 NT-3。②NSCs30d 组和电针 NSCs30d 组脊髓全横断处的移植神经干细胞均有 TrkC 表达。**结论:**督脉电针与神经干细胞移植联合应用能够明显增高大鼠脊髓全横断损伤处邻近组织的 NT-3 水平;在大鼠脊髓损伤处及邻近组织有些移植神经干细胞表达 TrkC。

关键词 督脉电针;神经干细胞移植;脊髓损伤;神经营养-3;神经营养-3 受体;大鼠

中图分类号: R245.97,R49,R651.2 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2006)-09-0779-03

Effects of combination of Du meridian electroacupuncture and neural stem cells transplanted on the content of nerotrophine-3 and expression of nerotrophine-3 receptor in injured tissue of rat spinal cord transected completely/CHEN Yayun,ZENG Yuanshan,ZHANG Wei,et al//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2006, 21(9):779—781

Abstract Objective:To explore the effects of combination of Du meridian electroacupuncture and neural stem cells (NSCs) transplanted on the content of nerotrophine-3(NT-3) and expression of nerotrophine-3 receptor(tyrosine protein kinase C,TrkC) in injured tissue of rat spinal cord transected completely. **Method:**Thirty adult rats were divided into six groups: control 14d group,DU meridian electroacupuncture plus 14d group (EA 14d group),NSCs transplanted 14d group (NSCs 14d group),DU meridian electroacupuncture plus NSCs transplanted 14d group (EA+NSCs transplanted 14d group),NSCs transplanted 30d group (NSCs 30d group) and DU meridian electroacupuncture plus NSCs transplanted 30d group (EA+NSCs transplanted 30d group). T10 spinal cord segment of all animals were completely transected. The rats of EA 14d group,EA+NSCs transplanted 14d group and EA+NSCs transplanted 30d group were treated with DU electroacupuncture 5 days after operation. **Result:** ①The content of NT-3 at injured spinal cord tissue was highest in EA+NSCs transplanted 14d group, secondly at EA 14d group and NSCs 14d group. The content of NT-3 was lowest in control 14d group.②Transplanted neural stem cells at completely transected site of spinal cord expressed TrkC in NSCs 30d group and EA+NSCs transplanted 30d group. **Conclusion:**Combination of Du meridian electroacupuncture and neural stem cells transplanted may significantly enhance NT-3 content of the tissue neighboring completely transected site of rat spinal cord. Some transplanted neural stem cells express TrkC in injured site and near tissue of rat spinal cord.

Author's address Division of Neuroscience,Dept. of Histology and Embryology,Zhongshan Medical College,Sun Yat-sen University,Guangzhou,510080

Key words DU meridian electroacupuncture; neural stem cells transplant; spinal cord injury; nerotrophine-3; tyrosine protein kinase C; rat

督脉属奇经八脉之一,是全身阳气的会聚之处,为“阳脉之海”,和脑、肾皆有密切联系。临床应用督脉针刺或电针治疗脊髓损伤的患者已取得一定的疗效^[1]。实验证明,督脉电针可以抑制脊髓损伤后的神经元凋亡^[2]。本研究组也将督脉电针和神经干细胞(neural stem cells,NSCs)移植联合应用治疗脊髓损伤,已观察到有较好的促进脊髓损伤修复的作用,在

* 基金项目:国家自然科学基金(30472132)和广东省中医药管理局科研基金(101139 和 303013)资助项目

1 中山大学中山医学院组织胚胎学教研室神经科学教研室,广州市中山二路 74 号,广州,510080

2 通讯作者:曾园山(中山大学中山医学院组织胚胎学教研室神经科学教研室,广州市中山二路 74 号,广州,510080)

3 中山大学脊髓损伤研究所

4 中山大学附属一院针灸科

作者简介:陈雅云,女,硕士

收稿日期:2005-12-20

损伤处移植的神经干细胞能更好地存活,并向神经元样细胞分化^[3-4]。在此基础上,本研究拟探讨督脉电针与神经干细胞联合应用对大鼠脊髓全横断损伤组织神经营养素-3(neurotrophine-3, NT-3)含量及其受体表达的影响,为进一步研究督脉电针促进移植的神经干细胞存活、迁移和分化机制提供资料。

1 材料与方法

1.1 实验动物分组

30 只成年雌性 SD 大鼠体重 210—230g 随机分为 6 组,每组 5 只;即对照 14d 组、督脉电针 14d 组(EA14d 组)、神经干细胞移植 14d 组(NSCs14d 组)、督脉电针+神经干细胞移植 14d 组(电针 NSCs14d 组)、神经干细胞移植 30d 组(NSCs30d 组)和督脉电针+神经干细胞移植 30d 组(电针 NSCs30d 组)。

1.2 神经干细胞的制备

选用新生 1—2d 的 SD 大鼠,无菌条件下断头取脑,在 D-Hank 液中分离出海马,剪碎置入离心管中,以 1000r/min 离心 5min,弃上清,加入 0.25%胰酶消化 10min(37℃),用胎牛血清终止消化。随后离心、弃上清,加入 DMEM/F12(含 bFGF 20ng/ml 和 B27 20μl/ml)无血清培养液,吹打、过滤及细胞计数后制成 1×10^4 个细胞/ml 单细胞悬液移入培养瓶,于 37℃ 5% CO₂ 培养箱中进行悬浮培养。第 2 代培养 7—8d 后,取少量神经干细胞经胰酶消化及机械分离后进行 nestin 免疫荧光细胞化学染色。第 2 代培养的神经干细胞,用胰酶消化及机械分离后,制备成 5×10^5 个细胞/μl 的细胞悬液,4℃下冷藏备用。

1.3 制备大鼠全横断脊髓损伤模型及其 NSCs 移植

实验大鼠经腹腔注射 1%戊巴比妥钠 25—30g/kg 麻醉后,在脊髓 T9 和 T10 节段之间做全横断,在损伤腔内植入约 1mm³ 的明胶海绵。其中 NSCs14d 组、电针 NSCs14d 组、NSCs30d 组和电针 NSCs30d 组的明胶海绵内含有 5μl 的神经干细胞悬液,对照 14d 组和 EA14d 组的明胶海绵内含有 5μl DMEM/F12 培养液。逐层缝合肌肉和皮肤。术后每只动物腹腔内注射青霉素 5 万 U/d,连续 3d,人工排尿。术后动物分别被饲养 14d 和 30d。

1.4 督脉电针治疗

EA14d 组、电针 NSCs14d 组和电针 NSCs30d 组在术后第 5 d 开始接受隔日 1 次的电针治疗。选择 2 组穴位:第 1 组为两个督脉阿是穴,位于脊髓全横断处上、下约两个脊髓段(T7—8 和 T11—12)的椎体棘突之间。第 2 组为督脉的腰俞穴和长强穴。在这 4 个穴位的进针深度为穿皮后再进针约 2mm,刺激频

率为 2Hz,波型为疏密波,留针时间为 15min。

1.5 ELISA 检测脊髓全横断损伤处邻近组织的 NT-3 含量

将术后 14d 的动物深麻醉后,置于冰盘上开胸,经左心室灌注预冷的 0.9% NaCl 肝素溶液 200ml 冲洗血管,再用 0.1mol/L 磷酸缓冲液 200ml 灌注后迅速解剖游离出脊髓全段。取损伤区上段 T2—9 和损伤区下段 T11—L5,各称量 50mg 脊髓组织,冰浴环境研磨制备组织匀浆,取上清液待用。将标准品和制备好的上清液各 0.1ml 依次加入酶标板,37℃反应 90min;加入生物素抗大鼠 NT-3 抗体工作液,37℃反应 60min。用 PBS 洗涤后加入 ABC 工作液,37℃反应 30min。PBS 洗涤后加入 TMB 显色液。37℃避光反应 8—12min,加入 TMB 终止液。用酶标仪在 450nm 测定 OD 值。将 TMB 空白显色孔设为对照,以吸光值作为纵坐标,以浓度作为横坐标绘出标准曲线。根据样品的吸光值在坐标上找出对应的浓度。

1.6 免疫荧光细胞化学检测 NT-3 受体的表达

将术后 30d 的动物深麻醉后,经左心室主动脉插管,先灌注血管冲洗液(含 1.8gNaCl,1%NaNO₂ 0.4ml,400U 肝素钠)200ml,再灌注 4%多聚甲醛 400ml 固定动物。取 T8—12 脊髓段,用新鲜的 4%多聚甲醛后固定 4h,再置于 30%蔗糖溶液中浸泡至组织下沉到瓶底。用恒冷箱切片机做 T8—12 脊髓段连续纵切片,片厚为 30μm,行 NT-3 受体(即酪氨酸蛋白激酶受体(tyrosine protein kinase C, TrkC))免疫荧光细胞化学染色。一抗、二抗均购自博士德公司。一抗工作浓度为 1:200。先用 0.01mol/L PBS 洗 3 次各 5min,再用 1:50 正常山羊血清封闭 20min;一抗 4℃过夜;PBS 洗 3 次各 5min,生物素化二抗 37℃,30min;PBS 洗 3 次各 5min,SABC-Cy3 复合液 37℃,30min;PBS 洗 3 次各 5min,AEC 封片。以 PBS 代替一抗作为阴性对照。

1.7 统计学分析

所得数据均经两个样本均数 *t* 检验和单因素方差分析处理。

2 结果

2.1 脊髓全横断损伤处邻近组织的 NT-3 含量

见表 1。术后 14d,各组大鼠脊髓损伤区上段 T2—9 和损伤区下段 T11—L5 均可检测到 NT-3,但每一组的脊髓损伤区上段 NT-3 含量与损伤区下段比较无明显差别($P>0.05$)。电针 NSCs14d 组的脊髓损伤区上段和下段 NT-3 含量最高,与其他三组比较有显著性差异($P<0.05$)。电针 14d 组的脊髓损伤区上

表 1 4 组大鼠脊髓全横断损伤处邻近组织 NT-3 含量的比较

(pg/ml, $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	损伤区上段(T2—T9)	损伤区下段(T11—L5)	损伤区上段和下段(T2—T9 和 T11—L5)
对照 14d 组	5	167.16±43.03 ^①	190.60±43.10	178.88±42.45 ^②
NSCs14d 组	5	229.93±54.79 ^①	229.34±55.88	229.63±52.17 ^③
电针 14d 组	5	231.83±18.12 ^①	257.00±16.95	244.52±21.46 ^④
电针 NSCs14d 组	5	267.35±13.27 ^①	296.42±46.38	281.88±35.62

①与同组损伤区下段比较 $P>0.05$, ②与损伤区上段和下段其他三组比较 $P<0.05$, ③与④比较 $P>0.05$

段和下段 NT-3 含量与 NSCs14d 组的比较无明显差别 ($P>0.05$)。对照 14d 组的脊髓损伤区上段和下段 NT-3 含量明显低于其他三组 ($P<0.05$)。这些检测结果提示, 督脉电针治疗或神经干细胞移植都能够增高脊髓损伤处邻近组织的 NT-3 水平, 而督脉电针与神经干细胞移植联合应用可以明显增高脊髓损伤处邻近组织的 NT-3 水平。

2.2 免疫荧光细胞化学检测移植 NSCs 表达 TrkC

免疫荧光细胞化学显示, 电针 NSCs30d 组和 NSCs30d 组的脊髓全横断损伤处以及相邻的组织内均有些 TrkC 阳性染色的细胞呈红色荧光(图 1 和图 3, 见前置彩色插页 7), 它们的细胞核都被核荧光标记呈蓝色荧光(图 2 和图 4, 见前置彩色插页 7)。但从 TrkC 阳性染色的细胞数量上看, 两组动物并没有很大的差异, 这提示有些移植的神经干细胞已有 TrkC 表达。

3 讨论

神经营养素是神经营养因子重要的家族成员之一, 主要包括 NT-3、神经生长因子和脑源性神经营养因子等。神经营养素主要通过与其相应的受体 Trk 结合, 启动细胞信号转导通路而发挥生物学效应, 在神经系统的发生、发育和神经元存活、增殖、分化及其损伤修复过程中发挥重要作用。其中 NT-3 于 1990 年由 Ernfors 等发现, 它具有较广泛的神经营养活性作用, 分布于神经节、脑干、小脑、海马和脊髓等处^[5]。

本研究观察到在大鼠脊髓全横断损伤后 14d, 督脉电针治疗或神经干细胞移植都能够增高脊髓损伤处邻近组织的 NT-3 水平, 而督脉电针与神经干细胞移植联合应用可以明显增高脊髓损伤处邻近组织的 NT-3 水平。关于督脉电针可能增高脊髓损伤处邻近组织 NT-3 水平的机制, 现尚不清楚。有研究报导, 用电针作用于脊髓部分背根切除术的大鼠, 可以观察到邻近保留背根的背根节神经胶质细胞和神经元的 NT-3 mRNA 及其蛋白表达都有增加^[6]。我们推测, 督脉电针增高脊髓损伤处邻近组织的 NT-3 水平可能是激活了宿主脊髓组织的神经胶质细胞和神经元的 NT-3 表达所致。关于神经干细胞移植可能增高脊髓损伤处邻近组织 NT-3 水平的现象, 我们

认为, 神经干细胞移植可能促使宿主脊髓组织的神经胶质细胞和神经元分泌 NT-3, 也有可能是移植的神经干细胞通过分化为幼稚的神经胶质细胞分泌 NT-3。有研究认为, 神经发生时期, 幼稚的神经胶质细胞可以分泌神经营养因子诱导和支持神经元轴突生长。督脉电针与神经干细胞移植联合应用能明显提高 NT-3 的水平, 可能是督脉电针治疗与神经干细胞移植这两种因素在增高 NT-3 含量方面有协同作用, 即一方面通过督脉电针引起宿主脊髓组织分泌 NT-3, 另一方面通过移植的神经干细胞在宿主内分泌 NT-3。NT-3 的分泌增加为移植的神经干细胞存活和分化, 以及对受损脊髓神经元的存活及其轴突再生都有促进作用。

在本研究中, 无论是神经干细胞移植或是督脉电针与 NSCs 移植联合应用, 都能观察到脊髓损伤处移植的 NSCs 存活, 而且移植的神经干细胞都有部分表达 TrkC。TrkC 是 NT-3 受体, 正常情况下主要在大脑表达, 集中在大脑皮质、小脑和海马等脑区。NT-3 可通过 TrkC 的自身磷酸化进行细胞内信号转导, 产生神经生物作用^[7]。移植的神经干细胞有 TrkC 表达, 可能与神经干细胞移植增高脊髓损伤处邻近组织 NT-3 水平以及督脉电针与神经干细胞移植联合应用明显增高脊髓损伤处邻近组织的 NT-3 水平有关。但本研究没有进行 TrkC 的定量检测, 因此, 有关 NT-3 水平的增高与移植的神经干细胞表达 TrkC 之间的量效关系, 还有待进一步研究。

参考文献

- [1] 许健鹏, 王明久, 刘学茹, 等. 以督脉电针为主治疗脊髓损伤 80 例的临床观察[J]. 针灸临床杂志, 1994, 10(6):13—15.
- [2] 曾园山, 李晓滨, 郭家松, 等. 督脉电针与神经干细胞移植在脊髓损伤修复中的作用[J]. 中国康复医学杂志, 2005, 20(6):468—470.
- [3] 李晓滨, 曾园山, 陈玉玲, 等. 督脉电针与神经干细胞移植联合应用促进脊髓全横断大鼠后肢运动功能的恢复 [J]. 解剖学报, 2004, 35(6):582—588.
- [4] 李晓滨, 曾园山, 陈玉玲, 等. 督脉电针与神经干细胞移植联合应用促进脊髓全横断大鼠受损的神经元存活及其轴突再生的研究[J]. 解剖学报, 2006, 37(1): 30—35.
- [5] Chao MV, Rajagopal R, Lee FS. Neurotrophin signalling in health and disease[J]. Clin Sci (Lond), 2006, 110(2):167—173.
- [6] 周雪, 吴良芳. 针刺对部分去背根猫脊髓背角与备用背根节神经营养素家族及其 mRNA 表达的影响[J]. 中国针灸, 2002, 22(11): 769—771.
- [7] Stenqvist A, Agerman K, Marmige F, et al. Genetic evidence for selective neurotrophin-3 signalling through TrkC but not TrkB in vivo[J]. EMBO Rep, 2005, 6(10):973—978.