

减重步行训练结合针刺治疗对脊髓损伤大鼠运动功能及 Cdh1 mRNA 表达的影响

孟巍¹ 邢艳丽^{2,3} 刘帅¹

摘要

目的:探讨减重步行训练结合针刺治疗对脊髓损伤(SCI)大鼠运动功能及 Cdh1 mRNA 表达的影响。

方法:将 150 只雄性 SD 大鼠随机分为针刺组(A)、步行训练组(B)、针步组(C)、对照组(D),每组 30 只,及假手术组(E)、空白组(F),每组 15 只。A、B、C、D 组采用切割型脊髓损伤模型法制备 SCI 模型;E 组仅暴露脊髓。并于术后 3d 开始 A、B、C 组相应治疗,D、E 不予治疗,F 组不做任何处理。术后 3、5、7、14、21d 对大鼠后肢运动功能进行 BBB 评分;及提取脊髓损伤节段组织总 RNA,用实时荧光定量测定 PCR 检测损伤区 Cdh1 mRNA 的表达。

结果:21d 后治疗组 BBB 评分明显高于 D 组,其中 C 组最高,B 组次之,A 组最少,各组差异有显著性($P<0.01$);Cdh1 mRNA 的表达 C 组最高,与其他各组有显著差异($P<0.01$);A、B 组与 D 组相比差异有显著性($P<0.01$),A、B 组差异无显著性($P>0.05$)。

结论:减重步行训练或针刺治疗都对 SCI 大鼠运动功能及损伤部 Cdh1 mRNA 的表达具有良性作用,二者结合疗效更为显著。

关键词 减重步行训练;大鼠;脊髓损伤;Cdh1 mRNA

中图分类号:R651.2 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2012)-07-0635-04

Effects of body weight support treadmill training combining with acupuncture on motion function and Cdh1 mRNA expression in rats with spinal cord injury/MENG Wei, XING Yanli, LIU Shuai/Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2012, 27(7): 635—638

Abstract

Objective: To explore the effects of body weight support treadmill training combining with acupuncture on motion function and Cdh1 mRNA expression in rats with spinal cord injury (SCI).

Method: One hundred and fifty male SD rats were randomly divided into acupuncture group (A), body weight support treadmill training group (B), combination group (C), control group (D), 30 rats in each group, and sham operation group (E), blank group (F), 15 rats in each group. SCI models were established by cutting method in group A, B, C and D. In group E rats' spinal cords were exposed only. Treatments were started in group A, B, C 3 days after operation, no treatment in group D, E and F. BBB scores were evaluated 3,5,7,14 and 21 days after operation, total RNA of injury spinal cord segments were extracted and expression of Cdh1 mRNA was detected by RT-PCR.

Result: Twenty-one days after treatment, BBB scores in group A,B and C were markedly higher than that in group D, and the descending order was C,B,A with significant differences ($P<0.01$). Expression of Cdh1 mRNA peaked in group C with significant differences compared with other groups ($P<0.01$); there were significant differences among group A,B and D ($P<0.01$) and there was no significant difference between group A and B ($P>0.05$).

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2012.07.011

1 黑龙江中医药大学,哈尔滨,150040; 2 黑龙江中医药大学附属二院康复病房; 3 通讯作者

作者简介:孟巍,女,硕士研究生; 收稿日期:2011-11-22

Conclusion: There are positive effects of both methods of body weight support treadmill training and acupuncture, on SCI rats' motion function and expression of Cdh1 mRNA and the combination of both treatments can get better effect.

Author's address Heilongjiang University of Chinese Medicine, Heilongjiang, 150040

Key word body weight support treadmill training; rat; spinal cord injury; Cdh1 mRNA

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)是临床上致残的重要原因,发病以青壮年为主^[1],绝大部分尚无法治愈,给家庭及社会带来沉重的负担,并严重地影响患者的生存质量^[2],因此如何促进SCI患者运动功能恢复是康复治疗的主要目的。本实验通过自制减重步行训练器与针刺疗法联合治疗SCI大鼠疗效的对比,旨在寻求一种更为有效、安全、经济、简便的SCI治疗方法及进一步证实Cdh1 mRNA的表达与脊髓损伤修复的相关性。

1 材料与方法

1.1 实验分组

将200—220g的150只成年雄性SD大鼠随机分为针刺组(A)、步行训练组(B)、针步组(C)、对照组(D),每组30只;假手术组(E)、空白组(F),每组15只。A组给予针刺治疗;B组减重步行训练器治疗;C组二者结合;D组不治疗。

1.2 模型制备

A、B、C、D组采用切割型脊髓损伤模型^[3]制备方法,建立大鼠双后肢瘫痪实验模型。术后分笼饲养,保暖1—2h。术后肌肉注射青霉素16万U/d,连续1周。定时人工排尿和翻身。E组仅暴露脊髓。F组不做处理。

1.3 分组治疗

1.3.1 减重步行训练:于脊髓横断损伤术后3d开始减重步行训练器训练,每天1次,每次30min,每周5次。开始减重量为大鼠体重的50%,跑台速度设为5—10m/min。以后减重量和速度依大鼠的能力进行调整。连续3周。

1.3.2 针刺治疗:术后3d开始,取切口上下两端夹脊穴(椎体棘突下两侧,距中线3—4mm)直刺,深度5mm。并用6805-D型电麻仪,以持续脉冲电流2Hz为输出强度以背部肌肉出现轻微抖动及大鼠双下肢出现外展外旋为度,正极在上,负极在下。每次20min,连续3周。

1.4 评分及取材

1.4.1 后肢功能评估:采用大鼠脊髓损伤评分标准(Basso, Beattie and Bresnahan, BBB)。选用一直径约为100cm大小的光滑硬质木板为评定区域,于术后3d、5d、7d、14d、21d由熟悉本实验评分标准的其他人员进行测定并记录。

1.4.2 组织总RNA的提取及实时定量RT-PCR反应:分别于术后第3、5、7、14、21天取材(3d在治疗前取材,余结束当天治疗后取材),A、B、C、D组每个时间点各6只,E、F组各3只。取出以打击点为中心长约15mm的脊髓节段取匀浆,用TaKaRa试剂盒提取组织总RNA,紫外分光光度计测定浓度,按实时定量RT-PCR试剂盒说明书操作,提取总RNA 500ng进行逆转录。以逆转录所得cDNA为模板,采用Light Cycler实时荧光定量PCR仪进行实时定量PCR反应,检测Cdh1 mRNA的表达,并以 β -actin为内参照。PCR引物为:

Cdh1(NM-031334.1)上游引物为5'-TCTTGC-GTTTCTTCAAACCA-3',

下游引物为5'-TGATTGCAGTCATCATTTGCT-3',

产物片段为705bp。 β -actin(NM-031144.2)

上游引物为5'-TGGCATCCATGAACTACATTCA-3',

下游引物为5'-AAGAAAGGGTGTAAAACGCA-3',

产物片段350bp。

用凝聚成像系统分析、扫描、拍照,获取条带平均密度和面积数据计算基因表达的含量,计算方法: $\text{Cdh1 基因强度} \times \text{面积} / \beta\text{-actin 强度} \times \text{面积}$ 。

1.5 统计学分析

采用SPSS 18.0中文统计软件,对各组结果进行单因素方差分析,各组数据以均数 $\pm$ 标准差表示,以 $P < 0.05$ 为有显著性意义。

2 结果

2.1 大鼠后肢运动功能评定

A、B、C、D组造模后双下肢瘫痪。术后第3天:各组BBB评分差异无显著性($P > 0.05$),术后第5天:

BBB评分显示A组与D组差异无显著性($P>0.05$);B、C组与D组相比差异有显著性($P<0.05$);B、C组相比差异无显著性($P>0.05$)。术后第7天:A、B、C组 BBB评分明显高于D组($P<0.05$);A、B组差异无显著性($P>0.05$)。术后第14、21天:A、B、C组 BBB评分明显高于D组($P<0.01$),其中C组最高,B组次之,A组最少,A、B、C各组差异有显著性($P<0.01$);E组造模成功大鼠苏醒后,各时段双下肢功能正常,二便功能正常,与F组无显著差异,BBB评分均为21分($P>$

0.05)。见表1。

2.2 实时荧光定量PCR

术后第3天 A、B、C、D组 Cdh1 mRNA 定量差异无显著性($P>0.05$),具有可比性。术后第5、7、14、21天 A、B、C组 Cdh1 mRNA 含量明显高于D组($P<0.01$);C组 Cdh1 mRNA 含量最高;A、B组差异无显著性($P>0.05$)。E、F组各时间点差异无显著性($P>0.05$)。见表2,图1。

表1 各组术后不同时间点 BBB 后肢运动功能评分

($\bar{x} \pm s$)

组别	第3天	第5天	第7天	第14天	第21天
A组	0.33 ± 0.52	1.67 ± 0.52	3.17 ± 0.75	5.00 ± 0.63	6.33 ± 1.21
B组	0.17 ± 0.41	1.83 ± 0.41	3.50 ± 0.84	6.50 ± 0.84	9.50 ± 1.05
C组	0.17 ± 0.41	2.17 ± 0.41	4.50 ± 0.55	8.33 ± 1.21	11.83 ± 0.75
D组	0.33 ± 0.52	1.33 ± 0.52	2.17 ± 0.41	3.30 ± 0.52	4.67 ± 0.52
E组	21.00 ± 0.00	21.00 ± 0.00	21.00 ± 0.00	21.00 ± 0.00	21.00 ± 0.00
F组	21.00 ± 0.00	21.00 ± 0.00	21.00 ± 0.00	21.00 ± 0.00	21.00 ± 0.00

表2 各组术后不同时间点 Cdh1 mRNA 表达

($\bar{x} \pm s$)

组别	第3天	第5天	第7天	第14天	第21天
A组	0.6706 ± 0.0005	0.6670 ± 0.0006	0.7100 ± 0.0008	0.6506 ± 0.0006	0.6296 ± 0.0015
B组	0.6703 ± 0.0010	0.6700 ± 0.0007	0.7139 ± 0.0048	0.6503 ± 0.0009	0.6298 ± 0.0010
C组	0.6707 ± 0.0006	0.7600 ± 0.0006	0.8309 ± 0.0024	0.7372 ± 0.0010	0.7272 ± 0.0027
D组	0.6702 ± 0.0003	0.4402 ± 0.0008	0.3103 ± 0.0009	0.2103 ± 0.0007	0.1904 ± 0.010
E组	0.9509 ± 0.0004	0.9597 ± 0.0019	0.9595 ± 0.0014	0.9594 ± 0.0015	0.9580 ± 0.0040
F组	0.9509 ± 0.0003	0.9598 ± 0.0031	0.9601 ± 0.0007	0.9603 ± 0.0008	0.9553 ± 0.0051

3 讨论

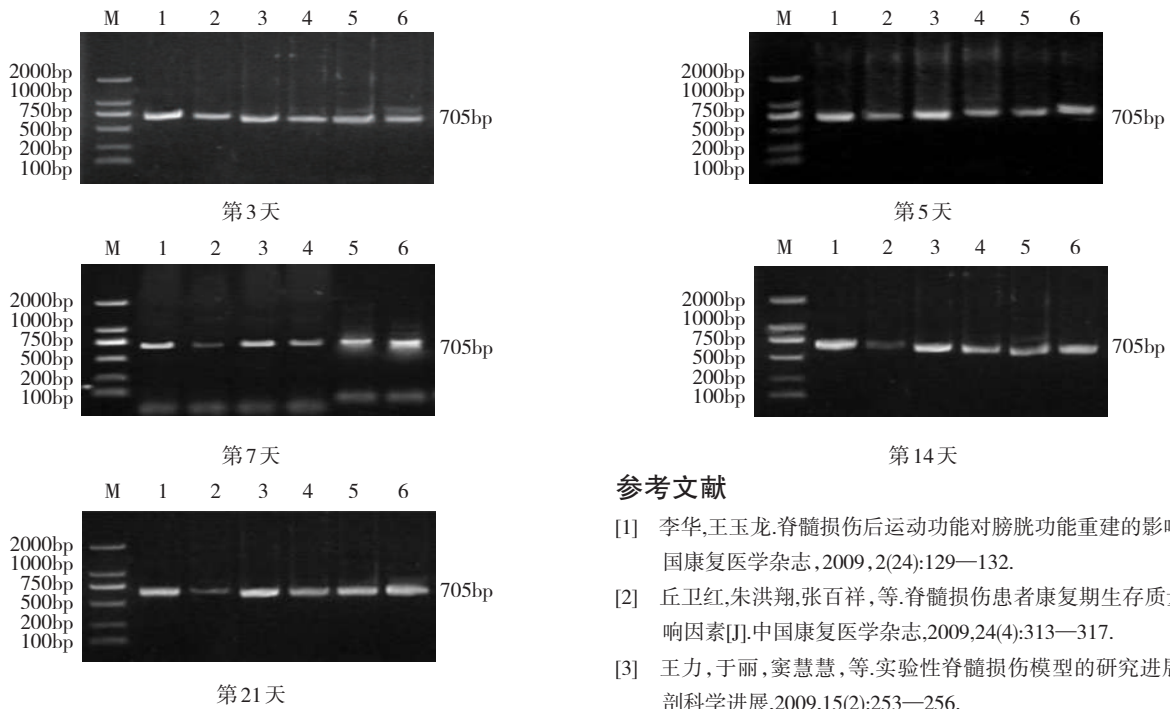
Cdh1 是细胞周期后期分裂促进复合物(ana-phase promoting complex, APC)的一个调节亚基,具有调控细胞周期进程及细胞周期转换的功能^[4]。在脑组织中有大量表达,主要定位于神经元,且具有调节神经元轴突生长及神经元存活的作用,提示其可能参与中枢神经系统损伤等病理生理过程^[5]。相关研究表明:急性SCI后 Cdh1 mRNA 的表达降低,是神经元变性、坏死和凋亡的重要因素^[4]。另有实验表明,Cdh1 mRNA 在大鼠损伤脊髓前、后角的神经元中大量表达,且损伤1周内表达量达高峰,2周时又下降但其神经功能却显著改善,表明 Cdh1 mRNA 可能参与SCI修复的病理生理过程^[6]。

现今大鼠脊髓损伤训练方式种类多样^[7],如:游泳训练、重量支撑平板运动、下肢辅助机器装置、减重步行训练、功能电刺激、自发跑转笼等;而每种训练都有其缺点不足:如平板运动不是啮齿类动物的

自然运动方式;下肢辅助机器装置客观、量化、可获取较多参数,便于进行运动学分析;但装置复杂,费用昂贵;又如减重步行训练在我国虽应用广泛但所涉及的病种尚不够深入,使用时需多名治疗师参与治疗,人力投入相对较大,限制了它在临床工作中的使用^[8]。因此,现阶段不论是临床治疗还是动物实验的训练方式上都需要多种方法联合应用,相互借鉴。实验中采用的自制减重步行训练器以平板训练为原理,配有减重及辅助屈腿屈踝装置,能够较为有效的预防SCI后异常的运动模式,且结构简单,成本低廉,符合我国目前的社会经济发展水平,是具有非常广泛市场前景的一种新型康复技术设备。

本实验以脊髓全横断大鼠为研究对象,应用减重步行训练结合针刺治疗方法,与单纯针刺组、训练器组、对照组进行比较。结果显示,减重步行训练结合针刺治疗更好的促进脊髓损伤局部 Cdh1 mRNA 的表达及下肢运动功能的恢复。这可能是由于步行

图1 术后各时间点各组电泳凝胶成像图谱



M: DNA Marker(DL2000); 1: F组; 2: D组; 3: E组; 4: A组; 5: B组; 6: C组

训练器结合针刺治疗可以激活中枢模式发生器^[8](central pattern generation, CPG),改善脊髓损伤局部血循环,减轻脊髓组织水肿,而对脊髓功能起保护作用的。尽管减重步行训练结合针刺治疗对促进脊髓损伤修复的具体机制尚不十分清楚,但减重步行训练结合针刺治疗促进 Cdh1 mRNA 的表达可能是其发挥治疗作用的重要途径之一。

参考文献

- [1] 李华,王玉龙.脊髓损伤后运动功能对膀胱功能重建的影响[J].中国康复医学杂志,2009,2(24):129—132.
- [2] 丘卫红,朱洪翔,张百祥,等.脊髓损伤患者康复期生存质量的影响因素[J].中国康复医学杂志,2009,24(4):313—317.
- [3] 王力,于丽,窦慧慧,等.实验性脊髓损伤模型的研究进展[J].解剖科学进展,2009,15(2):253—256.
- [4] 李平,姚文龙,钱巍,等.脊髓损伤后大鼠 Cdh1 mRNA 表达的变化[J].中国康复医学杂志,2009,24(1):12—14.
- [5] 姚文龙,张传汉,钱巍,等.APC-Cdh1 在中枢神经系统中的表达分布特点[J].第四军医大学学报,2009,30(13):1161—1164.
- [6] 祁月红,钱巍,李平,等.大鼠脊髓部分横切损伤后 APC-Cdh1 在损伤脊髓组织中的表达[J].中国神经免疫学和神经病学杂志,2009,16(4):285—288.
- [7] 丁晓晶,王红星,王彤.脊髓损伤大鼠运动训练方式的研究进展[J].中国康复医学杂志,2010,25(6):589—591.
- [8] 王斌,王静.减重步行训练在国内的应用进展[J].中国康复医学杂志,2010,25(8):815—817.