

·基础研究·

神经电刺激对大鼠脊髓钝挫伤后神经营养因子4和增殖细胞核抗原表达影响的研究*

曾茜¹ 向虹雨¹ 饶莹¹ 胡析¹ 曹蓝¹ 张晓² 梁楠^{2,3}

摘要

目的:探讨在电刺激干预下大鼠脊髓损伤节段神经生长因子(NT4)和增殖细胞核抗原(PCNA)的表达及对脊髓损伤的影响。

方法:成年雌性SD大鼠78只,随机分为3组:假手术组(n=6)、对照组(n=36)和实验组(n=36)。Allen's法复制SD大鼠T9脊髓钝挫伤模型。实验组脊髓钝挫伤后给予夹脊穴和足三里穴位神经电刺激干预。神经行为学评分后,运用免疫组化和蛋白质印迹(Western blot)来检测NT4、PCNA的表达变化。

结果:行为学观察,实验组大鼠术后1周BBB评分显著高于对照组($P < 0.05$),低于假手术组($P < 0.05$)。实验组第1—3天NT4表达显著升高($P < 0.05$),第7天达到峰值并且其表达明显高于对照组($P < 0.05$)。实验组第1—3天PCNA表达降低,第7天达到最大差异($P < 0.05$)。

结论:电刺激干预下,脊髓组织中神经元中的NT4表达增强,电刺激能改善运动功能恢复。神经电刺激后PCNA表达减少,神经电刺激对神经干细胞的分化作用大于神经干细胞的再生增殖。

关键词 脊髓损伤;神经电刺激;神经生长因子家族;增殖细胞核抗原

中图分类号:R744, R454.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2015)-11-1100-05

The impact of nerve electrical stimulation on the expressions of neurotrophin-4 and proliferating cell nuclear antigen after spinal cord contusion in rats/ZENG Xi, XIANG Hongyu, RAO Ying, et al//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2015, 30(11): 1100—1104

Abstract

Objective: To explore the impacts of nerve electrical stimulation on the expressions of neurotrophin-4 (NT4) and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) after spinal cord contusion in SD rats.

Method: Seventy-eight adult female SD rats were randomly divided into three groups: sham group (n=6), control group (n=36) and experimental group (n=36). SD rats were prepared according to Allen's method for T9 spinal cord contusion. Experimental group was given Jiaji (EX-B2) point and Zusanli (ST36) point nerve electrical stimulation intervention after spinal cord contusion (SCC). After neurobehavioral score assessment, immunohistochemistry and Western blot were used to detect the expressions of NT4 and PCNA at different time and in different groups.

Result: After spinal cord contusion on the 1st—3rd d SD rats, BBB score increased gradually, compared with control group, on the 7th d BBB score of experimental group restored significantly ($P < 0.05$). Immunohistochemistry and Western blot analysis showed that the experimental group compared with control group, NT4 expression raised, and reached the maximum difference until the 7th d ($P < 0.05$). PCNA expression depressed, and reached the maximum difference until the 7th d ($P < 0.05$).

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2015.11.003

*基金项目:2012年四川省教学质量工程大学生创新实验项目

1 成都医学院,成都,610083; 2 成都医学院基础医学实验教学中心; 3 通讯作者

作者简介:曾茜,男,2010级临床医学本科生; 收稿日期:2014-11-18

Conclusion: Nerve electrical stimulation can promote the expression of NT4 but not PCNA that may create nerve regeneration microenvironment which contribute to the recovery of hindlimb motor function in rats.

Author's address Chengdu Medical College, Chengdu, 610083

Key word spinal cord injury; nerve electrical stimulation; nerve growth factor families; proliferating cell nuclear antigen

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)是临床常见的神经系统损伤,具有相当高的致残率和死亡率,严重危及人类的健康,其损伤后的修复一直是医学领域的难点。近年来的研究表明电刺激能够促进脊髓再生^[1-2],但是神经电刺激促进脊髓再生的机制不清楚。神经营养因子-4(neurotrophin-4, NT4)是于1991年在蝾螈和非洲蟾蜍中发现的神经生长因子家族的第四个成员(nerve growth factor families),在维持感觉神经、交感神经元和运动神经元的存活、促进神经细胞的分化等方面发挥重要的作用。王廷华等^[3-4]用脊髓横断损伤的实验动物模型研究表明NT4具有调节突触可塑性的作用。但是,NT4在神经电刺激治疗脊髓损伤中发挥什么作用还不清楚。增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)是细胞增殖的标志,是观察脊髓神经细胞增殖的指标。因此,本实验采用改良的Allen方法制备动物模型,用BBB运动功能评分评价脊髓损伤运动功能的恢复,采用免疫组化及蛋白质印迹方法研究大鼠脊髓损伤后不同时相PCNA及NT4的表达,了解神经电刺激干预下NT4及PCNA的变化特点和关系,以及对脊髓损伤的影响,对临床应用NT4具有重要意义。

1 材料与方 法

1.1 动物分组及模型制备

成年健康清洁级SD大鼠78只(成都达硕实验动物有限公司提供),雌性,200—220g。随机分为假手术组(n=6)、对照组(具体分为1d、3d、7d、9d、11d和13d组,每组n=6)和实验组(具体分为1d、3d、7d、9d、11d和13d组,每组n=6)。3.6%水合氯醛腹腔麻醉后,俯卧位固定,在T9处依次切开皮肤、筋膜及肌肉,随后进行椎板切除术,暴露脊髓。选择10g金属棒在30mm处自由下落,实施脊髓钝挫伤(spinal cord contusion, SCC)模型。假手术组只进行椎板切除术,不实施打击。

1.2 模型后肢运动功能评分

采用Basso Beattie & Bresnahan评分^[5]。

1.3 神经电刺激干预

术后24h对实验组进行经皮电刺激30min,正极接T7水平对应的背侧皮肤,负极接右下肢小腿腓侧中上1/3位置的皮肤。干预参数为:每天1次,刺激频率10Hz,疏密波脉冲电流,电流强度2.5mA。

1.4 石蜡切片及标本获取

在相应的存活时间点对模型进行心脏灌注,根据不同的实验技术要求,分为酶免疫组化染色法组(1d组、3d组、7d组、9d组、11d组、13d组,每组n=6)及蛋白质印迹(Western blot, WB)组(1d组、3d组、7d组、9d组、11d组、13d组,每组n=6)。前者先快速用0.9%生理盐水(4℃),接着4%多聚甲醛溶液(PH=7.3,4℃)缓慢固定,48h后脱水、包埋及石蜡切片(厚度5μm,每例5张行免疫组化染色);后者直接先快速用0.9%生理盐水(4℃)后取材(1cm长损伤节段),于-80℃保存。

1.5 酶免疫组织化学染色

酶免疫组织化学染色(enzyme immunohistochemistry, IHC),按SP法进行免疫组化染色,具体步骤:烤片、脱蜡、水化、抗原修复,3%过氧化氢(过滤0.01MPBS配制)37℃封闭10min,5%羊血清(过滤0.01MPBS配制)37℃孵育25min,加一抗(兔抗,1:200)4℃过夜,漂洗,按SP试剂盒说明书依次加试剂B(37℃孵育15min)及试剂C(37℃孵育15min),两者间隔0.01M PBS漂洗5min 3次。一抗及SP试剂盒均购自中山金桥生物技术有限公司。DAB显色,0.01M PBS终止反应,复染、分色、反蓝、脱水、封片。

1.6 蛋白印迹

获取-80℃不同时间点样本,冰水浴上碾磨5min,于冰箱(4℃)放置1h后,10000r/min离心30min,取上清A280(nm)紫外光吸收法初步测定蛋白浓度。电泳分离,洗玻璃板并组装,将其垂直放置,制备5ml 8%分离胶溶液,取3.4ml加入玻璃板中,覆盖一层超纯水,分离胶聚合完全后(约30min),

倾出覆盖层,尽可能排除凝胶上液体。制备 2ml 5% 积层胶溶液,加入玻璃板至灌满后迅速插入梳子,待积层胶聚合完全后,置于 4℃ 冰箱中过夜。取出凝胶板,使之减冻至室温。在样品中按 1:4 体积比加入 5XSDS 上样缓冲液配制样品,在 100℃ 加热 5min 以使蛋白质变性。取出梳子,组装电泳槽。用去离子水洗涤加样槽,把凝胶固定于电泳装置上,上下槽各加入 Tris-甘氨酸电极缓冲液。按预定顺序加样 10μl,将电泳装置与电源相接,电泳直至溴酚蓝接近玻璃板底部,然后关闭电源。让后取出胶块转膜,将胶和滤纸 5 片浸于转移缓冲液中平衡 10min,按从负极到正极的顺序依次是滤纸、胶、滤纸制成膜装置。将转移槽置于冰浴中,放入装好的膜装置,加电转缓冲液,插上电极,1.5h(电流约为 300mA)。用漂洗液 TBST 2 次 5min,用 TBST 配置 5% 羊血清,封闭 1h。用 5% 羊血清按说明书的稀释比稀释一抗。一抗孵育 37℃ 1h 或 4℃ 冰箱中过夜,同法按说明书的稀释比稀释二抗。二抗孵育 37℃ 1h 底物孵育及显色。按 WB 化学发光试剂说明书进行底物显色,在暗室中,加入显色液 A 和 B,显色 5min,进行凝胶成像,进行灰度值测量。

1.7 细胞计数及统计学分析

Motic 光学显微镜 400× 视野下观察 NT4 和 PCNA 阳性细胞分布并计数。本实验所有数据均采用平均数±标准差表示,并用 SPSS 17.0 处理,根据数据特征采用单因素方差分析及独立样本 *t* 检验。

2 结果

2.1 神经电刺激促进大鼠脊髓钝挫伤后的运动功能恢复

在脊髓损伤前,大鼠的 BBB 评分是 21。脊髓损伤后对照组与实验组的 BBB 评分均降为 0,此后, BBB 评分逐渐上升。实验组评分与对照组相比,在 SCC 后第 7 天明显上调 ($P < 0.05$),并且实验 13d 组也高于对照组 ($P < 0.05$)。见图 1,表 1。

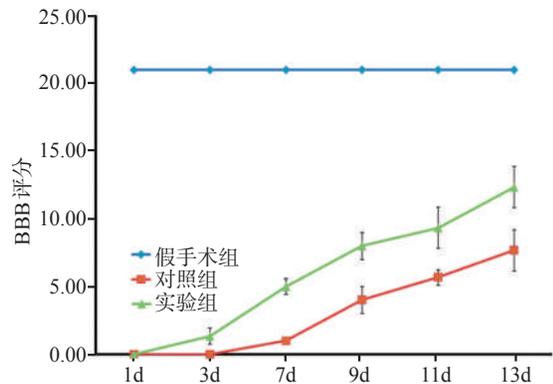
2.2 神经电刺激促进 NT4 的表达

表 1 脊髓钝挫伤后不同时间点大鼠的 BBB 评分 ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 1d | 3d | 7d | 9d | 11d | 13d |
|------|----|-----------|------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|
| 假手术组 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 |
| 对照组 | 0 | 0 | 1.00±0.00 | 4.00±1.00 | 5.67±0.58 | 7.67±1.53 |
| 实验组 | 0 | 1.33±0.58 | 5.67±0.58 ^① | 8.00±1.00 ^① | 9.33±1.53 ^① | 12.33±1.53 ^① |

①与对照组比较 $P < 0.05$

图 1 大鼠脊髓钝挫伤后的运动功能恢复(BBB 评分)



NT4 样免疫反应阳性产物呈棕色,在胞浆和胞核染色,胞浆染色比胞核深。并且,NT4 样免疫反应阳性产物分布于脊髓前角运动神经元与神经胶质细胞。

在对照组,脊髓前角 NT4 阳性细胞数少,细胞灰度值迅速下调。在第 3 天时 NT4 的免疫阳性反应呈弱阳性(图 2a);到第 7 天时,NT4 的表达比第 3 天有所增加(图 2b),第 9 天时 NT4 阳性表达比第 3 天增加,但是差异没有显著性意义(图 2c)。

在 SCC 后,实验组 NT4 的免疫阳性细胞数与对照组相比显著上调,实验组在 3d、7d 和 9d 组与对照组相比差异有显著性意义(图 2g), $P < 0.05$ 。见图 2,表 2。

2.3 神经电刺激后 PCNA 的表达

PCNA 免疫反应阳性产物呈棕色,定位于脊髓中央管神经上皮细胞核(图 3a)。

在对照组,脊髓中央管神经上皮细胞中的 PCNA 免疫阳性反应比实验组强,免疫阳性细胞数上调。3d 组,7d 组和 9d 组相比 PCNA 阳性表达没有显著性差异(图 3a,3b,3c)。

在 SCC 后,实验组与对照组相比,脊髓中央管 PCNA 阳性细胞数显著下调。实验 3d 组,7d 组和 9d 组与对照组相比差异有显著性意义(图 3g) ($P < 0.05$)。见图 3,表 3。

2.4 神经电刺激影响 NT4 和 PCNA 蛋白表达水平

Western blot 实验结果表明,NT4 蛋白在脊髓内

表 2 脊髓前角 NT-4 的表达 ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 3d(n=3) | 7d(n=3) | 9d(n=3) |
|-----|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 对照组 | 4.33±1.53 | 8.67±1.28 | 13.00±1.00 |
| 实验组 | 11.33±1.63 ^① | 13.67±1.33 ^① | 18.00±2.00 ^① |

①与对照组比较 $P < 0.05$

图2 神经电刺激促进脊髓前角NT4的表达(IHC, 400×)

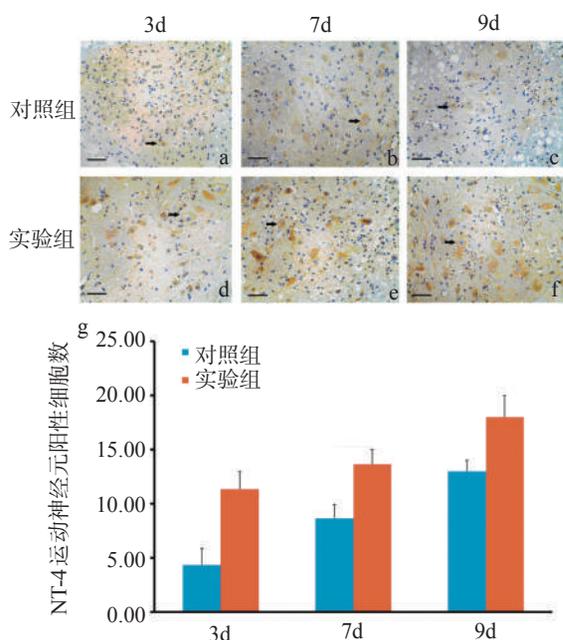


表3 脊髓中央管PCNA的表达 (x±s)

| 组别 | 3d(n=3) | 7d(n=3) | 9d(n=3) |
|-----|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 对照组 | 32.33±2.08 | 36.33±1.15 | 26.33±0.58 |
| 实验组 | 24.67±1.15 ^① | 20.67±0.58 ^① | 18.33±1.53 ^① |

与对照组比较:①P < 0.05

图3 神经电刺激抑制脊髓中央管PCNA的表达 (IHC, 400×)

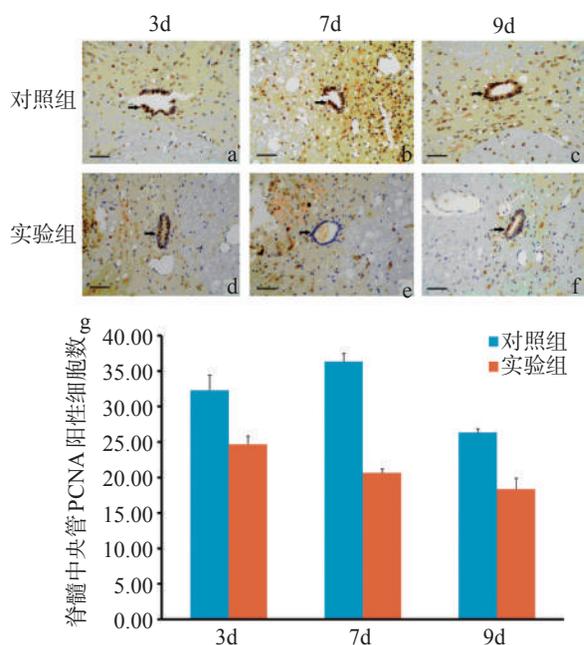


表4 NT-4蛋白相对表达值 (x±s)

| 组别 | 3d(n=3) | 7d(n=3) | 9d(n=3) |
|-----|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 对照组 | 768.31±94.24 | 968.51±23.20 | 1101.84±36.95 |
| 实验组 | 2254.35±31.95 ^① | 2556.25±21.73 ^① | 2836.45±89.03 ^① |

与对照组比较:①P < 0.05

表5 PCNA蛋白相对表达值 (x±s)

| 组别 | 3d(n=3) | 7d(n=3) | 9d(n=3) |
|-----|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 对照组 | 2462.35±145.40 | 2847.40±136.03 | 2229.02±53.43 |
| 实验组 | 602.21±51.57 ^① | 730.42±36.55 ^① | 618.60±85.56 ^① |

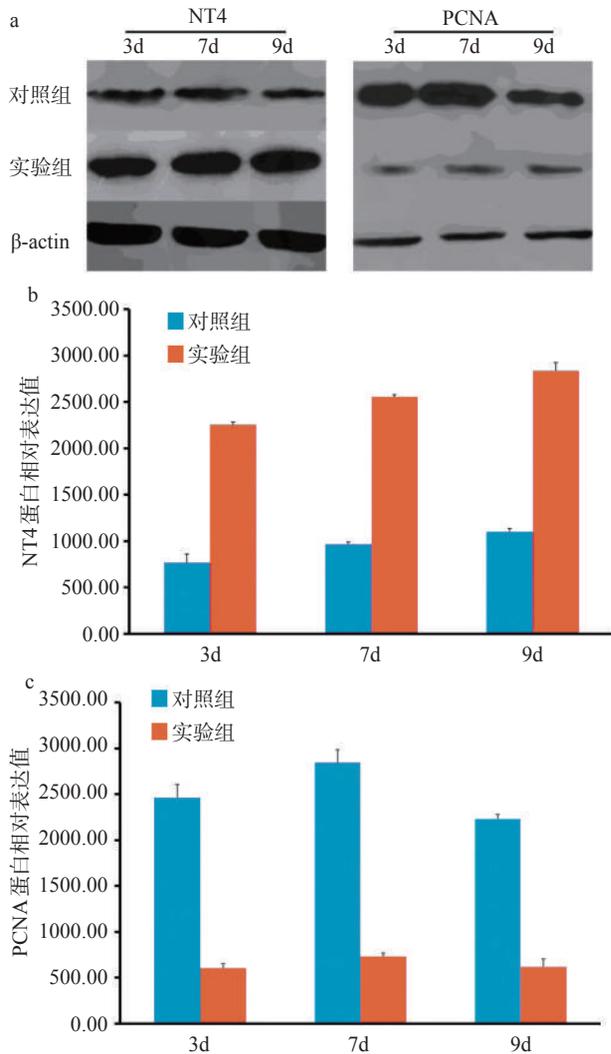
与对照组比较:①P < 0.05

3 讨论

本实验采用免疫组化方法定位研究大鼠脊髓损伤后不同时相NT4和PCNA的表达,采用蛋白质印迹方法研究大鼠脊髓损伤后蛋白的表达,结果表明损伤脊髓局部NT4表达明显增加。在电刺激组和对照组中,电刺激组大鼠BBB评分在脊髓损伤后第7天明显高于损伤对照组。在免疫组化实验中,电刺激组大鼠第3天脊髓前角NT4阳性细胞数显著上调,明显高于损伤对照组。在WB实验中,电刺激组大鼠NT4蛋白表达水平第3天表达迅速上调,明显优于对照组。这表明电刺激有利于促进大鼠后肢功能的恢复。其内在的机制可能是由于电刺激诱导NT4的表达,促进神经细胞的存活,减轻脊髓继发性损伤而致。另外电刺激可能加速神经营养因子的传输,促进受损伤的脊髓神经再生,建立新的轴突联系^[6-9]。

脊髓损伤后,如何提高神经元存活质量、促进神经元轴突的生长是恢复脊髓功能的关键。然而轴突的再生和受损神经元的存活受内、外环境多种因素的影响较大^[10-11]。神经营养物质(neurotrophins, NTs)在脊髓损伤发生机制上对运动神经元存活和运动功能恢复也发挥着重要的作用^[12-13],它能逆转受损神经元的萎缩和促进靶器官与皮质脊髓束建立功能联系,提高神经元存活率,最终使受损神经修

图4 神经电刺激影响NT4和PCNA蛋白表达水平



复;如果没有NT4的营养,神经元胞体会很快死亡。因此,电刺激促进NT4的表达增加,从而创造有利于神经再生的微环境。

PCNA是细胞核增殖抗原,是细胞增殖的标志。脊髓受损后,需要不断补充新的神经细胞。本实验观察到在脊髓中央管的神经上皮细胞随着脊髓受损时间的延长,神经电刺激不能使PCNA阳性细胞数显著增加,提示脊髓损伤后神经电刺激的作用主要是促进脊髓神经管神经上皮细胞的不断分化,因此,电刺激后PCNA的表达增加不明显,提示在神经中央管的神经干细胞分化大于增殖,因此导致

PCNA的表达不显著。

综上所述,在神经电刺激干预下,脊髓组织中神经元中的NT4表达增强,电刺激能促进神经元的存活,有利于运动功能的恢复;另外,神经电刺激对神经干细胞的分化作用大于神经干细胞的再生增殖作用。

参考文献

- [1] Boldt I, Eriks-Hoogland I, Brinkhof MW et al. Non-pharmacological interventions for chronic pain in people with spinal cord injury. The Cochrane database of systematic reviews [J].2014,11:1—85.
- [2] Schuhfried O, Crevenna R, Fialka-Moser V et al. Non-invasive neuromuscular electrical stimulation in patients with central nervous system lesions: an educational review.Journal of rehabilitation medicine[J].2012 ,44(2):99—105.
- [3] 高志宇.成年恒河猴脊髓半横断损伤后NGF、NT-4的表达及变化[D].昆明:昆明医学院,2005.
- [4] 龙双链,刘芬,王廷华,等.针刺对备用背根节和脊髓NT-4表达的影响[J].四川大学学报(医学版),2005,36(5):625—629.
- [5] Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats[J]. J Neurotrauma, 1995, 12(1):1—21.
- [6] 张卉,田芸,饶莹.经皮电刺激对脊髓损伤后GFAP和NT-3表达的影响[J].中国临床研究,2012,25(10):940—943.
- [7] 陈虹,李俊岑,党彦丽,等.电刺激对大鼠脊髓损伤后神经生长因子表达的影响[J].中国康复理论与实践,2012,18(1):33—36.
- [8] 卢帆,李典,杨拯,等.电刺激对脊髓损伤大鼠巢蛋白与GFAP表达的影响[J].实用骨科杂志,2012,18(1):32—36.
- [9] 廖麟荣,王俊.功能性电刺激在不完全性脊髓损伤患者步行中的应用研究进展[J].中国康复医学杂志,2011,26(3):284—287.
- [10] Runge EM, Hoshino N, Biehl MJ, et al. Neurotrophin-4 is more potent than brain-derived neurotrophic factor in promoting, attracting and suppressing geniculate ganglion neurite outgrowth[J]. Dev Neurosci, 2012, 34(5):389—401.
- [11] Chung JY, Kim MW, Bang MS, et al. Increased expression of neurotrophin 4 following focal cerebral ischemia in adult rat brain with treadmill exercise[J]. PLoS One, 2013, 8 (3):e52461.
- [12] Bothwell M. NGF, BDNF, NT3, and NT4[J]. Handb Exp Pharmacol, 2014, (220):3—15.
- [13] Jones J, Estirado A, Redondo C, et al. Mesenchymal stem cells improve motor functions and decrease neurodegeneration in ataxic mice[J]. Mol Ther, 2015, 23(1):130—138.