

·基础研究·

联合应用督脉电针和游泳训练后脊髓损伤大鼠神经干细胞分化方向的研究*

李灵玲¹ 周达岸^{2,3} 杨燕兴¹ 王 良¹ 刘鹏氏¹

摘要

目的:联合应用督脉电针和游泳训练后,研究脊髓损伤大鼠神经干细胞分化的方向。

方法:复制并评价脊髓全横断损伤大鼠模型,75只大鼠随机分为5组:假手术组、脊髓损伤组、脊髓损伤+督脉电针组、脊髓损伤+游泳训练组、脊髓损伤+督脉电针+游泳训练组(n=15),检测各组1周、2周、3周、4周、5周5个时间点脊髓组织神经生长因子(NGF)、胶质纤维酸性蛋白(GFAP)的表达,对各组大鼠进行BBB评分(Basso, Beattie & Bresnahan locomotor rating scale, BBB scale)。

结果:各治疗组均能使不同时间点脊髓损伤大鼠BBB评分、脊髓组织NGF表达水平提高($P < 0.05$);脊髓组织GFAP表达水平下降($P < 0.05$);提示游泳训练和督脉电针联合干预对促进脊髓损伤的康复效果更佳。各治疗组随着干预时间的增加表现出不同程度的BBB评分、脊髓组织NGF表达水平提高($P < 0.01$),脊髓组织GFAP表达水平下降($P < 0.01$);尽量长时间的应用游泳训练和督脉电针对促进脊髓损伤大鼠运动功能恢复的疗效最佳。

结论:联合应用督脉电针与游泳训练后,神经干细胞分化方向得到控制,使脊髓组织NGF表达增强,GFAP表达被抑制,从而促进神经元的再生和修复,抑制星形胶质细胞持续反应性增生,减少胶质瘢痕组织生成,促进神经环路重建。

关键词 神经干细胞;督脉电针;游泳训练;脊髓损伤;神经环路

中图分类号:R744, R329.2 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2016)-02-0172-05

Effects of Du Mai electroacupuncture combined with swim training on differentiation of neural stem cell after spinal cord injury in rats/LI Lingling, ZHOU Daan, YANG Yanxing, et al//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2016,31(2): 172—176

Abstract

Objective: To investigate the effect of Du Mai electroacupuncture and Swim Training on differentiation of neural stem cell after spinal cord injury in rats.

Method: Copy and evaluate rat model after spinal cord injury (SCI). The rats were randomly divided into five groups: sham operation group, SCI group, SCI and Du Mai electroacupuncture group (SCI+EA), SCI and Swim Training group (SCI+ST), SCI with Du Mai electroacupuncture and Swim Training group (SCI+DA+ST). Detected the expression of nerve growth factor (NGF), glial fibrillary acidic protein (GFAP) at 1w, 2w, 3w, 4w, 5w five time points.

Result: The scores of BBB scales, levels of NGF increased ($P < 0.05$) and the expression of GFAP depressed ($P < 0.05$) in treatment groups at different time points respectively. The combination therapy of ST and DE was better in promoting the recovery of motor function for SCI rats. With the intervention time change, the treatment groups show different degrees of BBB score, expression of NGF increased ($P < 0.01$) and expression

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2016.02.009

*基金项目:辽宁医学院校长基金——奥鸿博泽研究生科研创新基金

1 辽宁医学院,锦州,121001; 2 辽宁医学院附属第三医院; 3 通讯作者

作者简介:李灵玲,女,硕士研究生; 收稿日期:2015-06-25

of GFAP decreased ($P < 0.01$). Extend the application of ST and ED on SCI rats to recovery of motor function is the best curative effect.

Conclusion: The combination therapy of ST and EA can control the differentiation of neural stem cell, enhance the expression of NGF and inhibit the expression of GFAP, so as to promote neuronal regeneration and repair, prevent sustained reactive hyperplasia of astrocyte cells, reduce glial scar tissue, thus promote neural circuit reconstruction.

Author's address Liaoning Medical College, Jinzhou, 121001

Key word neural stem cells; acupuncture; swimming training; spinal cord injury; neural circuits

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)后首先表现为脊髓组织及结构直接被破坏,继而在损伤局部发生缺血、缺氧、创伤后炎症反应、细胞凋亡等一系列变化,致使神经元变性坏死、神经胶质细胞修复功能被抑制,胶质细胞在损伤区域聚集,并分泌大量细胞外基质共同形成瘢痕组织,阻碍神经元再生及神经功能恢复^[1]。

虽然细胞治疗给SCI患者带来了很大的希望,但真正应用于临床还是有一定的难度,很难作为一线治疗大范围应用,且目前临床遇到最多的问题是急性期手术后需长时间的康复训练,以促进损伤后肢体功能障碍恢复,所以康复训练对于神经系统损伤的补偿作用非常重要。目前康复联合疗法已经越来越受到重视,但是游泳训练联合督脉电针的治疗方案尚无研究,本文采用脊髓损伤实验动物,对联合应用督脉电针和游泳训练的脊髓损伤大鼠神经干细胞的分化方向进行研究,从而进一步指导临床康复。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康SPF级SD雌性大鼠75只,体重(240±20)g,由辽宁医学院实验动物中心提供。随机分为5组:假手术组、脊髓损伤组、脊髓损伤+督脉电针组、脊髓损伤+游泳训练组、脊髓损伤+督脉电针+游泳训练组(联合治疗组)(n=15)。实验中对动物处置方法符合相关伦理学要求。

1.2 大鼠模型复制

7%水合氯醛注射麻醉(500mg/kg)^[2],俯卧。以胸T9—T11节段骨性标志为中心,无菌操作下沿棘突做纵行切口约4cm,剥离筋膜、脂肪、钝性分离椎旁肌,暴露术野。咬除T9—T11棘突、T10椎板并打开椎管,充分暴露硬膜囊背面及两侧。10号手术刀

于T10节段处连同硬脊膜和脊髓一同快速咬除,大鼠后肢痉挛性抽搐数次后软瘫。硬脊膜切口用胸背部筋膜片覆盖,逐层缝合。假手术组仅切断棘突、椎板,显露脊髓,不予切除,其余同上^[3-4]。

1.3 术后护理

术后单独饲养,每天对各实验组动物早晚各排尿1次至排尿反射恢复;术后每天1次腹腔注射青霉素80000U,预防感染,持续5d;术后每天腹腔注射5%葡萄糖注射液2ml以补充体液和能量,维持5d。每天注意观察皮肤有无压疮或感染,下肢、尾巴有无溃烂、自噬。

1.4 处理方法和仪器

1.4.1 督脉电针治疗:督脉电针组和联合治疗组大鼠行脊髓横断手术后第5天开始进行督脉电针治疗,方法如下:动物俯卧位捆绑固定,根据《大鼠穴位图谱的研制》^[5],选取督脉大椎、命门两穴位,各用一次性针灸针(长25mm,直径0.30mm)沿棘突间隙刺入,选择4Hz、疏密波,电流强度以大鼠背部及后肢出现颤动为度,30min/次,1次/天。

1.4.2 游泳训练:游泳条件:自制塑料游泳池,130cm×70cm×60cm,水深为大鼠身体长度的2倍,水温(30±3)℃。正式训练前游泳训练组和联合治疗组大鼠进行3天适应性游泳训练。游泳训练组和联合治疗组于脊髓横断损伤后第5天开始行游泳训练,自由游泳,游泳训练5min,休息5min为一组治疗,术后第1周训练1组,术后第2周训练2组,术后第3周训练3组,以此类推。每次游泳出水后吹干动物回笼。

1.5 术后动物行为学观察

BBB评分法观察动物的髓、膝、踝关节及躯干的运动和协调情况,为保证实验结果的准确性,在观察时采取四人分别观察记录打分的方法,整理数据

后求平均分,并对其进行统计学处理。各组大鼠从手术第1、3、5、7天进行运动功能评分。

1.6 Western Blot 检测神经生长因子 (nerve growth factor, NGF) 的表达

制备脊髓组织样品蛋白,4℃,14000r/min 离心15min,取上清-20℃冻存。经蛋白定量,制胶,上样,电泳,转膜后,加一抗,4℃孵育过夜,洗膜后加HRP标记的羊抗兔IgG(1:3000),37℃条件下孵育1h。洗膜后ECL作用后胶片曝光,经显影、定影处理后观察结果并扫描分析。

1.7 免疫组化检测胶质纤维酸性蛋白的表达

免疫组化染色:分别在手术后1、2、3、4、5周,用7%水合氯醛腹腔注射麻醉(500mg/kg),经左心室灌注生理盐水及4%多聚甲醛充分冲洗固定后,完整取出距脊髓损伤处上、下约1cm的脊髓组织,行脱水、浸蜡、包埋、切片、烤片、烘片、脱蜡、免疫组织化学染色。胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)阳性反应于细胞胞浆呈棕黄色染色。

显微镜下(40×10倍)对每张切片任选3个不重叠视野进行摄像。应用Image-Pro Plus 5.1彩色病理图文分析系统(Olympus公司)测定GFAP阳性产物的平均积分光密度值与其面积的比值。

1.8 统计学分析

实验数据采用SPSS 17.0软件进行统计处理,实验结果以均数±标准差表示。

2 结果

2.1 实验动物数量分析

麻醉意外造成脊髓损伤组、督脉电针组各死亡2只,术后5天内因腹胀造成联合组死亡5只大鼠,均及时补充大鼠并完成实验。

2.2 大鼠BBB评分结果

脊髓损伤模型组和脊髓损伤+督脉电针组、脊髓损伤+游泳训练组、脊髓损伤+督脉电针+游泳训练组在术后1d、3d、5d、7d与假手术组比较有显著差异($P < 0.01$)。SCI模型复制成功。见表1。

表1 各组大鼠BBB评分

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

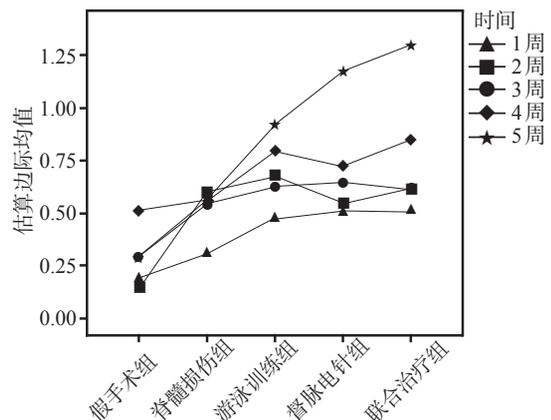
组别	例数	BBB评分(分)			
		第1天	第3天	第5天	第7天
假手术组	15	21.00±0.000	21.00±0.000	21.00±0.000	21.00±0.000
脊髓损伤组	15	0.000±0.000 ^①	1.250±0.500	2.250±0.957	4.000±0.816
脊髓损伤+游泳训练组	15	0.000±0.000 ^①	2.000±0.816 ^①	4.000±0.817 ^①	4.250±0.957 ^①
脊髓损伤+督脉电针组	15	0.000±0.000 ^①	1.750±0.500 ^①	3.000±0.817 ^①	7.000±0.817 ^①
脊髓损伤+督脉电针+游泳训练组	15	0.000±0.000 ^①	2.000±0.816 ^①	3.250±0.957 ^①	7.000±0.817 ^①

与正常对照组比较:① $P < 0.01$

2.3 各组大鼠不同时间点 NGF、GFAP 表达结果

脊髓损伤术后1周、2周、3周各治疗组 NGF 表达量与脊髓损伤组相比,差异无显著性意义($P > 0.05$);治疗后4周各治疗组与脊髓损伤组相比,差异有显著性意义($P < 0.05$),游泳训练组及联合治疗组差异有显著性意义($P < 0.01$);治疗后5周各治疗组与脊髓损伤组相比,差异有显著性意义($P < 0.01$)。通过组内两两比较,脊髓损伤术后1周、2周、3周联合治疗组与游泳训练组及督脉电针组差异无显著性意义($P > 0.05$);脊髓损伤术后4周,联合治疗组与督脉电针组比较差异具有显著性意义($P < 0.01$),与游泳训练组比较差异无显著性意义($P > 0.05$);脊髓损伤术后5周,联合治疗组与游泳训练组比较差异具有显著性意义($P < 0.01$),与督脉电针组比较差异无显著性意义($P > 0.05$),见表2。

图1 NGF的估算边际均值



前4周各组NGF表达量与时间变化的趋势大致相同,第5周NGF表达量明显增加,且联合治疗组显著优于其他治疗组。见图1。

脊髓损伤术后2周各治疗组GFAP表达量与脊髓损伤组相比,差异无显著性意义($P > 0.05$);治疗后3周各治疗组与脊髓损伤组相比,差异无显著性意义($P > 0.05$);治疗后4周各治疗组与脊髓损伤组相比,差异具有显著性意义($P < 0.01$);治疗后5周各治疗组与脊髓损伤组相比,差异具有显著性意义

($P < 0.01$)。组内两两比较分析结果显示,脊髓损伤术后1周,2周联合治疗组与游泳训练组及督脉电针组差异无显著性意义($P > 0.05$);脊髓损伤术后3周,联合治疗组与游泳训练组比较差异具有显著性意义($P < 0.01$),与督脉电针组比较差异无显著性意义($P > 0.05$);脊髓损伤术后4周、5周,联合治疗组与游泳训练组及督脉电针组比较差异均具有显著性意义($P < 0.01$)。见表3。

表2 各组大鼠脊髓组织中NGF的表达

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

组别	例数	灰度值比值(NGF/ β -actin)				
		第1周	第2周	第3周	第4周	第5周
假手术组	15	0.190 \pm 0.108	0.153 \pm 0.031	0.293 \pm 0.788	0.511 \pm 0.026	0.289 \pm 0.012
脊髓损伤组	15	0.313 \pm 0.144	0.600 \pm 0.188 ^①	0.546 \pm 0.044	0.561 \pm 0.053	0.563 \pm 0.208 ^②
脊髓损伤+游泳训练组	15	0.477 \pm 0.115	0.673 \pm 0.155 ^①	0.626 \pm 0.145	0.794 \pm 0.053 ^②	0.919 \pm 0.010 ^②
脊髓损伤+督脉电针组	15	0.506 \pm 0.175	0.549 \pm 0.168	0.648 \pm 0.117 ^①	0.722 \pm 0.060 ^①	1.175 \pm 0.086 ^②
脊髓损伤+督脉电针+游泳训练组	15	0.518 \pm 0.382	0.618 \pm 0.148 ^①	0.614 \pm 0.154	0.850 \pm 0.063 ^②	1.300 \pm 0.056 ^②

与假手术组比较:① $P < 0.05$;② $P < 0.01$

表3 各组大鼠脊髓组织中GFAP的表达

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

组别	例数	GFAP平均积分光密度值比值(IOD/面积)				
		第1周	第2周	第3周	第4周	第5周
假手术组	15	0.019 \pm 0.014	0.084 \pm 0.030	0.060 \pm 0.060	0.061 \pm 0.003	0.120 \pm 0.002
脊髓损伤组	15	0.032 \pm 0.007	0.032 \pm 0.007 ^①	0.073 \pm 0.011 ^①	0.359 \pm 0.005 ^②	0.322 \pm 0.026 ^②
脊髓损伤+游泳训练组	15	0.076 \pm 0.010 ^②	0.019 \pm 0.007 ^②	0.052 \pm 0.012 ^②	0.128 \pm 0.019 ^②	0.137 \pm 0.005
脊髓损伤+督脉电针组	15	0.005 \pm 0.003	0.036 \pm 0.011 ^①	0.022 \pm 0.013 ^①	0.100 \pm 0.014 ^②	0.015 \pm 0.004 ^②
脊髓损伤+督脉电针+游泳训练组	15	0.001 \pm 0.001 ^①	0.012 \pm 0.006 ^②	0.017 \pm 0.006 ^②	0.011 \pm 0.002 ^②	0.003 \pm 0.002 ^②

与假手术组比较:① $P < 0.05$;② $P < 0.01$

3 讨论

神经干细胞(neural stem cells, NSCs)受诸多因子及信号通路调控,可分化为不同亚型的神经元,少突胶质细胞和星形胶质细胞^[6],本研究探讨了脊髓损伤后NGF及GFAP的表达情况,从而观察神经干细胞的分化方向,并通过康复治疗调控神经干细胞分化方向,使神经康复得到进一步的发展。目前常用的康复训练包括动物的步行、游泳、阶梯行走等,已经积累的证据表明,动物模型中特定康复训练可促进轴突再生和突触的可塑性^[7]。Magnuson等^[8]采用LSS方法对SCI大鼠游泳后的功能恢复进行评估,证实游泳训练有助于脊髓损伤后大鼠运动功能的恢复。督脉电针在功能性电刺激的基础上选择督脉穴位为刺激点,使传统电刺激疗法进一步发展,从而促进轴突再生,加速神经环路重建。如表2所示,脊髓损伤后4周、5周联合治疗组NGF表达显著高

于单一治疗组,差异有显著性意义($P < 0.01$)。由此可见治疗时间越长对于神经生长因子表达作用越明显,康复治疗需要长时间的坚持,从而增加NGF的表达量,促进神经重建,并为将来临床康复治疗提供基础研究。

胶质原纤维酸性蛋白最初发现于慢性多发性硬化症患者的白质斑块中,是星形胶质细胞骨架蛋白的特有成分,因此作为星形胶质细胞的成熟标志^[9]。Geng X等^[10]发现抑制Notch信号通路后可抑制神经干细胞分化为星形胶质细胞,从而抑制GFAP蛋白的表达,并促进神经干细胞增殖和分化,减少胶质瘢痕形成,使神经回路更快重建。突触的可塑性使脊髓损伤后的脊髓功能恢复潜力巨大,而NGF是一种特殊的蛋白质,已被证明能够促进和维持神经生长、生存和执行功能,并可修复受伤神经元^[11]。其在周围神经系统中可支持神经元存活并促

进轴突生长^[12],还可促进感觉神经元轴突的丝状伪足和分支形成^[13]。Yi X等^[14]通过NGF基因转染,证明成年大鼠脊髓损伤后,NGF可诱导的感觉神经元的轴突延伸,从而刺激局部运动神经纤维生成。本实验结果与前期研究一致,如表3所示,脊髓损伤后4周、5周各治疗组与其他治疗组相比,差异具有显著性统计学意义($P < 0.01$)由此可见联合疗法优于单独疗法,可降低SCI后大鼠胶质原纤维酸性蛋白的生成,从而减少胶质瘢痕的生成,减少神经重建的阻力,促进康复恢复。

针对脊髓损伤,各种治疗方法层出不穷,如细胞移植、基因治疗、针灸治疗、药物治疗、康复训练、手术治疗等,随着研究的不断深入,人们逐渐意识到单一的治疗方法很难取得令人满意的效果,因此联合几种疗法成为了目前治疗脊髓损伤的主流,尤其是康复训练+针灸治疗,可调控干细胞分化、减少抑制性因子和瘢痕组织生成、补充神经营养因子,从而增强中枢神经元的生长潜能,通过析因分析结果显示:联合治疗组相比单独应用督脉电针组或者游泳训练组来讲,均可很好地抑制GFAP表达,而上调NGF表达方面,因5周时差异有显著性意义,因此时间长短有着非常重要的意义。综合来看,联合疗法优于单一疗法,且干预时间越长疗效越好。因此,本研究证实游泳训练联合督脉电针的联合疗法对脊髓全横断大鼠神经重建作用最显著。

参考文献

- [1] Hamid S, Hayek R. Role of electrical stimulation for rehabilitation and regeneration after spinal cord injury: an overview[J]. Eur Spine J, 2008, 17(9):1256—1269.
- [2] 李少春,马丽娜,李峰杰,等.不同浓度水合氯醛对大鼠的麻醉作用比较[J].中国药业,2014,23(19):22—23.
- [3] 吴卓,汪玉良.脊髓损伤动物模型的研究进展[J].中国矫形外科杂志,2014,22(12):1086—1089.
- [4] 陈萌,马泉,郑小影,等.大鼠脊髓横断模型的建立及米诺环素对胶质纤维酸性蛋白表达的影响[J].解剖学杂志,2014,37(3):352—355.
- [5] 华兴邦,周浩良.大鼠穴位图谱的研制[J].实验动物与动物实验,1991,(1):1.
- [6] 杨大伟,靳春杰,吕冬甫,等.神经干细胞移植对脊髓创伤后神经再生促进作用的研究进展[J].滨州医学院学报,2014,37(1):60—62.
- [7] Fouad K, Hurd C, Magnuson DS. Functional testing in animal models of spinal cord injury: not as straight forward as one would think[J]. Front Integr Neurosci, 2013, (7):85.
- [8] Magnuson DS, Smith RR, Brown EH, et al. Swimming as a model of task-specific locomotor retraining after spinal cord injury in the rat[J]. Neurorehabil Neural Repair, 2009, 23(6):535—545.
- [9] 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.
- [10] Geng X, Sun T, Li JH, et al. Electroacupuncture in the repair of spinal cord injury: inhibiting the Notch signaling pathway and promoting neural stem cell proliferation[J]. Neural Regen Res, 2015, 10(3):394—403.
- [11] Song Q, Xu R, Zhang Q, et al. Therapeutic effect of transplanting bone mesenchymal stem cells on the hind limbs' motor function of rats with acute spinal cord injury[J]. Int J Clin Exp Med, 2014, 7(1):262—267.
- [12] Bodmer D, Levine-Wilkinson S, Richmond A, et al. Wnt5a mediates nerve growth factor-dependent axonal branching and growth in developing sympathetic neurons [J]. J Neurosci, 2009, 29(23):7569—7581.
- [13] Ketschek A, Gallo G. Nerve growth factor induces axonal filopodia through localized microdomains of phosphoinositide 3-kinase activity that drive the formation of cytoskeletal precursors to filopodia[J]. J Neurosci, 2010, 30(36):12185—12197.
- [14] Yi X, Jin G, Tian M, et al. Porous chitosan scaffold and ngf promote neuronal differentiation of neural stem cells in vitro[J]. Neuro Endocrinol Lett, 2011, 32(5):705—710.