

·基础研究·

神经根磁刺激对慢性不完全性脊髓损伤大鼠髓鞘修复的影响*

杨琦¹ 赵丹¹ 陈玉辉² 许东升^{3,4,5}

摘要

目的:观察神经根磁刺激对慢性不完全性脊髓损伤大鼠髓鞘修复的影响。

方法:将18只雄性SD大鼠按随机数字表法分为假手术组、模型组、治疗组,每组6只,模型组建立钳夹型脊髓损伤大鼠模型,治疗组于脊髓损伤术后第11天开始为期14天的治疗。治疗结束后处死大鼠,采用实时荧光定量PCR检测损伤处脊髓组织脑源性神经营养因子(BDNF)、神经营养素-3(NT-3)、胶质纤维源性酸性蛋白(GFAP)的mRNA表达;采用Western Blot方法检测髓鞘碱性蛋白(MBP)的表达;采用免疫荧光染色观察损伤区MBP的表达;采用LFB髓鞘染色(Luxol Fast Blue, LFB)观察损伤区髓鞘的病理变化。

结果:神经根磁刺激治疗后大鼠BDNF、NT-3 mRNA及MBP蛋白的表达与模型组比较均明显上调($P<0.05$)。LFB髓鞘染色显示治疗组髓鞘结构较模型组排列紧密,空泡减少,具有显著性差异($P<0.05$)。

结论:神经根磁刺激可以促进慢性不完全性脊髓损伤大鼠髓鞘结构的修复。

关键词 脊髓损伤;神经根磁刺激;髓鞘;脑源性神经营养因子;神经营养素-3

中图分类号:R651.2,R493 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2021)-05-0514-06

Effects of nerve root magnetic stimulation on myelin repair in rats with chronic incomplete spinal cord injury/YANG Qi, ZHAO Dan, XU Dongsheng//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2021, 36(5): 514—519

Abstract

Objective: To observe the effect of nerve root magnetic stimulation on myelin repair in rats with chronic incomplete spinal cord injury.

Method: Eighteen male SD rats were randomly divided into sham operation group, model group and treatment group, with 6 rats in each group. The rat model of spinal cord injury with vertical clamp was established. The treatment group was given therapy for 14 days from the 11th day after spinal cord injury. The expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF), neurotrophin-3 (NT-3) mRNA and glial fibrillary acidic protein (GFAP) in the injured spinal cord were detected by quantitative real-time PCR. The expression of MBP in the injured area was observed by Western blot and immunofluorescence staining. The pathological changes of myelin in the injured area were observed by LFB staining.

Result: Quantitative real-time PCR showed that the expression of BDNF and NT-3 mRNA were significantly up-regulated ($P<0.05$). Western blot showed that the expression of MBP was higher than that of the model group. LFB staining showed that the myelin structure of the treatment group was more closely arranged than that of the model group accompanied by the decreased number of vacuoles ($P<0.05$).

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2021.05.002

*基金项目:国家自然科学基金面上项目(81772453,81974358)

1 同济大学附属同济医院康复中心,上海,200065; 2 同济大学附属同济医院神经内科; 3 上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院康复医学中心; 4 中医智能康复教育部工程研究中心; 5 通讯作者

第一作者简介:杨琦,女,硕士研究生; 收稿日期:2021-02-20

Conclusion: Nerve root magnetic stimulation can promote the repair of myelin in rats with chronic incomplete spinal cord injury.

Author's address Rehabilitation Center, Tongji Hospital, Tongji University, Shanghai, 200065

Key word spinal cord injury; nerve root magnetic stimulation; myelin; brain-derived neurotrophic factor; neurotrophin-3

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)是指因不同原因引起脊髓正常结构、功能改变,造成损伤平面以下的感觉、运动等功能障碍的一种中枢神经系统的严重创伤性、致残性疾病,它不仅严重影响了患者的生活质量,而且给家庭和社会带来了巨大的负担^[1]。脊髓损伤后的病理生理学十分复杂,研究表明,SCI后神经功能的丧失不仅因为大量神经元的丧失,轴突脱髓鞘也是重要原因之一^[2-4]。脊髓损伤后短时间内少突胶质细胞大量丢失,导致轴突脱髓鞘变化,持续3周,甚至更长时间,同时恶劣的微环境抑制少突胶质前体细胞增殖分化,损伤区脱髓鞘呈进行性变化,进一步加重SCI^[5-6]。经颅磁刺激可以促进神经系统合成和分泌内源性神经营养因子,促进神经结构与功能的恢复,因此,被广泛应用于中枢神经系统疾病的治疗^[7-9]。本研究将应用神经根磁刺激治疗慢性不完全性脊髓损伤大鼠,观察神经根磁刺激对脊髓损伤大鼠髓鞘修复的影响,探讨神经根磁刺激促进脊髓损伤康复的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

健康成年雄性、清洁级SD大鼠18只,体质量200—220g,购自上海杰斯捷实验动物有限公司[动物生产许可证号:SCXK(沪)2018-0006],按随机数字表法分为Sham组:假手术组,SCI组:模型组,RMS组:治疗组,每组6只。实验过程中严格遵守中华人民共和国科技部2006年颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》的规定。

1.2 实验器材与试剂

主要器材:动脉瘤夹(美国FST);经颅磁刺激仪(江西脑调控技术发展有限公司);主要试剂:戊巴比妥钠;一抗兔源GAPDH抗体(美国Abcam);兔源GFAP抗体(美国Abcam);兔源MBP抗体(美国CST);山羊抗兔二抗(上海碧云天生物技术有限公司);HRP化学发光试剂盒(美国Millipore)。

1.3 模型制备

大鼠适应性饲养1周后,采取Rivlin等^[10]的方法制备钳夹型脊髓损伤大鼠模型。模型组:采用1%戊巴比妥钠(40mg/kg)将大鼠麻醉,俯卧位固定在恒温手术台,通过外科手术切除椎板以暴露T9—T10节段脊髓,持三角针尖端,利用钝端穿过锥体和脊髓硬脊膜之间挑起脊髓,持动脉瘤夹钳夹脊髓20s,可见大鼠四肢痉挛抽搐或有摆尾现象,局部脊髓表面充血。术后腹腔注射青霉素(100U/d),连续3d预防感染,每日按摩大鼠腹部以防止尿潴留,直到自主排尿功能恢复。造模后1d采用Basso Beattie Bresnahan(BBB)运动功能评分,BBB评分<3分为造模成功。假手术组:仅手术切除椎板,暴露T10—T11脊髓,形成通道,不损伤脊髓,止血消毒后逐层缝合。

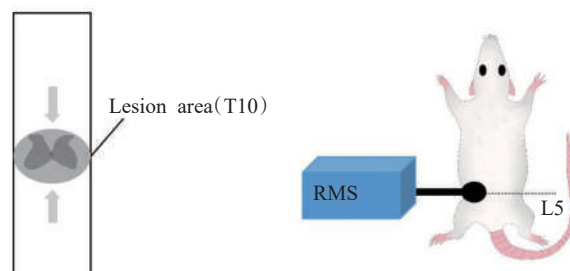
1.4 治疗方案

治疗组于造模后第11天进行磁刺激治疗,仪器为经颅磁刺激仪(江西脑调控技术发展有限公司),刺激中使用圆形动物线圈。神经根磁刺激方案(图1):线圈放置于大鼠L5神经根,刺激强度为60%静息运动阈值,刺激频率为10Hz,共计2000个脉冲,为期14d。在刺激过程中,使用自制大鼠固定器固定大鼠。

1.5 观测指标与检测方法

1.5.1 标本采集:治疗结束完成评估后,新鲜取材的大鼠使用10%水合氯醛腹腔注射深度麻醉后,冰上

图1 大鼠T10急性脊髓损伤模型和神经根磁刺激治疗方案



迅速取损伤节段及上下共1cm的脊髓,移入干净EP管。灌注取材的大鼠使用1%戊巴比妥钠麻醉(4ml/kg),手术开胸,经0.9%氯化钠溶液和4%多聚甲醛溶液心脏灌注,待肝脏变白后,剪断损伤段脊柱,分离损伤节段脊髓,取损伤节段脊髓,浸泡在多聚甲醛中过夜。

1.5.2 实时荧光定量PCR法检测GFAP、BDNF和NT-3的mRNA表达水平:将预处理好的样品用Trizol裂解法提取RNA,反转录成cDNA,采用实时PCR的方法检测目的基因的mRNA表达情况。引物序列见表1。

表1 q-PCR中的引物序列

名称	引物	引物序列(5'—3')
BDNF	Forward	GTCGCACGGTCCCCATT
	Reverse	ACCTGGTGGAAGTCAGGGTC
NT-3	Forward	GCGCAACTTCTTCCCTCTT
	Reverse	GTCATTCACTCTCGCCACC
GFAP	Forward	GGGCGAAGAAAACCGCATC
	Reverse	GATGGGAATTGGGCCTAGCA
GAPDH	Forward	TTCAACGGCACAGTCAAGG
	Reverse	CTCAGCACCAGCATCACC

1.5.3 免疫蛋白印迹检测大鼠脊髓MBP的表达:将脊髓组织于冰上研磨后加入裂解液,冰浴30min。12000r/min离心15min,取上清液,采用BCA法定量蛋白,计算蛋白浓度,配平后置于99℃ 10min变性, -20℃保存备用。取蛋白样品使用SDS-PAGE凝胶电泳分离蛋白,浓缩胶80V,分离胶120V,电泳结束后将蛋白转印至PVDF膜上,用快速封闭液进行封闭10min,加入一抗4℃孵育过夜,TBST清洗3次,二抗室温摇床孵育120min,TBST清洗3次后使用化学发光试剂在避光条件下显影,在凝胶扫描成像系统中进行拍照、观察。Alpha View软件测量光密度值,利用目的蛋白与内参的比值进行半定量分析。

1.5.4 LFB染色观察损伤区髓鞘变化:将髓鞘染色液A置于60℃烤箱预热30min,切片入髓鞘染色液A加膜加盖浸染1h,取出切片快速自来水洗。切片浸入髓鞘染色液B中稍分化2s(趁热),直接浸入髓鞘染色液C分化15s,水洗终止分化,镜检,反复分化水洗和镜检,至髓鞘呈蓝色背景即可,随后切片入65℃烤箱烤干约30min,冷却后进入95%乙醇后复染伊红。最后切片依次脱水,中性树胶封片。显微镜镜检,图

像采集分析。

1.6 统计学分析

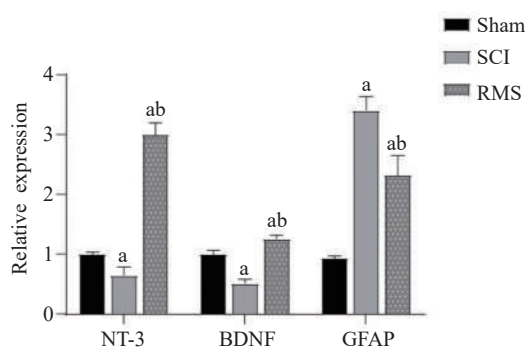
采用SPSS 20.0软件进行数据分析,计量资料用均数±标准差描述。组间比较采用单因素方差分析,符合正态分布且方差齐时采用LSD-*t*检验,方差不齐时使用Tamhane's *T*₂法检验。以 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 神经根磁刺激上调脊髓损伤后BDNF、NT-3的mRNA表达,下调GFAP的mRNA表达

治疗14d后,RMS组BDNF、NT-3的mRNA表达水平高于SCI组($P < 0.05$),RMS组GFAP的mRNA表达水平显著低于SCI组($P < 0.05$)。见图2。

图2 各组大鼠BDNF、NT-3及GFAP的mRNA相对表达量



注:与Sham比较,a: $P < 0.05$;与SCI组比较,b: $P < 0.05$

2.2 神经根磁刺激上调大鼠脊髓损伤后MBP蛋白的表达促进髓鞘的修复

Western Blot显示,SCI组MBP的相对表达量较Sham组显著降低($P < 0.05$);与SCI组比较,RMS组MBP的表达量明显提高($P < 0.05$)。这表明脊髓损伤后神经根磁刺激可以上调MBP的表达,减少神经髓鞘的丢失。见图3。

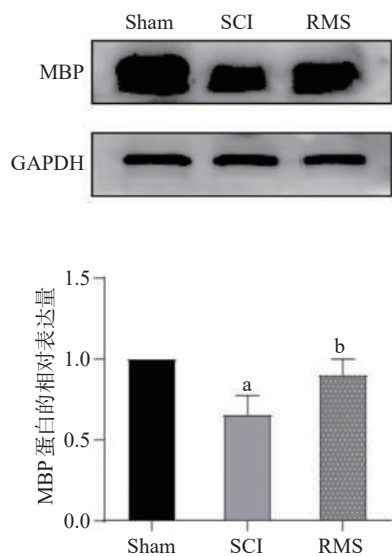
MBP免疫荧光染色分析脊髓损伤后的脱髓鞘情况,与Sham组相比,SCI组髓鞘染色阳性面积明显降低($P < 0.05$)。与SCI组相比,RMS组的髓鞘染色阳性面积表达较高($P < 0.05$)。这表明神经根磁刺激可以减少脊髓损伤区髓鞘的丢失促进髓鞘的修复。见图4。

2.3 神经根磁刺激减少脊髓损伤后脊髓白质髓鞘

的丢失

LFB 染色可以显示神经髓鞘结构,相对染色面积可以用来比较各组间的髓鞘形成情况。与假手术组相比,SCI 组 LFB 相对染色面积减少($P < 0.05$)。与此同时,RMS 组相对染色面积显著高于 SCI 组($P < 0.05$),空泡明显缩小,排列更加紧密。见图 5。

图3 各组大鼠损伤区脊髓组织 MBP 蛋白表达水平



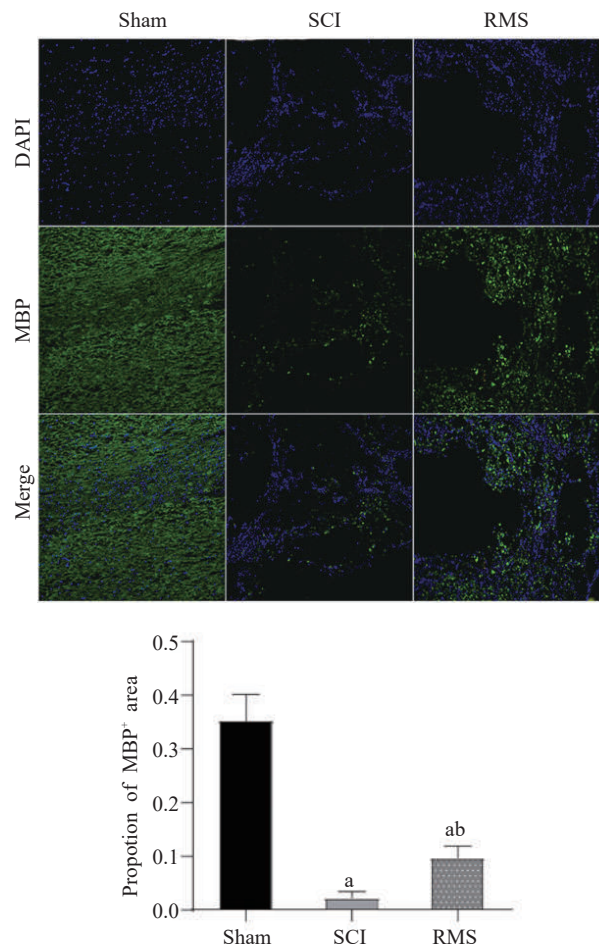
注:与 Sham 比较,a: $P < 0.05$;与 SCI 组比较,b: $P < 0.05$

3 讨论

脊髓损伤后,基于患者的神经可塑性,将残余的神经纤维激活、建立连接,并增加连接中的传输是恢复脊髓损伤运动功能的有效途径^[11]。影响神经元突起再生的微环境因素包括神经营养因子的缺乏、炎症因子抑制作用、胶质瘢痕的形成以及髓鞘丢失等,这些导致脊髓损伤后脊髓难以完成再生修复^[12-14]。中枢神经系统的髓鞘是一层由少突胶质细胞(oligodendrocyte, OL)包绕形成的富含脂质的膜,髓鞘结构的完整性确保了神经信息高效、准确地传递。脊髓损伤后表现为大量少突胶质细胞丢失和死亡,导致神经纤维脱髓鞘,从而干扰了电信号的正常传导,这种现象在 SCI 中普遍存在^[15-16]。

近年来神经调控技术越来越多的应用于中枢神经性疾病,重复经颅磁刺激(repetitive transcranial magnetic stimulation, rTMS)因具有安全、无创、有

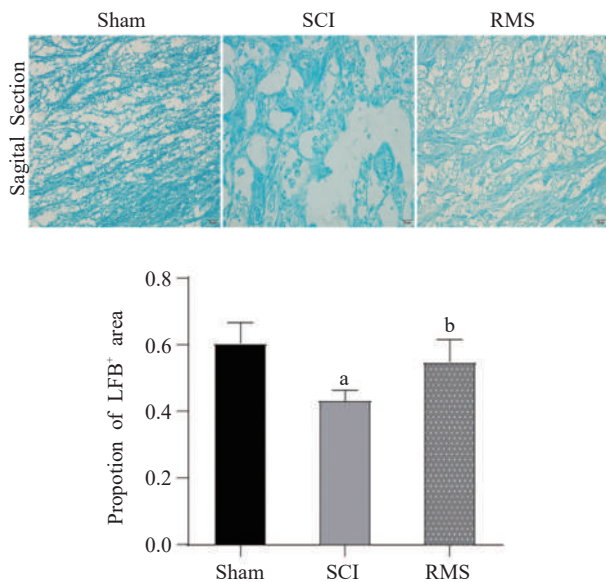
图4 各组大鼠脊髓损伤区免疫荧光染色 (×40)



注:与 Sham 比较,a: $P < 0.05$;与 SCI 组比较,b: $P < 0.05$

效的优点得到了广泛的关注^[17]。它是利用交变电磁场作用于大脑皮层形成感应电流,刺激皮层下的神经元,改变皮层兴奋性,并且可以通过改变刺激强度、刺激频率和线圈的位置来调节中枢神经系统的活动^[18-20]。Croarkin 等^[21-24]研究证实,rTMS 可以通过调节 γ -氨基丁酸和谷氨酸释放,增加细胞内钙水平,从而调节神经元活性,促进生长因子的释放。尽管研究表明,rTMS 对 SCI 后的运动功能障碍、肌肉强直痉挛、神经根性疼痛等方面有一定作用,但其作用的机制和最佳治疗参数仍需进一步研究^[25-28]。本研究采用远端的神经根磁刺激治疗脊髓损伤大鼠,通过激活自下而上的感觉传导通路,探讨神经根磁刺激对 SCI 后髓鞘结构的修复作用。BDNF 是少突发生和适应性髓鞘形成的关键调节因子。本文研究

图5 各组大鼠脊髓损伤区髓鞘染色 (×400)



注:与Sham比较,a: $P < 0.05$;与SCI组比较,b: $P < 0.05$

发现,神经根磁刺激通过调控损伤区微环境,减少损伤区GFAP的mRNA表达,上调损伤区脊髓BDNF、NT-3的mRNA和MBP蛋白的表达,有效促进慢性不完全性脊髓损伤大鼠髓鞘结构的修复。但影响髓鞘修复的原因众多,还需要进一步深入研究神经根磁刺激治疗SCI的具体机制。此外,本次实验仅探讨了慢性期神经根磁刺激对髓鞘修复的影响,早期神经根磁刺激对SCI后的髓鞘修复是否有不同的效应,这也是今后进一步研究的方向。

综上所述,本研究表明神经根磁刺激能够促进脊髓损伤区髓鞘再生修复,这提示神经根磁刺激可能是SCI后一种有效的治疗方案。

参考文献

- [1] Eckert MJ, Martin MJ. Trauma: spinal cord injury[J]. Surg Clin North Am,2017, 97(5): 1031—1045.
- [2] Song YH, Agrawal N, Griffin JM, et al. Recent advances in nanotherapeutic strategies for spinal cord injury repair[J]. Adv Drug Deliv Rev,2019, 148: 38—59.
- [3] Gaudet AD, Fonken LK. Glial cells shape pathology and repair after spinal cord injury[J]. Neurotherapeutics, 2018, 15(3): 554—577.
- [4] Silver J, Schwab ME, Popovich PG. Central nervous system regenerative failure: role of oligodendrocytes, astrocytes, and microglia[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol,2014, 7(3): a020602.
- [5] Assinck P, Duncan GJ, Plemel JR, et al. Myelinogenic plasticity of oligodendrocyte precursor cells following spinal cord contusion injury[J]. The Journal of Neuroscience,2017, 37(36):8635—8654.
- [6] Pukos N, Goodus MT, Sahinkaya FR, et al. Myelin status and oligodendrocyte lineage cells over time after spinal cord injury: What do we know and what still needs to be unwrapped?[J]. Glia,2019, 67(11):2178—2202.
- [7] Seewoo BJ, Etherington SJ, Rodger J. Transcranial Magnetic Stimulation[M].2019.DOI:10.1002/9780470015902.a0028620
- [8] Angelucci F, Oliviero A, Pilato F, et al. Transcranial magnetic stimulation and BDNF plasma levels in amyotrophic lateral sclerosis[J]. Neuroreport,2004, 15(4): 717—720.
- [9] Wang HY, Crupi D, Liu J, et al. Repetitive transcranial magnetic stimulation enhances BDNF- TrkB signaling in both brain and lymphocyte[J]. Journal of Neuroscience,2011,31(30): 11044—11054.
- [10] Rivlin AS, Tator CH. Effect of duration of acute spinal cord compression in a new acute cord injury model in the rat[J]. Surgical Neurology,1978,10(1):38—43.
- [11] 郑娅, 毛也然, 许东升. 神经磁调控技术在脊髓损伤康复中的应用与机制探讨[J]. 中国康复医学杂志,2019, 34(12): 1482—1488.
- [12] Karen D, Cheryl F, Ira B. Brain-derived neurotrophic factor in astrocytes, oligodendrocytes, and microglia/macrophages after spinal cord injury[J]. Neurobiol Disease,2000,7(6): 574—585.
- [13] Batista CM, Bianqui LLT, Zanon BB, et al. Behavioral improvement and regulation of molecules related to neuroplasticity in ischemic rat spinal cord treated with PEDF[J]. Neural Plasticity, 2014, 2014: 451639.
- [14] Li N, Leung G. Oligodendrocyte precursor cells in spinal cord injury: a review and update[J]. Bio Med Research International,2015,2015(3): 1—20.
- [15] Terayama R, Bando Y, Murakami K, et al. Neuropilin promotes oligodendrocyte death, demyelination and axonal degeneration after spinal cord injury[J]. Neuroscience,2007, 148(1): 175—187.
- [16] Duncan GJ, Manesh SB, Hilton BJ, et al. The fate and function of oligodendrocyte progenitor cells after traumatic spinal cord injury[J]. Glia,2020, 68(2):227—245.
- [17] Huerta PT, Volpe BT. Transcranial magnetic stimulation, synaptic plasticity and network oscillations[J]. Journal of Neuro Engineering and Rehabilitation,2009, 6(1): 7.
- [18] Thomas N, Rene M. Comment on: Safety, ethical considerations, and application guidelines for the use of transcranial

- al magnetic stimulation in clinical practice and research[J]. Clinical Neurophysiology,2010,121(6):980.
- [19] Kathrin H, Wolfgang HR, Klaus F. Intermittent theta-burst transcranial magnetic stimulation alters electrical properties of fast-spiking neocortical interneurons in an age-dependent fashion[J]. Frontiers in Neural Circuits,2016, 10: 22—34.
- [20] Tang A, Thickbroom G, Rodger J. Repetitive transcranial magnetic stimulation of the brain: mechanisms from animal and experimental models[J]. Neuroscientist,2015, 23(1): 82—94.
- [21] Croarkin PE, Nakonezny PA, Wall CA, et al. Transcranial magnetic stimulation potentiates glutamatergic neurotransmission in depressed adolescents[J]. Psychiatry Research Neuroimaging,2016, 247(1): 25—33.
- [22] Hoppenrath K, Funke K. Time-course of changes in neuronal activity markers following iTBS-TMS of the rat neocortex[J]. Neuroscience Letters,2013, 536(Complete): 19—23.
- [23] Lenz M, Galanis C, Müller-Dahlhaus F, et al. Repetitive magnetic stimulation induces plasticity of inhibitory synapses [J]. Nature Communications,2016, 7(1): 2150—2206.
- [24] Vlachos A, Muller-Dahlhaus F, Rosskopf J, et al. Repetitive magnetic stimulation induces functional and structural plasticity of excitatory post-synapses in mouse organotypic hippocampal slice cultures[J]. Journal of Neuroscience, 2012, 32(48):17514—17523.
- [25] Chalfouh C, Guillou C, Hardouin J, et al. The regenerative effect of trans-spinal magnetic stimulation after spinal cord injury: mechanisms and pathways underlying the effect[J]. Neurotherapeutics,2020, 17(2):2069—2088
- [26] Benito J, Kumru H, Murillo N, et al. Motor and gait improvement in patients with incomplete spinal cord injury induced by high-frequency repetitive transcranial magnetic stimulation[J]. Topics in Spinal Cord Injury Rehabilitation, 2012, 18(2): 106—112.
- [27] Nardone R, Langthaler PB, Orioli A, et al. Effects of intermittent theta burst stimulation on spasticity after spinal cord injury[J]. Restorative Neurology & Neuroscience, 2017, 35(3):287—294.
- [28] Nardone R, Hiller Y, Langthaler PB, et al. rTMS of the prefrontal cortex has analgesic effects on neuropathic pain in subjects with spinal cord injury[J]. Spinal Cord,2017,55(1):20—25.

成都市第一人民医院诚聘儿童康复科学科带头人公告

因医院工作需要,现面向国内外诚聘儿童康复科学科带头人1名,详情如下:

一、岗位条件及要求:1.遵纪守法,具有良好的职业道德;2.硕士研究生及以上学历和学历相应学位,所学专业为儿科、发育行为儿科、康复医学与理疗学等专业。国外(境外)留学人员须取得教育部中国留学服务中心国外(境外)学历、学位认证证书;3.具有副主任医师及以上专业技术职称;4.市级及以上学术技术带头人或后备人选;5.年龄要求:45周岁以下(1976年1月1日以后出生,特别优秀者可适当放宽);6.适应岗位要求的身體条件。

二、岗位职责:负责儿童康复相关疾病诊断;指导康复医师、治疗师制定患者康复计划及开展日常工作;了解儿童康复各亚专业国际发展方向及技术新进展,带领团队开展国内先进康复技术;指导科室开展临床、科研、教学、人才培养等工作。

三、相关待遇:面议。

四、报名方式:如有意向,请将个人简历及相关证书及业绩佐证材料(电子版)发送到医院人力资源部邮箱(yyysk@126.com),邮件名以“姓名+应聘儿童康复科学科带头人”命名。

五、联系人:苏老师;电话:028-85318902。