

## · 基础研究 ·

# 硬膜外脊髓电刺激结合减重跑台训练对脊髓损伤大鼠运动功能的影响

徐江 王熠钊 黄晓琳 许涛 徐琦 邢科新 王昕 何际平

**【摘要】目的** 探讨硬膜外脊髓电刺激(ESCS)结合减重跑台训练对脊髓损伤大鼠运动功能的影响。**方法** 共选取成年雌性 SD 大鼠 24 只,采用改良 Allen 打击法将其制作成 T<sub>8-9</sub> 脊髓损伤模型,将造模成功大鼠随机分为脊髓损伤组(简称模型组,术后未给予特殊处理)、硬膜外电刺激组(简称电刺激组,术后给予硬膜外电刺激)、减重跑台治疗组(简称减重运动组,术后给予减重运动训练)和减重跑台训练结合硬膜外电刺激组(简称治疗组,术后给予减重运动训练及硬膜外电刺激)。于术前及术后采用神经行为学评分(BBB 评分)对各组实验大鼠运动功能恢复情况进行评定,并于术后 8 周时取各组大鼠脊髓损伤节段进行神经丝蛋白(NF200)免疫组化染色分析。**结果** 减重运动组和治疗组大鼠神经行为学评分(BBB 评分)和 NF200 染色光密度值均显著高于模型组及电刺激组水平( $P < 0.05$ );治疗组大鼠 BBB 评分显著高于减重运动组( $P < 0.05$ ),但治疗组和减重运动组 NF200 免疫组化染色结果间差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。**结论** ESCS 及减重运动训练均对不完全性脊髓损伤大鼠步行功能恢复具有促进作用,且两者联用具有协同功效,其治疗机制可能与刺激脊髓损伤下位中枢模式发生器神经元有关。

**【关键词】** 脊髓损伤; 硬膜外脊髓电刺激; 减重步行; 可塑性; 大鼠

**A combination of epidural spinal cord stimulation and treadmill training facilitates functional recovery after moderate spinal cord injury in rats** XU Jiang\*, WANG Yi-zhao, HUANG Xiao-lin, XU Tao, XU Qi, XIN Ke-xin, WANG Qin, HE Ji-ping.

Department of Rehabilitation, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

Corresponding author: HUANG Xiao-lin, Email: xiaolin2006@yahoo.com.cn

**【Abstract】Objective** To investigate the potential synergistic effect on motor function recovery of the application of epidural spinal cord stimulation (ESCS) with body weight supported treadmill training after incomplete spinal cord injury. **Methods** Twenty-four adult, female Sprague-Dawley rats were administered a contusive injury of moderate severity at vertebral level T<sub>8-9</sub> using a modification of Allen's method. They were then randomly allocated into 4 groups: a spinal cord injury group (SCI group), a spinal cord injury plus ESCS group (ESCS group), a treadmill training group (treadmill group), and a treadmill training plus ESCS group (treatment group). Before and after surgery, hindlimb functional recovery in the rats was evaluated using the open field Basso, Beattie and Bresnahan (BBB) scale for gait analysis and the expression of neurofilament 200 (NF200) was detected by histochemical staining 8 weeks post surgery. **Results** Both BBB scores and the expression of NF200 were significantly higher in the treadmill and treatment groups compared with the SCI and ESCS groups. BBB scores in the treatment group were significantly higher than those in the treadmill group. However, no significant difference in terms of NF200 expression was observed between the treatment and treadmill groups. **Conclusion** The combination of ESCS and treadmill training can yield functional improvement following spinal cord injury.

**【Key words】** Spinal cord injury; Epidural spinal cord stimulation; Treadmill training; Plasticity

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)是严重致残性疾患之一,其治疗干预是目前神经科学领域中难点、热点之一。硬膜外脊髓电刺激(epidural spinal cord

stimulation, ESCS)技术是将电极植入患者椎管内,通过脉冲电流刺激脊髓神经,对治疗慢性顽固性疼痛具有显著疗效。近年来有研究表明,ESCS 结合减重步行训练(bodyweight supported treadmill training, BWSTT)对不完全性 SCI 患者步行功能有改善作用,但其确切治疗机制有待进一步探索<sup>[1,2]</sup>。本研究采用 ESCS 技术并结合 BWSTT 对不完全 SCI 大鼠进行治疗,发现实验大鼠运动功能均获得显著改善。现报道如下。

作者单位:430030 武汉,华中科技大学同济医学院附属同济医院康复医学科(徐江、王熠钊、黄晓琳、许涛);华中科技大学控制科学与工程系(徐琦、邢科新、王昕);美国亚利桑那州立大学生物工程系(何际平)

通讯作者:黄晓琳,Email: xiaolin2006@yahoo.com.cn

## 材料与方法

### 一、主要试剂和仪器

主要实验试剂包括水合氯醛(上海试剂二厂产品)、大鼠 NF200 单抗、即用型 SABC 试剂盒(武汉博士德生物技术有限公司产品),其它均为市售分析纯产品。主要实验仪器包括自制改良 Allen 打击器, ESCS 系统由华中科技大学自动控制系研制<sup>[3]</sup>, Image-pro Plus 图像分析系统由同济医学院提供。

### 二、实验动物及分组处理

共选取成年健康雌性 SD 大鼠 24 只,体重 250 ~ 300 g,由同济医学院动物实验中心提供,实验期间给予自然光照,定时添加饲料,饮水不受限制。将上述大鼠制成 SCI 模型,并将造模成功大鼠随机分为 SCI 模型组(简称模型组)、硬膜外电刺激治疗组(简称电刺激组)、减重跑台运动组(简称减重运动组)和减重跑台运动结合硬膜外电刺激组(简称治疗组),每组各 6 只大鼠。模型组不作特殊处理,电刺激组及减重运动组大鼠于脊髓损伤后分别施以电刺激和减重运动训练,治疗组大鼠于脊髓损伤后给予电刺激及减重运动训练。

### 三、SCI 动物模型的建立

采用 10% 水合氯醛按 300 mg/kg 体重进行腹腔注射麻醉,将大鼠俯卧位固定于实验台上,腰背部剪毛,以 T<sub>8-9</sub> 棘突为中心,自背部正中切口,显露 T<sub>7-10</sub> 棘突及椎板,切除 T<sub>8-9</sub> 棘突及部分椎板组织,暴露脊髓组织作为损伤区。制模方法参照改良 Allen 打击法<sup>[4,5]</sup>,将 10 g 重物从 2.5 cm 高度垂直落下并直接撞击大鼠脊髓组织,如受损脊髓组织出现水肿、出血,大鼠出现摆尾反射,双下肢及躯体回缩扑动,双后肢呈弛缓性瘫痪等征象,提示 SCI 模型制作成功。

### 四、硬膜外电刺激电极植入

电刺激组和治疗组大鼠于成功建立 SCI 模型后,将硬膜外刺激电极及导线从 T<sub>9</sub> 椎骨窗沿椎板下植入椎管内,将刺激电极中心置于 L<sub>2</sub> 水平,采用缝合丝线将导线固定于 T<sub>7</sub> 棘突处,导线与刺激器接头部分经背部皮下用牙科水泥固定于颅骨表面。

待各组实验动物苏醒后分别单独饲养,采用青霉素腹腔注射 3 d 以预防感染,期间自由进食及饮水,每日按摩膀胱辅助排尿 2 次,直至大鼠排尿反射功能恢复正常。

### 五、治疗干预方法

减重运动组大鼠于脊髓损伤 1 周后开始 BWSTT,每天 1 次,每次 20 min,每周 6 次,初始减重量为大鼠体重的 60%,跑台速度设定为 3 cm/s,以后减重量和跑台速度根据大鼠运动功能恢复情况随时调整。治疗

组大鼠在减重跑台训练过程中同时给予硬膜外电刺激,电刺激部位为 L<sub>2</sub> 区域,刺激强度为运动阈下水平(电刺激强度为 100 mV,波宽 200  $\mu$ s,频率 20 Hz)。电刺激组大鼠于脊髓损伤 1 周后给予硬膜外电刺激,电刺激参数同治疗组。

### 六、大鼠运动功能评定

分别于术前、术后 1 d、7 d、14 d、21 d、28 d、35 d、42 d、49 d 及 56 d 时由双人在单盲条件下采用 BBB (Basso, Beattie and Bresnahan) 开放空间运动评分法对各组大鼠后肢运动功能恢复情况进行评定<sup>[6]</sup>。神经功能评定在 80 cm  $\times$  60 cm  $\times$  60 cm 空间内进行,每只实验大鼠运动功能评定时间为 4 min,评定前排空大鼠膀胱内尿液。

### 七、标本制备与检测指标

于术后第 8 周将各组实验大鼠用 10% 水合氯醛深度麻醉,开胸经左心室行主动脉插管,先用 100 ml 生理盐水快速灌注冲洗,再用 4% 多聚甲醛 500 ml 先快后慢灌注固定,取损伤脊髓节段 0.5 cm 组织置入上述固定液中后固定 4 h,再置入 4 $^{\circ}$ C 蔗糖溶液(30%)中,待组织块沉底后行恒冷箱冰冻切片(片厚 20  $\mu$ m)。标本切片经正常羊血清封闭后,加入兔抗大鼠 NF200 单克隆抗体(1:200),置于 4 $^{\circ}$ C 环境下孵育 48 h,然后与生物素标记的二抗(1:200)于 25 $^{\circ}$ C 环境下孵育 2 h,再与 ABC(1:100)在 25 $^{\circ}$ C 环境下孵育 2 h,最后滴加新鲜配制的 DAB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 显色液室温下显色 10 ~ 15 min。将切片脱水、透明、封片后置于显微镜下观察。

### 八、统计学分析

本研究所得数据以( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用 SPSS 11.0 版统计学软件对数据进行方差分析, $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 结 果

### 一、各组实验大鼠治疗前、后运动功能比较

通过对各组实验大鼠 SCI 后连续 8 周的 BBB 评分分析后发现,所有组别大鼠术前 BBB 评分均为 21 分,术后 1 d 时各组大鼠后肢均呈弛缓性瘫痪,爬行动作完全依靠前肢运动完成,期间 BBB 评分为 0 ~ 1 分;自 SCI 后第 14 天开始,各组实验大鼠后肢运动功能均出现明显恢复,其中减重运动组与治疗组大鼠 BBB 评分显著高于模型组和电刺激组( $P < 0.05$ );且治疗组大鼠 BBB 评分与减重运动组比较,其间差异也有统计学意义( $P < 0.05$ );对组内数据比较后发现,各组大鼠术后 14 d 时 BBB 评分与 28 d、35 d、42 d、49 d 及 56 d 时比较,其间差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),具体数据详见图 1。

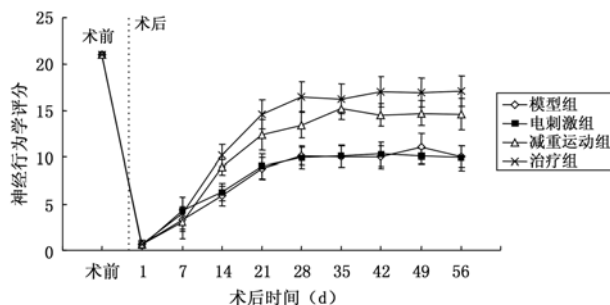


图 1 各组大鼠治疗前、后 BBB 评分结果比较

二、各组实验大鼠脊髓损伤部位 NF200 表达情况比较

NF200 染色阳性以细胞及其突起部位呈棕褐色为主要特征,当脊髓损伤后 8 周时,模型组及电刺激组大鼠脊髓白质内均只见少量棕褐色神经纤维,而减重运动组及治疗组大鼠脊髓白质内均可见大量均匀排列的 NF200 染色阳性神经纤维。经图像分析系统处理后发现,与模型组及电刺激组比较,减重运动组及治疗组大鼠脊髓损伤部位 NF200 表达水平均显著增高 ( $P < 0.05$ );减重运动组 NF200 表达水平与治疗组比较,差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ),具体情况详见图 2,表 1。

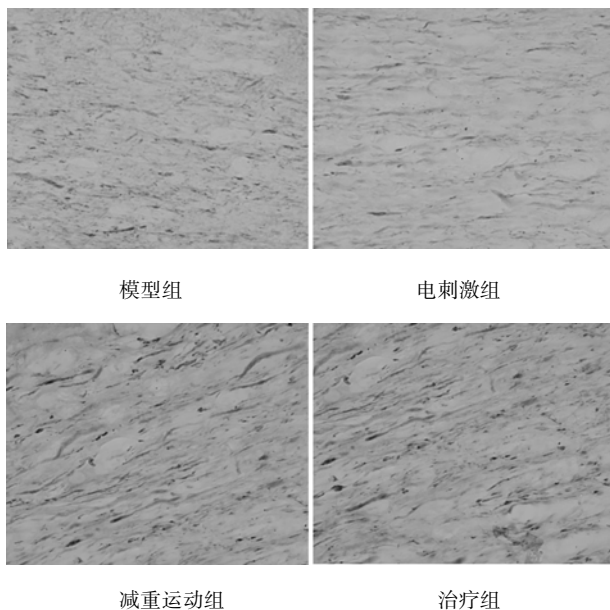


图 2 各组实验大鼠脊髓 NF200 表达情况比较(免疫组化染色,  $\times 400$ )

表 1 各组实验大鼠脊髓损伤后 NF200 表达水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	只数	NF200 染色密度
模型组	6	0.25 $\pm$ 0.05
电刺激组	6	0.23 $\pm$ 0.04
减重运动组	6	0.38 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>
治疗组	6	0.40 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>

注:与模型组及电刺激组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$

讨 论

SCI 是常见的中枢神经系统严重创伤,常造成患者运动功能不同程度障碍。下肢的核心运动功能是步行,因此恢复步行能力是大多数 SCI 患者最迫切的需求之一。目前诸多研究表明,单一疗法均不能使 SCI 患者获得满意疗效<sup>[7]</sup>,这就要求临床需重视多种治疗手段的综合运用。除了各种促进损伤神经轴突再生的治疗方法外,近年来提高 SCI 后脑可塑性的治疗策略也引起临床越来越多的重视<sup>[8]</sup>。

神经丝蛋白 NF200 是神经元特异性骨架蛋白,参与神经元形态结构的形成及维持,与蛋白质在胞体及突起之间的双向运输功能密切相关,并与膜蛋白相互作用。当中枢神经损伤后,神经丝蛋白的表达水平可间接反映神经轴突再生能力。

本研究结果发现,BWSTT 及 ESCS 均对 SCI 大鼠运动功能恢复有积极促进作用,且两者联用具有协同功效,如治疗组大鼠运动功能恢复情况明显优于模型组、电刺激组及减重运动组,差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ );但治疗组大鼠受损脊髓组织 NF200 表达水平与减重运动组比较,其间差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ),提示电刺激疗法对脊髓损伤处轴突再生并未产生显著影响。

ESCS 是将电极植入相应脊髓节段硬膜外间隙并给予适当电刺激,通过上行传导的电流阻断疼痛信号传递,从而达到镇痛目的<sup>[9]</sup>。对本研究结果分析后发现,单独应用 ESCS 治疗并不能有效促进大鼠神经行为学功能恢复及损伤脊髓节段轴突再生;而将 ESCS 与 BWSTT 联合应用后则能显著改善实验大鼠步行功能,进一步分析发现,实验大鼠运动功能改善与损伤节段轴突再生无明显相关性,推测大鼠运动功能改善是通过刺激脊髓损伤下位神经元而实现的。

本研究将 ESCS 电极置于大鼠脊髓 L<sub>2</sub> 水平,在形态学上该处正是腰膨大的起始部位。有学者认为此节段具有特殊结构,即损伤部位以下腰骶段脊髓内保留的步行低级控制中枢——中枢模式发生器 (central pattern generator, CPG)<sup>[10-12]</sup>。脊髓步行 CPG 具有独立于大脑等脊髓上位神经中枢的控制功能,能自发产生节律性神经冲动<sup>[13]</sup>。BWSTT 能促进 SCI 动物运动功能恢复<sup>[14,15]</sup>,其相关机制可能是步行训练能将步行时下肢本体感觉信息传入到脊髓步行 CPG 神经元中,使损伤部位以下未受损脊髓环路神经系统可塑性增强,从而发挥治疗作用<sup>[16]</sup>。本研究结果提示 ESCS 能增强 BWSTT 对 CPG 的调控功能,加快截瘫大鼠后肢运动功能恢复。

综上所述,本研究发现 ESCS 及 BWSTT 均能促进

不完全性 SCI 大鼠步行功能恢复,两者联用具有协同功效,其相关治疗机制可能与电刺激改变中间神经元细胞膜电位及兴奋性,增强步行时本体感觉传入刺激,进而促进大鼠后肢运动功能恢复等有关,其确切机制还有待进一步研究。

参 考 文 献

[1] Carhart MR, He J, Herman R, et al. Epidural spinal-cord stimulation facilitates recovery of functional walking following incomplete spinal-cord injury. *IEEE Trans Neural Rehabil Eng*, 2004, 12:32-42.

[2] Herman R, He J, D'Luzansky S, et al. Spinal cord stimulation facilitates functional walking in a chronic, incomplete spinal cord injured. *Spinal Cord*, 2002, 40:65-68.

[3] 王永骥,张潇,何际平,等.硬脊膜外脊髓电刺激器的实验设计. *中国临床康复*, 2006, 10:118-121.

[4] Young W. Spinal cord contusion models. *Prog Brain Res*, 2002, 137: 231-255.

[5] 许涛,郭风劲,李新志,等.磁刺激对脊髓损伤组织 c-fos 基因表达的影响. *中华物理医学与康复杂志*, 2003, 25:3-6.

[6] Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J Neurotrauma*, 1995, 12:1-21.

[7] Fawcett JW. Spinal cord repair: from experimental models to human application. *Spinal Cord*, 1998, 36:811-817.

[8] Wickelgren I. Animal studies raise hopes for spinal cord repair. *Science*, 2002, 297:178-181.

[9] North RB, Wetzel FT. Spinal cord stimulation for chronic pain of spinal origin: a valuable long-term solution. *Spine*, 2002, 27: 2584-2591.

[10] Gerasimenko YP, Lavrov IA, Courtine G, et al. Spinal cord reflexes induced by epidural spinal cord stimulation in normal awake rats. *J Neurosci Meth*, 2006, 157:253-263.

[11] Ichiyama RM, Gerasimenko YP, Zhong H, et al. Hindlimb stepping movements in complete spinal rats induced by epidural spinal cord stimulation. *Neurosci Lett*, 2005, 383:339-344.

[12] Grillner S. The spinal locomotor CPG: a target after spinal cord injury. *Prog Brain Res*, 2002, 137:97-108.

[13] Duysens J, Vande C. Neural control of locomotion, the central pattern generator from cats to humans. *Gait Posture*, 1998, 7:131-141.

[14] Thota A, Carlson S, Jung R. Recovery of locomotor function after treadmill training of incomplete spinal cord injured rats. *Biomed Sci Instr*, 2001, 37:63-67.

[15] Zhang Y. Observation of locomotor functional recovery in adult complete spinal rats with BWSTT using semiquantitative and qualitative methods. *Spinal Cord*, 2007, 45:496-501.

[16] Fouad K, Metz GA, Merkler D, et al. Treadmill training in incomplete spinal cord injured rats. *Beh Brain Res*, 2000, 115:107-113.

(收稿日期:2008-05-19)  
( 本 文 编 辑 : 易 浩 )

· 短篇论著 ·

McKenzie 法联合动态干扰电及牵引治疗腰椎间盘突出症的疗效观察

傅建明 顾旭东 王佳宇 姚云海 顾敏 尹汉逵 任芸

腰椎间盘突出症是一种临床常见病、多发病,治疗方法多,但效果不一,主要以非手术疗法为主,我科采用 McKenzie 法联合干扰电及牵引治疗腰椎间盘突出症,疗效明显,现报道如下。

一、资料与方法

(一)临床资料

选取 2004 年 10 月 1 日至 2007 年 3 月 31 日来我院康复医学中心门诊和住院治疗的 86 例腰椎间盘突出症患者。临床症状、体征、X 线片表现均符合腰椎间盘突出症诊断标准<sup>[1]</sup>,均经 CT 或 MRI 检查确诊。排除结核、肿瘤、非椎间盘因素造成的腰腿痛。按 McKenzie 分型标准<sup>[2]</sup>均为椎间盘向后移位综合征,髓核向后突出或侧方移位。将所有患者随机分成治疗组和对照组,每组 43 例。治疗组中,男 23 例,女 20 例;平均年龄(35.2±4.3)岁;平均病程(6.9±2.5)个月;L<sub>3-4</sub> 突出 2 例, L<sub>4-5</sub> 突出 14 例, L<sub>5</sub>~S<sub>1</sub> 突出 11 例, L<sub>4-5</sub> 和 L<sub>5</sub>~S<sub>1</sub> 突出 16 例。对照组中,男 25 例,女 18 例;平均年龄(38.3±2.1)岁;平均病程(7.2±1.3)个月;L<sub>3-4</sub> 突出 3 例, L<sub>4-5</sub> 突出 12 例, L<sub>5</sub>~S<sub>1</sub> 突出

12 例, L<sub>4-5</sub> 和 L<sub>5</sub>~S<sub>1</sub> 突出 16 例。2 组患者性别、年龄、病程、突出部位等经统计学分析,差异均无统计学意义(P>0.05),具有可比性。

(二)治疗方法

2 组患者均接受常规的药物治,即口服弥可保片,每次 500 μg,每日 3 次。同时应用日本产 TM-300 型可变式电脑牵引系统行牵引治疗,患者仰卧位,牵引重量为人体重的 1/3~1/4,根据体质情况适当加减,以患者感觉舒适和疼痛症状减轻为准,每次牵引 30 min,每天 2 次。牵引后休息 5~10 min,再行动态干扰电治疗。应用日本产 SD-21 型动态干扰电治疗仪,4 个直径为 6 cm 的圆形吸附型电极,以腰腿部最痛点为中心交叉放置,或沿坐骨神经放射疼痛部位交叉放置。采用抽吸法,负压脉冲为 16~18 次/min,输出频率为 4000 Hz 和(4000±100)Hz,差频为 0~100 Hz,电流强度为 0.5~2.0 mA,每次治疗 30 min,每天 2 次。

治疗组患者在此基础上予以 McKenzie 法治疗。患者俯卧位,若症状较轻,用肘将身体撑起,骨盆以下部位贴于床面,行腰部加压伸展手法,每次持续 3~5 s,休息 1 min 后重复上述伸

作者单位:314000 嘉兴,浙江省嘉兴市第二医院康复医学中心