

磁刺激对脊髓损伤后神经细胞凋亡的影响及机制研究

邵彬 王晓红 周宁 张强

【摘要】 目的 观察磁刺激对脊髓损伤(SCI)后 SD 大鼠的神经细胞凋亡及诱导型一氧化氮合酶(iNOS)生成的影响。方法 雄性SD大鼠32只,分为磁刺激组16只,对照组16只,每组又分为SCI后第6小时,第12小时,第24小时和第72小时4个时间点,每个时间点4只。2组采用脊髓横切法造成SCI模型,磁刺激组在每个时间点给予磁刺激后即处死,对照组在伤后相应时间点处死。用脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记法标记凋亡细胞,用免疫组化法检测诱导型一氧化氮合酶阳性细胞。观察各时间点的凋亡指数和诱导型一氧化氮合酶阳性细胞率。结果 凋亡细胞在伤后第6小时即出现在脊髓组织中,第24小时与第72小时凋亡细胞数显著增加;iNOS阳性细胞在SCI后第6小时和第12小时时间点几乎没有表达,从第24小时到第72小时显著升高。与对照组相比,在伤后第6小时和第12小时,磁刺激组的凋亡指数未见明显减少($P > 0.05$);但是在第24小时和第72小时的时间点上,磁刺激组的凋亡阳性细胞显著少于对照组($P < 0.01$)。诱导型一氧化氮合酶阳性细胞率两组在各个时间点上的差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 磁刺激可以降低SCI后神经细胞的继发性损伤,抑制神经细胞的凋亡,对SCI早期的神经细胞具有保护作用,然而其机制是否通过对诱导型一氧化氮合酶表达的抑制而实现的需要进一步研究。

【关键词】 脊髓损伤; 磁刺激; 凋亡; 诱导型一氧化氮合酶

Effects of magnetic stimulation on apoptosis of nerve cells and the production of iNOS after spinal cord injury

SHAO Bin*, WANG Xiao-hong, ZHOU Ning, ZHANG Qiang. * Department of Rehabilitation Medicine, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

Corresponding author: ZHOU Ning, Email: xczhou@tjh.tjmu.edu.cn

【Abstract】 Objective To investigate effects of magnetic stimulation on apoptosis of nerve cells and the production of inducible nitric oxidate synthase (iNOS) after spinal cord injury (SCI). **Methods** Thirty-two Sprague-Dawley male rats were randomly divided into a magnetic stimulation group ($n = 16$) and a control group ($n = 16$). SCI models were established by spinal cord transection in both groups. Rats were sacrificed at the 6th, 12th, 24th and 72nd hour post-injury, but the rats in the stimulation group received magnetic stimulation before being sacrificed. Apoptosis index (AI) and iNOS-positive cells rate were recorded at each time point. **Results** Apoptotic cells could be observed by the 6th hour post-injury, and were elevated from the 24th to the 72th hour. iNOS-positive cells were few at the first two time points, but had increased significantly at the 24th and 72nd hour post-injury. Compared with the control group, the apoptosis index of the stimulation group decreased a little at the 6th and 12th hour, but not significantly. The difference was quite significant at the 24th and 72nd hour, however, and the AI in the stimulation group decreased much more than that in the control group. There was little difference in the rate of iNOS-positive cells between the control and stimulation groups at any time point. **Conclusions** Magnetic stimulation could inhibit neural apoptosis and protect neurons from secondary SCI, but it has little effect on iNOS production.

【Key words】 Spinal cord injury; Magnetic stimulation; Apoptosis; Nitric oxidate synthase

外伤引起的脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)往往未造成脊髓结构上的完全损伤,但是神经细胞在SCI后大量凋亡^[1],导致损伤平面以下的功能完全丧失或者几近完全丧失,而诱导型一氧化氮合酶

(inducible nitric oxidate synthase, iNOS)在SCI后神经细胞凋亡的程序中扮演了重要角色。磁刺激能够改善SCI后患者的呼吸、膀胱及直肠功能,许多实验研究结果提示,电磁刺激能够通过作用于各种细胞膜外和膜上的蛋白质来影响细胞的功能,包括离子通道、膜受体和酶^[2];磁刺激可以影响DNA合成,RNA转录和细胞增殖^[3]。本实验旨在了解磁刺激对SCI后神经细胞凋亡和iNOS生成的影响,为磁刺激在SCI治疗中的应用及其安全性提供实验依据。

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2011.01.004

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(邵彬、周宁、张强);广州军区武汉总医院理疗科(王晓红)

通信作者:周宁,Email:xczhou@tjh.tjmu.edu.cn

材料与方法

一、实验动物及分组

雄性 SD 大鼠 32 只, 体重 150 ~ 190 g, 普通级, 由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供。大鼠饲养温度为 20 ~ 23 °C, 湿度为 50% ~ 60%, 可在笼中自由饮水。将 32 只大鼠分为磁刺激组和对照组, 每组 16 只, 每组又分为 SCI 后第 6 小时、第 12 小时、第 24 小时和第 72 小时 4 个时间点, 每个时间点 4 只。

二、动物模型的建立

采用脊髓横切法^[4]制作脊髓损伤模型。称取大鼠体重后, 用水合氯醛溶液按 4 ml/kg 体重给予腹腔内注射麻醉, 然后用电子剃毛器剃去大鼠背部毛发, 以 T₁₂ 为中心显露直径约 0.5 cm 的圆形无菌区, 作为 SCI 区。将大鼠固定在鼠台上, 以 T₁₂ 棘突为中心背部正中纵行切口, 长约 3 cm, 显露脊柱后, 在 T₁₁ ~ T₁₂ 之间用血管钳小心咬除棘突和双侧椎板露出白色的脊髓后, 用眼科剪或手术刀切断脊髓, 然后依层缝合。造模成功的标志是大鼠的双下肢出现回缩性扑动、尾巴呈痉挛性摆动。所有大鼠术后均给予青霉素抗感染治疗。上述实验经华中科技大学同济医学院动物伦理委员会批准。

三、磁刺激器

丹麦 Dantec 公司生产的磁刺激器及圆形刺激线圈, 脉冲磁场的强度峰值为 1.9 T, 由华中科技大学同济医学院附属同济医院康复医学科提供。

四、磁刺激干预

磁刺激组大鼠分别在术后第 6 小时、第 12 小时、第 24 小时及第 72 小时均接受磁刺激治疗 1 次, 刺激频率为 0.5 Hz, 以 70% 的最大输出强度(磁刺激器产生的脉冲磁场的强度峰值为 1.9 T)进行刺激, 每次给予 30 个刺激冲动, 分 2 次完成, 中间间隔 2 min, 刺激部位为手术区中心^[5]。对照组不给予磁刺激治疗。

五、取材

磁刺激组大鼠分别在术后第 6 小时、第 12 小时、第 24 小时和第 72 小时这几个时间点的治疗结束后即刻处死。对照组大鼠分别在术后第 6 小时、第 12 小时、第 24 小时和第 72 小时各时间点即刻处死。大鼠处死前给予 10% 水合氯醛溶液麻醉后开胸暴露心脏, 心脏灌注冰生理盐水至流出液为清亮后给予 4% 多聚甲醛溶液继续灌注, 灌注完成后取出受损脊髓节段头端 3 mm, 尾端 3 mm 的脊髓组织, 放入灌注液中, 置入 4 °C 冰箱过夜。酒精脱水石蜡包埋并切片, 切片为横切面头端 5 μm, 尾端 5 μm 各一张。

六、脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记法标记凋亡细胞

脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记法 (terminal deoxynucleotidyl-transferase-mediated dUDP-biotin nick end-labeling, TUNEL) 试剂盒由德国 Roche 公司提供, 实验步骤按试剂盒说明书进行; 用光学显微镜观察凋亡细胞(共计 200 ~ 500 个细胞)并拍照。高倍视野下(×400)计算凋亡指数, 凋亡指数是指每张 TUNEL 阳性切片选取 5 个阳性细胞数(细胞核中有棕黄色颗粒者)最多的进行计算, 计算公式: 凋亡指数 = 凋亡细胞核数/总细胞核数 × %。

七、免疫组化法检测 iNOS 的表达

根据 GENE TECH 公司两步法抗兔/鼠通用型免疫组化试剂盒说明书进行; 用 PBS 代替一抗做阴性对照, 高倍视野(×400)下计算阳性细胞率, 即每张切片随机取出 10 个不重叠高倍视野, 算出阳性细胞率。

八、统计学分析

应用统计软件 SPSS 13.0 版进行统计分析, 先对数据进行正态性检验, 均满足正态性检验, 计量数据采用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 先进行两因素方差分析, 再进行两个独立样本 *t* 检验和单因素方差分析, 组间两两比较采用 Tukey 法。P < 0.05 表示差异有统计学意义。

结 果

TUNEL 结果显示, SCI 第 6 小时后, 磁刺激组和对照组灰、白质中均可见散在阳性细胞。第 12 小时的凋亡阳性细胞表达较第 6 小时增加, 但是不明显, 差异无统计学意义(P > 0.05)。第 24 小时以后阳性细胞明显增加(P < 0.01), 第 72 小时脊髓组织中的凋亡细胞阳性表达最高(P < 0.01)。见表 1。

表 1 磁刺激组与对照组各个时间点凋亡指数比较
(%, $\bar{x} \pm s$)

| 组 别 | 只数 | 术后 第 6 小时 | 术后 第 12 小时 | 术后 第 24 小时 | 术后 第 72 小时 |
|------|----|--------------|---------------|---------------------------|---------------------------|
| 对照组 | 4 | 19.83 ± 1.29 | 24.46 ± 2.69 | 42.83 ± 4.35 | 50.45 ± 5.73 |
| 磁刺激组 | 4 | 18.16 ± 2.59 | 23.57 ± 1.44 | 31.25 ± 2.78 ^a | 42.29 ± 4.04 ^a |

注: 与对照组同期比较, ^aP < 0.01

给予磁刺激干预后, 伤后第 6 小时和伤后第 12 小时, 磁刺激组的凋亡细胞表达与对照组比较, 差异无统计学意义(P > 0.05)。伤后第 24 小时与第 72 小时, 磁刺激组的凋亡细胞显著少于对照组, 差异具有统计学意义(P < 0.01)。见表 1, 图 1。

免疫组化结果显示, 对照组和磁刺激组在伤后第 72 小时的切片上均可见微量棕黄色的阳性细胞(iNOS 阳性细胞)。见图 2。

在对照组和磁刺激组的脊髓组织中, 各时间点上 iNOS 阳性细胞不仅在白质出现, 而且在灰质中表达。除磁刺激组伤后第 6 小时的阳性细胞率与第 12 小时

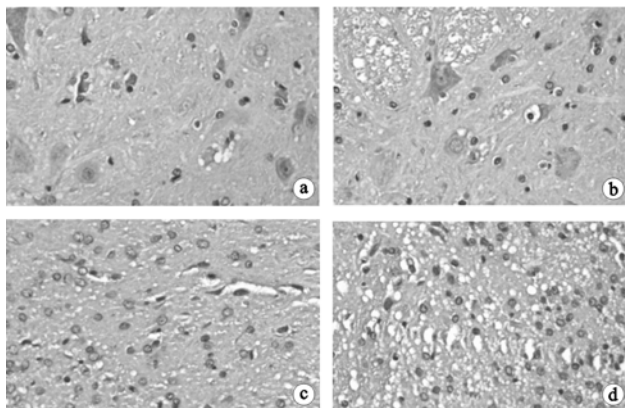
的阳性细胞率比较差异无统计学意义($P > 0.05$)外,其他时间点之间的比较结果提示 iNOS 的生成在 SCI 后随着时间推进而显著增加,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。见表 2,图 2。

与对照组相比,磁刺激组的 iNOS 阳性细胞率在各个时间点上差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 2 磁刺激组与对照组各个时间点 iNOS 阳性细胞率比较(%, $\bar{x} \pm s$)

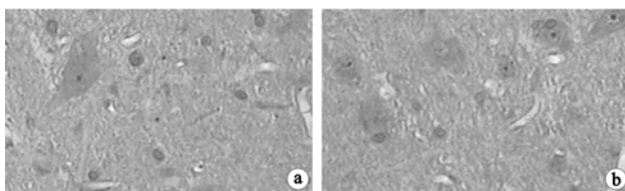
| 组别 | 只数 | 术后 | | 术后 | |
|------|----|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | | 第 6 小时 | 第 12 小时 | 第 24 小时 | 第 72 小时 |
| 对照组 | 4 | 15.47 ± 1.67 | 18.11 ± 0.63 | 30.36 ± 3.15 | 61.18 ± 2.90 |
| 磁刺激组 | 4 | 14.82 ± 1.92 ^b | 17.12 ± 3.07 ^b | 27.85 ± 3.49 ^b | 60.12 ± 4.00 ^b |

注:与对照组比较,^b $P > 0.05$



注:a,c 分别是磁刺激组第 24 小时、第 72 小时组;b,d 分别是对照组第 24 小时、第 72 小时组

图 1 TUNEL 阳性细胞表达(原位末端标记法, ×200)



注:a 是磁刺激组第 72 小时组;b 是对照组第 72 小时组

图 2 iNOS 阳性细胞在脊髓组织中的表达(免疫组化染色, ×400)

讨 论

目前对 SCI 的研究的热点之一是如何预防和逆转 SCI 后继发性损伤,尽可能保留受损脊髓残存的结构和功能。有研究证明,神经细胞的凋亡在 SCI 后的继发性损伤机制中扮演了重要的角色^[1]。

在 SCI 的研究中,各种 SCI 模型均出现不同类型神经细胞凋亡。肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 作为外源性信号诱导神经元和少突胶质细胞的凋亡^[6-8]。TNF- α 是通过诱导 iNOS 表达增加,导致受损脊髓节段内 NO 水平升高来触发细胞凋亡过程的^[9-10]。NO 参与巨噬细胞介导的细胞杀伤过程提示 NO 可能参与了由谷氨酸盐诱导的神经细胞凋

亡^[11-12]。SCI 后,神经细胞因为缺血缺氧,局部神经元线粒体内呼吸链的电子传递和氧化磷酸化发生障碍,ATP 生成减少,引起谷氨酸盐大量释放,后者过度刺激其在突触后膜上的 NMDA 受体,激活一氧化氮合酶,同时促炎性因子激活 iNOS,使受损组织中 NO 生成增高,NO 与超氧化物作用生成过氧亚硝酸根,它具有强氧化性,引起受损局部神经细胞的坏死或凋亡^[13-14]。iNOS 能够在短时间内迅速催化 L-精氨酸生成 NO,能使受损部位神经细胞死亡^[15-16]。有关 iNOS 与 SCI 后神经细胞凋亡的研究结果表明,iNOS 表达水平在伤后 1 d 增高,损伤节段脊髓中 iNOS 阳性细胞主要是胶质细胞^[12]。

磁刺激作为一种神经电刺激技术,在临床广泛应用于神经电生理检查和神经肌肉疾病的治疗,具有无痛、无创、安全等特点。磁刺激发生器利用高压、高能电流在刺激线圈内瞬间放电,诱导出高强磁场,能无衰减地透过皮肤、肌肉和骨组织,使受刺激局部被诱导出局部电位^[17]。国内有学者发现,磁刺激具有使 SCI 后脊髓组织中 $[Ca^{2+}]_i$ 减少^[5],抑制 c-fos 基因的表达以及促进神经细胞的再生的作用^[3,18]。国外的研究结果提示,电磁刺激能够通过调控 Ca^{2+} 通道蛋白的表达来促进神经细胞增殖并抑制其凋亡^[2]。

本研究发现,在伤后第 6 小时脊髓中即可出现散在的凋亡细胞,第 24 小时显著增加,第 72 小时升高更为明显,这种 SCI 后神经细胞凋亡的时序性与国内外大多数研究结果相符合。同时,本研究显示,在最初的 6 小时凋亡细胞主要出现在白质,12 小时后灰质的凋亡细胞开始增加,24 小时后灰质中也开始现大量凋亡细胞,这一实验结果与国内外的研究结果也是相符的。但是,给予磁刺激干预后的结果提示,在伤后第 6 小时和第 12 小时,磁刺激组的凋亡指数与对照组相比并无显著减少($P > 0.05$),而在伤后第 24 小时和第 72 小时才出现显著差异($P < 0.01$)。我们认为出现这种现象的原因可能与 SCI 后细胞凋亡的时序性有关。虽然引起 SCI 后细胞凋亡的机制仍在探讨中,但是大多数研究在伤后细胞凋亡的时序性上的结果还是比较一致的,虽然也有研究报道伤后第 4 小时即可检测到凋亡阳性细胞,但是一般认为凋亡细胞最早是出现在伤后第 6 小时,第 24 ~ 第 72 小时达到高峰。磁刺激在本研究中对 SCI 后神经细胞凋亡的干预效果可能在头两个时间点也有作用,对照组伤后第 6 小时的凋亡指数为(19.83 ± 1.29)%,磁刺激组为(18.16 ± 2.59)%;第 12 小时对照组的凋亡指数为(24.46 ± 2.69)%,磁刺激组为(23.57 ± 1.44)%,但是由于凋亡细胞出现的数量不多,因此差异无统计学意义($P > 0.05$)。可能的原因是磁刺激对神经元的凋亡作用更大一些,因

为凋亡阳性细胞在 24 h 后在灰质中的表达增加。

本研究结果还显示,除磁刺激组伤后第 6 小时的阳性细胞率与第 12 小时的 iNOS 阳性细胞率比较差异无统计学意义外($P > 0.05$),其他时间点之间的比较结果提示 iNOS 的生成在 SCI 后随着时间推进而显著增加,具有统计学意义($P < 0.01$)。这个结果与国内多数研究报告的结果一致,即 iNOS 在 SCI 后第 6 小时即有阳性细胞表达,第 24 小时后明显增高,第 72 小时后到达峰值。磁刺激组和对照组的各时间点上的 iNOS 阳性细胞率差异均无统计学意义,可能的原因有三:①磁刺激对 SCI 后 iNOS 的生成没有影响。我们前面做的实验结果表明,磁刺激可以减少 SCI 后神经细胞的凋亡指数,虽然在 SCI 后 iNOS 以及 NO 的作用非常重要,但是凋亡过程本身以及 SCI 后的继发性损失本身就是复杂的病理生理过程,参与并影响这个过程的因素非常多,磁刺激对神经细胞凋亡的影响究竟是通过何种机制,目前尚在研究中;②磁刺激的剂量和方法有待调整;③样本含量不足。这需要进一步增加样本含量,或者做 iNOS 定量分析,或设计量效关系的实验来证实。在本研究中,我们选择了脊髓横切法造模,而非常用的 Allen's 法,是出于考虑本实验室定位仪老化,跟不上现代先进的电脑操控的定位仪能够造出的模型效果,这同样需要在技术上进一步更新,使实验结果更能反映客观、科学的现实。

参 考 文 献

- [1] 傅强,侯铁胜,刘善荣,等. 大鼠脊髓压迫性损伤后神经细胞的死亡方式. 第二军医大学学报,1977,18:557-559.
- [2] Grassi C, Ascenzo MD, Torsello A, et al. Effects of 50 Hz electromagnetic fields on voltage-gated Ca^{2+} channels and their role in modulation of neuroendocrine cell proliferation and death. Cell Calcium, 2004,35:307-315.
- [3] 许涛,郭风劲,李志新,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.
- [4] 乔晓峰,杨建华,朱光宇,等. 脊髓损伤模型的制备及其评价. 中国全科医学杂志,2009,12:1279-1281.
- [5] 郭风劲,李新志,许涛,等. 磁刺激对脊髓神经组织损伤的早期保护作用. 中国康复医学杂志,2001,12:4-6.
- [6] Casha S, Yu WR, Fehlings, MG. FAS deficiency reduces apoptosis, spares axons and improves function after spinal cord injury. Exp Neurol, 2005, 196: 390-400.
- [7] Demjen D, Klussmann S, Kleber S, et al. Neutralization of CD95 ligand promotes regeneration and functional recovery after spinal cord injury. Nat Med, 2004, 10:389-395.
- [8] Chan PH. Mitochondria and neuronal death/Survival signaling pathways in cerebral ischemia. Neurochem Res, 2004,29: 1943-1949.
- [9] Lee YB, Yune TY, Baik SY, et al. Role of tumor necrosis factor- α in neuronal and glial apoptosis after spinal cord injury. Exp Neurol, 2000, 166: 190-195.
- [10] Yune TY, Chang MJ, Kim SJ, et al. Increased production of tumor necrosis factor-alpha induces apoptosis after traumatic spinal cord injury in rats. J Neurotrauma,2003,20:207-209.
- [11] Satake K, Matsuyama Y, Kamiya M, et al. Nitric oxide via macrophage iNOS induces apoptosis following traumatic spinal cord injury. Brain Res Mol,2000,85:114-122.
- [12] Xu J, Kim GM, Chen S, et al. iNOS and nitrotyrosine expression after spinal cord injury. J Neurotrauma, 2001,18:523-532.
- [13] Miscusi M. The role of constitutive nitric oxide synthase in pathogenesis of secondary lesion after spinal cord injury preliminary results. J Neurosurg Sci, 2002,46:55-59.
- [14] Kwak EK, Kim JW, Kang KS, et al. The role of inducible nitric oxide synthase following spinal cord injury in rat. J Korean Med Sci, 2005, 20: 663-669.
- [15] Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. Pharmacol Rev,1991,43:109-142.
- [16] Nathan C, Xie QW. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. Cell, 1994,78:915-918.
- [17] 尤春景,韩韶华. 功能性磁刺激的康复应用研究现状. 中华物理医学与康复杂志,2003,25:697-700.
- [18] 李新志,郭风劲,许涛,等. 磁刺激和碱性成纤维细胞生长因子对脊髓损伤后神经再生的影响. 中华创伤杂志,2004,20:491-492.

(修回日期:2010-07-20)

(本文编辑:松 明)

《中华物理医学与康复杂志》第七届编辑委员会通讯编委名单

(按姓氏笔画排序)

| | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 马 超 | 尹 勇 | 王俊华 | 王楚怀 | 王蓓蓓 | 白玉龙 | 刘雅丽 | 孙乐蓉 | 毕 胜 |
| 许 涛 | 许光旭 | 余 茜 | 张载福 | 李 丽 | 李铁山 | 李雪萍 | 杨卫新 | 汪 萍 |
| 汪 琴 | 汪军民 | 陆 敏 | 陈 刚 | 陈 翔 | 范晓华 | 姜志梅 | 胡昔权 | 胥方元 |
| 商晓英 | 舒 彬 | 谢 明 | 虞乐华 | | | | | |