

[文章编号] 1671-587X(2010)04-0620-05

甲强龙、电针联合羊膜上皮细胞移植对脊髓损伤大鼠轴浆运输功能及GFAP表达的影响

李一帆^{1,2}, 陈东³, 薛辉¹, 刘佳梅¹

(1. 吉林大学基础医学院组织学与胚胎学教研室, 吉林 长春 130021; 2. 长春中医药大学基础医学院解剖学教研室, 吉林 长春 130117; 3. 广东医学院组织学与胚胎学教研室, 广东 湛江 524023)

[摘要] 目的: 探讨甲强龙(MP)、电针与羊膜上皮细胞(AECs)联合治疗对脊髓损伤(SCI)大鼠轴浆运输功能的影响, 为临床治疗脊髓损伤寻找一种更为有效的方法。方法: 将60只成年雌性Wistar大鼠随机分成5组, 每组12只。脊髓损伤对照组: 做脊髓损伤模型, 不进行治疗; 甲强龙组: 脊髓损伤后, 用大量甲强龙药物冲击治疗, 共3d; 甲强龙+电针组: 在甲强龙治疗基础上, 脊髓损伤后4h, 行华佗夹脊穴电针治疗; 甲强龙+电针+AECs组: 在甲强龙+电针组基础上, 脊髓损伤后第7天, 在脊髓损伤处移植大鼠AECs联合治疗; 假手术组: 只打开椎板, 暴露脊髓, 不造成脊髓损伤。各组每隔6d进行行为学观察(BBB评分), 术后30d行荧光红(FR)逆行示踪和GFAP免疫荧光组织化学观察。结果: BBB评分显示, 脊髓损伤后经过治疗各组都有不同程度的后肢功能恢复, 其中以甲强龙+电针+AECs组恢复最为明显, 第30天, BBB评分可恢复到 15.23 ± 1.01 。荧光红(FR)逆行示踪, 甲强龙+电针+AECs组可见大量有序的FR阳性神经纤维, 神经示踪剂能被运输到脊髓损伤区远侧端较远的距离; 100倍荧光显微镜下观察, 损伤区FR阳性神经纤维数为 312.67 ± 34.06 , 与其他治疗组比较差异有显著性($P < 0.01$); GFAP表达结果, 各组GFAP阳性细胞较假手术组均明显增高, 而甲强龙+电针+AECs组的表达量低于其他损伤组, 200倍荧光显微镜下观察, 损伤区GFAP阳性细胞数为 633.61 ± 54.4 , 与其他治疗组比较差异有显著性($P < 0.01$)。结论: 甲强龙、电针与AECs联合治疗脊髓损伤能够有效地抑制星形胶质细胞的过度增生, 恢复脊髓轴浆运输功能, 促进神经纤维再生。

[关键词] 甲强龙; 电针; 羊膜上皮细胞; 轴浆运输; 胶质纤维酸性蛋白

[中图分类号] R651.2; R245.31 **[文献标志码]** A

Effects of methylprednisolone, electro-acupuncture and amniotic epithelial cells transplantation on axon-plasma transporting function and expression of GFAP in spinal cord injury rats

LI Yi-fan^{1,2}, CHEN Dong³, XUE Hui¹, LIU Jia-mei¹

(1. Department of Histology and Embryology, School of Medical Sciences, Jilin University, Changchun 130021, China; 2. Department of Anatomy, School of Basic Medical Sciences, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China; 3. Department of Histology and Embryology, Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, China)

Abstract: Objective To explore the combined effect of methylprednisolone (MP), electro-acupuncture and amniotic epithelial cells (AECs) transplantation on axon-plasma transporting function in rats with spinal cord injury

[收稿日期] 2010-04-13

[基金项目] 国家自然科学基金资助课题(30970739); 吉林省科技厅科技发展计划项目资助课题(20090726)

[作者简介] 李一帆(1977-), 女, 吉林省长春市人, 讲师, 医学博士, 主要从事脊髓损伤与修复的研究。

[通信作者] 陈东(Tel: 0759-2388575, E-mail: nbumschendon@yahoo.com.cn)

(SCI), and provide a more effective method to clinical therapy for SCI. **Methods** Sixty female Wistar rats were randomly divided into 5 groups ($n=12$). SCI control group: no treatment after SCI was created. MP group: MP pulse treatment after SCI, for 3 d. MP and electro-acupuncture group: electro-acupuncture treatment on Hua Tuo Jiaji acupoint 4 h after SCI, based on MP group. MP, Electro-acupuncture and AECs group: rat AECs transplantation treatment in SCI region 7 d after SCI based on MP and electro-acupuncture group. Sham group: neural scute was opened and spinal cord was exposed without SCI. Ethological observation (BBB scores) was performed every 6 d. Fluorescein red (FR) anterograde tagging and GFAP immunofluorescence histochemistry observation were performed on the 30th day after operation. **Results** BBB scores revealed that functional recovery diversity of the hind limb was seen in every therapy group after SCI, and the MP, electro-acupuncture and AECs group was the best and the score was 15.23 ± 1.01 on the 30th day. As revealed by FR anterograde tagging, MP, electro-acupuncture and AECs group contained numerous ordinary FR-positive axons, and neural labelled compound could be transported to the far distant area of SCI region distal end, the number of FR-positive axons of SCI region were 312.67 ± 34.06 under fluorescence microscope ($\times 100$), the differences between MP, electro-acupuncture and AECs group and other therapy groups were statistically significant ($P < 0.01$). GFAP revealed that the quantity of GFAP positive astrocytes in each injured group was increased obviously than sham operation group and MP, electro-acupuncture and AECs group listed the least, the number of GFAP positive astrocytes of SCI region was 633.61 ± 54.4 under fluorescence microscope ($\times 200$), there were significant differences between MP, electro-acupuncture and AECs group and other therapy groups ($P < 0.01$). **Conclusion** A combination of methylprednisolone, electro-acupuncture and AECs transplantation can restrain hyperplasy of horizontal cells, promote the recovery of axon-plasma transporting function and the regeneration of axons in SCI rats.

Key words: methylprednisolone; electro-acupuncture; amniotic epithelial cells; axon-plasma transporting; glial fibrillary acidic protein

30多年前,我国唐山大地震造成了数十万人伤亡,存活的伤员中有相当一部分是脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)患者,失去了生活自理能力。2008年5月12日汶川大地震中同样存在很多脊髓损伤患者,37万余伤员中因脊髓损伤造成截瘫者占2%^[1]。目前国内外对于脊髓损伤的治疗还是以外科手术与激素治疗为主。据国外统计,脊髓损伤患者一生的治疗康复费用平均达75万美元以上,美国每年对脊髓损伤患者的花费超过60亿美元^[2-3]。我国属于发展中国家,还承担不起如此昂贵的医疗费用,所以,寻找一种更加经济、有效的治疗方法迫在眉睫。脊髓损伤在中国传统医学中属“体惰”、“痿证”范畴。在脊髓损伤治疗中,电针在临床上已取得了一定效果,它是由祖国传统医学针刺与现代医学电刺激疗法相结合而形成,具有“简、便、验、廉”等优势。近年来研究显示,羊膜上皮细胞(amniotic epithelial cells, AECs)可分泌多种神经营养因子,能促进神经元的存活及其轴突生长,在脊髓损伤治疗方面起着重要作用。本研究通过中西医相结合的治疗途径,观察脊髓损伤后轴浆运输功能的恢复情况,为临床治疗脊髓损伤寻找一种更为简便、有效的方法。目前国内外未见相关文献报道。

1 材料与方 法

1.1 大鼠 AECs 的分离和培养

取妊娠中期(12~14d)Wistar大鼠,用10%水合氯醛腹腔注射麻醉后,在无菌条件下剥下胎膜内层的羊膜,收集AECs,加入含10%灭活的胎牛血清的DMEM/F12培养液,以细胞数为 $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 的密度接种到培养瓶中,置 37°C 、5% CO_2 的细胞培养箱中静置培养。移植前2h Hoechst33342标记。

1.2 实验动物及分组

60只体质量200~250g雌性健康Wistar大鼠,由吉林大学基础医学院实验动物中心提供。随机分为5组,每组12只。脊髓损伤对照组:做脊髓损伤模型,不进行治疗;甲强龙组:脊髓损伤后,立即静脉推注甲强龙 $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,4h后重复1次, $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,此后,静脉推注甲强龙 $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,2次 $\cdot \text{d}^{-1}$,共3d;甲强龙+电针组:除了进行甲强龙治疗外,脊髓损伤后4h,行华佗夹脊穴电针治疗。损伤平面上、下各2对取穴,左、右穴位交替使用,选用长25mm、直径0.35mm的毫针,上海产6805-II型治疗仪,正、负极,疏密波,频率1~2Hz,强度0.3~

1.0 mA, 以针刺处肌肉轻微抖动为宜, 持续 15 min, 此后 1 次·d⁻¹, 6 d 为 1 疗程, 间隔 2 d, 进入下一个疗程, 共治疗 3 个疗程; 甲强龙+电针+AECs 组: 在进行甲强龙和华佗夹脊穴电针治疗的基础上, 脊髓损伤后第 7 天, 用微量注射器在脊髓损伤处中心灰质区, 移植 AECs 5 μ L, 浓度: $1 \times 10^7 \mu\text{L}^{-1}$; 假手术组: 只打开椎板, 暴露脊髓, 不造成脊髓损伤。

1.3 大鼠脊髓损伤模型制作

采用改良的 Allen's 撞击法^[4]。所有器械经高压蒸汽灭菌。用 10% 水合氯醛作腹腔麻醉 ($0.35 \text{ mL} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$), 用咬骨钳和骨剪以开骨窗的方法去除 T₁₀ 椎板, 用自制改良的 Allen's 撞击器, 使 20 g 的击打棍从 3 cm 高度自由落体, 致伤能量 $60 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-2}$, 撞击 T₁₀ 骨窗对应的脊髓, 造成急性脊髓损伤。撞击成功标准为: 撞击脊髓组织水肿、出血, 硬脊膜完整呈紫红色, 紧张, 膨隆, 大鼠尾巴出现痉挛性摆动, 双下肢躯体回缩样扑动, 呈迟缓性瘫痪。术后开始每日腹腔注射青霉素 8 万 U/只, 庆大霉素 0.2 万 U/只, 维持 7 d。定时定量给以软饲料喂养, 饮水不加限制, 人工排尿, 直到自身排尿反射恢复。各组大鼠均饲养 30 d 后取材。大鼠共计死亡 1 只, 出现在 A 组术后 20 d, 解剖后发现死因为肠梗阻, 随后补充 1 只入实验。

1.4 检测指标

1.4.1 行为学检测 参照 Basso 等^[5]提出并改良的脊髓损伤大鼠功能恢复评判标准即 BBB 评分法(共 21 级)、双盲法对各组动物后肢运动能力进行评估, 每隔 6 d 定时记录大鼠双后肢运动功能恢复情况, 进行评分。

1.4.2 荧光红 (fluorescein red, FR) 顺行示踪

实验各组大鼠于术后 30 d 各取 6 只, 用 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉大鼠后, 俯卧位固定于立体定位仪上, 在脊髓损伤处上方 2 个脊髓节段, 用 Hamilton 微量注射器在左、右两侧分浅、中、深 3 点缓慢注入 FR 示踪剂^[6] (美国 Invitrogen 公司), 每侧 0.9 μ L, 标记动物再饲养 4 d 后用 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉大鼠, 生理盐水、4% 多聚甲醛常规灌流固定, 暴露脊髓 T₈~T₁₂, 迅速取出脊髓组织, 4% 多聚甲醛后固定 4 h, 梯度蔗糖脱水, OCT 包埋, -70℃ 保存。用恒冷箱切片机做冠状面切片, 厚 16 μ m, 甘油明胶封片。实验各组

切片于 100 倍荧光显微镜下观察, 选择脊髓损伤区中部的视野, 显微照片输入计算机, 采用 Imagepro-plus (IPP) 6.0 图像分析软件计数每张切片 FR 阳性纤维的数量。每只动物随机取 3 张切片入实验数据分析。

1.4.3 免疫荧光组织化学观察 每组取 6 只大鼠, 用恒冷箱切片机做脊髓冠状面切片 (方法同前), 切片经 10% 羊血清封闭 30 min, GFAP 一抗 (小鼠抗大鼠, 美国 Lab Vision 公司 1:200 稀释) 4℃ 过夜, PBS 冲洗, 二抗 (CY3 标记羊抗小鼠, 美国 Jackson Immunoresearch Labs 1:400 稀释), 室温 1 h, PBS 冲洗, 甘油明胶封片。实验各组切片于 200 倍荧光显微镜下观察, 选择脊髓损伤区中部的视野, 显微照片输入计算机, 采用 Imagepro-plus (IPP) 6.0 图像分析软件计数每张切片 GFAP 阳性细胞的数量。每只动物随机取 3 张切片入实验数据分析。

1.5 统计学分析

采用 SPSS13.0 统计软件包进行数据处理, 结果中 BBB 评分、FR 阳性神经纤维及 GFAP 阳性细胞数以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间多个均数的两两比较采用 *q* 检验法。

2 结果

2.1 行为学 BBB 评分结果

手术前所有实验动物双后肢 BBB 评分均为 21 分。脊髓损伤对照组大鼠脊髓受撞击损伤后都出现双后肢瘫痪, 术后 1 周内未见功能恢复, 2 周开始恢复, 但恢复缓慢, 到第 4 周基本停止, 只能恢复到后肢 3 个关节的广泛活动而不能持重行走。甲强龙组、甲强龙+电针组和甲强龙+电针+AECs 组在脊髓损伤后经过治疗, 都有不同程度的后肢功能恢复, 甲强龙组大鼠后肢功能虽然有所恢复, 但与脊髓损伤对照组比较, 差异未见统计学意义; 甲强龙+电针组、甲强龙+电针+AECs 组与甲强龙组比较差异有显著性 ($P < 0.01$); 甲强龙+电针组与甲强龙+电针+AECs 组比较差异也有显著性 ($P < 0.01$), 各治疗组中甲强龙+电针+AECs 组后肢功能恢复最为明显。假手术组术后第 1 天, 后肢出现短暂性活动迟缓, 第 2 天明显恢复, 1 周后功能恢复接近正常 (表 1)。

表1 实验各组后肢运动功能的 BBB 评分比较

Tab. 1 Comparison of BBB score of hind limb motor function between various groups ($n=12, \bar{x} \pm s$)

Group	BBB score					
	(t/d) 1	6	12	18	24	30
SCI control	0	0.68±0.59	2.42±1.03	4.69±1.46	5.56±1.03	5.56±1.03
MP	0.5±0.1	1.56±0.52	3.64±0.87	5.23±1.17	6.42±1.21	7.00±0.61
MP+electro-acupuncture	0.9±0.2*	2.65±0.87*	4.61±1.21*	7.05±1.42*	7.61±1.52*	8.20±0.65*
MP+electro-acupuncture+AECs	0.9±0.2*	2.66±0.59*	6.23±1.25 [△]	9.68±1.31 [△]	13.32±1.66 [△]	15.23±1.01 [△]
Sham	9.4±0.4	19.56±0.76	20.88±0.11	21.00±0.00	21.00±0.00	21.00±0.00

* $P<0.01$ compared with MP group; [△] $P<0.01$ compared with MP+electro-acupuncture group.

2.2 FR 顺行示踪观察

在本实验中, 脊髓损伤对照组在脊髓损伤区及损伤区两端均未见 FR 阳性神经纤维; 甲强龙组损伤区近侧端处偶见短小呈红色荧光的 FR 阳性神经纤维, 但是未见此阳性纤维通过损伤区; 甲强龙+电针组可见少量 FR 阳性神经纤维并通过损伤区; 甲强龙+电针+AECs 组可见大量的 FR 阳性神经纤维, 神经示踪剂能被运输到脊髓损伤区远侧端较

远的距离, 数量较甲强龙+电针组明显增加, 纤维走行较规则, 几乎平行排列且红色荧光着色增强, 在同一张切片上可见大量 Hoechst33342 标记的呈蓝色的移植 AECs, 生长良好, 分布均匀, 甲强龙+电针+AECs 组与其他各治疗组比较 FR 阳性的神经纤维数量差异有显著性 ($P<0.01$); 假手术组显示 FR 阳性的神经纤维繁多, 较长, 分布均匀, 平行排列, 规则有序 (表 2 和图 1, 见封二)。

表2 实验各组大鼠脊髓损伤处 FR 阳性神经纤维及 GFAP 阳性细胞计数

Tab. 2 FR positive axons and GFAP positive astrocytes in SCI region in various groups ($n=6, \bar{x} \pm s$)

Group	No. of FR positive axons	No. of GFAP positive astrocytes
SCI Control	0	2 033.89±93.80
MP	0	1 330.95±69.48
MP+electro-acupuncture	78.67±10.59*	866.94±89.97*
MP+electro-acupuncture+AECs	312.67±34.06 [△]	633.61±54.4 [△]
Sham	1 263.39±140.01	391.94±44.58

* $P<0.01$ compared with MP group; [△] $P<0.01$ compared with MP+electro-acupuncture group.

2.3 GFAP 表达结果

假手术组脊髓内可见 GFAP 染色呈红色的阳性星形胶质细胞, 细胞轮廓清晰, 其他各组显示 GFAP 的表达均明显增高。脊髓损伤对照组、甲强龙组脊髓损伤区中心组织坏死, GFAP 高表达, 但未见完整的星形胶质细胞; 甲强龙+电针组损伤区可见大量的星形胶质细胞, 生长混乱, 形成明显的胶质界膜; 甲强龙+电针+AECs 组 GFAP 的表达低于其他损伤组, 组间比较差异有显著性 ($P<0.01$), 同时可见大量 Hoechst33342 标记的呈蓝色的移植 AECs, 生长良好, 分布均匀 (表 2 和图 2, 见封二)。

3 讨论

成年哺乳动物脊髓损伤后神经传导通路中断, 其代谢、轴浆运输功能受到抑制, 而轴突再生所需的功能和结构蛋白均由神经元胞体合成经轴浆转运

供给^[7-8], 轴浆运输功能的恢复程度直接影响神经纤维再生情况, 故如何恢复轴浆运输功能并促进神经纤维再生, 是脊髓功能恢复的关键所在。FR 是一种显示长传导束极佳的顺行及逆行追踪剂, 进入神经组织后, 该示踪剂可以被损伤和未损伤的神经元及其突起摄取, 然后顺行或逆行沿轴突运输到相应的靶区, 标记后 4~15 d 均可观察到阳性结果。本实验采用损伤脊髓上 2 个节段 3 点注射法, 顺行标记下行传导束, 标记后 4 d 即可清晰显示传导束走行的全程。结果发现甲强龙、电针联合 AECs 移植治疗组可见大量的 FR 阳性神经纤维通过损伤处, 向远侧端生长, 数量较其他各损伤组明显增加, 纤维走行较规则。由此可以证明甲强龙、电针联合 AECs 移植治疗对轴突内轴浆运输功能的修复有一定作用, 并促进了神经纤维的再生, 与 BBB 评分结果相一致, 运动功能得到了部分恢复。FR 示踪技术为甲强龙、电针联合 AECs 移植治疗脊髓

损伤、促进轴浆运输功能提供了形态学依据。

GFAP是星形胶质细胞(AS)的特异性蛋白和骨架成分之一^[9],可作为其特异性分子标志蛋白,其表达的高低可反映胶质细胞的功能状态。大量实验表明:脊髓损伤后损伤部位常由AS进行修复,一方面参与吞噬损伤处溃变的细胞碎屑和退变的神经轴突,并分泌多种神经诱导因子促使神经再生^[10];另一方面通过AS增生肥大,反应性胶质化,使损伤局部形成胶质瘢痕,对神经纤维生长及脊髓轴浆运输功能起着机械、化学性的阻碍作用,影响脊髓损伤的修复^[11-12]。本实验GFAP染色结果显示:各脊髓损伤组GFAP的表达均明显增高,甲强龙、电针联合AECs移植治疗组增生的星形胶质细胞数量低于其他损伤组,而该组FR逆行示踪结果显示优越于其他损伤组,说明甲强龙、电针联合AECs移植治疗能够有效地抑制星形胶质细胞的过度增生,有利于抑制胶质瘢痕的形成,恢复轴浆运输功能,促进损伤区再生的轴突穿越胶质屏障。推测是通过以下作用的综合结果:①甲强龙多方面的神经保护作用,包括改善微循环、抑制脂质氧化、减少细胞钙内流、维持神经系统兴奋性等^[13]作用;②电针刺激能从多个方面有效抑制体内有害物质的释放和促进有益物质的释放,从而减轻脊髓继发性损伤^[7];③AECs移植起到了“细胞桥”作用,并可分泌多种神经营养因子。另外,结果中显示甲强龙、电针联合AECs移植治疗组GFAP阳性细胞数量约为假手术组的1.6倍,甲强龙+电针组为假手术组的2.2倍,分析星形胶质细胞增生数量小于正常组织的1.6倍,对脊髓损伤的恢复还是有益的,不会成为神经轴突再生的阻碍,超过正常组织的2.2倍,形成的胶质瘢痕会阻碍神经纤维再生,抑制脊髓的轴浆运输功能。至于量化GFAP阳性细胞对神经生长的促进和阻碍作用,有多少再生的轴突可以穿过多厚的瘢痕还有待进一步的深入研究。

[参考文献]

- [1] 朱立国,雷仲民,张兴平.地震伤员灾后中医药治疗与康复的思考[J].北京中医药,2009,28(1):7-8.
- [2] Tator CH. Strategies for recovery and regeneration after brain and spinal cord injury[J]. Injury Prev, 2002, 8 (Suppl 4): 33-36.
- [3] O' Connor P. Incidence and patterns of spinal cord injury in Australia[J]. Accid Anal Prev, 2002, 34 (4): 405-415.
- [4] Allen AR. Remarks on the histopathological changes in the spinal cord due to impacts: An experimental study[J]. J Neu Nint Dis, 1914, 41 (3): 141.
- [5] Engesser-Cesar C, Anderson AJ, Basso DM, et al. Voluntary wheel running improves recovery from a moderate spinal cord injury[J]. J Neurotrauma, 2005, 22 (1): 157-171.
- [6] 薛辉,陈东,张秀英.化学去细胞肌肉促进大鼠脊髓半横断后的轴突再生[J].西安交通大学学报:医学版,2009,30(2):154-158.
- [7] 乔鸿飞,兰宾尚,刘亦恒.电针刺激对脊髓损伤大鼠NF200 GFAP表达的影响[J].中国康复医学杂志,2008,23(7):635-637.
- [8] 王亚莉,许燕,韩雪,等.人脐血单个核细胞移植对大鼠脊髓损伤的修复作用[J].郑州大学学报:医学版,2009,44(2):309-312.
- [9] 卢培刚,冯华,王宪荣,等.高压氧预处理对大鼠脊髓损伤后GFAP和巢蛋白表达的影响[J].中华神经外科疾病研究杂志,2008,7(2):149-153.
- [10] Cheng H, Wu JP, Tzeng SF. Neuroprotection of glial cell line-derived neurotrophic factor in damaged spinal cords following contusive injury[J]. J Neurosci Res, 2002, 69(3): 397.
- [11] 杨成,李滨,刘同慎,等.电针对脊髓损伤后星形胶质细胞增生的影响[J].中国针灸,2005,25(8):569-572.
- [12] 刘曾旭,王向东,余庆,等.微囊化兔嗅球细胞悬液移植对脊髓损伤大鼠GFAP及NF200表达的影响[J].中国临床解剖学杂志,2009,27(5):566-569.
- [13] Beattie MS, Hermann GE, Rogers RC, et al. Cell death in models of spinal cord injury[J]. Prog Brain Res, 2002, 137(6): 37-47.