

· 基础研究 ·

磁刺激对损伤大鼠脊髓组织巢蛋白表达的影响

许涛 郭风劲 郭铁成 陈安民 黄晓琳 何际平

【摘要】目的 研究磁刺激对损伤脊髓组织的中间丝蛋白——巢蛋白(nestin)表达的影响。**方法** 46 只 Wistar 大鼠随机分为假手术组(6 只)、损伤组(20 只)和治疗组(20 只)。治疗组与损伤组用改良的 Allen 重物坠落法制作大鼠脊髓损伤模型。治疗组于术后 24 h 开始给予磁刺激,频率为 0.5 Hz,75% 的最大输出强度(峰值强度为 1.9 T),每天 1 次,每次 30 个脉冲,连续 7 d,损伤组无特殊处理。分别于术后 24 h、1 周、4 周和 8 周进行 BBB(Basso Beattie and Bresnahan)行为学评分,应用免疫荧光组织化学法、半定量逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)技术检测各时间点损伤脊髓组织中巢蛋白表达的变化。**结果** 假手术组大鼠脊髓组织细胞中巢蛋白有微量表达,脊髓损伤后表达增加治疗组在损伤后 1 周、4 周和 8 周巢蛋白表达均高于损伤组($P < 0.05$);治疗组在损伤后 1 周、4 周和 8 周的行为学评分也均明显高于损伤组($P < 0.01$)。**结论** 磁刺激治疗后损伤脊髓组织局部巢蛋白的表达增强,可促进大鼠损伤脊髓的再生修复和功能恢复。

【关键词】 脊髓损伤; 神经干细胞; 磁刺激; 巢蛋白

Effects of magnetic stimulation on nestin expression of injured spinal cord in rats XU Tao*, GUO Feng-jing, GUO Tie-cheng, CHEN An-ming, HUANG Xiao-lin, HE Ji-ping. * Department of Rehabilitation Medicine, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

【Abstract】 Objective To study the effects of magnetic stimulation (MS) on expression of intermediate filament protein (nestin) in spinal neurons of rats after spinal cord injury (SCI). **Methods** Forty-six Wistar rats were used, among them 40 rats underwent SCI with 10×12.5 cm impact at the T₈ level and were evenly divided into two groups: the MS group ($n = 20$) and the control group ($n = 20$), the other 6 rats served as the normal control. The rats in the MS group received 0.5 Hz and 75% of 1.9 T maximal intensity output of the magnetic stimulator 24 h post injury, 30 pulses per day and lasting for 7 days, while the rats in the other group were not exposed to the MS. The rats were sacrificed 24 h, 1 w, 4 w and 8 w after spinal cord injury, the nestin mRNA levels of the affected spinal cord were determined by RT-PCR, the protein levels by using immunofluorescence. The BBB scores were used to assess hindlimb neurological function. **Results** The nestin expression were mild in the normal spinal cord but increased after SCI, which were higher in MS group than that in the control group 24 h, 1 w, 4 w and 8 w post SCI as detected by immunofluorescence and RT-PCR ($P < 0.05$). The Basso, Beattie and Bresnahan scores in the MS group were higher than those in the control group 1 w, 4 w and 8 w post SCI ($P < 0.01$). **Conclusion** MS (0.5 Hz, 75% of 1.9 T maximal intensity) could promote nestin expression in spinal cord after SCI and facilitate the recovery of hindlimb function.

【Key words】 Spinal cord injury; Neural stem cell; Magnetic stimulation; Nestin

近年的研究发现,在成年哺乳动物的胚胎和成熟个体体内的下丘脑、室下带、嗅球、海马齿状回和脊髓中均存在神经干细胞(neural stem cells, NSCs),其标记分子为巢蛋白(nestin)^[1]。NSCs 在正常情况下处于静息状态,但如遇到与胚胎时期相同因子的影响或异常情况则会被诱导分裂和分化^[2,3]。诱导内源性 NSCs 增殖和分化,使损伤的中枢神经系统进行自我修复是 NSCs 研究的重要内容之一^[4]。关于 NSCs 电生理活

动特性的研究发现,NSCs 具有其子代细胞——神经元和神经胶质细胞的双重电生理特性^[5]。本研究的目的是为了验证脉冲磁刺激诱导出的感应电流能否对 NSCs 产生激活效应。

材料与方法

一、动物模型的建立与分组

46 只 Wistar 大鼠,雌、雄各半,体重为 220 ~ 300 g,由华中科技大学同济医学院动物实验中心提供。随机分为假手术组($n = 6$)、损伤组($n = 20$)和治疗组($n = 20$)。损伤组和治疗组采用改良的 Allen 重物坠落

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(许涛、郭铁成、黄晓琳),骨科(郭风劲、陈安民);美国亚力桑那州立大学生物工程系,华中科技大学客座教授(何际平)

(weight drop)法^[6]制造脊髓损伤模型:以30 mg/kg体重戊巴比妥钠腹腔麻醉大鼠后,无菌操作下以 T₈ 椎体为中心行椎板切除术,显露直径约 3.0 mm 的圆形区作为脊髓损伤区,在硬膜表面垫一弯曲度与脊髓表面一致的塑料垫片,用重 10 g 的圆柱状金属砝码在细玻璃管的引导下从 12.5 cm 高处垂直落下,打击垫片致大鼠脊髓急性挫伤。如大鼠出现摆尾反射,双下肢及躯体回缩扑动后瘫痪,表明撞击成功。损伤后每日 10 点、16 点和 22 点行人工手法膀胱排尿,直至建立反射性膀胱排尿。假手术组仅做椎板切除术。

二、治疗干预

磁刺激器为丹麦 Dantec 公司生产,圆形刺激线圈直径为 9 cm,脉冲磁场峰值强度为 1.9 T。治疗组于脊髓损伤后 24 h 开始给予磁刺激,将线圈水平置于大鼠脊柱上方,线圈中心对准 T₈ 节段、距背部皮肤 1 cm 的位置,刺激频率为 0.5 Hz,75% 的最大输出强度,每天 1 次,每次 30 个脉冲,连续 7 d。损伤组置相同环境下,未予磁刺激。

三、取材及切片

损伤组和治疗组分别于术后 24 h、1 周、4 周和 8 周进行运动功能评分并取材(治疗组前 2 个时间点均于磁刺激治疗后评分并取材)。每个时间点取 5 只大鼠,以 40 mg/kg 体重的戊巴比妥钠腹腔麻醉,3 只大鼠经升主动脉插管后完整地取出脊髓,置于 4% 多聚甲醛中固定 4 h,取损伤段脊髓组织块(长约 8 mm),冰冻连续切片,片厚 5 μm,隔 4 片取 1 片进行组织免疫荧光检测;2 只大鼠取损伤脊髓中心组织制备组织匀浆,进行 RT-PCR 检测。假手术组于上述各时间点取材总制备冰冻切片。

四、检测指标

1. 大鼠运动功能评分

采用脊髓运动功能 BBB(Basso Beatti and Bresnahan)评分法^[7],对大鼠后肢功能,包括后肢髓、膝、踝关节主动活动范围、后足负重状况、前/后肢运动协调性、后爪在抬起和触地时脚趾的动作、尾部运动、躯干稳定性等项目进行评估,满分为 21 分。

2. 免疫荧光组织化学法检测巢蛋白的表达

取组织切片,0.5% H₂O₂ 甲醇液处理 30 min,1% 牛血清白蛋白-0.3% Triton X-100 37℃ 下处理 30 min,加入兔抗鼠巢蛋白一抗(1:50, CHEMICON 公司),37℃ 下孵育 30 min 后于 4℃ 的冰箱中放置 24 h,取出后以 PBS 冲洗,加入羊抗兔 FITC 荧光二抗(1:100, KPL 公司),37℃ 下处理 30 min,甘油封片,荧光显微镜下记录每张切片的阳性细胞数。

3. 半定量逆转录-聚合酶链式反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)测定巢蛋

白 mRNA 的表达

依照巢蛋白 cDNA 顺序,设计下列引物:上游引物 5'-aaccacaggagtggaactg3';下游引物 3'-tctggcattgactgag-caac5'(北京赛百盛生物技术公司合成),进行 PCR 扩增,扩增片段长度为 219 bp。RNA 抽提采用 TRIzol (Gibco-BRL 产品)试剂,依照说明书操作提取总 RNA,分光光度法定量。RT-PCR 反应采用一步法 RT-PCR 反应体系(Promega 公司)。首先确定最适循环数和最适模板量,本次实验最适模板量为 1.0 μg,上、下游引物各 1 μl,采用 50 μl 反应体系,PCR 最适循环数为 35 个循环。循环条件为:95℃ 下 5 min,94℃ 下 45 min,54℃ 下 45 min,72℃ 下 45 min,72℃ 下 10 min。产物经 2% 琼脂糖凝胶(含 0.5 mg/L 的溴乙锭)电泳,用凝胶成像系统(法国 Vilber 公司)处理。

五、统计学分析

应用 SPSS 10.0 统计软件进行分析,采用 *t* 检验。

结 果

一、大鼠行为学检查

术后 24 h,治疗组和损伤组大鼠都表现为后肢瘫痪($P > 0.05$),第 1,4 和 8 周时治疗组大鼠功能改善明显,与损伤组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 损伤组和治疗组大鼠各时间点 BBB 评分结果(分, $n = 20, \bar{x} \pm s$)

组 别	24 h	1 周	4 周	8 周
损伤组	0.84 ± 0.99	8.90 ± 1.05	14.80 ± 1.44	16.7 ± 2.12
治疗组	0.92 ± 0.57	11.95 ± 2.72 *	17.50 ± 0.85 *	19.90 ± 1.32 *

注:与损伤组比较, * $P < 0.01$

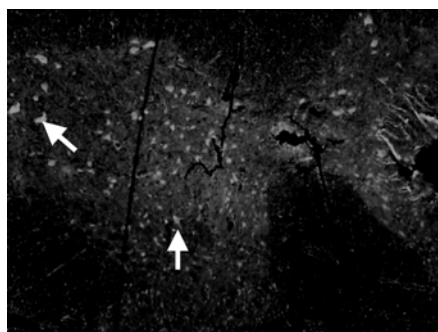
二、免疫荧光组织化学法检测巢蛋白的表达

巢蛋白在阳性细胞胞浆中有表达。假手术组仅见少许巢蛋白阳性细胞,为(2.1 ± 0.6)个;损伤组和治疗组在脊髓损伤后 24 h,巢蛋白阳性细胞数明显增加,1 周时达高峰,至第 8 周仍可见到巢蛋白阳性细胞。巢蛋白阳性细胞主要位于脊髓中央管室管膜、脊髓背侧出血坏死区,另外在脊髓白质、脉管周围、软膜下也能观察到巢蛋白阳性细胞(图 1,2)。图像分析比较显示,治疗组术后 1 周、4 周和 8 周,巢蛋白阳性细胞数明显多于损伤组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 2。

表 2 损伤组和治疗组大鼠各时间点巢蛋白阳性细胞数比较(个, $n = 20, \bar{x} \pm s$)

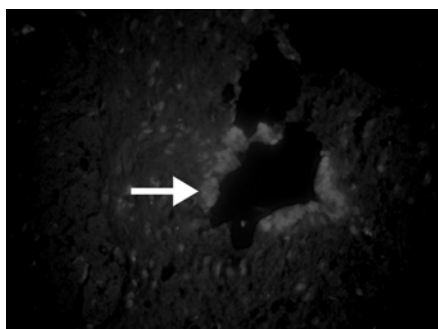
组别	24 h	1 周	4 周	8 周
损伤组	18.87 ± 2.45	21.48 ± 7.83	19.13 ± 3.47	9.18 ± 3.26
治疗组	19.01 ± 2.35	35.24 ± 6.83 *	29.69 ± 6.16 *	17.30 ± 6.61 *

注:与损伤组比较, * $P < 0.05$



箭头表示脊髓灰质内巢蛋白阳性细胞

图 1 治疗组 1 周脊髓内巢蛋白阳性表达 (×100)

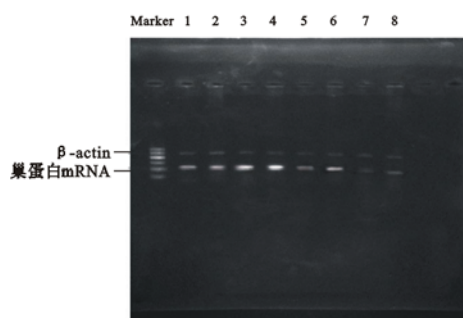


箭头表示室管膜周围巢蛋白阳性细胞

图 2 损伤组 4 周室管膜周围巢蛋白表达 (×400)

三、半定量 RT-PCR 测定巢蛋白 mRNA 的表达

治疗组和损伤组不同时间点的 RT-PCR 检测结果显示,得到两条约 200 bp (巢蛋白 mRNA) 和 500 bp (β -actin) 的扩增产物 (图 3),与预期大小一致。损伤组脊髓损伤后 24 h 已测出巢蛋白 mRNA 表达,1 周时达峰值 (1.453 ± 0.028),以后逐渐下降。治疗组在各个时间点的表达均高于损伤组,结果与免疫荧光组织化学结果相一致。



注:损伤组术后 24 h 目标基因巢蛋白 (219 bp) 和内参 β -actin 的表达;治疗组术后 24 h;损伤组术后 1 周;治疗组术后 1 周;损伤组术后 4 周;治疗组术后 4 周;损伤组术后 8 周;治疗组术后 8 周各组内参 β -actin 的表达基本一致

图 3 脊髓巢蛋白 mRNA RT-PCR 结果

讨 论

一、脊髓损伤与巢蛋白表达的关系

巢蛋白是一种中间丝蛋白,可作为 NSCs 的免疫细胞标记物,只在多潜能的神外胚层细胞中表达,随着神经上皮的分化、成熟而逐渐消失^[8]。但在少数保持神经发生功能的部位,巢蛋白仍有表达,例如大脑室管膜下区和海马齿状回^[3],脊髓中央管室管膜层也存在着大量未分化细胞^[9]。有研究证实^[10],脊髓损伤后脊髓中央管周围的巢蛋白阳性细胞有向损伤部位发生迁移的现象,提示中枢神经系统损伤后,室管膜下区的 NSCs 成为损伤灶周围的反应性胶质细胞的来源。

本实验观察到,巢蛋白在正常脊髓内很少表达,脊髓损伤后表达增强;从时间上来看,伤后 24 h 即可以检测到巢蛋白的基因和蛋白表达,1 周达高峰,此后随时间的延长而逐渐降低。这与 Frisen 等^[11]的研究结果类似,他们观察到脊髓损伤后 48 h 内,无论是损伤灶还是退化纤维束中的反应性星形细胞,均有巢蛋白表达,而且至少可持续 13 个月。

有研究提出,巢蛋白阳性细胞主要为两类 NSCs^[10]。第一类是能分化成胶质细胞的 NSCs,其来源可能是反应性胶质细胞,主要参与脊髓胶质瘢痕的形成,也被认为具有修复损伤病变、限制局部病变向周围扩散的作用;第二类是能分化为新神经元 NSCs,这类细胞有可能分化为胶质细胞和神经元,代替损伤神经元。因此,它们是成体脊髓神经细胞的新生基础,在脊髓损伤后的修复中有重要的意义。杜少辉等^[12]的研究报道,NSCs 再塑能力随时间的延长而降低,所以促进巢蛋白表达增强和表达时间延长的治疗措施将有利于中枢神经系统损伤的再生和修复。

二、磁刺激对脊髓损伤后巢蛋白表达的影响

从电生理学角度来看,中枢神经系统内细胞被分为两大类:一类是兴奋性细胞,即神经细胞,具有活跃的电生理活动特性;另一类为非兴奋性细胞,如胶质细胞,它们的电生理特性稳定^[13]。磁刺激就是利用交变磁场诱发组织内感应电流,刺激可兴奋细胞,从而对中枢神经系统发挥作用。近 10 年来人们才发现,啮齿类动物或人的中枢神经系统内还存在着 NSCs^[14]。刘欸等^[5]报道,NSCs 具有其子代细胞——神经元和神经胶质细胞的双重电生理特性,因此深藏于中枢神经系统内的 NSCs 有可能对磁刺激产生反应。本实验结果显示,治疗组脊髓组织巢蛋白的表达强度明显高于损伤组,证实磁刺激对在体 NSCs 具有激活作用。

既往已经有诸多研究提示磁刺激有利于中枢神经系统损伤的再生和修复,如 Shafik^[15]报道磁刺激有助于实验动物膀胱排空和神经源性膀胱的机能训

练;Singh 等^[16]发现,功能磁刺激能提高脊髓损伤后通气功能,恢复咳嗽功能;Sheriff 等^[17]报道骶骨外功能性磁刺激改善了脊髓损伤后逼尿肌反射亢进;有学者报道磁刺激能促进脊髓损伤后神经再生^[18,19]。但关于磁刺激对神经作用机制的报道并不多。本实验再次发现磁刺激能促进大鼠患肢功能恢复,且恢复程度与巢蛋白的表达上调同步,提示磁刺激可激活脊髓 NSCs,这可能是其促进脊髓损伤功能恢复的作用机制之一。

参 考 文 献

- 1 Svendsen CN, Caldwell MA, Ostenfeld T. Human neural stem cells: isolation, expansion, and transplantation. *Brain Pathol*, 1999, 9:499-513.
- 2 Craig CG, Tropepe V, Morshead CM, et al. In vivo growth factor expansion of endogenous subependymal neural precursor cell populations in the adult mouse brain. *J Neurosci*, 1996, 16:2649-2658.
- 3 Li Y, Chopp M. Temporal profile of nestin expression after focal cerebral ischemia in adult rat. *Brain Res*, 1999, 838:1-10.
- 4 Okano H. Stem Cell Biology of the Central Nervous System (Review). *J Neurosci Res*, 2002, 69:698-707.
- 5 刘喆,王红云,何乐. 胚胎大鼠神经干细胞电生理特性检测. *中华神经外科杂志*, 2001, 17:271-274.
- 6 Anderson TE. A controlled pneumatic technique for experimental spinal cord contusion. *J Neurosci Methods*, 1992, 6:327-333.
- 7 Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J Neurotrauma*, 1995, 12:1-12.
- 8 边玮,杨靖,唐珂,等. 巢蛋白在 P19 神经元分化过程中的表达. *卫*

生学报, 1999, 51:246-252.

- 9 Hauke C, Ackermann I, Korr H. Cell proliferation in the subependymal layer of the adult mouse in vivo and vitro. *Cell Prolif*, 1995, 271:978.
- 10 徐曦,刘勇. 中枢神经系统损伤后 NSCs 及 nestin 蛋白的变化. *解剖科学进展*, 2002, 8:343-345.
- 11 Frisen J, Johansson CB, Torok C, et al. Rapid widespread and long lasting induction of nestin contributes to the generation of glial scar tissue after CNS injury. *J Cell Biol*, 1995, 131:453-464.
- 12 杜少辉,张悦,黄洁,等. 牛珀至宝微丸对局灶性脑缺血再灌注后 Nestin 表达的影响. *中国中医基础医学杂志*, 2002, 8:737-741.
- 13 刘洪广,周琳,王毅,等. 无创性磁刺激技术在中枢神经的应用. *中国神经科学杂志*, 2000, 16:68-72.
- 14 Taupin O, Gage FH. Adult neurogenesis and neural stem cells of the central nervous system in mammals. *J Neurosci Res*, 2002, 69:745-749.
- 15 Shafik A. Magnetic stimulation: a novel method for inducing evacuation of the neuropathic rectum and urinary bladder in a canine model. *Urology*, 1999, 54:368-376.
- 16 Singh H, Bushnik T, Vernon WH. Expiratory muscle activation by functional magnetic stimulation of thoracic and lumbar spinal nerves. *Crit Care Med*, 1999, 27:2201-2211.
- 17 Sheriff MK, Shah PJ, Fowler C, et al. Neuromodulation of detrusor hyperreflexia by functional magnetic stimulation of the sacral roots. *Br J Urol*, 1996, 78:39-46.
- 18 李新志,郭风劲,陈安民,等. 磁刺激对脊髓损伤后神经再生的影响. *中国康复*, 2001, 16:129-131.
- 19 许涛,郭风劲,李新志,等. 磁刺激对脊髓损伤组织-fos 基因表达的影响. *中华物理医学与康复杂志*, 2003, 25:3-5.

(修回日期:2005-11-12)

(本文编辑:吴倩)

· 征稿 · 征订 ·

《神经损伤与功能重建》杂志征稿启事

《神经损伤与功能重建》杂志(原刊名:国外医学.物理医学与康复学分册)是经中华人民共和国新闻出版总署批准,由中华人民共和国教育部主管,华中科技大学同济医学院主办的神经科学专业学术性期刊(季刊),ISSN1001-117X, CN42-1759/R。本刊入选为中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊、被中国核心期刊(遴选)数据库收录。本刊由中科院院士杨雄里、王永炎等担任名誉主编,由同济医院神经内科主任王伟教授担任主编。本刊紧跟国际神经科学发展趋势,对神经系统疾病的基础与临床研究热点,予以实时追踪、报道,内容新颖、报道及时,突出科学性、创新性和实用性。本刊以从事相关科研、临床医疗工作者为读者对象。主要栏目有:述评、论著(基础研究与临床研究)、短篇论著、重大科研成果(包括阴性结果)报道、综述与编译、继续教育专栏、学术交流、病例讨论、讲座、会议纪要、新药介绍、读者来信、学术活动预告、书评或书讯。现面向国内外医学院校、科研机构及医疗单位征集稿件。

本刊具有学术水平高、指导性强、容稿量大、刊登周期短、信息时效快等特点。编辑部对来稿及时进行处理,收稿后 2 周内给予回执,对于网上投稿者,我们将在投稿后 1 周内发送电子回执,如需书面通知请及时来电告知。为了快速处理稿件,欢迎电子投稿。

来稿请寄:武汉市解放大道 1095 号(同济医院内)《神经损伤与功能重建》编辑部雷琪收;邮政编码:430030;电话:027-83662686;传真:027-83662686;E-mail: sunshiny1q@yahoo.com.cn。