

· 研究简报 ·

游泳训练联合补阳还五汤对大鼠脊髓损伤后神经轴突再生抑制因子的影响

王宏江 段晓娜 王鹏 李启超 窦静敏 周达岸

【摘要】 目的 探究联合应用游泳训练和补阳还五汤对脊髓损伤后大鼠神经轴突再生的影响。**方法** 将入选的 150 只 SPF 级 Sprague-Dawley (SD) 雌性大鼠按随机数字表法分为联合组、中药组、游泳组、损伤组和假手术组, 每组 30 只; 采用标准 T₁₀ 脊髓全横断损伤大鼠模型。分别于造模后第 1、2、3、4 和 5 周时, 每组各随机选取 6 只大鼠给予 BBB 评分后取材; 运用免疫组化、Western Blot 方法分别检测脊髓组织中 Nogo-A、MAG 的表达情况。**结果** 治疗第 1 周时, 各组大鼠之间的 BBB 评分值差别无统计学意义 ($P>0.05$), 第 2、3、4 和 5 周时, 各组同时点相比, 联合组、中药组、游泳组均较损伤组均表现出不同程度的 BBB 评分增高 ($P<0.05$), 且联合组高于中药组和游泳组, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。治疗第 1 周和第 2 周时, 各组 DAB 染色 Nogo-A 表达的 IOD/Area 比值差异不明显 ($P>0.05$), 而在第 3、4 和 5 周时, 联合组、中药组和游泳组其抑制程度均低于损伤组 ($P<0.05$), 以联合组最为明显, 且各组间差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。治疗第 1 周和第 2 周时, 各组的 MAG/ β -actin 比值组间比较, 差异均无统计学意义 ($P>0.05$), 而在第 3、4 和 5 周时, 联合组、中药组和游泳组与损伤组比较, 差异均有统计学意义 ($P<0.01$), 且联合组、中药组、游泳组的组间差异亦有统计学意义 ($P<0.05$), 联合组较中药组和游泳组的 MAG 表达抑制程度更为明显, 组间差异有统计学意义 ($P<0.05$)。**结论** 游泳训练与补阳还五汤的联合应用可以促进脊髓损伤的修复, 且联合组疗效明显优于单一的中药组或游泳组。

【关键词】 脊髓损伤; 补阳还五汤; 游泳训练

基金项目: 锦州医科大学校长基金-研究生科研创新基金 (AH2014016)

Fund program: Graduate Student Research Innovation Fund, Principal Fund of Jinzhou Medical University (AH2014016)

脊髓损伤 (spinal cord injury) 是脊柱损伤最严重的并发症之一, 常导致损伤节段以下肢体严重的功能障碍, 目前脊髓损伤的治疗尚缺乏很好的治愈手段。文献及前期实验表明, 补阳还五汤有利于改善脊髓损伤, 但其疗效还很局限^[1-4]。游泳运动康复训练是一种非侵入性干预, 可以增加脊髓神经潜在可塑性^[5]; 脊髓病变以下通路保持了许多脊髓功能和神经元特性, 并可以应答感觉输入, 因此在缺乏正常脊髓上传输入的情况下, 训练是一种激活离断脊髓功能的有效方法^[5-7]。本研究运用游泳训练联合补阳还五汤治疗脊髓损伤大鼠, 通过观察大鼠双下肢的运动功能及神经轴突再生抑制因子的影响, 以评估联合治疗的疗效程度, 旨在为探索脊髓损伤的临床治疗方案提供依据。

材料与方法

一、实验动物及分组

健康 SPF 级雌性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠若干只, 体重 (200±20) g, 由锦州医科大学动物实验中心提供; 实验中, 麻醉及手术中死亡大鼠 8 只、感染死亡 3 只、溺亡 2 只, 最终实际参

与并完成实验的 SPF 级大鼠 150 只。按随机数字表法将 150 只入选大鼠分为假手术组、损伤组、中药组、游泳组和联合组, 每组 30 只。实验中对大鼠的处置均符合锦州医科大学相关伦理学要求。

二、大鼠脊髓损伤模型制备及术后护理

脊髓损伤模型制作: 采用 1% 戊巴比妥腹腔注射麻醉 (0.5 ml/100 g), 以 T₉~T₁₁ 节段骨性标志为中心, 备皮后无菌操作下沿棘突做纵行约 3~5 cm 切口, 剥离筋膜、脂肪、钝性分离椎旁肌, 暴露术野; 用 10 号手术刀于 T₁₀ 节段处横行切断暴露的脊髓, 损伤组、中药组、游泳组和联合组大鼠用眼科镊夹除约 0.3~0.5 cm 脊髓, 止血, 确认夹除彻底, 用生理盐水冲洗手术视野^[8], 大鼠后肢痉挛性抽搐数次后软瘫, 双下肢运动功能评分 (Basso, Beattie, Bresnahan scale, BBB 评分)^[9] 为 0 分, 即为造模成功; 硬脊膜切口用胸背部筋膜片覆盖, 肌肉、皮下、皮层依次逐层缝合。假手术组大鼠仅切断棘突、椎板, 显露脊髓但不予切除, 不损伤脊髓。所有大鼠造模后 (包括假手术组) 均给予庆大霉素 100 mg/kg 腹腔注射, 以预防感染^[10]; 饮食、护理等处理无差别。

术后护理: 每天注意观察皮肤有无压疮或感染, 下肢、尾巴有无溃烂、自噬。术后单独饲养, 每天对各实验组动物排尿 2 次, 直至排尿反射恢复; 术后每天腹腔注射 5% 葡萄糖注射液 2 mL 以补充体液和能量, 持续 3 d。

三、补阳还五汤的组成和制备

补阳还五汤来源于清代王清任传统方剂, 组成成份: 黄芪

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2017.03.017

作者单位: 121000 锦州, 锦州医科大学研究生院 (王宏江、段晓娜、王鹏、李启超、窦静敏); 锦州医科大学附属三院康复中心 (周达岸); 武汉市第一医院神经内科 (王宏江)

通信作者: 周达岸, Email: 469490174@qq.com

60 g、当归 10 g、地龙 10 g、川芎 10 g、桃仁 10 g、红花 10 g、赤芍 10 g。由锦州医科大学附属中医医院中药房提供,经煎煮、提取,再浓缩至生药浓度为:0.6 g/ml,放入 4℃ 冰箱保存备用。

四、大鼠干预处理方法

各组大鼠造模成功后,假手术组和损伤组在造模完成后不给予任何干预治疗,中药组只给予补阳还五汤中药灌胃治疗,游泳组只给予游泳训练,联合组给予游泳训练和补阳还五汤中药灌胃治疗,持续治疗 5 周。

1. 中药灌胃方法:大鼠造模成功后,将制备好的中药取出,用 18 号灌胃针给中药组和联合组大鼠进行灌胃干预,根据人与大鼠体表面积换算,剂量为 0.7 ml/100 g(约 1.5 ml),每日上午 10:00 至 11:30 给药 1 次。

2. 游泳训练方法:游泳组和联合组大鼠在脊髓损伤造模前每天给予适应性游泳训练 10 min,持续 3 d。造模完成 3 d 后,参照 Simth 等^[11]游泳训练方法,进行游泳训练干预,每天 2 次,每次 5 min,密切观察大鼠游泳情况,防止溺水。水深 30 cm 左右,水温 30~34℃。游泳训练中注意避免尾巴接触池底,大鼠省力,从而不影响实验。游泳完成,吹干大鼠毛发后返笼。

五、观察指标及检测方法

分别于造模成功后(治疗前)及治疗第 1、2、3、4 和 5 周时,对各组大鼠进行 BBB 评分^[9];然后采用免疫组化法^[12]检测勿动蛋白(Nogo-A)的积分光密度(integrated optical density, IOD)值,用免疫印迹法(Western Blot)检测髓磷脂相关糖蛋白(myelin associated glycoprotein, MAG)/β-肌动蛋白(β-actin)的灰度比值^[13]。

1. 免疫组化检测:分别于治疗第 1、2、3、4 和 5 周时,各组按随机数字表法取 3 只大鼠给予 BBB 评分后,用 1%戊巴比妥麻醉,依次用生理盐水 500 ml 和 4%多聚甲醛给予心脏灌注,待大鼠肝脏及肠系膜动脉完全褪色时停止灌注,取大鼠脊髓横断处上下各 1 cm 左右组织,假手术组取术口处 2 cm 左右组织,浸泡于 4%多聚甲醛中,4℃ 保存,用于免疫组化检测。

取出各组大鼠 T₁₀段脊髓组织,行脱水、浸腊、包埋、制成 4 μm 厚切片,采用链酶亲和素-生物素复合物(strept avidin-biotin complex, SABC)三步法进行 Nogo-A 免疫组化染色。按照 SABC-POD 试剂盒的步骤进行,其中一抗以 1:100 比例稀释,湿盒 4℃ 过夜孵育。显微镜下观察并控制显色剂 3,3'-二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)显色时间,苏木素复染,以胞浆内淡黄色或棕黄色颗粒染色为阳性表达,然后通过 ImagePro Plus 6.0 软件检测 Nogo-A 的 IOD 值,分析各组 Nogo-A 阳性表达所选取单位面积的积分光密度值比(IOD/

area)。

2. Western Blot 检测:分别于治疗第 1、2、3、4 和 5 周时,各组按随机数字表法取 3 只大鼠给予 BBB 评分后,用 1%戊巴比妥麻醉后,直接取大鼠脊髓横断处上下各 1 cm 左右组织,假手术组取术口处 2 cm 左右组织,用 PBS 清洗后,-80℃ 保存,用于 Western Blot 检测。

制备脊髓组织样品蛋白,4℃,12 000 r/min 离心 15 min,取上清-20℃ 冻存。经蛋白定量,制胶、上样、电泳、转膜后、加一抗 MAG 及 β-actin,4℃ 孵育过夜,洗膜后加 HRP 标记的山羊抗兔 IgG(1:1000),37℃ 条件下孵育 1 h。洗膜后超敏发光液(ECL)作用后胶片曝光,经显影、定影处理后,观察 MAG 及 β-actin 显色情况并用 Image J 软件扫描,SPSS 16.0 统计分析 MAG/β-actin 灰度比值,得出结果。

六、统计学方法

使用 SPSS 16.0 版统计软件对实验数据进行统计学分析处理,所得计量数据以($\bar{x} \pm s$)表示,采用重复测量资料的方差分析方法,对各指标进行统计分析;用 ImagePro Plus 6.0 软件测量和分析免疫组化 Nogo-A 的平均积分光密度值比(IOD/Area)表达;用 Image J 软件测量 MAG/β-actin 的灰度比值。 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

结 果

一、各组大鼠不同时间的 BBB 评分比较

治疗前,损伤组、中药组、游泳组和联合组大鼠的 BBB 评分均为 0 分,与假手术组[(19.83±1.02)分]比较,差别有统计学意义($P < 0.01$)。随着治疗时间的推移,各组大鼠的 BBB 评分逐渐提高,除假手术组外,治疗第 1、2、3 和 4 周时,损伤组、游泳组、中药组、联合组各自与组内不同时间点相互比较,差异均有统计学意义($P < 0.01$);仅联合组第 5 周的 BBB 评分较组内第 4 周仍有明显提高($P < 0.05$)。详见表 1。

治疗第 1~5 周时,损伤组、游泳组、中药组和联合组大鼠的 BBB 评分均明显低于同时时间点的假手术组,且差异均有统计学意义($P < 0.05$);而第 1 周时,损伤组、游泳组、中药组和联合组各组大鼠之间的 BBB 评分比较,差别无统计学意义($P > 0.05$)。治疗第 2~5 周时,各组间同时时间点比较,联合组 BBB 评分分别较中药组和游泳组评分更高($P < 0.05$),较损伤组差异亦更明显($P < 0.01$)。详见表 1。

二、Nogo-A 的免疫组化检测

治疗第 1 周和第 2 周时,游泳组、中药组、联合组 Nogo-A 阳性表达的 IOD/Area 比值变化趋势不明显($P > 0.05$),且与损伤

表 1 各组大鼠不同时间点 BBB 评分比较(分, $\bar{x} \pm s$)

组别	只数	第 1 周	第 2 周	第 3 周	第 4 周	第 5 周
假手术组	6	20.25±0.50	20.75±0.50	21.00±0.00 ^{ab}	21.00±0.00 ^a	21.00±0.00 ^a
损伤组	6	3.25±0.50 ^c	5.75±0.50 ^{ac}	8.25±0.50 ^{abc}	11.25±0.58 ^{abc}	11.50±0.50 ^{ac}
游泳组	6	3.75±0.96 ^c	6.25±0.50 ^{acd}	9.25±0.96 ^{abcd}	12.00±0.50 ^{abcd}	12.25±0.50 ^{acd}
中药组	6	3.00±1.63 ^c	6.25±0.96 ^{acd}	10.00±2.16 ^{abcd}	13.00±0.50 ^{abcd}	13.00±0.00 ^{acd}
联合组	6	3.75±1.26 ^c	7.00±1.41 ^{acd}	10.25±2.22 ^{abcd}	13.25±0.50 ^{abcd}	14.25±0.50 ^{abcde}

注:与组内第 1 周比较,^a $P < 0.01$;与组内前 1 周比较,^b $P < 0.05$;与假手术组同时时间点比较,^c $P < 0.01$;与损伤组同时时间点比较,^d $P < 0.01$;与游泳组和中药组同时时间点比较,^e $P < 0.05$

组同时时间点比较,组间差异均无统计学意义($P>0.05$)。而在治疗第 3、4 和 5 周时,除假手术组外,各组与组内不同时间点相互比较,差异均有统计学意义($P<0.05$);游泳组、中药组和联合组 Nogo-A 阳性表达的 IOD/Area 比值逐渐降低(如图 1 所示),游泳组、中药组、联合组与假手术组同时时间点比较,差异有统计学意义($P<0.05$),与损伤组同时时间点比较,差异亦有统计学意义($P<0.01$);联合组 IOD/Area 比值明显低于游泳组和中药组,组间差异亦均有统计学意义($P<0.05$)。详见表 2。

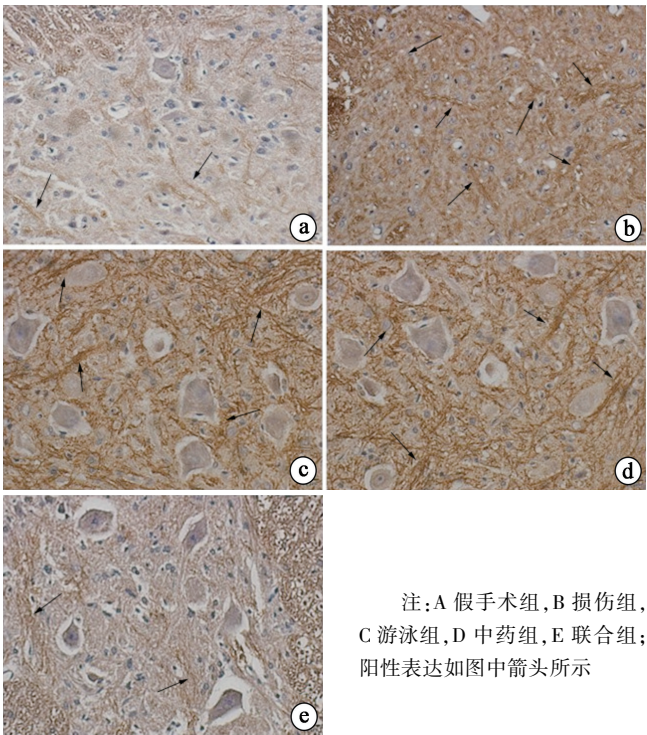


图 1 第 4 周时各组神经元轴突的 Nogo-A 表达(DAB 染色,×400)

注:A 假手术组,B 损伤组, C 游泳组,D 中药组,E 联合组; 阳性表达如图中箭头所示

三、MAG 的 Western Blot 检测

治疗第 1 周和第 2 周时,游泳组、中药组和联合组的 MAG/ β -actin 灰度比值变化趋势不明显($P>0.05$),且与损伤组同时时间点比较,组间差异均无统计学意义($P>0.05$)。随着时间的推移,治疗第 3、4 和 5 周时,游泳组、中药组、联合组与假手术组同时时间点比较,差异有统计学意义($P<0.05$);与损伤组同时时间点比较,差异亦有统计学意义($P<0.01$);联合组与游泳组和中药组比较,差异亦有统计学意义($P<0.05$),详见表 3。其中联合组比中药组和游泳组的 MAG 表达抑制程度更为明显(图 2)。

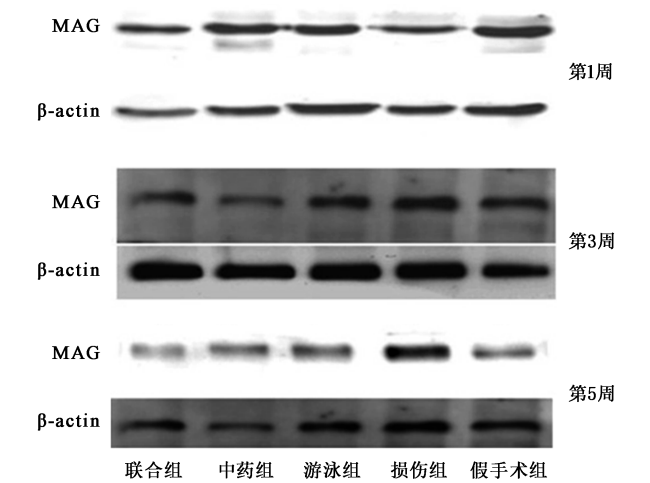


图 2 治疗第 1、3 和 5 周时各组大鼠的 MAG 表达电泳图

讨 论

研究表明,用药物封闭髓鞘相关抑制因子可以作为促进中枢神经系统再生的一种方法^[5]。中枢神经系统神经元再生能力差,部分是由于损伤后中枢神经系统轴索自身固有的再生能力差所致^[14]。如果将损伤的中枢神经系统轴索置于允许生长

表 2 各组不同时间点 Nogo-A 阳性表达的 IOD/Area 比值($\times 10^{-2}$, $\bar{x}\pm s$)

组别	只数	第 1 周	第 2 周	第 3 周	第 4 周	第 5 周
假手术组	3	11.49±1.30	12.32±1.14	11.71±0.98	11.00±0.64	11.83±0.57
损伤组	3	13.48±0.86	14.23±0.16	14.94±0.42 ^{ab}	15.44±3.20 ^{ab}	13.49±1.92 ^{ab}
游泳组	3	13.33±1.69	14.90±0.23	13.61±1.27 ^{abc}	12.30±2.91 ^{abc}	12.23±0.97 ^{abc}
中药组	3	14.68±1.24	13.97±2.12	13.11±1.44 ^{abc}	12.05±3.83 ^{abc}	11.36±1.25 ^{abc}
联合组	3	12.02±0.84	13.83±0.19	12.87±0.64 ^{abcd}	11.98±4.48 ^{abcd}	10.03±2.10 ^{abcd}

注:治疗第 3、4、5 周,各组与组内比较,^a $P<0.05$;与假手术组同时时间点比较,^b $P<0.05$;与损伤组同时时间点比较,^c $P<0.01$;与游泳组和中药组同时时间点比较,^d $P<0.05$ 。

表 3 各组大鼠不同时间点的 MAG/ β -actin 灰度比值($\times 10^{-1}$, $\bar{x}\pm s$)

组别	只数	第 1 周	第 2 周	第 3 周	第 4 周	第 5 周
假手术组	3	8.59±0.25	7.55±0.01	7.69±0.33	7.20±0.04	7.46±0.19
损伤组	3	8.82±0.25	7.37±0.10	8.40±0.52 ^a	9.46±0.51 ^a	8.76±0.08 ^a
游泳组	3	8.97±1.24	7.47±0.00	7.01±0.26 ^{ab}	7.94±0.18 ^{ab}	7.70±0.15 ^b
中药组	3	10.92±0.18	7.52±0.14	6.23±0.05 ^{ab}	7.57±0.11 ^{ab}	6.53±0.01 ^{ab}
联合组	3	9.07±0.60	7.05±0.25	6.69±0.17 ^{abc}	6.86±0.12 ^{abc}	6.07±0.05 ^{abc}

注:与假手术组同时时间点比较,^a $P<0.05$;与损伤组同时时间点比较,^b $P<0.01$;与游泳组和中药组同时时间点比较,^c $P<0.05$

的环境中,如将周围神经植入损伤的部位时,轴索是能够再生的^[15]。Nogo-A 和 MAG 是存在于中枢神经系统中抑制轴索再生的因子。本研究中,治疗第 1 周时,联合组、中药组、游泳组与损伤组相比,差异不明显($P>0.05$),其原因可能是大鼠自愈能力强,对脊髓损伤应激性代偿较大,机体的自我修复导致早期实验干预治疗疗效不明显;治疗第 3、4 和 5 周时,中药组与损伤组相比 BBB 评分较高,Nogo-A、MAG 表达抑制较强($P<0.05$),表明在第 3 周后,中药补阳还五汤能明显改善脊髓损伤,进一步证实了补阳还五汤对改善脊髓损伤具有明确的促进作用^[3]。

本研究中,游泳组 SD 大鼠在治疗第 2、3、4 和 5 周时的双下肢 BBB 评分均明显高于损伤组($P<0.05$),说明游泳训练可以促进大鼠双下肢功能恢复,改善脊髓损伤。其机制可能是运动训练通过抑制神经轴突生长抑制因子的表达,从而改善脊髓损伤,促进大鼠双下肢功能恢复^[16]。

本研究治疗第 1 周时,联合组、中药组、游泳组较损伤组 Nogo-A 和 MAG 的表达差异无统计学意义($P>0.05$);而联合组在第 3、4 和 5 周时,Nogo-A 和 MAG 的表达抑制程度均高于中药组和游泳组($P<0.05$),表明游泳训练联合补阳还五汤治疗的效果明显优于单一的补阳还五汤治疗或游泳训练治疗。

综上所述,本研究将游泳训练与补阳还五汤联合应用治疗 3 周后,脊髓损伤大鼠的双下肢 BBB 评分明显增加,脊髓组织中 Nogo-A 和 MAG 表达受到明显抑制,这表明给予其联合治疗大鼠脊髓损伤确实有效,且联合应用较单一治疗效果更佳。其机制可能是补阳还五汤可抑制神经轴突生长抑制因子 Nogo-A 和 MAG 的表达,为轴突生长提供适宜的环境,并通过游泳康复训练,改善大鼠下肢运动功能,从而促进脊髓损伤的修复。至于此联合治疗在神经元的生长、神经再生和信息传导通路等方面是否有效,尚有待于进一步研究探讨。

参 考 文 献

- [1] 崔敬虹,饶耀剑.补阳还五汤治疗脊髓损伤机制的研究[J].中国中医药现代远程教育,2015,13(15):150-152. DOI:10.3969/j.issn.1672.2779.2015.15.075.
- [2] 石继祥,曹成福,纪斌,等.补阳还五汤对急性脊髓损伤大鼠神经功能康复作用的研究[J].临床和实验医学杂志,2012,11(21):1684-1686. DOI:10.3969/j.issn.1671-4695.2012.21.003.
- [3] 贺小平,董贤慧,赵静怡,等.不同剂量补阳还五汤对脊髓损伤大鼠后肢运动功能的影响[J].中国老年学杂志,2014,34(22):6391-6393. DOI:10.3969/j.issn.1005-9202.2014.22.070.

- [4] 柴勇,张敏,刘文波,等.补阳还五汤联合神经干细胞移植促进脊髓损伤髓鞘再生[J].解剖学杂志,2013,36(4):785-788. DOI:10.3969/j.issn.1001-1633.2013.04.021.
- [5] Wang X, Baughman KW, Basso DM, et al. Delayed Nogo receptor therapy improves recovery from spinal cord contusion[J].Ann Neurol, 2006,60(5):540-549. DOI:10.1002/ana.20953.
- [6] Cha J, Heng C, Reinkensmeyer DJ, et al. Locomotor ability in spinal rats is dependent on the amount of activity imposed on the hindlimbs during treadmill training[J].Neurotrauma, 2007,24(6):1000-1012. DOI:10.1089/neu.2006.0233.
- [7] Gomez-Pinilla F, Huie JR, Ying Z, et al. BDNF and learning within the spinal cord by up-regulating BDNF expression[J].Neuroscience, 2007,148(4):893-906. DOI:10.1016/j.neuroscience.2007.05.051.
- [8] 崔晓军,谢华,蔡雪彦,等.补阳还五汤联合神经干细胞移植对脊髓损伤大鼠后肢功能恢复的影响[J].现代中西医结合杂志,2012,21(2):134-136. DOI:10.3969/j.issn.1008-8849.2012.02.009.
- [9] 李灵玲,周达岸,杨燕兴,等.联合应用督脉电针和游泳训练后脊髓损伤大鼠神经干细胞分化方向的研究[J].中国康复医学杂志,2016,31(2):172-176. DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2016.02.009.
- [10] 刘艳红,张晓燕,赵利军.肾康注射液对庆大霉素肾损伤的保护作用[J].中国药师,2015(4):548-552. DOI:10.3969/j.issn.1008-049X.2015.04.006.
- [11] Smith RR, Shum-Siu A, Baltzley R, et al. Effects of swimming on functional recovery after incomplete spinal cord injury in rats[J].J Neurotrauma, 2006,23(6):908-919. DOI:10.1089/neu.2006.23.908.
- [12] 徐洪,杨方,袁媛,等.免疫组织化学 Image Pro Plus 图像半定量分析的参数选择[J].解剖学杂志,2012,35(1):37-41. DOI:10.3969/j.issn.1001-1633.2012.01.014.
- [13] Green CJ, Fraser ST, Day ML. Insulin-like growth factor 1 increases apical fibronectin in blastocysts to increase blastocyst attachment to endometrial epithelial cells in vitro[J].Hum Reprod, 2015,30(2):284-298. DOI:10.1093/humrep/deu309.
- [14] Di Giovanni S. Molecular targets for axon regeneration: focus on the intrinsic pathways[J].Expert Opin Ther Targets, 2009,13(12):1387-1398. DOI:10.1517/14728220903307517.
- [15] Cheng H, Cao Y, Olson L. Spinal cord repair in adult paraplegic rats: partial restoration of hind limb function[J].Science, 1996,273(5274):510-513.
- [16] Lu XM, Wei JX, Wang YT, et al. Experimental and clinical advances in immunotherapy strategies for spinal cord injury target on MAIs and their receptors[J].Curr Pharm Des, 2016,22(6):728-737.

(修回日期:2016-12-23)

(本文编辑:汪 玲)