

· 基础研究 ·

磁刺激对脊髓损伤组织 c-fos 基因表达的影响

许涛 郭风劲 李新志 郭铁成 尤春景 陈安民

【摘要】目的 观察磁刺激对损伤脊髓组织中 c-fos 基因表达的影响。方法 用 Allen 氏 WD 法制造大鼠 T8 脊髓损伤的动物模型。38 只 Wistar 大鼠随机分为正常组(6 只)、脊髓损伤治疗组(16 只)和对照组(16 只)。治疗组于术后 15 min、1 h、2 h 和 4 h 分别予以磁刺激(0.5 Hz, 70% 最大输出强度), 对照组无特殊处理。治疗组、对照组分别于术后 15 min、1 h、2 h 和 4 h 各取 4 只动物处死, 取损伤段脊髓组织, 作石蜡切片, 用地高辛标记的 c-fos 基因探针进行原位杂交, 测定 c-fos mRNA 在损伤脊髓组织中的表达, 用免疫组织化学方法检测 fos 蛋白的表达。结果 fos 蛋白 OD 值在正常组为 3.78 ± 0.72 , 在对照组明显增多(最高达 16.49 ± 1.3), 而治疗组在各时段均低于对照组($P < 0.01$), c-fos 基因表达在正常脊髓组织中呈弱阳性, 在对照组中表达明显增加, 治疗组 c-fos 基因表达的数目少于对照组($P < 0.01$)。结论 应用磁刺激能抑制脊髓损伤后 c-fos 基因的表达, 这可能是磁刺激保护神经元并减轻脊髓继发性损伤的机理之一。

【关键词】 脊髓损伤; c-fos 基因; 磁刺激

Effects of magnetic stimulation on c-fos gene expression of rats with spinal cord injury XU Tao*, GUO Feng-jin, LI Xin-zhi, GUO Tie-cheng, YOU Chun-jing, CHEN An-ming. * Department of Rehabilitation Medicine and Department of Orthopaedics, 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 c-fos gene expression in spinal neurons of rats after spinal cord injury (SCI). Methods Thirty-eight Wistar rats were used, among them 32 rats underwent SCI with $10\text{g} \times 2.5\text{cm}$ impact at T8 level and were evenly divided into two groups: the MS group ($n = 16$) and the control group ($n = 16$), the other 6 rats served as the normal control. The rats in the MS group received 15 minutes, 1, 2 or 4 hours of MS at 0.5Hz and 70% of the maximal intensity output of the magnetic stimulator after the injury, while the rats in the other groups were not exposed to the MS. The c-fos mRNA levels of the rats were determined by in situ hybridization, the protein levels immunohistochemical methods. Results As compared with that in the normal controls (3.78 ± 0.72), the c-fos protein expression increased significantly in rats with SCI in the control group ($P < 0.01$), and this increase peaked at 2 hours after injury (16.49 ± 1.30). The levels of c-fos expression in the MS group were significantly lower than those in the control group ($P < 0.01$). Conclusion MS can inhibit the c-fos gene expression in spinal cord after injury, it may be one of the mechanisms that MS protects spinal cord against injury.

【Key words】 Spinal cord injury; c-fos gene; Magnetic stimulation

磁刺激是一种无痛、无创、快捷、方便的神经电生理技术,自 80 年代以来,主要用于神经系统疾病的检测与评估。近年来,随着对磁刺激认识的不断深入,其对一些疾病和损伤的潜在的治疗作用亦引起了人们的重视^[1]。在我们以往的实验研究中,也发现磁刺激对脊髓损伤具有保护作用^[2]。为进一步证实它的作用及探讨其作用机制,我们进行了磁刺激对脊髓损伤组织 c-fos 基因表达的影响的实验研究。

材料与方法

一、材料

1. 实验对象:健康 Wistar 大白鼠 38 只,雌雄不限,

体重 220 ~ 300 g。

2. 磁刺激器:丹麦产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。

3. 改良的 Allen 氏 WD(weight drop)法脊髓损伤装置:由支架台、砝码(重 10 g)和砝码控制筒组成。

4. c-fos 癌基因探针:成段长度为 1.4 kb,武汉博士德生物技术有限公司提供。

二、动物分组

38 只 Wistar 大白鼠随机分成三组进行实验。

1. 正常组:6 只大鼠,不做手术,作为测量 c-fos 基因的正常对照。

2. 治疗组(MS 组):16 只大鼠脊髓损伤后,分别于术后 15 min、1 h、2 h、4 h 给予磁刺激;刺激条件为 0.5 Hz、70% 的最大输出强度(峰值强度为 1.9 T),每

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、尤春景),骨科(郭风劲、李新志、陈安民)

次给予 30 个刺激(分两步完成,中间间隔 2 min)。

3. 对照组:16 只大鼠,脊髓损伤后,不做处理。

三、动物模型的建立

0.3% 戊巴比妥钠 (30 mg/kg) 腹腔麻醉,无菌条件下,以 T₈ 节段脊髓为中心显露直径约 3.0 mm 的圆形区作为脊髓损伤区,Allen 氏 WD 法选用 10 g × 2.5 cm 致伤力损伤脊髓。见大鼠出现摆尾反射,双下肢及躯体回缩扑动后,双下肢瘫痪,表明撞击成功。

四、检测项目及方法

1. 手术各组于术后 15 min、1 h、2 h、4 h 各取 4 只大鼠断头处死,切取损伤区脊髓组织 5 mm,中性福尔马林固定、脱水、石蜡包埋,切片(6 μm)。

2. Dig-DNA 探针标记及原位杂交法:地高辛配基 (Digoxigenin) 作为标记物,随机引物法标记 c-fos 癌基因探针 (购于博士德生物工程公司,片段长度为 1.4 kb),按试剂操作说明书进行原位杂交。

3. fos 免疫组织化学:采用兔抗人 fos 多克隆抗体 (购于武汉博士德生物技术有限公司,分子量为 62 kd),按照 SABC 试剂盒说明书进行操作。

4. 结果判定:用 TJTY-300 图象仪分别测出每张切片脊髓前角神经元内 c-fos mRNA 和 fos 蛋白的积分光密度(OD)值,代表 c-fos mRNA 和 fos 蛋白的含量。

五、统计学分析

实验结果采用 *t* 检验,对相应数据进行统计学分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

结 果

一、fos 蛋白表达结果

1. 正常组:脊髓灰质内可见散在的 fos 蛋白表达弱阳性细胞,图象分析测得积分光密度值(OD)值为 3.78 ± 0.72 。

2. 对照组:术后灰质内可见 fos 蛋白表达增多,以前角为主,术后 15 min 的 OD 值为 5.89 ± 0.87 ,与正常组比较,差异有显著性意义($P < 0.01$),术后 2 h fos 蛋白表达达高峰(OD 值 16.49 ± 1.3),以后逐渐下降。

3. 治疗组:fos 蛋白表达在各个时点均低于对照组,提示治疗抑制了伤后 fos 蛋白的表达。与对照组差别有显著性意义($P < 0.01$)。结果见表 1 和图 1。

表 1 对照组与治疗组脊髓中 fos 蛋白 OD 值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组 别	术后时间			
	15 min	1 h	2 h	4 h
对照组	5.89 ± 0.87	8.07 ± 1.18	16.49 ± 1.30	12.85 ± 0.82
治疗组	5.20 ± 0.55	7.02 ± 0.26	12.03 ± 0.65	10.02 ± 0.62
<i>P</i> 值	< 0.05	< 0.01	< 0.01	< 0.01

二、c-fos mRNA 原位杂交结果

正常组,脊髓灰质内可见少量散在的 c-fos mRNA

弱阳性神经细胞,对照组可见其表达明显地增加,而治疗组 c-fos mRNA 的表达明显低于对照组,杂交结果同免疫组化相符(见图 2、图 3、图 4)。

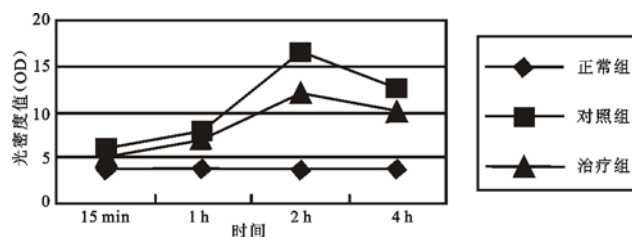


图 1 fos 蛋白在损伤脊髓中的表达

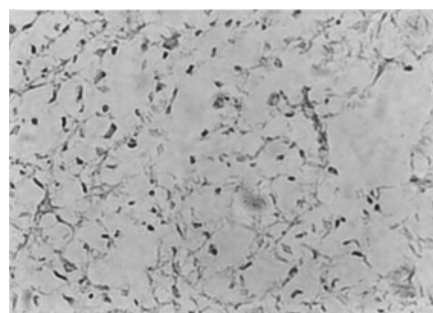


图 2 正常组,脊髓灰质可见散在 c-fos mRNA 弱表达神经元 ($\times 200$)

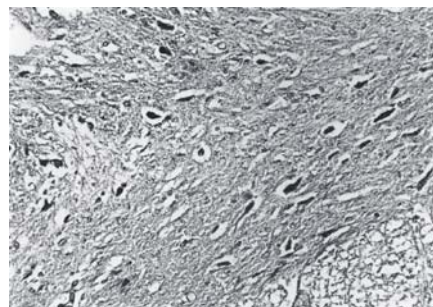


图 3 对照组,脊髓损伤后 1 h,脊髓灰质神经元 c-fos mRNA 增加,可见深蓝色颗粒 ($\times 400$)

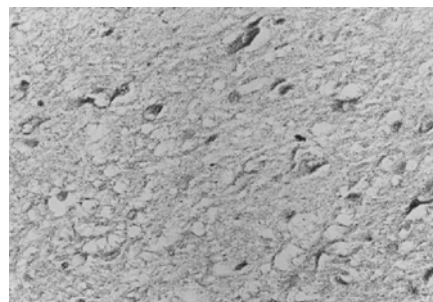


图 4 治疗组,脊髓损伤后 1 h,脊髓灰质神经元 c-fos mRNA 表达较对照组少 ($\times 400$)

讨 论

一、c-fos 基因的结构、功能及诱导表达的机制

原癌基因表达方法是一种从细胞水平对神经元功能活动定位的新方法。研究表明,当中枢神经细胞受到伤害性刺激如缺血时,会出现相关神经细胞 c-fos 癌

基因的表达急剧增加,其产物 fos 蛋白迅速堆积于胞核。用 c-fos 癌基因 CDNA 探针原位杂交或 fos 蛋白抗体免疫组化法在切片上染出受兴奋的神经元,显示这些产物的存在部位及含量,可以从侧面反映相关神经细胞的功能活动^[3]。

c-fos 原癌基因属于一类快速早反应基因(immediate early genes, IEGs)。正常情况下,它的基础水平很低,多种兴奋性刺激如细胞外的条件刺激可引起它快速、短暂的表达。c-fos 癌基因的表达产物是细胞核的硫酸蛋白,后者形成 DNA 结合的蛋白复合物,并通过选择性的启动因子来刺激转录。研究表明,c-fos 基因的表达与钙离子、谷氨酸受体及胆碱能神经元受体有关^[4,5]。

Morgan 等人认为^[6-8],中枢神经细胞对伤害性刺激作出应答反应的程序可能为:伤害性刺激→兴奋性氨基酸受体(NMDA)激活→一氧化氮(NO)产生→激活胞内第二信使(cGMP、钙调素、蛋白激酶 c、二酰基甘油、三磷酸肌醇和钙离子等)→第二信使进入胞核,从而诱导 c-fos 基因转录 mRNA→mRNA 在胞浆中翻译合成 fos 蛋白→fos 与 jun(另一癌基因蛋白)在核中形成复合物,与目的基因内调节位点相结合,从而进一步激活目的核基因的表达,最终对该刺激作出反应。因而,fos 蛋白可以作为神经元兴奋的标志,并且在转录偶联的信息传递过程中行使第三信使的功能。

二、磁刺激对脊髓损伤的保护作用

磁刺激利用高压高能电流在刺激线圈内瞬间放电,诱导出高场强的磁场,在组织内形成感应电流,使神经细胞去极化,从而兴奋神经纤维。由于有磁场的介导,电流可以穿透皮下组织、脂肪及骨骼结构,达到刺激深部外周神经组织及脑部结构的作用,具有无痛、无创、易于操作的优点^[9]。人们利用这一特点,用磁刺激进行多种中枢及外周神经系统疾病的评估与检测。近年来,随着研究的深入,以及对磁刺激仪器性能的改进,磁刺激治疗疾病的多方面的潜能也逐渐被人们所认识及利用^[10,11]。例如,在脊髓损伤方面,磁刺激训练可以帮助恢复咳嗽及呼吸功能^[12,13];帮助改善截瘫患者的大、小便功能^[14,15];改善截瘫患者下肢肌肉萎缩状况及减少深部静脉血栓形成等^[16]。

在基础研究方面,人们发现磁刺激的单个脉冲可降低细胞钙;而且脉冲在即刻状态下能增进局部的血运,使毛细血管床内的血流增加,脉冲的累积作用则能促进血管再生,而神经的生长具有血管趋向性,从而可以间接促进神经纤维的生长^[17];此外,磁刺激可以调节损伤脊髓组织内的离子失衡状况(减少钙离子浓度,增加镁离子含量)^[3],而钙离子和 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活性是神经细胞及其他细胞基因表达的重要调制因

素。本实验发现 c-fos 基因的表达受到抑制,这进一步提示我们,磁刺激对脊髓损伤具有保护性作用,它可能是通过提高了 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活力,改变了 L-型钙通道的生物特性,抑制细胞外 Ca^{2+} 离子内流,减轻了细胞内钙离子超载,从而减轻和抑制神经细胞受到伤害性刺激后的一系列应答反应,抑制 c-fos 基因的表达。当然,磁刺激强度、频率、刺激时限等条件与效应的关系,仍待研究。本实验所用磁刺激强度是国外多个报道中较常用的治疗剂量(70% 最大强度)^[12,15];0.5 Hz 是我们前期研究中所用剂量。但有关最佳治疗频率和时限等问题,则有待于更多的探讨。

参 考 文 献

- 1 Pascual-Leone A. Repetitive transcranial magnetic stimulation: Technical principles, safety, and potential therapeutic applications. (Abstract). *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 1997, 103:48.
- 2 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*, 2001, 16:4-6.
- 3 Zhang P, Hirsch EC, Damier P, et al. c-fos protein like immunoreactivity: distribution in the human brain and over-expression in the hippocampus of patients with Alzheimer's disease. *Neuroscience*, 1992, 46:9-21.
- 4 Cole AJ, Saffen DW, Baraban JM, et al. Rapid increase of an immediate-early gene messenger RNA in hippocampal neurons synaptic NMDA-receptor activation. *Nature*, 1989, 340: 474.
- 5 Szekeley AM, Barbaccia ML, Alho H, et al. In primary cultures of cerebellar granule cells the activation of N-methyl-D-aspartate sensitive glutamate receptors induces c-fos mRNA expression. *Mol Pharmacol*, 1989, 35:401.
- 6 Morgan JI, Curran T. Stimulus-transcription coupling in neurons: role of cellular mediate-early genes. *Trends Neurosci*, 1989, 12:459-462.
- 7 Craig CG, White TD. N-methyl-D-aspartate and non-NMDA-evoked adenosine release from rat cortical slices: distinct purinergic sources and mechanisms of release. *J Neurochem*, 1993, 60:1073-1082.
- 8 Yakovlev AG, Faden AI. Sequential expression of c-fos protooncogene, TNF-alpha, and dynorphin genes in spinal cord following experimental traumatic injury. *Mol Chem Neuropathol*, 1994, 23:179-190.
- 9 汤晓芙, 编著. 临床肌电图学. 北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1995. 148-168.
- 10 Mally J, Stone TW. Therapeutic and "dose-dependent" effect of repetitive microelectroshock induced by transcranial magnetic stimulation in Parkinson's disease. *J Neurosci Res*, 1999, 15:57:935-940.
- 11 Pascual-Leone A, Rubio B, Pallardo F, et al. Rapid-rate transcranial magnetic stimulation of left dorsolateral prefrontal cortex in drug-resistant depression. *Lancet*, 1996, 348: 233.
- 12 Singh H, Magruder M, Bushnik T, et al. Expiratory muscle activation by functional magnetic stimulation of thoracic and lumbar spinal nerves. *Crit Care Med*, 1999, 27:2201-2205.
- 13 Lin VW, Hsiao IN, Zhu E, et al. Functional magnetic stimulation for conditioning of expiratory muscles in patients with spinal cord injury. *Arch Phys Med Rehabil*, 2001, 82:162-166.
- 14 Lin VW, Nino-Murcia M, Frost F, et al. Functional magnetic stimulation of the colon in persons with spinal cord injury. *Arch Phys Med Re-*

habil, 2001, 82:167-173.

- 15 Shafik A. Magnetic stimulation: a novel method for inducing evacuation of the neuropathic rectum and urinary bladder in a canine model. Urology, 1999, 54:368-372.
- 16 Lin VW, Perkash A, Liu H, et al. Functional magnetic stimulation: a new modality for enhancing systemic fibrinolysis. Arch Phys Med Reha-

bil, 1999, 80:545-550.

- 17 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.

(收稿日期: 2002-08-09)

(本文编辑: 乔致)

· 短篇论著 ·

儿童臀肌挛缩症的术后康复治疗

倪国华 陈建国 李靖 赵书安

我们于 1996 年 12 月 ~ 2000 年 12 月采用手术治疗儿童臀肌挛缩症 181 例, 其中术后接受康复治疗 149 例。

181 例患者中, 男 99 例, 女 82 例; 年龄 3 ~ 12 岁, 平均 7 岁; 病程 1 ~ 6 年, 平均 3 年; 单侧 20 例, 双侧 161 例; 有反复多次药物臀部肌肉注射史 150 例, 臀部外伤及脓肿史各 1 例, 小儿先天性髋关节脱位术后 2 例, 原因不明 27 例; 行走或跑步时呈“外八字”步或“跳步征” 159 例, 仅上楼梯时患髋需先外展、呈“划圈征” 22 例; 端坐位交腿试验阳性 170 例; 并膝屈膝屈髋试验阳性 181 例; 屈膝屈髋位 Ober 征阳性 178 例; 髋部有弹响感及臀部可触及条索状物 155 例; 双下肢不等长、X 线片示骨盆倾斜 23 例。全部病例均经同一手术方式治疗。术后能自觉接受并及时进行康复治疗的患者 149 例, 未接受康复治疗的患者 32 例。

术后康复治疗包括: (1) 术后切口处以棉垫和绷带加压包扎, 双下肢屈膝屈髋 45° 位并膝绷带固定。(2) 术后第 1 天, 观察切口处无渗出血后, 进行并膝、屈髋被动活动练习, 每日 2 ~ 3 次, 每次 30 ~ 60 min, 开始缓慢, 根据患儿耐受情况, 逐渐加大屈髋活动范围, 并在被动屈膝屈髋能达到的最大范围时维持 5 ~ 10 min, 连续 3 日。(3) 术后第 4 天, 若患儿一般情况良好, 可下地练习双腿交叉直线行走, 在床上仰卧位屈膝、屈髋进行髋关节内收练习。(4) 术后 1 周, 练习并膝下蹲动作及髋关节内收屈曲高抬腿动作, 夜间休息时双腿交叉平放。对有骨盆倾斜、双下肢不等长的患者, 训练间歇期给予下肢皮牵引治疗。以上 4 种训练方法, 坚持到步态完全正常后, 再坚持 2 个月。(5) 术后半月内, 每日给予超短波治疗, 双侧臀部并置, 微热量, 每天 1 次, 每次 15 ~ 20 min。

149 例患者经以上康复治疗, 步态完全恢复至正常, 阳性体征消失, 所需时间最短为 7 d, 最长为半年, 平均为 2 个月。32 例未接受康复治疗的患者中, 有 8 例至术后 2 年步态仍未完全恢复至正常, 其余患者虽步态完全恢复至正常、阳性体征消失, 但所需时间最短为 1.5 个月, 最长为 2 年, 平均达 4 个月。

讨论 大多数学者认为儿童臀肌挛缩症与婴儿期臀部反复注射药物有关, 也有学者^[1]认为该病与遗传因素、体质原因及儿童易感性有关。手术治疗被认为是此症最有效的治疗方

法, 目前有较多报道^[2,3], 但有关术后康复治疗对疗效的影响的报道较少。我们对 181 例患儿采用同一手术方式治疗, 将积极进行康复治疗的患者与未接受康复治疗的患者进行比较后, 认为术后进行康复治疗有以下优点: (1) 能够缩短疗程。当臀筋膜与臀大肌挛缩时, 髋关节只能在外展、外旋位下屈曲, 或在后伸位时内旋, 不能在中立位时屈曲, 也不能屈髋同时髋内收。臀中、小肌挛缩同样会引起类似臀大肌挛缩所致的髋关节功能障碍和畸形。长期的挛缩亦会导致正常的肌纤维等软组织发生相应短缩, 手术将无伸缩性能的挛缩束带切断, 但正常肌纤维等发生短缩需靠术后功能训练来恢复正常。我们采用的训练方法如屈髋内收、并膝下蹲等, 正是针对正常组织短缩而进行的。术后进行康复治疗的患者所需的康复平均时间较未接受康复治疗的患者所需的时间明显缩短, 表明术后康复治疗可缩短疗程, 并且康复治疗可防止术后软组织再次粘连挛缩。(2) 有利于躯干和骨关节的发育。下肢不等长引起患儿跛行, 站立时呈单一方向的“稍息”姿态, 脊柱倾斜, 久之势必引起脊柱侧弯畸形。房伦光^[4]发现臀肌挛缩症患儿髋臼指数及颈干角均增大。若长期挛缩可引起迟发性并发症(如滑囊炎、膝外翻、骨关节炎等)出现^[5]。经过康复治疗和下肢适度皮牵引后, 双下肢不等长在短期内得以纠正, 这有利于患儿身体的发育, 而且患儿也可消除自卑心理, 有利于身心发育。(3) 步态正常后, 继续坚持功能训练, 有利于防止复发。因此, 对儿童臀肌挛缩症, 不仅要早发现、早手术, 而且术后还应早期进行规范、合理的康复治疗。

参 考 文 献

- 1 吉士俊, 潘少川, 王继孟, 主编. 小儿骨科学. 济南: 山东科学技术出版社, 2000. 377-378.
- 2 俞辉国, 童学波, 刘红兵, 等. 臀肌挛缩症的手术治疗探讨. 中华骨科杂志, 1996, 16:375-376.
- 3 李开南, 黄锡荣, 唐景明, 等. 注射性臀肌挛缩症手术治疗的远期效果. 中华骨科杂志, 1998, 18:437-438.
- 4 房伦光. 儿童注射性臀大肌挛缩症的 X 线表现. 中华小儿外科杂志, 1984, 5:39.
- 5 李洪, 钟生木, 赵希康, 等. 儿童臀肌筋膜挛缩. 中华骨科杂志, 1996, 16:320.

(收稿日期: 2002-08-03)

(本文编辑: 郭正成)

作者单位: 454003 焦作, 河南省焦作市解放军第 160 医院骨科 (倪国华、赵书安); 唐山市中医院骨科 (陈建国); 第四军医大学西京医院全军骨科研究所 (李靖)