·基础研究·

督脉电针结合游泳训练对大鼠全横断脊髓损伤后GAP-43和Nogo-A表达的影响*

刘鹏民[1] 李灵玲[1] 王 良[1] 杨燕兴[1] 周达岸[2,3]

摘要

目的:通过检测大鼠脊髓损伤后运动功能恢复情况和神经生长相关蛋白-43(GAP-43)、神经轴突生长抑制剂-A(Nogo-A)的表达来探讨督脉电针结合游泳训练干预脊髓损伤的作用机制。

方法:选用雌性SD大鼠180只,随机分为正常组、假手术组、模型组、游泳训练组、督脉电针组(督电组)、督脉电针结合游泳训练组(联合组)。用外科手术尖形刀片横切断暴露脊髓的方法致大鼠T9-T10段脊髓全横断模型。术后各时间点对各组大鼠进行BBB评分;免疫组化检测各时间点损伤段脊髓GAP-43和Nogo-A的表达;Western blot检测各时间点损伤段脊髓Nogo-A的表达。

结果:与模型组相比,联合组和督电组BBB评分显著增加,联合组在术后第14、21、28、35天较督电组BBB评分显著增加,具有显著性差异($P<0.05$)。与模型组相比,督电组和联合组GAP-43的表达显著增加,Nogo-A的表达显著减少,具有显著性差异($P<0.05$),联合组在术后第14、21、28、35天较电针组GAP-43的表达显著增加,Nogo-A的表达显著减少,具有显著性差异($P<0.05$)。

结论:①督脉电针和游泳训练都能通过促进脊髓损伤大鼠GAP-43的表达和抑制Nogo-A的表达来促进神经的修复。②联合治疗对大鼠运动功能的恢复更为有效。

关键词 脊髓损伤;督脉电针;游泳训练;GAP-43;Nogo-A

中图分类号:R651.2;R245 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2016)-04-0399-06

Effects of Du Meridian Electroacupuncture combined with swimming training on the expression of Nogo-A and GAP-43 aftert acute complete spinal cord injury in rats/LIU Pengmin,LI Lingling,WANG Liang,et al.//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2016, 31(4): 399—404

Abstract

Objective: To investigate the mechanism underling the effects of Du Meridian Electroacupuncture combined with swimming training treatment on spinal cord injury by detecting the motor function recovery and the expression of growth associated protein-43 (GAP-43) and neurite outgrowth inhibitor-A (Nogo-A) in the spinal lesion segment.

Method:A total of 180 female rats were randomly divided into the normal group, Sham-control group, the operated control group (Op-control group),swimming training treatment group,Du Meridian electroacupuncture treatment group(DMEA group) and DMEA combined with swimming training treatment group (Combination treatment group). Acute complete spinal cord contusion model was made at T9-T10 segments with surgical pointed blade cutting off the exposure of the spinal cord. The rats in each group were given BBB score at all time points after the operation. The expression of Nogo-A and GAP-43 were determined by immunohistochemical method. Furthermore, the expression of Nogo-A was also determined by Western Blot method.

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2016.04.005

*基金项目:辽宁医学院校长基金——奥鸿博泽研究生科研创新基金资助(AH2014016)

1 辽宁医学院,锦州市,121000; 2 辽宁医学院附属第三医院康复科; 3 通讯作者

作者简介:刘鹏民,男,硕士研究生; 收稿日期:2015-10-26

Result: The BBB score increased significantly in the DMEA group and combination treatment group compared with the Op-control group. Moreover, the BBB score of the combination treatment group was significantly higher than that of the DMEA group at the days 14,21,28 and 35 post-operation(P<0.05). Comparing with the Op-control group, the expression of GAP-43 significantly increased with significantly decreased Nogo-A in the DMEA group and combination treatment group(P<0.05). Furthermore, the expression of GAP-43 significantly increased and the expression of Nogo-A significantly decreased in the combination treatment group when compared with the DMEA group at the days 14,21,28 and 35 post-operation.

Conclusion:DMEA and swimming training treatment can increase the expression of GAP-43 and decrease the expression of Nogo-A, by which the nerve repair gets promoted. DMEA combined with swimming training treatment is more effective for the motor function recovery.

Author's address Liaoning Medical College,Jinzhou City,121000

Key word spinal cord injury; Du Meridian electroacupuncture; swimming training; GAP-43; Nogo-A

脊髓损伤(spinal cord injury,SCI)是一种致残率极高的创伤。由于中枢神经系统的特殊性,全横断脊髓损伤一旦发生,损伤平面以下随即丧失所有运动及感觉功能,还可能伴发自主神经功能障碍。SCI后神经轴突的生长和再生困难是其面临的重要问题。研究表明,生长相关蛋白(growth associated protein-43, GAP-43)是一种神经组织中特有的快速转运胞膜磷酸蛋白,与神经元发育密切相关,是神经细胞轴突生长及再生、突触形成及重建的标志性蛋白质[1]。而且,脊髓损伤后轴突再生困难与中枢神经系统(central nervous system,CNS)内抑制性因子息息相关,其中髓磷脂相关抑制物Nogo (Also Known As Reticulon 4,Nogo-A)被认为是最主要的髓磷脂相关轴突生长抑制蛋白[2]。因此,如何减轻继发损伤,给神经轴突生长和再生提供一个良好的微环境,是亟待解决的问题。有学者研究发现,督脉电针可以促进大鼠脊髓损伤后GAP-43的表达,有助于轴突再生及突触重建,发挥促进脊髓损伤修复的作用[3]。有研究表明,游泳训练中的皮肤接触反馈对水中和地面上的运动功能恢复都有加强的作用,可以促进SCI大鼠运动功能的恢复[4]。近年来,临床上单一疗法越来越不能完全满足患者的需要,联合疗法相较于单一治疗手段具有更大的优势,广泛地应用于促进神经修复的治疗。本研究从神经轴突生长和再生的角度出发,通过检测轴突生长和再生的相关蛋白GAP-43和抑制蛋白Nogo-A的表达变化,观察大鼠下肢的运动情况,探讨督脉电针结合游泳训练疗法对大鼠SCI后运动功能的恢复情况和作用机制,为临床治疗SCI提供理论依据和方法。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康成年清洁级雌性SD大鼠180只,体重180—200g,购自辽宁本溪生物技术有限公司。分笼饲养,室温保持在20—25℃。运用SPSS 软件产生随机数字,将其随机分为正常组、假手术组、模型组、督脉电针治疗组(督电组)、游泳治疗组(游泳组)和督脉电针结合游泳治疗组(联合组)。每组按术后7、14、21、28、35d各时间点各取材6只。

1.2 动物模型

所有动物采用10%水合氯醛(3.5ml/kg)进行腹腔注射麻醉。后路暴露T9—T10段脊髓用外科手术尖形刀片横切断暴露的脊髓,用眼科镊夹除约0.3—0.5cm脊髓,止血,确认夹除彻底,用生理盐水冲洗手术视野,然后逐层缝合肌肉、皮下组织和皮肤,建立大鼠双后肢瘫痪实验模型。术后处理:①在腹腔注射青霉素(80000U/d)以抗感染;②保持室温在20—25℃;③每日按摩膀胱2次至其出现自主排尿为止。假手术组仅切除椎板,不损伤脊髓。模型组于损伤脊髓后不予任何治疗。

1.3 督脉电针治疗

大鼠脊髓于术后2d开始进行督脉电针治疗,选取大椎穴(DU14)、命门穴(DU4),于每天下午15点,两穴位各刺入一枚毫针,针刺深度5mm。大椎穴接正极,命门穴接负极,电针频率2 Hz,持续脉冲电流12—15mA,强度以双下肢出现规律性收缩抖动为度,

1次/d,每次20min,连续7d为1个疗程,共5个疗程。

1.4 游泳训练治疗

SD大鼠于脊髓损伤前一周时进行适应性游泳训练,每天游泳10min,连续5d。大鼠于术后7d开始进行游泳训练,于自制长方体形游泳池(60×50×50cm^3)进行,水温保持在27—30℃,训练时注意观察大鼠的尾巴是否接触池底,避免尾巴因接触池底产生代偿性支撑作用影响训练效果。每天上午9点开始训练5组,每组6min,每组间歇5min,每天训练共30min, 1次/d,连续7d为一个疗程,共5个疗程。游泳时注意观察大鼠切口愈合情况,避免大鼠切口部位感染。每次游泳前更换干净水,每次游泳结束后用干毛巾擦干,用红外线灯烤干,防止大鼠感冒。

1.5 BBB评分

各组大鼠于造模后进行BBB评分,判断造模是否成功,评分在1分以上的大鼠予以剔除。于术后各时间点夜间分别由两名独立观察者(熟悉评分标准但非本组实验人员)进行BBB评分,以两人的平均分作为大鼠的最终BBB评分,观察脊髓损伤后的运动功能恢复情况。评定前排空大鼠膀胱。

1.6 免疫组化染色

经多聚甲醛固定的脊髓组织冲洗、脱水、透明、浸蜡、包埋,制成4μm厚切片,进行GAP-43和Nogo-A免疫组化染色(SABC三步法)。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。

1.7 Western blot测定Nogo-A蛋白

以10%水合氯醛腹腔注射麻醉(剂量为0.3—0.4ml/100g),以造模损伤区为中心,取脊髓损伤区及其上、下方各1cm的脊髓组织放于2ml冻存管液氮中带回,-70℃冰箱保存。取各组脊髓样本40mg,提取总蛋白,蛋白定量后放入-70℃冰箱备用。制胶、凝胶电泳、转膜后5%脱脂奶粉室温封闭1.5h,一抗β-actin(1∶1000);Nogo-A(1∶300),4℃孵育过夜。羊抗兔二抗室温孵育2h(1∶5000),ECL法显色后成像。采用 Image-Pro Plus 6.0软件分析蛋白条带灰度值,以β-actin作为内参蛋白进行校准,采用Nogo-A蛋白条带灰度值/β-actin条带灰度值的比值表示Nogo-A蛋白的相对表达量。

1.8 图像分析统计处理

每只大鼠取损伤段、损伤上段和损伤下段各6张切片,并在光学显微镜下计录每张切片脊髓灰质的GAP-43和Nogo-A阳性细胞数,各切片的均数作为该动物的GAP-43和Nogo-A阳性细胞数。所得数据输入SPSS软件包进行统计处理,结果以均数±标准差表示,并以单因素方差分析和LSD-t检验处理,以P<0.05为差异具有显著性。

2 结果

2.1 BBB评分结果

BBB评分结果统计显示,督电组和联合组于术后各时间点较模型组BBB评分具有显著性差异(P < 0.05),联合组于术后第14、21、28、35天较督电组BBB评分具有显著性差异(P < 0.05),见表1。

2.2 免疫组化结果

2.2.1 Nogo-A免疫组化检测结果:各组于各时间点Nogo-A均有表达,主要分布于脊髓灰质,胞浆为棕褐色的阳性信号,胞核为蓝色的阴性信号(图1)。正常组于各时间点较假手术组Nogo-A的表达无明显差异。督电组和联合组在各时间点较模型组Nogo-A的表达明显减少,差异具有显著性意义(P < 0.05)。联合组于术后第14、21、28、35天较督电组Nogo-A的表达明显较少,差异具有显著性意义(P < 0.05),见表2。

表1 各组大鼠术后各时间点BBB评分 ($\bar{x}\pm s$,n=6)

组别	7d	14d	21d	28d	35d
正常组	21.00±0.00	21.00±0.00	21.00±0.00	21.00±0.00	21.00±0.00
假手术组	21.00±0.00	21.00±0.00	21.00±0.00	21.00±0.00	21.00±0.00
模型组	1.17±0.41	2.17±0.75	5.50±1.05	7.17±1.60	9.33±1.37
游泳组	1.33±0.52	4.17±0.75①	7.33±1.03①	9.50±1.05①	11.17±1.17①
督电组	2.50±0.55①②	5.50±1.05①②	7.83±1.47①	9.67±1.63①	12.33±1.03①
联合组	3.27±0.52①②	7.50±1.38①②③	10.17±1.47①②③	12.83±1.17①②③	15.50±1.38①②③

注:①与模型组相比P < 0.05;②与游泳组相比P < 0.05;③与督电组相比P < 0.05

2.2.2 GAP-43免疫组化检测结果：各组于各时间点GAP-43均有表达，主要分布于脊髓灰质，胞浆为棕褐色的阳性信号，胞核为蓝色的阴性信号（图2）。正常组和假手术组各时间点GAP-43表达无明显差异。

表2 各组大鼠术后各时间点Nogo-A阳性细胞数 （$\bar{x}\pm s$，n=6）

组别	7d	14d	21d	28d	35d
正常组	2.50±1.05	2.83±1.17	2.17±0.75	2.33±1.51	2.17±1.47
假手术组	3.33±1.03	3.17±0.98	2.67±1.75	2.67±1.75	2.50±1.87
模型组	10.83±2.32	10.33±0.82	9.67±1.21	8.83±0.75	8.33±1.21
游泳组	10.50±0.55	8.83±0.75①	7.83±0.98①	6.50±1.38①	6.17±0.75①
督电组	8.17±0.75①②	7.17±0.75①②	7.00±0.89①	6.33±1.03①	5.67±0.82①
联合组	8.33±1.21①②	5.67±0.82①②③	5.17±0.75①②③	4.17±1.33①②③	3.83±0.41①②③

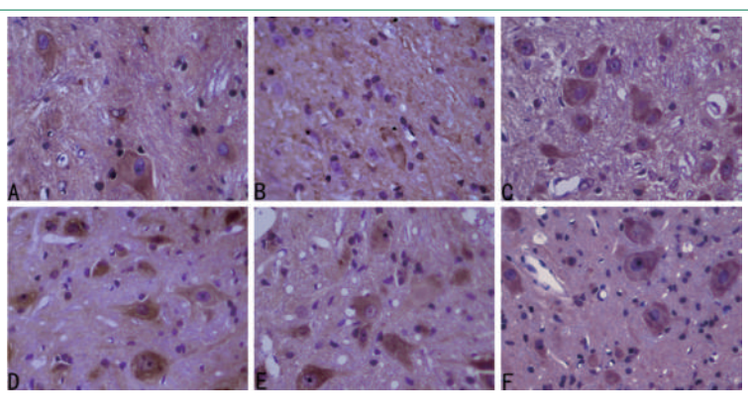
注：①与模型组相比$P<0.05$；②与游泳组相比$P<0.05$；③与督电组相比$P<0.05$

表3 各组大鼠术后各时间点GAP-43阳性细胞数 （$\bar{x}\pm s$，n=6）

组别	7d	14d	21d	28d	35d
正常组	4.17±1.17	3.33±2.07	3.67±2.07	3.17±2.14	3.50±1.05
假手术组	4.33±0.82	4.17±1.33	4.00±1.41	3.33±1.63	3.83±0.41
模型组	12.50±2.35	11.50±1.87	9.67±1.03	7.83±1.94	6.67±1.21
游泳组	13.17±1.47	17.33±0.82①	14.17±0.98①	11.67±1.21①	9.33±1.37①
督电组	19.83±2.32①②	18.50±1.38①	15.50±1.38①	12.00±1.41①	10.17±1.17①
联合组	21.83±2.07①②	21.17±1.47①②③	18.33±1.63①②③	15.50±1.38①②③	13.17±1.83①②③

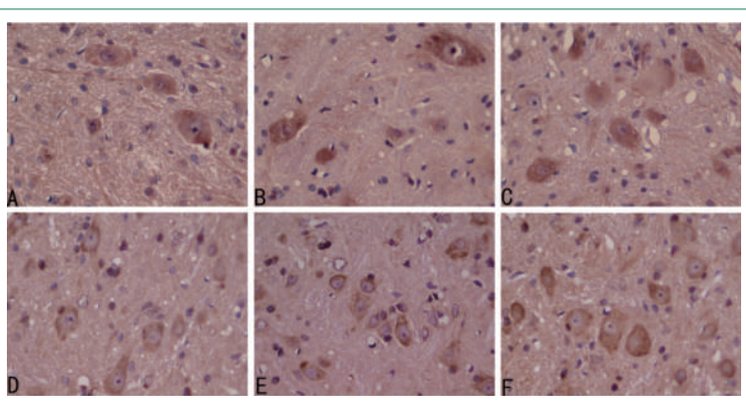
注：①与模型组相比$P<0.05$；②与游泳组相比$P<0.05$；③与督电组相比$P<0.05$

图1 术后7d免疫组化技术检测全横断大鼠脊髓标本Nogo-A的表达 （×400）



A：正常组；B：假手术组；C：模型组；D：游泳组；E：督电组；F：联合组

图2 术后7d免疫组化技术检测全横断大鼠脊髓标本GAP-43的表达 （×400）



A：正常组；B：假手术组；C：模型组；D：游泳组；E：督电组；F：联合组

督电组和联合组于各时间点较模型组GAP-43的表达明显增加,差异具有显著性意义($P<0.05$)。联合组于术后14、21、28、35d较督电组GAP-43的表达明显增加,差异具有显著性意义($P<0.05$),见表3。

2.3 Western blot检测结果

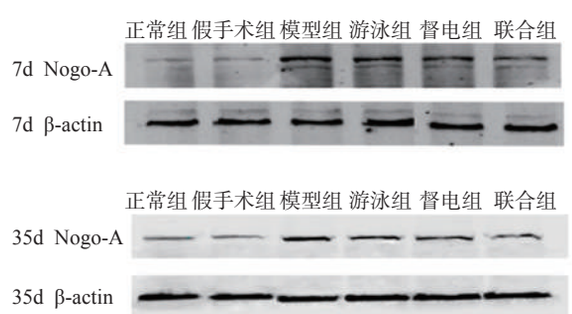
治疗组和模型组在各时间点均可检测出Nogo-A的表达,Nogo-A的表达于一周最高,随后下降。督电组和联合组在各时间点Nogo-A表达均低于模型组,差异具有显著性意义($P<0.05$)。联合组于第14天、21天、28天、35天Nogo-A的表达均低于督电组,差异具有显著性意义($P<0.05$)。见图3,表4。

表4 各组大鼠SCI后脊髓损伤区Nogo-A蛋白表达水平 ($\bar{x}\pm s$,n=6)

组别	7d	14d	21d	28d	35d
正常组	0.259±0.004	0.253±0.024	0.280±0.009	0.245±0.006	0.237±0.005
假手术组	0.280±0.026	0.280±0.016	0.261±0.006	0.260±0.043	0.222±0.008
模型组	0.943±0.004	0.794±0.043	0.715±0.016	0.621±0.047	0.546±0.010
游泳组	0.905±0.005	0.688±0.051①	0.579±0.004①	0.509±0.037①	0.375±0.011①
督电组	0.789±0.081①②	0.675±0.046①	0.562±0.026①	0.496±0.014①	0.376±0.013①
联合组	0.770±0.077①②	0.524±0.033①②③	0.468±0.014①②③	0.327±0.026①②③	0.277±0.002①②③

注:①与模型组相比$P<0.05$;②与游泳组相比$P<0.05$;③与督电组相比$P<0.05$

图3 7d和35d大鼠Nogo-A蛋白在脊髓中的表达



3 讨论

3.1 Nogo-A、GAP-43与脊髓损伤后神经细胞轴突再生的关系

Nogo-A蛋白是由少突胶质细胞分泌的一种神经抑制因子,目前被认为是脊髓损伤后抑制轴突再生最重要的髓磷脂相关轴突生长抑制糖蛋白。Nogo-A与相应的受体结合后启动信号级联,使得局部生长锥的细胞骨架发生改变,生长锥的伪足收缩,从而改变生长锥的形态,破坏了生长锥的稳定性,引起生长锥的溃变,起到抑制轴突再生的作用[5]。因此,如何有效减少Nogo-A在脊髓损伤后的表达,对脊髓损伤神经的修复具有重要意义。

GAP-43是在神经组织的神经元中发现的一种高度特异性髓磷脂蛋白,参与神经元的再生、发育,已作为神经元再生的标志蛋白。McPhai等[6]学者发现,在神经元轴突再生的过程中,GAP-43高度表达,GAP-43和轴突再生关系密切。Metz等[7]学者通过敲除大鼠的GAP-43基因,发现大鼠的感觉及运动功能均出现障碍,GAP-43在轴突再生的过程中高度表达。GAP-43是轴突连接的特异性蛋白,是轴突再生的代表性蛋白,所以可以作为反映轴突再生及神经元修复的标志性蛋白[8]。

3.2 督脉电针对Nogo-A、GAP-43表达的影响

中医学认为,督脉为"阳脉之海",从尾骶部,沿脊柱的内部而行,进入脑内。脊髓损伤后由于督脉受损,导致其关联的经络功能紊乱,造成肢体的功能障碍。大椎穴是督脉上的穴位,也是督脉和手足三阳经的交会穴,因此大椎穴可通行督脉,联系手足三阳经,是治疗脊髓损伤重要的穴位。命门穴在腰部正中线上,是督脉的重要穴位,针刺命门穴可通调督脉经络,对于下肢的运动功能恢复具有重要作用。针刺大椎穴和命门穴可通调督脉,从而使脊髓损伤处经络上下相通,对于脊髓损伤后运动功能的恢复具有重要作用。督脉电针作为一种传统的中医治疗手段,已经在实验研究和临床实践中被证实对脊髓损伤的修复具有促进作用[9—11]。

本实验研究结果显示,大鼠脊髓损伤术后GAP-43的表达在7d时达到高峰,随后逐渐递减,这一动态表达变化与张奇兰等[12]研究报道一致。这一结果表明脊髓损伤可上调GAP-43的表达,促进神经轴突生长和再生,增强神经的可塑性。大鼠脊髓损伤术后7d时Nogo-A的表达达到高峰,至术后14d时

逐渐下降。脊髓损伤后Nogo-A在7d到14d时高度表达，说明在脊髓损伤后的14d里，越早进行治疗恢复的程度越好。督电组较模型组GAP-43的表达明显升高，而Nogo-A的表达较模型组明显降低，这一结果说明督脉电针可以明显提高GAP-43的表达，同时降低Nogo-A的表达，促进轴突再生和突触重建，发挥促进脊髓损伤后神经修复作用。BBB评分结果与Nogo-A和GAP-43的表达变化总体保持一致，说明大鼠脊髓损伤后的运动功能恢复可能与两种蛋白表达对神经的修复相关。

3.3 督脉电针结合游泳训练对脊髓损伤的作用

啮齿类动物对于游泳具有先天的适应性，大鼠脊髓损伤后由于后肢的瘫痪，漂浮于水中，借助水的浮力减轻下肢的负重，同时产生类似下肢步行的运动，可以进行早期的运动功能恢复锻炼。因此，游泳训练作为一种天然的减重训练方式常用于脊髓损伤动物的运动训练[13]。考虑到大鼠切口愈合的情况，避免造成切口感染，游泳训练从术后7d开始进行。每次游泳训练前换水，同时保持水温基本恒定。

游泳训练作为脊髓损伤的一种治疗手段，可以产生更多的步数和更快的步行频率，使中枢发生器通路产生更多数量的步行周期，大鼠的运动功能可以得到有效改善[13]。实验证实，大鼠在游泳训练后可缓解因脊髓损伤造成的异常痛觉[14]。本实验研究结果显示，游泳组GAP-43的表达较模型组于术后第14、21、28、35天明显增高，Nogo-A的表达明显降低，说明游泳训练可以提高GAP-43的表达，同时抑制Nogo-A的表达，促进神经轴突的再生和突触的重建，发挥神经修复的作用。

各组Nogo-A和GAP-43表达变化的结果显示，联合组和督电组较模型组于术后各时间点都具有显著性差异，联合组较督电组于术后第14、21、28、35天都具有显著性差异，说明督脉电针结合游泳训练在脊髓损伤后神经修复上更有优势。BBB评分结果表明联合组较督电组于术后第14、21、28、35天具有显著性差异，说明督脉电针结合游泳训练疗法对大鼠脊髓损伤后运动功能的恢复具有明显的优势。

综上所述，督脉电针结合游泳训练可以通过增加GAP-43的表达和减少Nogo-A的表达来促进神经轴突的再生和重建，增强神经的可塑性，进而促进脊髓损伤后神经的修复，促进脊髓损伤大鼠后肢运动功能的恢复。

参考文献

[1] Raivich G,Makwana M.The making of successful axonal regeneration: genes, molecules and signal transduction pathways [J].Brain Res Rev, 2007, 53(2):287—311.

[2] Broggini T,Nitsch R,Savaskan NE.Plasticity-related gene 5 (PRG5)induces filopodia and neurite growth and impedes lysophosphatidic acid-and nogo-A-mediated axonal retraction[J]. Mol Biol Cell, 2010,21(4):521—537.

[3] 李兵奎,曾彬,常巍,等.督脉电针对脊髓损伤大鼠生长相关蛋白43表达的影响[J].中国康复理论与实践,2014,20(1):27—29.

[4] Magnuson DS,Smith RR,Brown EH,et al.Swimming as a model of task-specific locomotor retraining after spinal cord injury in the rat[J].Neurorehabil Neural Repair,2009,23:535—545.

[5] Joset A,Dodd DA,Halegoua S,et al.Pincher-generated Nogo-A endosomes mediate growth cone collapse and retrograde signaling[J].J Cell Biol,2010,188(2):271—285.

[6] McPhail LT,Femandes KJ,Chan CC,et al.Axonal reinjury reveals the survival and re-expression of regeneration associated genes in chronically axotomized adult mouse motoneurons [J].Exp Neuro,2004,188(2):331—340.

[7] Metz GA, Schwab ME.Behavioral characterization in a comprehensive mouse test battery reveals motor and sensory impairments in growth-associated protein-43 null mutant mice [J].Neuroscience,2004,129(3):563—574.

[8] Dijk F,Bergen AA,Kamphuis W. GAP-43 expression is upregulated in retinal ganglion cells after ischemia/reperfusion-induced damage[J].Exp Eye Res,2007,84(5):858—867.

[9] 李晓宁,迟蕾.夹脊配合督脉电针治疗脊髓损伤后功能障碍临床观察[J].上海针灸杂志,2015,34(10):972—974.

[10] 李波霖,周宾宾,金昕.电针刺激不同穴位治疗脊髓损伤机制实验研究进展[J].针灸临床杂志,2015,31(5):75—78.

[11] 杨波,隋汝波.电针对大鼠脊髓损伤细胞凋亡相关因子的影响[J].中国老年医学杂志,2015,35(12):3263—3266.

[12] 张奇兰,李俊岑,丁培培,等.神经生长相关蛋白GAP-43在脊髓损伤后不同时段的表达[J].四川解剖学杂志, 2010, 18(2):1—4.

[13] Smith RR,Shum-Siu A,Baltzley R,et al.Effects of swimming on functional recovery after incomplete spinal cord injury in rats[J].Journal of Neurotrauma,2006,23(6):908—919.

[14] Hutchinson KJ,Gomez-Pinilla F,Crowe MJ,et al.Three exercise paradigms differentially improve sensory recovery after spinal cord contusion in rats[J].Brain,2004,127(Pt 6):1403—1414.