·基础研究·

督脉电针与神经干细胞移植联合应用促进SCI横断大鼠前角运动神经元存活及减轻后肢肌萎缩的研究*

李晓滨[1,3]　曾园山[1,2]　陈玉玲[4]　陈穗君[1]

摘要　目的:探讨督脉电针与神经干细胞移植联合应用对大鼠脊髓全横断损伤的前角运动神经元存活以及减轻后肢肌萎缩有无促进作用。**方法**:将正常组、对照组、督脉电针组(电针组)、神经干细胞移植组(NSCs组)和督脉电针+神经干细胞移植组(电针NSCs组)成年大鼠T10脊髓段做全横断损伤,其中NSCs组和电针NSCs组在损伤处移植神经干细胞,电针组和电针NSCs组在术后开始接受督脉电针治疗。所有实验动物在脊髓损伤后存活65天。**结果**:电针NSCs组大鼠其腰段脊髓受损伤运动神经元的存活数量明显多于其他实验对照组大鼠。电针NSCs组大鼠后肢的股二头肌萎缩程度明显小于其他实验对照组大鼠。**结论**:督脉电针与神经干细胞移植联合应用能够促进大鼠脊髓全横断损伤后受损伤的脊髓前角运动神经元存活, 以及减轻大鼠脊髓全横断损伤后瘫痪的后肢股二头肌的萎缩状况。

关键词　督脉; 电针; 神经干细胞移植; 脊髓损伤; 运动神经元; 肌萎缩; 大鼠

中图分类号: R245.97,S338.21,R49　**文献识别码**: A　**文章编号**: 1001-1242(2006)-02-0104-04

The combination of Goremor vessel electroacupuncture and neural stem cells transplantation to promote the survival of injured motoneuron of anterior horn and to reduce the myatrophy of hind limbs in rat spinal cord transected completely/LI Xiaobin,ZENG Yuanshan, CHEN Yuling,et al.//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2006,21(2):104—107

Abstract　Objective: To explore the effects of combination of Goremor vessel electroacupuncture and neural stem cells transplantation(NSCs) on the survival of injured motoneuron of anterior horn and the myatrophy of hind limbs in rat spinal cord transected completely. **Method:** Completely transection the T10 spinal cord of adult rats was performed in the normal group, the control group, the NSCs implant group (NSCs group), the Goremor vessel electroacupuncture group (EC group) and the Goremor vessel electroacupuncture plus NSCs grafted group (EC+NSCs group). NSCs were simutaneously implanted into the transected site of spinal cord in NSCs group and EC+NSCs group. The animals of EC group and EC+NSCs group were treated by Goremor vessel electroacupuncture after operation. All the experimental rats were fed for 65 days. **Result:**1.The survival number of injured motoneuron at the lumbar segment in EC+NSCs group of rat were more than that in the other experimental control groups. 2.The myatrophy degree of Biceps femoris muscle at the hind limbs in EC+NSCs group of rat were obviously less than that in the other experimental control groups. **Conclusion:**The combination of Goremor vessel electroacupuncture and transplantation neural stem cells may promote the survival of injured motoneuron of the anterior horn and reduce the myatrophy degree of Biceps femoris muscle at the hind limbs suffering from paralysis after rat spinal cord transected completely.

Author's address　Division of Neuroscience, Department of Histology and Embryology, Zhongshan Medical College, Sun Yat-sen University, Guangzhou, 510080

Key words　goremor vessel; electroacupuncture; neural stem cells; spinal cord injury; motoneuron survival; myatrophy; rat

在进行脊髓损伤修复研究时, 更多的关注点是损伤区的神经纤维再生以及受损伤神经元功能性网络的重建[1]。近些年来,本研究组也围绕上述关注点展开过一些研究[2-6]。在前期研究中,我们注意到如果在离脊髓损伤区上下端两个椎体棘突间隙阿是穴进行督脉电针的同时, 在脊髓损伤区远端的腰俞穴和长强穴进行督脉电针刺激, 则可以明显加快全横断脊髓损伤的大鼠后肢部分运动功能恢复[4]。但是其中的机制还不清楚, 可能与支配后肢肌肉的脊髓受损

*基金项目:国家自然科学基金(30472132);广东省中医药管理局科研基金(101139和303013)

1　中山大学中山医学院组织胚胎学教研室神经科学研究室,广州市中山二路74号,510080

2　通讯作者:曾园山(中山大学中山医学院组织胚胎学教研室神经科学研究室,广州市中山二路74号,510080)

3　广州医学院组织胚胎学教研室

4　中山大学附属一院针灸科

作者简介:李晓滨,男,博士,副教授

收稿日期:2005-08-21

伤运动神经元的存活状况有关。因此,本研究试图观察脊髓损伤后支配后肢肌肉的运动神经元存活状况,以及后肢股二头肌的形态变化,探讨督脉电针结合神经干细胞移植对大鼠脊髓全横断损伤的前角运动神经元存活,以及减轻后肢肌萎缩有无促进作用,为脊髓损伤患者的早期康复治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 神经干细胞的获取、培养及纯化

出生1—2d的SD大鼠,在无菌条件下开颅,切取海马和侧脑室下区的脑片(约2mm厚),放入新鲜D-Hank液中,用吸管轻柔吹打数十次(以肉眼观察明显组织块消失为度)。吹打后的组织悬液移入离心管离心(1500r/min,5min,后续的离心过程相同),去上清液,加入0.25%胰蛋白酶消化液,并用吸管轻吹打至沉淀细胞散开,置于37℃温箱消化10min。加含有胎牛血清的培养液以终止消化,离心后弃上清液,加新鲜D-Hank液清洗。离心弃上清液后,加入DMEM/F_{12}(含20ng/ml bFGF和20μl/ml B_{27})无血清培养液,用吸管吹散沉淀为细胞悬液。用200目细胞过滤器过滤细胞液,移入培养瓶,先加入约5ml DMEM/F_{12}培养液混匀,取样进行细胞密度计数,根据细胞计数情况逐渐加入DMEM/F_{12}培养液,调整为1×10^4个/ml的细胞浓度后放入37℃、5%CO_2培养箱进行培养。每5—7d半量更换培养液1次,待大量神经球形成后,更换新培养瓶,收集悬浮的神经球,弃去贴壁的分化细胞,将收集的细胞悬液离心去上清液,加入新鲜DMEM/F_{12}培养液,并用吸管轻吹打至神经球分散开后,再放入培养箱培养。经5—6d后,新一代的神经球形成。收集第二代培养7—8d的神经干细胞(NSCs)悬液,用吸管轻吹打神经球至散开,并经细胞计数调制成移植所需细胞浓度后用于移植。

1.2 实验动物分组

将25只SD成年雌性大鼠(体重约220—250g),分为正常组、对照组、督脉电针组(电针组)、神经干细胞移植组(NSCs组)和督脉电针+神经干细胞移植组(电针NSCs组),每组5只。本实验所用的新生和成年大鼠均由中山大学北校区实验动物中心提供。

1.3 制备脊髓全横断损伤模型和神经干细胞移植

除正常组外,其余4组大鼠腹腔内注射戊巴比妥钠(25—30mg/kg)进行麻醉。经无菌消毒后,切开背部正中皮肤,用器械沿两侧棘突顺腰棘肌群走向钝性分离肌肉和韧带,暴露T8、T9和T10棘突和椎弓,仔细剪开T8—T9和T9—T10椎弓间韧带,有齿镊轻提T9棘突,沿T9—T10椎弓间隙,自两侧剪断T9椎弓根部,移出T9椎弓,既暴露T10段脊髓,用尖刃手术刀快速完成脊髓全横断。止血后,在脊髓切断处填入约2mm×2mm×2mm无菌明胶海绵,先用棉球吸去填充海绵内的液体,再用微量移液器抽取10μl已制备好的神经干细胞悬液(浓度为8×10^6个细胞/μl),快速注入明胶海绵内。清理创口后,依肌肉层、皮下组织和皮肤顺序逐层缝合。术后连续3d,每只动物肌肉注射青霉素5万单位0.5ml/d,皮下注射生理盐水5ml/d。人工排尿,2—3次/天。术后4组动物均饲养9周。

1.4 督脉电针治疗

电针组和电针NSCs组的大鼠自术后第5d开始接受隔日1次的督脉电针治疗。选取两组督脉穴位,同时进行。第1组为两个督脉阿是穴,位于脊髓横断处上、下约两个脊髓段(T7—T8和T11—T12)的棘突之间。第二组为腰俞和长强穴。4个穴位的进针深度均为穿透皮后,再进针约2mm,刺激强度为12mV,频率为疏密波,留针时间为15min。此外,两组大鼠均在每天排尿后进行适量的运动恢复训练,如爬网格等。

1.5 实验动物的组织标本制备

5组动物深麻醉后开胸,经左心室至主动脉,固定插管。先快速灌注预冷生理盐水约180ml(每100ml含1%亚硝酸钠0.2ml和肝素200IU),冲洗血管,随后限速(10—12ml/min)滴注预冷固定液(含4%多聚甲醛的0.1mol/L磷酸钠缓冲液,pH7.4)300ml。灌注固定后,从动物背部剥离肌肉,并仔细剪开颅骨和各段椎弓,剪断脑神经和脊神经后,游离并提取出全脑和脊髓,切取L1—L5脊髓段,置入上述新鲜固定液中做后固定。固定后的脊髓组织放入30%蔗糖溶液中(0.1mol/L磷酸钠缓冲液为溶液,pH 7.4),浸泡时间以脊髓组织沉底为度(4℃)。用冷冻包埋剂OCT将脊髓组织分节段包埋后,做连续冰冻横切片,片厚为20μm。组织切片用中性红染色。此外在完成灌注固定后,分离后肢主要大腿伸肌群股二头肌(biceps femoris muscle),并放入Bouin固定液中二次固定,石蜡包埋,组织切片用HE染色。

1.6 脊髓腰段前角运动神经元的计数

5组大鼠腰段脊髓组织切片为横断面,被中性红染色。观察并计数5组L1、L3和L5节段的脊髓前角(双侧)运动神经元数量。每只动物腰段的3个节段均分别计数4张切片(间隔3张取1张),每组动物(5只)每个节段(如L1)共计数20张切片,计数

后再对 5 组数据进行单因素方差分析和显著性检验。

1.7 后肢股二头肌的形态定量分析

在光镜下观察 5 组大鼠股二头肌的组织切片,取每组动物股二头肌组织切片 10 张进行形态定量分析。对其中的肌纤维单位数量密度和肌纤维横截面直径(费莱特直径)进行计数。

1.8 统计学分析

获得的各组数据进行单因素方差分析和显著性检验。

2 结果

2.1 大鼠脊髓腰段前角运动神经元形态和数量的比较

正常组的脊髓前角运动神经元胞体较大, 可见胞突。胞核大而圆,染色较浅。胞质内尼氏体清晰可见(图 1)。对照组的脊髓前角运动神经元胞体明显皱缩(图 2),也可见胞突,但胞核不明显,胞质染色较深,尼氏体不明显。电针 NSCs 组的脊髓前角运动神经元胞体皱缩较轻(图 3),能见突起,有些胞核较明显,可见胞质内有尼氏体。NSCs 组和电针组的脊髓前角运动神经元形态变化(图 4—5)介于对照组和电针 NSCs 组之间。

与正常组比较,各实验组脊髓 L1 和 L3 段前角运动神经元数量均明显减少。神经元数量减少最明显的是 NSCs 组和对照组, 而电针治疗的两个组减少辐度较小。电针 NSCs 组 L5 段前角运动神经元接近正常组; 电针组的神经元数量也较 NSCs 组和对照组多。表 1 结果表明,运动神经元数量波动最大的节段为各实验组 L1,这可能与距脊髓损伤区较近有关。在 L5 节段, 电针组和电针 NSCs 组的前角运动神经元数量也较对照组和 NSCs 组的多($P<0.01$),接近正常组的水平。督脉电针和神经干细胞移植联合应用能够促进大鼠脊髓全横断损伤后受损伤的脊髓前角运动神经元存活。

2.2 大鼠后肢股二头肌的形态定量分析

正常组的后肢股二头肌肌纤维横断面大而圆,可见由肌原纤维组成的孔海姆区(图 6)。对照组的后肢股二头肌肌纤维横断面明显缩小, 每条肌纤维界线不清楚,不能见到由肌原纤维组成的孔海姆区(图 7)。电针 NSCs 组的后肢股二头肌肌纤维横断面皱缩不明显,能见到每条肌纤维的界限,有些可见由肌原纤维组成的孔海姆区(图 8)。

表 2—3 显示,由于大鼠脊髓全横断损伤,可造成其后肢瘫痪, 以致股二头肌萎缩后表现为肌纤维变细、横断面直径减小。因此在单位面积内,萎缩的股二头肌肌纤维的数目密度明显增大。与正常组比较, 其余 4 组大鼠的后肢股二头肌肌纤维数目密度均明显增大,以及肌纤维的横断面直径明显减小。其中对照组股二头肌肌纤维数目密度增加最显著,肌纤维的横断面直径变得最小。而电针 NSCs 组的股二头肌肌纤维数目密度明显减少, 肌纤维的横断面直径恢复性增大。这些数据表明,督脉电针和神经干细胞移植联合应用能够减轻大鼠脊髓全横断损伤后瘫痪的后肢股二头肌的萎缩状况。

3 讨论

临床上一直有用督脉电针治疗脊髓损伤患者的方案, 并取得一定的疗效[7]。在国外,也有人采用电刺激结合辅助器械训练脊髓损伤患者[8]。中医针灸理论认为,督脉循行于脊柱正中,手、足三阳经均与督脉交汇,具有总督一身之阳经、调节阳经经气的作用。

图 1 **正常组大鼠脊髓 L3 段前角** 中性红染色(×40)

图 2 **对照组大鼠脊髓 L3 段前角** 中性红染色(×40)

图 3 **电针 NSCs 组脊髓 L3 段前角** 中性红染色 (×40)

图 4 **NSCs 组大鼠脊髓 L3 段前角** **中性红染色** (×40)

图 5 **电针组大鼠脊髓 L3 段前角** 中性红染色 (×40)

图 6 **正常组大鼠股二头肌肌纤维横断面** HE 染色(×100)

图 7 **对照组大鼠股二头肌肌纤维横断面** HE 染色(×100)

图 8 **电针 NSCs 组大鼠股二头肌肌纤维横断面** HE 染色(×100)

表 1 5 组大鼠脊髓腰段前角运动神经元数量的比较 (个数, $\bar{x}\pm s$)

组别	切片数	L1	L3	L5
正常组	20	48.80±6.01	40.30±3.75	34.50±3.95
对照组	20	22.80±3.47①	22.50±3.50①④	20.70±3.13①
NSCs 组	20	24.30±3.24①	26.00±4.49①	23.50±2.87①
电针组	20	27.90±4.98①②④	28.70±4.01①②③	30.90±3.65②③⑥
电针 NSCs 组	20	31.00±2.71①②③	34.70±5.47①②③⑤	33.90±3.78②③⑦

相同脊髓腰段内, ①与正常组比较 $P<0.01$;②与对照组比较 $P<0.01$;③与 NSCs 组比较 $P<0.01$;④与 NSCs 组比较 $P<0.05$;⑤与电针组比较 $P<0.01$;⑥与正常组比较 $P<0.05$;⑦与电针组比较 $P<0.05$

表 2 5 组大鼠后肢股二头肌肌纤维数目的比较 (个数, $\bar{x}\pm s$/0.25mm²)

组别	切片数	肌纤维个数
正常组	10	36.9±2.51
对照组	10	116.7±7.54①
NSCs 组	10	95.5±4.84①②③④
电针组	10	88.6±2.65①②③
电针 NSCs 组	10	83.2±5.02①②

①与正常组比较 $P<0.01$; ②与对照组比较 $P<0.01$; ③与电针 NSCs 组比较 $P<0.01$; ④与电针组比较 $P<0.05$

表 3 5 组大鼠后肢股二头肌肌纤维横断面直径的比较 ($\bar{x}\pm s$, μm)

组别	动物数	肌纤维个数	肌纤维横断面直径
正常组	5	200	49.75±11.38
对照组	5	200	16.28±5.75①
NSCs 组	5	200	18.70±4.25①②
电针组	5	200	23.50±4.25①②③
电针 NSCs 组	5	200	25.25±4.60①②③④

①与正常组比较 $P<0.01$;②与对照组比较 $P<0.01$;③与 NSCs 组比较 $P<0.01$; ④与电针组比较 $P<0.05$

所以,督脉是针灸治疗脊髓损伤时的首选经脉。本研究选择一组督脉阿是穴是位于脊髓全横断处上、下各两个脊椎的棘突间;另一组为督脉的腰俞穴和长强穴。腰俞穴正对应于脊髓马尾的根部,在此穴给予电针刺激可能会影响到分布在腰、骶部的诸多脊神经的分支。而长强穴是阴部和尾部神经汇聚之处,也是督脉经络尾端的止点。从解剖学构造看,这 4 个穴位的电针刺激可以直接作用于脊髓损伤处邻近脊髓节段和腰、骶段脊髓所发出的脊神经分支,从而促使受损伤的脊髓组织发生结构和功能的变化。

脊髓前角运动神经元是锥体束传导通路的下运动神经元,它们间接或直接与部分下行传导束神经纤维和后根部分传入神经纤维发生突触联系。一旦这些神经元受到损伤甚至死亡,就会导致其所支配的骨骼肌瘫痪(肌张力下降、腱反射消失和肌纤维萎缩)。脊髓腰段的前角运动神经元主要支配后肢肌群和会阴肌群。本研究观察到,当腰段脊髓前角受损伤运动神经的存活增多,该动物的后肢运动功能恢复就较好[4]。各组大鼠受损伤的运动神经元存活数量比较显示,采用电针结合 NSCs 移植方法能有效地减少受损伤的运动神经元死亡,进而促进了后肢运动功能的恢复[4]。这组大鼠的神经电生理检测结果也明显好于其他组大鼠[4]。受损伤运动神经元存活的机制可能与督脉电针和 NSCs 移植联合应用促进宿主脊髓组织生成神经营养素-3(NT-3)等内源性神经生长活性物质有关[11-12],这些活性物质可使受损伤运动神经元存活增多[9-10]。另外,受损伤运动神经元的存活数量多少还与其离脊髓损伤区的距离远近有关,如本研究观察到 L5 脊髓段距损伤区 (T10 脊髓段)较远,其受损伤运动神经元的存活数量最多。

由于脊髓损伤导致受损伤运动神经元发生死亡,因而肌组织失去神经支配,肌组织的收缩功能则丧失。本研究发现,脊髓损伤早期实施督脉电针和神经干细胞移植联合治疗,使后肢伸肌群(股二头肌)的肌纤维萎缩程度明显减轻。这表明当后肢肌组织失去神经支配后,如果能继续给予适当的电针刺激,使脊髓损伤区远端的固有神经通路发挥一定的神经-肌运动单位的调控,并使肌组织仍能得到某些神经递质的营养作用;同时,适度的肌肉运动,也可以促进后肢的血液循环,则不论对受损伤运动神经元或失去神经支配的肌组织同样都有较明显的促进恢复作用。肌纤维的经常收缩对肌组织的血供也有益处,对防止肌纤维功能退行性萎缩有明显的作用。由于神经肌肉接头(突触)的恢复性建立,后肢运动肌群的功能重现,使后肢肌肉及其关节均没有发生较明显的退化。

参考文献

[1] Martin ES. Repairing the injured spinal cord [J]. Science, 2002,295(5557):1029.
[2] 郭家松,曾园山,李海标,等.移植神经干细胞促进脊髓全横断大鼠结构与功能恢复的研究[J]. 解剖学报,2003,34(2):113.
[3] 郭家松,曾园山,陈玉玲,等. 督脉电针治疗大鼠全横断性脊髓损伤的实验研究[J]. 中国针灸, 2003, 23(6):351.
[4] 李晓滨,曾园山,陈玉玲,等. 督脉电针与神经干细胞移植联合应用促进脊髓全横断大鼠后肢运动功能的恢复 [J]. 解剖学报,2004,35(6):582.
[5] 郭家松,曾园山,李海标,等. 神经干细胞与 NT-3 基因修饰雪旺细胞联合移植促进全横断脊髓损伤大鼠的功能修复[J].中国康复医学杂志, 2005,20(5):323.
[6] 曾园山,李晓滨,郭家松,等. 督脉电针与神经干细胞移植在脊髓损伤修复中的作用[J]. 中国康复医学杂志, 2005, 20(6):468.
[7] 徐斌. 脊髓针为主综合方法治疗外伤性截瘫 286 例疗效观察[J]. 中国针灸,1990, 2(1):7.
[8] Kalb RG. Getting the spinal cord to think for itself [J]. Arch Neurol, 2003, 60(6):805.
[9] Vroemen M, Aigner L, Winkler J, et al. Adult neural progenitor cell grafts survive after acute spinal cord injury and integrate along axonal pathways [J]. Eur J Neurosci, 2003, 18(4):743.
[10] Coumans JV, Lin TT, Dai HN, et al. Axonal regeneration and functional recovery after complete spinal cord transection in rats by delayed treatment with transplants and neurotrophins [J]. J Neurosci, 2001, 21(23):9334.
[11] Oppenheim RW, Haverkamp LJ, Prevette D, et al. Reduction of naturally occurring motoneuron death in vivo by a target-derived neurotrophic factor[J]. Science, 1988, 240(4854):919.
[12] 李晓滨,曾园山,陈玉玲,等. 督脉电针与神经干细胞移植联合应用促进全横断脊髓损伤组织产生内源性神经生长活性物质的研究[J].解剖学报,2005,36(1):56.