

基础研究

振荡电场对脊髓损伤大鼠运动功能恢复
和轴突再生的影响

白金柱, 洪毅, 关骅, 张军卫, 唐和虎, 姜树东, 王方永

(首都医科大学康复医学院 中国康复研究中心北京博爱医院脊柱脊髓外科 100068 北京市)

【摘要】目的:探讨振荡电场对脊髓损伤大鼠运动功能恢复和轴突再生的影响。**方法:**改良 Allen's 打击法建立 90 只 SD 大鼠脊髓损伤模型, 随机分为实验组和对照组, 两组均置入刺激电极。实验组施加振荡电场干预, 对照组只置入振荡电场刺激器而不给予干预。电场强度 $600\mu\text{V}/\text{mm}$, 振荡周期为每 15min 极性交替变换, 供电方式为感应式供电, 工作方式为大鼠清醒状态下持续刺激至实验结束。建模成功后 2 周、6 周、12 周进行 BBB 评分、运动诱发电位评价脊髓神经传导情况(MEP 潜伏期差和波幅差); HE 染色行组织学观察, 神经丝蛋白(NF200)、胶质纤维酸性蛋白(GFAP)免疫组化染色, 观察轴突再生情况、行轴突计数、胶质瘢痕形成和星形胶质细胞突起夹角测量, 两组间比较行 t 检验。**结果:**实验组和对照组比较, 2 周时, BBB 评分、MEP 波幅差和轴突计数无差异 ($P>0.05$), 但右下肢 MEP 潜伏期差缩短 ($P<0.05$)。6 周和 12 周时, BBB 评分、MEP 潜伏期差和波幅差、轴突计数和星形胶质细胞突起夹角测定两组间均有显著差异 ($P<0.05$)。12 周时 HE 染色观察两组可见损伤部位脊髓空洞及瘢痕形成; NF 染色实验组可见较多神经纤维通过损伤区; GFAP 染色发现两组间 IOD 值测定无显著差异。**结论:**振荡电场可以促进脊髓损伤大鼠的脊髓神经传导功能改善和后肢运动功能恢复, 电场作用时间需达 6 周以上。大鼠后肢运动功能恢复可能与振荡电场促进轴突再生、诱导其定向生长, 促进星形胶质细胞线性排列等有关。

【关键词】脊髓损伤; 振荡电场; 运动; 轴突; 大鼠

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2012.04.13

中图分类号: R683.2, Q64 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2012)-04-0352-05

Effect of oscillating electrical field on motor function recovery and axon regeneration in rat with spinal cord injury/BAI Jinzhu, HONG Yi, GUAN Hua, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2012, 22(4): 352-356

【Abstract】 Objectives: To explore the influence of oscillation field on motor function recovery and axon regeneration in rat with spinal cord injury. **Methods:** Ninety SD rats with spinal cord injury induced by Allen method was randomly divided into experimental group and control group. The stimulating electrode were added in both groups. The experimental group received oscillation electric field as intervention, while the control group experienced the implanted stimulator alone rather than the oscillation electric field. The electric field intensity was $600\mu\text{V}/\text{mm}$. Every 15 min, the polarity alternated. The power supply mode was inductive system, and the rats received the stimulation in conscious state. At 2w, 6w, 12w after the experiment, BBB scores, motor evoked potentials (the MEP latency and amplitude difference), HE dyeing histology, neurofilament protein (NF200), glial fibers acid protein(GFAP) immunohistochemical, immunofluorescence stain were used to observe the axonal regeneration, axon counting, glial scar formation and astrocytes neurite angle measurement. The statistical analysis was performed between 2 groups. **Results:** Compared with control group of 2w, BBB scores, MEP amplitude difference and axon count in experimental group showed no significant difference, while the MEP latency period of right hindlimb showed significant difference ($P<0.05$). At 6w, 12w, BBB scores, MEP latency period difference and amplitude difference, axon count and astrocytes neurite angle

基金项目: 国家自然科学基金青年基金(30801222), 北京市科技新星计划(2007B070)

第一作者简介: 男(1973-), 副主任医师, 医学博士, 研究方向: 脊柱外科

电话: (010)87569065 E-mail: baijinzhu@126.com

通讯作者: 洪毅 E-mail: hongyihyy@yahoo.com.cn

measurement all showed significant difference ($P < 0.05$) compared with control group. At 12 week, the HE dyeing histological result showed no difference between 2 groups, which both presented with syringomyelia and glial scar formation. As for NF200 immunohistochemical stain, more nerve fibers were noted in experimental group than control group; as for GFAP immunohistochemical stain, the density and IOD values showed no difference between two groups. **Conclusions:** Oscillating electrical field can promote motor function recovery in rats with spinal cord injury, the inner mechanism may be related with promoting axon regeneration, inducing the directional growth, promoting astrocytes linear array and providing axon outgrowth channels.

[Key words] Spinal cord injury; Oscillating electric field; Rat; Motor function recovery

[Author's address] Department of Spinal Surgery, Beijing Boai Hospital, China Rehabilitation Research Center, Capital Medical University, Beijing, 100068, China

Jaffe等^[1]体外试验中证明了细胞外电场和轴突再生的关系,生长的神经纤维对电场有反应并且沿着电压梯度生长;另一个重要的现象是轴突在 70~140mV/mm 直流电场中以三倍的速度向阴极生长,而朝向阳极的轴突在持续暴露于电场中 30min 后开始退变;电场阴极可能对损伤脊髓轴突有定向和营养作用并且可改善其功能。Wallace 等^[2]和 Shapirc 等^[3]的研究也证明了外加弱电场可促进脊髓损伤神经功能的恢复。振荡电场的特性是交替变换极性,按轴突再生朝向阴极生长原理,理论上振荡电场可同时促进损伤头侧和尾侧轴突的双向修复。本研究目的是验证置入式振荡电场持续作用对脊髓损伤大鼠后肢运动功能以及轴突再生的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康成年清洁级雌性 SD 大鼠 90 只,体重 220 ± 10 g,由中国军事医学科学院实验动物中心提供,许可证号 SCXK-(军)2007-004。动物饲养及实验操作均在中国康复研究中心动物实验室完成。

1.2 实验材料

兔抗大鼠 GFAP 多克隆抗体 (Sigma-Boster 分装),鼠抗 NF200 单克隆抗体 (Sigma-Boster 分装),山羊抗小鼠 IgG (Sigma-Boster 分装),山羊抗兔 IgG (Sigma-Boster 分装),Alexa Fluor 568 山羊抗小鼠 IgG (Zymed; 美国),Alexa Fluor 568 山羊抗兔 IgG (Zymed; 美国),NYU 打击器 (New York University; 美国),神经电生理仪 (Medelec Synergy; 德国),植入式振荡电场刺激器 (中国科学院电工研究所),DM2500 光学显微镜 (Leica; 德国),DMLA 4000B 荧光正置显微镜 (Leica; 德国),Image Pro Plus 6.0 软件 (Media Cybernetics;

美国)

1.3 实验方法

90 只 SD 大鼠,数字随机法分为实验组和对照组,每组 45 只,制作脊髓损伤模型(采用改良 Allen 打击法),脊髓损伤大鼠出现后肢及尾部痉挛及硬膜充血为模型成功,同时置入刺激电极。实验组施加振荡电场干预,对照组只置入振荡电场刺激器而不给予干预。电场强度 $600 \mu\text{V}/\text{mm}$,振荡周期为每 15min 极性交替变换,供电方式为感应式供电,工作方式为大鼠清醒状态下持续刺激。每组按照观察时间又随机分为 2 周、6 周和 12 周三个亚组,每个亚组各 15 只。实验过程中死亡或被淘汰的大鼠均予以补充。

1.3.1 动物模型的制备 10% 水合氯醛 (3ml/100g 体重)腹腔注射麻醉。暴露 T10 水平的脊髓,将大鼠固定于 NYU 打击器平台,对大鼠实施 50gcf 势能的脊髓撞击。用非吸收缝合线将振荡电场两个电极(每个电极有 3 个固定支)缝合到 T8~T9、T11~T12 棘突和双侧关节突,逐层缝合切口,振荡电场主体置于体外。术后即开始给予实验组振荡电场干预。

1.3.2 取材和切片制备 建模成功后 2 周、6 周、12 周行 10%水合氯醛腹腔注射麻醉,运动诱发电位检测后,用 4%多聚甲醛经心内灌注,取出损伤中心脊髓节段及头尾端 1cm,在 4%多聚甲醛中固定 12h,以损伤部位为中心石蜡包埋,连续冠状及矢状面切片,切片厚度为 $10 \mu\text{m}$ 。

1.4 检测方法

1.4.1 行为学观察 实验后 2 周、6 周、12 周进行 BBB 评分,观察大鼠后肢运动功能。实行单盲法,采用双人独立观察记录,最后取其均值。

1.4.2 电生理学检查 刺激电极为一对针状电极,分别放置于手术野上、下棘突间隙,即 T7/8 和 L1/2。阴电极置于阳电极尾侧,两者间距 0.5~

0.8cm。刺激类型为矩形脉冲,恒压输出,波宽 0.05ms,输出强度为 100~150V。记录电极也为一对针状电极,在左右小腿腓肠肌上分别记录复合肌肉动作电位(CMAP)。采用损伤区上下方的潜伏期之差和波幅之差作为指标。损伤区上方的 MEP 与下方的差异越小,则传导功能恢复越好。

1.4.3 组织学检查 损伤部位脊髓行 HE 染色,观察损伤局部的病理变化。常规脱蜡和水化,抗原修复,封闭,滴加 I 抗,37℃ 1h,PBS 洗 3 次每次 2min,滴加 II 抗,置 37℃ 1h,PBS 洗 3 次各 5min,DAB 显色,苏木精复染,盐酸酒精分化,脱水、透明、封片、镜检。冰冻切片采用漂片法漂洗,封闭后,加入一抗。分别加入鼠单克隆抗体 NF200(1:1000)、兔多克隆抗体 GFAP(1:500),4℃过夜,漂洗,加入二抗分别为 Alexa Fluor 568 山羊抗小鼠 IgG、Alexa Fluor 568 山羊抗兔 IgG,室温 2h,漂洗,封片后,荧光显微镜观察。应用 Image Pro Plus 6.0 软件对 GFAP 阳性表达的荧光照片测量累积光密度值(IOD 值=面积×平均光密度)及脊髓损伤处胶质细胞相邻突起之间的夹角。NF200 染色片上,400 倍光镜下计数脊髓损伤部位残存白质内单位面积褐色着色点的数目,即轴突计数。

1.5 统计方法

应用 SPSS 16.0 对 BBB 评分采用双因素方差分析,各时间点(2 周、6 周、12 周)数据采用 SNK 法两两比较。MEP 的潜伏期差和波幅差、轴突计数和胶质细胞相邻突起之间的夹角均采用独立样本 *t* 检验。设 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

整个实验中有 8 只大鼠死亡,5 只电极埋置部位皮下出现局部感染征象,均按照实验步骤进行补充。

2.1 BBB 评分

双侧后肢 BBB 评分见表 1,两组在 1d 和 2 周时差异均无统计学意义($P>0.05$),6 周和 12 周时差异均有统计学意义($P<0.05$)。以时间因素进行组内分析,实验组随着时间延长 BBB 评分不断增高($P<0.05$);而对照组 6 周及 12 周时差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.2 双后肢 MEP

MEP 潜伏期差比较,2 周时实验组右侧较对照组缩短,6 周和 12 周实验组双侧均较对照组缩短,差异具有统计学意义($P<0.05$,表 2)。波幅差比较见表 3,2 周时差异无统计学意义($P>0.05$),6 周和 12 周实验组双侧均较对照组减小,差异具有统计学意义($P<0.05$)。

2.3 组织学观察

HE 染色示 2 周时两组脊髓内灰白质界限不清,6 周时可见脊髓空洞形成,周边少量白质残留,12 周时可见损伤部位胶质瘢痕。

2.4 NF200 免疫组化染色和轴突计数。

在脊髓矢状面切片,光镜下可见 NF200 染色阳性神经纤维呈褐色或棕黄色。2 周时对照组和实验组的白质内均可见散在的褐色着色点,6 周和 12 周时实验组可见较多神经纤维通过损伤区($P<0.05$,表 4,图 1、2)。

2.5 GFAP 蛋白免疫组化染色

两组大鼠脊髓损伤区域内均可见神经胶质细胞增生,两组间密度无显著差异($P>0.05$)。但星形胶质细胞突起夹角测量发现 12 周时实验组为 $34.39\pm 8.51^\circ$,明显小于对照组为 $66.32\pm 15.84^\circ$ ($P<0.05$,图 3、4)。

3 讨论

3.1 振荡电场对脊髓损伤大鼠运动功能恢复的

表 1 大鼠在各时间点的 BBB 评分

Table 1 The BBB locomotor score of the rat at different time(Mean±SD, $P<0.05$)

分组(Group)	实验组 Experimental group($n=45$)		对照组 Control group ($n=45$)	
	左后肢评分 Left hindlimb score	右后肢评分 Right hindlimb score	左后肢评分 Left hindlimb score	右后肢评分 Right hindlimb score
1d	2.4±1.43	1.9±1.08	2.6±1.50	2.1±1.33
2周 2 weeks	4.0±2.27	3.9±2.41	4.9±1.35	4.1±1.47
6周 6 weeks	7.65±2.51 ^①	7.72±1.91 ^①	6.20±1.44	6.16±1.82
12周 12 weeks	9.50±2.02 ^①	9.65±2.34 ^①	6.80±2.11	6.74±2.31

注:①与对照组比较 $P<0.05$

Note: Compared with control group $P<0.05$

表 2 MEP 潜伏期差

Table 2 The MEP latency difference (Mean±SD, $P<0.05$)

时间 (Time)	实验组 Experimental group (n=45)		对照组 Control group (n=45)	
	左侧(L)	右侧(R)	左侧(L)	右侧(R)
2周 2 weeks	2.95±1.68	2.90±0.98 ^①	2.85±1.18	2.92±1.47*
6周 6 weeks	1.94±1.065 ^①	1.85±0.94 ^①	2.70±1.30	2.78±1.26
12周 12 weeks	1.01±1.33 ^①	1.16±0.09 ^①	2.65±1.44	2.60±0.50

注:①与对照组比较($P<0.05$)①Compared with control group($P<0.05$)

表 3 MEP 波幅差

Table 3 The MEP amplitude difference (Mean±SD, $P<0.05$)

分组 (Group)	实验组 Experimental group (n=45)		对照组 Control group (n=45)	
	左侧(L)	右侧(R)	左侧(L)	右侧(R)
2周 2 weeks	2.86±1.45	2.50±0.75	2.94±2.35	2.76±1.30
6周 6 weeks	1.92±1.44 ^①	1.86±0.94 ^①	2.55±1.63 ^①	2.38±1.15 ^①
12周 12 weeks	0.21±0.066 ^①	0.48±0.102 ^①	2.25±1.45 ^①	1.91±1.54 ^①

注:①与对照组比较($P<0.05$)①Compared with control group($P<0.05$)

表 4 NF 染色轴突计数

Table 4 NF stain axon counting (Mean±SD/400, $P<0.05$)

组别 Group	实验组 Experimental group (n=45)	对照组 Control group (n=45)
2周 2 weeks	8.67±1.52	7.33±2.78
6周 6 weeks	20.33±4.08 ^①	14.36±3.53 ^①
12周 12 weeks	41.31±8.51 ^①	20.32±4.44 ^①

注:①组内与 2 周时比较($P<0.05$) ②组内与 6 周时比较($P<0.05$)①Compared with 2 week ($P<0.05$) ②Compared with 6 week ($P<0.05$)

影响

有研究表明直流电场或振荡电场能促进脊髓损伤动物神经功能的恢复, Borgens 等^[4]用脊髓损伤狗进行随机双盲临床试验来评估在椎管内置入振荡电极的效果和生物相容性, 振荡电场置入 14 周, 狗恢复了行走功能。但 Fehlings 等^[5]同样研究直流电场应用于大鼠急性脊髓损伤后 8 周发现在行为学上和电生理上都无明显的恢复。

本研究实验组脊髓损伤后即刻给予振荡电场的干预, 对照组只置入振荡电场刺激器而不给予干预, BBB 评分结果提示 2 周内, 无明显改善, 振荡电场作用 6 周后对后肢运动功能有一定程度的促进作用。对照组随时间延长, 恢复逐渐停滞, 与既往研究相一致^[6]。

3.2 振荡电场对脊髓损伤大鼠神经电生理的影响

本研究中, 2 周时 MEP 的检测提示在脊髓损伤早期振荡电场已开始改善脊髓的运动传导功能。脊髓损伤大鼠振荡电场治疗 2 周后未发现双后肢运动功能有明显的恢复, 但 MEP 检测显示右后肢 MEP 潜伏期明显缩短, 可能是由于 2 周内尚未形成胶质瘢痕, 振荡电场的早期干预增加了轴突的生长速度。虽然产生了电生理学上的变化, 但尚不足以表现为运动功能的恢复。6 周和 12 周时 MEP 结果表明经 6 周以上的持续振荡电场刺激, 脊髓损伤大鼠的运动传导功能获得一定程度改善, 与 Borgens 等^[4]的结果一致, 而且与双后肢运动功能恢复在时间上相对应, 提示振荡电场可能通过改善脊髓神经运动传导功能, 进而促进运动

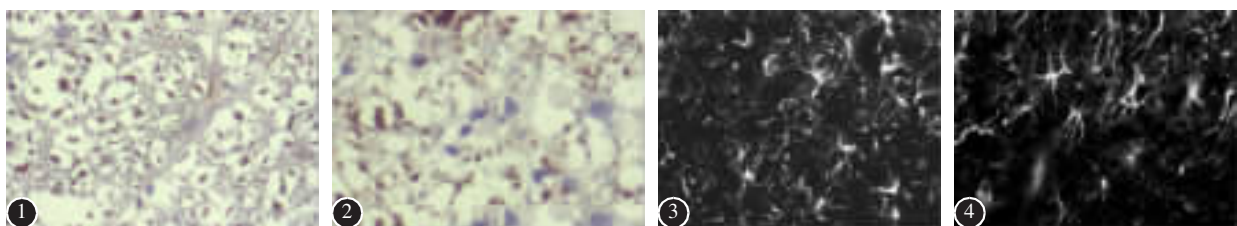


图 1 12 周光镜下对照组大鼠脊髓损伤部位灰质的 NF200 染色(40×), 可见褐色的神经元和散在的褐色轴突着色点 图 2 12 周时光镜下实验组大鼠脊髓损伤部位灰质的 NF200 染色(40×), 可见褐色的神经元和较多较集中的褐色着色点, 即轴突 图 3 12 周时对照组大鼠脊髓损伤部位的 GFAP 免疫荧光染色(40×), 可见星形胶质细胞突起无规则 图 4 12 周时实验组大鼠脊髓损伤部位的 GFAP 免疫荧光染色(40×), 可见星形胶质细胞突起相对规则

Figure 1 At 12w, with the NF200 immunohistochemical staining of the injured spinal cord in the control group, the brown axon spots and neurons spots were interspersed **Figure 2** At 12w, with the NF200 staining of the injured spinal cord in experimental group, there were brown axon spots and neurons spots **Figure 3** At 12w, with the GFAP immunofluorescence staining of the injured spinal cord in the control group, the astrocytes neurite were irregular **Figure 4** At 12w, with the GFAP immunofluorescence staining of the injured spinal cord in the experimental group, the astrocytes neurite were regular relatively

功能恢复。

3.3 振荡电场对轴突生长的作用

Borgens 等^[7]在成年猪横断其背侧索的轴突后,外加电场可促进其再生,新生的、可穿入胶质瘢痕的轴突通常 $<1\mu\text{m}$,且主要分布在损伤周围的白质中,本研究轴突计数短期内与对照组无明显差别,但 12 周时,实验组可见神经纤维再生和轴突计数高于对照组,同时实验组的 MEP 检测显示脊髓神经传导功能改善,双后肢运动功能与对照组比较有明显恢复。

3.4 振荡电场对胶质瘢痕形成的影响

胶质瘢痕的形成是抑制轴突再生、阻碍神经功能恢复的主要原因之一。Hamid 等^[8]认为电场可以减轻损伤部位的神经胶质增生。本研究进行了胶质纤维酸性蛋白 IOD 值测定,但各时间点实验组与对照组比较无差异,可能为样本量较小所致。

Moriarty 等^[9]应用振荡电场抑制了脊髓损伤区星形胶质细胞突起伸展,并诱导其向电场方向重新定向。本研究进行了脊髓损伤处星形胶质细胞相邻轴突之间的夹角测量,12 周时实验组夹角明显小于对照组,提示振荡电场虽然对胶质瘢痕形成的程度无明显影响,但可促进星形胶质细胞线性排列,可为轴突生长提供通道。

3.5 振荡电场与神经功能恢复的关系

既往有研究证明外加的弱电场可以促进神经功能的恢复,并可促进轴突的再生,认为轴突再生与神经功能恢复相关^[1-4,7]。2005 年经美国 FDA 批准,Shapiro 等^[3]对急性完全性脊髓损伤患者进行的临床一期研究表明,振荡电场治疗可以明显改善患者的感觉和运动功能。但另外有实验证明外加的弱电场可促进神经功能恢复,但是组织学上并未发现差异,即不能诱发施旺细胞和室管膜细胞的增殖和新的髓鞘生成,功能恢复可能是由于替代突触的发育^[10]。2007 年 Cormie^[11]和 Robinson 等^[12]研究发现体外培养的斑马鱼神经元细胞其生长并不受外加电场的影响,并对振荡电场对脊髓损伤修复的影响提出质疑。

本研究中,振荡电场作用 6 周以后,实验组轴突计数和星形胶质细胞线性排列优于对照组,同时 MEP 检测提示实验组大鼠的运动传导功能获得一定程度改善,双后肢运动功能有所恢复。以上各项结果在时间上相对应,提示振荡电场可能通过促进轴突再生进而促进神经功能恢复。

综上,振荡电场可以促进脊髓损伤大鼠的脊髓运动传导功能改善和运动功能恢复,电场作用时间需达 6 周以上。振荡电场的作用机制可能是促进轴突再生、诱导其定向生长,促进星形胶质细胞线性排列、提供轴突生长通道。

5 参考文献

1. Jaffe LF, Poo MM. Neurites grow faster towards the cathode than the anode in a steady field[J]. J Exp Zool, 1979, 209 (1): 115-127.
2. Wallace MC, Tator CH, Gentles WM. Effect of alternating current stimulation of the spinal cord on recovery from acute spinal cord injury in rats[J]. Surg Neurol, 1987, 28(4): 269-76.
3. Shapirc S, Borgens R, Pascuzzi R, et al. Oscillating field stimulation for complete spinal cord injury in humans: a Phase 1 trial[J]. J Neurosurg Spine 2005, 2(1): 3-10.
4. Borgens RB, Toombs JP, Breur G, et al. An imposed oscillating electrical field improves the recovery of function in neurologically complete paraplegic dogs[J]. Neurotrauma, 1999, 16 (7): 639-657.
5. Fehlings MG, Wong TH, Tator CH, et al. Effect of a direct current field on axons after experimental spinal cord injury [J]. Can J Surg, 1989, 32(3): 188-91.
6. You SW, Chen BY, Liu HL, et al. Spontaneous recovery of locomotion induced by remaining fibers after spinal cord transection in adult rats[J]. Restor Neurol Neurosci, 2003, 21 (1-2): 39-45.
7. Borgens RB, Bohnert DM. The responses of mammalian spinal axons to an applied DC voltage gradient[J]. Exp Neurol, 1997, 145(2 Pt 1): 376-389.
8. Hamid S, Hayek R. Role of electrical stimulation for rehabilitation and regeneration after spinal cord injury: an overview [J]. Eur Spine J, 2008, 17(9): 128-132.
9. Moriarty LJ, Borgens RB. An oscillating extracellular voltage gradient reduces the density and influences the orientation of astrocytes in injured mammalian spinal cord[J]. J Neurocytol. 2001, 30(1): 45-57.
10. Wallace MC, Tator CH, Piper I. Recovery of spinal cord function induced by direct current stimulation of the injured rat spinal cord[J]. Neurosurg, 1987, 20(6): 878-884. 10.
11. Cormie P, Robinson KR. Embryonic zebrafish neuronal growth is not affected by an applied electric field in vitro[J]. Neurosci Lett, 2007, 411(2): 128-132.
12. Robinson KR, Cormie P. Electric field effects on human spinal injury: is there a basis in the vitro studies [J]? J Neurobiol, 2007, 68(2): 274-280.

(收稿日期:2011-11-15 修回日期:2011-12-29)

(英文编审 蒋欣/贾丹彤)

(本文编辑 刘彦)