

活血通督汤对脊髓损伤后胶质瘢痕形成的影响

汪今朝¹ 范筱¹ 张俐^{1,2}

[摘要] **目的:**观察活血通督汤对脊髓损伤后肢体运动功能和胶质瘢痕形成的影响,探讨活血通督汤治疗脊髓损伤的作用机制。**方法:**成年 SD 大鼠 18 只,采用随机数表法随机分为假手术组、模型组和活血通督汤组,每组各 6 只。假手术组仅行椎板切除术,模型组和活血通督汤组采用 NYU 脊髓打击器建立脊髓损伤模型,造模后假手术组和模型组给予生理盐水灌胃,活血通督汤组给予活血通督汤灌胃。术后第 1,3,5,7 天行 BBB 肢体运动功能评分,7 d 后取材。采用尼氏染色法观察神经元细胞形态结构以及神经元受损情况,免疫荧光检测胶质纤维酸性蛋白(GFAP)表达,计算 GFAP 阳性细胞数。**结果:**自术后第 3 天起,活血通督汤组的大鼠 BBB 评分高于模型组大鼠 BBB 评分,差异有统计学意义($P < 0.05$);尼氏染色结果显示活血通督汤组神经元受损情况得到改善,神经元的形态结构优于模型组;免疫荧光检测结构显示与假手术组相比,脊髓损伤后 GFAP 表达显著,损伤处 GFAP 阳性细胞数增多,差异有统计学意义($P < 0.05$);与模型组相比,活血通督汤组 GFAP 阳性细胞数较少,差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论:**活血通督汤能促进脊髓损伤后肢体运动功能的恢复,其机制可能与抑制 GFAP 表达、降低脊髓损伤后胶质瘢痕形成有关。

[关键词] 脊髓损伤;活血通督汤;胶质纤维酸性蛋白;胶质瘢痕

[中图分类号] R274.39 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2017)08-0001-05

Effects of Huoxue Tongdu Decoction on the Glial Scar Formation

WANG Jinzhao¹ FAN Xiao¹ ZHANG Li^{1,2}

¹Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China;

²Xiamen Medical School, Xiamen 361008, Fujian China.

Abstract Objective: To discuss the effects of the recovery of locomotion in rats via Huoxue Tongdu decoction, the morphology and structure of neurons, the damage of neuron and the expression of glial fibrillary acidic protein(GFAP). **Methods:** 18 adult SD rats were randomized into three groups: the sham operation group, the model group and the Huoxue Tongdu decoction group with six rats in each group. The sham operation group was undergone laminectomy while the model group and Huoxue Tongdu decoction group with NYU spinal cord impactor to establish the spinal cord injury model. The sham operation group and model group were given saline while the Huoxue Tongdu decoction group the same amount of Huoxue Tongdu decoction perday after operation. BBB score was used to evaluate the locomotion daily. After 7 d, tissues were gathered for Nissl's staining and immunofluorescence. **Results:** There is significant difference between Huoxue Tongdu decoction group than the other two groups in the BBB score from the third day on ($P < 0.05$). A better structure and morphology of neuron was observed by Nissl's staining in the Huoxue Tongdu decoction group compared with the model group which suggests that Huoxue Tongdu decoction reduced GFAP secretion from cells of the spinal cord ($P < 0.05$). **Conclusions:** It suggests that Huoxue Tongdu decoction can alleviate locomotion function after spinal cord injury by inhibiting the expression of GFAP positive cells and promoting the regeneration of injured axons

Keywords: spinal cord injury; Huoxue Tongdu decoction; glial fibrillary acidic protein(GFAP); glial scar

基金项目:国家自然科学基金项目(81273775)

福建省百千万领军人才项目

¹ 福建中医药大学(福州, 350122)

² 厦门医学院

脊髓损伤是一种严重的神经系统疾病,损伤后由于轴突再生障碍,损伤患者多伴有下肢感觉和运动功能减退或消失,损伤局部病理变化复杂,常伴有大量神经细胞凋亡,电解质紊乱,炎症反应,瘢痕组织积累

等^[1,2]。胶质纤维酸性蛋白(GFAP)是星型胶质细胞的标志蛋白,是星型胶质细胞重要的细胞骨架,仅存在于星型胶质细胞中,GFAP阳性细胞数量能直接反应出活化的星型胶质细胞数量。星型胶质细胞是神经胶质细胞中最主要的细胞,能起到保护、支持、营养神经元的作用,可诱导神经元突起的定向生长,活化的星型胶质细胞过度肥大,增生,形成胶质瘢痕,研究已证实胶质瘢痕由于其三维结构所产生的屏障以及释放的抑制因子阻碍了轴突的再生和恢复从而阻碍神经细胞生长、恢复和功能重建^[3,4]。

活血通督汤是中医骨伤专业高等教育创始人张安桢教授所创,临床上广泛使用。目前该药已获得福建省食品药品监督管理局的批准,批准文号为闽药制字Z20150010。现代研究^[5-8]已经证实,活血通督汤可以改善脊髓缺血再灌注损伤微环境,抑制细胞凋亡,减轻炎症反应,对肢体运动功能恢复有很好的疗效。但是,活血通督汤对胶质瘢痕和GFAP表达的调控作用尚不明确。因此本实验通过观察神经细胞的形态结构以及GFAP阳性细胞的数量,探讨活血通督汤促进脊髓损伤后大鼠肢体运动功能恢复的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

18只健康成年雌性SD大鼠,体质量(230 ± 20)g,由上海斯莱克实验动物责任有限公司提供,饲养于福建中医药大学实验动物中心SPF级实验室。

1.2 药品与试剂

活血通督汤组成:黄芪30g,地龙9g,泽兰叶9g,赤芍、白芍各4.5g,川芎6g,牛膝9g,购于福建中医药大学附属第三人民医院,加工成1g/mL即1mL汤药含生药1g,无菌封瓶, -20°C 冰箱保存备用。试剂:兔抗鼠GFAP一抗(Abcam,美国),山羊抗兔GFAP荧光二抗(Alexa Fluo488, Thermo Fisher, 美国),DAPI染色液(博士德,武汉),尼氏染色液(索莱宝,北京),Triton-100(Sigma,美国)。

1.3 实验方法

1.3.1 分组和造模 采用随机数表法将18只SD大鼠随机分为假手术组、模型组和活血通督汤组,每组6只。假手术组仅行椎板切除术,不损伤脊髓,其余两组使用NYU脊髓打击器建立脊髓损伤(SCI)模型^[9]。麻醉后消毒,于 $T_9 \sim T_{11}$ 区域沿脊柱纵轴作一长约2~3cm切口,切开皮肤、肌肉、筋膜,钝性剥离棘突两侧的肌肉,使用小型咬骨钳咬除椎板,暴露白色硬脊膜。将大鼠置于NYU脊髓打击器固定台,调整打击杆,瞄准暴露的脊髓正中,调整打击杆高度为12.5mm,释放打击杆,使其自由下落撞击脊髓,出现大鼠尾部剧烈摆动,头部肌肉瞬间收缩,术后出现双下肢完全瘫痪,

提示造模成功。造模成功后,生理盐水冲洗伤口后逐层缝合。术后每日早晚人工按摩膀胱和下腹以助大鼠排便排尿,每日给予青霉素4万单位/只,连续3d,预防感染。

1.3.2 干预方法 自术后第1天起,活血通督汤组给予活血通督汤灌胃,2次/d,给药量为 $12.6\text{ mL}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ ^[10];模型组和假手术组分别灌服等量生理盐水,连续干预7d。

1.3.3 运动功能评分 本实验采用BBB评分评估大鼠肢体运动功能^[11]。2名专业人员于第1,3,5及7天对每只大鼠独立进行BBB评分,每只大鼠评分2次,每次观察时间不少于3min。

1.3.4 取材方法 水合氯醛麻醉成功后,将大鼠腹腔剪开,止血钳夹住腹主动脉,打开胸腔,暴露心脏。于右心房、左心尖处各剪一小口,自左心尖部注入150mL生理盐水快速冲洗,然后缓慢注入150mL的4%多聚甲醛进行灌注固定。自头尾剪断脊柱后,以脊髓损伤处为中心,取长约2cm脊髓段,置于4%多聚甲醛, 4°C 固定48h后包埋做厚度为 $5\mu\text{m}$ 的石蜡切片。

1.3.5 检测方法

1.3.5.1 尼氏染色:将上述石蜡切片常规脱蜡入水后放入尼氏染色液,置于 60°C 温箱中浸染50min,蒸馏水迅速冲洗3遍,再用分色液分色1~2min(具体时间根据分色情况而定),晾干,中性树胶封片,镜下观察,采集图片。

1.3.5.2 GFAP免疫荧光:将制作好的石蜡切片脱蜡入水后,用 0.01 mol/L PBS清洗3次,每次3min;浸入枸橼酸盐缓冲液中进行高压修复,密闭自然冷却至室温;PBS洗3次,每次3min; 0.3% Triton X-100室温下破膜10min;PBS漂洗3次,每次3min;甩掉PBS加封闭液, 37°C 烤箱孵育1h,甩掉组织表面封闭液,不洗;加GFAP一抗(1:200), 4°C 过夜; 37°C 复温30min;PBS洗3次,每次3min;避光滴加GFAP荧光二抗(1:200); 37°C 避光反应2h;PBS避光洗3次,每次3min;避光滴加DAPI,反应3min;PBS避光洗3次,每次3min,滴加抗荧光淬灭封片剂,荧光显微镜观察,采集图片,进行分析。

1.4 统计学方法

实验数据收集用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 20.0统计软件对GFAP进行组间方差分析, $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BBB肢体运动功能评分

脊髓损伤后,模型组和活血通督汤组大鼠的肢体运动功能显著丧失,与假手术组相比,BBB评分显著下降;术后第1天,活血通督汤组与模型组相比,BBB

评分差异无统计学意义($P>0.05$);自术后第 3 天起,督汤组 BBB 评分较模型组高,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 1.

表 1 BBB 肢体运动功能评分表($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	第 1 天	第 3 天	第 5 天	第 7 天
假手术组	6	20.50±0.54	21	21	21
模型组	6	2.16±0.75	3.67±1.03	4.67±1.37	6.50±1.37
活血通督汤组	6	2.66±0.51	7.50±1.50 ¹⁾	8.50±1.05 ¹⁾	10.0±0.89 ¹⁾
<i>F</i>		0.552	0.901	0.710	2.813
<i>P</i>		0.017	0.000	0.000	0.000

注:同一时间点与假手术组相比,1) $P<0.05$.

2.2 尼式染色

假手术组神经细胞结构完整,胞质内可见清晰的虎斑样尼氏体,细胞核明显;模型组神经细胞损伤严重,细胞水肿、无细胞核,无可视突触,胶质瘢痕组织堆

积,细胞溶解;活血通督汤组可见轻微瘢痕组织,神经细胞形态较模型组改善,细胞水肿情况较轻,部分神经细胞可见细胞核,见图 1.

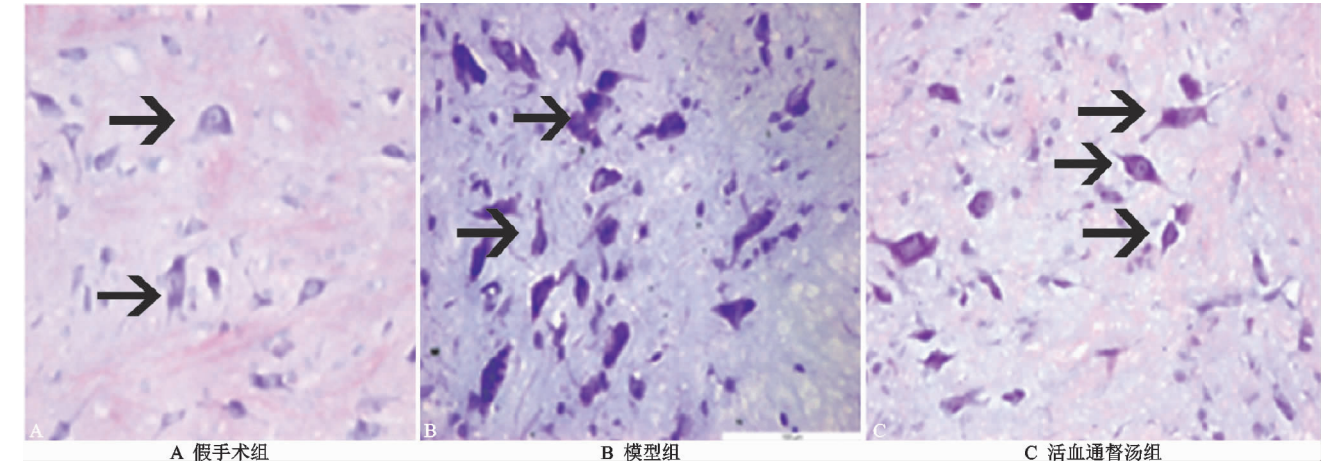


图 1 3 组尼式染色,神经细胞形态结构(400×)

2.3 免疫荧光检测 GFAP 阳性细胞数

GFAP 阳性细胞呈绿色,形态树枝状。假手术组可见 GFAP 表达量较少,GFAP 阳性细胞数较少,亮度较暗,与活血通督汤组和模型组相比差异具有统计学意义($P<0.05$);活血通督汤组 GFAP 表达和 GFAP 阳性细胞数较模型组少,差异具有统计学意义($P<0.05$),见表 2 及图 2.

表 2 免疫荧光检测 GFAP 阳性细胞数($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	GFAP 阳性细胞数
假手术组	6	43.16±5.63
模型组	6	63.83±6.74 ¹⁾
活血通督汤组	6	50.10±2.63 ¹⁾²⁾
<i>F</i>	6	25.014
<i>P</i>	6	0.000

注:与假手术组相比,1) $P<0.05$;与模型组相比,2) $P<0.05$.

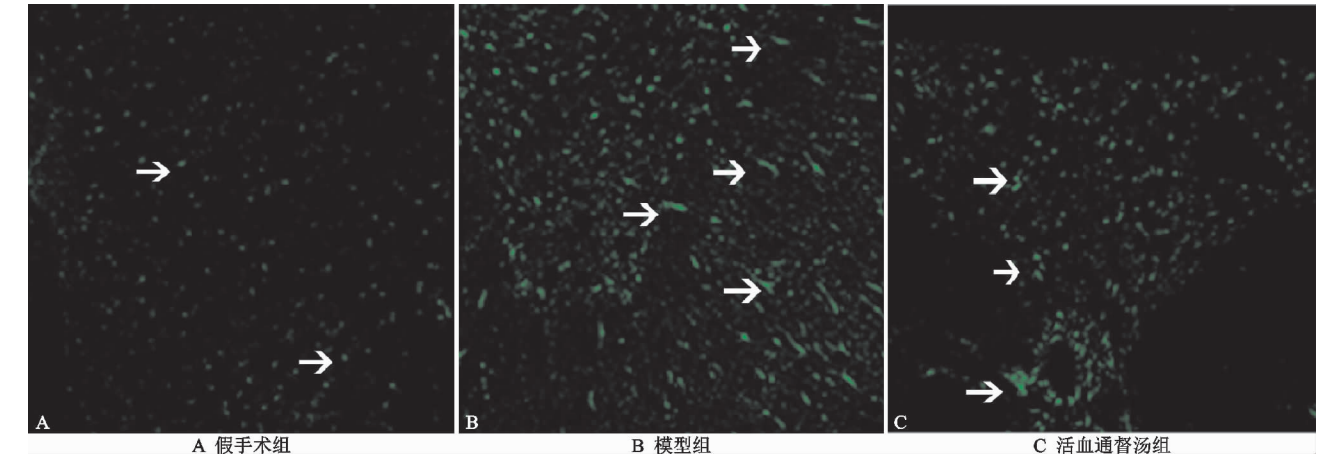


图 2 3 组 GFAP 阳性细胞荧光图片(400×)

3 讨论

脊髓损伤一直是临床上最棘手的问题之一,脊髓损伤后肢体运动功能恢复一直是医学领域研究的热点^[12,13]。脊髓损伤后众多因素影响脊髓修复,包括神经细胞凋亡、神经营养因子缺乏、髓鞘相关糖蛋白和轴突生长抑制因子的抑制作用、胶质瘢痕的抑制作用^[14]。其中,胶质瘢痕是抑制轴突再生的重要因素。胶质瘢痕的形成是一个复杂的病理过程,包括局部组织缺血、水肿、炎症反应、自由基的损伤、脂质过氧化作用、钙离子超负荷、星形胶质细胞、少突胶质细胞和小胶质细胞等增生、活化,其中星形胶质细胞增生活化是胶质瘢痕形成的重要基础^[15-17]。现代研究证实,胶质瘢痕由于其空间结构所形成的物理性以及由硫酸软骨素蛋白聚糖^[18,19]等构成的化学性屏障严重影响神经元活性、轴突再生、髓鞘再生^[20],以及神经传导通路的正常功能,从而影响肢体运动功能恢复。尤其是硫酸软骨素蛋白多糖发挥重要的抑制轴突再生作用。因此,胶质瘢痕的形成是阻碍脊髓损伤后神经系统修复的重要因素之一。星形胶质细胞在中枢神经系统内数量众多,具有合成和分泌多种神经营养因子和细胞因子的能,对神经元及轴突具有支持和营养作用,对神经系统的稳定性也具有一定的调节作用^[21,22]。脊髓受到损伤后,星形胶质细胞发生增生活化,此时细胞数量增加,细胞体积肥大,细胞之间连接、相互融合,形成致密的网状结构,对损伤处起到支持和保护作用^[23]。星形胶质细胞持续活化后,硫酸软骨素蛋白多糖主要由胶质细胞分泌,中枢神经系统损伤后,伴随胶质瘢痕的大量形成,硫酸软骨素蛋白的表达也随之上升,阻断脊髓损伤后轴突再生^[24],并在损伤中心区至周边区形成由密到稀的浓度梯度,形成胶质瘢痕的物理性及化学性屏障,阻断了轴突的生长和修复^[25,26]。由于胶质细胞和硫酸软骨素多糖的关系,后者已成为胶质瘢痕阻碍轴突修复的化学因素。相关研究表明,GFAP 是星形胶质细胞表达的中间丝蛋白,能在活化的星形胶质细胞中大量且特异性地表达^[27,28]。利用 GFAP 作为星形胶质细胞特异性标志物,可探讨脊髓损伤大鼠星形胶质细胞的表达及增生情况。已有研究^[29-31]证明,脊髓损伤后 GFAP 高表达,星形胶质细胞活化,并在损伤后一周星形胶质细胞活化程度以及 GFAP 表达量达到最高值。中医学认为,SCI 属于中医督脉受损,气滞血瘀,肌肉筋骨失养范畴,针灸和中药等传统中医药疗法在治疗脊髓损伤方面已经取得了一定的经验^[32,33]。活血通督汤由黄芪、地龙、泽兰叶、赤白芍、川芎、牛膝组成。方中重用黄芪以益气活血为君药,赤芍清热凉血、散瘀止痛,其性清凉有清心安神之功,泽兰、白芍想须为用有活血止痛,养血调经的功效,地龙

则取其通络除痹之功,川芎活血行气,祛风止痛,为血中气药,牛膝强筋骨,引血下行,二者配伍可升达清阳,使气血和调。诸药合用能行气活血,祛瘀通络。本实验研究显示,给与活血通督汤灌胃的大鼠从第 3 天起,肢体运动功能恢复明显。尼氏染色光镜下观察显示活血通督汤能改善损伤后神经细胞的形态,保护受损神经细胞。免疫荧光结果显示,活血通督汤能减少脊髓损伤后 GFAP 阳性细胞数,说明活血通督汤能抑制星形胶质细胞的增生活化,减少瘢痕组织的形成,从而促进轴突再生。而且相关研究已证实^[34],降低 GFAP 阳性细胞数能减少胶质瘢痕的形成,使轴突得以生长及修复,降低对神经细胞的损害,从而促进脊髓损伤大鼠肢体运动功能的恢复,提示活血通督汤能够改善损伤局部微环境,恢复脊髓损伤局部神经细胞的正常形态,促进神经细胞轴突的再生和恢复,从而为临床运用提供理论和实验依据,值得推广。

参考文献

- [1] Tran AP, Silver J. Neuroscience systemically treating spinal cord injury[J]. Science, 2015, 348(6232): 285-286.
- [2] Bramlett HM, Dietrich WD. Progressive damage after brain and spinal cord injury: pathomechanisms and treatment strategies[J]. Prog Brain Res, 2007, 161: 125-141.
- [3] Morin-Richaud C, Feldblum S, Privat A. Astrocytes and oligodendrocytes reactions after a total section of the rat spinal cord[J]. Brain Res, 1998, 783(1): 85-101.
- [4] Fitch MT, Doller C, Combs CK, et al. Cellular and molecular mechanisms of glial scarring and progressive cavitation: in vivo and in vitro analysis of inflammation-induced secondary injury after CNS trauma[J]. J Neurosci, 1999, 19: 8182-8198.
- [5] 林庆宾. 活血通督汤促进兔脊髓缺血再灌注损伤修复的作用及机制[D]. 福州: 福建中医药大学, 2016.
- [6] 张纪浩. 活血通督汤对脊髓缺血再灌注损伤微环境炎症反应的作用机制研究[D]. 福州: 福建中医药大学, 2015.
- [7] 林庆宾, 张俐. 活血通督汤对脊髓缺血再灌注损伤神经细胞凋亡的影响[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2014, 22(8): 1-3.
- [8] 邵航, 陈芬芳, 张俐. 活血通督汤对坐骨神经损伤后脊髓损伤性反应的作用机制[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2016, 24(6): 1-3.
- [9] Chen WF, Chen CH, Chen NF, et al. Neuroprotective Effects of Direct Intrathecal Administration of Granulocyte Colony-Stimulating Factor in Rats with Spinal Cord Injury[J]. CNS Neurosci Ther, 2015, 21(9): 698-707.
- [10] 徐淑云, 卞如廉, 陈修. 药理实验方法学[M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 226-230.
- [11] Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats[J]. J Neurotrauma, 1995, 12(1): 1-21.

- [12] Reis PA,Carvalho ZM,Tirado Darder JJ,et al. Cross-cultural adaptation of the Quality of Life Index Spinal Cord Injury-Version III[J]. Rev Esc Enferm USP,2015,49(3):403-410.
- [13] Shamim MS, Ali SF, Enam SA. Non-operative management is superior to surgical stabilization in spine injury patients with complete neurological deficits:a perspective study from a developing world country,Pakistan[J]. Surg Neurol Int,2011,2(2):166.
- [14] 蒋涛,任先军. 脊髓损伤修复的相关阻碍因素[J]. 中国组织工程研究,2005,9(22):177-179.
- [15] West H,Richardson WD,Fruttiger M. Stabilization of the retinal vascular network by reciprocal feedback between blood vessels and astrocytes[J]. Development,2005,132(8):1855-1862..
- [16] Faulkner JR,Herrmann JE,Woo MJ,et al. Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury[J]. J Neurosci,2004,24(9):2143-2155.
- [17] Brambilla R,Persaud T,Hu X,et al. Transgenic inhibition of astroglial NF- κ B improves functional outcome in experimental autoimmune encephalomyelitis by suppressing chronic central nervous system inflammation[J]. J Immunol,2009,182(5):2628-2640.
- [18] Tang X,Davies JE,Davies SJ. Changes in distribution,cell associations,and protein expression levels of NG2,neurocan,phosphacan,brevican,versican V2,and tenascin-C during acute to chronic maturation of spinal cord scar tissue[J]. J Neurosci Res,2003,71(3):427-444.
- [19] Asher RA,Morgenstern DA,Moon LD,et al. Chondroitin sulphate proteoglycans:inhibitory components of the glial scar[J]. Prog Brain Res,2001,132:611-619.
- [20] North HA,Pan L,Mcguire TL,et al. β 1-Integrin Alters Ependymal Stem Cell BMP Receptor Localization and Attenuates Astrogliosis after Spinal Cord Injury[J]. J Neurosci,2015,35(9):3725-3733.
- [21] Yamaoka G,Morino T,Morizane K,et al. p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor reduces neurocan production in cultured spinal cord astrocytes[J]. Neuroreport,2012,23(9):546-550.
- [22] Tsai HH,Rowitch DH. Regional astrocyte allocation regulates CNS synaptogenesis and repair[J]. Science,2012,337(6092):358-562.
- [23] 刘晓刚,邓宇斌,蔡辉,等. 控释神经营养因子与细胞移植减少损伤脊髓的胶质瘢痕[J]. 中国组织工程研究,2013,17(42):7427-7434.
- [24] Tang X,Davies JE,Davies SJ. Changes in distribution,cell associations,and protein expression levels of NG2,neurocan,phosphacan,brevican,versican V2,and tenascin-C during acute to chronic maturation of spinal cord scar tissue[J]. J Neurosci Res,2003,71(3):427-444.
- [25] Buss A,Brook GA,Kakulas B,et al. Gradual loss of myelin and formation of an astrocytic scar during Wallerian degeneration in the human spinal cord[J]. Brain,2004,127(1):34-44.
- [26] Wanner IB,Deik A,Torres M,et al. A new in vitro model of the glial scar inhibits axon growth[J]. Glia,2011,56(15):1691-1709.
- [27] 卢培刚,冯华,王宪荣,等. 高压氧预处理对大鼠脊髓损伤后 GFAP 和巢蛋白表达的影响[J]. 中华神经外科疾病研究杂志,2008,7(2):149-153.
- [28] Yick LW,So KF,Cheung PT,et al. Lithium chloride reinforces the regeneration-promoting effect of chondroitinase ABC on rubrospinal neurons after spinal cord injury[J]. J Neurotrauma,2004,21(7):932-943.
- [29] 段艳萍,黄素群,冯林森,等. GAP-43 治疗大鼠完全性脊髓损伤后 GFAP 表达的变化及意义[J]. 神经解剖学杂志,2011,27(6):670-674.
- [30] 黎天尊,晏怡,刘强,等. 细胞凋亡信号调节蛋白 1 对大鼠脊髓损伤后 GFAP,vimentin 表达及后肢运动功能的影响[J]. 南方医科大学学报,2015,35(6):795-800.
- [31] 徐玉生,崔浩,张松,等. miRNA let-7b 修饰的骨髓间充质干细胞移植对大鼠脊髓损伤后脊髓 NF-200、GFAP 表达的影响[J]. 郑州大学学报:医学版,2015,50(3):400-403.
- [32] 卢帆,李典,杨拯,等. 电刺激对脊髓损伤大鼠巢蛋白与 GFAP 表达的影响[J]. 实用骨科杂志,2012,18(1):32-36.
- [33] Dong XH,He XP,Gao WJ. Neuroprotective effects of the Buyang Huanwu decoction on functional recovery in rats following spinal cord injury[J]. J Spinal Cord Med,2016,39(1):85-92.
- [34] Guan HT,Xue XH,Wang XJ,et al. siRNA against survivin coupling with epirubicin enhances to induce breast cancer cell MCF-7 to apoptosis[J]. J Sichuan Univ Med Sci Ed,2006,37(2):221-225.

(收稿日期:2017-02-07)