

小剂量超短波治疗对大鼠脊髓损伤后 VEGF 和 BDNF 的影响*

万峪岑¹ 孙 师¹ 冯智萍¹ 赵利娜¹ 冯思宁¹ 尹艳梅¹ 周禹鑫¹ 张志强¹ 张立新^{1,2}

摘要

目的:观察小剂量超短波治疗对大鼠脊髓损伤后不同时间点的功能恢复、血管内皮生长因子(VEGF)及脑源性神经营养因子(BDNF)表达的影响,并探讨其作用机制。

方法:54只SD大鼠,被随机分成3组:假手术组,暴露硬脊膜后,不予打击,直接缝合;对照组,采用Allen打击法建立大鼠脊髓损伤(spinal cord injury,SCI)模型,不给予任何治疗;超短波组,在SCI后第2天开始给予受损部位小剂量超短波治疗,每日1次,每次7min,治疗至取材前。于造模后第2天,1周、2周、3周、4周采用BBB评分评定大鼠的后肢运动功能,免疫组织化学染色检测VEGF、BDNF的表达,应用图像分析系统进行半定量分析。

结果:BBB评分显示随着损伤时间的延长,脊髓损伤各组大鼠运动功能逐渐改善,与对照组相比,超短波组自术后1周起运动功能明显改善($P<0.01$)。免疫组化染色结果显示术后1周起,对照组、超短波组的VEGF、BDNF阳性表达较假手术组明显增加($P<0.001$),2周时两组的VEGF、BDNF表达均达高峰后逐渐下降,超短波组高峰持续时间均延长。4个时间点超短波组的VEGF表达较对照组明显增加($P<0.01, P<0.05, P<0.01, P<0.001$);1周、4周超短波组的BDNF表达较对照组明显增加($P<0.01, P<0.05$)。

结论:脊髓损伤后超短波治疗可以增加VEGF的表达,改善组织血液循环,延长BDNF蛋白高峰持续时间,促进神经功能恢复。

关键词 脊髓损伤;超短波;血管内皮生长因子;脑源性神经营养因子

中图分类号:R651.2,R493 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2018)-08-0891-05

Effects of low dose ultrashort wave therapy on expression of VEGF and BDNF following spinal cord injury in rats/WAN Yucen,SUN Shi,FENG Zhiping,et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2018, 33(8): 891—895

Abstract

Objective: To investigate the effect of ultrashort wave therapy on the function recovery,the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and brain derived nerve neurotrophic factor (BDNF) after spinal cord injury (SCI) in rats.

Method:Female SD rats($n=54$) were randomly divided into three groups,sham-operated, control group,that were subjected to spinal cord contusion without any treatment,ultrashort wave group, SCI animals exposed to USW radiation 7min at 24h after injury, once per day until the animals were sacrificed. Locomotors functional recovery was assessed 1d and every week post operation period by performing open-field locomotors tests in BBB score,Immunohistochemical staining was performed to observe the expression of the VEGF and BDNF.The image analysis system was used for semi quantitative analysis.

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2018.08.003

*基金项目:国家自然科学基金青年基金资助项目(81101462); 辽宁省自然科学基金项目(201602059);辽宁省科学事业公益研究基金项目(2016003001)

1 中国医科大学附属盛京医院康复中心,辽宁沈阳,110022; 2 通讯作者

作者简介:万峪岑,女,主治医师; 收稿日期:2015-12-18

Result:From 1 week after operation, BBB scores of ultrashort wave group were higher than control group ($P<0.01$), Immunohistochemical staining showed that 1w post operation, VEGF and BDNF positive expression of control group and ultrashort wave group compared with the sham-operated group was significantly increased ($P<0.001$), the expression of VEGF and BDNF in the two groups reached the peak at 2w and were gradually decreased, the peak durations of ultrashort wave group was prolonged. Compared with the control group, VEGF positive expression of ultrashort wave group were significantly increased at each time point ($P<0.01, P<0.05, P<0.01, P<0.001$), BDNF positive expression of ultrashort wave group were significantly increased at 1w and 4w ($P<0.01, P<0.05$).

Conclusion:Ultrashort wave therapy can increase the expression of VEGF after SCI, improve the blood circulation of organization, prolong the peak duration of BDNF, promote the recovery of neurological function.

Author's address Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang, Liaoning, 110022

Key word spinal cord injury; ultrashort wave; vascular endothelial growth factor; brain-derived neurotrophic factor

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)是一种高发的中枢神经系统创伤性疾病,致残率和致死率很高。脊髓损伤后的病理变化过程可分为原发性损伤和继发性损伤。机械性创伤引起组织坏死、水肿、出血和血管痉挛,导致局部的血流减少及水肿发生。继发性产生二级病理生理反应包括缺血、凋亡、水及电解质紊乱、脂质过氧化、自由基产生、兴奋性神经递质毒性作用及炎症反应等。临床上,超短波(ultrashort wave)应用极为广泛,小剂量的超短波治疗可扩张血管,改善血液循环及组织营养,加强局部组织代谢,达到消炎、减轻水肿的目的^[1],但机制不明确。在前期实验中我们已观察到,小剂量超短波可显著地减轻坐骨神经损伤后的肌肉萎缩程度,提高神经传导速度^[2]。因此,本实验旨在观察超短波对大鼠脊髓损伤后血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)及脑源性神经营养因子(brain derived nerve neurotrophic factor, BDNF)表达影响,为超短波的治疗作用提供可能的理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物、试剂及仪器设备

8—10周龄清洁级SD大鼠(中国医科大学附属盛京医院中心实验室提供),兔抗大鼠VEGF多克隆抗体(Abcam),兔抗大鼠BDNF多克隆抗体(Santa),SABC试剂(北京博奥森生物技术有限公司)及DAB显色剂(福州迈新生物技术开发有限公司),石蜡切片机(LEICA RM2245),显微图像成像系统(LEI-

CA DMD108),光学显微镜(Olympus BS-60),五官超短波治疗机(上海医用设备厂,频率为40.68 MHz,最大输出功率为40W)。

1.2 方法

1.2.1 脊髓损伤动物模型的制备:取8—10周龄雌性SD大鼠,体重180—250g,用10%水合氯醛腹腔麻醉(0.33ml/100g)大鼠,无菌条件下在T9—T11平面打开椎管,暴露T10节段脊髓,采用改良Allen法^[3]制作脊髓损伤模型,打击强度为10cm高度、10g重量自由落体打击,大鼠立即出现一过性鼠尾摆动和后肢痉挛视为造模成功,苏醒后评分为0—1分。术后伤口局部青霉素冲洗防止感染,清醒后分笼饲养,自由饮水、进食。术后3天每天给大鼠腹腔注射青霉素8万单位,每日早晚排尿2次,直至建立正常的排尿反射。术后观察大鼠切口愈合情况,保持身体干燥,预防泌尿系感染及压疮等并发症。苏醒后评分过高及死亡者,剔除并及时补充样本量。

1.2.2 分组及干预方法:假手术组6只,模型鼠48只随机分成对照组和USW组的1—4周组,每组6只。假手术组仅单纯咬除椎板,脊髓无损伤;对照组为造成脊髓损伤,不给予治疗;超短波组损伤后24h开始进行损伤部位小剂量超短波治疗,将大鼠固定于直径适合的塑料容器内,直径为4cm的圆形电极板(五官超短波机的标准二号极板)对置于塑料容器两侧,电极板与脊髓皮肤间隙2cm,调谐后第1档输出,每日1次,每次7min,直至取材前一天。

1.2.3 取材:SCI后1—4周,10%水合氯醛腹腔麻

醉,仰卧位暴露两肺和心脏,首先以4℃预冷的生理盐水约250ml经心脏-主动脉灌注,肝脏颜色变浅,更换4℃预冷的4%多聚甲醛固定液约200ml心脏灌注至大鼠四肢震颤,四肢僵硬,停止灌注。解剖并暴露脊髓,取以T10损伤处为中心向头尾端共1cm的脊髓,置于4%多聚甲醛PBS溶液的标本储存瓶中4℃固定24h,石蜡包埋,沿脊髓长轴纵向连续切片,片厚3μm。

1.3 观察指标

1.3.1 BBB评分:术后第2天及1、2、3、4周对模型鼠进行BBB行为学评分,评分采用双人双盲法,观察时间为4min。0分为全瘫,21分为正常大鼠。

1.3.2 免疫组化VEGF、BDNF分析:每个脊髓组织标本切片选取10张,常规脱蜡,高压抗原修复,3% H₂O₂溶液中孵育,10%胎牛血清封闭,分别滴加兔抗大鼠VEGF多克隆抗体(1:800,Abcam),兔抗大鼠BDNF多克隆抗体(1:100,Santa),4℃过夜,阴性对照用PBS代替一抗;PBS冲洗,分别滴加SABC试剂(北京博奥森生物技术有限公司),具体染色步骤按照试剂盒说明执行,DAB显色,苏木素复染,透明封片。使用显微图像成像系统(LEICA DMD108)对每张切片进行拍照,每张切片随机选取4个视野。采用Image-Pro Plus 6.0软件进行图像处理,行VEGF、BDNF阳性细胞计数。

1.4 统计学分析

采用GraphPad Prism 5.0统计软件进行双因素方差分析,如有显著性意义则进一步做Bonferroni检验,进行两两比较, $P<0.05$ 为有显著性差异。

2 结果

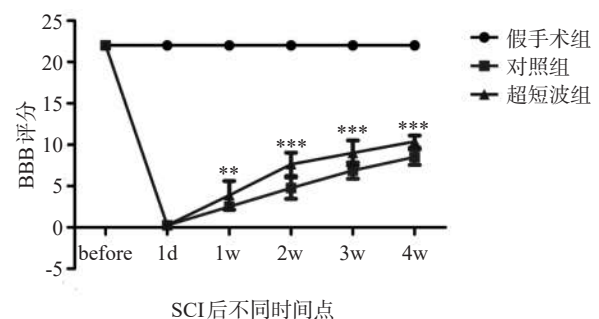
2.1 造模结果

大鼠麻醉后行SCI手术操作,术后约1—2h后清醒,大鼠双下肢瘫痪,二便障碍,行动迟缓,进食水情况较差,术后1天BBB评分为0—1分,说明完成重度脊髓损伤模型。实验期间共死亡7只大鼠,假手术组因手术误伤导致下肢轻瘫痪排除1只大鼠。对照组因麻醉过量死亡2只,因泌尿系感染死亡4只;超短波组因麻醉过量死亡1只。其余大鼠均存活至取材,各组死亡及排除大鼠于实验中随时补齐。

2.2 大鼠行为学评估

正常大鼠BBB评分为21分,假手术组对大鼠脊髓功能无影响。对照组及超短波组术后1天评分为0—1分,随着时间的延长,功能逐渐恢复,术后1—4周,与对照组相比,超短波组评分显著提高($P<0.01$, $P<0.001$, $P<0.001$, $P<0.001$),见图1。

图1 SCI后1—4周各组BBB评分



** $P<0.01$,*** $P<0.001$; $t_{1w}=3.368$, $t_{2w}=7.042$, $t_{3w}=5.205$, $t_{4w}=4.593$

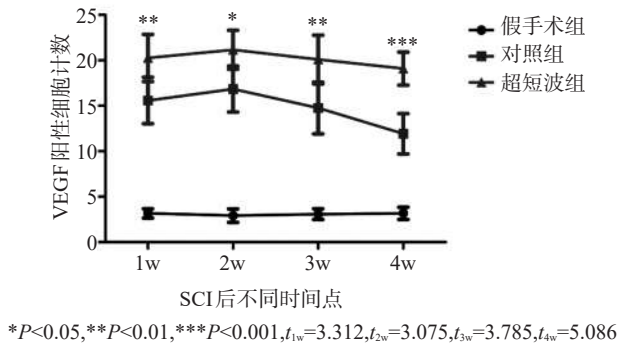
2.3 免疫组织化学染色

2.3.1 病理学观察:在脊髓组织纵行切片中观察VEGF及BDNF的表达情况。假手术组的VEGF、BDNF阳性细胞数量较少。SCI后1周,VEGF在血管内皮细胞,脊髓灰、白质的神经胶质细胞,脊髓前角运动神经元细胞,脊髓后角的中、小神经元细胞内呈强阳性表达。2周时,神经元细胞及灰质内胶质细胞阳性表达减少,3周时VEGF主要表达于血管内皮细胞及白质的胶质细胞内。SCI后BDNF在脊髓前角运动神经元及白质的一些胶质细胞内呈阳性表达,阳性细胞为胞浆和突起染色。VEGF及BDNF在损伤区周围分布较密集,远离损伤区的阳性细胞密度逐渐减低。

2.3.2 各时间点VEGF免疫组化染色及阳性细胞数:术后1周起,对照组、超短波组的VEGF阳性细胞数较假手术组明显增加($P<0.001$),2周时两组的VEGF表达达高峰后逐渐下降,各个时间点超短波组的VEGF表达较对照组明显增加,且2周以后两组显著性意义逐渐增大($P<0.01$, $P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.001$);超短波组VEGF高峰持续时间延长。见图2—3。

2.3.3 各时间点BDNF免疫组化染色及阳性细胞数:术后1周起,对照组、超短波组的BDNF阳性细胞数较假手术组明显增加($P<0.001$),2周时两组的

图2 SCI后1—4w各组VEGF阳性细胞数及变化趋势



BDNF表达均达高峰后逐渐下降,1周超短波组的BDNF表达较对照组明显增加($P<0.01$);2周时超短波组的BDNF表达与对照组相比无明显增加;3周起超短波组BDNF表达较对照组有增加趋势($P>0.05$),4周时两组比较的差异趋势更为明显($P<0.05$),超短波组BDNF高峰持续时间均延长。见图4—5。

3 讨论

SCI后损伤处及损伤周围的脊髓节段血流量均有明显减少,形成病灶周围的脊髓缺血区^[4],引发损

图3 SCI后1—4w各组VEGF的免疫组化染色图片

($\times 400$)

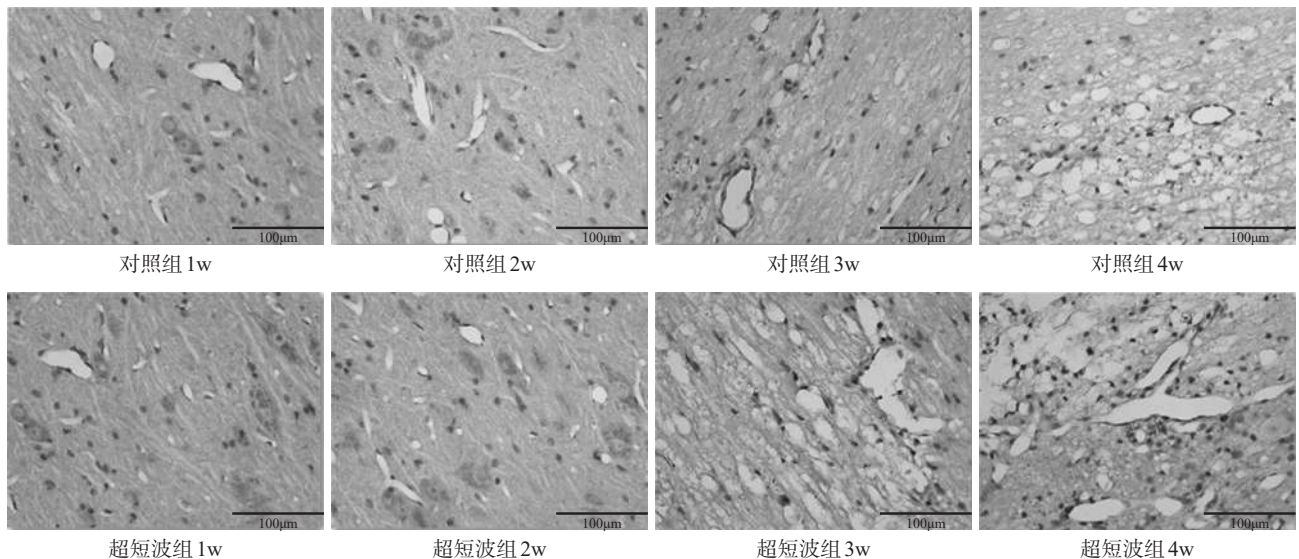
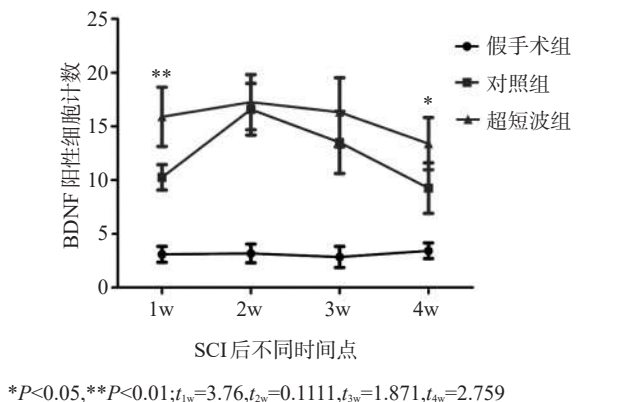


图4 SCI后1—4w各组BDNF阳性细胞数及变化趋势

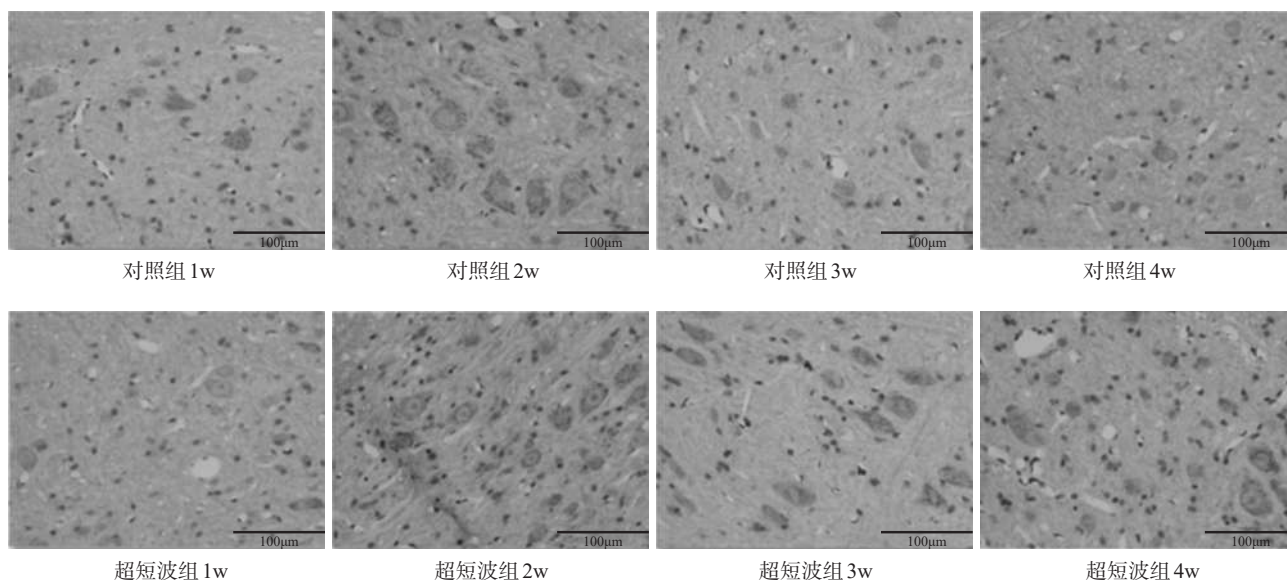


伤-正常交界脊髓坏死面积增大。缺血缺氧是诱导血管新生因子释放的最主要因素^[5]。VEGF是目前发现的功能最强的血管生成促进因子,能直接作用于血管内皮细胞,刺激血管内皮细胞的增殖和迁移,促进神经滋养动脉形成。VEGF还是一种独立的神经保护因子,抑制神经元的凋亡,促进神经轴突再生^[6-7]和重塑^[8]。des Rieux A等^[9]注射式水凝胶支架缓释VEGF植入脊髓半切模型大鼠体内,4周后发现血管再生及神经突再生增加,适当的提高VEGF的表达,延长VEGF表达时间有助于减轻缺血缺氧对脊髓损伤的继发性损伤,保护缺血区域的神经元细胞。

脊髓损伤后局部的神经细胞、少突胶质细胞等

图5 SCI后1-4w各组BDNF的免疫组化染色图片

(×400)



死亡,以及神经传导纤维断裂、脱髓鞘等,造成了神经功能的缺失;脊髓损伤后再生困难大多归因于局部微环境的改变,例如神经营养因子的缺乏及生长抑制因子的存在。脊髓的伤害性感受诱导BDNF释放,BDNF是神经营养素家族中活性很强,含量丰富,能提高受损脊髓运动和感觉神经元的存活,并能促进神经元的修复和轴突生长^[10]。另外,BDNF还可以通过调节突触传递及其可塑性以刺激神经元的轴突和树突出芽^[11]。Ji等^[12]发现BDNF可促进巨噬细胞向M2型极化,抑制小鼠脊髓损伤后炎症反应。

超短波属于高频电治疗范围,目前广泛应用于物理治疗中。高频电对生物体的作用可能与热和非热效应有关。高频电治疗时,偶极子在高频电场中急剧振荡和旋转,与周围媒介发生摩擦产生“内源性热”。产热深度可达深部肌肉和骨,产热均匀且可控。超短波可调节血管内皮细胞NO的合成和释放^[13]可以引起小动脉及毛细血管扩张^[14],血流速度加快,血管再生增加。小剂量超短波治疗时,其非热效应机制尚不明确。前期试验中我们已证实超短波治疗可以改善脊髓损伤早期水肿,控制急性炎症范围,减少正常临界神经组织的破坏。

本实验中,对照组的VEGF、BDNF表达较假手术组明显增加,说明脊髓损伤后其内环境改变本身可诱导两者的分泌,但由于持续时间较短,对功能恢

复发挥作用不充分;各个时间点超短波组的VEGF表达较对照组明显增加($P<0.01, P<0.05, P<0.01, P<0.001$),于4周时两组的差异趋势最大。1周、3周、4周超短波组的BDNF表达较对照组增加($P<0.01, P>0.05, P<0.05$),这与我们前期试验中,超短波可以增加坐骨神经相应脊髓内VEGF mRNA表达、延长BDNF蛋白高峰持续时间的结果一致^[1-2,15]。超短波治疗可以提高受损脊髓中各时间点VEGF的表达总量,延长VEGF的高峰持续时间,这证实了超短波提高血管密度、改善微循环的作用,与前期试验中推测超短波改善急性炎症、消除水肿的作用机制吻合;并可能通过VEGF的独立机制发挥保护神经细胞作用。实验中超短波组早期BDNF的表达明显增加,但2周时BDNF分泌高峰值并未明显提高,至3周起超短波明显延长BDNF表达的高峰持续时间,提示超短波可能因提高血管密度、扩张血管作用而延长神经营养因子的供给量,挽救缺血缺氧的神经元,促进神经功能恢复。结合大鼠的BBB行为学检测可见,超短波治疗可从1周起改善大鼠下肢运动功能,且效果明显直至4周,提示早期超短波即可有明显的治疗作用,具体的作用机制不单纯与促进大鼠脊髓BDNF及VEGF表达有关,还存在其他的机制。下一步实验中,我们计划用多种方式验证超短波的

(下转第909页)