

# 珍宝丸联合电针对急性脊髓损伤大鼠行为学和 BrdU、Nestin、GFAP 表达的影响

赖增娇<sup>1</sup>, 滕秀英<sup>2\*</sup>, 刘国斌<sup>3</sup>

(1. 内蒙古民族大学附属医院, 内蒙古 通辽 028000; 2. 黑龙江中医药大学附属第二医院, 黑龙江 哈尔滨 150001; 3. 内蒙古通辽市科尔沁区第一人民医院, 内蒙古 通辽 028000)

**摘要:** **目的** 探讨珍宝丸联合电针对急性脊髓损伤大鼠行为学和 BrdU、Nestin、GFAP 表达的影响。**方法** 建立急性脊髓损伤模型, SD 成年大鼠随机分为正常对照组、模型组、丸剂组 (0.54 g/kg)、电针组和联合组。丸剂组予以蒙药珍宝丸 (0.54 g/kg) 治疗, 电针组予以电针干预, 联合组予以蒙药珍宝丸联合电针治疗, 共 1 周。以 BBB 量表评价治疗前后大鼠行为学变化, HE 染色、TUNLE 染色分别观察损伤脊髓组织的病理变化、细胞凋亡率, 免疫荧光染色检测 vWF 阳性血管数目, Western blot、RT-PCR 检测损伤脊髓组织 BrdU、Nestin、GFAP 蛋白及 mRNA 表达。**结果** 治疗后, 与正常对照组比较, 模型组 BBB 评分下降 ( $P < 0.01$ ), 损伤脊髓组织分级升高 ( $P < 0.05$ ), 凋亡率增加 ( $P < 0.01$ ), vWF 阳性血管数目增多 ( $P < 0.01$ ), BrdU、Nestin、GFAP 蛋白及 mRNA 表达增加 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 丸剂组、电针组和联合组 BBB 评分升高 ( $P < 0.01$ ), 损伤脊髓组织分级降低 ( $P < 0.05$ ), 凋亡率降低 ( $P < 0.01$ ), vWF 阳性血管数目增多 ( $P < 0.01$ ), BrdU、Nestin、GFAP 蛋白及 mRNA 表达增加 ( $P < 0.01$ ), 且联合组效果更佳。**结论** 蒙药珍宝丸、电针治疗急性脊髓损伤大鼠均可改善其行为学、减轻病理变化、促进新生血管形成, 二者联用的效果更佳, 且推测很可能与上调损伤脊髓组织的 BrdU、Nestin、GFAP 表达有关。

**关键词:** 蒙药珍宝丸; 电针; 急性脊髓损伤

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2020)11-2883-07

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2020.11.011

## Effects of Zhenbao Pills combined with electroacupuncture on ethology and expressions of BrdU, nestin and GFAP in rats with acute spinal cord injury

LAI Zeng-jiao<sup>1</sup>, TENG Xiu-ying<sup>2\*</sup>, LIU Guo-bin<sup>3</sup>

(1. The Hospital Affiliated to Inner Mongolia University for the Nationalities, Tongliao 028000, China; 2. The Second Hospital Affiliated to Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150001, China; 3. The First People's Hospital of Korqin District, Tongliao City, Inner Mongolia, Tongliao 028000, China)

**ABSTRACT: AIM** To explore the effects of Zhenbao Pills combined with electroacupuncture on ethology and expressions of BrdU, nestin and GFAP in rats with acute spinal cord injury. **METHODS** Adult SD rats were randomly divided into normal control group, model group, Zhenbao Pills group (0.54 g/kg), electroacupuncture group, and combination group with use of both Zhenbao Pills and electroacupuncture, and acute spinal cord injury model was established as well. Each group underwent one week corresponding administration. The rats were subjected to evaluation of their behavioral changes before and after treatment by BBB scale, the observation of pathological changes and apoptosis rate of spinal cord injury tissues by HE staining and TUNLE staining, the detection of number of vWF positive blood vessels by immunofluorescence staining, and determination of the protein and mRNA expressions of BrdU, Nestin and GFAP in spinal cord injury tissues by Western blot and RT-PCR.

收稿日期: 2019-12-16

基金项目: 内蒙古自然科学基金 (2018LH08061); 内蒙古自治区卫生和计划生育委员会医疗卫生科研计划项目 (201303104)

作者简介: 赖增娇 (1981—), 女, 硕士, 主治医师, 从事神经系统疾病临床和基础研究。Tel: 15047564610, E-mail: doctor-ac@tom.com

\* 通信作者: 滕秀英 (1966—), 博士, 主任医师, 从事针灸治疗脑血管疾病研究。E-mail: Xiuyingteng2006@163.com

**RESULTS** After treatment, compared with the normal control group, the model group was observed with decreased BBB score ( $P < 0.01$ ), higher grade of injured spinal cord tissue ( $P < 0.05$ ), increased apoptosis rate ( $P < 0.01$ ), increased number of vWF positive blood vessels ( $P < 0.01$ ), increased BrdU, Nestin, GFAP protein and mRNA expression ( $P < 0.01$ ). Compared with the model group, Zhenbao Pills group, electroacupuncture group and the combinative intervention group shared increased BBB scores ( $P < 0.01$ ), lower grade of spinal cord injury tissue ( $P < 0.05$ ), decreased apoptosis rate ( $P < 0.01$ ), increased number of vWF positive blood vessels ( $P < 0.01$ ), increased protein and mRNA expressions of BrdU, Nestin, GFAP ( $P < 0.01$ ), and the combinative intervention group took the lead. **CONCLUSION** Upon rats with acute spinal cord injury, the combinative use of Zhenbao Pills and electroacupuncture can improve their ethology, and alleviate the pathological changes in terms of formation promotion of new blood vessels. It is suggested that this intervention may be associated with the up regulation of BrdU, nestin and GFAP expressions in spinal cord injury tissue.

**KEY WORDS:** Zhenbao Pills; electroacupuncture; acute spinal cord injury

急性脊髓损伤是临床常见的急重症,多发生于交通事故、高处坠落等事故中,可影响肢体功能,甚至可导致瘫痪。调查<sup>[1]</sup>显示,全球急性脊髓损伤的发病率约为每百万人中有3.6~195例,且该病的发生率仍逐渐增长,由此所致的肢体运动障碍和死亡人数也越来越多,已引起高度重视。目前临床上对此类患者多采用减压手术或营养脊髓神经、促脊髓神经生长等保守治疗,有一定疗效,但仍存在较大的提升空间。蒙药珍宝丸具有安神活络、清热凉血等功效,在既往研究中被证实对急性脊髓损伤具有辅助治疗作用<sup>[2]</sup>,可改善患者的康复效果,且在动物实验中也证实该药物可改善急性脊髓损伤大鼠模型的行为学<sup>[3]</sup>。电针是基于经络学说的一种脉冲电刺激疗法,可改善血流、增强损伤的脊髓神经的自我修复功能,还可改善患者的运动功能<sup>[4]</sup>。有研究<sup>[5-7]</sup>提示,5-溴-2-脱氧尿嘧啶核苷(BrdU)、巢蛋白(Nestin)、胶质纤维酸性蛋白(GFAP)表达是脊髓神经细胞生长、增殖和分化的重要参考指标,在急性脊髓损伤后上述指标表达均有所升高以促进脊髓神经细胞的生长、增殖和分化,加快损伤组织修复,已被作为急性脊髓损伤的治疗靶点应用于动物实验中<sup>[8]</sup>。为尝试探讨增疗效的方案,本研究特尝试将蒙药珍宝丸与电针联用治疗急性脊髓损伤大鼠,并观察其效果,探讨对脊髓损伤组织BrdU、Nestin、GFAP表达的影响。

## 1 材料

1.1 动物 45只成年SD大鼠,雌雄各半,无特定病原体(SPF)级,10周龄,体质量180~230g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,生产许可证号SCXK(京)2018-0001。

1.2 药物与试剂 蒙药珍宝丸(内蒙古蒙药股份

有限公司,国药准字Z1502410,规格6g/丸,批号171205003);苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(碧云天生物技术研究,批号1706135A);末端脱氧核苷酸转移酶介导的生物素脱氧尿嘧啶核苷酸缺口末端标记(TUNEL)染色试剂盒(美国Roche公司,批号1710178);兔抗鼠血管性血友病因子(vWF)、BrdU、Nestin、GFAP单克隆抗体和山羊抗兔vWF、BrdU、Nestin、GFAP多克隆抗体(辣根过氧化物酶标记)(美国Abcam公司,批号1710115002、1711125001、1711017010、1710018007、1710014007、1712017008、1712151002、1711019004);RNAiso Plus提取试剂盒(大连宝生物工程有限公司,批号1710145001);BrdU、Nestin、GFAP、内参( $\beta$ -actin)引物委托深圳晶美生物技术有限公司合成;蛋白定量试剂盒(北京普利莱基因技术有限公司,批号170812)。

1.3 仪器 G-6805型电针治疗仪(北京科苑达医疗器械有限公司);不锈钢打击杆(天津州杰科技发展有限公司定制);Magnetion(德国西门子公司);CH20 BIM型光学显微镜、BX63型荧光显微镜(日本Olympus公司);7500型聚合酶链反应(PCR)仪(美国ABI公司);Allegra X-15R型低温高速离心机(美国Beckman公司);Mini-PROTEAN Tetra Cell型蛋白质凝胶电泳仪(美国Bio-Rad公司);凝胶系统成像分析软件(美国Alpha公司)。

## 2 方法

2.1 造模及分组 取45只SD成年大鼠随机分为正常对照组、模型组、丸剂组、电针组、联合组。以水合氯醛腹腔注射麻醉,仰卧位固定大鼠于手术台上,常规术前准备,沿着T7~T11椎体中线做纵

行切口，切开 2 cm，逐层切开皮肤和椎旁肌肉，注意避免损伤血管，接着切除 T8~T10 棘突和椎板，冲洗伤口后压迫止血。取 10 cm 不锈钢打击杆垂直下降击打暴露脊髓中心的位置，注意每只大鼠建模时打击高度需一致，均为 10 cm，打击物质量为 10 g。建模后出现痉挛性摆尾反射，双后肢回缩性扑动，迟缓性瘫痪<sup>[9]</sup>，即为造模成功。与此同时，正常对照组仅暴露脊髓，无击打操作。

2.2 治疗 丸剂组予以蒙药珍宝丸治疗，取蒙药珍宝丸以开水浸泡，制作悬液，剂量 0.54 g/kg，溶于 1 mL/100 g 大鼠体质量的温开水中灌胃，于术后 23 h 予以治疗，此后每间隔 24 h 给药 1 次，共 1 周；电针组予以电针干预，选取大椎穴（位于第 7 颈椎和第 1 胸椎间背部正中）、命门穴（位于第 2 腰椎棘突下），大椎穴向下斜刺、命门穴向上斜刺，分别接入阳极、阴极，持续脉冲电流刺激，于术后 23 h 予以治疗，针刺 30 min，留针 30 min，此后每间隔 24 h 治疗 1 次，共 1 周；联合组予以蒙药珍宝丸联合电针治疗，具体方法分别同丸剂组、电针组。

2.3 治疗前后行为学 分别于治疗前（确认建模成功后，正常对照组同一时刻）、治疗后采用后肢运动功能评分（Basso Beattie Bresnahan, BBB）量表评价<sup>[10]</sup>，评分范围为 0~21 分，0 分表示后肢完全无活动，21 分表示后肢活动完全正常，运动功能评分量表评分越高认为行为学越佳，每只大鼠均评价 3 次，每 2 次时间间隔至少 5 min，求平均值。

2.4 治疗后损伤脊髓组织病理变化和脊髓细胞凋亡率 采用 HE 染色法观察损伤脊髓组织病理变化，采用 TUNEL 法检测脊髓细胞凋亡率。常规腹腔麻醉，取 T11~T13 段损伤部位的脊髓组织，留取样本，保存于 -80 °C 的超低温冰箱中。取 1 mg

组织固定、冲洗、脱水，二甲苯透明处理后石蜡包埋，制作石蜡切片，层厚 4 μm，严格按照 HE 染色法试剂盒操作，最后以中性树胶封固，于光学显微镜下观察病理变化。将无明显神经细胞损伤划为 0 级，将有散在、轻微神经细胞损伤划为 1 级，将有片状神经细胞损伤划为 2 级，将有严重神经细胞损伤划为 3 级。同法取组织制作石蜡切片，严格按照 TUNEL 检测试剂盒操作，于光学显微镜下随机取 5 个不重复的视野计算阳性染色细胞率，即为脊髓细胞凋亡率。

2.5 治疗后损伤区域血管生成 采用免疫荧光染色法检测。取待检测组织，脱水包埋，液氮速冻，切片后平铺于防脱载玻片上。室温下干燥，于摇床上振摇清洗 3 次，5 min/次，透膜后采用 PBS 清洗 3 次，5 min/次。加入 2 mol/L 盐酸溶液，孵育 30 min、37 °C。加入 0.1 mmol/L 硼酸钠溶液，中和反应 10 min，采用 PBS 清洗 3 次，5 min/次。以 10% 浓度小牛血清蛋白封闭，加入一抗（兔抗鼠 vWF 单克隆抗体），湿盒孵育，4 °C 过夜，PBS 清洗后加入二抗（辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 vWF 多克隆抗体），湿盒孵育，37 °C、1 h，PBS 清洗。吹干，封片，4 °C 避光，干燥后以荧光显微镜采集图像，统计 vWF 阳性血管数目。

2.6 损伤脊髓组织 *BrdU*、*Nestin*、*GFAP* mRNA 表达 采用逆转录实时荧光定量 PCR 检测。同法取组织，采用 RNAiso Plus 提取总 RNA，配置反应体系，共 10 μL，逆转录合成 cDNA。以 β-actin 为内参，取待检测基因的上下游引物配置反应体系，共 25 μL，实施 PCR 反应，反应体系为 95 °C 预变性 30 s，95 °C（5 s）、60 °C（30 s），共 40 个循环，最后 55 °C（90 s）。对扩增产物实施凝胶电泳验证，并绘制溶解曲线，采用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法计算目的基因的相对表达量。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Tab. 1 Primer sequences

基因名称	引物序列	长度/bp
<i>BrdU</i>	正向 5'-ATCGGAGATCGAGAGACTAGACTAGATCAG-3'	20
	反向 5'-TCGATAGAGAGAGCTAGAGATCGATAGCGCG-3'	20
<i>Nestin</i>	正向 5'-TAGCTAGAGAGAGCGGCTCGCTCGATAGAT-3'	20
	反向 5'-CTGAGACTCGGATAGCTGCCATAGGCTAGC-3'	20
<i>GFAP</i>	正向 5'-AGCTCGCTAGATCGCGCGGATAGAGCTACG-3'	20
	反向 5'-TCGCTAGATCTCGATATATGCTCAGAGCTAGA-3'	20
<i>β-actin</i>	正向 5'-AGCCTCGCTCTCGGCTAGAAGCTAGAGCTA-3'	20
	反向 5'-GTCGCGGATAGAGCTCGGCTAGAGAGCTCGG-3'	20

2.7 损伤脊髓组织 *BrdU*、*Nestin*、*GFAP* 蛋白表达 采用 Western blot 法检测。取组织，液氮冷冻，

加入经过预冷处理的裂解液，冰上快速匀浆并裂解 1 h。将产物离心分析，并进行蛋白变性、电泳、

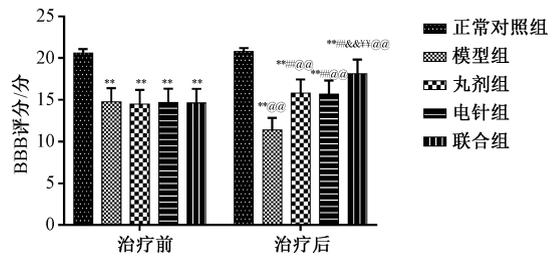
转膜、标记处理。加入一抗 (1 : 1 000), 湿盒孵育, 4 ℃ 过夜, PBS 冲洗 3 次, 5 min/次; 加入二抗 (1 : 5 000), 室温孵育 1 h, PBS 冲洗 3 次, 5 min/次。计算目的蛋白的相对表达量。

2.8 统计学分析 采用 SPSS 25.0 软件进行统计学分析, 计量资料以 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 SNK-*q* 检验, 配对 *t* 检验检测本组内治疗前后资料。检验标准为  $\alpha = 0.05$ 。

### 3 结果

3.1 治疗前后各组行为学 40 只建模大鼠中共有 33 只建模成功, 7 只死亡, 推测由于脊髓损伤过重所致, 建模成功率为 82.50% (33/40), 将建模成功大鼠随机分为模型组 (8 只)、丸剂组 (8 只)、电针组 (9 只)、联合组 (8 只)。治疗前模型组 BBB 评分低于正常对照组 ( $P < 0.01$ ), 丸剂组、电针组、联合组均与模型组相近 ( $P > 0.05$ ), 治疗后模型组 BBB 评分较治疗前下降 ( $P < 0.01$ ), 丸剂组、电针组、联合组 BBB 评分均较治疗前升高 ( $P < 0.01$ ); 治疗后组间 BBS 评分比较, 模型组低于正常对照组 ( $P < 0.01$ ), 丸剂组、电针组、联合组均高于模型组 ( $P < 0.01$ ), 联合组高于丸剂组、电针组 ( $P < 0.01$ )。见图 1。

3.2 治疗后各组损伤脊髓组织病理变化和脊髓细胞凋亡率 正常对照组大鼠神经元细胞结构完整、

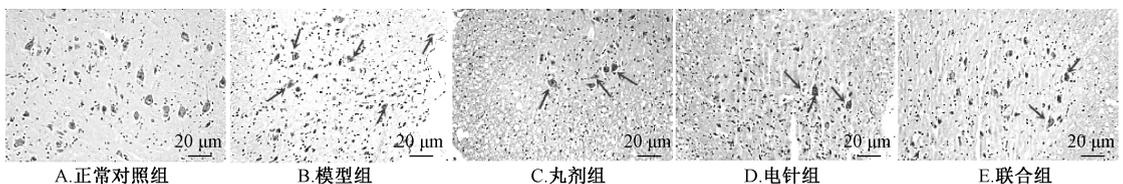


注: 与本组治疗前比较, @ $P < 0.01$ ; 与同时刻正常对照组比较, \*\* $P < 0.01$ ; 与同时刻模型组比较, ## $P < 0.01$ ; 与同时刻丸剂组比较, &# $P < 0.01$ ; 与同时刻电针组比较, &# $P < 0.01$ 。

图 1 治疗前后各组行为学

Fig. 1 Behavior of each group before and after treatment

形态正常, 灰质未见弥漫性水肿; 模型组可见脊髓灰质有大量、较大空泡形成, 脊髓组织的正常结构被破坏, 白质中可见神经胶质细胞大量增生, 受损的脊髓白质区域内可见严重微囊性病变, 且神经元细胞可见严重的崩解、核碎裂表现, 大量炎性细胞浸润; 丸剂组和电针组可见脊髓灰质有部分、大空泡形成, 白质可见神经胶质细胞增生, 受损的脊髓白质区域内可见微囊性病变, 且部分神经元细胞可见崩解、核碎裂表现, 部分炎性细胞浸润; 联合组可见脊髓灰质少量、大空泡形成, 白质可见较少神经胶质细胞增生, 受损的脊髓白质区域内可见较少微囊性病变, 较少神经元细胞可见崩解、核碎裂表现, 少量炎性细胞浸润。见图 2。



注: 图中箭头所示为损伤神经细胞。

图 2 各组损伤脊髓组织病理变化 (HE,  $\times 40$ )

Fig. 2 Pathological changes of spinal cord injury tissue in each group (HE,  $\times 40$ )

治疗后模型组损伤脊髓组织分级高于正常对照组 ( $P < 0.05$ ), 丸剂组、电针组和联合组均低于模型组 ( $P < 0.05$ ), 且联合组低于丸剂组、电针组 ( $P < 0.05$ )。见表 2。

治疗后模型组损伤脊髓细胞凋亡率高于正常对照组 ( $P < 0.01$ ), 丸剂组、电针组和联合组损伤脊髓细胞凋亡率均低于模型组 ( $P < 0.01$ ), 且联合组损伤脊髓细胞凋亡率低于丸剂组、电针组 ( $P < 0.01$ )。见图 3。

3.3 治疗后损伤区域血管生成 治疗后模型组 vWF 阳性血管数目多于正常对照组 ( $P < 0.01$ ),

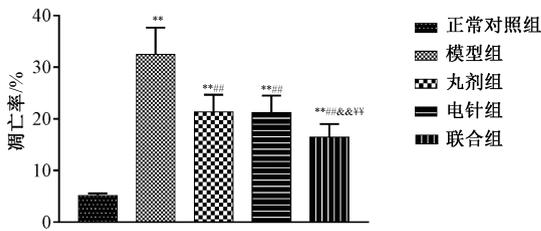
表 2 各组损伤脊髓组织病理分级 ( $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 2 Pathological grade of spinal cord injury tissue in each group ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	动物数/只	分级
正常对照组	5	0.40 ± 0.49
模型组	8	2.75 ± 0.43 *
丸剂组	8	1.88 ± 0.33 #
电针组	9	1.89 ± 0.31 #
联合组	8	1.13 ± 0.33 #&# $\forall$

注: 与正常对照组比较, \* $P < 0.05$ ; 与模型组比较, # $P < 0.05$ ; 与丸剂组比较, &# $P < 0.05$ ; 与电针组比较,  $\forall P < 0.05$ 。

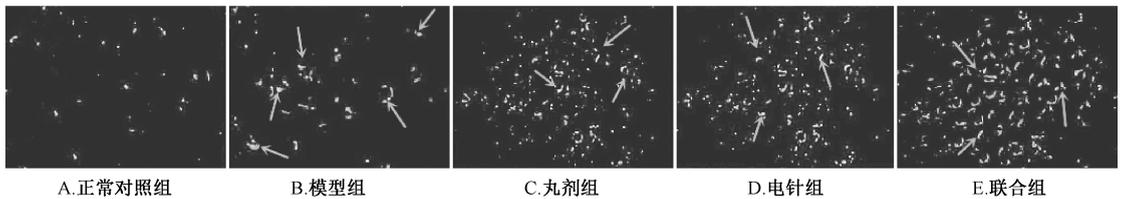
丸剂组、电针组和联合组 vWF 阳性血管数目均多于模型组 ( $P < 0.01$ ), 且联合组 vWF 阳性血管数



注：与正常对照组比较，\*\*  $P < 0.01$ ；与模型组比较，<sup>##</sup>  $P < 0.01$ ；与丸剂组比较，<sup>&&</sup>  $P < 0.01$ ；与电针组比较，<sup>∇∇</sup>  $P < 0.01$ 。

图3 各组治疗后损伤脊髓细胞凋亡率

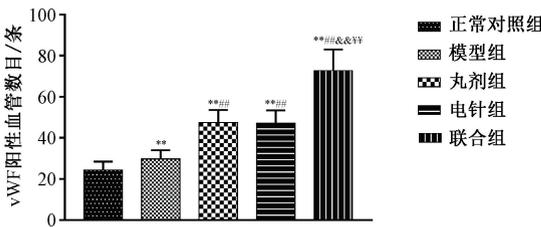
Fig. 3 Post-treatment apoptosis rates of spinal cord injury tissue cells in each group



注：图中箭头所示为vWF阳性血管。

图4 vWF阳性血管数目(免疫荧光染色, ×100)

Fig. 4 Number of vWF positive blood vessel (immunofluorescence staining, ×100)



注：与正常对照组比较，\*\*  $P < 0.01$ ；与模型组比较，<sup>##</sup>  $P < 0.01$ ；与丸剂组比较，<sup>&&</sup>  $P < 0.01$ ；与电针组比较，<sup>∇∇</sup>  $P < 0.01$ 。

图5 各组治疗后vWF阳性血管数目

Fig. 5 Post-treatment number of vWF positive vessels in each group

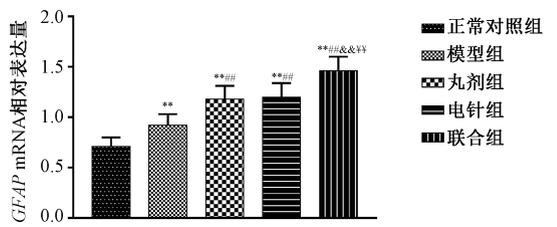
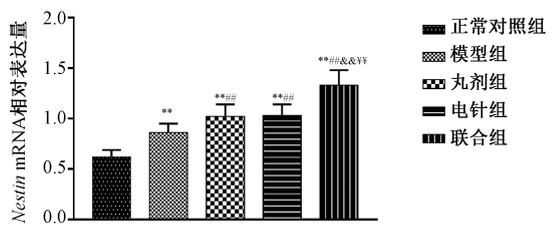
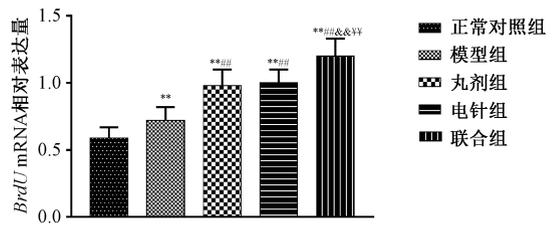
3.5 治疗后各组损伤脊髓组织 BrdU、Nestin、GFAP 蛋白表达 治疗后模型组损伤脊髓组织 BrdU、Nestin、GFAP 蛋白表达均高于正常对照组 ( $P < 0.01$ )，丸剂组、电针组和联合组损伤脊髓组织 BrdU、Nestin、GFAP 蛋白表达均高于模型组 ( $P < 0.01$ )，且联合组损伤脊髓组织 BrdU、Nestin、GFAP 蛋白表达均高于丸剂组、电针组 ( $P < 0.01$ )。见图7~8。

#### 4 讨论

急性脊髓损伤后，局部神经细胞会出现某些病理变化，如新血管生成、干细胞被激发并向损伤部位迁移等，可以为损伤组织的修复创造有利条件。但是在此过程中，由于某些因素出现拮抗作用，影响损伤脊髓组织的自我修复，如兴奋性氨基酸的毒性作用、自由基大量产生、损伤所致的严重

目多于丸剂组、电针组 ( $P < 0.01$ )。见图4~5。

3.4 治疗后各组损伤脊髓组织 BrdU、Nestin、GFAP mRNA 表达 治疗后模型组损伤脊髓组织 BrdU、Nestin、GFAP mRNA 表达均高于正常对照组 ( $P < 0.01$ )，丸剂组、电针组和联合组损伤脊髓组织 BrdU、Nestin、GFAP mRNA 表达均高于模型组 ( $P < 0.01$ )，且联合组损伤脊髓组织 BrdU、Nestin、GFAP mRNA 表达均高于丸剂组、电针组 ( $P < 0.01$ )。见图6。



注：与正常对照组比较，\*\*  $P < 0.01$ ；与模型组比较，<sup>##</sup>  $P < 0.01$ ；与丸剂组比较，<sup>&&</sup>  $P < 0.01$ ；与电针组比较，<sup>∇∇</sup>  $P < 0.01$ 。

图6 各组治疗后损伤脊髓组织 BrdU、Nestin、GFAP mRNA 表达

Fig. 6 Post-treatment expressions of BrdU, Nestin and GFAP mRNA in spinal cord injury tissue of each group

炎症反应等<sup>[11-12]</sup>。Wan 等<sup>[13]</sup>研究指出，急性脊髓

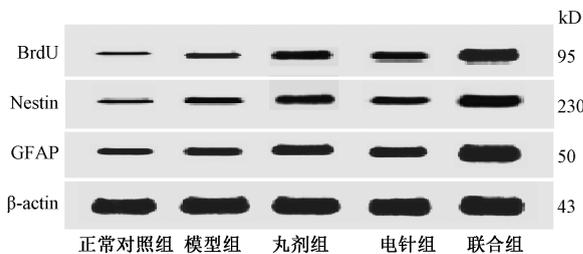
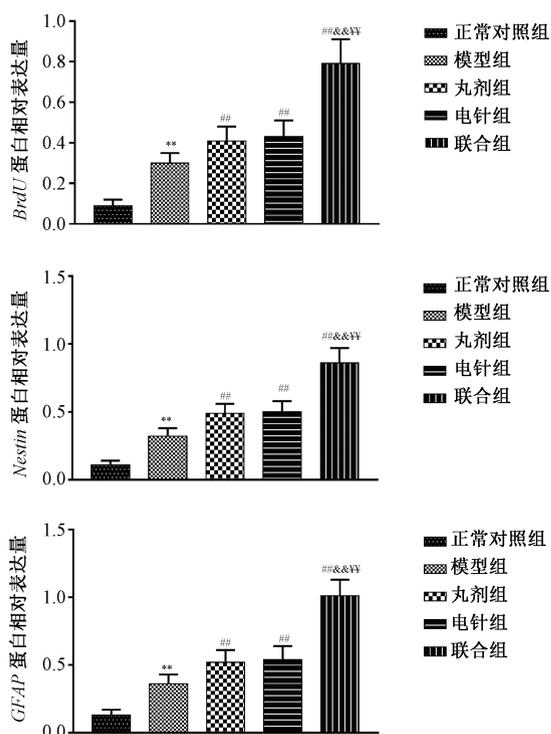


图7 Western blot 检测各组治疗后损伤脊髓组织 BrdU、Nestin、GFAP 蛋白表达

Fig. 7 Detection of post-treatment expressions of BrdU, Nestin and GFAP proteins in spinal cord injury tissue of each group by Western blot



注：与正常对照组比较，\*\*  $P < 0.01$ ；与模型组比较，##  $P < 0.01$ ；与丸剂组比较，&&  $P < 0.01$ ；与电针组比较，&&&  $P < 0.01$ 。

图8 各组治疗后损伤脊髓组织 BrdU、Nestin、GFAP 蛋白表达

Fig. 8 Post-treatment expressions of BrdU, Nestin and GFAP proteins in spinal cord injury tissue of each group

损伤后常规的治疗措施难以达到理想的效果，患者往往需要较长时间的恢复过程，且肢体功能受损严重，给患者的生活质量造成极大的影响。故而该领域工作者需积极探讨新的治疗方案促进急性脊髓损伤患者脊髓功能快速恢复，改善疗效。

神经行为学功能障碍是急性脊髓损伤的共同特性，已成为临床医师关注的重点问题。本研究中模

型组 BBB 评分显著下降，远不如正常对照组，而丸剂组、电针组和联合组治疗后 BBB 评分均升高且均高于模型组，联合组 BBB 评分明显高于丸剂组和电针组，提示蒙药珍宝丸、电针治疗急性脊髓损伤均可改善急性脊髓损伤大鼠的神经行为学功能，且蒙药珍宝丸联合电针的效果更佳。根据蒙医理论，急性脊髓损伤属于白脉病，可出现水肿、血液循环障碍和神经损伤等表现，从而损伤白脉，需针对病因实施治疗。蒙药珍宝丸具有清热除湿、舒筋活络、安神宁心等功效，对白脉病疗效理想。现代药理研究发现，蒙药珍宝丸不仅有助于增强受损的脊髓神经细胞的自我修复功能，改善局部微循环，还可清除氧自由基、控制炎症反应，最终达到加快急性脊髓损伤恢复的目的<sup>[14-15]</sup>。电针刺激大椎穴和命门穴可舒筋活络、疏通血脉，濡养经脉气血，在外力损伤督脉所致的气血逆乱、瘀阻经络病症中疗效确切。陈温慈等<sup>[16]</sup>研究表明，电针刺激急性脊髓损伤大鼠的大椎穴和命门穴可温煦气血，濡养肢体筋脉，疏利关节，益气活血。因此将蒙药珍宝丸与电针刺激大椎穴和命门穴联用治疗急性脊髓损伤可获得理想的效果。本研究中病理学观察、分级和脊髓细胞凋亡率对比结果也显示丸剂组、电针组和联合组均较模型组显著改善，提示蒙药珍宝丸联合电针治疗急性脊髓损伤效果良好，可减轻病理学改变程度，减少脊髓细胞凋亡，提示该方案具有较高的临床应用价值。

急性脊髓损伤后新血管生成是快速恢复的有利条件，而其中与相关信号通路的调控关系紧密，可增加 vWF 表达，促进新血管生成。BrdU 属于一种胸腺脱氧核苷类似物，在细胞增殖周期 S 期可整合进入细胞核的脱氧核糖核苷酸中，可反映细胞增殖状态，其表达越高意味着细胞增殖越快，从而为新血管的生成提供条件<sup>[17]</sup>。Nestin 属于一种中间丝类型蛋白，主要在神经上皮干细胞特异性表达，可促进神经元分化，增强损伤的脊髓神经细胞的自我修复作用，在急性脊髓损伤患者治疗中可将其作为靶点，上调其表达以改善脊髓功能。GFAP 可与肌动蛋白、细胞膜相结合，增强脊髓神经细胞的迁移和黏附能力，并且还和蛋白激酶有密切关系，可共同参与脊髓损伤细胞的修复和功能改善<sup>[18]</sup>。有研究<sup>[19-21]</sup>显示，急性脊髓损伤大鼠中损伤的脊髓组织中 UrdU、Nestin 和 GFAP 均较正常大鼠高表达，而予以对症治疗可上调其表达，提示在急性脊髓损伤治疗中应上调 UrdU、Nestin 和 GFAP 表达，以改

善脊髓功能。本研究中,模型组 vWF 阳性血管数目、损伤脊髓组织 *BrdU*、*Nestin*、*GFAP* mRNA 及蛋白表达均显著高于正常对照组,提示机体的自我修复机制可能启动,进而保证急性脊髓损伤的恢复,但其作用不甚理想,远不如丸剂组、电针组和联合组,且联合组的作用最佳,表明蒙药珍宝丸、电针夹脊穴和命门穴均可刺激急性脊髓损伤大鼠新血管生成,上调损伤的脊髓组织中 *BrdU*、*Nestin*、*GFAP* mRNA 及蛋白表达,从而发挥加快恢复的作用。

综上所述,蒙药珍宝丸、电针治疗急性脊髓损伤大鼠均可改善其行为学、减轻病理损伤,并且均可促进新血管生成,二者联用的效果明显优于单独应用,且很可能是通过上调损伤脊髓组织的 *BrdU*、*Nestin*、*GFAP* 表达实现此作用的。本研究为蒙药珍宝丸联合电针在急性脊髓损伤患者临床治疗中的应用奠定了基础,提供了一种高效可行的治疗方案,但该方案对损伤脊髓组织的 *BrdU*、*Nestin*、*GFAP* 表达上调的具体机制尚不明确,仍需进一步研究探讨,以加深人们对其认识,更好地在临床中推广使用。

#### 参考文献:

[ 1 ] 孙中仪. 中国脊柱脊髓损伤数据库对急性脊髓损伤病人的分析价值[D]. 青岛: 青岛大学, 2012.

[ 2 ] 张天宇, 王海生, 武瑞兵, 等. 珍宝丸对大鼠脊髓损伤后 RhoA 的调节作用[J]. 内蒙古医学杂志, 2015, 47(3): 270-272; 386.

[ 3 ] 于宝龙, 贺永雄, 刘 斌, 等. 蒙药珍宝丸对急性脊髓损伤大鼠的神经保护作用[J]. 国际中医中药杂志, 2015, 37(10): 900-903.

[ 4 ] 李晓宁, 梁雪松, 吴 磊, 等. 夹脊电针对急性脊髓损伤大鼠脊髓组织微环境 Rho-ROCK II 通路相关因子的影响[J]. 针刺研究, 2018, 43(7): 445-449; 455.

[ 5 ] Sun F, Shi T, Zhou T, et al. 3D Poly (Lactic-co-glycolic acid) scaffolds for treating spinal cord injury [J]. *J Biomed Nanotechnol*, 2017, 13(3): 290-302.

[ 6 ] Blaško J, Szekiova E, Slovinska L, et al. Axonal outgrowth stimulation after alginate/mesenchymal stem cell therapy in injured rat spinal cord[J]. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 2017, 77(4): 337-350.

[ 7 ] 范瑜洁, 聂 颖, 陈 安, 等. 补阳还五汤对移植 BMSCs 在脊髓损伤局部存活、增殖及分化的影响[J]. 湖南中医药

大学学报, 2018, 38(11): 99-103.

[ 8 ] Bang W S, Kim K T, Seo Y J, et al. Curcumin increase the expression of neural stem/progenitor cells and improves functional recovery after spinal cord injury [J]. *J Korean Neurosurg Soc*, 2018, 61(1): 10-18.

[ 9 ] 刘小康, 徐建广, 连小峰, 等. 大鼠钳夹式急性脊髓损伤模型的制备与评价[J]. 中国矫形外科杂志, 2012, 20(14): 1318-1322.

[ 10 ] 金 华, 郭光琼, 李 江, 等. 脊髓缺血再灌注损伤模型的改进及对大鼠神经行为学的影响[J]. 中风与神经疾病杂志, 2012, 29(10): 879-882.

[ 11 ] Hesp Z C, Yoseph R Y, Suzuki R, et al. Proliferating NG2-cell-dependent angiogenesis and scar formation alter axon growth and functional recovery after spinal cord injury in mice [J]. *J Neurosci*, 2018, 38(6): 1366-1382.

[ 12 ] Zhang Y D, Zhu Z S, Zhang D, et al. Lentivirus-mediated silencing of the PTC1 and PTC2 genes promotes recovery from spinal cord injury by activating the Hedgehog signaling pathway in a rat model [J]. *Exp Mol Med*, 2017, 49(12): e412.

[ 13 ] Wan J M, Liu L L, Zhang J F, et al. Promotion of neuronal regeneration by using self-polymerized dendritic polypeptide scaffold for spinal cord tissue engineering [J]. *J Mater Sci Mater Med*, 2017, 29(1): 6.

[ 14 ] 郇颜强. 珍宝丸在脊髓损伤再生修复中的作用及相关机制研究[D]. 武汉: 武汉大学, 2018.

[ 15 ] 罗亚敏, 任小巧, 宋慧荣, 等. 藏药如意珍宝丸对急性血瘀模型大鼠血液流变学的影响[J]. 中国中医基础医学杂志, 2018, 24(6): 757-759.

[ 16 ] 陈温慈, 屠文展, 胡 洁, 等. 督脉电针对急性脊髓损伤大鼠脊髓损伤区 NR2B 表达的影响[J]. 针刺研究, 2019, 44(2): 95-101.

[ 17 ] Wang C, Kong X, Zhu C, et al. Wu-tou decoction attenuates neuropathic pain via suppressing spinal astrocytic IL-1R1/TRAF6/JNK signaling [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(54): 92864-92879.

[ 18 ] Zhang N, Wei G, Ye J, et al. Effect of curcumin on acute spinal cord injury in mice via inhibition of inflammation and TAK1 pathway [J]. *Pharmacol Rep*, 2017, 69(5): 1001-1006.

[ 19 ] 熊 鹰. 川芎嗪对大鼠急性脊髓损伤后 GFAP 表达的影响 [D]. 南宁: 广西中医药大学, 2016.

[ 20 ] Fu Q, Liu Y, Liu X, et al. Engrafted peripheral blood-derived mesenchymal stem cells promote locomotive recovery in adult rats after spinal cord injury [J]. *Am J Transl Res*, 2017, 9(9): 3950-3966.

[ 21 ] 滕秀英, 王德生, 张晓梅, 等. 夹脊电针疗法对脊髓横断损伤大鼠的作用[J]. 科学通报, 2011, 21(33): 2765-2771.