

坐骨神经电刺激对不完全性脊髓损伤大鼠运动功能及 BDNF-TrkB 表达的影响

徐青亲¹, 殷其勇¹, 宋娟¹, 陈适², 胡子木¹, 李伦兰³, 陈和木¹

摘要 目的 探讨坐骨神经电刺激对不完全性脊髓损伤大鼠运动功能恢复的影响及其可能机制。方法 使用改良 Allen's 法构建不完全性胸部脊髓损伤大鼠模型,45 只 SD 大鼠随机分为假手术组、脊髓损伤组、坐骨神经电刺激组,每组 15 只。电刺激参数为脉宽 1 ms,频率 100 Hz,20 min/次,1 次/d,持续 21 d。采用 BBB 评分评估运动功能;电生理检测动作电位传导情况;HE 染色观察脊髓及股二头肌病理改变并分析股二头肌纤维平均截面积百分比;通过免疫组化、RT-PCR 和 Western blot 检测分析脑源性神经营养因子(BDNF)和酪氨酸激酶 B(TrkB)阳性细胞数、相对 mRNA 表达量和蛋白表达情况。结果 干预 21 d 时,①电刺激组 BBB 评分和动作电位平均振幅高于脊髓损伤组且差异有统计学意义($P < 0.05$);②电刺激组脊髓组织病理损伤比脊髓损伤组明显改善,股二头肌纤维平均截面积比脊髓损伤组增大且有统计学差异($P < 0.05$);③电刺激组 BDNF 和 TrkB 阳性细胞数多于脊髓损伤组且有统计学差异($P < 0.05$);④电刺激组 BDNF 和 TrkB 相对 mRNA 表达量和蛋白表达高于脊髓损伤组且有统计学差异($P < 0.05$)。结论 坐骨神经电刺激可以减轻脊髓组织损伤,促进运动功能恢复,延缓损伤平面以下肌肉萎缩,其机制可能与 BDNF-TrkB 蛋白表达增加有关。

关键词 坐骨神经电刺激;脊髓损伤;脑源性神经营养因子;酪氨酸激酶 B

中图分类号 R 651.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2023)09-1514-08
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.09.013

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)是一种严重的中枢神经系统损伤,最新指南已指出物理疗法在神经保护方面有积极作用。电刺激(electrical stimulation, ES)是常用的物理疗法之一,已广泛应用于

周围神经损伤及脑损伤等疾病。在 SCI 治疗研究中,有报道提出早期应用 ES 可以激活脊髓运动回路并发挥神经保护作用^[1]。临床中常将 ES 应用于肌肉,但有学者将 ES 作用于神经时,发现利用更少的功率,可获得更好的治疗效果^[2]。坐骨神经是人体最粗大的神经,起于腰骶神经丛,在改善神经源性疼痛方面有效^[3]。坐骨神经电刺激(sciatic nerve electrical stimulation, SNES)是一种利用低频脉冲电流刺激坐骨神经的神经干预治疗方案。脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)常作为神经运动功能恢复的观察指标,酪氨酸激酶 B(tropomyosin-related kinase B, TrkB)是与 BDNF 相互作用的主要受体,BDNF 激活 TrkB 受体,重组运动回路,促进运动功能恢复^[4]。现探讨 SNES 对不完全性 SCI 大鼠运动功能恢复及 BDNF-TrkB 表达的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 动物实验方案遵循《中国实验动物指南》,并经安徽医科大学动物实验伦理委员会批准(编号:LLSC20221103),本实验所有操作均遵循 3R 原则,最大程度保证动物福利。45 只 SPF 级雌性 SD 大鼠(10~12 周,210~230 g)由安徽医科大学动物实验中心提供。实验动物[许可证号:SCXK(安徽)2017-006]饲养于室温 20℃~25℃和相对湿度 40%~70%环境中,并提供足够的水和食物。

1.1.2 主要试剂和仪器 二甲苯购自上海国药集团化学试剂有限公司;苏木精伊红染色试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司;柠檬酸盐抗原修复液购自杭州浩克生物科技有限公司;组化试剂盒购自杭州图凌生物医药有限公司;一抗(BDNF, TrkB, GAPDH, 1:2 000)购自武汉三鹰生物技术有限公司;二抗(辣根酶标记山羊抗兔 IgG, 辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG, 1:10 000)购自北京中杉金桥生物技术有限公司;Trizol 试剂盒购自美国赛默飞世尔科

2023-08-08 接收

基金项目:安徽省高校自然科学基金项目(编号:KJ2020ZD18);安徽省科研编制计划项目(编号:2022AH051160);安徽医科大学研究生科研与实践创新项目(编号:YJS20230067)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院¹ 康复医学科、² 骨外科、³ 人力资源部,合肥 230022

作者简介:徐青亲,女,硕士研究生;

陈和木,男,副教授,主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail:chenhemu123@126.com

技公司;SYBR® Green PCR 试剂盒购自美国赛默飞世尔科技公司;ECL 发光试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;低频神经肌肉电刺激仪 HB-SJ3 购自苏州好博医疗器械有限公司;组织脱水机 ASP300 购自德国莱卡有限公司;石蜡包埋机 EG1150 购自德国莱卡有限公司;石蜡切片机 RM2255 购自德国莱卡有限公司;正置荧光显微镜 DM6 购自德国莱卡有限公司;生物信号采集与分析系统 BL4221 购自中国泰盟科技有限公司;荧光定量 RT-PCR 仪 LC480 II 购自瑞士罗氏公司;凝胶成像分析仪 AL600RGB 购自美国伯乐公司。

1.2 方法

1.2.1 实验分组及处理 将 45 只 SPF 级雌性 SD 大鼠随机分为 3 组,每组 15 只:假手术组(Sham 组;椎板切除术),脊髓损伤组(SCI 组;造模后不干预),坐骨神经电刺激组(SCI + SNES 组;造模后进行坐骨神经电刺激),实验分组及安排见图 1。使用改良 Allen's 法构建 T10 不完全性 SCI 大鼠模型,腹腔注射 1.25% 三溴乙醇溶液(10 ml/kg)麻醉大鼠,当眼睑反射消失后,将大鼠俯卧位固定于手术板上,背部纵向切开 15 mm。Sham 组仅进行椎板切除术,不破坏脊髓。其余各组大鼠均分离脊柱两侧肌肉,暴露 T10 附近的脊髓,使用打击棍(10 g,50 mm)^[5] 撞击暴露部位,停留时间 5 s。术中硬膜囊充血增厚,脊髓撞击处出现血肿及大鼠立即出现摆尾反射作为统一标准^[6]。各组大鼠术后均置于 36 ℃~37 ℃ 加热垫下苏醒,连续 3 d 注射青霉素(160 mg/kg)预防感染。术后 SCI 大鼠均采用 Crede 法手动排尿(2 次/d),直至排尿反射重新建立。

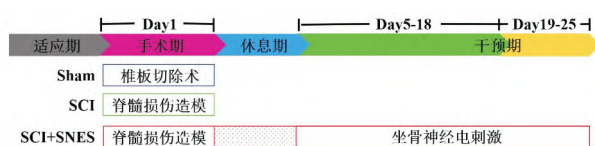


图 1 实验进展图

1.2.2 SNES 本实验选用低频神经肌肉电刺激仪(HB-SJ3),将电刺激仪电极端连接无菌针灸针(针尖直径 0.25 mm,针长 25 mm),选择大鼠双侧坐骨神经近端(髋关节后上缘)和远端(股骨中点下 0.5 cm)为刺激点,进行方波脉冲电刺激,以大鼠后肢出现趾反射为针电极刺激到坐骨神经的判断标准。参考 Hou et al^[7] 与 Wang et al^[8] 的研究,持续干预 14 d 时运动功能指标得到改善,为探讨延长干预时间是否能进一步提高治疗效果,本实验将干预持续时间

设置为 14 d 和 21 d。参考 CLAIR-AUGER et al^[9] 的研究,设置刺激参数为:脉宽 1 ms,频率 100 Hz,20 min/d,1 次/d,连续 21 d,术后第 4 d 开始刺激。

1.2.3 BBB 评分 干预第 1、3、5、7、14、21 d 时,采用 BBB 评分评估大鼠的运动能力,包括踝关节、膝关节和髋关节的活动范围、躯干运动协调性和整体稳定性等。将大鼠置于直径为 90 cm 的空旷场地,观察其自由活动 4 min,总分为 21 分,0 分指后肢完全没有运动能力,21 分指后肢完全正常,采用双人双盲法评定。

1.2.4 电生理检测 干预第 14 d 和 21 d 时按上述方法麻醉大鼠,采用生物信号采集与分析系统进行电生理检测。使用玻璃分针沿腰骶神经丛游离坐骨神经腹腔部,然后循坐骨神经沟纵向分离坐骨神经至腘窝处。刺激电极置于 T10 脊髓受损处,记录电极分别置于双侧坐骨神经干采集动作电位平均振幅,参考电极置于后肢股二头肌中腹,记录电极与参考电极之间相距 1 cm,接地电极置于大鼠尾部皮下。刺激类型为方波单刺激,刺激参数为波宽 0.1 ms,初幅度 0.2 V,增量 0.02 V,末幅度 1 V,延时 4 ms。

1.2.5 HE 染色 末次治疗和行为学评估后,心脏灌注 0.9% 冰生理盐水(1 000 ml/kg)至肝脏变白,快速提取脊髓组织及后肢肌肉,将样本于 4% 多聚甲醛中固定。梯度酒精脱水后,将组织包埋后连续切片 5 μm。切片放入二甲苯和梯度酒精中脱蜡,用苏木精染色 5 min,流动水冲洗至细胞核呈蓝色。将切片浸泡在伊红染液 3 s,洗去漂浮液后,中性树脂密封,显微镜观察并拍照。

1.2.6 免疫组化染色 将脊髓切片脱蜡后进行抗原修复,3% H₂O₂ 孵育以消除内源性过氧化物酶,加入 3% BSA 室温封闭 30 min,一抗 4 ℃ 孵育过夜。次日 TBST 水洗涤 3 次后,二抗室温孵育 1 h,加入 DAB-H₂O₂ 液室温下充分显色。最后苏木精复染细胞核,梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树脂封片。显微镜观察脊髓 BDNF 和 TrkB 阳性细胞数,Image J 半定量分析。

1.2.7 RT-PCR 检测 按上述方法快速提取脊髓组织,并保存于液氮中。TRIZOL 试剂盒提取总 RNA,分别加入氯仿、异丙醇后离心,30 μl DEPC 水溶解 RNA。往试管中加入 1 μl gDNA Digester,2 μl gDNA Digester Buffer,1 ng-1 μg 总 RNA 和 DEPC 水消除总 RNA 中的 DNA。取上一步反应液 10 μl,加入 2 μl Hifair II Enzyme Mix,2 μl Hifair II Buffer plus,1 μl Oligo(Dt)18 和 DDH₂O,25 ℃ 浸泡 5 min,42 ℃ 温

浴 30 min, 85 °C 加热 5 min。SYBR[®] Green PCR 试剂盒在 RT-PCR 仪进行如下反应: 95 °C 变性 15 s, 60 °C 退火 15 s, 72 °C 延伸 15 s, 引物序列如表 1 所示。

表 1 实时 RCR 引物核苷酸序列 (5'-3')

引物	序列 (5'-3')	产物大小 (bp)
BDNF	F: TTTGATGAGACCGGTTCC	164
	R: CTCACCTGGTGAACCTCAG	
TrkB	F: TGTGGTAGGATTCTGCCTG	84
	R: CATGAGACATCTTTCATGCCA	
GAPDH	F: AGGTCCGTGTGAACGGATTTC	95
	R: GGGTCTGTGATGGCAACA	

注: GAPDH-甘油醛-3-磷酸脱氢酶

1.2.8 Western blot 检测 从液氮中取出脊髓组织 (20 mg), 进行研磨、裂解、离心、分离上清液。电泳前计算蛋白浓度, 将上样缓冲液 × 3 (18 μg) 加入泳道进行电泳后, 转移至 PVDF 膜恒流电泳, 浸入密封液封闭 1 h。一抗 4 °C 孵育过夜, 隔日洗涤 3 次, 二抗温育 2 h。最后将显影剂滴入膜表面, 凝胶成像分析仪计算灰度值, Image J 进行定量分析。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 25.0 软件 (IBM Corp.) 对数据进行统计学处理, 呈正态分布的两组数据比较采用 *t* 检验, 呈正态分布的多组数据比较采用单因素方差分析, SNK-*q* 检验进行两两比较, 用 $\bar{x} \pm s$ 表示。呈偏态分布的两组数据比较采用 Mann-Whitney 秩和检验, 呈偏态分布的多组数据比较采用 Kruskal Wallis 秩和检验, 用 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠 BBB 评分比较 如表 2、图 2 所示: 与 SCI 组比较, SCI + SNES 组干预 1、3、5、7、14 d 时

BBB 评分结果差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 干预 21 d 时 BBB 评分明显升高 ($P < 0.001$)。

表 2 各组大鼠干预后 BBB 评分比较

(分, $n = 15, M(P_{25}, P_{75})$ 或 $\bar{x} \pm s$)

时间 (d)	Sham	SCI	SCI + SNES	Z/t 值	P 值
1	21	0(0, 0)	0(0, 0.75)	-0.968	0.333
3	21	0(0, 0.75)	0.5(0, 1)	-1.718	0.086
5	21	0.5(0, 1.75)	1.5(1, 2)	-1.868	0.062
7	21	0.5(0, 4)	2(2, 2.75)	-1.717	0.086
14	21	2.5(1, 6.25)	5(3, 7.75)	-1.603	0.109
21	21	5.50 ± 1.51	10.50 ± 1.20 **	7.338	<0.001

与 SCI 组比较: ** $P < 0.001$

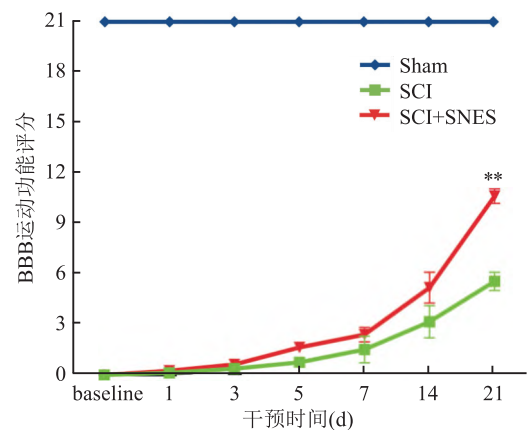


图 2 BBB 运动功能评分

2.2 各组大鼠动作电位平均振幅比较 如图 3、表 3 所示, Sham 组大鼠动作电位平均振幅正常, SCI 组大鼠动作电位平均振幅降低。如表 3、图 4 所示: 干预 14 d 时各组大鼠动作电位平均振幅结果比较无统计学差异 ($P > 0.05$), 干预 21 d 时各组大鼠差异比较有统计学意义 ($P < 0.05$)。与 SCI 大鼠相比, SCI + SNES 组干预 14 d 时动作电位平均振幅差异



图 3 电生理动作电位检测结果

Sham 组动作电位平均振幅均正常, SCI 组动作电位平均振幅降低, SCI + SNES 组动作电位平均振幅较 SCI 组升高

表3 各组大鼠动作电位平均振幅比较(mV, $n=5, \bar{x} \pm s$)

时间	Sham	SCI	SCI + SNES	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
14 d	0.38 ± 0.07	0.21 ± 0.05	0.27 ± 0.07	0.186	0.857
21 d	0.41 ± 0.02	0.18 ± 0.07	0.33 ± 0.04 *	4.239	<0.05
<i>t</i> 值	0.783	-0.984	1.454		
<i>P</i> 值	0.456	0.354	0.184		

与SCI组比较; * $P < 0.05$

比较无统计学意义($P > 0.05$), 干预21 d时动作电位平均振幅升高且有统计学差异($P < 0.05$)。

2.3 各组大鼠脊髓及股二头肌 HE 染色比较 脊髓 HE 结果显示, Sham 组脊髓结构排列规整; SCI 组脊髓中央有空洞, 损伤面积大, 且细胞核与细胞膜分离; 与 SCI 组比较, SCI + SNES 组损伤面积减小, 见图 5A。股二头肌 HE 结果显示, Sham 组股二头肌肌纤维排列整齐, 组织间隙均匀, 无肌肉萎缩; SCI 大鼠股二头肌肌纤维松散, 间隙大, 提示肌肉萎缩; 与 SCI 组相比, SCI + SNES 组肌纤维排列稍规则, 肌纤维间隙减小, 见图 5B。如图 6 所示: 干预 14 d 和

21 d 时各组股二头肌肌纤维平均 CSA 百分比差异有统计学意义($P < 0.05$)。与 SCI 组比较, SCI + SNES 组干预 14 d 平均 CSA 百分比无统计学差异($P = 0.217$), 干预 21 d 时平均 CSA 百分比增大且有统计学差异($P < 0.05$)。

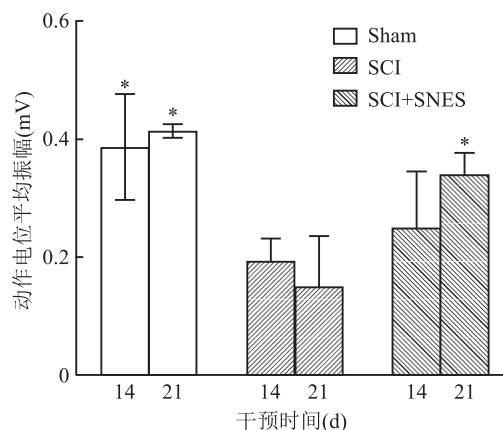
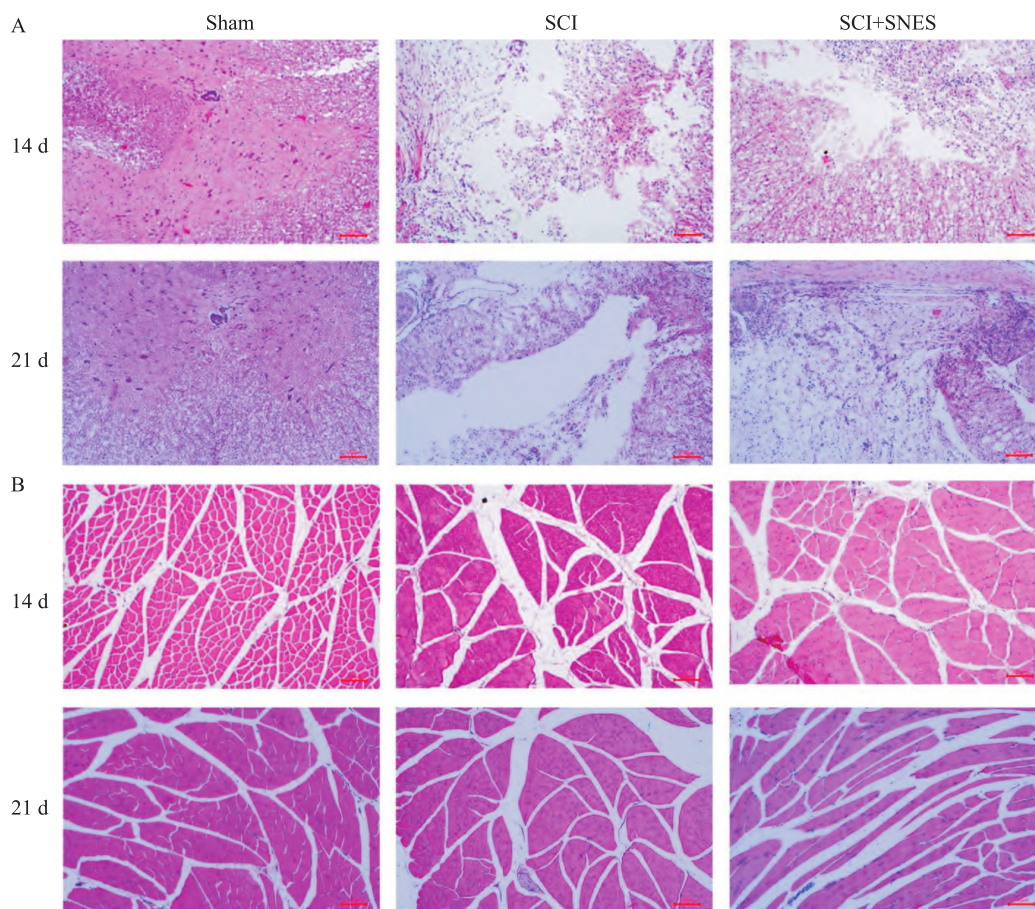
图4 各组大鼠动作电位平均振幅比较
与SCI组比较: * $P < 0.05$ 

图5 脊髓组织和股二头肌 HE 染色 ×100

A: 干预 14 d 和 21 d 各组大鼠脊髓组织 HE 染色; B: 各组大鼠股二头肌 HE 染色结果

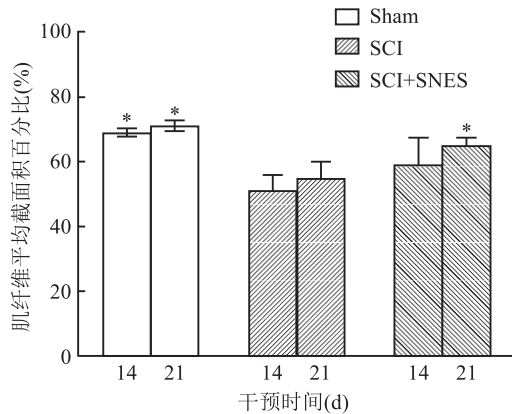


图6 股二头肌肌纤维平均 CSA 百分比结果

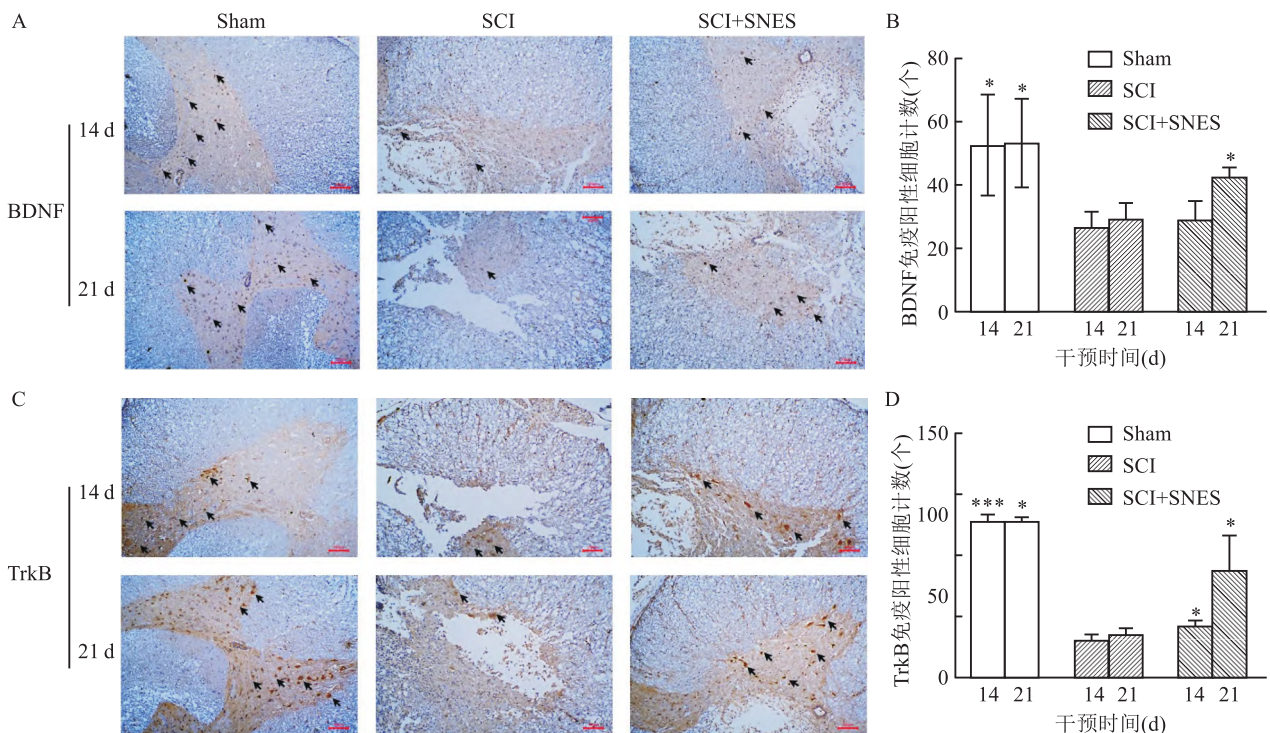
CSA 百分比 = 肌纤维平均截面积/总平均面积 $\times 100\%$; 与 SCI 组比较; * $P < 0.05$

2.4 脊髓 BDNF 和 TrkB 的免疫组化比较 如图 7A、7C 所示, Sham 大鼠脊髓可见较多的棕黄色或棕褐色颗粒, 其余各组大鼠脊髓棕黄色或棕褐色颗粒呈不同程度减少趋势。如图 7B、7D 所示, 干预 14 d 和 21 d 时, 各组大鼠脊髓 BDNF 和 TrkB 免疫阳性细胞数有统计学差异 ($P < 0.05$)。与 SCI 组比较, SCI + SNES 组干预 21 d 时 BDNF 和 TrkB 免疫阳性

细胞数增多且均有统计学差异 ($P < 0.05$)。

2.5 RT-PCR 检测脊髓 BDNF 和 TrkB 相对 mRNA 表达量比较 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 分析法计算 mRNA 表达倍数变化, 脊髓组织 BDNF 和 TrkB 相对 mRNA 表达量结果显示, 与 Sham 组相比, 干预 14 d 时其余各组脊髓 BDNF 和 TrkB 靶基因 mRNA 相对表达量没有上升趋势, 干预 21 d 时 SCI + SNES 组 BDNF 和 TrkB 靶基因相对 mRNA 表达增加。与 SCI 组相比, SCI + SNES 组在干预 14 d 和 21 d 时 BDNF 相对 mRNA 表达量增多且有统计学差异 ($P < 0.05$); 干预 14 d 时 TrkB 相对 mRNA 表达量无差异 ($P = 0.574$), 干预 21 d 时 TrkB 相对 mRNA 表达量增多且有统计学差异 ($P < 0.05$), 见图 8A、8B。

2.6 Western blot 检测脊髓 BDNF 和 TrkB 蛋白表达量比较 脊髓组织 BDNF 和 TrkB 蛋白表达量结果显示, 与 Sham 组比较, SCI 后各组 BDNF 和 TrkB 蛋白表达均有不同程度的下降 ($P < 0.001$)。与 SCI 组相比, SCI + SNES 组干预 14 d 时 BDNF 和 TrkB 蛋白表达升高且有统计学差异 ($P < 0.05$); 在干预 21 d 时 BDNF 和 TrkB 蛋白表达升高且有统计学差异 ($P < 0.05$), 见图 9A ~ 9D。

图7 各组大鼠 BDNF 和 TrkB 免疫组化染色结果 $\times 100$

A: 干预 14 d 和 21 d 时 BDNF 阳性细胞免疫组化图; B: 干预 14 d 和 21 d 时 BDNF 阳性细胞计数统计图; C: 干预 14 d 和 21 d 时 TrkB 阳性细胞免疫组化图; D: 干预 14 d 和 21 d 时 TrkB 阳性细胞计数统计图; 黑色箭头: BDNF 和 TrkB 免疫阳性标记细胞, 呈棕黄色或棕褐色; 与 SCI 组比较; * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$

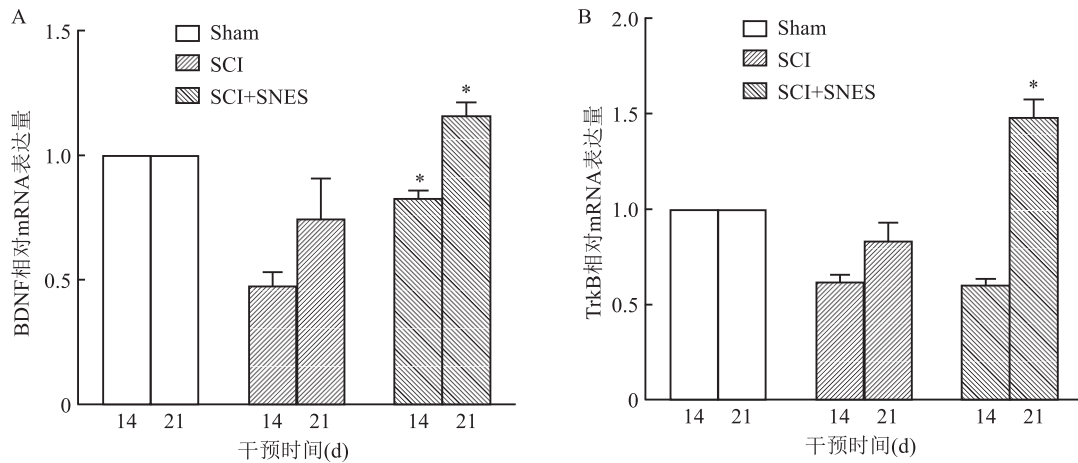


图8 BDNF-TrkB 的 RT-PCR 检测结果

A: 干预 14 d 和 21 d 时 BDNF 相对 mRNA 表达量; B: 干预 14 d 和 21 d 时 TrkB 相对 mRNA 表达量; 与 SCI 组比较; * $P < 0.05$

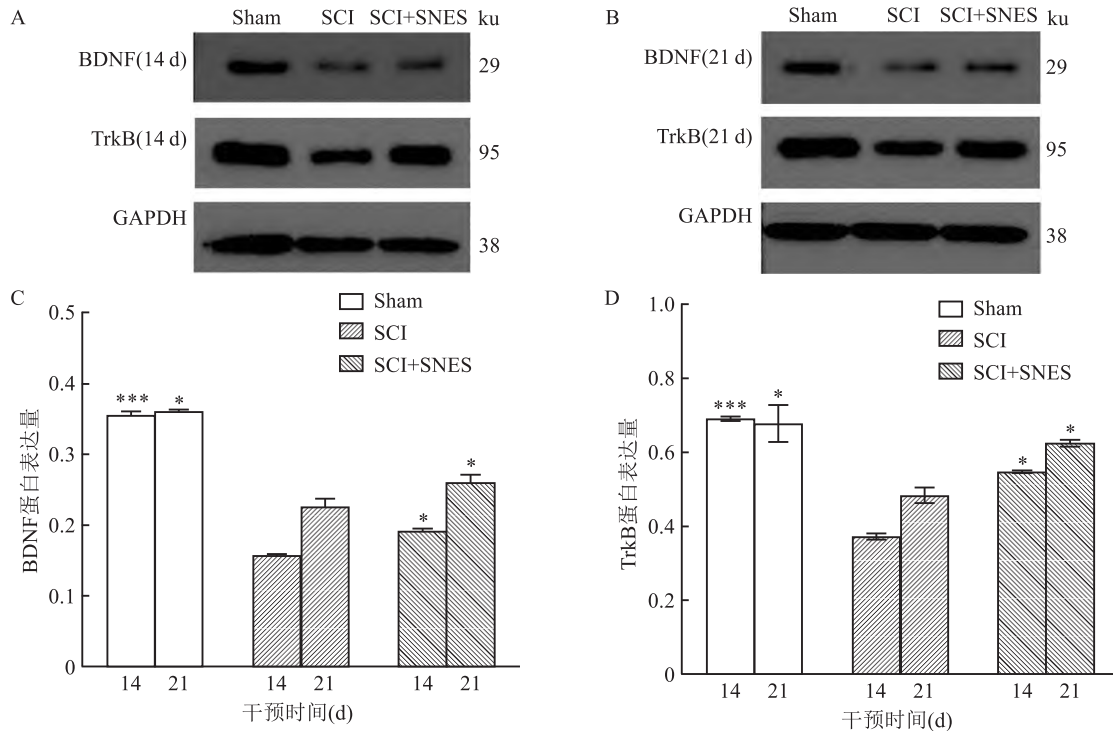


图9 脊髓 BDNF-TrkB 的 Western blot 检测结果

A: 干预 14 d 和 21 d 时 BDNF 蛋白免疫印迹发光条带图; B: 干预 14 d 和 21 d 时 TrkB 蛋白免疫印迹发光条带图; C: 干预 14 d 和 21 d 时 BDNF 蛋白表达量柱状图; D: 干预 14 d 和 21 d 时 TrkB 蛋白表达量柱状图; 与 SCI 组比较; * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$

3 讨论

SCI 后脊髓结构或功能受损, 损伤平面以下出现运动、感觉和二便等多种功能障碍, 给患者、家庭和社会带来巨大的经济负担。寻找安全有效的治疗方法是学者们一直面临的挑战。电刺激作为一种常用的康复治疗方法, 在 SCI 领域应用颇多, 如硬膜外电刺激、功能性电刺激、经皮脊髓电刺激等。SNES

是对坐骨神经进行低频脉冲刺激的治疗方法, 已知 SNES 在缓解神经性疼痛、改善活动能力和促进周围神经再生方面有效^[3], 与提高中枢敏感性、提高丘脑后三角核神经元的兴奋性和促进髓鞘再生有关。然而针对 SNES 促进 SCI 后运动功能恢复的研究较少, Vivo et al^[10] 发现将 ES 应用于坐骨神经可激活感觉神经元的内在生长潜能, 加速神经再生。SNES 通过上调兴奋性突触传递因子胶质谷氨酸转运蛋

白,诱发脊髓长时程增强状态,激活大量脊髓背角神经元,从而调节脊髓可塑性。

BDNF 常作为评估神经系统损伤后运动功能恢复的重要蛋白,对神经元的存活、分化和再生起关键作用。TrkB 是与 BDNF 结合的高亲和力受体,对维持神经元生理功能及促进损伤后运动功能恢复发挥积极作用。BDNF 是一种重要的神经营养因子,其浓度在成年时降低,但在机体损伤后通过自分泌及旁分泌等途径表达上调,与特异性受体 TrkB 结合后,形成同源二聚体复合结构,促进酪氨酸受体残基发生自身磷酸化,从而激活细胞内下游信号通路,发挥对损伤神经元的保护作用,改善肢体运动功能。

本实验数据显示,SNES 连续干预 21 d 可改善损伤后运动活动,提高动作电位平均振幅,减轻脊髓组织损伤,延缓损伤平面下肌纤维萎缩,增加 BDNF 和 TrkB 蛋白表达。因此推测 SNES 促进 SCI 运动功能恢复与脊髓 BDNF-TrkB 蛋白高表达有关,其原因可能是:①SCI 后良好的再生微环境是运动功能恢复的基础。SCI 后常保留皮质-脊髓连接,ES 可促进损伤同侧皮质-脊髓轴突的生长,改善保留区域再生环境;ES 诱导神经元细胞内 Ca^{2+} 浓度升高,调节细胞内外离子分布,为神经再生提供稳定的内环境^[11];SNES 诱导 N-甲基 D-天冬氨酸受体参与脊髓长时程增强过程,脊髓背角神经元接受电信号刺激,进行换元处理,诱发出场电位,使脊髓内神经元再生微环境向有利方向转变^[12]。②SCI 后髓鞘再生对运动功能恢复至关重要,BDNF 是参与髓鞘再生的重要蛋白。ES 促进功能恢复的作用机制与中枢神经系统脱髓鞘区 BDNF 表达升高有关。ES 提高有髓神经纤维上施万细胞释放神经营养因子 BDNF 的能力,上调脊髓中 BDNF 表达水平,促进受损神经元的存活及发挥神经保护作用^[13]。③原肌球蛋白受体激酶 B 可减少神经元变性,是 SCI 修复可利用的靶点。当 BDNF 与 TrkB 结合后启动细胞内信号通路传导,增加神经回路适应性,从而调控神经元生长、发育和分化^[14]。TrkB 激动剂促进兴奋性谷氨酸能受体增多,使神经末梢发生去极化,参与神经元的兴奋性突触传递活动,调控整个神经网络的信息传递^[15]。TrkB 协同 BDNF 诱导脊髓神经元保护作用,是 SNES 促进 SCI 后运动功能恢复的原因之一。

综上,SNES 通过激活特定的神经营养因子及其受体,减轻脊髓组织损伤及促进运动功能恢复。上述实验数据显示,在持续干预 14d 时部分指标尚未

出现阳性结果,其原因可能为 SNES 促进 SCI 功能恢复机制起效慢,不足以对抗损伤后发生的一系列急性期继发性损伤。然而随着干预时长增加至 21 d 时,SNES 对 SCI 后功能恢复效果进一步提高,使所有检测指标结果均成阳性。本研究对临床上制定 SCI 康复疗程有指导意义,但局限性在于未能确定最佳的干预时间。为解决上述局限性,本课题组计划加长干预时间,以确定 SCI 康复最佳时间。

参考文献

- [1] Lai B Q, Zeng X, Han W T, et al. Stem cell-derived neuronal relay strategies and functional electrical stimulation for treatment of spinal cord injury[J]. *Biomaterials*, 2021, 279: 121211.
- [2] Mokhtari T, Ren Q, Li N, et al. Transcutaneous electrical nerve stimulation in relieving neuropathic pain: basic mechanisms and clinical applications[J]. *Curr Pain Headache Rep*, 2020, 24(4): 14.
- [3] Buwembo J, Munson R, Rizvi S A, et al. Direct sciatic nerve electrical stimulation for complex regional pain syndrome type 1[J]. *Neuromodulation*, 2021, 24(6): 1075-82.
- [4] Lee-Hotta S, Uchiyama Y, Kametaka S. Role of the BDNF-TrkB pathway in KCC2 regulation and rehabilitation following neuronal injury: A mini review[J]. *Neurochem Int*, 2019, 128: 32-8.
- [5] Mattucci S, Speidel J, Liu J, et al. Temporal progression of acute spinal cord injury mechanisms in a rat model: contusion, dislocation, and distraction[J]. *J Neurotrauma*, 2021, 38(15): 2103-21.
- [6] Ying X, Xie Q, Li S, et al. Water treadmill training attenuates blood-spinal cord barrier disruption in rats by promoting angiogenesis and inhibiting matrix metalloproteinase-2/9 expression following spinal cord injury[J]. *Fluids Barriers CNS*, 2020, 17(1): 70.
- [7] Hou Y, Luo D, Hou Y, et al. Bu Shen Huo Xue decoction promotes functional recovery in spinal cord injury mice by improving the microenvironment to promote axonal regeneration[J]. *Chin Med*, 2022, 17(1): 85.
- [8] Wang H, Zheng Z, Han W, et al. Metformin promotes axon regeneration after spinal cord injury through inhibiting oxidative stress and stabilizing microtubule[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020: 9741369.
- [9] Ding X, Cai J, Li S, et al. BDNF contributes to the development of neuropathic pain by induction of spinal long-term potentiation via SHP2 associated GluN2B-containing NMDA receptors activation in rats with spinal nerve ligation[J]. *Neurobiol Dis*, 2015, 73: 428-51.
- [10] Vivo M, Puigdemasa A, Casals L, et al. Immediate electrical stimulation enhances regeneration and reinnervation and modulates spinal plastic changes after sciatic nerve injury and repair[J]. *Exp Neurol*, 2008, 211(1): 180-93.
- [11] 裴保安, 岑金花, 吴立生, 等. 制备坐骨神经损伤大鼠模型: 脊髓与局部神经电刺激的修复效果比较[J]. *中国组织工程研*

- 究, 2015, 19(49): 7982–7.
- [12] Shapira Y, Sammons V, Forden J, et al. Brief electrical stimulation promotes nerve regeneration following experimental incontinuity nerve injury[J]. *Neurosurgery*, 2019, 85(1): 156–63.
- [13] 王震, 张香路, 李阳, 等. 改良透明质酸水凝胶控释脑源性神经营养因子对大鼠胚胎神经干细胞生长、分化和凋亡的影响[J]. *安徽医科大学学报*, 2022, 57(5): 805–10.
- [14] Anjuma A, Yazid M D, Fauzi D M, et al. Spinal cord injury: pathophysiology, multimolecular interactions, and underlying recovery mechanisms[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(20): 7533.
- [15] Fouad K, Vavrek R, Cho S. TrkB antibody agonist promotes plasticity after cervical spinal cord injury in adult rats[J]. *J Neurotrauma*, 2021, 38(9): 1338–48.

Effects of sciatic nerve electrical stimulation on motor function and expression of BDNF-TrkB in rats with spinal cord injury

Xu Qingqin¹, Yin Qiyong¹, Song Juan¹, Chen Shi², Hu Zimu¹, Li Lunlan³, Chen Hemu¹

(¹Dept of Rehabilitation, ²Dept of Orthopedics, ³Dept of Human Resources, First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objectives To investigate the effect of sciatic nerve electrical stimulation (SNES) on motor function recovery in rats with incomplete spinal cord injury (SCI) and its possible mechanism. **Methods** The incomplete SCI model was constructed by modified Allen's method. Forty-five Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into three groups: Sham, SCI, and SNES. Electrical stimulation parameters were 1 ms pulse width and 100 Hz, with 20 mins each time, once a day for 21 days. The motor function was assessed by Basso-Beattie-Bresnahan (BBB) locomotor function scale, and the action potential conduction was detected by electrophysiology. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the pathological changes in the spinal cord and the average cross-sectional area (CSA) of biceps femoris muscle fibers. The number of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and tropomyosin-related kinase B (TrkB) positive cells, relative mRNA and protein expression were analyzed by immunohistochemistry, reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot separately. **Results**

On 21 d, the BBB score and average amplitude of action potential of SNES group were higher than those of SCI group, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Compared with SCI group, the pathological injury of spinal cord tissue in SNES group was significantly improved, and the average CSA of biceps femoris muscles had a statistical difference ($P < 0.05$). The number of BDNF and TrkB positive cells in SNES group was higher than that in SCI group, and there were statistical differences ($P < 0.05$). The relative mRNA and protein expressions of BDNF and TrkB in SNES group were higher than those in SCI group, with statistical differences ($P < 0.05$). **Conclusion** These results show that SNES contributes to alleviating spinal cord tissue injury, promoting the recovery of motor function and delaying the atrophy of muscles below the injury level. The possible mechanism is related to the increased expression of BDNF-TrkB proteins.

Key words sciatic nerve electrical stimulation; spinal cord injury; brain-derived neurotrophic factor; tropomyosin-related kinase B