

夹脊电针疗法对脊髓横断损伤大鼠的作用

滕秀英, 王德生*, 张晓梅, 赖增娇, 姜海霞, 吴建丽, 齐欢, 于倩, 姚舜, 宋文博, 杨景杰, 李艾穆

哈尔滨医科大学附属第一医院, 哈尔滨 150040

* 联系人, E-mail: wangdesheng5678@126.com

2011-04-30 收稿, 2011-06-22 接受

中国科学院“百人计划”(2006-067)和国家自然科学基金(40872168)资助项目

摘要 在雌性 Wistar 成年大鼠胸髓第 10 节段造成脊髓横断损伤, 然后在脊髓损伤区给予夹脊电针治疗, 为脊髓组织在电场的作用下再生提供一个良好的微环境. 脊髓横断术后 7 和 14 d, 通过对大鼠运动功能的观察发现, 夹脊电针治疗可以促进神经的恢复; 脊髓损伤区的 Brdu, Nestin, GFAP 阳性神经元计数、Nestin mRNA 及 GFAP mRNA 相对表达量的变化也证实, 夹脊电针治疗可以促进脊髓损伤后的神经干细胞增殖, 从而发挥神经元及其他功能细胞的修复作用. 电生理学检测结果表明, 夹脊电针治疗可以提高脊髓传导速度. 研究结果显示, 夹脊电针和夹脊电针预处理治疗方法对于脊髓损伤后神经干细胞增殖及神经功能的恢复具有重要作用, 为临床应用提供了新的思路.

关键词

夹脊电针
脊髓横断
大鼠
内源性神经
干细胞

脊髓损伤是一种严重的中枢神经系统损伤, 常造成不同程度的伤残, 甚至死亡. 传统观点认为, 成体哺乳动物中枢神经系统不具备更新的能力, 受损后不能再生. 近年来许多研究发现, 在包括人类在内的成年哺乳类动物的中枢神经系统中存在具有自我更新和分化潜能的神经干细胞(NSCs)^[1]. 正常情况下这些 NSCs 处于静止状态, 在损伤、缺血等刺激因素作用下其可以被激活, 经增殖、迁移、分化等一系列变化以替代坏死的神经细胞, 修复损伤、恢复神经功能, 为脊髓损伤后的治疗带来了新的希望. 目前, 应用神经干细胞治疗脊髓损伤大鼠大概有两种途径: 一是移植外源性神经干细胞; 二是激活内源性神经干细胞. 前者虽然取得了许多进展, 但随着研究的深入, 也存在一些问题^[2], 如免疫排斥、伦理学道德等问题, 而后者更适合于临床运用.

1920 年 Ingvar^[3]就发现电场在神经生长走向上起着主要作用, 能减少损伤神经的退行性变. 电刺激能够促进 eNSC (endogenous neural stem cell) 的增殖

与分化, 并提高神经组织的修复能力^[4,5]. 电针或电场疗法已被用于治疗脊髓损伤, 一些临床和实验研究结果证实电针或电场治疗脊髓损伤疗效显著^[6-9]. 夹脊又称“挟脊”、“侠脊”, 原指挟于脊柱两旁的经穴, 最早出自《黄帝内经》. 1955 年, Cheng^[10]将此穴位置确定为第一胸椎到第五腰椎棘突下旁开 5 分, 共 17 对穴位, 称为“华佗夹脊穴”. 夹脊电针技术在治疗上取脊髓损伤平面的上下各一个节段的夹脊穴, 刺入 2 对针灸针, 针刺后将导线在同侧上下连接, 正极在上, 负极在下^[11], 脉冲电场能促进神经组织的再生和血管形成^[12], 电针刺激法能够促进脊髓损伤后功能的恢复^[13], 改善损伤处脊髓及周围组织血液循环和组织代谢及减轻水肿^[14], 还可保护和促进轴突的重建^[15,16], 脉冲电磁场, 使神经元发生有效极化, 增强其酶的活性^[17], 调整基因的表达^[18,19].

本研究的目的是观察夹脊电针对完全脊髓横断损伤的大鼠内源性神经干细胞标记物的作用, 包括 5-溴脱氧尿核苷(Brdu)、巢蛋白(nestin)和胶质纤维酸

性蛋白(GFAP).

1 材料和方法

(i) 动物和研究设计. 动物治疗协议经黑龙江中医药大学审查委员会批准, 96只Wistar成年雌性大鼠(黑龙江中医药大学动物实验中心提供), 体重200~220 g, 年龄为11~12周, 随机分为4组: 假手术组, 只暴露胸10节段脊髓, 不予横断, 然后缝合伤口; 模型组, 于胸10节段横断脊髓, 但不进行治疗; 电针刺组, 造模后分别接受3, 7, 14 d的治疗; 预针刺组, 在造模前给予夹脊电针1周, 造模后, 同电针刺组. 各组按取材时间不同分为3, 7, 14 d共3个时间点, 每个时间点8只. 从中随机取4只用于免疫组织化学方法检测, 另外4只用于荧光定量PCR方法检测. 也对每个组的L2到T₈的神经传导速度进行评估.

(ii) 脊髓横断. 大鼠用10%的水合氯醛腹腔注射(400 mg/kg 体重), 麻醉成功后俯卧位固定在手术台上, 仔细定位. 消毒术区皮肤, 于胸背部行正中入路, 无菌条件下逐层切开皮肤、皮下组织至脊柱, 充分暴露T₈~T₁₀锥体, 用外科剪小心剪掉椎板至两侧关节突, 充分暴露T₉~T₁₁节段脊髓. T₁₀^[20]节段脊髓被显微剪剪断^[21,22], 覆盖明胶海绵. 逐层缝合伤口. 大鼠术后腹腔注射青霉素(1.6×10^5 U)预防感染, 一日一次, 共5 d, 定时按压膀胱以促排尿, 给与开塞露以促排便, 皮下注射新斯的明(0.1 mg/kg)以促胃肠蠕动, 供给充足的食料和水.

(iii) 夹脊电针和运动功能评价. 夹脊针方法在一些研究中已被应用^[23,24]. 在距损伤处上下端2个椎体的棘突间隙旁开3~4 mm处取穴, 头侧的两根针在横断水平上的2个椎体棘突间隙旁, 尾侧的两根针在横断水平下的2个椎体棘突间隙旁, 用25 mm华佗牌毫针垂直刺入约4~5 mm, 使针尖触及椎板, 正、负极导线分别夹在头、尾两侧毫针针柄上(正极在上, 负极在下). 连续密波脉冲电流, 频率为100 Hz, 输出电流强度是以背部肌肉出现轻微抽动为度. 电针刺组于造模成功后0.5, 4, 8 h分别进行夹脊电针治疗15 min, 以后每天1次, 每次15 min. 预针刺组于造模前一周每天给予夹脊电针一次, 每次15 min, 术后治疗方法同电针刺组. 参照Basso等人^[25]提出的大鼠SCI后功能评判标准BBB运动功能评分法对大鼠后肢运动功能进行评分, 自术后第3, 7, 14天各时间点由掌握评分标准的固定2人对大鼠进行盲评, 结果取

平均值.

(iv) 免疫组织化学. 将BrdU溶于生理盐水中配制成1%的溶液. 在各时间点大鼠处死前3 d腹腔注射150 mg/kg BrdU, 每天2次. 大鼠用10%的水合氯醛腹腔注射(400 mg/kg 体重)麻醉, 然后用4%多聚甲醛灌注, 以损伤点为中心迅速取髓2 cm, 取下脊髓放入4%多聚甲醛固定24 h, 石蜡包埋, 制备2 μ m厚组织切片, 进行免疫组织化学染色. 每张石蜡切片脱蜡至水, 用3%过氧化氢室温下阻断内源性过氧化物酶10 min, 高压蒸气修复抗原, 加BrdU一抗(1:200)或Nestin(1:400), GFAP(1:400)一抗4℃过夜. 按照一抗的来源, 分别滴加相应的二抗PV6001/6002, 各于室温下孵育30 min, 滴加DAB显色液, 显微镜下观察10~30 min, 阳性显色为棕黄色. 加苏木素复染, 充分水洗. 酒精脱水, 二甲苯透明, 树脂封片剂封片. 以细胞内棕黄色染色者为阳性. 在10×40倍显微镜下对阳性细胞进行细胞计数. 每张切片随机选取5个视野进行阳性细胞计数, 计算平均值为该鼠的标准值.

(v) 实时聚合酶链反应. 在各时间点断头处死大鼠后, 立即取出包含损伤处的脊髓, 放入-80℃低温冰箱保存备用. 应用RNAiso Plus提取总RNA, 之后经逆转录反应合成cDNA. 反应体系为10 μ L, 包含5×PrimeScript Buffer 2 μ L, PrimeScript RT Enzyme Mix 0.5 μ L, Oligo Dt Primer 0.5 μ L, Random 6 mers 0.5 μ L, Total RNA 4 μ L, RNase free 水 2.5 μ L. 反应条件: 37℃, 15 m, 85℃, 5 s. 合成好的cDNA放-80℃低温冰箱储存备用. 本实验中所用引物序列及增幅产物长度: GAPDH (143 bp), 5'-GGCACAGTCAAGGCT-GAGAATG-3'和5'-ATGGTGGTGAAGACGCCAGTA-3'; GFAP (163 bp), 5'-AGTGGCCACCAGTAACAT-GCAA-3'和5'-GGACTCAAGGTCGCAGGTCAA-3'; nestin (101 bp) 5'-CAGCAACTGGCACACCTCAAG-3'和5'-CCTCGTCCAGGTGTCTGCAA-3'. 以GAPDH为管家基因^[26], SYBR 荧光实时定量PCR法检测GFAP和NESTIN mRNA表达情况, 基因表达的相对定量基于比较CT (threshold cycle)值法. PCR反应体系为25 μ L, 包含RT-PCR mix, 上游引物0.5 μ L, 下游引物0.5 μ L. 反应条件: 95℃预变性30 s; 95℃, 5 s, 60℃, 30 s, 共40个循环. 反应后进行熔解曲线分析. 琼脂糖凝胶电泳证实扩增产物. 计算扩增效率, 各个指标取一份cDNA经2倍系列稀释后(20, 10, 5, 2.5,

1.25 ng)进行荧光实时定量 PCR 扩增,以各个梯度浓度的对数为 Y 轴,所对应的 C_T 值为 X 轴,建立标准曲线,获得标准曲线方程,根据标准曲线方程的斜率 S 可以计算扩增效率(E): $E=10^{-S}-1$

(vi) 神经传导. 大鼠用 10%的水合氯醛腹腔注射(400 mg/kg 体重)麻醉,俯卧在操作台上,暴露头盖骨、脊髓的 L_2 和 T_8 及左后肢的坐骨神经. 应用丹麦丹迪肌电图(EMG)/诱发电位(EP)系统(Skovlunde, Denmark)评价体感诱发电位和传导速度. 电极采用 15 mm 华佗牌毫针,记录电极安放在 L_1 和 L_2 之间的棘间韧带,皮层记录电极安放在 T_7 和 T_8 之间的棘间韧带. 参考电极安放在距记录电极 1~2 cm 远处,刺激电极安放在腓骨头处,刺激量以踝关节出现轻微活动为宜,0.4~0.8 mA,刺激周期为 0.2 ms;频率为 30 Hz,叠加 200 次;扫描速度为 3 ms/D;敏感性为 10 μ V/D. 身体表面的刺激点被固定于另一个腓骨头,然后评估从刺激点到 L_{1-2} , T_{7-8} 的传导时间和 L_2 - T_8 的脊髓传导速度.

(vii) 统计分析. 各组数据以均数 $\pm$ 标准差(mean $\pm$ SD)表示. 数据需经正态分布检验,多组间比较用单因素方差分析(one-way ANOVA),然后执行 Tukey 或 Dunnet 检验, BBB 评分作为中位数(四分位差)出现,因为数据非正态分布. 组间 BBB 评分的差别被 Kruskal-Wallis 检验证实,采用 Mann-Whitney U 检验进行 BBB 评分的实验事后分析. $P < 0.05$ 被认为是具有统计学的意义的,当执行 Mann-Whitney U 检验时,显著水平调节为 0.005 (= 0.05/number of post-hoc tests). 应用 SPSS 统计软件进行统计分析 (v. 15.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

2 结果

2.1 运动功能

表 1 列出了 4 组大鼠的 BBB 评分,在 3 d 时间点,

假手术组和其他 3 组之间有显著的差异 ($P < 0.001$),正如预期,在 7 和 14 d 时针灸治疗组(电针刺组和预针刺组)的 BBB 评分明显高于模型组($P < 0.001$).

2.2 免疫组织化学和 PCR

BrdU, nestin 和 GFAP 的免疫着色图片列于图 1~3,量化的数据列于表 2. 在每个时间点,针灸治疗组的 BrdU, nestin 和 GFAP 的阳性细胞数明显高于模型组($P < 0.001$),另外,预针刺组的结果优于电针刺组. 神经干细胞标记物的基因表达结果列于表 3,在每个时间点,治疗组的 nestin mRNA, GFAP mRNA 的表达明显高于模型组($P < 0.001$).

2.3 神经传导

表 4 列出各组可检测到 L_2 - T_8 脊髓传导的大鼠只数,在每个时间点假手术组的传导速度快于电针刺组和预针刺组,脊髓损伤后第 14 天,电针刺组的传导速度(12.13 m/s; $n = 4$)和预针刺组(25.04 m/s; $n = 7$)快于模型组 (3.01 m/s; $n = 3$). 另外,第 14 天的电针刺组和预针刺组的传导速度快于第 7 天的传导速度(3.08 m/s 电针刺组($n = 3$); 12.13 m/s 预针刺组($n = 4$)).

3 讨论

本实验研究的目的是评价夹脊电针对脊髓横断大鼠细胞增殖和神经干细胞标记物 nestin, GFAP 表达的影响. 通过对 BrdU, nestin 和 GFAP 的染色及定量分析,结果显示,夹脊电针能够促进脊髓组织的细胞增殖,包括脊髓横断后电针治疗和夹脊电针预处理.

我们对 3 种神经干细胞的标记物进行评估. 5-溴脱氧尿核苷(BrdU)可以结合细胞分裂期的 DNA,标记分裂增殖的细胞. Nestin 也称为巢蛋白,是一种中间丝蛋白,存在于神经上皮前体细胞;也存在于成年多能干前体细胞^[27]. GFAP 主要用于标记损伤后胶质反应,反应性星形胶质细胞在脊髓损伤中发挥重要

表 1 不同时间点各组大鼠后肢运动功能 BBB 评分变化^{a)}

	假手术组($n = 8$ /时间点)	模型组($n = 8$ /时间点)	电针刺组($n = 8$ /时间点)	预针刺组($n = 8$ /时间点)	P 值
Day 3	21.0 (21.0, 21.0) ^a	0 (0, 0) ^b	0 (0, 0) ^b	0 (0, 0) ^b	<0.001 [*]
Day 7	21.0 (21.0, 21.0) ^a	1.0 (0, 1.0) ^b	2.0 (1.5, 2.0) ^c	4.0 (3.5, 4.5) ^d	<0.001 [*]
Day 14	21.0 (21.0, 21.0) ^a	4.0 (3.0, 4.5) ^b	6.0 (5.5, 6.0) ^c	8.5 (7.5, 9.5) ^d	<0.001 [*]

a) 数据以中值(四分位差)呈现, Kruskal-Wallis 检验; 执行 Mann-Whitney U 检验以调整后的 α' (= 0.05/10 = 0.005) 进行实验事后分析. *表示 4 组之间显著不同. 不同的字母(a, b, c, d)表明组间有差异($P < 0.005$)

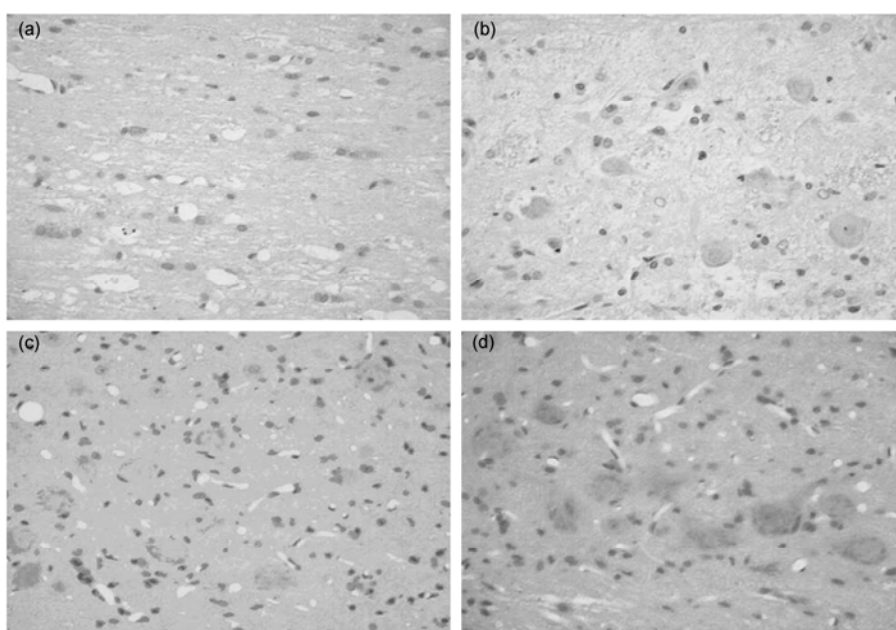


图 1 脊髓组织中 nestin 免疫组化染色图

(a) 假手术组; (b) 模型组; (c) 预针刺组; (d) 脊髓横断后 7 d 电针刺组

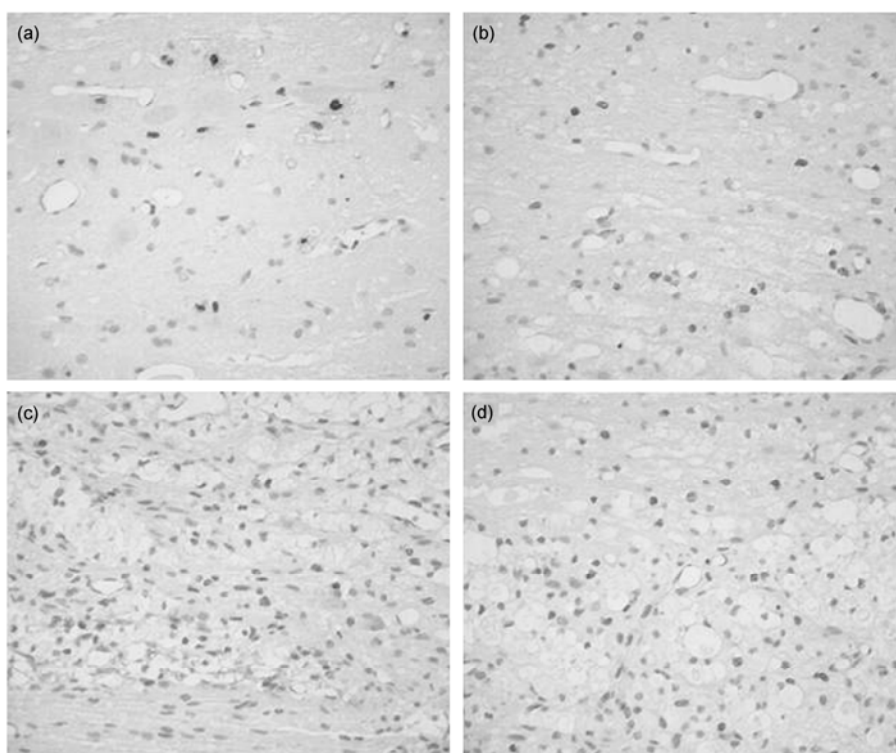


图 2 脊髓组织中 BrdU 免疫组化染色图

(a) 假手术组; (b) 模型组; (c) 预针刺组; (d) 脊髓横断后 7 d 电针刺组

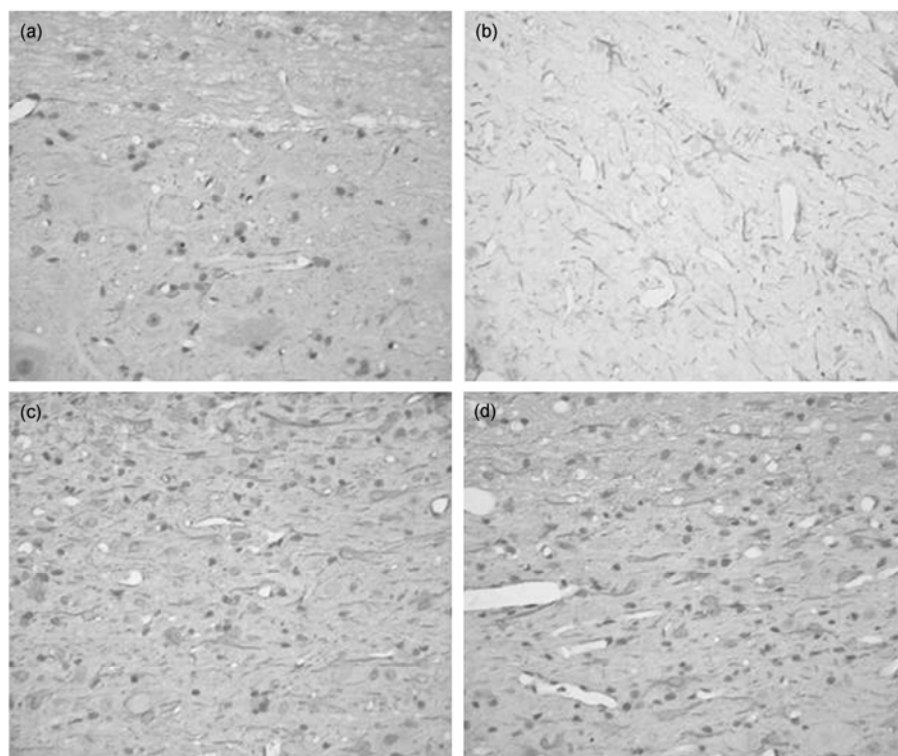


图3 脊髓组织中 GFAP 免疫组化染色图像

(a) 假手术组; (b) 模型组; (c) 预针刺组; (d) 脊髓横断后 7 d 电针刺组

表2 组间神经干细胞标记物阳性细胞表达情况(细胞数/mm²)^{a)}

	假手术组(<i>n</i> = 4/时间点)	模型组(<i>n</i> = 4/时间点)	电针刺组(<i>n</i> = 4/时间点)	预针刺组(<i>n</i> = 4/时间点)	<i>P</i> 值
Day 3					
Nestin	4.7±1.9 ^a	38.4±5.4 ^b	86.3±2.3 ^c	111.3±3.7 ^d	<0.001 [*]
BrdU	60.9±6.5 ^a	263.8±9.8 ^b	590.9±18.7 ^c	860.9±22.0 ^d	<0.001 [*]
GFAP	34.1±3.4 ^a	73.4±4.7 ^b	183.4±4.1 ^c	274.7±19.6 ^d	<0.001 [*]
Day 7					
Nestin	3.4±1.2 ^a	67.8±5.3 ^b	123.4±5.1 ^c	170.0±5.9 ^d	<0.001 [*]
BrdU	60.9±8.3 ^a	416.6±20.2 ^b	890.9±39.5 ^c	1508.1±26.0 ^d	<0.001 [*]
GFAP	30.6±5.3 ^a	129.7±11.0 ^b	276.3±22.9 ^c	442.8±8.3 ^d	<0.001 [*]
Day 14					
Nestin	5.0±1.0 ^a	30.9±3.7 ^b	74.7±2.1 ^c	104.4±3.9 ^d	<0.001 [*]
BrdU	55.6±8.6 ^a	99.1±4.7 ^b	439.1±12.2 ^c	834.7±19.2 ^d	<0.001 [*]
GFAP	32.2±4.5 ^a	48.8±6.5 ^a	172.5±8.4 ^b	231.6±13.3 ^c	<0.001 [*]

a) 数据以平均数±标准差表示, 多组间比较用单因素方差分析. Tukey 或 Dunnett 检验用于实验事后分析. *表示 4 组之间显著不同. 不同的字母(a, b, c, d)表明组间有差异(*P* < 0.05)

的作用^[28,29], Lang 等人^[30]报道星型胶质细胞能逆向分化为神经干细胞. 因此, 我们认为这 3 种标记物的结合表示了神经干细胞的激活.

神经传导实验反应了运动功能评价的结果, 脊髓横断后诱发电位的未引出, 随后在 7~14 d 诱发电

位部分恢复, 夹脊电针促进了诱发电位的恢复, 夹脊电针预处理的治疗效果特别明显. 我们没有进行波幅的定量比较, 但视觉的评定显示组间没有明显的差异. 在 7 和 14 d 电针刺组尤其是预针刺组的脊髓传导速度快于模型组, SCCV 被提高.

表 3 组间神经干细胞标记物的基因表达^{a)}

	假手术组(<i>n</i> = 4/时间点)	模型组(<i>n</i> = 4/时间点)	电针刺组(<i>n</i> = 4/时间点)	预针刺组(<i>n</i> = 4/时间点)	<i>P</i> 值
Day 3					
GAPDH	16.4 ± 0.7	17.1 ± 0.5	17.0 ± 0.4	17.1 ± 0.5	0.249
GFAP	19.8 ± 0.9 ^a	17.3 ± 1.0 ^b	14.5 ± 0.5 ^c	13.9 ± 0.4 ^c	<0.001*
Nestin	27.4 ± 0.6 ^a	23.7 ± 0.7 ^b	22.2 ± 0.7 ^c	21.1 ± 0.3 ^c	<0.001*
Day 7					
GAPDH	17.0 ± 0.4	17.7 ± 0.2	17.7 ± 0.7	17.6 ± 0.3	0.108
GFAP	20.0 ± 0.7 ^a	16.9 ± 0.6 ^b	14.7 ± 0.5 ^c	12.2 ± 0.6 ^d	<0.001*
Nestin	27.0 ± 0.9 ^a	24.8 ± 0.5 ^b	22.0 ± 0.4 ^c	19.8 ± 0.4 ^d	<0.001*
Day 14					
GAPDH	17.3 ± 0.7	17.9 ± 0.5	17.5 ± 0.5	17.5 ± 0.6	0.567
GFAP	19.3 ± 0.6 ^a	17.4 ± 0.4 ^b	14.7 ± 0.6 ^c	13.8 ± 0.6 ^c	<0.001*
Nestin	27.5 ± 0.8 ^a	24.6 ± 0.5 ^b	22.0 ± 0.5 ^c	20.8 ± 0.6 ^c	<0.001*

a) 数据以 ct 值平均数±标准差表示, 多组间比较用单因素方差分析. Tukey 或 Dunnett 检验用于实验事后分析. *表示 4 组之间显著不同. 不同的字母(a, b, c, d)表明组间有差异(*P* < 0.05)

表 4 可检测到 L₂–T₈ 脊髓传导的大鼠只数

	假手术组(<i>n</i> = 8/时间点)	模型组(<i>n</i> = 8/时间点)	电针刺组(<i>n</i> = 8/时间点)	预针刺组(<i>n</i> = 8/时间点)
Day 3	8	0	1	1
Day 7	8	1	3	4
Day 14	8	3	4	7

大量实验和临床研究显示, 针灸预处理对心、脑、胃肠、脊髓等部位缺血、缺氧有良好的保护作用, 研究认为, “预处理”可产生一些触发因子, 通过一些中介物质的介导而产生保护作用^[31]. 我们的实验结

果显示, 夹脊电针预处理组的效果优于电针刺组, 因此, 预处理也能促进内源性神经干细胞活化, 今后的研究有必要证实目前的发现, 并能进一步地说明夹脊电针对内源性神经干细胞影响的机制.

参考文献

1 Lie D C, Song H, Colamarino S A, et al. Neurogenesis in the adult brain: New strategies for central nervous system diseases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2004, 44: 399–421

2 张辉, 尹宗生. 神经干细胞在治疗实验性脊髓损伤中的应用进展. *国外医学-生物医学工程分册*, 2005, 28: 160–163

3 Ingvar S. Reaction of cells to the galvanic current in tissue cultures. *Proc Socexpbiol Med*, 1920, 17: 189–198

4 李群. 电刺激促进中枢神经系统内源性神经干细胞的增殖与分化及在脊髓损伤中的作用. *针刺研究*, 2008, 33: 34–36

5 Zhao M, Song B, Pu J, et al. Electrical signals control wound healing through phosphatidylinositol-3-OH kinase-gamma and PTEN. *Nature*, 2006, 442: 457–460

6 崔晓军, 李伊为, 陈东风, 等. 督脉电针对脊髓损伤大鼠神经干细胞的作用. *解剖学研究*, 2002, 24: 180–183

7 Ding Y, Yan Q, Ruan J W, et al. Electro-acupuncture promotes survival, differentiation of the bone marrow mesenchymal stem cells as well as functional recovery in the spinal cord-transected rats. *BMC Neurosci*, 2009, 10: 35

8 何丽娜, 袁章, 陈炜, 等. 电刺激治疗脊髓损伤的实验及临床研究进展. *中国康复理论与实践*, 2009, 15: 720–722

9 王振宇, 孙忠人, 刘睿姝. 电针夹脊穴对脊髓损伤大鼠皮层体感诱发电位的影响. *中国康复理论与实践*, 2009, 15: 938–941

10 Cheng D A. *The Study of Chinese Acupuncture and Moxibustion*. Beijing: People's Medical Publishing House, 1955

11 高维滨. *神经病针灸新疗法*. 北京: 人民卫生出版社, 2002

12 王新家, 孔抗美. 电刺激与脊髓再生研究进展. *汕头大学医学院学报*, 2002, 15: 58–60

13 黎桃英. 电针夹脊穴治疗脊髓损伤的疗效观察. *上海针灸杂志*, 2002, 21: 42

- 14 吴永刚, 孙忠人, 李晓燕, 等. 针刺对大鼠脊髓损伤血流量变化影响的研究. 中国中医药科技, 1995, 2: 14–16
- 15 Borgens R B, Blight A R, Murphy D J, et al. Transected dorsal column axons within the guinea pig spinal cord regenerate in the presence of an applied electric field. *J Comp Neurol*, 1986, 250: 168–180
- 16 Fehlings M G, Tator C H, Linden R D. The effect of direct-current field on recovery from experimental spinal cord injury. *J Neurosurg*, 1988, 68: 781–792
- 17 董永泉, 胥少汀. 实验性脊髓损伤的脉冲电场治疗. 中华外科杂志, 1992, 30: 180–183
- 18 张志英, 崔云华, 严振国. 电针对脊髓损伤后细胞凋亡的影响. 中国临床康复, 2002, 6: 818–819
- 19 张志英, 余安胜, 严振国. 电针对脊髓损伤早期 bcl-2 mRNA 及蛋白表达的影响. 中国针灸, 2003, 23: 473–476
- 20 Borgens R B, Blight A R, McGinnis M E. Functional recovery after spinal cord hemisection in guinea pigs: The effects of applied electric fields. *J Comp Neurol*, 1990, 296: 634–653
- 21 Coumans J V, Lin T T, Dai H N, et al. Axonal regeneration and functional recovery after complete spinal cord transection in rats by delayed treatment with transplants and neurotrophins. *J Neurosci*, 2001, 21: 9334–9344
- 22 Potas J R, Zheng Y, Moussa C, et al. Augmented locomotor recovery after spinal cord injury in the athymic nude rat. *J Neurotrauma*, 2006, 23: 660–673
- 23 Lin W Z. *Experimental Acupuncture Science*. Shanghai: Shanghai Science and Technology Publishing House, 1997
- 24 张力, 熊东林, 陈葵好. 电针联合骨髓基质细胞移植对脊髓损伤大鼠神经功能恢复的影响. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13: 5217–5220
- 25 Basso D M, Beattie M S, Bresnahan J C. Graded histological and locomotor outcomes after spinal cord contusion using the NYU weight-drop device versus transection. *Exp Neurol*, 1996, 139: 244–256
- 26 Pfaffl M W, Horgan G W, Dempfle L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30: e36
- 27 Gritti A, Parati E A, Cova L, et al. Multipotential stem cells from the adult mouse brain proliferate and self-renew in response to basic fibroblast growth factor. *J Neurosci*, 1996, 16: 1091–1100
- 28 Ao Q, Wang A J, Chen G Q, et al. Combined transplantation of neural stem cells and olfactory ensheathing cells for the repair of spinal cord injuries. *Med Hypotheses*, 2007, 69: 1234–1237
- 29 Iriki A, Sakura O. The neuroscience of primate intellectual evolution: Natural selection and passive and intentional niche construction. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2008, 363: 2229–2241
- 30 Lang B, Liu H L, Liu R, et al. Astrocytes in injured adult rat spinal cord may acquire the potential of neural stem cells. *Neuroscience*, 2004, 128: 775–783
- 31 Tatlisumak T, Takano K, Carano R A, et al. Delayed treatment with an adenosine kinase inhibitor, GP683, attenuates infarct size in rats with temporary middle cerebral artery occlusion. *Stroke*, 1998, 29: 1952–1958