

振荡电场对脊髓损伤大鼠 β -catenin 蛋白表达和神经元再生的影响

张坤坤, 钱军, 黄先甲, 荆珏华

摘要 目的 观察振荡电场对脊髓损伤大鼠 β -catenin 蛋白表达规律和神经元再生的影响。方法 60 只 SD 大鼠采用改良 Allen's 打击法建立脊髓损伤模型, 随机分为对照组和实验组。实验组施加振荡电场干预, 对照组只置入振荡电场刺激器而不予干预。建模成功后分别在 3、7、14 d 取大鼠脊髓, 行 HE 染色观察脊髓大体形态变化, 采用 Western blot 和免疫组化技术检测脊髓中 β -catenin 蛋白表达规律, 行免疫荧光检测观察神经元变化情况, 并在取材前对两组大鼠行 Basso-Beattie-Bresnahan (BBB) 行为学评分。结果 Western blot 和免疫组化结果均显示, 3 d 时两组脊髓灰质内 β -catenin 蛋白均高表达, 随时间延长表达量逐渐减少, 同时实验组在各时间点 β -catenin 蛋白表达量均高于对照组 ($P < 0.05$)。神经元的表达在 3 ~ 14 d 时呈现递增的趋势, 但实验组神经元在表达数量上明显优于对照组, 同时细胞形态更加规则。两组 BBB 评分 3、7 d 时差异无统计学意义, 而 14 d 时, 实验组 BBB 评分明显高于对照组 ($P < 0.05$)。结论 振荡电场可以提高大鼠脊髓损伤区域 β -catenin 蛋白表达量, 并促进神经元再生, 从而改善受损脊髓神经功能。

关键词 振荡电场; 脊髓损伤; 大鼠; β -catenin 蛋白; 神经元

中图分类号 R 381.0; R 681.54

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2017)03-0351-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.03.010

急性脊髓损伤 (spinal cord injury, SCI) 是指车祸、高处坠落等创伤事件导致脊髓神经结构完整性遭到破坏, 从而造成严重的感觉和运动功能障碍^[1]。振荡电场刺激 (oscillating field stimulation, OFS) 技术发展了 20 余年, 研究^[2-3]证实 OFS 可以有效改善 SCI 后神经传导功能。OFS 的特性是每 15 min 变换一次电极, 在阳极轴突没有萎缩前促进轴突向阴极生长, 从而实现 SCI 区轴突双向生长。研究^[4]显示电场刺激可以激活大鼠体内 Wnt 信号通

路, 改善 SCI 区域微环境, 从而促进脊髓神经功能的恢复。作为 Wnt 信号通路中的主要信号分子, β -catenin 蛋白能够调节神经干细胞的增殖和分化^[5]。该研究旨在观察 OFS 对 SCI 大鼠体内 β -catenin 蛋白表达和神经元再生的影响, 以期对 OFS 治疗 SCI 机制进行初步探讨, 为 OFS 治疗 SCI 提供一定的理论基础和科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 雌性 SD 大鼠 60 只, (230 ± 10) g, 清洁级, 购自安徽医科大学实验动物中心。大鼠在使用过程中严格遵循安徽省实验动物管理条例, 并且尽可能减少大鼠的痛苦及使用数量。

1.1.2 主要试剂和仪器 抗 β -catenin 抗体、抗 MAP2 抗体 (英国 Abcam 公司); 抗 β -actin 抗体 (合肥 Biosharp 公司); 一步法抗兔即用型免疫组织化学检测试剂盒、Alex488 荧光二抗、辣根酶标记羊抗小鼠/兔二抗 (北京中杉金桥生物技术有限公司); Western blot 试剂盒 (美国 ThermoFisher 公司); 振荡电场刺激器 (北京中国科学院电工研究所), 荧光正置显微镜 (日本奥林巴斯公司)。

1.2 方法

1.2.1 实验动物分组及处理 60 只成年 ♀ SPF 级 SD 大鼠随机分为实验组和对照组, 每组 30 只。实验组术后即开始给予 OFS 干预, 对照组只置入 OFS 器而不予干预。电场强度为 400 mv/mm, 电场极性每 15 min 变换 1 次, 刺激时间为大鼠清醒状态下持续刺激直至实验结束。

1.2.2 脊髓损伤模型制备 所有大鼠采用改良 Allen's 打击法建立大鼠 SCI 模型。大鼠经腹腔注射 2% 戊巴比妥钠 (1 ml/100 g) 麻醉后固定于脊髓损伤 NYU 打击器平台, 常规消毒后取背部后正中切口, 依次切开皮肤和皮下组织, 沿肌肉走行钝性剥离双侧椎旁肌, 显露并咬除 T10 棘突和椎板, 充分暴露硬脊膜并保持其完整性, 对大鼠脊髓实施 5 g/10 cm 的势能撞击。大鼠出现后肢、尾部痉挛及硬膜充血

2016-12-06 接收

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (编号: 81471273)

作者单位: 安徽医科大学第二附属医院骨科, 合肥 230601

作者简介: 张坤坤, 男, 硕士研究生;

荆珏华, 男, 副教授, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-

mail: jjhefy@sina.com

提示造模成功。造模成功后用丝线将 OFS 器的电极缝合固定到 T9、T11 棘突两侧,再逐层缝合切口,刺激器固定于大鼠背部。大鼠麻醉苏醒后分笼饲养,予以青霉素 20 万单位腹腔注射,2 次/d,连续 3 d。每日按摩膀胱促排尿两次,并消毒会阴周围,预防并发症。

1.2.3 后肢运动功能评分 在术后 3、7、14 d 采用 Basso-Beattie-Bresnahan (BBB) 评分系统检测大鼠后肢运动功能恢复情况,最后取其平均值。评分采用双盲法,评分者为熟悉掌握 BBB 评分标准人员。

1.2.4 脊髓取材及标本制作 在造模成功后第 3、7、14 天行 2% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉后处死大鼠。取包括 SCI 位点及头尾端组织约 1 cm 长,部分标本迅速转移至液氮冻存,备用行 Western blot 检测,剩余标本在 4% 多聚甲醛中固定 12 h,常规脱水,石蜡包埋,从损伤位点处行连续横向切片,切片厚度为 4 μm,分别行 β-catenin 免疫组化、MAP2 免疫荧光检测,部分切片做 HE 染色。每个标本随机选取 10 张切片,每张切片选取 5 个高倍视野,取平均值。

1.2.5 组织学观察 取上述切片常规脱蜡和水化,抗原高温修复,山羊血清 37 °C 封闭 30 min,免疫组化检测加入兔多克隆抗体 β-catenin (1 : 1 000 稀释),4 °C 过夜,PBS (pH = 7.2 ~ 7.4) 溶液漂洗 3 次,每次各 5 min,加入二抗,37 °C 孵育 20 min,PBS 溶液漂洗 3 次,每次各 5 min,二氨基联苯胺 (3,3'-diaminobenzidine, DAB) 显色,苏木精复染,盐酸酒精分化,脱水、透明、封片、拍照,应用 Image ProPlus 6.0 软件对 β-catenin 蛋白阳性表达的照片测量累积光密度值;免疫荧光检测加入兔多克隆抗体 MAP2 (1 : 500 稀释),4 °C 过夜,PBS 溶液漂洗 3 次,每次各 5 min,加入 Alexa Fluor 488 山羊抗兔 IgG 二抗 (1 : 500 稀释),37 °C 孵育 1 h,PBS 溶液漂洗 3 次,每次各 5 min,DAPI 室温染核 10 min,漂洗干净后滴加适量抗荧光淬灭剂封片,用荧光显微镜拍照、计数并观察细胞形态。

1.2.6 Western blot 检测 将上述 -80 °C 保存的大鼠脊髓组织在冰上研磨后,用 RIPA 裂解液提取总蛋白,采用 2,2-联喹啉-4,4-二甲酸二钠 (bicinchoninic acid, BCA) 法进行总蛋白定量,100 °C 水浴 10 min 使蛋白变性,与蛋白上样缓冲液混匀后,经过聚丙烯酰胺凝胶电泳 2 h 后再以平行电泳方式转移到活化后的 PVDF 膜上。置于 5% 脱脂牛奶中封闭 1 h,加入 β-catenin 一抗 4 °C 过夜,TBST 溶液洗涤 3

次,每次 5 min,后加入辣根过氧化物酶标记的二抗 (1 : 1 000 稀释),室温下孵育 1 h,TBST 溶液洗涤 3 次,每次 5 min,然后使用 ECL 法显色,显影仪显影,以 β-actin 作为内参。测定灰度值,以目的蛋白与内参 β-actin 的灰度比值作为其相对表达水平。

1.3 统计学处理 应用 SPSS 13.0 统计软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BBB 行为学评分 两组大鼠 SCI 后,随着时间推移,后肢运动功能均有一定程度的改善。术后 3、7 d 时两组之间 BBB 评分差异无统计学意义,而 14 d 时,实验组 BBB 评分明显高于对照组 (*P* < 0.05),见表 1。

表 1 两组大鼠在不同时间点的 BBB 评分 (*n* = 30, $\bar{x} \pm s$)

时间(d)	对照组	实验组	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
3	1.40 ± 0.55	1.20 ± 0.45	0.63	>0.05
7	3.60 ± 0.89	4.40 ± 1.14	1.23	>0.05
14	4.80 ± 0.84	7.60 ± 0.55	6.26	<0.05

2.2 HE 染色结果 光学显微镜下观察显示,对照组与实验组相比,脊髓组织结构破坏更加严重,出血肿胀较明显,白质残留较少,形成空洞,较多的神经元死亡,见图 1。

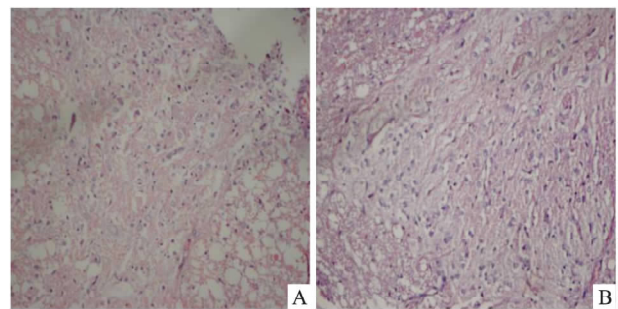


图 1 造模 2 周大鼠脊髓大体形态观察情况 ×200
A: 对照组; B: 实验组

2.3 β-catenin 蛋白免疫组化染色结果 免疫组化结果显示在大鼠脊髓横断面切片,光镜下可见 3 d 时两组脊髓灰质内 β-catenin 蛋白均高表达,7 d 时 β-catenin 蛋白逐渐减少,但仍维持在较高水平,14 d 时表达量最少,同时实验组在各时间点 β-catenin 蛋白表达量均高于对照组 (*P* < 0.05),见图 2、表 2。

2.4 β-catenin 蛋白 Western blot 检测 Western

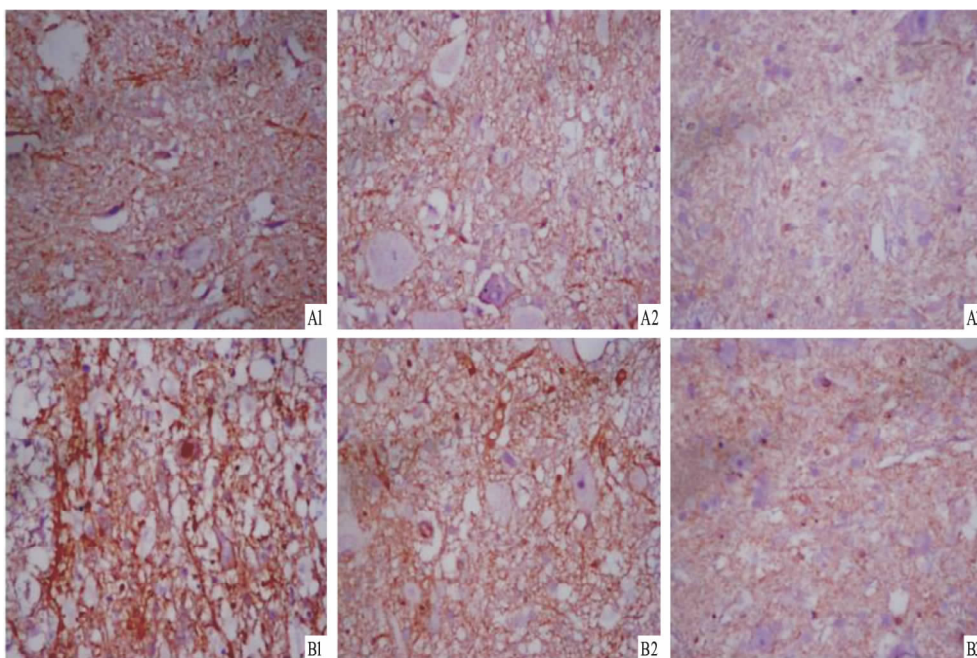


图2 对照组与实验组不同时间点 β -catenin 蛋白免疫组化染色结果 $\times 400$
A: 对照组; B: 实验组; 1: 第3天; 2: 第7天; 3: 第14天

表2 OFS 对 SCI 大鼠脊髓组织中 β -catenin 蛋白表达的影响 ($n = 30, \bar{x} \pm s$)

时间(d)	对照组	实验组	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
3	183.28 \pm 4.52	290.44 \pm 6.74*	26.40	<0.05
7	95.39 \pm 7.43	143.41 \pm 5.89*	10.13	<i>P</i> < 0.05
14	55.20 \pm 7.47	72.12 \pm 5.63*	3.62	<i>P</i> < 0.05

与对照组比较: * *P* < 0.05

blot 结果显示,在 SCI 后各时间点,实验组大鼠 SCI 区 β -catenin 蛋白的表达较对照组明显增加,与免疫组化结果相符。实验组大鼠 3、7、14 d β -catenin 蛋白相对表达量较对照组升高($t = 3.67, 3.58, 5.00, P < 0.05$),见图 3。

2.5 MAP2 标记的神经元荧光染色结果 在脊髓切片同一区域视野内,从 3 ~ 14 d,对照组和实验组内 MAP2 标记的神经元胞体数量均逐渐增多;实验组神经元的胞体数量和体积在 3、7、14 d 的表达均优于对照组。并且,在 14 d 时实验组神经元排列更加有序,细胞突起更加规则,见图 4。

3 讨论

SCI 后损伤区发生组织坏死和细胞凋亡,导致神经系统破坏,同时伤后迅速触发继发性损伤,损伤区出现缺血、缺氧、炎症反应以及神经元的凋亡进一步加重损伤程度,导致脊髓传导功能障碍。普遍观

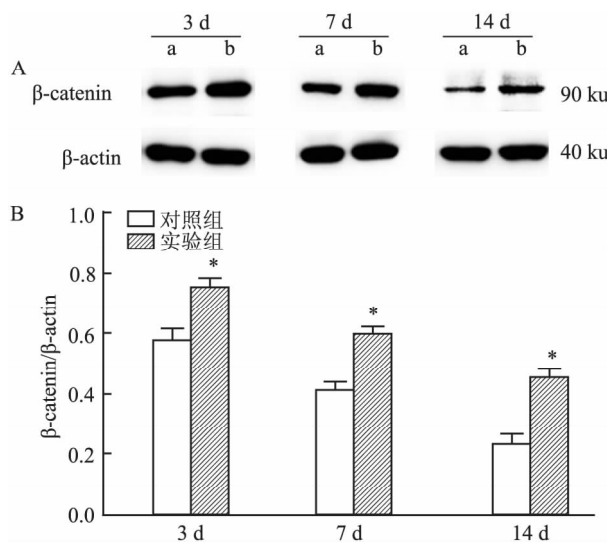


图3 Western blot 检测 SCI 模型大鼠脊髓中 β -catenin 蛋白的表达

A: 大鼠受伤后 3、7、14 d 脊髓中 β -catenin 蛋白的结果; B: 受伤后 3、7、14 d 大鼠脊髓中 β -catenin 蛋白的表达; a: 对照组; b: 实验组; 与对照组比较: * *P* < 0.05

点认为中枢神经系统损伤后,局部微环境变化、自身神经元再生能力有限及胶质瘢痕的形成阻碍了轴突通过,使受损脊髓恢复困难^[6]。因此 SCI 修复的关键在于如何改善损伤区域局部微环境,促进内源性神经干细胞向神经元分化或减少自身神经元的丢

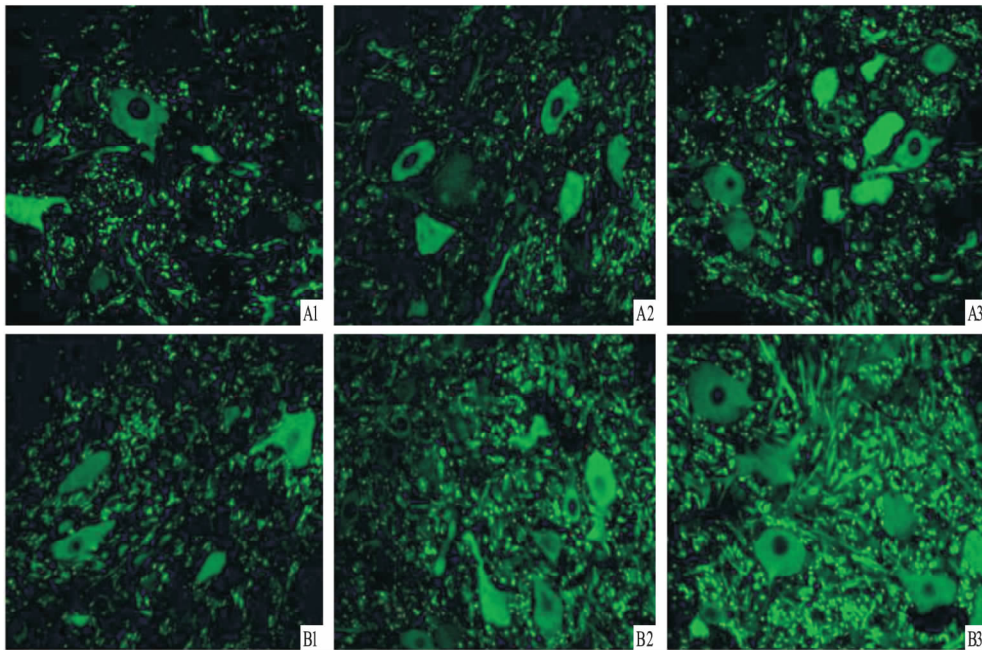


图4 对照组与实验组不同时间点神经元荧光染色结果 ×400
A: 对照组; B: 实验组; 1: 第3天; 2: 第7天; 3: 第14天

失。

Wnt 信号通路是 SCI 微环境中的重要信号通路,研究^[7]证明激活 Wnt 信号通路可以有效改善 SCI 后哺乳动物的感觉和运动功能,其中 β -catenin 蛋白作为主要信号分子发挥重要调节作用。研究^[8]显示辛伐他汀能够抑制 SCI 区神经细胞凋亡,减少组织损伤,促进大鼠运动功能恢复,其机制主要是通过 Wnt 信号通路发挥作用的。Zhou et al^[9]研究证实脉冲电磁场刺激可以改变微环境中的 Wnt 信号通路蛋白的表达,尤其是 Wnt3a、 β -catenin 蛋白。研究^[10]显示在脊髓横断大鼠模型中,电刺激通过上调 Pitx2 的表达激活 Wnt 信号通路,从而促进大鼠瘫痪后肢的恢复。OFS 可以改善 SCI 区域微环境促进受损脊髓轴突再生、髓鞘再形成^[2-3],理论上可以通过电刺激激活 Wnt 信号通路。本研究显示,施加 OFS 干预的实验组不同时间点 β -catenin 蛋白表达量均高于对照组,证实 OFS 可以通过激活 Wnt 信号通路从而促进 β -catenin 蛋白表达。

研究^[11]表明 SCI 后能够刺激内源性神经干细胞增殖、分化并向损伤部位迁移而修复损伤脊髓,但是定向分化为神经元的数量较少,因此脊髓自我修复能力有限。Zhao et al^[12]研究发现通过对体外培养的神经干细胞施加 115 V/m 直流电刺激后,发现电刺激可以促进神经干细胞迁移并向神经元方向分

化。Stewart et al^[13]同样发现人类神经干细胞在受到外在电刺激后,神经干细胞向 β -III Tubulin 标志的神经元分化的数量增多,而胶质纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP) 标记的星形胶质细胞数量减少。本实验采用 OFS 器植入的方式对 SCI 大鼠施加外在电刺激,显示脊髓损伤区域 MAP2 标记的神经元数量优于对照组,神经元排列更加有序,细胞突起更加规则。同时实验组大鼠 14 d 时 BBB 评分明显优于对照组,提示振荡电场可以诱导大鼠 SCI 区神经干细胞向神经元方向分化并在电场刺激下向受损区域迁移,替代坏死神经元,从而促进损伤脊髓结构和功能的恢复。

Wnt 信号通路是神经系统发育的关键途径,其中 β -catenin 蛋白作为主要的信号分子对细胞的增殖、分化起到重要调控作用^[14]。Chen et al^[15]通过体外培养大脑皮层前体细胞并添加脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF),证实 BDNF 主要通过提高 Wnt 信号通路中 Wnt1、 β -catenin 蛋白的表达从而促进神经前体细胞向神经元方向分化,应用 Wnt 信号通路抑制剂 IWR1 后,BDNF 促进神经前体细胞分化的作用受到抑制。Gao et al^[7]发现 SCI 大鼠体内 β -catenin 蛋白含量增加后,可以减少运动神经元的丢失,从而促进大鼠运动功能恢复。本实验结果显示 OFS 可以促进 β -cate-

nin 蛋白表达,同时实验组神经元数量也高于对照组。因此笔者认为对 SCI 大鼠施加 OFS 能够激活 Wnt 信号通路从而提高 β -catenin 蛋白表达量,为 SCI 后神经元再生提供有利的微环境。但由于脊髓组织本身及 SCI 病理生理机制的复杂性,OFS 更深层次的作用机制仍需进一步的研究。

参考文献

- [1] Alam M, Rodrigues W, Pham B N, et al. Brain-machine interface facilitated neurorehabilitation *via* spinal stimulation after spinal cord injury: recent progress and future perspectives [J]. Brain Res, 2016, 1646: 25–33.
- [2] Zhang C, Zhang G H, Wang A H, et al. Oscillating field stimulation promotes recovery after spinal cord injury in rats: Assessment using behavioral, electrophysiological and histological evaluations [J]. Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc, 2015, 2015: 4594–7.
- [3] Jing J H, Qian J, Zhu N, et al. Improved differentiation of oligodendrocyte precursor cells and neurological function after spinal cord injury in rats by oscillating field stimulation [J]. Neuroscience, 2015, 303: 346–51.
- [4] Wu Y, Collier L, Qin W, et al. Electrical stimulation modulates Wnt signaling and regulates genes for the motor endplate and calcium binding in muscle of rats with spinal cord transection [J]. BMC Neurosci, 2013, 14: 81.
- [5] Chen F, Wang H X, Xiang X, et al. Curcumin increased the differentiation rate of neurons in neural stem cells *via* wnt signaling in vitro study [J]. J Surg Res, 2014, 192(2): 298–304.
- [6] 潘伟, 尹宗生, 张辉, 等. 鞘内注射神经生长因子对脊髓损伤大鼠运动功能恢复及神经细胞变化的影响 [J]. 安徽医科大学学报, 2011, 46(9): 875–9.
- [7] Gao K, Wang Y S, Yuan Y J, et al. Neuroprotective effect of rapamycin on spinal cord injury *via* activation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. Neural Regen Res, 2015, 10(6): 951–7.
- [8] Gao K, Shen Z L, Yuan Y J, et al. Simvastatin inhibits neural cell apoptosis and promotes locomotor recovery *via* activation of Wnt/ β -catenin signaling pathway after spinal cord injury [J]. J Neurochem, 2016, 138(1): 139–49.
- [9] Zhou J, He H, Yang L, et al. Effects of pulsed electromagnetic fields on bone mass and Wnt/ β -catenin signaling pathway in ovariectomized rats [J]. Arch Med Res, 2012, 43(4): 274–82.
- [10] Wu Y, Collier L, Qin W, et al. Electrical stimulation modulates Wnt signaling and regulates genes for the motor endplate and calcium binding in muscle of rats with spinal cord transection [J]. BMC Neurosci, 2013, 14: 81.
- [11] 胡博, 尹宗生. 内源性神经干细胞治疗脊髓损伤的研究进展 [J]. 安徽医科大学学报, 2011, 46(1): 83–6.
- [12] Zhao H, Steiger A, Nohner M, et al. Specific intensity direct current (DC) electric field improves neural stem cell migration and enhances differentiation towards β III-Tubulin+ neurons [J]. Plos One, 2015, 10(6): e0129625.
- [13] Stewart E, Kobayashi N R, Higgins M J, et al. Electrical stimulation using conductive polymer polypyrrole promotes differentiation of human neural stem cells: a biocompatible platform for translational neural tissue engineering [J]. Tissue Eng Part C Methods, 2015, 21(4): 385–93.
- [14] Kumar D U, Devaraj H. Expression of Wnt 3a, β -catenin, cyclin D1 and PCNA in mouse dentate gyrus subgranular zone (SGZ): a possible role of Wnt pathway in SGZ neural stem cell proliferation [J]. Folia Biol (Praha), 2012, 58(3): 115–20.
- [15] Chen B Y, Wang X, Wang Z Y, et al. Brain-derived neurotrophic factor stimulates proliferation and differentiation of neural stem cells, possibly by triggering the Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. J Neurosci Res, 2013, 91(1): 30–41.

Oscillating field stimulation on expression of β -catenin protein and neurons regeneration in rat with spinal cord injury

Zhang Kunkun, Qian Jun, Huang Xianjia, et al

(Dept of Orthopedics, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601)

Abstract Objective To explore the influence of oscillating field stimulation on expression of β -catenin protein and neurons regeneration in rat with spinal cord injury. **Methods** Sixty SD rats with spinal cord injury induced by Allen's method were randomly divided into experimental group and control group. The experimental group was implanted oscillating electrical field as intervention, while the control group just received oscillating electric field stimulator but not applied stimulus. At 3, 7, 14 d after experiment, Basso-Beattie-Bresnahan (BBB) Rating Scale was used to observe the recovery of motor function. Western blot, immunohistochemistry and immunofluorescence staining were used to analyze the expression of β -catenin protein and neurons regeneration of SD rats. The statistical analysis was performed between the two groups. **Results** BBB scores showed no significant difference at 3, 7 d in two groups, while BBB scores presented a significant difference at 14 d ($P < 0.05$). Western blot and immunohistochemistry results showed that the expression of β -catenin protein was higher than the control group at each time

靶向沉默 HDAC6 对乳鼠心房肌成纤维细胞活化增殖的作用

曹 炜, 石开虎, 陶 辉, 施 鹏, 吴 超, 宣海洋, 沙纪名, 占红英

摘要 目的 探究组蛋白去乙酰化酶(HDAC6)对乳鼠心房肌成纤维细胞活化增殖的影响作用。方法 将50只乳鼠(雄性)分别提取心房肌成纤维细胞,应用Western blot法测定HDAC6和 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)的表达情况;运用qRT-PCR技术检测HDAC6和 α -SMA mRNA的表达情况;MTT法检测心房肌成纤维细胞的细胞增殖活性;使用Lipofectamine™ 2000 Reagent向心房肌成纤维细胞中转染小干扰RNA HDAC6(siRNA-HDAC6)后观察对心房肌成纤维细胞增殖的影响。结果 转染心房肌成纤维细胞 siRNA-HDAC6组HDAC6和 α -SMA的蛋白表达明显下降;qRT-PCR技术检测siRNA-HDAC6组中HDAC6和 α -SMA的mRNA表达明显下降;转染siRNA-HDAC6明显抑制心房肌成纤维细胞的增殖活性。结论 靶向沉默HDAC6可抑制心房肌成纤维细胞活化增殖,提示其在心房纤维化中可能发挥调控作用。

关键词 心房肌成纤维细胞; HDAC6; α -SMA

中图分类号 R 541

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2017)03-0356-04
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.03.011

心房肌成纤维细胞增殖和以胶原纤维为主的细胞外基质增多,继而导致心房纤维化的发生^[1]。组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylases, HDACs)在心房纤维化发生发展过程中的重要作用已成为临床研究热点问题。研究^[2]表明HDACs在心血管方面的

疾病中有着广泛表达,具有促进心肌肥大作用。而该实验研究的组蛋白去乙酰化酶6(histone deacetylase 6, HDAC6)作为II型组蛋白去乙酰化酶家族中的一员,在纤维化疾病的发生发展中发挥重要作用^[3]。然而有关HDAC6对心房肌成纤维细胞中的作用鲜有报道。该研究将通过转染siRNA-HDAC6对乳鼠心房肌细胞增殖活性的影响,探索心房纤维化发生的分子机制,为房颤心房纤维化的防治提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 SPF级SD乳鼠(雄性)50只,1周龄,(20±5)g,购自安徽医科大学实验动物中心。

1.1.2 药品与试剂 MTT相关试剂(美国Sigma公司);脂质体2000、TRIzol试剂(美国Invitrogen公司);新生牛血清(杭州四季青公司);PrimeScript™ RT Master Mix(日本TaKaRa公司);HDAC6抗体(美国Abcam公司); α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)、 β -actin(武汉博士德公司);二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司);逆转录试剂盒、SYBR-Green试剂(立陶宛Fermentas公司);上海生工合成引物 α -SMA、HDAC6和 β -actin。

1.2 方法

1.2.1 取材 用75%乙醇溶液浸泡乳鼠15s,用眼科剪取出心脏,置于预冷PBS中。用预冷PBS(含双抗)清洗3次,去除血污。将心脏组织剪成约1mm×1mm×1mm的组织块,备用。

1.2.2 组织消化 用胶原酶(II型)和胰蛋白酶(体积比1:1)联合消化心肌组织,37℃水浴,消化

2016-12-23 接收

基金项目:安徽省高校自然科学研究项目(编号:KJ2015A320);安徽省科技攻关项目(编号:1501041148)

作者单位:安徽医科大学第二附属医院心胸外科,安徽医科大学心血管病研究中心,合肥 230601

作者简介:曹 炜,男,副主任医师,硕士研究生;

石开虎,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者, E-mail: shikaihu@gmail.com

point($P < 0.05$), and the expression of β -catenin protein gradually decreased with the extension of the time in the two groups. Neurons expressed an increasing trend from 3 d to 14 d, while the number of neuron in the experimental group expressed better than that in the control group, and cell morphology was more regular. **Conclusion** Oscillating field stimulation can improve the expression of β -catenin protein and neurons regeneration in the injured spinal cord, which would contribute to neurological improvement after spinal cord injury.

Key words spinal cord injury; oscillating field stimulation; rat; β -catenin protein; neuron