

• 实验研究 •

补阳还五汤对大鼠脊髓损伤修复与运动功能康复的作用研究*

邹礼梁¹, 王 奎¹, 满夏楠¹, 刘学红², 陈健尔^{1△}

(1. 浙江中医药大学, 浙江 杭州 310053; 2. 绍兴文理学院, 浙江 绍兴 312000)

摘要: **目的** 探讨中医补阳还五汤对大鼠脊髓损伤后脊髓组织星形胶质细胞胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)和巢蛋白(Nestin)表达的影响及其促进脊髓损伤修复的作用机制。**方法** 大鼠随机分为假手术组(Sham 组)、模型组(Model 组)、补阳还五汤低剂量组(L-BYHWD 组)、补阳还五汤中剂量组(M-BYHWD 组)和补阳还五汤高剂量组(H-BYHWD 组)。Model 组、补阳还五汤低、中、高 4 组大鼠行脊髓左侧半横断损伤;模型组不行药物干预,补阳还五汤低、中、高 3 组分别使用不同剂量补阳还五汤连续灌胃。用免疫组织化学法检测不同组大鼠经补阳还五汤治疗后不同时间段损伤区脊髓组织内 GFAP 和 Nestin 表达情况, BBB 评分评估大鼠后肢运动功能。**结果** 补阳还五汤干预后大鼠 BBB 评分明显高于同时期 Model 组大鼠($P<0.05$)。脊髓损伤后大鼠脊髓组织 GFAP 表达出现明显上调,补阳还五汤干预后 GFAP 表达出现下调。M-BYHWD 组和 H-BYHWD 组大鼠脊髓组织 GFAP 表达明显低于同时期 Model 组($P<0.05$);H-BYHWD 组大鼠 GFAP 表达在术后 3~7d 明显低于同时期 M-BYHWD 组($P<0.05$),而术后 14~28d 二者无显著差异($P>0.05$)。补阳还五汤干预的脊髓组织 Nestin 表达水平平均高于同时期 Model 组($P<0.05$);中、高剂量组 Nestin 表达水平明显高于同时期低剂量组和 Model 组($P<0.05$),而中、高剂量组之间 Nestin 表达水平无显著差异($P>0.05$)。**结论** 补阳还五汤能促进大鼠脊髓损伤的修复和运动功能的康复,其作用机制可能与抑制 GFAP 表达减少瘢痕形成、上调 Nestin 表达促进神经修复有关。

关键词: 脊髓损伤; 补阳还五汤; 剂量; 胶质纤维酸性蛋白; 巢蛋白

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2723(2016)04-0001-05

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2016.04.001

脊髓损伤是一种严重的神经系统疾病,导致感觉或运动功能暂时性甚至永久性的丧失^[1]。脊髓损伤主要是在外力作用下撞击、压缩、牵拉、撕裂脊髓致使脊髓实质受损、血管破裂,继而导致正常脊髓微环境发生改变,致使神经细胞凋亡、胶质瘢痕形成等,严重阻碍神经功能的修复^[2]。目前临床上采用的物理治疗方法对脊髓损伤患者的康复非常重要,但效果仍然相对局限,结合传统中医药治疗方法可能获得更好的效果。中医传统方药补阳还五汤在治疗脊髓损伤方面取得较好的疗效^[3-4],但其具体机制尚在研究中。GFAP 主要分布于中枢神经系统的星形胶质细胞,是星形胶质细胞最重要的细胞骨架成分,其含量或结构的改变会引起星形胶质细胞的形态和功能的改变。Nestin 是一种神经干/前体细胞的中间丝蛋白,参与调控神经组织的生长和发育^[5-6];

是神经干/前体细胞在中枢神经系统存活和迁移的标志物,与神经损伤再生密切相关^[7]。本研究通过评估大鼠运动功能以及检测胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)和巢蛋白(Nestin)的表达水平,探讨补阳还五汤(Buyang Huanwu decoction, BYHWD)对脊髓损伤大鼠运动功能修复的作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 动物及实验条件

SPF 级雌性 SD 大鼠 75 只, 体重 220~250g (上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供, 生产许可证号 SCXK(沪)2013-0016, 使用许可证号 SYXK(沪)2013-0058)。购进后于浙江中医药大学动物实验中心屏障环境进行 2 周预饲养。实验在浙江中医药大学动物实验研究中心进行。

* 基金项目: 浙江省公益性技术应用研究计划项目(2012C33066);浙江省中医药科技计划项目(2012ZA123)

收稿日期: 2016-06-24

作者简介: 邹礼梁(1988-),男,江西赣州人,在读硕士研究生,研究方向:脊髓损伤的康复治疗。

△通信作者:陈健尔, E-mail: cje28@foxmail.com

1.2 制备补阳还五汤

补阳还五汤处方源自《医林改错》，处方组成：黄芪(生)120g，当归尾 6g，赤芍 4.5g，地龙(去土)、川芎、红花、桃仁各 3g。饮片购自浙江中医药大学中药饮片有限公司。制备方法：将饮片置于带冷凝管的煎药锅中，加入 925mL 纯水(根据 1g 饮片加 10mL 水的原则，把总加水量的 65%纯水加入头煎中，余下 35%加入二煎)浸泡 30min，武火煮沸后改文火煎煮 30min，过滤药液；再加入 500mL 纯水继续煮沸 30min，过滤，合并两次滤液，在旋转蒸发仪中将滤液浓缩为含生药 1g/mL，4℃冷藏备用。

1.3 构建脊髓损伤模型

SD 大鼠经 3% 戊巴比妥钠腹腔内注射(剂量 45mg/kg)麻醉，俯卧位固定于手术台上。依第 12 浮肋与第 12 胸椎上肋凹连接，定位第 10 胸椎(T₁₀)，褪毛后局部消毒，切开皮肤、皮下筋膜，暴露椎旁肌，在 T₁₀ 两侧横突与椎板连接处做纵行剪口，去除 T₁₀ 椎板，充分暴露 T₁₀ 对应的脊髓^[8]。用虹膜刀从脊髓后正中沟垂直插入，向脊髓左半侧横向切开，构建脊髓半横断损伤模型。常规止血后逐层缝合伤口，碘伏消毒。腹腔注射 0.5mL 生理盐水以补充失血量。术后开始每日肌肉注射青霉素钠 10 万 U/只，预防术后感染，维持 3d。回笼饲养，给以饲料及饮水。术后人工挤尿，定时早、晚 8 点各挤尿 1 次，直到动物自身排尿反射恢复。

1.4 动物分组与给药

75 只 SD 大鼠随机分为假手术组(Sham 组)、模型组(Model 组)、低剂量补阳还五汤组(L-BYHWD 组)、中剂量补阳还五汤组(M-BYHWD 组)、高剂量补阳还五汤组(H-BYHWD 组)。造模 24h 后对 3 个补阳还五汤组大鼠分不同剂量灌胃。每组大鼠分 3d、7d、14d、21d、28d 共 5 个时间点处死大鼠。参照标准体重动物药物等效剂量换算，以 14.6g/kg 作为中剂量组用量，高剂量组设为中剂量组的 2 倍即 29.2g/kg，低剂量组设为中剂量组的一半即 7.3g/kg。灌 2 次/d，连续灌胃至相应取材时间点。Sham 组和 Model 组动物造模后不行药物干预。

1.5 运动功能评分

本研究采用 BBB 评分(Basso, Beattie & Bresnahan locomotor rating scale, BBB scale)法评估大鼠脊髓损伤后的运动功能，BBB 法总分为 21 分^[9]。造模

后 1d、3d、7d、14d、21d、28d 测量大鼠体重并进行 BBB 评分。评分时间定于上午 9:00 开始，将动物放置在足够宽阔平坦的范围内进行观察。由熟知评分标准但非本实验人员进行独立观察评分，每只大鼠评分 2 次，每次评分观察不少于 3min。

1.6 脊髓组织标本采集

各组大鼠饲养至相应时间点，3%戊巴比妥钠腹腔内注射(剂量 45mg/kg)麻醉大鼠，仰卧位固定于手术台上，剪开胸腹腔，暴露心脏，剪开右心耳，从左心室-主动脉插管灌注生理盐水，直至右心耳流出清亮液体，继续注入 4%多聚甲醛 200mL 固定 30min。解剖并暴露脊髓，以损伤部位为中心取脊髓 2cm，近头端和近尾端各 1cm。置于 4%多聚甲醛中固定 24h 后，于 4℃冰箱中保存。

1.7 免疫组化检测脊髓 GFAP 和 Nestin 的表达

所取标本依次经脱水、浸蜡、石蜡包埋后，行 3μm 厚度连续切片。切片脱蜡至水，入柠檬酸盐溶液中进行抗原热修复，PBS 洗 5min×3 次，蒸馏水洗 5min×3 次，3%过氧化氢孵育 10min，蒸馏水洗 5min×3 次后 PBS 中浸泡，5% BSA 封闭 30min，一抗 GFAP(1:200)、Nestin(1:200)行免疫组化染色，4℃孵育过夜。PBS 洗 5min×3 次，生物素化二抗 37℃ 30min，PBS 洗 5min×3 次，HRP 标记链霉卵白素 30min×3 次，PBS 洗 5min×3 次，DAB 显色，苏木素复染，常规脱水、封片。光学显微镜下观察、拍照。阴性对照用 PBS 替代一抗。采用 Image-Pro plus 6.0 图像分析软件分析计算平均光密度。每个脊髓样本选取 3 张切片，每组切片随机选取 3 个非重叠视野对 GFAP 和 Nestin 进行光密度测量，分别累加求均值。

1.8 统计学分析

实验结果数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。采用 SPSS17.0 统计软件进行组间方差分析及 LSD 法两两比较。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BBB 法评分结果

BBB 评分表分值范围为 0~21 分。造模后 1d 除 Sham 组外均为 0 分。结果显示(见图 1)，各组的功能评分随着时间推移均有增高趋势。补阳还五汤干预后，大鼠运动功能得到不同程度的恢复，主要表现在髋膝关节活动。补阳还五汤低中高剂量组评分在 3~28d 均高于 Model 组评分($P < 0.05$)；M-BYH-

WD 组评分在 3~28d 均明显高于 L-BYHWD 组评分 ($P<0.05$); H-BYHWD 组评分在术后 3d 和 7d 明显高于 M-BYHWD 组评分 ($P<0.05$), 而在术后 28d 低于 M-BYHWD 组评分 ($P<0.05$)。

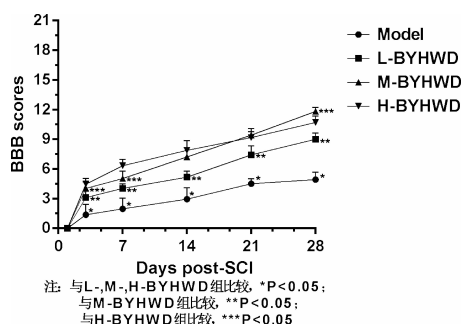
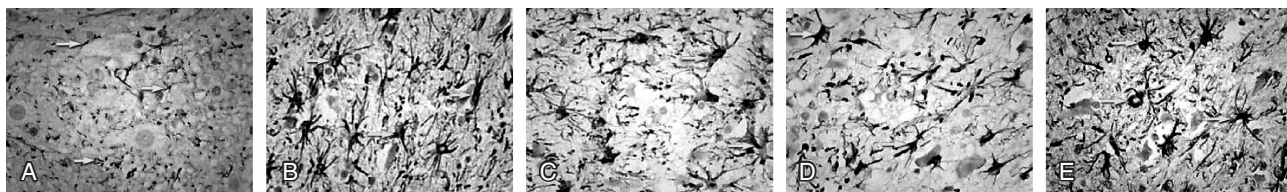


图1 各组大鼠术后各时间点 BBB 评分

2.2 GFAP 免疫组织化学染色结果

GFAP 免疫组化染色结果见图 2。脊髓灰质和

白质中都可见大量 GFAP 阳性细胞分布, 细胞数量增多, 胞体体积增大且分支增多, 补阳还五汤干预后 GFAP 阳性细胞数量减少, 体积缩小, 细胞分支减少。免疫组化对照实验结果均为阴性。结果分析显示(见图 3), 各组 GFAP 平均光密度值呈先上升后下降的趋势, 均于第 14 天达到最高。BYHWD 干预的脊髓组织 GFAP 平均光密度值在术后 3~28d 比同时期 Model 组低。在 3~28d 各时间点, L-BYHWD 干预组 GFAP 平均光密度值与 Model 组相比无显著差异 ($P>0.05$)。M-BYHWD 组和 H-BYHWD 组 GFAP 平均光密度值均低于同时期 Model 组, 且差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。在术后 3~7d, H-BYHWD 组 GFAP 平均光密度值低于 M-BYHWD 组, 差异具有统计学意义 ($P<0.05$), 而在术后 14~28d 无显著差异 ($P>0.05$)。



A: 假手术组; B: 模型组; C: 低剂量补阳还五汤组; D: 中剂量补阳还五汤组; E: 高剂量补阳还五汤组

图2 各组大鼠脊髓损伤后 14dGFAP 免疫组化染色($\times 400$)

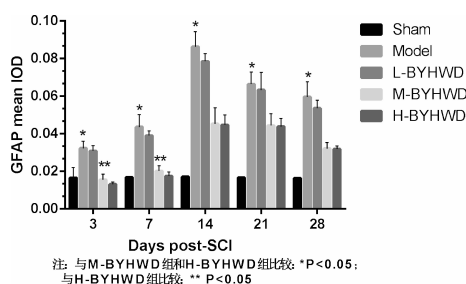
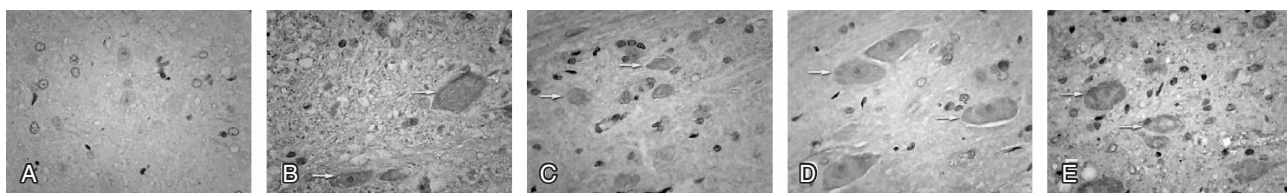


图3 各组大鼠各时间点 GFAP 平均光密度值

2.3 Nestin 免疫组织化学染色结果

Nestin 免疫组化染色结果见图 4。假手术组中几乎未见 Nestin 阳性细胞。脊髓损伤后, Nestin 免疫染色阳性细胞出现, 较多分布于脊髓灰质中和软脊髓膜下, 可见胞浆内深染棕黄色细颗粒, 细

胞大小不一, 散在分布脊髓白质和灰质中, 胞体多为软圆形, 有些阳性细胞出现明显突起和分支。免疫组化对照实验结果均为阴性。结果分析显示(见图 5), 除了 Sham 组未见 Nestin 明显表达外, 其他各组 Nestin 平均光密度值呈先上升后下降的趋势, 均于术后 7d 达到高峰。各剂量 BYHWD 干预的脊髓组织 Nestin 平均光密度值在术后 3~28d 均比同时期 Model 组高, 差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。M-BYHWD 组和 H-BYHWD 组 Nestin 平均光密度值均高于同时期 L-BYHWD 组, 且差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。H-BYHWD 组 Nestin 平均光密度值与 M-BYHWD 组相比无显著差异 ($P>0.05$)。



A: 假手术组; B: 模型组; C: 低剂量补阳还五汤组; D: 中剂量补阳还五汤组; E: 高剂量补阳还五汤组。

图4 各组大鼠脊髓损伤后 14dNestin 免疫组化染色($\times 400$)

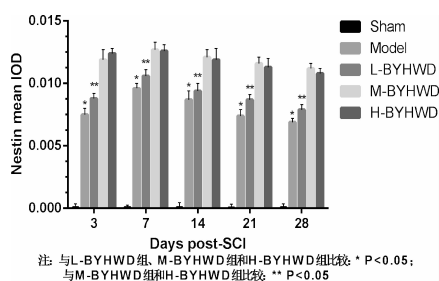


图5 各组大鼠各时间点 Nestin 平均光密度值

3 讨论

3.1 补阳还五汤促进运动功能恢复

中医学认为脊髓损伤是由外力损伤督脉,致使瘀阻经络,气血不足,属外伤瘀血所致“腰痛”“痿证”“体惰”“癱闭”等病证范畴。“活血化瘀,通络,补肾,益气”是治疗脊髓损伤的基本原则。补阳还五汤由生黄芪、当归尾、赤芍、地龙、川芎、红花、桃仁 7 味中药组成,方中重用黄芪补气,与活血化瘀药配伍,意在益气活血,通经活络。现代研究认为补阳还五汤能够改善脊髓损伤区域的微环境、促进肢体运动功能恢复等^[10]。

研究结果显示,大鼠造模前 BBB 评分均为 21 分,造模后 24h 除 Sham 组外均为 0 分。补阳还五汤干预后脊髓损伤大鼠运动功能评分随着时间推移均有增高趋势,其运动功能得到一定程度的恢复和提高,其中中、高剂量的作用较为显著,在后期可见大鼠后肢髌膝关节的活动。术后 3~7d 中、高剂量组比同时期低剂量组运动功能评分提高更加明显。结果提示,高剂量补阳还五汤对于急性脊髓损伤后短期内更有利于促进脊髓损伤大鼠运动功能的修复。术后 28d 高剂量组运动功能评分低于中剂量组,与低剂量组无显著差异,此情况可能与长期高剂量灌胃后导致大鼠食欲降低,机体修复能力下降有关。

3.2 补阳还五汤抑制 GFAP 的表达

实验结果显示,Sham 组中 GFAP 在脊髓损伤区周围表达明显上调,星形胶质细胞出现显著活化,表现为星形胶质细胞体积增大、数量增加、分支增多,与 Farida 等人^[11]的研究报道相符。GFAP 阳性的星形胶质细胞反应性增生在脊髓灰质区较白质区明显,多集中在血管周围。GFAP 表达的高低反映了胶质细胞的功能状态,也反映了胶质瘢痕形成的严重程度^[12]。

脊髓损伤后 GFAP 的表达水平总体呈先上升

后下降的趋势,于术后 14d 达高峰。各组补阳还五汤干预后脊髓组织 GFAP 的表达水平相比同时期 Model 组较低,补阳还五汤干预后可见 GFAP 阳性细胞数量减少、细胞体积缩小、细胞分支减少,胶质细胞的反应性增生得到一定程度的抑制。说明补阳还五汤可抑制 GFAP 的表达,降低星形胶质细胞的活化程度,减少胶质瘢痕在损伤区域的形成和堆积,有利于脊髓损伤的修复和运动功能的重建。其中高剂量组 GFAP 表达水平在 3~7d 显著低于中、低剂量组,提示在急性脊髓损伤后 3~7d 高剂量补阳还五汤的干预可能更有效地抑制 GFAP 表达,抑制胶质瘢痕的形成。

3.3 补阳还五汤上调 Nestin 的表达

Nestin 是一种表达于神经干/前体细胞的中间丝蛋白,是神经系统生长发育过程中的重要指标^[4],对神经系统损伤的修复起着重要作用^[13-14]。Albright 等^[15]通过转基因小鼠实验论证 Nestin 阳性前体细胞群可补充小鼠神经系统中成熟胺能神经元。抑制损伤部位神经细胞死亡,增强机体修复能力是治疗脊髓损伤的重要方法^[16]。Nestin 具有抗细胞凋亡的特性^[17];其上调可减少脊髓神经细胞的凋亡和神经瓦勒变性,减少脊髓组织的二次损伤,有利于脊髓损伤后运动功能修复和功能重建^[18]。

实验结果显示,Sham 组脊髓组织中几乎不表达 Nestin,当脊髓组织受损后,Nestin 在脊髓损伤部位出现明显的表达,可见 Nestin 阳性细胞大小不一,散在分布在脊髓灰质和白质中,于灰质区包括中央管周围分布较多,胞体多为软圆形,有些阳性细胞出现明显突起和分支,与李俊岑等人^[19]的报道相符。这些实验结果提示,脊髓损伤后微环境的改变诱发神经组织中的某些细胞上调 Nestin 的表达,或诱导 Nestin 阳性的神经干/神经前体细胞从海马齿状回颗粒下区、侧脑室室下区以及纹状体等聚集区迁移并存活于损伤区域。阳性细胞突起和分支的出现和增多,可能与细胞在损伤区域微环境作用下发生功能分化有关^[20]。

补阳还五汤组与模型组相比,Nestin 在脊髓组织中的表达出现明显上调,Nestin 阳性细胞数量增多,细胞的突起和分支也明显增多,其中中、高剂量组上调 Nestin 表达的作用比低剂量组更为突出。实验结果提示,补阳还五汤能有效地促进神经组织中

某些细胞上调 Nestin 的表达,或募集更多的 Nestin 阳性细胞迁移至损伤区域,促进损伤区域组织修复和再生。

综上,补阳还五汤通过抑制大鼠脊髓损伤区域 GFAP 的表达减少瘢痕组织形成,上调 Nestin 的表达促进神经修复再生,是其促进脊髓损伤的修复和运动功能的重建作用机制之一。

参考文献:

- [1] Tran AP, Silver J. Neuroscience. Systemically treating spinal cord injury[J]. Science, 2015, 348(6232):285-286.
- [2] Bramlett HM, Dietrich WD. Progressive damage after brain and spinal cord injury: pathomechanisms and treatment strategies[J]. Progress in Brain Research, 2007, 161:125-141.
- [3] An C, Hui W, Jianwei Z, et al. BYHWD rescues axotomized neurons and promotes functional recovery after spinal cord injury in rats [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2008, 117(3):451-456.
- [4] Wang L, Jiang DM. Neuroprotective effect of Buyang Huanwu Decoction on spinal ischemia/reperfusion injury in rats [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2009, 124(2):219-223.
- [5] 张泳, 刘学红. 微管相关蛋白 2 和巢蛋白在人胚胎脊髓的表达[J]. 解剖学报, 2011, 42(6):832-835.
- [6] Namiki J, Tator CH. Cell proliferation and nestin expression in the ependyma of the adult rat spinal cord after injury[J]. Journal of Neuropathology & Experimental Neurology, 1999, 58(5):489-498.
- [7] Cawsey T, Duflou J, Shannon WC, et al. Nestin-Positive Ependymal Cells Are Increased in the Human Spinal Cord after Traumatic Central Nervous System Injury[J]. Journal of Neurotrauma, 2015, 32(18):1393-1402.
- [8] 康鑫, 吴卓, 夏亚一. 大鼠 T10 脊髓半横断损伤模型的制备及评价 [J]. 世界科技研究与发展, 2015, 37(5):575-578.
- [9] Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats[J]. Journal of Neurotrauma. 1995, 12(1):1-21.
- [10] Xianhui D, Xiaoping H, Weijuan G. Neuroprotective effects of the Buyang Huanwu decoction on functional recovery in rats following spinal cord injury [J]. Journal of Spinal Cord Medicine, 2016, 39(1):85-92.
- [11] Hellal F, Hurtado A, Ruschel J, et al. Microtubule stabilization reduces scarring and causes axon regeneration after spinal cord injury[J]. Science, 2011, 331(6019):928-931.
- [12] Zhe L, Zhengyu F, Liang X, et al. Spinal cord injury-induced astrocyte migration and glial scar formation: effects of magnetic stimulation frequency [J]. Indian J Biochem Biophys. 2010, 47(6):359-363.
- [13] Lee HH, Park SC, Choe IS, et al. Time course and characteristics of astrocyte activation in the rat brain after injury [J]. Korean J Neurotrauma 2015, 11(2). 44-51.
- [14] Lee S, Yang M, Kim J, et al. Nestin expression and glial response in the hippocampus of mice after trimethyltin treatment[J]. Acta Histochemica, 2014, 116(8):1276-1288.
- [15] Albright JE, Stojkowska I, Rahman AA, et al. Nestin-positive/SOX2-negative cells mediate adult neurogenesis of nigral dopaminergic neurons in mice[J]. Neuroscience Letters, 2016, 615:50-54.
- [16] Liu S, Sarkar C, Dinizo M, et al. Disrupted autophagy after spinal cord injury is associated with ER stress and neuronal cell death[J]. Cell Death Dis, 2015, 6:e1582.
- [17] Park D, Xiang AP, Mao FF, et al. Nestin Is Required for the Proper Self-Renewal of Neural Stem Cells [J]. Stem Cells, 2010, 28(12):2162-2171.
- [18] Guo Y, Liu S, Zhang X, et al. Sox11 promotes endogenous neurogenesis and locomotor recovery in mice spinal cord injury [J]. Biochemical & Biophysical Research Communications, 2014, 446(4):830-835.
- [19] 李俊岑, 丁培培, 刘姿辰, 等. 神经前体细胞巢蛋白在大鼠脊髓损伤后的表达 [J]. 中国康复医学杂志, 2010, 25(9):833-837.
- [20] 招远祺, 乔利军, 袁龙健, 等. 从神经干细胞角度探索中医药介入中枢神经再生的研究策略[J]. 中国中医基础医学杂志, 2015, 21(7):915-916.

(编辑:徐建平)

(英文摘要见第 15 页)

等,病情纷繁复杂。糖尿病发病机制复杂,病机寒热虚实错杂,病位涉及三焦各个脏腑,治疗不是简单的滋阴润肺养胃补肾等可以涵盖的。本实验说明:“补泻同施,调节平衡”这一治则,是成功治疗2型糖尿病的新思路,是对中医治疗糖尿病的理论在继承基础上的创新。

参考文献:

- [1] 康白,毛淑梅,李承德,等. 黄芪多糖对糖尿病大鼠早期多尿的保护作用研究[J]. 中国药理学通报,2009,25(11):1470-1472.
- [2] 孙志,韩海荣,马丽,等. 针灸对2型糖尿病胰岛β细胞凋亡的影响[J]. 中国老年学杂志,2011,31(6):966-967.
- [3] 燕娟,郭巍伟,梁执群,等. 2型糖尿病大鼠模型的建立及其验证[J]. 临床和实验医学杂志,2009,8(4):5-6.
- [4] 陈秋,夏永彭,邱宗荫. 2型糖尿病大鼠模型的建立与评价[J]. 天津医药,2006,34(1):33-35.
- [5] 刘学政,萧鸿. 链尿佐菌素致大鼠糖尿病模型的研究[J]. 锦州医学院学报,2001,22(4):11-14.
- [6] Walensky LD. Bcl-2 in the crosshairs: tipping the balance of life and death[J]. Cell Death Differ,2006,13(8):1339-1350.
- [7] 王彤,刘存志,刘玉珍,等. Bcl-2/Bax 基因调控机体细胞凋亡的机制研究进展[J]. 中国老年学杂志,2008,28(16):1658-1660.
- [8] 陈灏珠,林果为,王吉耀. 实用内科学[M]. 14版. 北京:人民卫生出版社,2013:979.
- [9] Skrha J. Pathogenesis of type 1 and type 2 diabetes in 2011 the unifying model of glucoregulation disorder[J]. Vnitr Lek, 2011,57(11):949-953.
- [10] Butler AE, Janson J, Bonner-Weir S, et al. Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes[J]. Diabetes, 2003,52(1):102-110.
- [11] Farilla L, Hui H, Perfetti R. GLP-1 promoter growth and inhibit apoptosis of beta-cell in Zucker diabetic rat[J]. Endocrinology, 2002,143:4397-4408.
- [12] Butler AE, Jang J, Gurlo T, et al. Diabetes due to a progressive defect in beta-cell mass in rats transgenic for human islet amyloid polypeptide (HIP Rat): a new model for type 2 diabetes[J]. Diabetes, 2004,53(6):1509-1516.
- [13] 田伯乐,郭志光,郝建强,等. 胰岛β细胞再生与糖尿病治疗的研究进展[J]. 胰腺病学,2007,7(3):206-208.
- [14] Brooks C, Dong Z. Regulation of mitochondrial morphological dynamics during apoptosis by Bcl-2 family proteins: a key in Bak[J]. Cell Cycle, 2007,6(24):3043-3047.
- [15] Xie Z, Koyama T, Suzuki J, et al. Coronary reperfusion following ischemia: different expression of bcl-2 and bax proteins, and cardiomyocyte apoptosis [J]. Jpn Heart J, 2001,42(6):759-770.
- [16] 王小芳,张金盈,赵晓燕,等. 二甲双胍对原代心肌细胞凋亡的影响[J]. 临床心血管病杂志,2013,29(4):306-308.
- [17] 许曼音. 糖尿病学[M]. 2版. 上海:上海科学技术出版社,2010:216.

(编辑:徐建平)

(原文见第1页)

Effects of Buyang Huanwu Decoction on Motor Functional Recovery after Spinal Cord Injury in Rats

ZOU Liliang¹, WANG Kui¹, MAN Xianan¹, LIU Xuehong², CHEN Jianer¹

(1. Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou, 310053, China; 2. Shaoxing University, Shaoxing 312000, China)

ABSTRACT: **Objective** To study the effects and mechanism of Buyang Huangwu Decoction on rats with spinal cord injury by analyzing the changes of glial fibrillary acidic protein (GFAP) and Nestin expression. **Methods** SD rats were randomly divided into five groups: sham group, model group, low dose Buyang Huangwu Decoction group (L-BYHWD), medium dose Buyang Huangwu Decoction group (M-BYHWD) and high dose Buyang Huangwu Decoction group (H-BYHWD). Rats of Model group, L-BYHWD group, M-BYHWD group, H-BYHWD group underwent spinal cord hemisection injury; model group without drug intervention, Buyang Huanwu Decoction group were used with different doses of Buyang Huanwu Decoction orally. Immunohistochemistry was used to evaluate the expression level of GFAP and Nestin. BBB scales was used to evaluate the motor function of hind limbs in rats. **Results** The BBB scores of the rats after the intervention of BYHWD was higher than the same period of the model group ($P < 0.05$). The expression of GFAP in the rats spinal cord tissue was significantly increased after SCI, while down-regulation in the groups with the intervention of BYHWD. The expression of GFAP in the spinal cord tissue of rats of M-BYHWD and H-BYHWD was significantly lower than the same periods in the model group ($P < 0.05$); The expression of GFAP in the rats of H-BYHWD significantly lower than the same periods of M-BYHWD in 3-7 days after surgery ($P < 0.05$), while it does no significant difference in 28 days after surgery ($P > 0.05$). expression of Nestin in the spinal cord tissue with the intervention of BYHWD was higher than the same period model group ($P < 0.05$); Both the groups of M-BYHED and H-BYHWD, the expression level of Nestin were significantly higher than the model group in the same period ($P < 0.05$), while there was no significant difference of the Nestin expression between the M-BYHWD and the H-BYHWD. **Conclusion** BYHWD can promote the repair of injured spinal cord in rats and its mechanism may be related to reducing scarring by inhibiting the expression of GFAP and repairing nerve by increasing the expression of Nestin.

KEY WORDS: spinal cord injury; Buyang Huanwu decoction; dose; glial fibrillary acidic protein; Nestin