

本文引用:林庆宾,陈鹏,刘宇,李楠. 补肾活血汤对脊髓损伤大鼠 Tau 蛋白及神经营养因子表达的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2021, 41(12): 1851-1856.

补肾活血汤对脊髓损伤大鼠 Tau 蛋白及神经营养因子表达的影响

林庆宾^{1,2}, 陈鹏^{1,2}, 刘宇^{1,2}, 李楠^{1,2}

(1.福建中医药大学,福建福州 350122;2.福建中医药大学中医骨伤及运动康复教育部重点实验室,福建福州 350122)

[摘要] **目的** 观察补肾活血汤对脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)大鼠后肢功能、脊髓组织病理损伤,及对 Tau、BDNF、NT-3、NGF 蛋白表达的影响,探讨其作用机制。**方法** 24 只 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组、补肾活血汤组,每组 8 只。模型组、补肾活血汤组大鼠采用改良 Allen's 法建立大鼠 SCI 模型,假手术组手术操作同模型组,但不打击脊髓。补肾活血汤组大鼠用补肾活血汤以 10.8 g/(kg·d)剂量灌胃,假手术组和模型组大鼠用等量生理盐水灌胃。在模型建立后第 1、3、7、14、28 天用巴索、比蒂和布雷斯纳汉运动评级(Basso, Beattie & Bresnahan locomotor rating, BBB)法评估大鼠后肢功能;第 28 天观察结束后进行脊髓组织取材,尼氏染色观察脊髓组织病理结构;用 Western blot 和免疫组化法检测脊髓组织 Tau、BDNF、NT-3、NGF 蛋白的表达。**结果** (1)与模型组相比,补肾活血汤组大鼠 BBB 评分在第 14、28 天明显增高($P<0.05$);(2)补肾活血汤组脊髓组织神经元数目($P<0.05$)和形态优于模型组;(3)Western blot 和免疫组化结果显示,与模型组相比,补肾活血汤脊髓组织 Tau 蛋白表达显著降低($P<0.05$),BDNF、NT-3、NGF 的表达显著增高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。**结论** 补肾活血汤可改善 SCI 大鼠肢体功能,减轻脊髓组织病理损伤,其作用机制可能与抑制 Tau 蛋白表达,增加 BDNF、NT-3、NGF 蛋白的表达有关。

[关键词] 补肾活血汤;脊髓损伤;Tau;BDNF;NT-3;NGF

[中图分类号]R285.5

[文献标志码]A

[文章编号]doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2021.12.007

Effect of Bushenhuoxue Decoction on Tau Protein and Neurotrophic Factor Expression in Rats with Spinal Cord Injury

LIN Qingbin^{1,2}, CHEN Peng^{1,2}, LIU Yu^{1,2}, LI Nan^{1,2}

(1. Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, Fujian 350122, China; 2. Key Laboratory of Orthopedics & Traumatology of Traditional Chinese Medicine and Rehabilitation, Ministry of Education, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, Fujian 350122, China)

[Abstract] **Objective** To observe the effects of Bushenhuoxue Decoction on limb function, pathological structure of spinal cord, expression of Tau, BDNF, NT-3 and NGF in spinal cord injury (SCI) rats, and to explore its effect mechanism. **Methods** 24 SD rats were randomly divided into sham operation group, model group and Bushenhuoxue Decoction group, with 8 rats in each group. SCI model was established by modified Allen's method in the model group and Bushenhuoxue Decoction group. Operation in the sham operation group was the same as that of the model group without spinal cord attack. Rats in the Bushenhuoxue Decoction group were given the Bushenhuoxue Decoction at 10.8 g/(kg·d) dose while sham operation group and the model group were given the same amount of normal saline. Basso, Beattie & Bresnahan locomotor rating (BBB) method was used to evaluate the hind limb function of rats at 1, 3, 7, 14, and 28 days after model establishment. Spinal cord tissue samples were taken after the observation on day 28. The pathological structure of the spinal cord was observed by Nissl staining, and the expression levels of Tau, BDNF, NT-3 and NGF in the spinal cord were detected by Western blot and immunohistochemistry.

[收稿日期]2021-03-19

[基金项目]福建省自然科学基金项目(2018J01891)。

[作者简介]林庆宾,男,博士,讲师,研究方向:中医药防治脊髓损伤,E-mail:283118458@qq.com。

Results (1) Compared with model group, BBB scores of the rats in the Bushenhuoxue Decoction group were significantly increased at 14th and 28th day ($P<0.05$). (2) The number ($P<0.05$) and morphology of neurons of spinal cord in Bushenhuoxue Decoction group were superior than those in model group. (3) Western blot and immunohistochemical results showed that, compared with the model group, the expression of Tau protein in the spinal cord of Bushenhuoxue Decoction group was significantly decreased, and the expression levels of BDNF, NT-3 and NGF were significantly increased ($P<0.05$ or $P<0.01$). **Conclusion** Bushenhuoxue Decoction can improve limb function and relieve pathological injury of spinal cord in SCI rats, and its mechanism may be related to inhibiting Tau protein expression and increasing the expression of BDNF, NT-3 and NGF proteins.

[**Keywords**] Bushenhuoxue Decoction; spinal cord injury; Tau; BDNF; NT-3; NGF

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)属于严重的中枢神经系统损伤,是脊柱骨折最严重的并发症之一,可导致损伤平面以下运动、感觉和自主神经功能障碍^[1]。SCI具有高致死率和致残性的特点,全世界因创伤导致的SCI发病率约为3.6~195.4人次/100万^[2]。中国SCI发病率约为37人次/100万,而且好发人群集中在青壮年,不仅给患者本人造成严重伤害,也给家庭和社会带来沉重的负担^[3]。目前,SCI最常用的治疗方法为手术减压内固定和大剂量激素冲击疗法,能有效解除对脊髓造成的压迫,改善脊髓血供,防止继发性SCI,但对于已经造成的原发性SCI疗效有限。如何改善SCI一直都是临床研究的热点,补阳还五汤、脊髓康、黄芪桂枝五物汤、活血通督汤等益气活血通络的方剂已被证实能够一定程度上改善SCI,但还需进一步研究其作用机制^[4-7]。脊髓的位置及功能与中医经络学说中的“督脉”相近。肾主骨生髓,与督脉关系密切,督脉损伤必然累及肾脏。因此,SCI的治则不仅需要活血化瘀、益气通络,更应重视补肾。补肾活血汤出自清代赵竹泉的《伤科大成》,有补肾填精、化瘀通络之功,临床研究已证实其联合针刺有助于SCI患者肢体功能康复^[8]。因该研究是补肾活血汤联合针刺作为干预手段,补肾活血汤的作用及机制还需进一步研究明确。因此,本实验拟建立大鼠SCI模型,观察补肾活血汤对大鼠后肢功能、脊髓病理结构、脊髓组织Tau、BDNF、NT-3、NGF蛋白表达的影响,对补肾活血汤治疗SCI的作用及机制做进一步研究。

1 材料

1.1 动物

SPF级2月龄SD大鼠共24只,体质量(220±20)g,雌雄各半,由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供,许可证号:SCXK(沪)2017-0005。实验动物购回后饲养于福建中医药大学实验动物中心,饲养环境符合实验动物饲养标准。实验前进行适应性喂养一周,所有的操作均遵照福建中医药大学实验动物伦理委员会的要求进行。

1.2 药物

补肾活血汤药物组成具体如下:熟地黄9g,杜仲3g,枸杞子3g,补骨脂9g,菟丝子10g,当归尾3g,没药3g,山茱萸3g,红花1.5g,独活3g,淡肉苁蓉3g。补肾活血汤药物购自福建中医药大学附属第三人民医院中药房,药物符合2015版《中华人民共和国药典》标准^[9]。药物加工成1mL汤药含生药1g,即1g/mL,无菌封瓶,-20℃冰箱保存备用。

1.3 主要试剂

Tau(批号:66499-1)、BDNF(批号:66292-1-Ig)、NT-3(批号:18084-1-AP)均购自美国Protein tech Group公司;NGF(批号:BM4100)、 β -actin(批号:BM0627)、HRP-羊抗兔(批号:BA1054)、HRP-羊抗小鼠(批号:BA1050)均购自武汉博士德生物工程有限公司;尼氏染色液(北京索莱宝科技有限公司,批号:G1430)。

1.4 主要仪器

脱水机(型号:JJ-12J)、包埋机(型号:JB-P5)均购自武汉俊杰电子有限公司;切片机(上海莱卡仪器有限公司,型号:RM2016);烤箱(上海慧泰仪器制造有限公司,型号:DHG-9140);水浴锅(天力医疗器械有限公司,型号:TL-420);倒置显微镜(日本尼康公司,型号:ECLIPSE TI-SR);电泳仪(型号:1648001)、转印槽(型号:1704150)均购自美国bio-rad公司;低温离心机(德国Thermo公司,型号:Heraeus Fresco17)。

2 方法

2.1 动物分组

24只SD大鼠随机分为3组:假手术组、模型组、补肾活血汤组,每组8只。

2.2 模型建立

用改良Allen's法建立大鼠T10脊髓急性挫伤动物模型^[10]。用2%戊巴比妥钠(0.2mL/100g)腹腔注射麻醉。麻醉成功后,通过计数肋骨定位T10胸椎,剃除大鼠背部手术切口周围毛发,碘伏消毒,铺无菌手术巾。以T10棘突为中心作一长约3cm的

纵行切口,逐层切开皮肤、筋膜,钝性分离两侧椎旁肌,暴露 T9-T11 棘突椎板。用咬骨钳咬除 T10 棘突及椎板,显露硬脊膜打击区。将直径 2 mm、10 g 的圆柱状金属棒从 5 cm 高处垂直落下,建立 T10 脊髓急性挫伤模型。打击后硬脊膜表面立刻可见出血,以大鼠出现后肢回缩和尾巴痉挛性摆动作为打击成功标志^[1]。冲洗创口,逐层缝合肌肉、皮肤。模型组、补肾活血汤组大鼠均采用改良 Allen's 法造模;假手术组大鼠不打击脊髓,其余手术操作同模型组。

2.3 药物干预

补肾活血汤组大鼠从术后第 1 天开始用补肾活血汤灌胃,每天 2 次,具体的给药剂量按照人与大鼠体表面积换算为 10.8 g/(kg·d)^[2]。假手术组和模型组大鼠于术后第 1 天开始用等量生理盐水灌胃。

2.4 观察指标

于造模手术后第 28 天进行最后一次巴索、比蒂和布雷斯纳汉运动评级(Basso, Beattie & Bresnahan locomotor rating, BBB)法评分^[3],评分结束后处死大鼠。以 T10 脊髓节段为中心切取长约 2 cm 脊髓组织,用预冷的生理盐水将脊髓表面血液清洗干净,按照检测方法要求对脊髓组织做进一步处理。

2.4.1 后肢功能评分 各组大鼠于造模后第 1、3、7、14、28 天采用 BBB 法评估各组大鼠后肢功能。将大鼠后肢运动功能分为 22 个等级,后肢全瘫为 0 分,完全正常为 21 分。

2.4.2 尼氏染色 脊髓组织经 4%多聚甲醛固定 24 h,再依次经过梯度酒精脱水、二甲苯透明、石蜡包埋。以 5 μm 的厚度进行连续切片,选择完整的切片条带贴片,烤片。将切片经二甲苯脱蜡,梯度酒精复水,然后浸入焦油紫染液中。将染色缸放入 56 °C 烤箱中 1 h,蒸馏水冲洗 2 min,用分化液分化约 2 min,直至背景接近于无色为止。依次脱水、透明、中性树胶封片。切片置于显微镜下观察。

2.4.3 Western blot 法检测 取约 100 mg 脊髓组织,用预冷的 TBS 洗涤组织,加入含有蛋白抑制剂的 RIPA 裂解液,置于冰浴中超声匀浆,4 °C、10 000 g 离心 10 min,取上清液,用 BCA 法测定蛋白浓度,进行蛋白电泳分析。取 30 μg 蛋白质样品进行 SDS-PAGE 凝胶电泳。将胶上的蛋白质带转移至 NC 膜上,150 mA 转移 1 h。用含 5%脱脂奶粉的 TBST 封闭剂室温下封闭,摇床摇动 1.5 h, TBST 洗,膜转入适度稀释的一抗(BDNF 为 1:1000, Tau 为 1:1000, NT-3 为 1:1500, NGF 为 1:500, β-actin 为 1:1500), 4 °C 缓慢振摇过夜。TBST 洗,加入生物素标记的二

抗,4 °C 摇摆孵育 2 h, TBST 洗,配制 ECL 发光剂,均匀涂在膜上,暗室内曝光、显影,用凝胶图像处理系统分析蛋白条带灰度值。

2.4.4 免疫组化法检测 将切片经二甲苯脱蜡,梯度酒精复水,用 3%过氧化氢阻断内源性过氧化物酶。用 EDTA 抗原修复液进行抗原修复,用 5% BSA 进行封闭。切片滴加适度稀释的一抗(BDNF 为 1:200, Tau 为 1:200, NT-3 为 1:150, NGF 为 1:100)后置于 4 °C 冰箱过夜。PBS 漂洗,滴加二抗,置于湿盒中 37 °C 反应 30 min。PBS 漂洗, DAB 适度显色,苏木素复染。经梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。阳性表达神经元呈棕黄或棕褐色。每张组织切片在高倍镜下,于神经元丰富区随机选取 5 个相互非重叠视野进行观察,计算平均吸光度值。

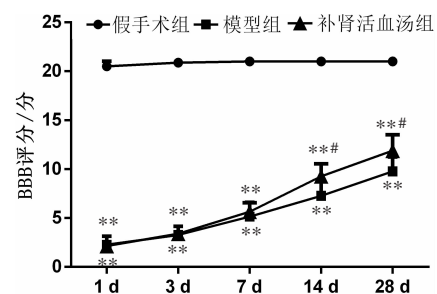
2.5 统计分析

采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析。计量资料以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,若数据符合正态分布,则采用单因素方差分析,组间比较若方差齐则用 LSD 检验,若方差不齐则采用 Dunnett's T3 检验;不满足正态分布者,采用非参数 Kruskal-Owallis 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠后肢功能评分比较

与假手术组相比,模型组和补肾活血汤组 BBB 评分在 1、3、7、14、28 d 显著降低($P < 0.01$)。与模型组相比,补肾活血汤组 BBB 评分在 14、28 d 明显增高($P < 0.05$)。见图 1。



注:与假手术组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,* $P < 0.05$

图 1 各组大鼠后肢功能评分

3.2 各组大鼠尼氏染色结果

假手术组脊髓组织结构完整,神经元结构清晰,核仁居中,胞浆中可见大量蓝紫色、呈斑块状的尼氏体,可见明显的树突和轴突;模型组脊髓前角神经元数目较假手术组明显减少,部分神经元尼氏体结构模糊,树突和轴突较少;补肾活血汤组脊髓前角神经

元数量较模型组有所增加,尼氏体颗粒较明显,树突和轴突的数目较模型组明显增加。见图 2。

3.3 各组大鼠 Tau、BDNF、NT-3、NGF 蛋白表达比较

与假手术组相比,模型组和补肾活血汤组 Tau、BDNF、NT-3、NGF 蛋白相对表达量显著增高($P < 0.01$)。与模型组相比,补肾活血汤组 Tau 蛋白相对表达量明显降低($P < 0.05$),BDNF、NT-3、NGF 蛋白相对表达量显著增高($P < 0.05$)。见图 3。

3.4 各组大鼠 Tau、BDNF、NT-3、NGF 平均吸光度值比较

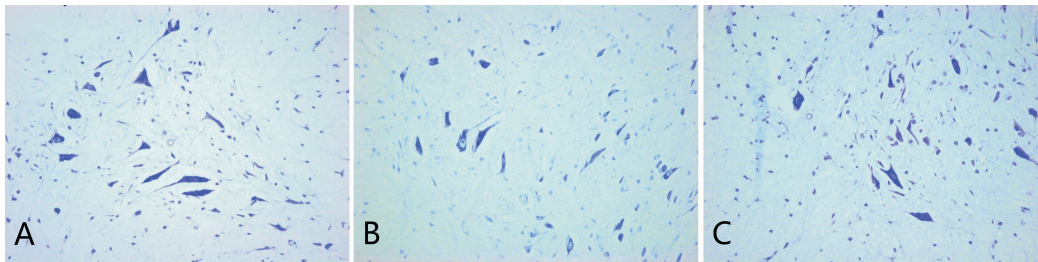
与假手术组相比,模型组和补肾活血汤组 Tau、

BDNF、NT-3、NGF 平均吸光度值显著增高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);与模型组相比,补肾活血汤组 Tau 平均吸光度值显著下降($P < 0.05$),BDNF、NT-3、NGF 平均吸光度值显著增高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见表 1、图 4。

表 1 各组大鼠 Tau、BDNF、NT-3、NGF 蛋白平均吸光度($n=8, \bar{x} \pm s$)

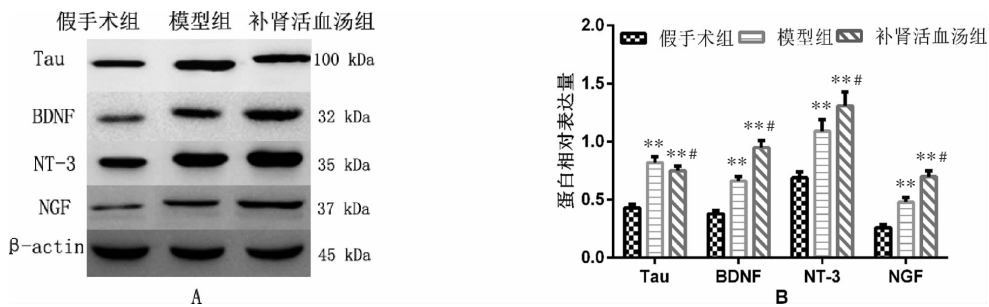
分组	Tau	BDNF	NT-3	NGF
假手术组	0.28±0.01	0.25±0.02	0.27±0.02	0.21±0.02
模型组	0.35±0.02**	0.34±0.02**	0.32±0.02**	0.25±0.02**
补肾活血汤组	0.32±0.03*#	0.36±0.02**#	0.35±0.02**#	0.27±0.02**#

注:与假手术组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$



注:A.假手术组;B.模型组;C.补肾活血汤组

图 2 各组大鼠尼氏染色图(×200)



注:A.蛋白电泳图;B.蛋白相对表达量。与假手术组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,# $P < 0.05$

图 3 各组大鼠 Tau、BDNF、NT-3、NGF 蛋白表达

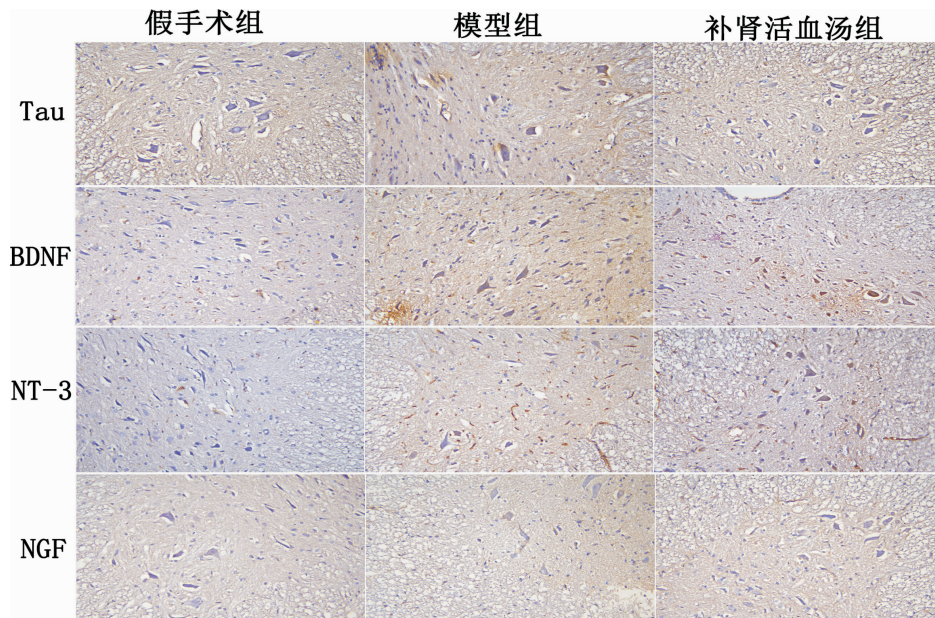


图 4 各组大鼠 Tau、BDNF、NT-3、NGF 蛋白免疫组化图(×200)

4 讨论

古代中医文献中无 SCI 的病名,需从与 SCI 症状相近的论述中去溯源。《灵枢·寒热病》有云:“若有所堕坠,四肢懈惰不收,名曰体惰”,该描述与 SCI 导致外伤性截瘫的症状相近,故可认为“体惰”是 SCI 最早的中医病名^[14]。按照中医辨证,SCI 属于“萎证”和“体惰”范畴^[15]。督脉循行于人体背侧正中,为阳脉之海,总督一身之阳气,有沟通联系肢体的作用;脊髓位于椎管内,属于中枢神经系统,主司肢体的运动和感觉功能。督脉与脊髓不论是位置,还是功能均有相似之处,故在中医研究中大多将脊髓等同於督脉,对 SCI 多采用活血祛瘀、通督的治法^[16-18]。但督脉属于经络辨证范畴,适用于针刺、电针、艾灸等治疗方式,而中药治疗大多采用脏腑辨证,因此,不仅要从活血化瘀、疏通督脉考虑,还要从脏腑辨证角度进行梳理,探讨督脉的本质及其与脏腑的关系。

肾藏精,主骨,生髓,脊髓、脑髓皆属于“髓”的范畴,依赖肾精的充养,与肾脏关系密切。基于中医理论中肾与督脉、络脉的关系以及临床从肾论治脊髓疾病(运动神经元病、脊髓空洞症、脊髓炎、多发性硬化、遗传性脊髓型共济失调等)的有效经验,王殿华等^[19-20]提出“肾督络”假说,即督脉反映了脊髓的绝大部分功能,督脉的物质基础是肾所藏之精,督脉的功能依赖肾精化生,而其对躯干、四肢联系是由络脉来实现的。督脉功能的正常发挥,与肾和络脉密不可分,故脊髓疾病应从肾进行论治。因此,SCI 的中医治则除了活血祛瘀、通督,还需重视补肾,通过补肾化生精气,输布于督脉,再通过督脉和络脉转输四肢和躯干。

补肾活血汤出自清代赵竹泉的《伤科大成》,方中重用熟地黄、补骨脂、菟丝子为君药,补益肝肾、填精益髓;杜仲、枸杞子、山茱萸辅助君药补益肝肾;红花、没药、当归尾以活血祛瘀、行气止痛;肉苁蓉补肾阳、润肠。全方具有补肾填精、活血化瘀之功。本实验采用 BBB 评分来评估大鼠后肢功能,评分结果显示,补肾活血汤组大鼠 BBB 评分在第 14 天和 28 天显著高于模型组,提示补肾活血汤有改善 SCI 大鼠的后肢功能的作用。尼氏染色结果显示,补肾活血汤组脊髓前角神经元的数目、形态均优于模型组,提示补肾活血汤有减轻 SCI 大鼠脊髓病理损伤的作用。

Tau 蛋白属于微管相关蛋白家族,它主要表达在神经轴突,同时也存在于神经细胞核中,与染色体骨架相连。Tau 蛋白是一种多功能蛋白,具有稳定微管的作用,通过与生长锥中的络氨酸相连接,可影响轴突的形成和生长^[21]。Tau 蛋白过度磷酸化可导致微管结构破坏,影响轴突转运,导致神经元损伤^[22]。Ying 等^[23]的研究证实,Tau 蛋白在大鼠 SCI 模型中表达增高,并且随着 SCI 病变程度的加重,其表达进一步增高,可以作为标志物用来预测 SCI 的严重程度以及肢体功能的结局。周成福等^[24]的研究显示,SCI 大鼠脊髓组织 Tau 蛋白表达增高,与神经元凋亡密切相关。本实验 Western blot 和免疫组化的结果均显示,补肾活血汤组与模型组相比,Tau 蛋白表达明显降低,证实补肾活血汤能抑制 SCI 大鼠脊髓组织 Tau 蛋白表达。

神经营养因子是中枢神经系统内广泛存在、结构相似、具有保护神经作用的一个蛋白家族,主要包括了神经生长因子(nerve growth factor, NGF)、脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)、神经营养因子-3(neurotrophin-3, NT-3)等,对脊髓受损神经元的生长、存活、轴突的连接具有重要作用^[25]。Liang 等^[26]的研究显示,SCI 大鼠脊髓组织 BDNF 表达增高,BDNF 可以通过调节 TrkB/p38/MAPK 信号通路减轻炎症。Ye 等^[27]证实,NT-3 可通过抑制 MAPK 通路促进 SCI 修复。Zhang 等^[28]的研究显示,黄芩提取物可以改善 SCI,其机制与上调 BDNF 蛋白表达有关。范筱等^[29-30]研究显示,活血通督汤可以促进 SCI 大鼠脊髓组织 BDNF、NGF、NT-3 蛋白的表达,从而促进损伤修复,改善肢体功能。本实验 Western blot 和免疫组化的结果一致显示,与模型组相比,补肾活血汤组脊髓组织 BDNF、NT-3、NGF 蛋白表达显著增加,提示补肾活血汤能促进 SCI 大鼠脊髓组织神经营养因子的表达,有助于 SCI 修复。

综上所述,补肾活血汤有活血化瘀的作用,有助于疏通督脉,有补肾之功,通过肾精的生髓作用,充养脊髓,可能有助于改善督脉的生理功能。补肾活血汤能减轻大鼠 SCI,改善 SCI 大鼠后肢功能,减轻脊髓组织病理损伤,其作用机制可能与抑制脊髓组织 Tau 蛋白的表达,增加神经营养因子 BDNF、NT-3、NGF 蛋白表达有关。

参考文献

- [1] MAIMAN D, PINTAR F, MALIK W, et al. AIS scores in spine and spinal cord trauma: Epidemiological considerations[J]. *Traffic Injury Prevention*, 2018, 19(sup1): S169-S173.
- [2] JAZAYERI S B, BEYGI S, SHOKRANEH F, et al. Incidence of traumatic spinal cord injury worldwide: A systematic review[J]. *European Spine Journal*, 2015, 24(5): 905-918.
- [3] 陈星月,陈栋,陈春慧,等.中国创伤性脊髓损伤流行病学和疾病经济负担的系统评价[J].*中国循证医学杂志*,2018,18(2):143-150.
- [4] YANG P, CHEN A, QIN Y, et al. Buyang Huanwu decoction combined with BMSCs transplantation promotes recovery after spinal cord injury by rescuing axotomized red nucleus neurons[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2019, 228: 123-131.
- [5] DONG X H, HE X P, GAO W J. Neuroprotective effects of the Buyang Huanwu decoction on functional recovery in rats following spinal cord injury[J]. *The Journal of Spinal Cord Medicine*, 2016, 39(1): 85-92.
- [6] GUO Y, MA Y, PAN Y L, et al. Jisuikang, a Chinese herbal formula, increases neurotrophic factor expression and promotes the recovery of neurological function after spinal cord injury[J]. *Neural Regeneration Research*, 2017, 12(9): 1519-1528.
- [7] 金玉峰.加味黄芪桂枝五物汤配合针灸对胸腰椎骨折合并脊髓损伤患者神经功能恢复的影响[J].*四川中医*,2017,35(8):108-110.
- [8] 王胜芳,张小容,张海波.补肾活血汤加减、针刺联合高压氧对脊柱骨折并脊髓损伤术后患者康复效果研究[J].*世界中医药*,2019,14(11):3040-3044.
- [9] 国家药典委员会.中华人民共和国药典 2015年版[M].北京:中国医药科技出版社,2015.
- [10] 熊春翔,宗少晖,曾高峰,等.大鼠 Allen's 脊髓损伤模型的建立及评价[J].*广西医科大学学报*,2011,28(2):215-217.
- [11] 范筱,吴杨鹏,汪今朝,等.活血通督汤对脊髓损伤后 BDNF/TrkB 信号表达的影响[J].*中华中医药杂志*,2017,32(5):2115-2120.
- [12] 徐叔云,卞如廉,陈修.药理学实验方法学[M].3版.北京:人民卫生出版社,2001:226-230.
- [13] BASSO D M, BEATTIE M S, BRESNAHAN J C, et al. MAS-CIS evaluation of open field locomotor scores: Effects of experience and teamwork on reliability. Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study[J]. *Journal of Neurotrauma*, 1996, 13(7): 343-359.
- [14] 王冰,张登本,等译.黄帝内经·灵枢[M].北京:新世界出版社,2008:217-220.
- [15] 范筱,张俐.益气活血法调控脊髓损伤后相关基因的表达[J].*中华中医药杂志*,2017,32(3):1168-1171.
- [16] 齐英娜,吴鑫杰,王延雷,等.从督论治脊髓损伤的研究进展[J].*时珍国医国药*,2018,29(6):1425-1427.
- [17] 孙岩,占达,谭明生.从疏通督脉论治脊髓损伤[J].*中国中医骨伤科杂志*,2018,26(2):64-66.
- [18] 张刘波,周峻,王佩佩,等.脊髓损伤中医药辨证论治研究进展[J].*现代中西医结合杂志*,2020,29(16):1813-1817.
- [19] 王殿华,陈金亮.关于构建肾督、络脉理论假说论治脊髓病的思考[J].*中医杂志*,2011,52(16):1366-1369.
- [20] 陈金亮,黄涛.从肾督络理论探讨脊髓病发病机制[J].*新中医*,2015,47(6):1-3.
- [21] QI Z P, WANG G X, XIA P, et al. Effects of microtubule-associated protein tau expression on neural stem cell migration after spinal cord injury[J]. *Neural Regeneration Research*, 2016, 11(2): 332-337.
- [22] 张鸿日,彭静华,张茂营,等.2ME2对脊髓损伤大鼠运动功能及Tau蛋白磷酸化的影响[J].*中华神经医学杂志*,2014,13(11):1127-1130.
- [23] TANG Y, LIU H L, MIN L X, et al. Serum and cerebrospinal fluid tau protein level as biomarkers for evaluating acute spinal cord injury severity and motor function outcome[J]. *Neural Regeneration Research*, 2019, 14(5): 896-902.
- [24] 周成福,梁宇,马晓茹,等.大鼠急性脊髓损伤后 tau 蛋白表达规律及意义[J].*黑龙江医药科学*,2014,37(1):17-19.
- [25] KEEFE K M, SHEIKH I S, SMITH G M. Targeting neurotrophins to specific populations of neurons: NGF, BDNF, and NT-3 and their relevance for treatment of spinal cord injury[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, 18(3): E548.
- [26] LIANG J D, DENG G, HUANG H. The activation of BDNF reduced inflammation in a spinal cord injury model by TrkB/p38 MAPK signaling[J]. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 2019, 17(3): 1688-1696.
- [27] YE J, XUE R, JI Z Y, et al. Effect of NT-3 on repair of spinal cord injury through the MAPK signaling pathway[J]. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 2020, 24(5): 2165-2172.
- [28] ZHANG Q, ZHANG L X, AN J, et al. Huangqin flavonoid extraction for spinal cord injury in a rat model[J]. *Neural Regeneration Research*, 2018, 13(12): 2200-2208.
- [29] 范筱,汪今朝,刘宇,等.活血通督汤促进脊髓损伤大鼠肢体运动功能恢复的神经营养机制[J].*中华中医药杂志*,2017,32(10):4611-4615.
- [30] 吴杨鹏,范筱,张俐.活血通督汤对大鼠急性脊髓损伤后神经生长因子和胶质纤维酸性蛋白表达的影响[J].*中华中医药杂志*,2017,32(2):697-701.

(本文编辑 匡静之 周旦)