

·基础研究·

# 减重平板训练对脊髓损伤大鼠运动功能及远端脊髓形态学的影响\*

丁晓晶<sup>1</sup> 王瑾<sup>1</sup> 王红星<sup>1</sup> 王彤<sup>1,2</sup>

## 摘要

**目的:**明确减重平板训练对脊髓损伤大鼠运动功能及远端脊髓形态学的影响。

**方法:**成年雌性SD大鼠30只,随机分为正常组、对照组和减重平板组。采用改良Allen's撞击法制作T9不完全性脊髓损伤模型。损伤后1周开始训练,30min/d,共4周。分别在损伤前、损伤后1d、1周、2周、3周、4周、5周时采用斜板试验、改良Tarlov评分、Basso-Beattie-Bresnahan(BBB)评分进行运动功能评定。损伤后5周,通过光镜和电镜观察脊髓及腓肠肌形态变化,计算肌纤维横截面积和直径大小。

**结果:**①减重平板组三项运动功能评分在训练后各个时间点均较对照组显著增加( $P < 0.05$ )。②减重平板组肌肉横截面积和直径与对照组相比显著增加( $P < 0.05$ ),并接近正常组数值( $P > 0.05$ )。③光镜显示减重平板组远端脊髓的运动神经元仍保留有较多突起,尼氏体无明显减少;电镜显示减重平板组髓鞘分离程度明显减轻,轴索与髓鞘间的空隙减少,结构趋于完整。

**结论:**减重平板运动可有效促进脊髓损伤大鼠运动功能及神经肌肉功能的恢复;促进远端脊髓形态的恢复,减轻远端神经元的继发损害。

**关键词** 脊髓损伤;运动功能;减重平板运动;大鼠

**中图分类号:**R745.4, R651.2, R493 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2011)-03-0201-05

**Effects of body-weight-support-treadmill training on motor activity and secondary lesion in distal spinal motor neuron after spinal cord contusion in rats/DING Xiaojing, WANG Jin, WANG Hongxing, et al// Chinese Journal of Rehabilitation Medicine,2011,26(3): 210—214**

## Abstract

**Objective:** To explore the promotion effect of body-weight-support-treadmill training(BWSITT) and the changes of secondary lesion in distal spinal motor neuron in rats after spinal cord injury (SCI).

**Method:** Thirty female adult Sprague-Dawley rats were used. An animal model of incomplete SCI was created using a modification of Allen's method at T9 spinal cord. Taking the uninjured rats as normal group, and the injured rats without training as control group. One group of injured rats was trained by BWSITT. Exercise training began 1 week post injury, lasted 30 min per day, 5 days a week for 4 weeks. Locomotor function was evaluated by using inclined plane test, modified Tarlov score and Basso-Beattie-Bresnahan (BBB) scale before injury and on the 1st day, and the 1st, 2nd, 3rd, 4th, 5th week post injury. Histomorphological changes of L5 spinal cord and gastrocnemius muscle were observed by light microscope and electromicroscope, and the cross section area and diameter of the gastrocnemius muscle fibers were analyzed by specialty computer software.

**Result:** ①The angles of inclined plane test, Tarlov scores and BBB scores of BWSITT group increased significantly compared with control group at any time points of observation( $P < 0.05$ ). ②Compared the shape, and the cross

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2011.03.003

\*基金项目:国家自然科学基金(81000853)

1 南京医科大学第一附属医院康复医学科,南京,210029; 2 通讯作者

作者简介:丁晓晶,女,硕士研究生; 收稿日期:2010-11-05

section area and the diameter of gastrocnemius muscle fibers, it showed that the improvement of amyotrophy of BWSTT group was significant. Its cross section area and diameter were nearly closed to those of normal group ( $P>0.05$ ). ③The observation through light microscope and electronmicroscope of L5 spinal cord of each group showed that the improvement of BWSTT group was significant. After 4 weeks of BWSTT, neurites and Nissl bodies didn't decreased greatly, the shapes of myelin sheath and neuraxis were mostly integrity, and the vacuoles in cell matrix were decreased significantly.

**Conclusion:** The body-weight-support-treadmill training can significantly improve the motor activity of SCI rats, and effectively decrease the secondary lesion in distal spinal motor neuron.

**Author's address** Department of Rehabilitation Medicine, The 1st Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, NanJing, 210029

**Key word** spinal cord injury; motor activity; body-weight-support-treadmill training; rat

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)是造成残疾的重要原因,改善和促进运动功能恢复是SCI患者康复治疗的首要目标。但目前研究均致力于损伤局部脊髓功能变化及如何实现神经再生跨过损伤断端,而忽视了损伤远端脊髓功能变化。有研究提示,脊髓损伤后由于远端脊髓失去上位中枢联系而会发生继发性损害<sup>[1-4]</sup>。本课题组前期研究结果也发现大鼠脊髓损伤后早期(损伤后1周)远端脊髓神经元即会发生继发性损害,包括细胞萎缩与凋亡、突起及尼氏体减少等。本实验在此基础上,进一步研究减重平板训练对脊髓远端继发损害的改善作用。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验动物及分组

成年雌性SD大鼠30只,体重260—300g,购于上海斯莱克实验动物有限责任公司[许可证号SCXK(沪)2003-0003]。剔除模型失败的2只及模型制作后死亡的4只,余下24只纳入实验。将其随机分为4组:减重平板组、对照1周组、对照5周组和正常组,每组6只。对照组和正常组不做运动训练。

### 1.2 SCI模型制备

用10%水合氯醛腹腔麻醉(300mg/kg)大鼠后,切除T8椎板,暴露脊髓,根据改良Allen重锤打击法的原理<sup>[5-7]</sup>,采用NYU脊椎冲击损伤仪model I型制作大鼠不完全性脊髓损伤(由美国新泽西州立大学神经科学联合中心实验室提供)。术后连续3d肌注青霉素1ml(20万U)预防感染,给予人工挤压膀胱帮助排尿,每日2次,至形成反射性排尿为止。

### 1.3 运动训练

损伤后第8天开始减重平板训练。训练方案:每次10min,每日3次,每周连续训练5天,共训练4周<sup>[8-9]</sup>。术后第5周处死取材。训练装置采用大鼠专用跑步机及自制的减重装置。跑台速度为0.8km/h,减重量为体重的20%—40%,(随时间逐渐减少减重量,第1周减重40%,第2周35%,第3周30%,第4周20%)。

### 1.4 运动功能评定

分别于损伤前、损伤后1d、1周、2周、3周、4周、5周对减重平板组和对照5周组两组大鼠进行运动功能评定。评定项目<sup>[6-7]</sup>包括斜板试验<sup>[10]</sup>,改良Tarlov评分<sup>[11]</sup>,BBB评分<sup>[12-13]</sup>。评定时间均统一为上午8:00开始。评分均为2人合评。

### 1.5 光镜取材及切片制备

对照1周组在术后1周取材,其余3组均在第5周取材。用4%多聚甲醛磷酸缓冲液心脏灌注<sup>[6-7,14]</sup>,取材损伤远端L5脊髓及任意一侧腓肠肌。常规脱水、石蜡包埋、连续切片,切片厚度4 $\mu$ m。从每只大鼠的脊髓及肌肉切片中各随机抽取5张,作HE染色,光镜下观察形态学改变并拍照。

### 1.6 电镜取材

用4%多聚甲醛磷酸缓冲液灌注<sup>[7]</sup>,固定1h,取L5节段脊髓,用4%戊二醛磷酸缓冲液继续固定24h,后用1%锇酸后固定10min,PBS洗涤后入70%乙醇饱和醋酸铀溶液过夜;逐级升度乙醇及丙酮脱水,环氧树脂包埋,半薄切片定位后,超薄切片,透射电镜观察并拍照。

### 1.7 图像分析

采用Image-Pro Plus 5.0软件进行图像分析,计

算每张切片的肌纤维横截面积和直径。

### 1.8 统计学分析

样本均数用均数 ± 标准差表示。实验数据用 SPSS 16.0 软件分析, 两组均数比较用 t 检验, 多组均数比较用单因素方差分析 (LSD 法), 等级资料采用非参数检验。

## 2 结果

### 2.1 运动功能评定结果

损伤前及运动训练前对照组与减重平板组 BBB 评分、斜板试验临界角度和改良 Tarlov 评分差异均无显著性意义。运动训练后减重平板组三项评分在各时间点 (损伤后 2—5 周) 较对照组都明显增加, 与对照组相比差异有显著性意义 ( $P < 0.05$ )。见表 1。

表 1 各时间点 BBB 评分、斜板试验临界角度、改良 Tarlov 评分结果

( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别                  | 例数 | 损伤前           | 损伤后           |               |                            |                            |                            |                            |
|---------------------|----|---------------|---------------|---------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
|                     |    |               | 第 1 天         | 第 7 天         | 第 14 天                     | 第 21 天                     | 第 28 天                     | 第 35 天                     |
| <b>BBB 评分</b>       |    |               |               |               |                            |                            |                            |                            |
| 对照组                 | 6  | 21.00 ± 0.000 | 0.00 ± 0.000  | 2.33 ± 1.862  | 8.33 ± 1.633               | 10.00 ± 1.414              | 12.83 ± 0.753              | 14.17 ± 0.983              |
| 平板组                 | 6  | 21.00 ± 0.000 | 0.00 ± 0.000  | 3.83 ± 2.483  | 12.00 ± 2.757 <sup>①</sup> | 13.67 ± 2.658 <sup>①</sup> | 16.67 ± 2.503 <sup>②</sup> | 17.67 ± 2.338 <sup>②</sup> |
| <b>斜板试验临界角度</b>     |    |               |               |               |                            |                            |                            |                            |
| 对照组                 | 6  | 42.50 ± 2.739 | 15.83 ± 2.041 | 21.67 ± 4.082 | 22.50 ± 2.739              | 25.83 ± 5.845              | 27.50 ± 4.183              | 30.00 ± 4.472              |
| 平板组                 | 6  | 42.50 ± 2.739 | 17.50 ± 2.739 | 21.67 ± 4.082 | 34.17 ± 8.010 <sup>①</sup> | 32.50 ± 5.244              | 39.17 ± 3.764 <sup>①</sup> | 42.50 ± 2.739 <sup>①</sup> |
| <b>改良 Tarlov 评分</b> |    |               |               |               |                            |                            |                            |                            |
| 对照组                 | 6  | 5.00 ± 0.000  | 0.00 ± 0.000  | 0.83 ± 0.408  | 1.67 ± 0.816               | 2.50 ± 0.837               | 2.50 ± 0.837               | 2.67 ± 0.816               |
| 平板组                 | 6  | 5.00 ± 0.000  | 0.00 ± 0.000  | 1.50 ± 0.548  | 2.83 ± 0.983 <sup>①</sup>  | 3.50 ± 0.548 <sup>①</sup>  | 3.67 ± 0.516 <sup>①</sup>  | 3.67 ± 0.516 <sup>①</sup>  |

与对照组相比较: ① $P < 0.05$ ; ② $P < 0.01$

### 2.2 腓肠肌肌纤维形态

正常肌纤维 (图 1A) 为圆柱形合体性多核巨细胞, 横断面呈钝角多面形。损伤 1 周时 (图 1B) 可见失神经支配的肌萎缩, 呈小群性分布, 即十余根肌纤维的萎缩。萎缩的肌纤维横截面呈尖角的细条状 (箭头所指); 损伤 5 周时 (图 1C) 小群性萎缩仍然存在, 萎缩部位邻近的部分肌纤维呈代偿性肥大 (箭头所指); 运动训练后, 减重平板组 (图 1D) 肌纤维萎缩情况已不太明显, 结构基本正常。

### 2.3 肌纤维横截面积和直径分析结果

损伤后 1 周肌纤维的横截面积和直径, 均较正常组肌显著下降 ( $P < 0.05$ )。对照组 (无运动组) 损伤后 5 周肌肉萎缩程度无改善 ( $P > 0.05$ )。减重平板组肌肉萎缩程度改善明显, 肌纤维横截面积和直径与对照组相比显著增加 ( $P < 0.05$ ), 并接近正常组数值 ( $P > 0.05$ )。见表 4。

### 2.4 远端脊髓 (L5) 光镜结果

图 2A 为正常对照组, 示运动神经元形态正常, 有较多的突起和尼氏体。图 2B 示损伤后 1 周时, 运动神经元较对照组染色变淡, 突起和尼氏体有所减少, 胞核和核仁无明显改变; 图 2C 示对照组损伤后 5 周时, 胞体突起和胞质内尼氏体仍有减少, 与损伤 1 周时变化相似; 图 2D 是减重平板训练组, 可见运动

神经元保留了较多的突起, 尼氏体也较多, 染色较深。

### 2.5 远端脊髓 (L5) 电镜结果

正常髓鞘 (图 3A) 排列规律整齐, 结构致密, 轴索均匀一致, 核仁清晰。损伤后 1 周 (图 3B), 髓鞘严重松散、断裂, 轴索与髓鞘间出现明显空隙 (髓鞘分离现象); 损伤后 5 周 (图 3C), 髓鞘形态较前完整, 但较薄, 髓鞘分离现象依然比较明显; 运动训练后, 减重平板组 (图 3D) 改善较明显, 可见髓鞘完整, 轴索均匀, 髓鞘及神经纤维周围基质中少见空泡。

## 3 讨论

自 20 世纪 80 年代动物实验证明脊髓神经具有再生能力后, 神经再生就成为目前脊髓损伤治疗研究的热点。大量研究表明, 外源性神经营养因子、转基因治疗和细胞移植可以促进神经再生。本课题组前期研究<sup>[7]</sup>也表明运动训练可以通过改善损伤局部的微环境为神经再生提供“允许”作用, 从而改善运动功能。这些措施虽然能促进神经再生跨过损伤断端, 但由于损伤远端脊髓变性, 新生神经难以与损伤远端运动神经元建立突触连接, 从而阻碍了传导通路的重新建立。临床上<sup>[8]</sup>部分 SCI 患者肌电图检查提示损伤平面以下相应肌肉呈现神经源性损害, 神

图1 各组大鼠腓肠肌的形态变化

(HE, × 200)

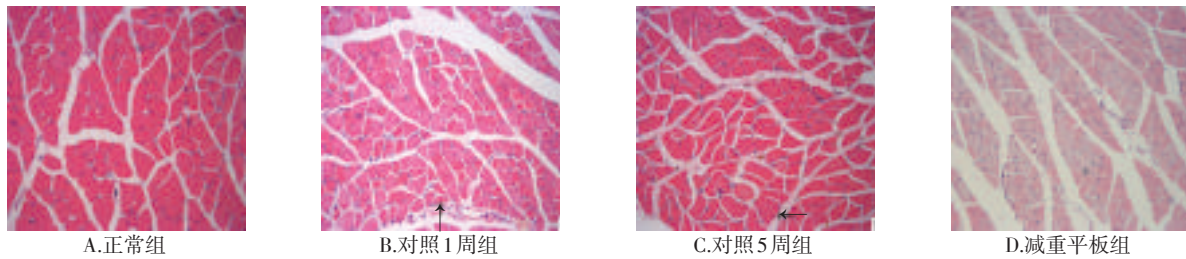


图2 各组大鼠损伤远端(L5)脊髓前角的形态变化

(HE, × 200)

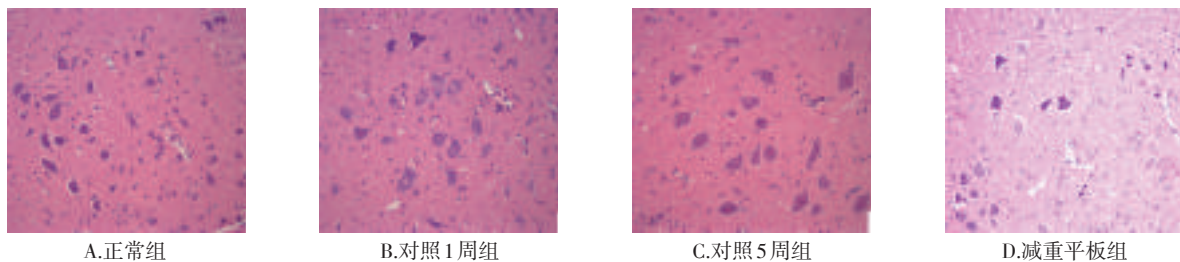


图3 各组大鼠损伤远端脊髓(L5)的髓鞘形态变化

(× 8000)

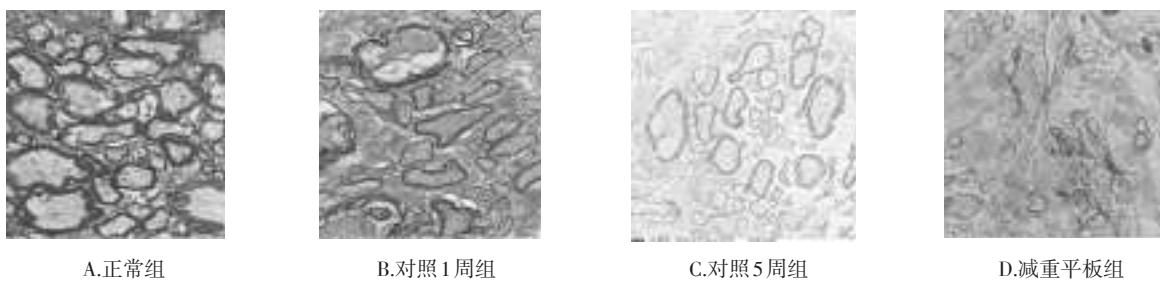


表2 各组肌纤维横截面积和直径比较 (x̄±s)

| 组别     | 肌纤维横截面积(μm <sup>2</sup> )   | 肌纤维直径(μm)                 |
|--------|-----------------------------|---------------------------|
| 对照组1周组 | 34.75 ± 13.19 <sup>③④</sup> | 6.61 ± 1.52 <sup>③④</sup> |
| 对照组5周组 | 36.16 ± 12.84 <sup>③④</sup> | 6.62 ± 1.33 <sup>③④</sup> |
| 平板组    | 55.34 ± 14.46 <sup>①②</sup> | 8.32 ± 0.99 <sup>①②</sup> |
| 正常组    | 55.49 ± 13.84 <sup>①②</sup> | 8.37 ± 1.13 <sup>①②</sup> |

与对照1周组相比:①P<0.05;与对照5周相比:②P<0.05;与平板组相比:③P<0.05;与正常组相比:④P<0.05

经传导示运动神经轴索损害,而感觉神经传导正常。提示SCI后损伤远端神经元发生了继发性损害。本课题组前期研究发现大鼠脊髓损伤后1周远端脊髓神经元即发生继发性损害,包括细胞萎缩与凋亡、突起及尼氏体减少等。因此,如何早期预防损伤远端神经元发生继发性损害,保护远端神经元维持正常功能状态,是实现神经再生后建立有效传导通路的首要条件。运动训练可能是一种有效措施。本研究采用动物实验常用的运动训练方式——减重

平板训练,观察脊髓损伤大鼠运动功能及远端脊髓形态学的恢复情况。

本研究结果显示:脊髓损伤大鼠经过减重平板运动训练后,反映运动功能的BBB评分、斜板试验和改良 Tarlov 评分,在各时间点(损伤后2周—5周)均较对照组明显增加(P<0.05)。表明减重平板运动能有效促进脊髓损伤大鼠运动功能的恢复,这与大量临床研究和动物实验结果一致。损伤后大鼠腓肠肌的形态学观察结果显示减重平板组大鼠肌肉萎缩明显减轻,表明大鼠损伤后神经肌肉功能的恢复与运动功能的恢复具有同步性。损伤远端脊髓(L5)的光镜及电镜观察结果显示:损伤后1周时,损伤远端运动神经元即发生了继发损害,神经元突起和尼氏体都有所减少;髓鞘严重松散、断裂,髓鞘分离现象明显。推测可能的原因有两方面:①损伤部位脊

髓的神经纤维发生直接或间接损伤,导致由这些神经纤维支配的远端运动神经元失去上位神经纤维的控制,发生退变。②损伤后这些远端运动神经元支配的肌肉长期失运动,导致反馈性分泌神经营养因子营养远端运动神经元的作用减小,因而发生继发损害。损伤后5周时,对照组大鼠运动功能有轻微恢复,但远端运动神经元胞体突起和尼氏体仍有减少;髓鞘形态较前完整,但较薄,髓鞘分离现象依然比较明显。经过运动训练后,减重平板组大鼠远端运动神经元保留了较多的突起,尼氏体也较多,染色较深;髓鞘结构完整,轴索均匀,髓鞘下及神经纤维周围基质中空泡较少。这表明减重平板运动能有效减轻脊髓损伤后远端运动神经元的继发损害。其作用可能是通过增加肢体末端皮肤感觉、本体感觉及正常运动模式的输入<sup>[15-17]</sup>,激活脊髓中枢模式发生器<sup>[18-20]</sup>,有效促进运动功能的恢复,并且增加肌肉、神经等反馈性分泌神经营养因子<sup>[21]</sup>,营养远端运动神经元,减轻和预防远端神经元的继发损害。

综上,减重平板运动不仅可有效促进脊髓损伤大鼠运动功能及神经肌肉功能的恢复,减轻肌肉萎缩;并且能促进损伤远端脊髓形态的恢复,减轻远端神经元的继发损害。由此可见,减重平板运动是早期预防损伤远端神经元发生继发性损害,保护远端神经元维持正常功能状态的一种有效措施,为后期实现神经再生后建立有效的传导通路提供条件。但其具体的作用机制尚不明了,需要后续实验进一步研究。

## 参考文献

- [1] Moon L, Bunge MB. From animal models to humans: strategies for promoting CNS axon regeneration and recovery of limb function after spinal cord injury[J]. J Neurol Phys Ther, 2005, 29(2):55—69.
- [2] Volker Dietz, Roland Muller. Degradation of neuronal function following a spinal cord injury: mechanisms and countermeasures[J]. Brain, 2004, 127:2221—2231.
- [3] Lin CS, Macefield VG, Elam M, et al. Axonal changes in spinal cord injured patients distal to the site of injury[J]. Brain, 2007, 130(Pt4):985—994.
- [4] Nogajski JH, Engel S, Kiernan MC. Focal and generalized peripheral nerve dysfunction in spinal cord-injured patients[J]. J Clin Neurophysiol, 2006, 23(3):273—279.
- [5] Allen AR. Surgery of experimental lesion of spinal cord equivalent to crush injury of fracture dislocation of spinal column[J]. JAMA, 1991, 57:878—880.
- [6] 王红星,徐冬晨,姚莉,等.脊髓损伤大鼠运动及神经功能自然恢复规律的探讨[J].中华物理医学与康复杂志,2008,30(7):433—436.
- [7] 徐冬晨,王红星,雷晓婷,等.运动训练对脊髓损伤大鼠运动及神经功能恢复的影响[J].中华物理医学与康复杂志,2010,32(1):9—12.
- [8] Heng C, de Leon RD. Treadmill training enhances the recovery of normal stepping patterns in spinal cord contused rats[J]. Experimental Neurology, 2009, 216(1):139—147.
- [9] Cha J, Heng C, Reinkensmeyer DJ, et al. Locomotor ability in spinal rats is dependent on the amount of activity imposed on the hindlimbs during treadmill training[J]. Journal of Neurotrauma, 2007, 24(6):1000—1012.
- [10] Rivlin AS, Tator CH. Objective clinical assessment of motor function after experimental spinal cord injury in the rat[J]. J Neurosurg, 1977, 47(2):577—581.
- [11] Gale K, Kerasidis H. Spinal cord contusion in the rat: Behavioral of functional neurological impairment[J]. Exp Neurol, 1985, 88(1):123—231.
- [12] Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats[J]. J Neurotrauma, 1995, 12(1):1—21.
- [13] 陈向荣,游思维,金大地.BBB评分评估脊髓损伤大鼠后肢运动功能的探讨[J].中国脊柱脊髓杂志,2004(14—9):547—549.
- [14] Wagner RD, et al. Histopathology of transitory traumatic paraplegia in the spinal cord trauma[J]. J Neurosurg, 1971, 35:272.
- [15] Dunlop SA. Activity-dependent plasticity: implications for recovery after spinal cord injury[J]. Trends Neurosci, 2008, 31(8):410—418.
- [16] Dietz V. Rehabilitation of locomotor function after a central motor lesion[J]. Restor Neurol Neurosci, 2010, 28(1):123—134.
- [17] Laird AS, Wu A, Lauschke JL. Changes in motoneuron properties following spinal cord transection: does afferent input play a role[J]. J Physiol, 2008, 586(13):3031—3032.
- [18] Dietz V. Spinal cord pattern generators for locomotion[J]. Clin Neurophysiol, 2003, 114(8):1379—1389.
- [19] Stewart BG, Tamiplosky MA, Hicks Aal, et al. Treadmill training-introduced adaptations in muscle phenotype in persons with in complete spinal cord injury[J]. Muscle Nerve, 2004, 30(1):61—68.
- [20] Grasso R, Ivanenko YP, Zago M, et al. Distributed plasticity of locomotor pattern generators in spinal cord injured patients[J]. Brain, 2004, 127(Pt5):1019—1043.
- [21] Burns AS, Boyce VS, Tessler A, et al. Fibrillation potentials following spinal cord injury: improvement with neurotrophins and exercise[J]. Muscle Nerve, 2007, 35(5):607—613.