

·基础研究·

运动训练对大鼠损伤远端脊髓及骨骼肌血管内皮生长因子表达的影响*

潘孟骁¹ 王红星^{2,3} 丁晓晶² 励建安² 王 彤²

摘要

目的:明确运动训练对大鼠损伤远端脊髓及骨骼肌血管内皮生长因子(VEGF)表达的影响,探讨运动促脊髓损伤功能恢复的机制。

方法:成年雌性SD大鼠24只,采用改良Allen撞击法制作T9不完全性脊髓损伤模型。术后随机分为损伤后1d组、1周组、训练组(术后1周开始训练,共4周)、对照组(未行训练)。分别在损伤前、损伤后第1、2、3、4及5周时采用Basso-Beattie-Bresnahan(BBB)评分评定运动功能。取损伤后1d、1周,对照组及训练组大鼠L5—S1节段脊髓及腓肠肌新鲜组织,采用RT-PCR及Western blot法测定VEGF mRNA及蛋白表达。

结果:①对照组与训练组BBB评分均较损伤后1周、2周明显提高,但训练组较对照组增加更为显著($P<0.05$);②训练组脊髓及腓肠肌VEGF mRNA及蛋白表达较对照组、损伤后1d、1周组显著增加($P<0.05$);对照组与损伤1周组、1d组比较脊髓及腓肠肌内VEGF表达差异无显著性($P>0.05$);但1周组脊髓内VEGF较1d组表达增加($P<0.05$),而腓肠肌内VEGF表达较1d组降低($P<0.05$)。

结论:运动训练能有效诱导脊髓损伤大鼠远端脊髓及骨骼肌VEGF表达,促进运动功能恢复。

关键词 脊髓损伤;运动训练;血管内皮生长因子

中图分类号:R651.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2012)-05-0406-04

Effects of exercise training on expressions of vascular endothelial growth factor in distal spinal cord and gastrocnemius muscle of rats with spinal cord injury/PAN Mengxiao, WANG Hongxing, DING Xiaojing, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2012, 27(5): 406—409

Abstract

Objective: To determine the effects of exercise training on expressions of vascular endothelial growth factor(VEGF) in distal spinal cord and skeletal muscles of rats with spinal cord injury.

Method: Twenty-four female adult Sprague-Dawley rats were included. An animal model of incomplete spinal cord injury was established by using modified Allen's method at T9 level of spinal cord. Those rats were divided into 4 groups randomly as 1d group, 1week post-injury group, control group(without training) and exercise group (trained by body-weight-support-treadmill-training). Exercise training started at 1 week after injury lasted 10 min per time, twice a day, 5d per week, for 4 weeks. Locomotor function was evaluated using Basso-Beattie-Bresnahan (BBB) scale before injury and at the 1st d, 1st, 2nd, 3rd, 4th and 5th week post. Real time-PCR and Western blot were used to detect the expressions of VEGF mRNA and protein in spinal cord and gastrocnemius muscle.

Result: ①BBB scores in exercise group and control group were higher than that in 1week group and 2week post injury group. But BBB score in exercise group increased more significantly than that in control group ($P<0.05$). ② Expressions of VEGF mRNA and protein in distal spinal cord and gastrocnemius muscle in exercise group were

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2012.05.005

*基金项目:国家自然科学基金青年基金资助项目(81000853)

1 南京医科大学第一临床医学院,南京市广州路300号,210029; 2 南京医科大学第一附属医院康复医学科; 3 通讯作者

作者简介:潘孟骁,男; 收稿日期:2011-11-21

higher than that in 1d group, 1week post injury group and control groups, but there was no difference among control group, 1d group and 1week post injury groups. Compared with 1d group, in 1week group the expressions of VEGF mRNA and protein were higher in spinal cord, but lower in gastrocnemius muscles ($P < 0.05$).

Conclusion: Exercise training may promote the recovery of locomotor function and induce the expressions of VEGF mRNA and protein in distal spinal cord and skeletal muscle.

Author's address The First Affiliated Hospital With Nanjing Medical University, 210029

Key word spinal cord injury; exercise training; vascular endothelial growth factor

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)后远端脊髓保持良好功能状态是神经再生后重建传导通路的必要条件,是决定神经功能修复的重要环节。SCI后远端脊髓继发性损害致使神经功能难以重建。研究表明血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)对保护损伤远端脊髓发挥重要作用,能通过促进血管新生和参与神经营养作用,保持远端脊髓功能^[1-2]。因此,提高VEGF表达将有可能为SCI后保护远端脊髓功能提供新的治疗途径和措施。本研究旨在探讨运动训练对脊髓及骨骼肌VEGF表达的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

成年雌性SD大鼠24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】。将其随机分为4组:损伤后1d组、损伤后1w组、对照组和训练组,每组6只。

1.2 SCI模型制备

10%水合氯醛腹腔麻醉(300mg/kg体重)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^[3-5],采用NYU脊椎冲击损伤仪Impactor I型制作大鼠不完全性脊髓损伤模型(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1周后开始运动训练,每次10min,每天2次,每周连续训练5d,共训练4周。减重平板训练采用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周为35%,第3周

为30%,第4周为20%)。对照组置于笼内不进行任何训练。

1.4 运动功能评定

分别于损伤前、损伤后1周、2周、3周、4周、5周对每组大鼠进行(Basso-Beattie-Bresnahan, BBB)评分^[6]评定运动功能。BBB评分主要反映大鼠后肢的运动功能,按照后肢的关节活动情况、负重情况、步态的协调性、爪位及尾巴的活动等进行评分。评分有0—21级,共22级。得分越高,表明运动功能越好。

1.5 实时PCR

用Trizol[®]提取组织mRNA,具体方法参照试剂说明(Invitrogen)。VEGF的引物序列是:上游5'-GAACCTTCTGCTGTCTTG-3'和下游5'-ATC-CATGAACCTCACCAC-3',引物长度为133bp,由上海基星生物科技有限公司设计。RT-PCR用Light-Cycler FastStart DNA Master SYBR Green Kit (Roche),具体方法参照试剂说明,94℃,5min,40个循环(94℃,15s,60℃,35s)。GAPDH作为内参,引物序列上游: AAGGTGAAGGTCGGAGTC,下游: CCTGGAAGATGGTGATGG,引物长度为229bp。

1.6 Western blot

采用Western blot法检测VEGF蛋白含量。取30μl制作好的蛋白上样液,经10% SDS凝胶电泳分离后,转移蛋白至PVDF印迹膜上,持续1h。用含5%脱脂奶粉的TBST封闭非特异性免疫反应结合位点(室温下1h)。一抗(兔抗VEGF单克隆抗体,Abcam公司,1:200)4℃孵育过夜,TBST漂洗5min×3次后加二抗(辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG, Abcam公司,1:5000)室温孵育1h。再用TBST洗膜5min×3次。在ECL发光反应系统中反应5min,暗室压片1min,胶片显影。分别以兔抗Beta-actin抗体(1:1000)和山羊抗兔IgG抗体(1:4000)为一抗和二

抗,重复上述步骤以作内参照。采用图像分析系统(Thermo Scientific, Rockford, U.S.A)扫描,并对条带进行灰度分析(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)。

1.7 统计学分析

数据均以均数 $\pm$ 标准差表示。所有数据均经SPSS11.5软件检验呈正态性分布且方差齐性。各组间采用单因素方差分析,组间多重比较采用Fisher

post-hoc test。

2 结果

2.1 运动功能

对照组与训练组BBB评分较损伤后1周、2周均明显提高,但训练组较对照组增加更为显著,其中以运动训练后1—2周时恢复更为明显($P<0.05$),见表1。

表1 SCI大鼠BBB评分变化

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

组别	鼠数	损伤前	损伤后				
			第1周	第2周	第3周	第4周	第5周
对照组	6	21 $\pm$ 0	3.33 $\pm$ 1.86	9.33 $\pm$ 1.63	10.5 $\pm$ 1.41	12.83 $\pm$ 0.75	14.17 $\pm$ 0.98
训练组	6	21 $\pm$ 0	3.83 $\pm$ 2.48	12.3 $\pm$ 2.75	15.67 $\pm$ 2.65	17.67 $\pm$ 2.5	18.67 $\pm$ 2.33 ^①

①与对照组比较 $P<0.05$

2.2 VEGF mRNA表达

损伤后5周训练组脊髓及腓肠肌内VEGF mRNA表达较对照组、损伤后1d、1周组均显著增加($P<0.05$);对照组与损伤1周组、1d组比较脊髓及腓肠肌内VEGF mRNA表达差异无显著性($P>0.05$);但1周组脊髓内VEGF mRNA较1d组增加($P<0.05$),而腓肠肌内VEGF mRNA表达较1d组降低($P<0.05$)。见表2。

2.3 VEGF蛋白表达

损伤后5周训练组脊髓及腓肠肌内VEGF蛋白表达较对照组、损伤后1d、1周组均显著增高($P<0.05$)。对照组与损伤后1d、1周组比较差异无显著性($P>0.05$);损伤后1周组脊髓内蛋白较1d组增加,而腓肠肌蛋白表达低于损伤后1d($P>0.05$)。见表3。

表2 VEGFmRNA在脊髓及腓肠肌内的表达 ($\bar{x}\pm s$)

组别	损伤后1d	损伤后1周	对照组	训练组
肌肉	1	0.95 $\pm$ 0.08	0.98 $\pm$ 0.11	1.27 $\pm$ 0.07 ^①
脊髓	1	1.17 $\pm$ 0.07	1.09 $\pm$ 0.13	1.49 $\pm$ 0.09 ^①

①与对照组及损伤后1d、1周组比较 $P<0.05$

表3 脊髓及腓肠肌内VEGF蛋白的表达 ($\bar{x}\pm s$)

组别	损伤后1d	损伤后1周	对照组	训练组
肌肉	1 $\pm$ 0	0.88 $\pm$ 0.11	0.95 $\pm$ 0.21	1.95 $\pm$ 0.36 ^①
脊髓	1 $\pm$ 0	1.16 $\pm$ 0.18	1.05 $\pm$ 0.14	2.09 $\pm$ 0.25 ^①

①与对照组及损伤后1d、1周组比较 $P<0.05$

3 讨论

临床研究发现,脊髓损伤后损伤远端脊髓的继

发性损害导致骨骼肌萎缩、肌张力下降及周围神经损害^[8]。其病理包括血液循环障碍、传导束脱髓鞘及运动神经元凋亡等。VEGF作为血管新生的关键效应因子,对血管生长起着重要作用;同时能有效促进SCI后功能恢复并降低继发性损害程度^[9-11]。有文献报道^[12],低氧刺激能诱导SCI大鼠VEGF表达增加,但该干预措施难以转化为有效的临床治疗措施。同时有研究发现VEGF也可能是参与脊髓损伤后神经性疼痛的重要因子^[13],过度VEGF表达有可能增加神经性疼痛的风险。因此有效诱导VEGF适量表达而发挥其积极的神经保护和营养作用是关键所在。为此,本研究在明确运动能有效诱导心肌表达VEGF及促进冠状动脉血管生长的基础上^[14],进一步验证运动对脊髓VEGF表达的影响,为SCI血液循环重建和神经功能修复提供依据。

研究结果发现,SCI后1周时脊髓组织内VEGF有所增加,而延长至5周时则表达无明显改变。可能与SCI后1周内血管损伤造成的缺血刺激诱导了VEGF表达,而随着损伤病程的延长,损伤局部微循环血供改善减轻了组织缺血,从而使VEGF表达逐渐减弱。而腓肠肌VEGF的表达则呈现相反的结果,在损伤后1周时表达处于低谷,至5周时表达有所回升,但仍低于损伤后1d时的水平。骨骼肌表达变化规律可能与脊髓损伤早期后肢瘫痪使肌肉处于不活动状态而削弱了VEGF的表达有关;随着运动功能的自发恢复,骨骼肌主动活动增加促使VEGF表达所有增加;同时由于后肢整体运动功能仍低于

正常水平,则 VEGF 表达水平仍低于 SCI 后 1d 组。运动训练后,发现无论脊髓还是肌肉组织 VEGF 表达均显著提高。提示脊髓损伤早期运动训练通过诱发肌肉活动可增强 VEGF 表达;同时随着运动功能的恢复,后肢骨骼肌主动活动增强,也可能促进了 VEGF 表达。脊髓内 VEGF 的表达增加是否经运动本身促进脊髓组织内 VEGF 表达或通过骨骼肌表达逆行或经血液系统运输达到脊髓,目前尚不明确。有学者推断^[15],骨骼肌产生的神经营养因子有可能通过反馈性作用增加脊髓表达水平。还有研究证明^[16]运动训练能增加血液内 VEGF 蛋白表达浓度,因此 VEGF 也可能通过旁分泌方式运输到脊髓。其诱导途径和机制尚需深入研究。

总之,运动训练能有效诱导脊髓损伤大鼠远端脊髓及骨骼肌 VEGF 表达及运动功能恢复。

参考文献

- [1] Lu X, Wu T, Huang P, et al. Effect and mechanism of intermittent myocardial ischemia induced by exercise on coronary collateral formation[J]. *Am J Phys Med Rehabil*, 2008, 87: 803—814.
- [2] Facchiano F, Fernandez E, Mancarella S, et al. Promotion of regeneration of corticospinal tract axons in rats with recombinant vascular endothelial growth factor alone and combined with adenovirus coding for this factor[J]. *J Neurosurg*, 2002, 97: 161—168.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] Lu K, Liang CL, Chen HJ, et al. Injury severity and cell death mechanisms: effects of concomitant hypovolemic hypotension on spinal cord ischemia-reperfusion in rats[J]. *Exp Neurol*, 2004, 185: 120—132.
- [8] 王红星, 陈文红, 顾绍钦, 等. 脊髓损伤患者双下肢神经肌肉的生理特征[J]. *中国康复医学杂志*, 2011, (6): 513—517.
- [9] Widenfalk J, Lipson A, Jubran M, et al. Vascular endothelial growth factor improves functional outcome and decreases secondary degeneration in experimental spinal cord contusion injury[J]. *Neuroscience*, 2003, 120: 951—960.
- [10] De Laporte L, des Rieux A, Tuinstra HM, et al. Vascular endothelial growth factor and fibroblast growth factor 2 delivery from spinal cord bridges to enhance angiogenesis following injury[J]. *J Biomed Mater Res A*, 2011, 98(3): 372—382.
- [11] Lutton C, Young YW, Williams R, et al. Combined VEGF and PDGF treatment reduces secondary degeneration after spinal cord injury[J]. *J Neurotrauma*, 2012, 29(5): 957—970.
- [12] Sundberg LM, Herrera JJ, Narayana PA. Effects of vascular endothelial growth factor treatment in experimental traumatic spinal cord injury: in vivo longitudinal assessment[J]. *J Neurotrauma*, 2011, 28(4): 565—578.
- [13] An SS, Pennant WA, Ha Y, et al. Hypoxia-induced expression of VEGF in the organotypic spinal cord slice culture[J]. *Neuroreport*, 2011, 22(2): 55—60.
- [14] 邱峰, 励建安, 陆晓, 等. 心肌缺血和有氧运动训练诱导 VEGF 表达时间规律的实验研究[J]. *中国康复医学杂志*, 2008, 23(3): 193—197.
- [15] Sieck GC, Mantilla CB. Role of neurotrophins in recovery of phrenic motor function following spinal cord injury[J]. *Respir Physiol Neurobiol*, 2009, 169(2): 218—225.
- [16] Lu X, Wu T, Huang P, et al. Effect and mechanism of intermittent myocardial ischemia induced by exercise on coronary collateral formation[J]. *Am J Phys Med Rehabil*, 2008, 87(10): 803—814.