

·基础研究·

运动训练对大鼠损伤远端脊髓超微结构及脑源性神经营养因子表达的影响*

柴湘婷¹ 王红星^{2,3} 丁晓晶² 陈文红² 王 彤² 励建安²

摘要

目的:明确运动训练对大鼠脊髓损伤(SCI)后远端脊髓超微结构及脑源性神经营养因子(BDNF)表达的影响。

方法:成年雌性SD大鼠18只,采用改良Allen撞击法制作T9不完全性SCI模型。术后随机分为损伤后1周组、对照组(未行训练)及训练组(术后1周开始训练,共4周)。分别在损伤前、损伤后第1、2、3、4及5周时采用BBB评分评定运动功能,训练结束后取腰膨大段脊髓进行电镜观察超微结构,免疫组化检测BDNF蛋白表达情况。

结果:①BBB评分: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超微结构:损伤后1周组,髓鞘排列规律整齐、轴索较均匀一致、核仁清晰;对照组髓鞘松散、轴索与髓鞘间出现空隙、轴突变性及空泡;训练组髓鞘完整、较薄、轴索均匀、髓鞘下及神经纤维周围基质中少见空泡。③BDNF免疫组化:BDNF免疫反应阳性产物多分布于脊髓前角,中央管周围也有出现,背角少见;训练组BDNF阳性染色颗粒增多,平均光密度值较损伤后1周组及对照组均显著增加($P<0.05$)。

结论:运动训练能减轻损伤远端脊髓继发性损害,并促进BDNF蛋白的表达。

关键词 脊髓损伤;超微结构;脑源性神经营养因子;运动训练

中图分类号:R651.2,R493 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2012)-08-0728-04

The effect of exercise training on ultrastructure and brain-derived neurotrophic factor expression in spinal cord distal to injury level in rats/CHAI Xiangting, WANG Hongxing, DING Xiaojing, et al//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2012, 27(8): 728—731

Abstract

Objective: To determine the effects of exercise training on ultrastructure and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) expression in spinal cord distal to injury level in rats.

Method: Eighteen female adult Sprague-Dawley rats were included to make incomplete spinal cord injury (SCI) at T9 level by using modified Allen's method. Those rats were divided randomly into 1 week post injury group, control group(without training) and exercise group (trained by body-weight-support-treadmill-training, started from 1 week after injury, lasted 10 min/time, twice a day, 5d/week, for 4 weeks). Locomotor function was evaluated using Basso-Beattie-Bresnahan (BBB) scale before injury and at the 1st, 2nd, 3rd, 4th and 5th week post-injury. Ultrastructure changes and expression of BDNF were detected by electron microscope and immunohistochemistry test respectively.

Result: ①BBB scores in exercise and control groups were higher than that at 1 week and 2 week post injury, but BBB scores in exercise group increased more significantly than that in control group ($P<0.05$). ②Ultrastructure changes in control group, the most notable changes were the overt splitting of myelin lamellae, evident loss of myelin compaction and much intramyelinic vacuoles. In exercise group, axons retained their round or oval

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2012.08.009

*基金项目:国家自然科学基金资助项目(81000853)

1 山东省胶南市人民医院内一科,山东胶南,266400; 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:柴湘婷,女,硕士,主任医师; 收稿日期:2012-05-19

shapes, but there were few intramyelinic vacuoles and some loss of myelin compaction. ③In immunohistochemistry test positive immunologic reaction to BDNF protein was mainly located in anterior horn of spinal cord, the expression level in exercise group increased remarkably compared with 1 week post injury group and control group ($P < 0.05$).

Conclusion: Exercise training may alleviate the secondary degeneration and enhance the expression of BDNF in spinal cord distal to injury level in rats.

Author's address 287 Renmin Road, Jiaonan, Shandong Province, 266400

Key word spinal cord injury; ultrastructure; brain-derived neurotrophic factor; exercise training

临床和实验研究均致力于脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)后损伤局部神经功能的治疗,而对远端脊髓功能变化却关注甚少。研究提示^[1],脊髓损伤后中枢传导通路中断造成的中枢神经营养支持作用缺乏可引起远端脊髓出现继发性损害,如脱髓鞘、轴索变性等,给予神经营养因子能有效减轻远端脊髓的继发性损害。本课题组在前期研究发现运动能有效改善运动功能的基础上^[2],进一步探讨运动训练对损伤远端脊髓超微结构及脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic, BDNF)表达的影响,探讨运动训练对继发性损害的影响及机制,为脊髓损伤后康复治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

成年雌性SD大鼠18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】。将其随机分为损伤后1周组、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T9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,10min/次,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减重装置。跑台速度为0.8km/h。减重量为体重的20%—40%(随时间延长逐渐降低减

重程度,第1周减重40%,第2周35%,第3周30%,第4周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、损伤后第1、2、3、4、5周对每组大鼠进行BBB评分^[3]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 取材

训练结束后,10%水合氯醛腹腔麻醉,4%多聚甲醛磷酸缓冲液灌注,固定1h,取腰膨大脊髓。分别进行免疫组化及电镜检测。损伤1周组在术后1周取材,对照组和训练组均在术后5周取材。

1.6 电镜

标本用4%戊二醛磷酸缓冲液继续固定24h,后用1%锇酸后固定10min, PBS洗涤后注入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 BDNF免疫组织化学检测

标本经固定后制成5μm厚的石蜡切片,采用SP法染色。光学显微镜下观察切片中组织染色及BDNF蛋白的表达分布情况。

1.8 统计学分析

数据均以均数±标准差表示。所有数据均经SPSS16.0软件检验呈正态性分布且方差齐性。组间比较采用单因素方差分析,组间多重比较采用Fisher post-hoc 检验,以 $P < 0.05$ 为有显著性差异。

2 结果

2.1 运动功能

对照组与训练组大鼠损伤2周后,BBB评分开始显著提高,第3—5周仍呈显著增加趋势,与损伤后第1周、第2周比较有显著性差异($P<0.05$),训练组较对照组增加更为显著($P<0.05$)。见表1。

2.2 超微结构

损伤后1周组,髓鞘排列规律整齐,轴索均匀一致,核仁清晰;对照组,髓鞘松散、轴索与髓鞘间出现空隙、轴突变性、空泡多见;训练组,髓鞘完整,稍松

散、较薄,轴索均匀,髓鞘下及神经纤维周围基质中少见空泡(见图1)。

2.3 免疫组织化学检测

BDNF免疫反应阳性产物多分布于脊髓前角,中央管周围也有出现,背角少见。训练组BDNF阳性染色颗粒增多,平均光密度值较损伤后1周、对照组显著增加, 0.08 ± 0.008 、 0.12 ± 0.003 、 0.14 ± 0.008 ($P<0.05$)(表2,图2)。每组6只SD大鼠。

表1 SCI大鼠BBB评分变化 (n=6, $\bar{x} \pm s$)

组别	损伤前	第1周	第2周	损伤后第3周	第4周	第5周
对照组	21 ± 0	3.43 ± 1.15	9.75 ± 1.53	11.3 ± 1.28	12.94 ± 1.67	14.21 ± 1.78
训练组	21 ± 0	3.61 ± 1.48	13.1 ± 1.72	15.49 ± 1.51	17.67 ± 1.80	18.38 ± 2.08

图1 远端脊髓超微结构 (×2000)

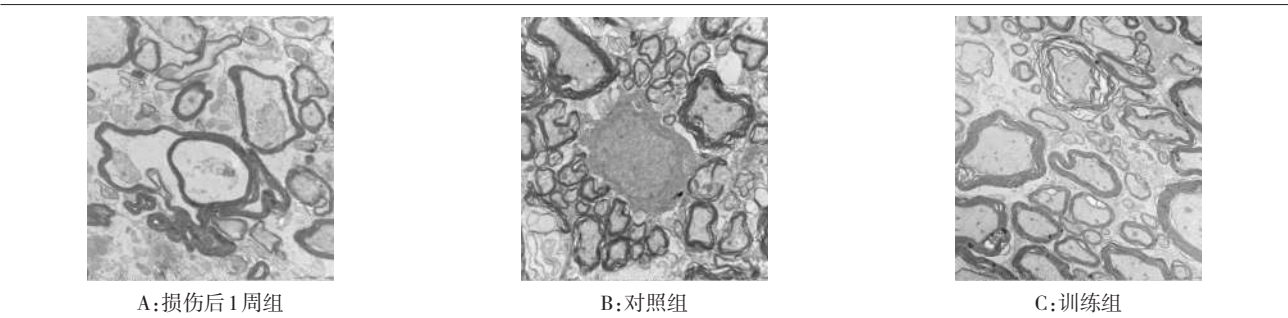
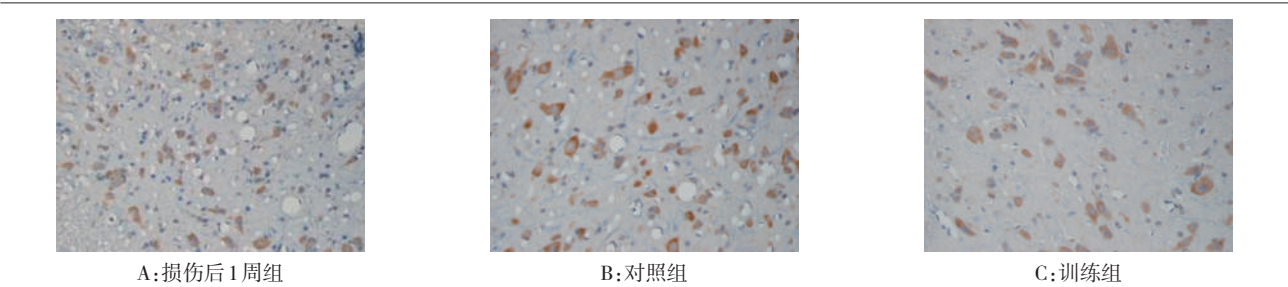


图2 远端脊髓BDNF表达 (免疫组化染色, ×100)



3 讨论

临床和实验研究表明SCI后远端脊髓及其脊神经运动神经纤维会发生继发性损害^[1,4-6],包括脊髓内脱髓鞘、轴索变性、细胞凋亡、运动神经纤维轴索变性等,并认为可能与脊髓传导通路中断而使远端脊髓失去上位中枢的神经营养作用有关,肢体瘫痪引起肌肉活动依赖性的神经营养因子分泌减少也可能是造成脊髓继发性损害的机制之一。本课题组在前期研究^[7-8]证明运动训练能有效改善运动功能及

促进脊髓相关神经营养因子表达的基础上,进一步探讨运动训练能否通过诱导神经营养因子表达而减轻远端脊髓继发性损害。

研究结果发现,未给予运动训练的对照组大鼠在SCI后5周远端脊髓可见髓鞘排列松散、髓鞘与轴索空隙、轴索变性及空泡,而训练组远端脊髓虽可见髓鞘变薄及少量空泡,但髓鞘排列较整齐,轴索较均匀,与对照组比较,其继发性损害程度显著减轻。提示运动训练可有效减轻SCI后远端脊髓的继发性损

害。有研究发现^[1],运动训练能使SCI后下肢神经轴索性损害及肌肉失神经支配表现减轻,并推断其机制可能是运动改善了远端脊髓的继发性损害而减轻了脊神经的轴索性损害,但未观察远端脊髓的形态学变化。本研究结果提示运动训练可减轻远端脊髓继发性损害,进而维持运动神经元功能、减轻其运动神经纤维轴索性损害及肌肉的失神经支配表现。同时,研究结果还发现,SCI后1周远端脊髓超微结构并无明显改变,提示远端脊髓继发性损害的形态学表现并非SCI后的即刻变化,有一个时间窗,但SCI后基因及分子水平的改变却在SCI后即刻启动,早于形态学改变。

研究发现SCI后给予BDNF后远端肌肉失神经支配程度减轻,而且运动神经元萎缩程度减轻^[9-10],细胞数目减少程度降低。提示神经营养因子可能是预防或阻止SCI后远端脊髓继发性损害的重要分子机制。本研究结果发现训练组远端脊髓内BDNF蛋白表达较对照组显著增高。提示运动训练有可能通过促进神经营养因子的表达而减轻继发性损害。因此,早期介入运动训练可通过调节分子水平的表达而保护远端脊髓功能。

SCI后远端脊髓的继发性损害是一个过程复杂、受众多因素影响的病理性变化。尽管训练组远端脊髓超微结构变化较对照组明显改善,仍可见一定程度损害表现。虽然神经营养因子能有效减轻其病理变化,但单一因素介入难以从根本上完全阻止继发损害的病理过程。本研究只是从超微结构的形态学观察提示运动训练有助于减轻继发性损害程度,并可能通过BDNF表达而减轻继发性损害程度,为远端脊髓继发损害的机制及治疗方法的深入研究

提供了思路。但对其复杂的机制尚不清楚,尚需进一步深入研究。

总之,运动训练能减轻损伤远端脊髓继发性损害,并促进BDNF蛋白的表达。

参考文献

- [1] 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.
- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] 王红星, 陈文红, 顾绍钦, 等. 脊髓损伤患者双下肢神经肌肉的电生理特征[J]. 中国康复医学杂志, 2011, 26(6): 513—517.
- [5] 张庆民, 关骅, 洪毅. 完全性横断性脊髓损伤后跨神经元变性的实验研究[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2006, 16(11): 840—843.
- [6] 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.
- [7] 潘孟尧, 王红星, 丁晓晶, 等. 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[J]. 中国康复医学杂志, 2012, 27(5): 406—409.
- [8] 雷晓婷, 刘兴波, 王红星, 等. 康复训练对脊髓损伤后大鼠脊髓内再生微环境的影响[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2009, 29(4): 429—434.
- [9] Sharma HS. Selected combinations of neurotrophins potentiate neuroprotection and functional recovery following spinal cord injury in the rat[J]. Acta Neurochir Suppl, 2010, 106: 295—300.
- [10] Shulga A, Blaesse A, Kysenius K, et al. Thyroxine regulates BDNF expression to promote survival of injured neurons[J]. Mol Cell Neurosci, 2009, 42(4): 408—418.