

·基础研究·

早期跑台训练在改善颅脑外伤大鼠认知功能中的应用*

沈夏锋¹ 于惠贤² 吴军发³ 张宇玲⁴ 田 闪³ 荣积峰¹ 路微波¹ 胡永善³ 吴 毅^{3,5}

摘要

目的:观察早期运动对中重度颅脑外伤(TBI)大鼠认知功能的影响。

方法:成年雄性SD大鼠30只,随机分为运动组、对照组和假手术组。制作中重度控制性皮质损伤(CCI)颅脑外伤模型,运动组大鼠在术后1天进行电动跑台运动训练,30min/d,1次/d,为期2周,训练结束后休息1周;术后第21—25天行Morris水迷宫(MWM)检查,评估大鼠认知功能的变化;术后第26天行Western blot检查海马区脑源性神经营养因子(BDNF)表达。

结果:运动组术后第21—24天平台搜索的潜伏期较对照组缩短,术后第25天颅脑外伤后运动组的象限游泳路程占总路程的百分值(29.1 ± 0.02)大于对照组(23.10 ± 0.02)($P<0.05$);运动组和对侧皮质内BDNF蛋白表达分别为(0.94 ± 0.10)和(0.65 ± 0.03),表明运动上调损伤对侧的海马区BDNF的表达。

结论:早期进行适宜强度的运动训练治疗能改善颅脑外伤大鼠认知功能和上调海马BDNF的表达。

关键词 颅脑损伤;跑台训练;认知功能;海马;脑源性神经营养因子

中图分类号:R651.15,R493 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2015)-02-0112-05

Early treadmill exercise in improving cognitive functional deficit after traumatic brain injury in rats/
SHEN Xiaofeng, YU Huixian, WU Junfa, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2015, 30(2):
112—116

Abstract

Objective: To determine the effect of early treadmill exercise on cognitive function of rats following traumatic brain injury(TBI).

Method: Thirty rats were randomly divided into an exercise group($n=10$), a control group($n=10$) or a sham group($n=10$). Rats underwent surgery to induce either a sham injury or a controlled cortical impact (CCI) injury. Rats in exercise group were forced to administer treadmill exercise for 14 days. The Morris water maze (MWM) task began at 21 days post-surgery and lasted for consecutive 4 days. Rats were sacrificed at day 26 for determining brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein expression in hippocampus.

Result: The rats in the exercise group had a shorter latency to find the platform in MWM test compared with control group rats ($P<0.05$). In exercise group rats travelled a longer distance which possessed a larger percent of total distance(29.07 ± 0.02), compared to that in control group (23.10 ± 0.02)($P<0.05$). The BDNF protein levels in contralateral hippocampus increased in the exercise group compared with the control group, (0.944 ± 0.095) vs (0.65 ± 0.03), respectively.

Conclusion: Treadmill exercise soon after severe TBI can contribute to the alleviation of TBI-induced cognitive deficits and the up-regulation of hippocampal BDNF expression.

Author's address Dept. of Rehabilitation Medicine, The Shanghai No.1 Rehabilitation Hospital, Shanghai, 200090

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2015.02.002

*基金项目:上海市杨浦区卫生局“名医师工程”课题;上海市科委生物医学重点项目(13411951000)

1 上海第一康复医院(筹),上海杨浦区老年医院,200090; 2 首都医科大学附属北京同仁医院康复医学科; 3 复旦大学附属华山医院康复医学科; 4 上海理工大学医疗器械与食品学院; 5 通讯作者

作者简介:沈夏锋,男,副主任医师; 收稿日期:2014-03-20

Key word traumatic brain injury; treadmill training; cognitive function; hippocampus; brain-derived neurotrophic factor

颅脑外伤(trumatic brain injury,TBI)是世界范围的公共卫生问题,很多脑外伤患者伴有认知功能障碍,目前没有一种有效的方法和药物来治疗这类疾病,康复治疗仍然是治疗颅脑外伤的主要手段之一^[1]。运动疗法是康复医学的主要组成部分,运动除了有利于运动器官的功能恢复,还促进心血管系统、呼吸系统和神经系统的功能恢复。临床研究表明,运动训练能改善颅脑外伤患者的运动和认知功能^[2-3]。但临床上对于中重度颅脑外伤的早期运动治疗还没有统一的治疗指南^[4]。在基础研究方面,检索文献,研究大多集中在轻中度脑外伤,对于中重度颅脑外伤早期运动治疗研究不多,效果还不明确。脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)是一种和学习记忆有关的很重要的神经营养因子,上调海马BDNF与认知功能改善密切相关^[5]。颅脑外伤发生后,经常出现认知功能障碍,也伴随着海马BDNF表达的下调^[6]。在诸多颅脑外伤动物模型中,控制性皮质撞击损伤模型(controlled cortical impact, CCI)大脑的BDNF出现明显下调,与临床相似,适合进行脑外伤干预后大脑BDNF变化的研究^[5]。为了探索中重度颅脑外伤早期运动治疗的效果,本课题通过制作大鼠CCI颅脑外伤,在外伤后一天进行电动跑台运动训练,观察海马区BDNF表达,探讨早期跑台运动训练与颅脑外伤后认知功能恢复之间的关系,以及早期跑台运动训练对BDNF表达的影响。

1 材料与方法

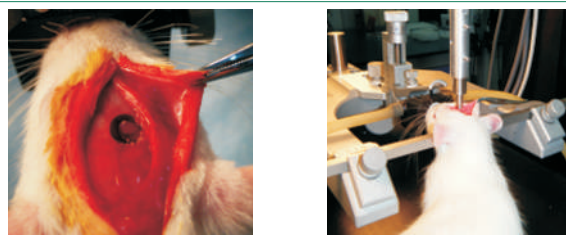
1.1 动物分组及模型制作

1.1.1 动物分组:健康成年SD大鼠30只,体重250—270g(由上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供,许可证号码SCXK(沪)2011-0016),随机分成运动组、对照组和假手术组,每组各10只。

1.1.2 动物模型:参考Sutton等制作CCI的方法^[7]:异氟醚气体诱导麻醉后,将大鼠俯卧位固定于控制性皮质冲击颅脑损伤操作台上(PSI,美国产),异氟醚全身麻醉,额顶部剃毛、消毒,沿中线矢状线切开

皮肤,暴露颅顶骨,用牙科电钻沿中线右旁5mm,前囟前2.5mm作一直径5mm的骨窗,暴露完整硬脑膜,使用不锈钢打击头对准骨窗,以速度4m/s、深度3.2mm撞击,造成中重度颅脑外伤^[8]。小心止血、缝合,见图1。

图1 建立大鼠CCI颅脑外伤模型



打开骨窗暴露脑膜的位置,即前囟右侧前方的圆形骨窗

按照预先设置的参数进行精确打击

1.1.3 运动训练方案:参考本课题组脑卒中大鼠跑台训练的经验,采用循序渐进的为期2周的低强度训练方案^[9]。各组在受伤后1d进行每天0倾角电动跑台(DSPT-202,立泰生物科技有限公司)运动干预,第1周跑台速度是3m/min,每天30min;第二周跑台速度是3m/min和5m/min各5min,8m/min,20min,每天共30min;对照组(0度倾角,0m/s),置于跑台机上30min。训练结束后休息1周。

1.2 观察指标及检测方法

1.2.1 Morris 水迷宫测试:测定空间学习能力和记忆能力,包括定位航行试验和空间搜索试验。定位航行试验:术后第21天,从任一象限开始将大鼠面向池壁随机放入水中,记录大鼠1min内找到平台的时间(逃避潜伏期),找到平台休息10s,如果1min内找不到平台,引导动物到平台休息10s,则逃避潜伏期记为1min,再按顺时针方向由下一象限入水进行,每次4个象限。每只鼠每天训练1次,连续4d。每天找到平台的平均时间为其学习时间,用于学习阶段的统计分析。空间搜索试验:末次定位航行试验结束后的第一天,撤除平台,从平台最远点将大鼠面向池壁放入水中,进行空间探索能力测试,在1min内记录其在各个象限寻找平台的时间,用于记忆能力的统计分析。

1.2.2 Western blot 检测:在手术后第 26 天大鼠在 10%水合氯醛(0.4ml/100g 体重)麻醉下断头取脑,将海马放入组织裂解液,匀浆,超声裂解。然后在 4℃下以 14000g 离心 30min,取上清。牛血清白蛋白标准液绘制标准曲线,考马斯亮蓝法测定提取蛋白的蛋白浓度。配分离胶和积层胶,上样量为 50g,先以 60V 电压电泳至样品进入分离胶中,然后将电压调至 100V,直至溴酚蓝跑至凝胶末端;转膜电压 100V,转膜时间为 90min,5%脱脂奶粉室温封闭 1h。 β 肌动蛋白(β -actin)作为内参,孵育 β -actin (1:1500, Epitomics, Inc.)和抗 BDNF 抗体 (1:1500, Abcam),室温振荡 1h 后,4℃过夜。孵育 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗(稀释度为 1:4000,上海舒济生物),室温振荡 1h。加荧光显影剂(ECL),在凝胶成像系统和 Quantity One 图像分析系统(Bio-rad 公司)中成像及分析蛋白条带的光密度。将假手术组光密度值设定为 1,取运动组和对照组光密度值与假手术组光密度的比值进行比较。

1.3 统计学分析

数据用 SPSS16.0 版统计软件分析,水迷宫数据采用重复测量资料的方差分析,蛋白电泳数据采

用独立样本 *t* 检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 对脑外伤后大鼠体重改变的影响

见表 1。假手术组大鼠的体重呈稳步上升趋势;而对照组大鼠则在术后第 3 天体重显著下降,随后稳步上升,两组无显著性差异。运动组的体重也下降,随后逐步上升,和对照组相比,两组无显著性差异。上述结果说明运动训练对体重无明显影响(图 2)。

2.2 对空间学习能力的影响

见表 2。在颅脑外伤后第 21—24 天,随时间推移,对照组和假手术组大鼠各时间点的潜伏期逐渐缩短,学习能力逐步提高。对照组大鼠找到水下平台的潜伏期明显比假手术组长,差异具有显著性($P<0.05$)。而运动组平台搜索的潜伏期较对照组缩短,第 3 天和第 4 天明显缩短,有明显差异($P<0.05$);运动组和假手术组无明显差异。上述结果说明:外伤后大鼠空间学习能力明显降低,而运动训练促进影响脑外伤后大鼠的空间学习能力的改善(图 3)。

2.3 对空间记忆能力的影响

表 1 低强度运动训练对大鼠体重的影响 ($\bar{x}\pm s$)			
测试时间	运动组	对照组	假手术组
-1d	257.3 $\pm$ 4.70	262.4 $\pm$ 8.0	258.7 $\pm$ 11.4
3d	247.3 $\pm$ 8.4	259.3 $\pm$ 9.0	257.0 $\pm$ 7.6
6d	257.3 $\pm$ 10.7	265.7 $\pm$ 8.4	269.9 $\pm$ 7.3
9d	269.6 $\pm$ 10.0	286.9 $\pm$ 10.0	305.0 $\pm$ 12.6
12d	285.9 $\pm$ 10.5	303.5 $\pm$ 7.9	313.9 $\pm$ 8.6
15d	298.1 $\pm$ 8.7	317.4 $\pm$ 6.6	329.0 $\pm$ 9.9
18d	319.1 $\pm$ 9.8	327.6 $\pm$ 9.6	349.3 $\pm$ 5.7
21d	325.8 $\pm$ 8.0	343.4 $\pm$ 8.0	359.3 $\pm$ 6.3
24d	340.2 $\pm$ 8.9	353.7 $\pm$ 9.8	368.0 $\pm$ 8.6

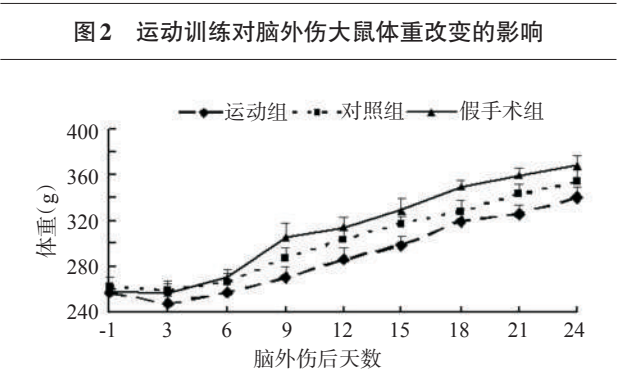
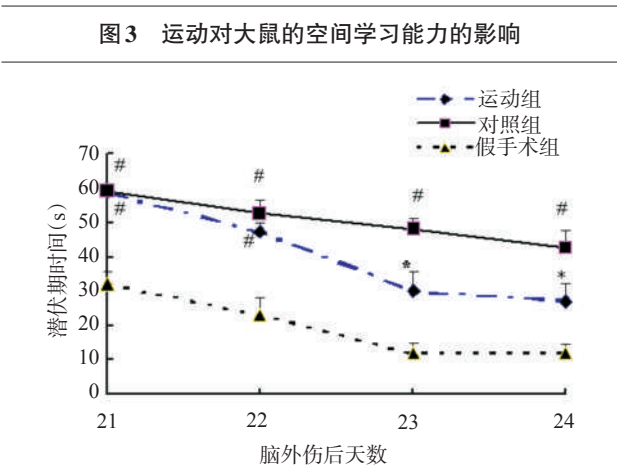


表 2 运动训练对大鼠空间学习能力的影响 ($\bar{x}\pm s$)			
测试时间	运动组	对照组	假手术组
21	58.93 $\pm$ 0.99	59.38 $\pm$ 0.63 ^②	32.06 $\pm$ 3.82
22	47.40 $\pm$ 2.38	52.61 $\pm$ 3.93 ^②	22.97 $\pm$ 5.15
23	30.13 $\pm$ 5.69 ^①	48.17 $\pm$ 3.21 ^②	12.00 $\pm$ 2.66
24	27.18 $\pm$ 4.99 ^①	43.01 $\pm$ 4.88 ^②	11.80 $\pm$ 2.68

①与对照组比较 $P<0.05$;②与假手术组比较 $P<0.05$



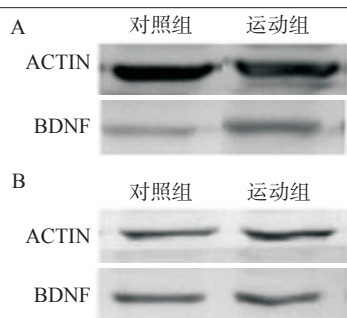
与对照组相比,* $P<0.05$;与假手术组相比,# $P<0.05$ 。

脑外伤后第25天去除平台,观察各组大鼠在目标象限(原平台所在区域)的停留时间百分比,以了解各组大鼠的空间记忆能力。颅脑外伤后运动组和假手术组的目的象限停留时间百分比分别为 (29.07 ± 0.02) 和 (29.69 ± 0.03) ,均比对照组 (23.10 ± 0.02) 高,差异具有显著性意义($P < 0.05$)。

2.4 海马BDNF的表达

运动组和对照组大鼠损伤对侧海马内BDNF蛋白表达分别为 (1.115 ± 0.129) 和 (0.743 ± 0.031) ,运动组损伤对侧海马的BDNF表达较对照组明显升高,差异具有显著性意义($P < 0.05$)(图4A),运动组和对照组大鼠损伤侧海马内BDNF蛋白表达相似,分别为 (0.891 ± 0.06) 和 (0.749 ± 0.04) ,无显著性差异(图4B)。

图4 运动对脑外伤后大鼠海马BDNF蛋白表达的影响



3 讨论

近年来,随着颅脑外伤发病率逐渐升高,脑外伤的后遗症也越来越受到临床医生的重视,据报道中度颅脑外伤患者至少有50%存在长期的损伤相关的残障^[10]。与运动功能障碍相比,中重度颅脑外伤患者外伤后记忆力、定向力、注意力、执行功能、解决问题能力等认知功能障碍往往更为突出,持续时间长,严重影响患者躯体运动功能的恢复和日常生活能力的提高^[11]。研究表明,学习记忆功能障碍和海马的病理变化密切相关,在CCI颅脑外伤动物模型中,出现认知功能障碍,也发现海马区域有相应的病理改变^[12]。有研究认为颅脑外伤引起海马部位尤其是CA2、CA3区大量的神经元死亡,是颅脑外伤后认知功能障碍发生的主要原因^[13]。本实验结果发现颅脑外伤后对照组大鼠潜伏期延长,在目标象限游泳时间减少,也证实颅脑外伤后大鼠认知功能遭到损害。

以往的动物实验研究已经证实,颅脑外伤后一周进行运动训练能改善大鼠颅脑外伤后的认知功能障碍^[14]。最近有文献报道指出,大鼠颅脑外伤后2天进行跑台训练能促进短期记忆功能的改善^[15]。然而,这些研究仅限于轻中度颅脑外伤,对于运动训练对中重度颅脑外伤的学习记忆障碍是否有影响,尚未见有报道。本研究通过制作大鼠颅脑外伤模型,观察外伤后1天进行跑台运动训练对中重度颅脑外伤大鼠认知功能的影响,结果发现早期进行低强度的康复训练治疗能改善颅脑外伤大鼠空间学习和记忆能力。但是,也有报道颅脑外伤大鼠早期进行跑台训练不能改善甚至恶化认知功能^[6,14]。就大鼠颅脑外伤急性期运动训练而言,之所以出现不同的实验结果,可能与不同运动方式、运动频率和运动强度有关。转笼运动和跑台运动是最常用的运动方式,这两种运动存在不同的特点,跑台运动训练可以控制运动时间和运动强度,而转笼运动很难控制运动时间和运动强度。此外,有报道跑台运动比转笼运动更容易改善脑缺血后功能障碍,也表明两种运动训练方式对治疗效果存在差别^[16]。我们认为,具体的运动时间和运动强度必须和康复介入的时间点综合考虑。颅脑外伤后产生脑水肿、脑缺血、炎症反应、自由基生成、兴奋性氨基酸释放、能量代谢障碍等病理生理改变,尤其是伤后第一周这种病理生理改变尤其明显^[17],此时,运动训练方案对疗效起着至关重要的作用,只有适当的运动时间和运动强度才会促进神经功能改善,而不适当的运动量和运动强度可能恶化神经功能^[18]。本研究也表明,中重度颅脑外伤后急性期采取适宜的训练方案能改善中重度颅脑外伤大鼠的认知功能障碍。

对于本课题运动改善颅脑外伤大鼠认知功能障碍的机制,我们认为可能与脑内BDNF的作用有关。BDNF是中枢神经系统内最丰富、分布最广的神经营养因子,它具有促进海马神经元的生长、增殖、分化和迁徙等作用,与认知功能密切相关^[19-20]。以往的研究表明,运动训练能改善正常大鼠的认知功能,上调大鼠海马的BDNF表达水平,并且通过上调BDNF来改善认知功能^[21-22]。进一步研究表明,运动训练还促进颅脑外伤大鼠海马BDNFmRNA的表达,改善颅脑外伤大鼠的认知功能,并且认知功能

的改善和对侧海马 BDNF 的上调明显相关^[6,23]。此外, BDNF 和突触可塑性密切相关^[24]。本研究也发现, 同侧海马 BDNF 蛋白水平并未明显改变, 而对侧海马的 BDNF 的蛋白水平明显上调, 提示运动训练能促进 BDNF 的上调。结合空间学习和记忆功能的改善, 提示本研究大鼠认知功能的改善很可能是通过上调对侧海马的 BDNF, 通过对侧海马可塑性的变化达到的。

本研究通过对颅脑外伤大鼠早期运动训练效果的观察, 结果表明早期介入适宜的运动训练, 可以促进大鼠颅脑外伤后神经功能恢复。本研究为颅脑损伤的临床康复治疗提供有价值的依据, 提示在脑外伤早期, 采取正规的、适宜的功能训练可起到改善颅脑外伤患者的功能障碍作用。

参考文献

- [1] Menon DK. Unique challenges in clinical trials in traumatic brain injury[J]. Crit Care Med, 2009, 37(1 Suppl):S129—135.
- [2] Lippert-Gruener M, Maegele M, Garbe J, et al. Late effects of enriched environment (EE) plus multimodal early onset stimulation (MEOS) after traumatic brain injury in rats: Ongoing improvement of neuromotor function despite sustained volume of the CNS lesion[J]. Exp Neurol, 2007, 203(1):82—94.
- [3] Franckeviciute E, Krisciunas A. Evaluation of factors influencing effectiveness of kinesitherapy in patients after traumatic brain injury[J]. Medicina (Kaunas), 2006, 42(9):732—737.
- [4] Andelic N, Bautz-Holter E, Ronning P, et al. Does an early onset and continuous chain of rehabilitation improve the long-term functional outcome of patients with severe traumatic brain injury[J]? Journal of Neurotrauma, 2012, 29(1):66—74.
- [5] Griesbach GS, Sutton RL, Hovda DA, et al. Controlled contusion injury alters molecular systems associated with cognitive performance[J]. Journal of Neuroscience Research, 2009, 87(3):795—805.
- [6] Hicks RR, Boggs A, Leider D, et al. Effects of Exercise Following Lateral Fluid Percussion Brain Injury in Rats[J]. Restorative Neurology And Neuroscience, 1998, 12(1):41—47.
- [7] Sutton RL, Lescaudron L, and Stein DG. Unilateral cortical contusion injury in the rat: vascular disruption and temporal development of cortical necrosis[J]. J Neurotrauma, 1993, 10(2):135—149.
- [8] Baskaya MK, Dogan A, Temiz C, et al. Application of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride staining to evaluate injury volume after controlled cortical impact brain injury: role of brain edema in evolution of injury volume[J]. J Neurotrauma, 2000, 17(1):93—99.
- [9] Bedford TG, Tipton CM, Wilson NC, et al. Maximum oxygen consumption of rats and its changes with various experimental procedures[J]. Journal of Applied Physiology, 1979, 47(1979):1278—1283.
- [10] Kraus MF, Smith GS, Butters M, et al. Effects of the dopaminergic agent and NMDA receptor antagonist amantadine on cognitive function, cerebral glucose metabolism and D2 receptor availability in chronic traumatic brain injury: a study using positron emission tomography (PET)[J]. Brain Injury, 2005, 19(7):471—479.
- [11] Dikmen SS, Corrigan JD, Levin HS, et al. Cognitive outcome following traumatic brain injury[J]. Journal of Head Trauma Rehabilitation, 2009, 24(6):430—438.
- [12] Saatman KE, Feeko KJ, Pape RL, et al. Differential behavioral and histopathological responses to graded cortical impact injury in mice[J]. J Neurotrauma, 2006, 23(8):1241—1253.
- [13] Tehranian R, Rose ME, Vagni V, et al. Disruption of Bax protein prevents neuronal cell death but produces cognitive impairment in mice following traumatic brain injury[J]. J Neurotrauma, 2008, 25(7):755—767.
- [14] Griesbach GS, Gomez-Pinilla F, Hovda DA. Time window for voluntary exercise-induced increases in hippocampal neuroplasticity molecules after traumatic brain injury is severity dependent[J]. J Neurotrauma, 2007, 24(7):1161—1171.
- [15] Kim DH, Ko IG, Kim BK, et al. Treadmill exercise inhibits traumatic brain injury-induced hippocampal apoptosis[J]. Physiol Behav, 2010, 101(5):660—665.
- [16] Hayes K, Sprague S, Guo M, et al. Forced, not voluntary, exercise effectively induces neuroprotection in stroke[J]. Acta Neuropathologica, 2008, 115(3):289—296.
- [17] Griesbach GS, Hovda DA, Tio DL, et al. Heightening of the stress response during the first weeks after a mild traumatic brain injury[J]. Neuroscience, 2011, 178:147—158.
- [18] Griesbach GS. Exercise after traumatic brain injury: is it a double-edged sword?[J]. PM R, 2011, 3(6 Suppl 1):S64—72.
- [19] Hu Y, Russek SJ. BDNF and the diseased nervous system: a delicate balance between adaptive and pathological processes of gene regulation[J]. J Neurochem, 2008, 105(1):1—17.
- [20] Liu YF, Chen HI, Wu CL, et al. Differential effects of treadmill running and wheel running on spatial or aversive learning and memory: roles of amygdalar brain-derived neurotrophic factor and synaptotagmin I[J]. The Journal of Physiology, 2009, 587:3221—3231.
- [21] Vaynman S, Ying Z, Wu A, et al. Coupling energy metabolism with a mechanism to support brain-derived neurotrophic factor-mediated synaptic plasticity[J]. Neuroscience, 2006, 139(4):1221—1234.
- [22] Lin TW, Chen SJ, Huang TY, et al. Different types of exercise induce differential effects on neuronal adaptations and memory performance[J]. Neurobiology of Learning and Memory, 2012, 97(1): 140—147.
- [23] Griesbach GS, Hovda DA, Gomez-Pinilla F. Exercise-induced improvement in cognitive performance after traumatic brain injury in rats is dependent on BDNF activation[J]. Brain Research, 2009, 1288:105—115.
- [24] Ferreira AF, Real CC, Rodrigues AC, et al. Moderate exercise changes synaptic and cytoskeletal proteins in motor regions of the rat brain[J]. Brain Research, 2010, 1361:31—42.