

·基础研究·

减重平板训练联合甲基强的松龙对脊髓损伤大鼠运动功能和脑源性神经营养因子及其受体TrkB表达的影响

李亚丽¹ 刘合玉^{1,2} 夏彬¹

摘要

目的:观察减重平板训练(BWSTT)和甲基强的松龙(MP)联合应用对脊髓损伤大鼠运动功能及脑源性神经营养因子(BDNF)及其酪氨酸激酶受体B(TrkB)表达的影响,为临床治疗脊髓损伤提供理论依据。

方法:清洁级成年雄性SD大鼠48只,按随机分配法,分为损伤对照组(n=12)、BWSTT组(n=12)、MP组(n=12)、联合治疗组(n=12)。采用改良Allen撞击法制作T10不完全性脊髓损伤模型。损伤对照组损伤后不做处理,减重平板组于损伤后1周平板训练,MP组损伤后给予大剂量甲基强的松龙琥珀酸钠冲击治疗,联合治疗组损伤后给予MP治疗联合平板训练。每组分别在损伤前、损伤后1周、2周、3周、4周、5周时采用BBB评分进行运动功能评定。于训练结束时取T₁₂—L₂节段脊髓,采用免疫组化法结合光密度分析法观察BDNF及其受体TrkB的表达。

结果:①每组大鼠损伤后5周时运动功能评分均较本组1周时评分显著增高($P < 0.01$)。②从损伤3周后,与损伤对照组比较,其余3组大鼠运动功能评分明显增高,且联合治疗组显著高于减重平板组和MP组,5周时,减重平板组评分高于MP组,差异具有显著性($P < 0.05$)。③免疫组化结果与对照组比较,减重平板组、MP组、联合组大鼠脊髓组织BDNF及其受体Trkb表达明显上升,差异有显著性($P < 0.05$),联合组BDNF及Trkb表达高于单纯平板组和MP组,差异具有显著性($P < 0.05$)。

结论:减重平板训练联合应用甲基强的松龙比单纯减重平板训练和MP对SCI大鼠运动功能及神经营养因子BDNF及其受体TrkB的表达有更明显的促进作用。

关键词 减重平板训练;甲基强的松龙;脊髓损伤;运动功能;脑源性神经营养因子

中图分类号:R744, R493 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2016)-08-0852-05

Effects of body weight support treadmill training combined with methylprednisolone on motor function and expressions of brain derived neurotrophic factor and TrkB in injured spinal cord of rats/LI Yali, LIU Heyu, XIA Bin//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2016,31(8): 852—856

Abstract

Objective: To explore effects of body weight support treadmill training(BWSTT) combined with high-dose methylprednisolone(MP) on motor function and expressions of brain-derived neurotrophic factor(BDNF) and tyrosine kinase receptor B(TrkB) in rats with spinal cord injury, provide theoretical basis for clinical treatment of spinal cord injury.

Method: Forty-eight adult male SD rats of clean level were randomly divided into damage control group (n=12), BWSTT group (n=12), MP group (n=12), BWSTT combined with high-dose MP group (n=12). An animal model of incomplete spinal cord injury was established by using modified Allen's method at T10 level of spinal cord. SCI group had no processing after injury, BWSTT group was trained by BWSTT for 4 weeks, MP group was treated by MP and combined group was treated by MP combined with training by BWSTT. Motion

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2016.08.005

1 郑州大学第二附属医院神经康复科,450014; 2 通讯作者

作者简介:李亚丽,女,住院医师;收稿日期:2015-05-12

function of every group was evaluated by using BBB scale before injury and at the 1st, 2nd, 3rd, 4th, 5th week post injury. The expression level of BDNF and TrkB in spinal cords were detected by immunohistochemical method.

Result: ① Five weeks after injury, BBB scores of each group were significantly higher than 1 week after injury ($P < 0.01$). ② Since the 3rd week after injury, BBB scores in other three groups were higher than that in damage control group; the scores of combined group were higher than that in BWSTT and MP groups. Five weeks after injury, BBB scores in BWSTT group were higher than that in MP group ($P < 0.05$). ③ Compared with SCI group, the expression levels of BDNF and TrkB in combined group increased significantly ($P < 0.05$), and were significantly higher than BWSTT or MP alone ($P < 0.05$).

Conclusion: BWSTT combined with MP could more effectively promote the recovery of motor function and the expression levels of BDNF and TrkB in SCI rats than BWSTT and MP alone.

Author's address Department of Neurological Rehabilitation Second Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou, 450014

Key word body weight support treadmill training; methylprednisolone; spinal cord injury; motor function; brain-derived neurotrophic factor

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)是一种严重的中枢神经系统损伤^[1],致残率高,所造成的功能障碍,尤其是运动功能障碍,严重影响患者的生存质量,给家庭和社会带来巨大经济负担,因此探究有效的治疗方案及作用机制意义重大。近年来大量研究表明,减重步行训练(body weight support treadmill training, BWSTT)可促进脊髓损伤患者的运动功能^[2-3],它可诱导SCI大鼠脊髓内脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)及其酪氨酸激酶受体B(tyrosine kinase receptor B, TrkB)的表达^[4-5]。也有研究表明,甲基强的松龙(methylprednisolone, MP)可诱导BDNF的表达上调^[6],明显促进脊髓损伤后神经功能的恢复^[7]。那么减重平板联合MP应用对脊髓损伤大鼠功能的影响如何?本实验通过制作脊髓损伤大鼠模型并进行相关研究,观察BWSTT与MP治疗SCI的疗效及其可能作用机制,探究一种更有效的脊髓损伤康复治疗方法,为临床应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

BDNF和TrkB一抗为兔抗鼠一抗,来自北京博奥森生物技术有限公司,二抗试剂盒来自北京中山生物技术有限公司,DAB显色试剂盒来自北京中山生物技术有限公司,光学显微镜、显微照相系统等。

1.2 实验动物与分组

健康清洁级成年雄性SD大鼠48只,体重360—400g,购于河南省郑州大学实验动物中心,其中大鼠的体重、窝别、月龄的差异无显著性意义($P > 0.05$),按随机分配法分为4组:损伤对照(SCI)组、减重平板(BWSTT)组、甲基强的松龙(MP)组、联合治疗(BWSTT+MP)组,每组12只大鼠。

1.3 SCI模型的制备

10%水合氯醛腹腔麻醉(300mg/kg)大鼠后,固定于手术台上,无菌条件下行背中段正中切口,分离椎旁肌,咬除T8—T10棘突椎板,暴露脊髓硬膜。采用改良Allen重锤打击法^[8],通用型脊髓打击器5g的重锤自10cm的高处自由垂直落下,造成大鼠T10 SCI模型。打击后鼠尾出现痉挛性摆动、双下肢回缩,硬膜表面充血水肿。再用生理盐水冲洗术野,消毒后常规缝合。各组大鼠分笼饲养,喂全价饲料,自由饮水,室温(25 ± 5)℃,术后连续3d肌注青霉素20万单位预防感染,给予人工挤压膀胱帮助排尿,每日2次,至能自主排尿为止。

1.4 运动训练和给药方法

缝合后,损伤对照组不做处理,BWSTT组损伤1周后开始BWSTT,每次30min,每天1次,每周5天,共训练4周。MP组缝合后1h内给予MP 30mg/kg,尾静脉15min缓慢注射,随后按5.4mg/kg计算23h总量,分3次(8h/次)腹腔注射,联合组缝合后也给予MP(方法同MP组),1周后进行BWSTT(方式同BWSTT组)。BWSTT采用专用跑步机及减重装

置,将大鼠胸部悬吊及双上肢固定于步行双杠上,以减轻部分体重且能使双下肢在跑台上进行步行训练,跑台速度定为0.8—1km/h。减重质量为鼠体质量的20%—40%。其中上述实验组分别死去的大鼠,用备用模型大鼠补上,完成实验。

1.5 运动功能评定

分别于损伤前、损伤后1周、2周、3周、4周、5周对各组进行运动功能评定,评定量表采用Basso、Beattie、Bresnahan(BBB)运动功能评分表^[9]。评定时间均定在上午10:00,由未参与实验但熟悉评定量表的实验人员3人采用双盲法评定,取3人评分均值。

1.6 组织学和免疫组化检测

在损伤后5周,即训练结束后,用水合氯醛(6ml/kg)腹腔内注射麻醉大鼠,打开大鼠胸腔,剪开右心耳,以7号半输液器针头插入大鼠左心室直至主动脉内,生理盐水100ml快速灌注大鼠心脏。再灌注4%多聚甲醛磷酸缓冲液200ml,约1h,取损伤区下2cm脊髓,用磷酸缓冲液(TBS)清洗后,置于4%多聚甲醛中保存。常规石蜡包埋,连续切片,采用BDNF和TrkB试剂盒行免疫组化染色用于检测。利用IPP 5.0图文分析系统对免疫组化结果进行计算机图像分析处理,每个组取5张切片(400×),由2名非本课题组并且熟悉阳性细胞形态的实验人员进行阳性细胞计数及平均光密度值(OD值)测定。

1.7 统计学分析

所得样本数据均以均数±标准差表示。应用

SPSS 17.0统计软件进行分析,组间采用单因素方差分析,多组定量资料样本均数的两两比较采用LSD-*t*检验法。

2 结果

2.1 运动功能评定结果

各组损伤前BBB评分均为21.00分,未列于表1中,且每组大鼠损伤后5周的运动功能评分均显著高于损伤后1周的评分,差异具有显著性($P < 0.01$);组间比较,从训练3周后开始,联合组、BWSTT组和MP组均显著高于损伤对照组,且联合组高于平板和MP组,差异具有显著性($P < 0.05$);前4周左右,平板组评分高于MP组,但差异不明显,到5周时,平板组评分高于MP组,差异具有显著性意义($P < 0.05$)。见表1。

2.2 免疫组化检测结果

2.2.1 BDNF免疫组化检测结果:BDNF免疫反应阳性产物呈棕黄色颗粒,主要分布于大鼠脊髓灰质腹角和背角神经元,主要定位于神经元胞浆中,着色深,神经元突起着色较浅,胞浆与胞核的界线清楚。由结果可知,与SCI组比较,BWSTT组及MP组的BDNF阳性神经数及其OD值增加明显,差异有显著性($P < 0.01$);BWSTT组与MP组比较,BWSTT组高于MP组($P < 0.05$);且BWSTT+MP组BDNF阳性神经数及其OD值均较BWSTT组、MP组、SCI组增加显著($P < 0.05$)。见表2,图1。

图1 大鼠L1—L2脊髓前角组织内含BDNF和TrkB的阳性细胞分布(损伤后5周) (×400)

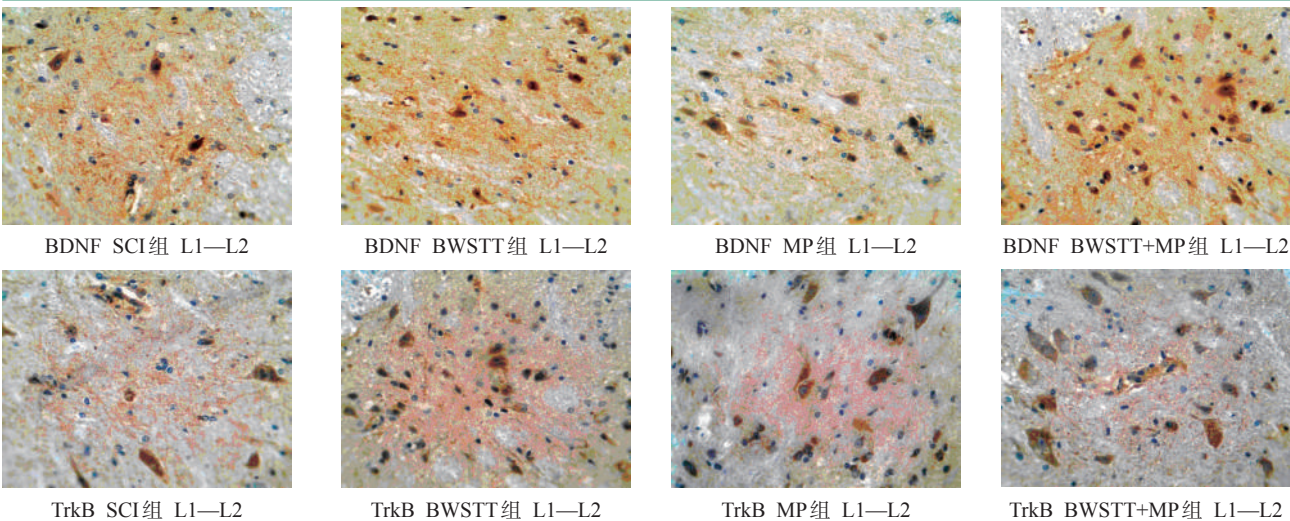


表1 各组不同时间点 BBB 评分

($\bar{x} \pm s, n=12$)

时间	SCI组	BWSTT组	MP组	BWSTT+MP组
1周	4.500±1.243	4.916±1.564	5.083±1.311	5.000±1.595
2周	5.166±1.337	6.083±1.564	5.666±1.302	6.416±1.676 ^①
3周	7.416±1.311	9.250±1.602 ^②	8.583±1.240 ^①	10.416±1.443 ^{②③④}
4周	10.083±1.621	12.750±2.667 ^②	11.666±1.302 ^①	14.750±1.484 ^{②③④}
5周	12.666±1.669 ^⑤	15.750±2.094 ^{②⑥}	14.083±1.164 ^{①③⑥}	17.666±1.614 ^{②④⑤⑥}

与对照组比较:① $P < 0.05$;② $P < 0.01$;与平板组比较:③ $P < 0.05$;④ $P < 0.01$;与MP组比较:⑤ $P < 0.01$;与本组1周时比较:⑥ $P < 0.01$

表2 每组大鼠脊髓内 BDNF 和 TrkB 的阳性细胞数及其 OD 值比较

($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	BDNF		TrkB	
	阳性细胞数	OD 值	阳性细胞数	OD 值
SCI组	11.16±1.46	0.399±0.033	11.58±1.72	0.466±0.023
BWSTT组	13.66±1.49 ^①	0.486±0.026 ^①	14.16±1.52 ^①	0.515±0.049 ^①
MP组	12.41±1.50 ^{②③}	0.452±0.047 ^{①③}	13.08±1.44 ^②	0.499±0.038 ^②
BWSTT+MP组	14.83±1.11 ^{①②③}	0.595±0.042 ^{①③⑤}	15.91±2.06 ^{①③⑤}	0.687±0.044 ^{①③⑤}
F值	15.198	55.799	13.693	73.378
P值	0.000	0.000	0.000	0.000

与对照组比较:① $P < 0.01$;② $P < 0.05$;与平板组比较:③ $P < 0.05$;④ $P < 0.01$;与MP组比较:⑤ $P < 0.01$

2.2.2 TrkB免疫组化检测结果:与SCI组比较,BWSTT组及MP组的TrkB阳性神经数及其OD值增加较多,差异有显著性意义($P < 0.01$);BWSTT组与MP组比较,差异无显著性;BWSTT+MP组TrkB阳性神经数及其OD值较BWSTT组、MP组、SCI组增加明显,差异有显著性意义($P < 0.05$)。

3 讨论

既往研究表明,BWSTT可促进神经营养因子BDNF表达、释放,增强脊髓的可塑性,促进神经元回路的重组^[10],从而促进损伤脊髓的功能恢复;MP是目前临床上常用于治疗脊髓损伤的类固醇激素,文献报道它可促进脊髓损伤后神经功能的恢复^[11],但两者联合应用的效果至今未见报道。本实验在前人的基础上,探索两者联合对脊髓损伤大鼠功能恢复的作用。研究发现,未接受任何干预措施的SCI大鼠的运动功能存在自发恢复的征象,这种自发恢复可能与损伤部位以下腰骶段脊髓内保留的步行低级控制中枢模式发生器(central pattern generator, CPG)有关^[12],与SCI组比较,BWSTT组、MP组单纯治疗时BBB评分均增加,但训练前期平板组和MP组差异不明显,后期平板组较MP组增加,说明对于脊髓损伤后期运动功能的恢复,BWSTT较MP效果好。另外,我们还发现,两者联合应用BBB评分值较

任何一组都高,损伤大鼠神经功能恢复最快最好,研究表明BWSTT和MP联合应用对SCI大鼠运动功能的疗效更明显。

BDNF作为神经生长因子家族重要成员之一,其功能与神经元存活、增殖、分化、诱导神经突起生长和对损伤后的神经再生发挥促进作用有关^[13-14],有文献报道^[15-16]BDNF可以通过与其受体TrkB结合,激活丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)、磷脂酰肌醇-3激酶(phosphatidylinositol-3 kinase, PI3K)等信号通路活化环磷酰苷效应元件结合蛋白(cAMP-response element binding protein, CREB),进而启动信号通路传导,发挥其促进神经功能的作用。本研究免疫组化结果显示,与SCI比较,联合组、平板组和MP组BDNF、TrkB阳性细胞数均增多,且联合组显著高于BWSTT组和MP组,其阳性细胞数增多最明显;表明BWSTT联合MP应用较BWSTT和MP单纯治疗更能诱导BDNF及其受体TrkB的表达上调,使BDNF与其受体Trkb的结合增多,激活的信号传导通路增多,从而促进了损伤脊髓神经元的修复,进而促进SCI大鼠运动功能的更好更快恢复。结合SCI大鼠行为学的变化,本研究发现脊髓损伤后伴随着大鼠行为学的改善,BDNF、TrkB的整体表达水平是上调的,尤其BWSTT联合MP组大鼠行为学的改善

和BDNF表达上调最为显著,提示脊髓损伤后神经功能的恢复与BDNF、TrkB表达增高有密切联系;同时也发现,对于BDNF、TrkB两个因子的表达变化,单纯应用BWSTT和MP的疗效是不完全一致的,其具体作用机制尚不十分清楚。但两者联合应用对SCI大鼠运动功能恢复及其BDNF、TrkB表达增多的效果是明显的,表明两者可能具有协同作用,推测其原因可能早期应用MP冲击治疗,减轻了脊髓的继发性损伤,抑制了神经细胞凋亡,保护了神经营养因子效应细胞,促进了神经营养因子分泌,后期联合BWSTT更加促进神经营养因子的表达,有利于损伤神经元的修复和残存神经元的存活、维持,从而更有效地促进神经功能的恢复。

本研究结果表明,BWSTT联合MP治疗SCI的疗效优于单纯BWSTT和MP治疗,其作用机制可能与其促进了BDNF、TrkB因子的表达有关,为临床上SCI的治疗提供了新的方案。但两者联合应用的协同作用的具体作用机制尚需进一步研究。

参考文献

- [1] Chen B, Zuberi M, Borgens RB, et al. Affinity for, and localization of, PEG-functionalized silica nanoparticles to sites of damage in an ex vivo spinal cord injury model[J]. J Biol Eng, 2012, 6(1):18—27.
- [2] 徐江,王熠钊,黄晓琳,等.硬膜外脊髓电刺激结合减重跑台训练对脊髓损伤大鼠运动功能的影响[J].中华物理医学与康复杂志, 2008,30(7):437—440.
- [3] Musselman KE, Fouad K, Misiaszek JE, et al. Training of walking skills overground and on the treadmill: case series on individuals with incomplete spinal cord injury[J]. Phys Ther, 2009, 89(6):601—611.
- [4] 贺晓玉.运动训练对脊髓损伤大鼠脊髓内BDNF及其受体TrkB表达的影响[J].天津医药,2014,42(6):547—550.
- [5] 林海燕,屠文展,陶涛涛,等.水中平板步行训练对脊髓损伤大鼠运动功能及脑源性神经营养因子、神经营养素-3表达的影响[J].中华物理医学与康复杂志,2010,32(12):887—891.
- [6] 李翠英,许争光,王廷华.金腰带联合甲基强的松龙对脊髓损伤大鼠行为学及脑源性神经营养因子表达的影响[J].南方医科大学学报,2015,32(2):276—280.
- [7] 赵永青,苏衍萍,韩凤岳.甲基强的松龙对急性脊髓损伤神经元保护作用的实验研究[J].中华神经外科杂志,2005,21(6):367—370.
- [8] Hall ED, Braugher JM, McCall JM. Antioxidant effects in brain and spinal cord injury[J]. J Neurotrauma, 1992, 9(Suppl 1):S165—172.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] 杨竣,许争光,荣荣,等.甲基强的松龙对大鼠损伤脊髓BDNF、NMDA受体表达及神经行为学的影响[J].四川大学学报:医学版,2012,43(2):245—249.
- [12] Dietz V. Spinal cord pattern generators for locomotion[J]. Clin Neurophysiol, 2003, 114(8):1379—1389.
- [13] Weishaupt N, Blesch A, Fouad K. BDNF: the career of a multifaceted neurotrophin in spinal cord injury[J]. Exp Neurol, 2012, 238(2):254—264.
- [14] Gao M, Lu P, Bednark B, et al. Templated agarose scaffolds for the support of motor axon regeneration into sites of complete spinal cord transection[J]. Biomaterials, 2013, 34(5):1529—1536.
- [15] Lu P, Blesch A, Graham L, et al. Motor axonal regeneration after partial and complete spinal cord transection[J]. J Neurosci, 2012, 32(24):8208—8218.
- [16] Zhou X, Xiao H, Wang H. Developmental changes of TrkB signaling in response to exogenous brain-derived neurotrophic factor in primary cortical neurons[J]. J Neurochem, 2011, 119(6):1205—1216.