

# 阻断脑源性神经营养因子-酪氨酸激酶受体B通路后运动训练对脊髓损伤大鼠功能恢复的影响研究\*

李向哲<sup>1,2</sup> 王红星<sup>3</sup> 谢财忠<sup>4</sup> 吴勤峰<sup>2</sup> 宋新建<sup>5</sup> 曹雅娜<sup>6</sup> 方露<sup>1</sup> 丁洁<sup>1</sup> 王彤<sup>3,7</sup>

## 摘要

**目的:**探讨阻断脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)-酪氨酸激酶受体B(tropomyosin-related kinase B, TrkB)信号通路后运动训练对脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)大鼠运动功能恢复和突触可塑性的影响。

**方法:**32只雌性SD大鼠被随机分为4组:损伤+PBS组(Sed-PBS组)、运动+PBS组(TT-PBS组)、损伤+TrkB/Fc组(Sed-TrkB/Fc组)及运动+TrkB/Fc组(TT-TrkB/Fc组)。于SCI术前1周进行L3-4鞘内置管。置管1周后使用改良Allen法制作T10不完全性SCI模型。于SCI术后第7天植入渗透压泵,并在Sed-PBS组和TT-PBS组的渗透压泵中灌入0.01M PBS, Sed-TrkB/Fc组和TT-TrkB/Fc组的渗透压泵中灌入TrkB阻滞剂(TrkB/Fc)。SCI后第8天,对TT-PBS组和TT-TrkB/Fc组进行减重平板训练。术后第1天、3天、7天、14天、21天、28天和35天进行BBB评分。实验结束后取材,使用Western Blot和免疫组化染色技术分析检测突触后膜密度蛋白-95(postsynaptic density protein-95, PSD-95)及突触素(synaptophysin, SYP)表达情况。

**结果:**术后14天,TT-PBS组BBB评分明显高于其他3组( $P < 0.05$ );术后21—35天,TT-PBS组BBB评分显著高于其他3组( $P < 0.001$ );术后28—35天,TT-TrkB/Fc组BBB评分高于Sed-PBS组及Sed-TrkB/Fc组( $P < 0.05$ )。蛋白免疫印迹结果显示,TT-PBS组PSD-95及SYP相对蛋白表达量显著高于其他3组( $P < 0.001$ );TT-TrkB/Fc组PSD-95及SYP相对蛋白表达量多于Sed-PBS组和Sed-TrkB/Fc组( $P < 0.05$ )。免疫组化结果显示,与Sed-PBS组、Sed-TrkB/Fc组和TT-TrkB/Fc组相比,TT-PBS组的PSD-95相对蛋白密度明显增高( $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ ,  $P < 0.01$ ),且SYP相对蛋白密度也明显增高( $P < 0.001$ );TT-TrkB/Fc组的PSD-95及SYP相对蛋白密度也高于Sed-TrkB/Fc组及Sed-PBS组( $P < 0.05$ )。

**结论:**阻断BDNF-TrkB信号通路可明显抑制运动训练对不完全性SCI大鼠运动功能恢复和脊髓突触标记蛋白表达的促进作用。

**关键词** 脊髓损伤;运动训练;脑源性神经营养因子;运动功能;突触可塑性

**中图分类号:**R651.2;R493 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2017)-12-1331-07

**Effects of exercise training on functional recovery after blocking BDNF-TrkB pathway in rat with spinal cord injury/LI Xiangzhe, WANG Hongxing, XIE Caizhong, et al.//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2017, 32(12): 1331—1337**

## Abstract

**Objective:** To investigate the effect of exercise training on locomotor function recovery and synaptic regeneration after blocking of brain-derived neurotrophic factor(BDNF) - Tyrosine kinase receptor B (TrkB) signaling

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2017.12.003

\*基金项目:国家自然科学基金面上项目(81171851)

1 南京医科大学第一临床医学院,南京,210029; 2 苏州科技城医院康复医学中心; 3 南京医科大学第一附属医院康复中心; 4 南京军区南京总医院康复科; 5 南通市第二人民医院康复科; 6 江苏省中医院康复科; 7 通讯作者

作者简介:李向哲,男,硕士,住院医师; 收稿日期:2017-04-30

pathway in rat with incomplete spinal cord injury (SCI).

**Method:** Totally 32 female SD rats were randomly divided into 4 groups: injury+PBS group (Sed-PBS group), exercise+PBS group (TT-PBS group), injury+TrkB/Fc group (Sed-TrkB/Fc group) and exercise+TrkB/Fc group (TT-TrkB/Fc group). Intrathecal catheterization was operated in 1 week before SCI operation. After 1 weeks of intrathecal catheterization, T10 incomplete SCI model was made by modified Allen's method. After 7 days of SCI, the Alzet osmotic pump was implanted into all SCI rats. The Alzet osmotic pump of Sed-PBS group and TT-PBS group were filled with 0.01M PBS, while Sed-TrkB/Fc group and TT-TrkB/Fc group with TrkB blocker (TrkB/Fc). After 8 days of SCI, the TT-PBS group and TT-TrkB/Fc group were underwent body-weight support treadmill training. The BBB score was performed at 1, 3, 7, 14, 21, 28 and 35 day after SCI. The lumbar spinal cord of all rats were removed at the end of this experiment. The Western Blot and immunohistochemical staining technique were used to detect the expression of postsynaptic density protein-95 (PSD-95) and synaptophysin (SYP).

**Result:** Fourteen days after SCI, the BBB scores of TT-PBS group were higher than the other 3 groups ( $P < 0.05$ ), and 21-35 days after SCI, the BBB scores of TT-PBS group were significantly higher than the other 3 groups ( $P < 0.001$ ). However, 28-35 days after SCI, the BBB scores of TT-TrkB/Fc group was higher than Sed-PBS group and Sed-TrkB/Fc group ( $P < 0.05$ ). The Western blot results showed that the relative expression of PSD-95 and SYP protein in TT-PBS group were significantly higher than the other 3 groups ( $P < 0.001$ ), the protein of PSD-95 and SYP in TT-TrkB/Fc group was higher than Sed-PBS group and Sed-TrkB/Fc group ( $P < 0.05$ ). The immunohistochemistry results showed that, compared with Sed-PBS group, Sed-TrkB/Fc group and TT-TrkB/Fc group, the PSD-95 and SYP relative density in TT-PBS group were significantly higher (PSD-95,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ ,  $P < 0.01$ , SYP,  $P < 0.001$ ), the relative protein density of PSD-95 and SYP in TT-TrkB/Fc group were higher than Sed-TrkB/Fc group and Sed-PBS group ( $P < 0.05$ ).

**Conclusion:** Blocking the BDNF-TrkB signaling pathway can significantly inhibit the effect of exercise training on the recovery of locomotor function and the protein expression of lumbar spinal cord synapse in incomplete SCI rats.

**Author's address** The First Clinical Medical College of Nanjing Medical University, Nanjing, 210029

**Key word** spinal cord injury; exercise training; brain-derived neurotrophic factor; locomotor function; synaptic plasticity

近年来的研究发现,运动训练(如减重平板训练等)可促进脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)患者及动物的运动功能恢复<sup>[1-4]</sup>,增加受损脊髓内的脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)的表达,减少损伤部位胶质瘢痕的形成、增加残存脊髓体积、促进神经纤维及突触再生、增加损伤远端神经纤维的再生等,促进功能的恢复<sup>[5-7]</sup>。其中,BDNF作为神经营养因子(neurotrophins, NTs)家族的成员之一,主要通过激活特异性受体酪氨酸激酶受体B(tropomyosin-related kinase B, TrkB)发挥神经修复作用<sup>[5]</sup>。但是,BDNF是否是SCI运动训练后功能恢复以及远端脊髓可塑性的关键因子,目前仍不清楚。

基于本课题组前期研究<sup>[8]</sup>及国内外研究<sup>[9-10]</sup>,运

动训练可以促进不完全性SCI大鼠远端脊髓的BDNF、TrkB表达,促进后肢运动功能恢复。本研究拟通过阻断BDNF-TrkB信号通路,从正反两方面观察运动训练后BDNF对运动功能恢复和突触后膜密度蛋白-95(postsynaptic density protein-95, PSD-95)及突触素(synaptophysin, SYP)表达的影响,以进一步揭示运动训练促进SCI后运动功能改善的机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物、试剂及仪器

动物:SPF级8—10周龄雌性SD大鼠32只[上海西普尔-必凯实验动物有限公司,许可证号:SCXK(沪)2013-0016]。

材料及试剂:PE-10导管(聚乙烯塑料导管,内

径[ID]: 0.28mm, 外径[OD]: 0.64mm, 英国, Smiths medical international Ltd.); PE-50 导管 (ID: 0.58mm, OD: 0.99mm, 英国, Smiths medical international Ltd.); 渗透压微泵 (Osmotic minipumps, model 2002; Alzet, USA); 2%盐酸利多卡因注射液 (上海禾丰制药有限公司); 0.01M 磷酸盐缓冲液 (0.01M PBS); 重组人 TrkB/Fc 嵌合体 (Recombinant human TrkB/Fc chimera, TrkB-IgG, R&D Systems, USA); 抗突触后密度蛋白-95 抗体 (Antipostsynaptic density protein-95 antibody, Rabbit, abcam, ab18258); 抗突触素抗体 (Anti-Synaptophysin antibody, Rabbit, abcam, ab64581); 山羊抗兔 IgG (goat anti-rabbit IgG, 中杉金桥); 3-3-diaminobenzidine-4 HCl/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (DAB, Vector Laboratories); 青霉素钠 (80万单位, 黑龙江哈药集团)。

仪器: NYU 脊椎冲击损伤仪 model I 型 (美国新泽西州立大学神经科学联合中心实验室提供); 减重平板训练设备 (自制, 国家实用新型专利, 专利号 ZL2009 2 0235390.5); 石蜡切片机 (LeicaRM2135, Nussloch, Germany); 25 $\mu$ l 微量进样器 (上海高鸽)。

## 1.2 鞘内置管术及导管通畅性验证

采用经 L3-4 鞘内置管法及导管通畅性验证, 根据先前研究结果指导<sup>[11]</sup>。简述如下: 采用 10% 水合氯醛麻醉动物 (剂量: 0.3ml/100g), 定位并暴露 L3/4 棘突间隙, 使用 19G 穿刺针穿刺硬脊膜及蛛网膜, 将长为 6cm 的 PE-10 导管向头侧插入蛛网膜下腔, 插入深度为 2cm, 导管内口约位于 L1 椎体, 缝合固定完毕后, 使用 25 $\mu$ l 微量进样器注入 20 $\mu$ l 无菌生理盐水冲洗导管, 之后封闭导管外口。术后大鼠恒温环境下单笼饲养, 给予小腿三头肌肌注青霉素钠 20 万 U/d, 连续 3 天, 预防感染。

鞘内置管后 7d, 在大鼠清醒状态下剪开 PE-10 导管外口, 使用 25 $\mu$ l 微量进样器注入 20 $\mu$ l 2% 盐酸利多卡因注射液, 注入后即刻封闭导管外口。若注射后大鼠双后肢出现瘫痪, 半小时内恢复正常, 表明导管在位通畅。

## 1.3 动物分组及脊髓损伤术

动物分组: 为研究 BDNF-TrkB 在运动训练促进 SCI 功能恢复中的作用, 于鞘内置管后 8d (SCI 术前), 采用随机数字法将动物分为: 损伤+PBS 组

(Sed-PBS 组)、运动+PBS 组 (TT-PBS 组)、损伤+TrkB/Fc 组 (Sed-TrkB/Fc 组) 及运动+TrkB/Fc 组 (TT-TrkB/Fc 组), 每组各 8 只。

脊髓损伤术: T10 SCI 打击模型制作依据先前的试验操作进行<sup>[8]</sup>。简述如下, 于分组后麻醉动物 (剂量同前), 行 T10 椎板切除术, 暴露脊髓, 采用 Allen 法制作 T10 不完全性 SCI 模型<sup>[12]</sup>, 损伤剂量为 10g $\times$ 25mm。术后原环境下单笼饲养, 自由饮食, 自然光照, 膀胱按摩排空残余尿, 2 次/d, 直至形成反射性排尿; 并给予小腿三头肌肌注青霉素钠 20 万 U/d, 连续 3 天, 预防感染。

## 1.4 鞘内泵入 TrkB/Fc 或 PBS

使用 TrkB/Fc 阻断 BDNF-TrkB 信号通路。将 TrkB/Fc 溶于无菌 0.01M PBS (浓度: 0.25  $\mu$ g/ $\mu$ L), 于 SCI 后第 7 天, 将先前准备好的 Alzet 渗透压泵 (容积约 200 $\mu$ l, 泵入速度: 0.5 $\mu$ l/h) 灌注满 PBS 或 TrkB/Fc (阻断剂量: 3 $\mu$ g/d)<sup>[9,13-15]</sup>, 并使用 PE-50 导管与先前植入的 PE-10 导管相连, 在大鼠背部皮下钝性分离一空腔, 将渗透压泵缝合固定于皮下。无菌生理盐水局部冲洗, 术后仍单笼饲养。由于 TrkB/Fc 的在体有效期约为 15 天<sup>[14-16]</sup>, 因此在植入渗透压泵 2 周后更换上述胶囊泵, 共阻断 4 周。

## 1.5 减重平板训练

SCI 后第 8 天, 对运动组大鼠进行减重平板训练。运动训练策略: 每次训练前排空大鼠膀胱, 每周训练 5 天, 每天 2 次, 每次 20min; SCI 后第 8 天先进行适应性训练, 每次跑步 5min, 休息 5min, 共运动 20min; 第 9 天, 每次跑步 10min, 休息 5min, 共运动 20min; 10 天后, 正常训练 20min/次。跑台速度 6m/min, 训练为期 4 周。训练时大鼠体重减重范围为 40%—60%, 根据大鼠后肢的运动恢复情况, 逐渐减小体重支持。

## 1.6 运动功能评估

大鼠后肢运动功能依据 Basso-Beattie-Bresnahan (BBB) 评分使用 open-field testing 进行评估<sup>[12,17]</sup>。评估时间点为术后第 1 天、3 天、7 天、14 天、21 天、28 天和 35 天, 评估时将大鼠放置于一个 80cm $\times$ 130cm $\times$ 30cm 的盒子里, 评估 5min, 所有评定均为 2 人盲评且所有评定人员均接受过相关培训。

## 1.7 Western Blot

实验结束后,在深度麻醉状态下离断大鼠腰骶膨大处(L2-L5 节段),在液氮中研磨破碎后,加入适量 RIPA 裂解液,4℃冷库摇床上消化 30min,4℃离心 12000r/min×15min。吸取上清液,BCA 法测定蛋白浓度,按照测定浓度加入 4×上样缓冲液使得样品浓度相同。沸水中变性 10min,分装后-80℃保存备用。12% SDS-PAGE 胶,上样 80μg 蛋白,每块胶 20mA 恒流电泳至目的条带区分开。电泳结束后 100V 恒压转膜 80min,封闭并加入一抗,(PSD-95: 1: 1000; SYP: 1: 1000; GAPDH: 1: 1000),4℃孵育过夜。次日二抗(山羊抗兔二抗,1: 2000)室温孵育 1h, TBST 洗膜 10min×3 次,用 ECL 法显影,Image J 软件进行灰度分析,以目标蛋白和内参蛋白灰度比值作为目标蛋白的相对表达量。

1.8 脊髓切片准备

SCI 5 周后,大鼠深度麻醉下(麻醉方法同前),打开胸腔暴露心脏,使用灌注泵先用 0.9%生理盐水 250ml 进行心脏灌注,之后换用 4%多聚甲醛溶液 250ml 灌注,先快后慢。取出脊髓后,依据神经根分离目标脊髓节段(L2-L5),4%多聚甲醛 4℃后固定过夜,酒精梯度脱水,最后石蜡包埋。使用石蜡切片机对脊髓节段进行水平横切,切片厚度为 5μm。

1.9 免疫组化

免疫组化根据先前研究指导进行<sup>[18]</sup>。简述如下:将连续石蜡切片每隔 5 张收 1 张,每个样本收取 3 张,去石蜡化并水化后,在以下抗体中孵育:(PSD-95:1: 800; SYP:1: 1000) 4℃过夜。PBS 冲洗后,组织切片再使用生物素标记的山羊抗兔二抗(1: 200) 37℃恒温箱中孵育 1h,之后洗片,使用 DAB 显色。摄片后使用 Image-Pro Plus 6.0 对脊髓 IX 层内 PSD-95 免疫阳性标记的运动神经元及 SYP 免疫阳性标记的突触进行光密度分析。

1.10 统计学分析

使用 SPSS20.0(IBM)软件进行统计学分析。所

有数据均采用均值±标准差表示,保留小数点后 2 位有效数字。BBB 评分数据建立一般线性模型,并对数据进行重复测量分析,其余数据使用单因素方差分析,若单因素方差分析有显著性差异,再使用 POST hoc 进行两两分析。设定  $P < 0.05$  为具有显著性意义。

2 结果

2.1 后肢运动功能评分

4 组大鼠于造模后均出现双后肢瘫痪。重复度量方差分析显示,4 组 BBB 评分在时间主效应上存在差异( $F=1090.501, P < 0.001$ ),组别主效应对 BBB 得分存在影响( $F=21.444, P < 0.001$ )。造模后 1d、3d 及 7d 后 4 组大鼠 BBB 评分之间差异无显著性意义( $P > 0.05$ )。术后 14d,SCI-TT-PBS 组 BBB 评分明显高于其他 3 组( $P < 0.05$ );术后 21—35d,SCI-TT-PBS 组与其他 3 组相比,差异具有显著性意义( $P < 0.001$ )。术后 28—35d,SCI-TT-TrkB/Fc 组与 SCI-Sed-PBS 组及 Sed-TrkB/Fc 组相比,差异具有显著性意义( $P < 0.05$ )。1—21d,SCI-Sed-PBS 组、SCI-Sed-TrkB/Fc 组及 SCI-TT-TrkB/Fc 组之间差异无显著性意义( $P > 0.05$ )。说明运动训练可明显改善大鼠后肢的运动功能,而阻断 BDNF-TrkB 后,运动训练促进运动功能改善的作用被减弱。见表 1。

2.2 PSD-95 及 SYP Western Blot 结果

于第 35 天脊髓取材,进行蛋白免疫印迹分析(如图 1A)。与 Sed-PBS 组、Sed-TrkB/Fc 组及 TT-TrkB/Fc 组相比,TT-PBS 组的 PSD-95 及 SYP 相对蛋白表达量均显著增多,差异具有显著性意义( $P < 0.001$ )。TT-TrkB/Fc 组的 PSD-95 及 SYP 相对蛋白表达量也明显多于 Sed-PBS 组和 Sed-TrkB/Fc 组( $P < 0.05$ ,如图 1B-C)。说明运动训练可显著增加 PSD-95 及 SYP 的表达量,而阻断 BDNF-TrkB 通路后,运动训练的促 PSD-95 及 SYP 表达作用受到明显抑制。

2.3 PSD-95 及 SYP 免疫组化结果

表 1 各组大鼠后肢不同时间点 BBB 评分结果

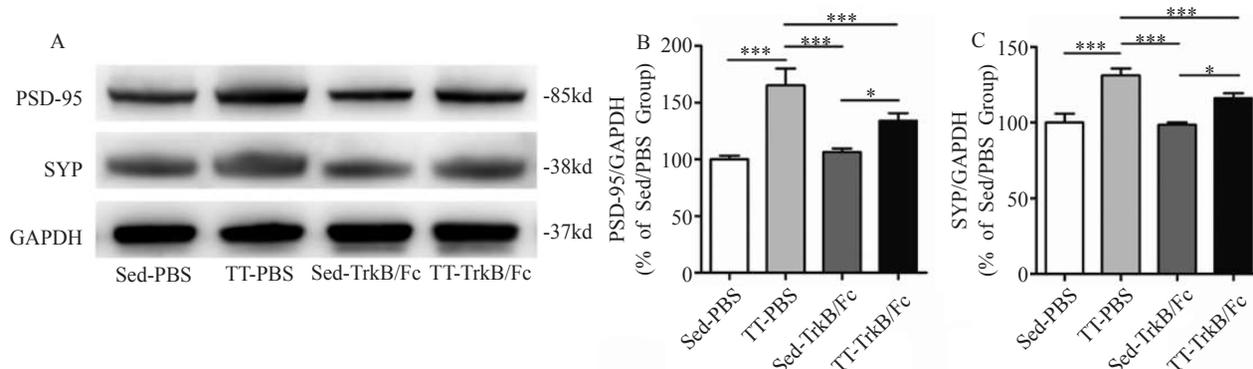
( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组别	第 1 天	第 3 天	第 7 天	第 14 天	第 21 天	第 28 天	第 35 天
Sed-PBS 组	0.13±0.35	0.88±0.35	4.00±0.76	5.88±0.83	6.38±0.52	6.88±0.83	7.63±0.74
TT-PBS 组	0.13±0.35	0.75±0.46	4.13±0.35	6.75±0.89 <sup>①</sup>	8.13±0.64 <sup>②</sup>	9.63±1.19 <sup>②</sup>	10.5±1.20 <sup>②</sup>
Sed-TrkB/Fc 组	0.13±0.35	0.75±0.46	4.00±0.53	6.00±0.53	6.38±0.52	6.63±0.52	7.63±0.52
TT-TrkB/Fc 组	0.13±0.35	1.00±0.00	4.00±0.53	6.00±0.53	6.75±0.46	7.75±0.71 <sup>③</sup>	8.63±0.74 <sup>③</sup>

注:与其他 3 组相比:① $P < 0.05$ ,② $P < 0.001$ ;与 Sed-PBS 组及 Sed-TrkB/Fc 组相比:③ $P < 0.05$

PSD-95 及 SYP 免疫组化结果显示,在脊髓内 PSD-95 蛋白主要表达于神经元的胞膜、胞质及神经突起上,SYP 主要表达于突触及细胞连接处,两者免疫组化染色均呈棕黄色或棕褐色(如图 2A)。与

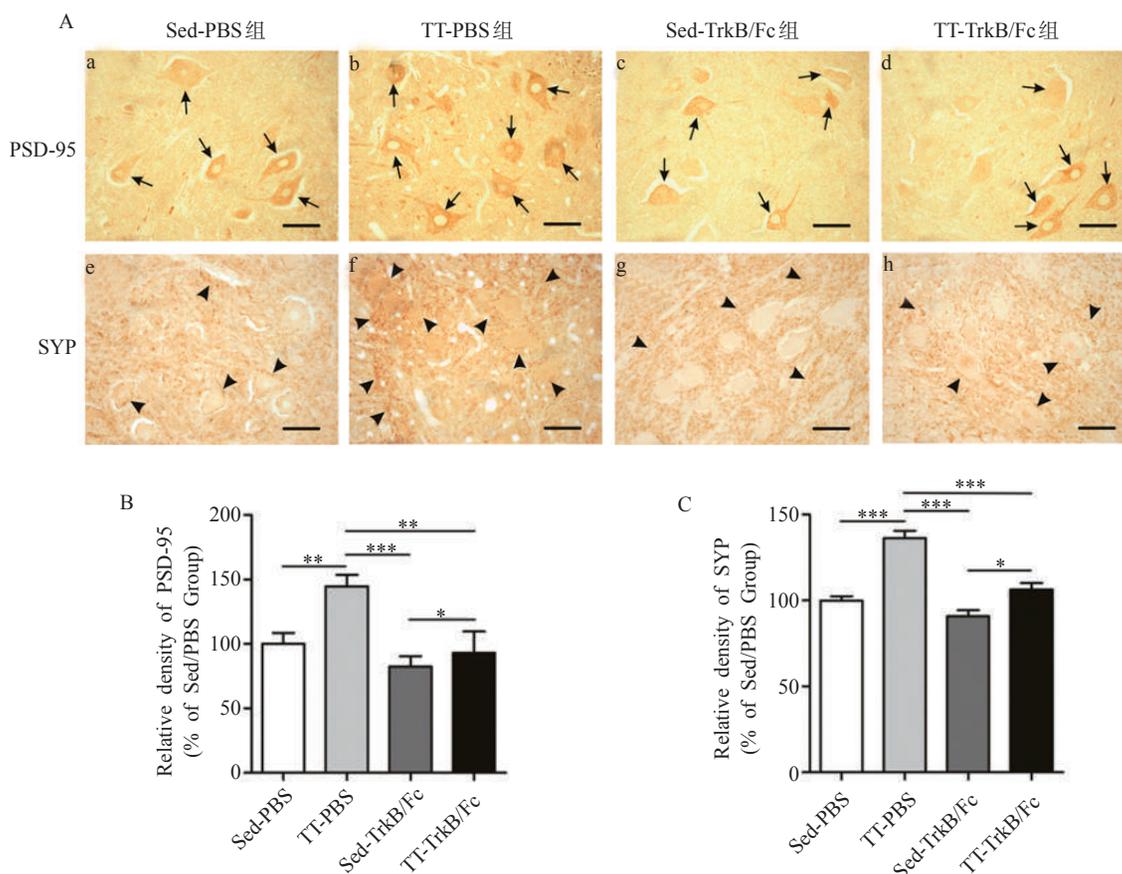
图1 PSD-95 及 SYP 蛋白免疫印记



图A:PSD-95 及 SYP 蛋白免疫印记条带 图B:各组 PSD-95 蛋白相对表达量柱状图 图C:各组 SYP 蛋白相对表达量柱状图。\* $P < 0.05$ ;\*\*\* $P < 0.001$

图2 大鼠脊髓前角 PSD-95 及 SYP 免疫组化

( $\times 400$ , bar 值=50 $\mu\text{m}$ )



图A:各组 PSD-95 及 SYP 免疫组化:图 a-d:PSD-95 免疫组化:PSD-95 免疫阳性标记细胞呈棕黄色或棕褐色,在脊髓前角主要表达于运动神经元胞膜、胞质及神经突起(如“ $\rightarrow$ ”所示);图 e-h:SYP 免疫组化:SYP 免疫阳性标记呈棕黄色或棕褐色颗粒,在脊髓前角主要表达于灰质突触及细胞连接处(如“ $\rightarrow$ ”所示);图B:各组 PSD-95 免疫组化相对密度值柱状图;图C:各组 SYP 免疫组化相对密度值柱状图。\* $P < 0.05$ ;\*\* $P < 0.01$ ;\*\*\* $P < 0.001$

Sed-PBS组、Sed-TrkB/Fc组和TT-TrkB/Fc组相比,TT-PBS组的PSD-95相对蛋白密度显著增高(Sed-PBS组 vs. TT-PBS组,  $P < 0.01$ ; Sed-TrkB/Fc组 vs. TT-PBS组,  $P < 0.001$ ; TT-TrkB/Fc组 vs. TT-PBS组,  $P < 0.01$ ),并且TT-PBS组SYP的表达量也明显增加( $P < 0.001$ );TT-TrkB/Fc组的PSD-95及SYP相对蛋白密度明显高于Sed-TrkB/Fc组,差异具有显著性意义( $P < 0.05$ );Sed-PBS组与TT-TrkB/Fc组差异无显著性意义( $P > 0.05$ ,如图2B-C)。说明运动训练可显著增加PSD-95及SYP的蛋白免疫阳性率,而阻断BDNF-TrkB通路可显著抑制运动训练对上述两种蛋白表达的促进作用。

### 3 讨论

BDNF是NTs家族中重要的成员之一。当TrkB被BDNF激活后可使其胞内两个酪氨酸残基发生自动磷酸化,并激活下游的三条主要信号转导通路<sup>[19-20]</sup>:①经磷脂酰肌醇-3激酶(PI-3K)/蛋白激酶B(Akt/PKB)通路,可释放促生存信号;②经大鼠肉瘤蛋白(RAS)/细胞外信号调节激酶(ERK)途径并对胞内环磷酸腺苷(cAMP)含量进行调节,刺激轴突生长;③经磷脂酶C- $\gamma$ (PLC- $\gamma$ )/3-磷酸肌醇(IP-3)通路,由此产生钙信号,影响突触的可塑性和信号传递。上述信号通路可能与神经再生、神经元活性调节、神经可塑性、中枢神经系统修复及炎症反应调节等方面密切相关<sup>[5,21-22]</sup>。

运动训练作为一种无创性的康复疗法,在SCI后不仅可以增加BDNF的表达<sup>[9-10]</sup>,增强瘫痪肌肉,促进运动功能的恢复,还可以促进大脑的重塑、改善脊髓微环境,并可通过多种途径和机制保护残存神经元的功能<sup>[23-24]</sup>。此外,SCI后运动训练还可以促进包括:神经营养因子(NGF)<sup>[25]</sup>、神经营养因子-3(NT-3)<sup>[26]</sup>、神经营养因子-4(NT-4)<sup>[27]</sup>和胶质源性神经营养因子(GDNF)<sup>[28]</sup>等NTs的表达。但是,作为NTs家族重要的一员,多数研究仅观察了运动训练对BDNF表达的影响,并未探究其在运动训练促进SCI大鼠运动功能恢复中的重要性。

本研究使用TrkB/Fc阻断BDNF-TrkB信号通路,观察了运动训练对不完全性SCI大鼠后肢运动功能及脊髓突触可塑性的影响。结果显示,运动训

练可促进不完全性SCI大鼠的后肢运动功能恢复;而阻断BDNF-TrkB途径后,减重平板训练促进不完全性SCI大鼠运动功能恢复的作用受到抑制,但运动训练仍能部分促进不完全性SCI大鼠的运动功能恢复。上述结果说明了BDNF-TrkB通路是运动训练促进不完全性SCI大鼠功能恢复的主要途径。阻滞TrkB通路后,虽然减重平板训练仍能提高TT-TrkB/Fc组大鼠的运动功能,但其提升程度较TT-PBS组明显减小。Tashiro等<sup>[9]</sup>在观察减重平板训练改善不完全性SCI后痉挛与疼痛的同时还发现,使用TrkB/Fc阻断BDNF-TrkB通路后,减重平板训练不再促进SCI大鼠的运动功能恢复。与本研究的运动功能恢复趋势相近。此外,我们还观察了阻滞TrkB受体后,运动训练对不完全性SCI大鼠脊髓突触可塑性的影响。结果显示,减重平板训练可以促进不完全性SCI大鼠脊髓内PSD-95及SYP的表达;阻断BDNF-TrkB通路后,TT-TrkB/Fc组大鼠的PSD-95及SYP的合成较TT-PBS组明显减少,但仍多于Sed-PBS组和Sed-TrkB/Fc组。提示BDNF-TrkB通路是运动训练促进不完全性SCI大鼠脊髓突触可塑性的主要途径。Ying等<sup>[16]</sup>使用TrkB/Fc阻断BDNF作用后发现,自由转轮促进颈髓半切SCI大鼠运动功能恢复的效应被抑制,脊髓突触蛋白I(synapsin I)表达量也较运动组明显减少。由此可见,运动训练后,BDNF是促进SCI大鼠脊髓突触可塑性的主要因子。

PSD-95以及SYP分别为突触后膜密度蛋白-95和突触素小泡蛋白,分别可标记突触后膜和突触前膜。Cao等<sup>[29]</sup>在研究Angelman综合征动物模型时发现,该疾病与BDNF-TrkB信号通路的异常相关,可使PSD-95和SYP的合成减少,影响认知功能;而恢复BDNF-TrkB信号通路后,可通过TrkB下游的PI-3K/Akt和PLC- $\gamma$ /CaMKII信号转导通路促进PSD-95的合成,并增加SYP的表达及长时程增强作用。Tartaglia等<sup>[30]</sup>的研究发现,长期使用BDNF培养海马细胞可增加SYP、小突触泡蛋白和突触结合蛋白的合成。上述研究结果均说明,BDNF在调节突触发生及突触传递等方面均发挥着重要作用。

在本研究中,阻断BDNF通路后,运动训练仍能部分促进不完全性SCI大鼠的运动功能恢复和突触

相关蛋白的表达,说明其他NTs在运动训练促进SCI大鼠功能恢复中也发挥一定作用。上述现象表明,SCI后脊髓内可能还存在多种NTs之间的交互促进作用,共同促进了运动功能的恢复<sup>[31-33]</sup>。而在本研究中,使用TrkB/Fc抑制了BDNF-TrkB的生物学作用的同时,也可能影响了BDNF与其他NTs之间的协同作用,进而削弱了运动训练促进不完全性SCI大鼠运动功能的恢复。由此可见,SCI后的神经修复是一个复杂的过程,运动训练等适宜性刺激可以促进NTs表达,增强运动学习,促进脊髓神经组织的修复,使脊髓内形成有效的功能性神经环路/网络,进而促进运动功能的恢复<sup>[34]</sup>。因此,本研究也间接说明了运动训练促进不完全性SCI大鼠运动功能的恢复需要多种NTs共同参与。

综上所述,减重平板训练是一种较为有效的无创性SCI康复疗法,可以促进不完全性SCI大鼠后肢运动功能的恢复,增加远端脊髓PSD-95和SYP的合成,增加突触可塑性。本研究通过阻断BDNF-TrkB通路,验证了BDNF在运动训练促进不完全性SCI大鼠运动功能恢复中的重要性。后续研究应进一步证实BDNF及其他NTs在SCI后神经修复作用中的作用机制,为临床康复治疗提供更佳的治疗方案和理论依据。

## 参考文献

- [1] Leech KA, Hornby TG. High-Intensity locomotor exercise increases brain-derived neurotrophic factor in individuals with incomplete spinal cord injury[J]. *Journal of Neurotrauma*, 2017,34(6):1240—1248.
- [2] Wang H, Liu NK, Zhang YP, et al. Treadmill training induced lumbar motoneuron dendritic plasticity and behavior recovery in adult rats after a thoracic contusive spinal cord injury[J]. *Experimental Neurology*, 2015,271:368—378.
- [3] Ward PJ, Herrity AN, Harkema SJ, et al. Training-Induced Functional Gains following SCI[J]. *Neural Plasticity*, 2016, 2016:1—12.
- [4] Hayashibe M, Homma T, Fujimoto K, et al. Locomotor improvement of spinal cord-injured rats through treadmill training by forced plantar placement of hind paws[J]. *Spinal Cord*, 2015,54(7):521—529.
- [5] Weishaupt N, Blesch A, Fouad K. BDNF: The career of a multifaceted neurotrophin in spinal cord injury[J]. *Experimental Neurology*, 2012,238(2):254—264.
- [6] Smith AC, Knikou M. A review on locomotor training after spinal cord injury: reorganization of spinal neuronal circuits and recovery of motor function[J]. *Neural Plasticity*, 2016, 2016:1—20.
- [7] Shah PK, Garcia-Alias G, Choe J, et al. Use of quadrupedal step training to re-engage spinal interneuronal networks and improve locomotor function after spinal cord injury[J]. *Brain*, 2013,136(11):3362—3377.
- [8] Wu Q, Cao Y, Dong C, et al. Neuromuscular interaction is required for neurotrophins-mediated locomotor recovery following treadmill training in rat spinal cord injury[J]. *PeerJ*, 2016,4:e2025.
- [9] Tashiro S, Shinozaki M, Mukaino M, et al. BDNF induced by treadmill training contributes to the suppression of spasticity and allodynia after spinal cord injury via upregulation of KCC2[J]. *Neurorehabilitation and Neural Repair*, 2015,29(7):677—689.
- [10] 李亚丽,刘合玉,夏彬. 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[J]. *中国康复医学杂志*, 2016,31(8):852—856.
- [11] 李向哲,谢财忠,王娜,等. 鞘内置管技术在大鼠胸髓损伤模型中的改进及应用[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2016, 36(10):1202—1207.
- [12] Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. Graded histological and locomotor outcomes after spinal cord contusion using the NYU weight-drop device versus transection[J]. *Experimental Neurology*, 1996,139(2):244—256.
- [13] Endo T, Ajiki T, Inoue H, et al. Early exercise in spinal cord injured rats induces allodynia through TrkB signaling [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2009,381(3):339—344.
- [14] Ramer LM, Mcphail LT, Borisoff JF, et al. Endogenous TrkB ligands suppress functional mechanosensory plasticity in the deafferented spinal cord[J]. *Journal of Neuroscience*, 2007,27(21):5812—5822.
- [15] Soril LJ, Ramer LM, Mcphail LT, et al. Spinal brain-derived neurotrophic factor governs neuroplasticity and recovery from cold-hypersensitivity following dorsal rhizotomy [J]. *Pain*, 2008,138(1):98—110.
- [16] Ying Z, Roy RR, Zhong H, et al. BDNF-exercise interactions in the recovery of symmetrical stepping after a cervical hemisection in rats[J]. *Neuroscience*, 2008,155(4):1070—1078.
- [17] Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC, et al. MASCIS evaluation of open field locomotor scores: effects of experience and teamwork on reliability. Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study[J]. *Journal of Neurotrauma*, 1996,13(7):343—359.
- [18] Cho YS, Ko IG, Kim SE, et al. Oral mucosa stem cells alleviate spinal cord injury-induced neurogenic bladder symptoms in rats[J]. *Journal of Biomedical Science*, 2014,21(1):43.
- [19] Mitre M, Mariga A, Chao MV. Neurotrophin signalling: novel insights into mechanisms and pathophysiology[J]. *Clinical Science*, 2016,131(1):13—23.
- [20] Leal G, Comprido D, Duarte CB. BDNF-induced local protein synthesis and synaptic plasticity[J]. *Neuropharmacology*, 2014,76(C):639-656.
- [21] Garraway SM, Huie JR. Spinal plasticity and behavior:

(下转第1344页)