

# 阻断BDNF-TrkB信号通路后运动训练对脊髓损伤后大鼠痉挛状态及腰髓内GAD65表达的影响\*

丁洁<sup>1</sup> 李向哲<sup>2</sup> 方露<sup>3</sup> 吴勤峰<sup>2</sup> 谢财忠<sup>4</sup> 王红星<sup>3</sup> 王彤<sup>3,5</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)大鼠后肢痉挛以及腰髓内谷氨酸脱羧酶 65(glutamic acid decarboxylase 65, GAD65)表达的影响。

**方法:**将 60 只雌性 SD 大鼠随机分为假手术组(Sham组)、损伤+磷酸盐缓冲液组(Sed-PBS组)、运动+磷酸盐缓冲液组(TT-PBS组)、损伤+TrkB 阻滞剂组(Sed-TrkB/Fc组)以及运动+TrkB 阻滞剂组(TT-TrkB/Fc组)。采用改良 Allen 撞击法建立 T10 不完全脊髓损伤后痉挛模型,在 SCI 后第 7 天,于 Sed-TrkB/Fc 组和 TT-TrkB/Fc 组植入灌有 TrkB 阻滞剂(TrkB/Fc)的 Alzet 渗透压泵,其余三组渗透压泵中则注入 0.01M 磷酸盐缓冲液(phosphate-buffered saline, PBS)进行对照。SCI 后第 8 天,TT-PBS 组和 TT-TrkB/Fc 组进行减重平板训练(treadmill training),每周使用 H 反射的  $H_{max}/M_{max}$  比值对术后大鼠后肢的痉挛状态进行评估,于术后 5 周采用 Western Blot 和免疫组化技术检测各组大鼠损伤远段脊髓 GAD65 的表达情况,并对大鼠小腿三头肌  $H_{max}/M_{max}$  比值与脊髓前角 GAD65 相对表达量之间的相关性进行分析。

**结果:**术后,除假手术组外,其余 4 组大鼠后肢痉挛程度均逐渐加重。从第 3 周开始,与 Sed-PBS 组、Sed-TrkB/Fc 组和 TT-TrkB/Fc 组相比,TT-PBS 组  $H_{max}/M_{max}$  比值明显降低( $P<0.05$ );在术后第 4—5 周,TT-TrkB/Fc 组比值也有下降( $P<0.05$ )。5 组大鼠 GAD65 免疫组化和 Western Blot 结果显示,各组 GAD65 的相对蛋白含量均低于假手术组( $P<0.05$ ),但 TT-PBS 组明显多于除 Sham 组外的其他 3 组( $P<0.05$ );TT-TrkB/Fc 组 GAD65 的相对蛋白表达量与 Sed-PBS 组和 Sed-TrkB/Fc 组相比也有所增加( $P<0.05$ )。相关性分析显示,SCI 后第 35 天,大鼠小腿三头肌  $H_{max}/M_{max}$  比值与脊髓前角 GAD65 相对表达量之间呈负相关( $P<0.001$ )。

**结论:**运动训练可以改善 SCI 后的痉挛状态,而阻断 BDNF-TrkB 信号通路可抑制运动训练对不完全性 SCI 大鼠后肢痉挛的缓解和损伤远段脊髓 GAD65 表达的促进作用,且 SCI 后的痉挛状态的改善可能与脊髓前角 GAD65 相对表达量相关。

**关键词** 脊髓损伤;运动训练;痉挛状态;谷氨酸脱羧酶 65;脑源性神经营养因子

**中图分类号:**R651.2,R493 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2019)-05-0501-07

Effects of exercise training on the expression of GAD65 after blocking BDNF-TrkB pathway in spastic rats with spinal cord injury/DING Jie, LI Xiangzhe, FANG Lu, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2019, 34(5): 501—507

## Abstract

**Objective:** To investigate the effects of treadmill training on the spasticity and the expression of glutamic acid decarboxylase 65(GAD65)after blocking of Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) - Tyrosine kinase recep-

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2019.05.002

\*基金项目:国家自然科学基金面上项目(81672258)

1 南京医科大学第一临床医学院,江苏南京,210029; 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; 5 通讯作者

作者简介:丁洁,女,硕士研究生; 收稿日期:2018-03-06

tor B (TrkB) signaling pathway in rats with incomplete spinal cord injury (SCI).

**Method:** 60 female SD rats were randomly divided into 5 groups: sham operation group, injury+phosphate-buffered saline group (Sed-PBS group), Treadmill Training+phosphate-buffered saline group (TT-PBS group), injury+TrkB/Fc group (Sed-TrkB/Fc group) and Treadmill Training+TrkB/Fc group (TT-TrkB/Fc group). The spastic rat model with T10 incomplete SCI was induced by modified Allen's method. In the 7th day after SCI, the Alzet osmotic pump with TrkB blocker(TrkB/Fc) was implanted into rats of Sed-TrkB/Fc group and TT-TrkB/Fc group, while the Alzet osmotic pump of the three other groups were filled with 0.01M PBS. 8 days after SCI, the TT-PBS group and TT-TrkB/Fc group were underwent body-weight support treadmill training. Then we evaluated the spasticity of rats after the operation through the  $H_{max}/M_{max}$  ratio every week. The expression of GAD65 in injured spinal cord was examined by Western Blot and immunohistochemistry at the 5th week post injury. The correlation between the  $H_{max}/M_{max}$  ratio of triceps crus and the relative expression of GAD65 in the anterior horn of spinal cord in rats was also analyzed.

**Result:** After the operation, spasticity gradually aggravated in other 4 groups except the sham operation group. At the third week after SCI, the ratio of  $H_{max}/M_{max}$  in the TT-PBS group was significantly lower than that of the other 3 groups ( $P<0.05$ ), and at the 4—5th week, it was also lower in TT-TrkB/Fc group ( $P<0.05$ ). The immunohistochemistry and the Western blot results showed that, compared with the sham operation group, the relative protein expression of GAD65 in other 4 groups were decreased ( $P<0.05$ ). While the TT-PBS group was significantly higher than that of the other 3 groups ( $P<0.05$ ), and the TT-TrkB/Fc group was also higher than that of the Sed-PBS group and Sed-TrkB/Fc group ( $P<0.05$ ). The correlation analysis showed that in the 35th day after 5d, there was a negative correlation between the  $H_{max}/M_{max}$  ratio of triceps crus and the relative expression of GAD65 in the anterior horn of spinal cord in rats( $P<0.001$ ).

**Conclusion:** Exercise training can alleviate spasticity after SCI. Blocking the BDNF-TrkB signaling pathway can inhibit the effect of exercise training on the relief of spasticity and the expression of GAD65 in lumbar spinal cord of rats with incomplete SCI. And the relief of spasticity after SCI may be related to the relative expression of GAD65 in the anterior horn of spinal cord.

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

**Key word** spinal cord injury; exercise training; spasticity; glutamic acid decarboxylase 65; brain-derived neurotrophic factor

痉挛状态(spasticity)是脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)后常见的并发症,痉挛的发生对患者的运动范围、姿势控制、平衡等都有不同程度的影响,重度的痉挛甚至会引起关节挛缩、疼痛、压疮、感染等并发症,从而扰乱日常生活和睡眠,导致康复疗效不佳和生存质量的下降<sup>[1]</sup>。有文献指出<sup>[2-4]</sup>,SCI后痉挛的发生与脊髓内抑制性神经元功能的改变密切相关。 $\gamma$ -氨基丁酸( $\gamma$ -aminobutyric acid, GABA)是神经系统内重要的抑制性神经递质,其合成的减少会使脊髓神经元的兴奋性增加,可能为痉挛的产生机制之一<sup>[5]</sup>。谷氨酸脱羧酶(glutamate decarboxylase, GAD)是GABA合成的速率限制酶,在哺乳动物神经系统中有GAD65和GAD67两种亚型,其中GAD65能够优先合成囊泡释放的GABA,它表达的

异常可能会直接影响体内起抑制性神经递质作用的GABA的合成与释放<sup>[6]</sup>。

运动训练是一种无创性康复疗法,但目前关于运动训练减轻SCI后痉挛的研究多侧重于对疗效的观察,其机制尚未完全揭示。Hou等<sup>[5]</sup>的研究表明,运动训练可通过促进SCI大鼠损伤远端脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)和酪氨酸激酶受体B(tropomyosin-related kinase B, TrkB)合成,促进运动功能的恢复,改善SCI后的痉挛状态。故本实验拟通过阻断BDNF-TrkB信号通路后对SCI后痉挛大鼠进行运动训练,并通过检测其电生理学变化以及腰髓GAD65的表达情况,从正反向进一步探讨运动训练改善SCI后痉挛的作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

SPF级成年雌性SD大鼠(上海西普尔-必凯实验动物有限公司,许可证号:SCXK(沪)2013-0016),8—10周龄,体重200—220g。主要实验试剂与材料:6cm长PE-10导管若干(聚乙烯塑料导管,ID[内径]:0.28mm,OD[外径]:0.61mm,英国,Smiths medical international Ltd.);1cm长的PE-50导管若干(ID:0.58mm,OD:0.96mm,英国,Smiths medical international Ltd.);Alzet渗透压微泵(Alzet Osmotic minipumps,2002型;Alzet,USA);2%盐酸利多卡因注射液(上海禾丰制药有限公司);重组人TrkB/Fc嵌合体(Recombinant human TrkB/Fc Chimera, TrkB-IgG,R&D Systems,USA);0.01M磷酸缓冲盐溶液(0.01M PBS);GAD65兔多克隆抗体(Millipore),山羊抗兔IgG抗体(南京翼飞雪生物技术有限公司);25 $\mu$ l微量进样器(上海高鸽)。

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);多功能肌电诱发电位仪(Dantec Keypoint)。

### 1.2 鞘内置管及利多卡因试验

采用我们前期验证的鞘内置管方法<sup>[7]</sup>:0.3ml/100g腹腔注射10%水合氯醛对大鼠进行麻醉,定位L3-4棘突,备皮并纵行切开皮肤,处理L3-4棘突间及周围组织,并使用19G穿刺针穿刺硬脊膜及蛛网膜,将先前准备好的PE-10导管插入蛛网膜下腔约2cm(对应L3-4脊髓段),逐层缝合固定。最后将导管与25 $\mu$ l微量进样器相连以注入20 $\mu$ l无菌生理盐水冲洗导管,封闭导管末端。术后保证大鼠于恒温条件下进行单笼饲养,并予以抗感染处理。

置管后第7天,在大鼠清醒状态下将原先封闭的导管外口剪开,使用微量进样器注入2%盐酸利多卡因注射液约20 $\mu$ l,封堵外口。观察大鼠有无尾部及双下肢麻痹现象以验证置管情况,淘汰不符合规定的大鼠。

### 1.3 脊髓损伤模型制作、分组及渗透压泵的植入

采用改良Allen法<sup>[8]</sup>来制备大鼠SCI模型:麻醉大鼠(剂量同前),定位后剃毛备皮,碘伏消毒,剔除T10棘突及椎板,清理周围组织以使视野清晰,暴露脊髓。使用损伤剂量为10g $\times$ 25mm的model I型脊

椎冲击损伤仪建立不完全SCI大鼠模型,缝皮消毒后放回笼内。进行假手术操作的大鼠则不使用打击器损伤脊髓,其余步骤均相同。术后单笼饲养,并注意保暖及青霉素抗感染处理,SCI大鼠早晚还需各1次辅助按摩排尿直至大鼠能反射性排尿为止。

SCI后第7天,随机从剩余符合要求的大鼠中选取60只大鼠,并根据随机数字法将它们分为5组:假手术组(Sham组)、损伤+磷酸盐缓冲液组(Sed-PBS组)、运动+磷酸盐缓冲液组(TT-PBS组)、损伤+TrkB阻滞剂组(Sed-TrkB/Fc组)及运动+TrkB阻滞剂组(TT-TrkB/Fc组)。切开之前的鞘内置管处,并于鼠背部皮下钝性分离一囊腔,将准备好的已在生理盐水中孵育过的Alzet渗透压泵(泵入速度为0.5 $\mu$ l/h,体积约200 $\mu$ l)中注满无菌PBS或浓度为0.25 $\mu$ g/ $\mu$ l的TrkB/Fc(0.01M PBS配)<sup>[3]</sup>,连接PE-50导管于原先已置入的PE-10导管,将渗透压泵植入空腔,在皮下缝合固定。TrkB/Fc的阻断剂量为3 $\mu$ g/d,在体内的有效期约为2周<sup>[9-10]</sup>,2周后需更换一次渗透压泵,共计植入4周。

### 1.4 运动训练

采用前期课题组自制的减重平板训练装置进行<sup>[11]</sup>。TT-PBS组和TT-TrkB/Fc组于SCI后第8天开始支撑重量为20%—40%的减重平板训练(随时间逐渐减少支撑重量),跑台速度为6m/min,每次训练20min,2次/d,5d/w,训练4w。Sham组、Sed-PBS组、Sed-TrkB/Fc组则不进行运动训练。

### 1.5 H反射评估

评定前排空大鼠膀胱,分别在SCI后第7d、14d、21d、28d、35d采用H反射的 $H_{max}/M_{max}$ 比值评估大鼠后肢小腿三头肌的痉挛程度。将大鼠麻醉后,俯卧位固定在实验台,连接设备,打开keypoint软件。将地线插入大鼠尾部皮下,刺激电极经皮插入腘窝处的胫神经,记录电极插于第五趾间肌,参考电极则位于跖骨表面<sup>[12-13]</sup>。以0.1Hz、0.2ms、0.1mA的方波刺激神经,并逐渐增大刺激电流强度,从而确定H波波幅最大值和M波波幅的最大值,最终获得 $H_{max}/M_{max}$ 比值。比值越高,痉挛程度越高。评定中需保持周围安静。

### 1.6 免疫组化

SCI后5周取材,麻醉大鼠,4%多聚甲醛进行心



脏灌注,截取目的脊髓段(L2-L5),进行后固定、酒精脱水、石蜡包埋等处理。使用石蜡切片机进行切片,并将厚度为 $5\mu\text{m}$ 的石蜡切片标本烘片后,置于 $56^{\circ}\text{C}$ 恒温箱1h,经脱蜡水化、过氧化物酶灭活、微波修复、山羊血清封闭等操作后,滴加GAD65(1:500)一抗进行孵育, $4^{\circ}\text{C}$ 过夜。第二天复温、PBS洗片后,再滴加生物素标记的山羊抗兔二抗(1:200), $37^{\circ}\text{C}$ 孵育1h后,洗片、DAB显色、封片。摄片后用Image J软件对每组脊髓相应区域内GAD65免疫阳性标记物进行光密度值的计算分析。

### 1.7 Western Blot

训练结束后,在麻醉状态下取大鼠腰骶膨大处(L2-L5段)组织,加入RIPA裂解液,匀浆后离心,取上清,BCA法测定蛋白浓度,分装后放置于 $-80^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。以 $80\mu\text{g}$ 蛋白上样,在10%SDS-PAGE胶上电泳分离后,再转至PVDF膜上。牛奶封闭并进行一抗孵育(GAD65:1:1000), $4^{\circ}\text{C}$ 过夜。第二天洗膜后加入二抗(山羊抗兔,1:2000)室温孵育1h,再次洗膜后,ECL法显影,Image J软件进行灰度值分析。

### 1.8 统计学分析

实验结果采用SPSS 20.0进行统计学分析。 $H_{\text{max}}/M_{\text{max}}$ 比值的评定采用重复测量方差分析,组内及组间不同时间点的差异比较均使用单因素方差分析,并建立线性模型。GAD65相对表达含量采用单因素方差分析,再使用Post Hoc进行两两比较。采用Pearson相关性分析对第35天大鼠H反射的 $H_{\text{max}}/M_{\text{max}}$ 比值与GAD65相对表达量之间的相关性进行分析。 $P<0.05$ 为差异具有显著性意义。

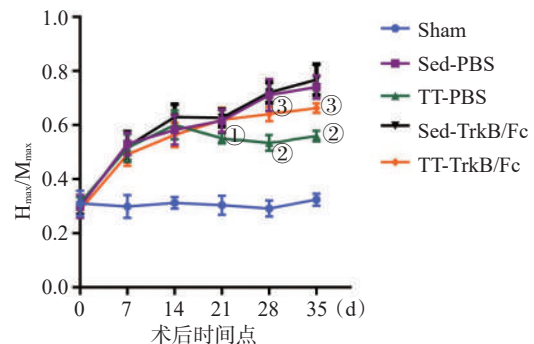
## 2 结果

### 2.1 $H_{\text{max}}/M_{\text{max}}$ 比值评定

重复度量方差分析显示,4组大鼠小腿三头肌 $H_{\text{max}}/M_{\text{max}}$ 比值在时间主效应上差异有显著性意义( $F=110.125, P<0.001$ ),组别主效应上也存在差异( $F=5.068, P=0.017$ ),且时间和组别之间有交互作用( $F=2.873, P=0.002$ )。SCI后Sham组 $H_{\text{max}}/M_{\text{max}}$ 比值增加不明显,而其余4组均逐渐增高。术后1—2w,除Sham组外其余4组大鼠 $H_{\text{max}}/M_{\text{max}}$ 比值之间差异无显著性意义( $P>0.05$ );术后3w,与其他3组相比,TT-PBS组 $H_{\text{max}}/M_{\text{max}}$ 比值明显降低( $P<0.05$ ),术后

4—5w,差异亦具有显著性意义( $P<0.01$ )。此外,TT-TrkB/Fc组 $H_{\text{max}}/M_{\text{max}}$ 比值在术后4—5w低于Sed-PBS组及Sed-TrkB/Fc组( $P<0.05$ )但仍明显高于TT-PBS组( $P<0.01$ )。见图1。

图1 各组大鼠术后各时间点 $H_{\text{max}}/M_{\text{max}}$ 比值



TT-PBS组与除Sham组外的其余3组相比,① $P<0.05$ ,② $P<0.01$ ; TT-TrkB/Fc组与Sed-PBS组及Sed-TrkB/Fc组相比,③ $P<0.05$ 。

### 2.2 GAD65 免疫组化检测

使用免疫标记法对GAD65进行研究发现,GAD65免疫阳性结构成斑点状(图2),在脊髓前角,主要可见于大的细胞体周围(图2A)。各组GAD65的相对蛋白密度较Sham组均有明显的下降( $P<0.001$ );而TT-PBS组与除Sham组外的其他3组相比,GAD65的相对蛋白密度显著增高( $P<0.001$ )。此外,TT-TrkB/Fc组GAD65的相对蛋白密度与Sed-TrkB/Fc和Sed-PBS组相比也有增加( $P<0.05$ ,图2B)。

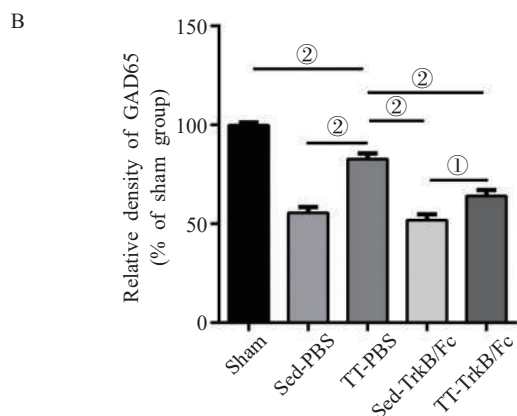
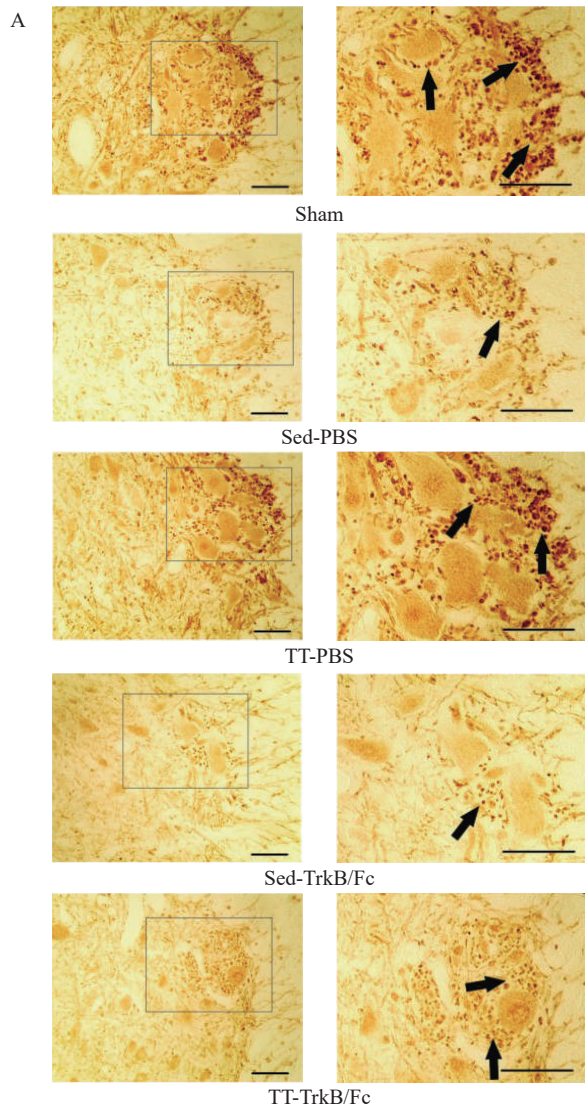
### 2.3 GAD65 Western Blot结果

以各组GAD65的平均相对灰度值与Sham组的比值作为GAD65的相对表达水平,结果显示:与Sham组相比,其余4组GAD65的相对蛋白表达量均有所下降( $P<0.001$ ),其中TT-PBS组GAD65的相对蛋白表达量显著高于Sed-PBS组( $P<0.001$ )、Sed-TrkB/Fc组( $P<0.001$ )及TT-TrkB/Fc组( $P<0.05$ ),而TT-TrkB/Fc组GAD65的相对蛋白表达量与Sed-PBS组和Sed-TrkB/Fc组相比也有所增加( $P<0.01$ ,图3B)。

### 2.4 大鼠小腿三头肌 $H_{\text{max}}/M_{\text{max}}$ 比值与腰髓前角GAD65相对表达量的相关性

采用Pearson相关性分析进一步分析探讨SCI

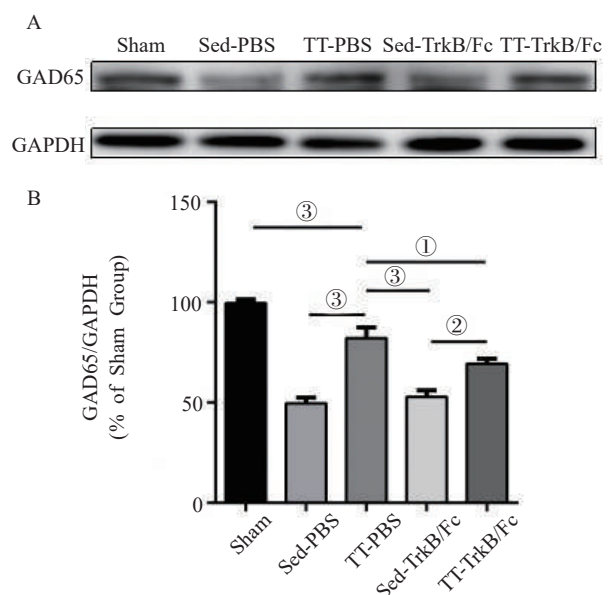
图2 GAD65腰髓前角免疫组化 (×400)



A:各组 GAD65 免疫组化:GAD65 免疫阳性标记呈棕黄色或棕褐色斑点状结构,在脊髓前角主要可见于大的细胞体周围(如“→”所示)  
B:各组 GAD65 免疫组化相对密度值柱状图,① $P<0.05$ ,② $P<0.001$

后第35天大鼠小腿三头肌  $H_{\max}/M_{\max}$  比值与脊髓前角 GAD65 相对表达量的相关性。取本研究中每只大鼠  $H_{\max}/M_{\max}$  比值和 GAD65 相对蛋白表达密度和相对蛋白表达量的平均值进行分析,结果显示, $H_{\max}/M_{\max}$  比值与 GAD65 相对表达量之间呈负相关( $r=-0.798$ ),即  $H_{\max}/M_{\max}$  比值越低,GAD65 相对蛋白表达密度( $r=-0.816$ )和相对蛋白表达量越高,结果有显著性意义( $P<0.001$ )。

图3 GAD65 蛋白免疫印记



A:GAD65 蛋白免疫印记条带;B:各组 GAD65 蛋白相对表达量柱状图。① $P<0.05$ ;② $P<0.01$ ;③ $P<0.001$

### 3 讨论

SCI是一种常见的意外创伤,它可导致受伤部位以下感觉和运动功能的紊乱,SCI后还存在各种并发症。痉挛状态即为SCI后常见的康复问题之一,它可严重影响患者的康复过程,降低生存质量<sup>[1]</sup>。针对痉挛状态的多个发病机制,各种治疗策略也在临床实践中应运而生,而运动疗法等康复治疗作为一种效果显著、无创又无毒副作用的治疗方法,可成为SCI后痉挛治疗的首选措施,但目前其机制尚不十分清楚。GABA是中枢神经系统主要的抑制性神经递质之一,在SCI后运动解痉的过程中可发挥重要的作用<sup>[5]</sup>。GAD65是GABA合成酶,激活后能够增强GABA的合成与释放,即它的表达可调

节抑制性突触信号的效率<sup>[2]</sup>。BDNF 是参与周围神经系统和中枢神经系统发育及维持的神经营养因子之一,它可与 TrkB 结合来激活下游信号通路而发挥作用<sup>[14]</sup>;在脊髓损伤部位,BDNF 还可促进神经保护、轴突神经元的再生与修复以及调节中枢神经系统的突触可塑性等<sup>[15-16]</sup>。Hou 等<sup>[5]</sup>的研究提示经颅磁刺激和/或运动训练可通过增加 BDNF 合成,促进 GABA 合成酶及其受体的表达而改善 SCI 后的痉挛状态。本实验则通过阻断 BDNF 与其特异性受体 TrkB 的结合从正反向观察运动训练对 SCI 后痉挛的改善以及对腰髓 GAD65 表达的影响,以进一步加深对运动训练改善 SCI 后痉挛作用机制的认识。

H 反射是一种客观的神经电生理评定技术,它可较好地反映脊髓水平的电生理学变化。Joon 等<sup>[17]</sup>通过对 T10-T12 压缩性 SCI 后小鼠进行研究发现,随着小鼠脊髓运动神经元的病理生理改变以及功能的逐渐恢复,H 反射对刺激频率的敏感性反应会增强, $H_{\max}/M_{\max}$  比值不失为评估下运动神经元兴奋性的较理想的指标。近年来,不少研究也已尝试建立痉挛的神经反射活动与临床神经体征、痉挛评定量表间的关联,并且指出 H 反射可作为临床上痉挛测定的辅助评估手段<sup>[18-19]</sup>。在动物实验中,H 反射亦是痉挛评定的可靠指标<sup>[20]</sup>。本实验通过对 SCI 后大鼠后肢  $H_{\max}/M_{\max}$  比值的评估发现,在 SCI 后,各损伤组大鼠后肢痉挛程序均逐渐加重,运动训练可以有效缓解不完全性 SCI 大鼠后肢的痉挛状态;而阻断 BDNF-TrkB 途径后,减重平板训练改善不完全性 SCI 大鼠后肢痉挛的作用会受到抑制,但运动训练仍能一定程度地减轻其痉挛程度。

此外,我们也观察了使用 TrkB 阻滞剂后,运动训练对不完全性 SCI 大鼠腰髓 GAD65 表达的影响,发现运动训练可以促进不完全性 SCI 大鼠腰髓内 GAD65 的表达;阻滞 TrkB 受体后,TT-TrkB/Fc 组大鼠脊髓 GAD65 的表达明显低于 TT-PBS 组,但仍多于 Sed-PBS 组和 Sed-TrkB/Fc 组。这表明,运动训练可显著上调 SCI 后大鼠腰髓内 GAD65 的水平;阻断 BDNF-TrkB 通路则可较明显地抑制运动训练对 GAD65 表达的促进作用。Tashiro 等<sup>[12,21]</sup>使用 TrkB 阻滞剂阻断 BDNF-TrkB 通路后还发现,运动训练通过促进钾-氯协同转运蛋白-2 (potassium-chloride

cotransporter-2, KCC2) 合成进而调节神经元的兴奋性减轻 SCI 后痉挛的作用也被抑制。由此可见, BDNF-TrkB 通路可作为运动训练促进不完全性 SCI 大鼠痉挛状态改善的主要途径之一。除此之外,TT-TrkB/Fc 组大鼠痉挛状态的部分改善及髓内 GAD65 表达的增高则表明可能还存在可参与神经元兴奋性调节的其他神经递质及受体或相关离子通道活性及功能的改变,这些因素及彼此之间的相互作用也会对此产生深远的影响<sup>[22]</sup>。进一步分析显示,SCI 后第 35 天,大鼠小腿三头肌  $H_{\max}/M_{\max}$  比值与脊髓前角 GAD65 相对表达量之间存在明显的负相关, $H_{\max}/M_{\max}$  比值越低,GAD65 相对表达量越高。由于本研究观察的特定时间点及样本量等因素的限制,我们尚不能确定其他时间节点二者之间的相关性。虽然目前未有研究完全明确这两者之间的相关性,但 Sandra 等<sup>[23]</sup>的研究指出,在大鼠 S2 椎骨水平脊髓完全横断后,其尾巴的痉挛是伴随着 GAD65 免疫阳性胞体面积的缩小而出现的,而脊髓节段性上调 GAD65 基因的表达与全身噻加宾 (tiagabine, GABA 摄取抑制剂) 治疗的联合使用则会起到有效的抗痉挛作用<sup>[24]</sup>,提示 GAD65 的表达量与 SCI 后痉挛的发生发展是密切相关的,这也可作为临床上治疗 SCI 后痉挛提供一种新的治疗思路与方法。

Betley 等<sup>[2]</sup>指出,在中枢神经系统的许多神经元中,高效的 GABA 的释放需要 GAD65 的表达,而来自本体感觉末端的 BDNF 的释放会激活 GABA 能神经元上的 TrkB 受体,从而促进 GAD65 在突触等处的积累。然而,BDNF/TrkB 信号通路通过何种途径调节 GAD65 的表达以及 GABA 能神经元的活性,目前尚不清楚。有研究表明<sup>[25]</sup>,大脑皮质的 BDNF/TrkB 信号可通过激活 Ras/ERK-CREB 通路控制 GAD65 的转录调控,促进 GAD65 的表达,从而调节大脑皮质抑制回路的成熟和功能。那么,在脊髓损伤后,运动训练是否也能像在大脑皮质中间神经元中那样通过该途径调控 GABA 的合成,调节脊髓运动神经元的兴奋性,减轻 SCI 后痉挛? 这些下游信号分子在痉挛产生过程中的具体机制又是什么? BDNF 在参与 GABA 能传递系统发育的同时,是否也能上调 GABA 受体的表达呢? 这些问题仍有待于我们在下一阶段进一步探讨。



综上所述,运动训练可有效缓解不完全性SCI大鼠后肢的痉挛状态,增加远端脊髓GAD65的合成与表达,而通过阻滞TrkB受体,我们也验证了BDNF-TrkB途径在SCI后运动解痉过程中的重要性。此外,SCI后痉挛的缓解是一个复杂的过程,可能还涉及条通路以及各通路之间的交互作用。本研究可为临床上运动解痉机制的研究提供一定的思路,后续我们仍需进一步探讨其确切机制以为临床上痉挛的康复治疗提供依据和指导。

### 参考文献

- [1] Gao W, Yu L, Liu Y, et al. Mechanism of GABA receptors involved in spasticity inhibition induced by transcranial magnetic stimulation following spinal cord injury[J]. J Huazhong U Sci-Med, 2015,35(2):241—247.
- [2] Betley JN, Wright CV, Kawaguchi Y, et al. Stringent specificity in the construction of a GABAergic presynaptic inhibitory circuit[J]. Cell, 2009,139(1):161—174.
- [3] Leal G, Comprido D, Duarte CB. BDNF-induced local protein synthesis and synaptic plasticity[J]. Neuropharmacology, 2014,76 Pt C:639—656.
- [4] Kopach O, Medvediev V, Krotov V, et al. Opposite, bidirectional shifts in excitation and inhibition in specific types of dorsal horn interneurons are associated with spasticity and pain post-SCI[J]. Sci Rep, 2017,7(1):5884.
- [5] Hou J, Nelson R, Nissim N, et al. Effect of combined treadmill training and magnetic stimulation on spasticity and gait impairments after cervical spinal cord injury[J]. J Neurotrauma, 2014,31(12):1088—1106.
- [6] Soghomonian JJ, Martin DL. Two isoforms of glutamate decarboxylase: why?[J]. Trends Pharmacol Sci, 1998,19(12):500—505.
- [7] 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,(10):1202—1207.
- [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]. Peer J, 2016,4:e2025.
- [9] Zhang X, Zeng L, Yu T, et al. Positive feedback loop of autocrine BDNF from microglia causes prolonged microglia activation[J]. Cell Physiol Biochem, 2014,34(3):715—723.
- [10] 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.
- [11] 徐冬晨, 王红星, 王彤. 大鼠部分重量支撑平板训练新模型在不完全性脊髓损伤运动功能改善中的应用[J]. 中国康复医学杂志, 2010,25(8):721—724.
- [12] 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]. Neurorehabil Neural Repair, 2014, 29(7):677—689.
- [13] 宗海洋, 马芬芬, 林耀发, 等. 光化学损伤单侧运动皮质致大鼠后肢痉挛性偏瘫模型的建立[J]. 第二军医大学学报, 2016, 37(8):925—930.
- [14] Yi B, Wu C, Shi R, et al. Long-term Administration of Salicylate-induced Changes in BDNF Expression and CREB Phosphorylation in the Auditory Cortex of Rats[J]. Otol Neurotol, 2018,39(3):e173—e180.
- [15] Keefe KM, Sheikh IS, Smith GM. Targeting Neurotrophins to Specific Populations of Neurons: NGF, BDNF, and NT-3 and Their Relevance for Treatment of Spinal Cord Injury[J]. Int J Mol Sci, 2017,18(3):548.
- [16] Hernandez-Torres V, Gransee HM, Mantilla CB, et al. BDNF effects on functional recovery across motor behaviors after cervical spinal cord injury[J]. J Neurophysiol, 2017,117(2):537—544.
- [17] Lee HJ, Jakovcevski I, Radonjic N, et al. Better functional outcome of compression spinal cord injury in mice is associated with enhanced H-reflex responses[J]. Exp Neurol, 2009,216(2):365—374.
- [18] Kumru H, Albu S, Valls-Sole J, et al. Influence of spinal cord lesion level and severity on H-reflex excitability and recovery curve[J]. Muscle Nerve, 2015,52(4):616—622.
- [19] 李红玲, 徐凌娇, 潘拴珍, 等. 脑卒中后偏瘫患者下肢H反射的特征表现[J]. 中国康复医学杂志, 2011,(11):1051—1055.
- [20] Lee S, Toda T, Kiyama H, et al. Weakened rate-dependent depression of Hoffmann's reflex and increased motoneuron hyperactivity after motor cortical infarction in mice[J]. Cell Death and Disease, 2014,5(1):e1007.
- [21] Cote MP, Gandhi S, Zambrotta M, et al. Exercise modulates chloride homeostasis after spinal cord injury[J]. J Neurosci, 2014,34(27):8976—8987.
- [22] 李向哲, 王彤. 脑源性神经营养因子对脊髓损伤后痉挛影响的研究进展[J]. 中国康复医学杂志, 2016,31(11):1289—1292.
- [23] Kapitz S, Zörner B, Weinmann O, et al. Tail spasms in rat spinal cord injury: Changes in interneuronal connectivity[J]. Exp Neurol, 2012,236(1):179—189.
- [24] Kakinohana O, Hefferan MP, Miyahara A, et al. Combinational spinal GAD65 gene delivery and systemic GABA-mimetic treatment for modulation of spasticity[J]. PLoS One, 2012,7(1):e30561.
- [25] Sánchez-Huertas C, Rico B. CREB-Dependent Regulation of GAD65 Transcription by BDNF/TrkB in Cortical Interneurons[J]. Cereb Cortex, 2011,21(4):777—788.