

生酮饮食对颈脊髓损伤大鼠功能预后及神经保护作用的研究*

邢华医¹ 刘捷² 刘楠¹ 喇高燕¹ 周谋望^{1,3}

摘要

目的:探索生酮饮食对脊髓损伤大鼠功能预后的影响及神经保护机制在其中所起的作用。

方法:对SD大鼠经过充分的行为学训练后,利用IH脊髓打击器建立SD大鼠单侧C5脊髓不完全损伤模型。术后将动物分为两组,分别给予普通标准饮食(standard diet,SD)和生酮饮食(ketogenic diet,KD),术后第4、7天及此后每周监测血 β -羟丁酸水平,每2周进行1次行为学评估(Staircase实验和Rearing实验)。8周后将动物处死,取损伤部位的脊髓组织进行连续冰冻切片EC染色,镜下观察并测量损伤部位灰质和白质的残存量。

结果:在术后观察的8周内,KD组从术后第3天开始尾静脉血 β -羟丁酸水平显著增高,维持在1.5mmol/L以上(最高2.89mmol/L);SD组血酮水平维持在0.70mmol/L左右。术后2周时SD组与KD组Staircase得分差异无显著性,术后4、6及8周时KD组得分均明显高于SD组;术后2、4、8周时KD组Rearing得分明显高于SD组,术后6周KD组与SD组得分差异虽无显著性,但两组均值差别趋势仍较明显($P=0.07$);KD组损伤部位灰质/白质残存量均明显多于SD组。

结论:生酮饮食对脊髓损伤后神经功能有保护作用,可能是通过保留残存神经组织量的途径实现。

关键词 脊髓损伤;生酮饮食;行为学评估;神经保护;功能恢复

中图分类号:R741,R493,R459.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2019)-06-0625-06

Effects of ketogenic diet on functional recovery and neuroprotection after spinal cord injury in rats/
XING Huayi, LIU Jie, LIU Nan, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2019, 34(6): 625—630

Abstract

Objective: To investigate whether a restricted KD regimen can result in improvement of functional outcomes and neuroprotection in rats after spinal cord injury.

Method: Immediately after C5 hemi-contusion injury, 34 Sprague-Dawley rats were fed with either standard diet (SD, ad libitum) or a restricted ketogenic diet (KD). Blood β -hydroxybutyrate concentration and forelimb function were evaluated for 8 weeks, followed by quantitative assessment of spinal cord tissue sparing using EC staining.

Result: Blood β -hydroxybutyrate concentration in KD group remained above 1.50mmol/l during the 8 weeks without decrease (maximal level 2.89 mmol/l). The blood β -hydroxybutyrate concentration in SD group was around 0.70 mmol/l. Staircase scores of KD and SD groups were similar at 2 weeks post injury, but then KD group got significantly higher scores than SD group in the later assessments. Rearing scores of KD group were significantly higher than SD group at 2 weeks, 4 weeks and 8 weeks after injury, although no significant difference was found between the two groups at 6 weeks after injury with the P value very closed to 0.05 ($P=0.07$). There was much more gray/white matter sparing in KD group than in SD group.

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2019.06.001

*基金项目:国家自然科学基金国际(地区)合作与交流项目(81261120563);国家自然科学基金青年基金项目(11502003)

1 北京大学第三医院康复医学科,北京,100191; 2 加拿大不列颠哥伦比亚大学Blusson脊髓损伤中心; 3 通讯作者
作者简介:邢华医,女,住院医师; 收稿日期:2018-09-03

Conclusion: Ketogenic diet can improve the recovery of forelimb function in animals with spinal cord injury.

This therapeutic effect of ketogenic diet may be attributed to the protection of tissue sparing.

Author's address Dept. of Rehabilitation Medicine, Peking University Third Hospital, Beijing, 100191

Key word spinal cord injury; ketogenic diet; behavioral assessment; neuroprotection; functional recovery

脊髓损伤是一种严重的创伤性疾患,常见的损伤原因包括交通事故、高处坠落、暴力外伤和体育运动相关活动等。全球脊髓损伤的年发生率约为15—40例/百万人口^[1]。随着我国经济水平的不断提高,交通运输、工业生产和体育娱乐活动所致的脊髓损伤不断增加。据估计,我国每年新增脊髓损伤患者约6万例^[2]。脊髓损伤造成的残疾对患者的生活造成灾难性影响,使原本独立的个体依赖他人,严重损害了患者及其家庭的生活质量;同时,各种并发症的出现又显著增加了患者个人、家庭和整个医疗卫生系统的负担。

虽然对脊髓损伤治疗策略的探索越来越深入和广泛,但到目前为止脊髓损伤的治疗手段仍极为有限,绝大多数治疗措施的疗效尚不确切^[3]。生酮饮食是一种含有高脂肪及极低含量碳水化合物的饮食疗法^[4]。传统的生酮饮食(ketogenic diet, KD)起源于20年代,最初用于治疗癫痫,至今对一些抗药性癫痫仍不失为一种公认而有效的非药物疗法^[5]。近几年来, KD治疗其他神经系统疾病的潜力也被逐渐认可,比如阿尔茨海默病^[6]、脑外伤^[7]、帕金森病^[8]等。已有研究表明,生酮饮食能够改善脊髓损伤大鼠的肢体功能^[9],其作用机制可能与抑制损伤后炎症反应及氧化应激有关^[10-11],但对于这一治疗措施在神经保护作用方面的认识仍有待深入。

本研究拟分别用普通标准饮食和生酮饮食饲养C5单侧脊髓挫伤模型大鼠,在损伤后多个时间点评价动物的肢体行为学表现,并通过组织学方法评价损伤部位神经组织(灰质/白质)残存量,探索生酮饮食对颈脊髓损伤大鼠功能预后的影响及神经保护作用机制,为这一治疗措施的临床转化提供依据。

1 资料与方法

1.1 实验动物及分组

体重150—200g雄性SPF级SD大鼠34只(北京维通利华实验动物技术有限公司,清洁级),饲养于北京大学医学部实验动物中心,环境昼夜周期为

12h/12h。所有操作均遵循北京大学医学部实验动物伦理委员会的相关要求。

采用随机数字表法将动物分为两组,每组17只,制作C5单侧脊髓挫伤模型。术后即刻开始给予不同的饮食。标准饮食组(standard diet, SD)给予足量正常饲料, KD组按照10g/只/d的剂量每日定量给予生酮饮食(奇酮, 中国深圳)。生酮饲料的配方及营养成分组成比例为:脂肪与碳水化合物+蛋白质的比例为3:1,每100g饲料中含脂肪62.5g,碳水化合物5.6g,蛋白质15.5g,其余为矿物质、膳食纤维等非能量成分。

1.2 实验动物术前行为学基线值评估

Staircase实验^[12]:评价动物前肢远端精细抓握功能。在7层阶梯上分别放置一定数量的不同颜色食物颗粒,将动物放入Staircase后任其自由取食,15min后计数被动物吃掉的食物颗粒数,可反映动物用前爪抓取食物颗粒和送至口边直至完成进食的整个过程中的功能情况。根据文献报道及预实验获得的经验,需进行6次实验动物方能达到得分平台期。取最后一次训练的得分为术前基线值。

Rearing实验^[13]:评价动物上肢近端功能。将动物放入透明塑料圆筒,用摄像机将动物在15min内的活动情况记录下来,然后分析动物在前20次直立活动中双侧前肢分别触壁的次数。损伤侧前肢触壁次数占双侧前肢触壁次数总和的百分比记为Rearing得分。该行为学实验无需特殊训练。在造模前2天进行一次视频录制,作为基线值。

1.3 C5单侧脊髓挫伤模型的制作^[14]

将动物2%戊巴比妥腹腔注射麻醉后取俯卧位,称体重并记录。然后自耳后至躯干中部的区域进行备皮及75%酒精皮肤消毒,进行造模手术。每只动物选择Staircase基线值得分较高的一侧(优势侧)定为损伤侧。

依次切开皮肤、肌层,暴露C5椎板,咬骨钳咬除待损伤侧C5椎板,暴露相应节段硬膜囊及脊髓。将动物放置在预先调整为倾斜22.5°的平台上。将IH

脊髓打击器(PSI,美国)的打击头对准暴露的脊髓节段并缓慢将打击头调整至距离硬膜囊表面上方2cm的位置。设置打击力度为150 K dynes,通过计算机软件控制打击器对C5节段单侧脊髓进行一次打击,形成挫伤模型,并记录实际打击力度。完成打击后分层缝合肌肉及皮肤。

1.4 血 β -羟丁酸水平测定

术后第4d、第7d及此后每周各进行1次尾静脉血 β -羟丁酸水平测试(试纸及测试仪厂家均为雅培,美国)。

1.5 术后行为学评估

在术后第2、4、6、8周各进行1次Staircase实验及Rearing实验,对动物的前肢功能进行评价。

1.6 脊髓组织取材及铬花青(Eriochrome cyanine, EC)染色分析

术后8周完成最后一次血 β -羟丁酸水平测试及行为学评估后,过量戊巴比妥腹腔注射处死动物,4%多聚甲醛灌注固定后,以损伤部位为中段,向头端和尾端暴露共1.5cm长的一段脊髓,切开硬膜,切断神经根,截取脊髓组织。4%多聚甲醛体外固定过夜,依次经12%、18%、24%梯度蔗糖PBS溶液脱水后,OCT包埋冰冻,做20 μ m厚连续冰冻横断切片。

切片经二甲苯、梯度酒精水化后,EC(Sigma,德国)染髓鞘、0.5%氨水分化、1%中性红复染,再经梯度酒精、二甲苯脱水透明,中性树胶封片。对于每一只动物的脊髓损伤部位连续切片,先找到损伤最严重的层面,然后分别向头端和尾端各数5个层面,共11层组织,总高度为20 μ m/层 $\times$ 11层=220 μ m。利用Image Pro Plus软件,分别对每个层面上的残存灰质和白质面积进行测量。残存灰质/白质面积均值 $\times$ 220 μ m=残存灰质/白质体积,对比各时间点的组间差异。

1.7 统计学分析

所有数值以均数 $\pm$ 标准差表示。使用SPSS 20.0进行统计分析。对不同时间点两组间行为学及组织学结果进行双因素方差分析,同一时间点的组间数据两两比较采用Bonferroni检验。 $P<0.05$ 时认为差异具有显著性意义。

2 结果

2.1 Staircase术前训练情况

经过6次Staircase术前训练,动物的得分随训练次数增多而逐渐升高,在进行第4次训练时开始进入平台期,第4、5、6次训练的得分差异无显著性,说明动物对Staircase实验方法的适应和学习已达到平台期,术前训练充分。见图1。

2.2 实验动物各指标基线值

SD组及KD组动物在造模前的体重、Staircase基线值及造模时的实际打击力度差异均未见显著性意义。见表1。

2.3 尾静脉血 β -羟丁酸水平

术前测得两组尾静脉血 β -羟丁酸水平基线值无统计学差异,术后观察8周内,SD组尾静脉血 β -羟丁酸水平始终未见明显波动,与术前基线值比较亦无明显差异;KD组从术后第4d开始尾静脉血 β -羟丁酸水平显著增高,与同时期SD组比较均有显著性意义($P<0.05$)。见图2。

2.4 术后行为学评估

Staircase实验:术后2周时SD组与KD组得分差异无显著性,术后4周、6周及8周时KD组得分均明显高于SD组,差异具有显著性意义($P<0.05$),见图3a。

Rearing实验:术后2周时KD组得分即明显高于SD组,差异具有显著性意义($P<0.05$),术后4周、8周结果亦有类似表现。术后6周KD组与SD组得分差异虽无显著性,但两组均值差别趋势仍较明显,

图1 Staircase术前训练得分

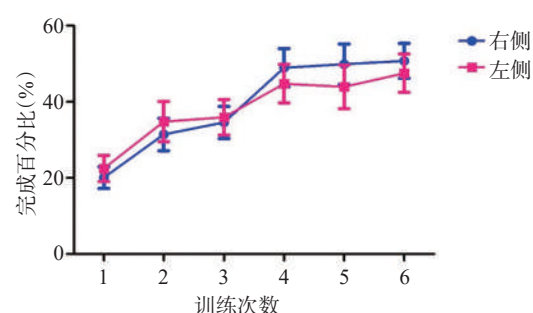


表1 动物分组情况及关键指标比较 ($\bar{x}\pm s$, n=17)

	SD组	KD组
体重(g)	293.29 $\pm$ 4.42	306.88 $\pm$ 3.10
Staircase基线值(%)	57.14 $\pm$ 7.38	60.29 $\pm$ 5.79
实际打击力度(K dynes)	178.59 $\pm$ 8.23	181.76 $\pm$ 9.01

且 P 值接近0.05($P=0.07$),见图3b。

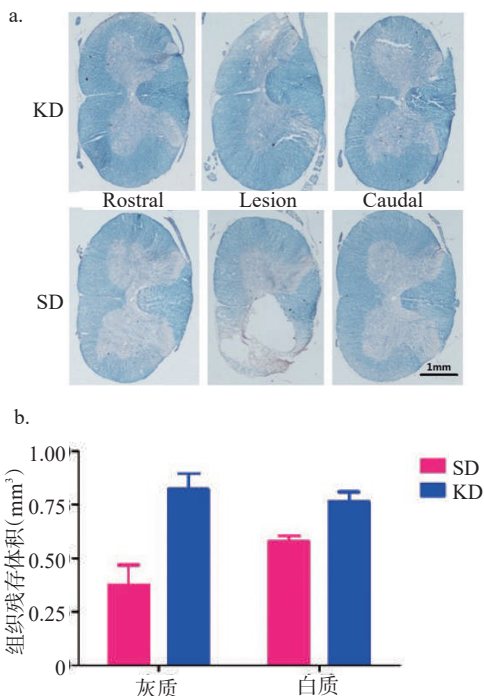
2.5 脊髓冰冻切片EC染色分析

损伤后8周典型的KD组与SD组脊髓冰冻横断切片EC染色表现见图4a。可见在损伤最严重的一个层面上(Lesion),SD组损伤侧脊髓组织几乎完全缺失,呈巨大空洞状;KD组损伤侧脊髓组织亦可见萎缩、灰白质界限不清等损伤表现,但组织残存量多于SD组。损伤头侧和尾侧远端的脊髓组织EC染

色光镜下未见明显异常。

两组灰质/白质残存量统计分析结果见图4b。损伤后8周时KD组残存灰质及白质组织体积均大于SD组($P<0.05$),其中灰质组织体积的组间差异更明显。

图4 KD组与SD组脊髓冰冻横断切片EC染色分析



a. 典型的KD组与SD组脊髓冰冻横断切片EC染色表现;b. 组织残存体积组间比较。Rostral,头端;Lesion,损伤部位;Caudal,尾端。
*与同一时间点SD组数据比较 $P<0.05$

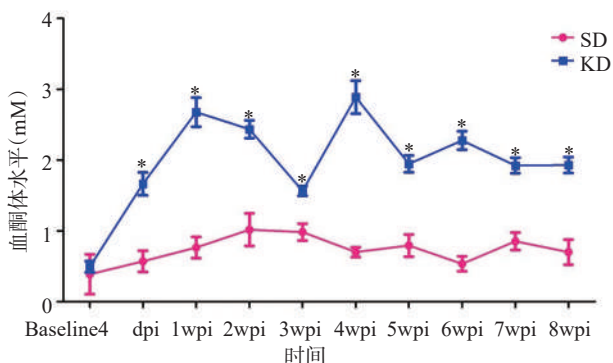
3 讨论

本研究结果表明,生酮饮食能够促进C5半侧脊髓挫伤模型大鼠的前肢功能恢复,其中前肢近端功能在治疗2周时即有改善,前肢远端精细功能在治疗4周时开始出现改善,表明生酮饮食对肢体功能不同方面改善的促进作用具有一定的时程性。且这一促进作用可能是通过保留残存神经组织量的途径实现,对灰质的保护作用比白质更明显。

研究采用的C5单侧脊髓挫伤模型较好地模拟了临床最常见的脊髓损伤类型之一,即不完全性颈脊髓损伤。以往的文献已经充分验证该模型中所有肢体功能表现都与颈脊髓损伤高度相关^[15]。

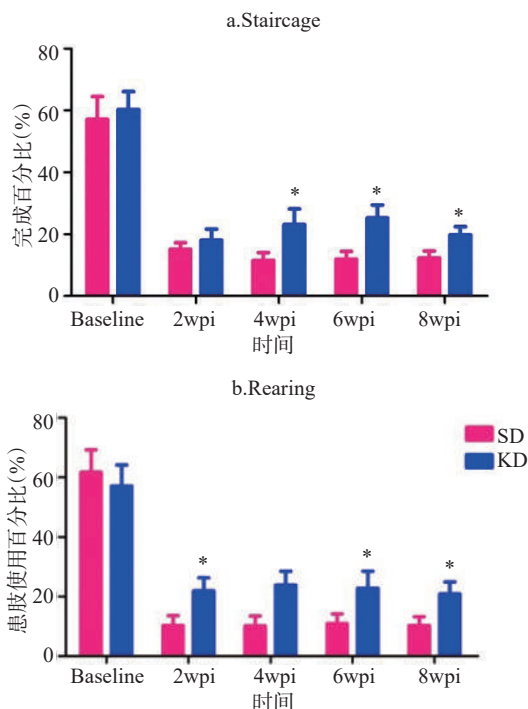
生酮饮食对脊髓损伤后肢体功能恢复具有一定

图2 尾静脉血 β -羟丁酸水平监测情况



Baseline: 基线值; dpi, 伤后天数, day post injury; wpi, 伤后周数, week post injury. *与同一时间点SD组数据比较 $P<0.05$

图3 术后行为学实验评估结果



Baseline: 基线值; wpi, 伤后周数, week post injury. *与同一时间点SD组数据比较 $P<0.05$

的促进作用,这一点与文献报道的结论相似^[9,16-17]。已有研究表明,在啮齿类颈脊髓损伤或胸脊髓损伤动物模型中,无论是给予生酮饮食^[9]、外源性 β -羟丁酸^[19]还是通过隔日禁食法提高内源性酮体水平^[16-17],均可使动物的肢体功能得到不同程度的改善。其中部分研究主要关注动物后肢功能与爬行(步行)能力的评定^[17-18],未对动物前肢功能进行评价;部分研究虽然评价了前肢功能,但观察时间点较少,未能充分反映生酮饮食治疗后肢体功能随时间的动态变化情况^[9],或者仅评价了较粗大的肢体动作,未对精细动作进行评价^[16]。本研究中,在干预时间为2周、4周、6周及8周分别进行动物行为学分析。Staircase实验侧重评价前肢远端精细功能,在术后2周时,生酮饮食尚未表现出明显的治疗效应,从术后4周开始才表现出与SD组的明显差异,说明生酮饮食对前肢远端功能恢复的促进作用可能出现的相对较晚,需要更长时间的持续治疗;Rearing实验侧重评价前肢近端的粗大动作和肌肉力量,在术后2周时即发现KD组动物Rearing实验得分比SD组明显增高,说明开始生酮饮食治疗早期即可达到促进前肢近端功能恢复的作用。与之前的研究报道相比,这一结果同时反映了生酮饮食对颈脊髓损伤大鼠前肢精细运动和粗大运动的影响,还体现了不同干预时间点肢体功能的动态变化。研究结果提示,生酮饮食的早期短期治疗和延迟治疗可能会在不同时间窗内对脊髓损伤后肢体功能的不同方面起到一定的恢复作用。

值得注意的是,本研究在术后干预6周时,Rearing实验未能得到预期的阳性结果,可能的原因分析如下:Rearing实验本身利用的是动物在陌生环境中的应激反应,但是经过术前基线值及术后的反复实验后,部分动物对Rearing实验环境已有所熟悉和适应,因此作出应激性攀爬动作的次数减少,表现为懒动、困倦等,加之行为学测试受到实验当天动物精神状态等多变因素的影响,当多种因素同时在某一次实验中出现时,会导致有效数据量的减少,可能无法真实反映动物的最大功能能力。适当延长观察时间,或发现动物活跃性不佳时给予一定的刺激使其配合实验,可能有助于解决这一问题。

对于生酮饮食对脊髓损伤后神经组织的保护作

用,已有研究的结果尚存争议。部分研究认为,生酮饮食干预可以使动物模型的脊髓损伤后空洞面积缩小,组织保留增加^[9,16]。这与本研究中组织学分析的结果相近。不过这些研究仅观察了脊髓损伤后慢性期空洞面积或损伤最严重部位的脊髓组织厚度,未对整个受累区域的神经组织体积进行评估。也有少数研究未能发现生酮饮食对脊髓损伤动物模型的神经组织结构产生影响,例如采用生酮饮食、胃饥饿素、C16多肽及布洛芬联合用药,发现神经组织横截面积与对照组相比无统计学差异^[3]。不过这一研究报道的局限性在于并未观察单独应用各项干预措施的效果,因此阴性结果可能与各项干预措施同时应用造成的混杂效应有关。在本研究中,典型的KD组与SD组脊髓冰冻横断切片EC染色表现可见在损伤最严重的一个层面上,SD组损伤侧脊髓组织几乎完全缺失,灰质缺失尤为明显,代之以巨大的空洞;而KD组损伤侧脊髓组织虽也有较明显的萎缩、组织减少、灰白质界限不清等损伤表现,但组织残存量明显多于SD组,仅有若干细小空洞散在分布,体现了生酮饮食对损伤部位神经组织的保护作用。此外,我们进一步对受累脊髓节段的组织残存体积进行了分析和计算,能够更好的反映组织保留程度。结果显示,KD组灰质及白质组织残存量均明显高于SD组,以灰质的组织保留优势更为明显,提示生酮饮食干预8周可以增加神经组织残存量,发挥神经保护作用。

生酮饮食神经保护作用的确切机制,目前仍未明确。已有研究阐述了几种可能的机制,包括抗氧化应激(减少氧自由基生成)^[19]、抗炎(抑制促炎因子NF- κ B及炎症因子白介素-6、肿瘤坏死因子- α 等)^[20]、调节神经兴奋性(降低谷氨酸导致的神经毒性作用)^[21]、转变脂质代谢途径(促进酮体生成,提高神经组织线粒体能量代谢效率)^[22]等。不过,上述机制在神经系统变性疾病和部分神经肌肉疾病中的研究较多,在脊髓损伤动物模型中的研究报道相对较少。在未来的研究中,进一步探索生酮饮食对脊髓损伤后神经保护作用的潜在机制,将有助于更加深入地认识生酮饮食的疗效和作用特点,为其临床应用提供支持和依据。

综上,本研究提示生酮饮食能够有效改善脊髓

损伤动物前肢功能,其机制可能与增加神经组织残存量的神经保护机制有关。其中前肢近端功能在治疗2周时即有改善,前肢远端精细功能在治疗4周时开始出现改善,说明生酮饮食对肢体功能不同方面改善的促进作用具有一定的时程性。

4 结论

生酮饮食能够促进C5半侧脊髓挫伤模型大鼠的前肢功能恢复,且这一促进作用可能是通过保留神经组织残存量的途径实现,对灰质的保护作用比白质更明显。其在脊髓损伤后神经保护作用的潜在机制有待进一步探索。

参考文献

- [1] Wyndaele M, Wyndaele JJ. Incidence, prevalence and epidemiology of spinal cord injury: what learns a worldwide literature survey[J]. *Spinal Cord*, 2006, 44: 523—529.
- [2] Qiu J. China spinal cord injury network: changes from within[J]. *Lancet Neurol*, 2009, 8:606—607.
- [3] Streijger F, Lee JH, Duncan GJ, et al. Combinatorial treatment of acute spinal cord injury with ghrelin, ibuprofen, C16, and ketogenic diet does not result in improved histologic or functional outcome[J]. *J Neurosci Res*, 2014, 92(7): 870—883.
- [4] Veyrat-Durebex C, Reynier P, Procaccio V, et al. How can a ketogenic diet improve motor function[J]. *Front Mol Neurosci*, 2018, 11:15.
- [5] Keene DL. A systematic review of the use of the ketogenic diet in childhood epilepsy[J]. *Pediatr Neurol*, 2006, 35(1):1—5.
- [6] Kim DY, Abdelwahab MG, Lee SH, et al. Ketones prevent oxidative impairment of hippocampal synaptic integrity through KATP channels[J]. *PLoS One*, 2015, 10(4):e0119316.
- [7] Deng-Bryant Y, Prins ML, Hovda DA, et al. Ketogenic diet prevents alterations in brain metabolism in young but not adult rats after traumatic brain injury[J]. *J Neurotrauma*, 2011, 28(9):1813—1825.
- [8] Paoli A, Bianco A, Damiani E, et al. Ketogenic diet in neuromuscular and neurodegenerative diseases[J]. *Biomed Res Int*, 2014, 2014:474296.
- [9] Streijger F, Plunet WT, Lee JH, et al. Ketogenic diet improves forelimb motor function after spinal cord injury in rodents[J]. *PLoS One*, 2013, 8(11):e78765.
- [10] Wang X, Wu X, Liu Q, et al. Ketogenic metabolism inhibits histone deacetylase (HDAC) and reduces oxidative stress after spinal cord injury in rats[J]. *Neuroscience*, 2017, 366:36—43.
- [11] Kong G, Huang Z, Ji W, et al. The ketone metabolite β -hydroxybutyrate attenuates oxidative stress in spinal cord injury by suppression of class I histone deacetylases[J]. *J Neurotrauma*, 2017, 34(18): 2645—2655.
- [12] Kloth V, Klein A, Loettrich D, et al. Colour-coded pellets increase the sensitivity of the staircase test to differentiate skilled forelimb performances of control and 6-hydroxydopamine lesioned rats[J]. *Brain Res Bull*, 2006, 70(1):68—80.
- [13] Schallert T, Fleming SM, Leasure JL, et al. CNS plasticity and assessment of forelimb sensorimotor outcome in unilateral rat models of stroke, cortical ablation, parkinsonism and spinal cord injury[J]. *Neuropharmacology*, 2000, 39(5): 777—787.
- [14] Lee JH, Streijger F, Tigchelaar S, et al. A contusive model of unilateral cervical spinal cord injury using the infinite horizon impactor[J]. *J Vis Exp*, 2012, 65(pii):3313.
- [15] Lam CJ, Assinck P, Liu J, et al. Impact depth and the interaction with impact speed affect the severity of contusion spinal cord injury in rats[J]. *J Neurotrauma*, 2014, 31(24): 1985—1997.
- [16] Plunet WT, Streijger F, Lam CK, et al. Dietary restriction started after spinal cord injury improves functional recovery[J]. *Exp Neurol*, 2008, 213(1):28—35.
- [17] Jeong MA, Plunet W, Streijger F, et al. Intermittent fasting improves functional recovery after rat thoracic contusion spinal cord injury[J]. *J Neurotrauma*, 2011, 28(3):479—492.
- [18] Qian J, Zhu W, Lu M, et al. D- β -hydroxybutyrate promotes functional recovery and relieves pain hypersensitivity in mice with spinal cord injury[J]. *Br J Pharmacol*, 2017, 174(13): 1961—1971.
- [19] Islam MT. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction-linked neurodegenerative disorders[J]. *Neurol Res*, 2017, 39(1):73—82.
- [20] Nandivada P, Fell GL, Pan AH, et al. Eucaloric ketogenic diet reduces hypoglycemia and inflammation in mice with endotoxemia[J]. *Lipids*, 2016, 51(6):703—714.
- [21] Suzuki Y, Takahashi H, Fukuda M, et al. Beta-hydroxybutyrate alters GABA-transaminase activity in cultured astrocytes[J]. *Brain Res*, 2009, 1268:17—23.
- [22] Newman JC, Verdin E. Ketone bodies as signaling metabolites[J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2014, 25(1):42—52.