

· 基础研究 ·

步行训练对不完全性脊髓损伤大鼠损伤部位周围组织可塑性的影响

叶超群 孙天胜 蔡艳华 岳峰 秦聪聪

【摘要】目的 探讨步行训练对不完全性脊髓损伤大鼠损伤部位周围组织可塑性的影响。**方法** 将雌性 SD 大鼠 24 只分为步行训练组和对照组,每组 12 只,制作第 10 胸椎段脊髓损伤模型。步行训练组在制作脊髓损伤模型后 1 周开始进行步行训练,共训练 9 周;对照组不接受干预。制作模型后每周利用 BBB 评分评定后肢运动功能,8 周后取材进行免疫荧光染色、Western blotting 和轴突示踪分析。**结果** 后肢运动功能:步行训练组在伤后 4 周(步行训练 3 周)时, BBB 评分较对照组出现明显改善($P < 0.05$),一直持续到实验结束(伤后第 10 周, $P < 0.01$)。损伤部位神经丝(NF)免疫荧光染色分析:对照组胶质瘢痕中可见许多排列比较规则、与脊髓纵轴方向一致的 NF 阳性纤维穿行,步行训练组除了可见少量 NF 阳性纤维在胶质瘢痕中穿越,还可见较多的 NF 阳性纤维围绕空洞边缘延伸,其 NF 阳性纤维数量明显高于对照组($P < 0.05$)。损伤部位生长相关蛋白-43(GAP-43)表达:2 组损伤部位周围均可见呈红色的排列凌乱的 GAP-43 表达,步行训练组 GAP-43⁺组织免疫荧光灰度值较对照组高($P < 0.05$)。皮质脊髓束再生:2 组损伤部位尾侧均未见生物素化葡聚糖胺(BDA)标记的纤维。**结论** 步行训练能明显增强脊髓损伤大鼠后肢损伤部位组织的可塑性,促进大鼠后肢运动功能恢复,但未能促进皮质脊髓束的再生。

【关键词】 不完全性脊髓损伤; 步行训练; 可塑性

Spinal cord plasticity and the effect of step training on functional recovery after incomplete spinal cord injury

YE Chao-qun*, SUN Tian-sheng, CAI Yan-hua, YUE Feng, QIN Cong-cong. *Orthopaedic Department, The Beijing Army General Hospital, Beijing 100700, China

Corresponding author: SUN Tian-sheng, Email: suntiansheng@163.com

【Abstract】 Objective To explore neural plasticity around an injured region of the spinal cord and the effects of step training on functional recovery after incomplete spinal cord injury (SCI). **Methods** Adult female Sprague-Dawley rats ($n = 24$) were induced with spinal cord contusion at T₁₀ and divided into a step training group and a control group (12 rats in each). Training started from the 7th day post-injury and lasted for (20 ± 10) min per day, 5 days per week, for 9 weeks. Treadmill speeds were 3 m/min at the beginning, and adjusted daily according to each rat's tolerance up to 11 m/min or more. The functional recovery was measured weekly with the open-field locomotor rating scale of Basso, Beattie and Bresnahan (BBB score). The expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP), neurofilament protein (NF) and growth-associated protein-43 (GAP-43) in the spinal cord around the injured region were detected. **Results** After 70 days of step training, the average BBB score of the step training group reached (12.86 ± 0.94), significantly higher than that of the control group (10.71 ± 0.95). The expression of NF and GAP-43 around the injured region increased significantly more in the step training group than among the controls. **Conclusions** Step training can promote functional recovery and neural plasticity in rats after incomplete SCI.

【Key words】 Incomplete spinal cord injury; Step training; Plasticity

研究发现,不同形式的步行训练均具有一定程度的改善脊髓损伤患者的步行能力,其机制与促进脊髓

的任务依赖性可塑性有关^[1-3]。在不完全性脊髓损伤患者中,任务依赖性可塑性主要表现为脊髓神经元回路的广泛重组^[4]。基础研究证实,脊髓损伤部位上端轴突的芽生、损伤部位下端腰骶部中枢模式发生器(control pattern generator, CPG)的激活均参与脊髓神经元回路的重组^[5-6]。国内外很少有人关注损伤部位残存神经以何种方式参与脊髓神经元回路的重组。本研究对此进行探索,为进一步地研究以及丰富脊髓可塑性理论提供参考。

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2010.09.002

基金项目:北京市教委科技计划面上项目(200710029003)和国家自然科学基金项目(30872604)联合资助

作者单位:100700 北京,北京军区总医院骨科(叶超群、孙天胜、蔡艳华、秦聪聪);首都体育学院研究生部(岳峰)

通信作者:孙天胜, Email: suntiansheng@163.com

材料与方法

一、实验材料

(75 ± 1) d SPF 二级雌性 SD 大鼠 24 只(微通利华实验动物中心提供);打击器(Impactor II, 美国新泽西大学神经科学合作中心提供);大鼠活动平板(杭州段氏医疗仪器公司);恒温冷冻切片机;立体定位仪;微量显微注射器;环孢霉素注射液;共聚焦显微镜;荧光显微镜;一抗包括:兔源抗胶质源酸性纤维蛋白(glia fibrillary acidic protein, GFAP)多抗(Z0334, Dako), 小鼠来源的抗神经丝(neurofilament, NF)单抗(N0142, Sigma), 小鼠来源的抗生长相关蛋白-43(growth associated protein-43, GAP-43)多抗(北京博菲康生物技术公司);二抗为:羊抗大鼠 Alexa 荧光 633(Alexa Fluor 633 goat-anti-rabbit), 羊抗小鼠 Alexa 荧光 488(Alexa Fluor 488 goat-anti-mouse)和羊抗大鼠 Alexa 荧光 488(Alexa Fluor 488 goat-anti-rat), 二抗均为分子探针公司(Molecular)产品。

二、动物分组

24 只大鼠分为步行训练组和对照组, 每组 12 只。

三、动物模型制作

依据 Young^[7]的方法, 利用 Impactor II 打击器制作脊髓损伤模型: 0.4% 戊巴比妥钠[(35 ± 5) mg/kg 体重]腹腔注射麻醉, 以 T₁₀ 棘突为中心常规备皮、消毒、铺巾, 以 T₁₀ 棘突为中点作长约 1 cm 的纵行切口, 逐层切开皮肤、筋膜, 钝性分离椎旁软组织, 暴露 T_{8~10} 棘突和椎板, 游离 T₁₀ 椎板上、下缘, 咬去 T₁₀ 椎板和 T₉ 椎板的下半部分, 暴露硬膜, 固定 T₈ 和 T₁₁ 棘突并使大鼠悬空, 接通打击器电路, 调节打击高度为 25 mm 打击, 大鼠立即出现一过性鼠尾摆动和后肢痉挛; 逐层缝合肌肉、筋膜和皮肤; 术后 1 周内每日给予青霉素 20 万单位肌注 2 次, 1 个月内每日排尿 1 次, 常规饲养。

四、步行训练

步行训练组利用大鼠活动平板进行步行训练, 每周 5 d, 每天 1 次, 每次 15 ~ 30 min(刚开始为 15 min, 逐步过渡到 30 min), 开始时步速为 3 m/min, 以后根据大鼠步行情况逐渐增加, 共训练 9 周。对照组不进行步行训练。

五、后肢运动功能评定

BBB 评分^[8], 伤后每周 1 次, 双盲法评定, 每只大鼠按要求观察 4 min。

六、损伤部位 NF、GAP-43 免疫荧光染色

步行训练 9 周后取材。标本制作步骤: 4% 多聚甲醛心脏灌注固定, 取以损伤部位为中心长 15 mm 的脊髓, 恒冷箱冰冻切片机上行冠状切片, 片厚 20 μm, 每隔 8 张取 1 张, 直接贴在预先用 0.1% 明胶处理过的

载玻片上(每张载玻片贴 6 张切片), 每只大鼠共取 8 套切片, -80℃ 保存, 1 个月内分别完成 GFAP/NF(每组每只均取第 3 套切片)、GAP-43(每组每只均取第 4 套切片)免疫荧光化学染色。免疫荧光方法: 从 -80℃ 冰箱内取出切片复温后 0.01 mol/L PBS 漂洗 10 min × 3 次, 含 10% 山羊血清的 0.1% PBST 常温封闭 2 h, 加入相应滴度的一抗(GFAP/NF 免疫荧光双染, 滴度分别为: GFAP 1:400, NF 1:800, GAP-43 1:200), 4℃ 湿盒过夜, 0.01 mol/L PBS 漂洗 10 min × 3 次, 相应荧光二抗(1:400)常温孵育 2 h, 漂洗、晾干后封片。

NF 阳性纤维计数方法为: 共聚焦显微镜下(400 倍), 计数每只大鼠第 3 套切片跨过损伤部位中心的脊髓纵轴垂直线的 NF 阳性纤维, 每组计数 7 只大鼠, 每只大鼠计数一套切片(6 张, 取平均值)。GAP-43 免疫荧光灰度值利用奥林巴斯 Image-Pro Plus 6.0 图像分析软件测定, 测定部位同 NF 阳性纤维计数, 步行训练组和对照组分别以测得的实际值除以正常同质大鼠相同部位的免疫灰度值统计。

七、轴突示踪

造模后 8 周每组取 4 只大鼠, 麻醉、固定后在脑立体定位仪引导下利用 Hamilton 微量注射器将 10% 的生物素化葡聚糖胺(biotinylated dextran amine, BDA)注射到运动皮质后肢代表区: 前囟后 1 和 2 mm, 矢状缝旁 2 和 2.5 mm, 深度为硬脊膜下 1.8 ~ 1.9 mm; 每侧注射 4 点, 每点注射 1 μl, 速度为 0.01 μl/min, 注射完毕后微玻管停留在原位 5 min, 随后缓慢拔出。缝合皮肤。2 周后 4% 多聚甲醛心脏灌注取材(包括全脑和脊髓)、切片(含有 BDA 注射部位的脑组织块, 恒冷冰箱连续冠状面切片, 包含损伤部位和细胞移植部位的脊髓纵切片, 其头侧和尾侧横切片, 片厚 40 μm), -80℃ 冰箱保存, 1 个月内完成显微荧光照相, 观察是否有 BDA 标记的纤维跨过损伤部位。

八、统计学分析

采用 SPSS 13.0 版软件, 各时间点组间 BBB 评分的比较采用单因素方差分析, NF 阳性纤维和 GAP-43 免疫荧光灰度值的组间对比采用独立样本 *t* 检验; *P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

结 果

步行训练组和对照组各有 1 只大鼠分别因循环衰竭和自噬剔除, 其余大鼠存活状态良好, 最终每组 7 只大鼠纳入统计进行 BBB 评分、NF 阳性纤维计数和 GAP-43 免疫荧光灰度对比分析; 2 组各有 4 只纳入轴突示踪分析。

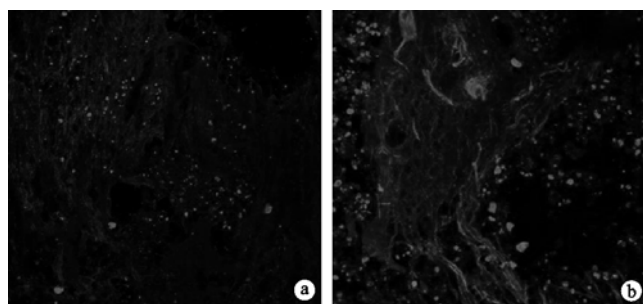
一、2 组大鼠后肢运动功能比较

对照组大鼠后肢功能在伤后 1 周即可出现细微恢

复征象,在 2~4 周恢复最明显,4~6 周达稳定状态(平台期),以后恢复幅度较小。步行训练组恢复趋势与对照组相似,但恢复幅度较对照组大,在伤后 4 周(步行训练 3 周)时,BBB 评分较对照组明显改善($P < 0.05$),一直持续到实验结束(伤后第 10 周, $P < 0.01$)。见表 1。

二、2 组大鼠损伤部位神经丝表达情况比较

2 组大鼠损伤部位空洞边缘均可见显色为蓝色的 GFAP⁺组织。对照组胶质瘢痕中可见许多排列比较规则、与脊髓纵轴一致的呈红色的 NF 阳性纤维穿行;步行训练组除了可见少量 NF 阳性纤维在胶质瘢痕中穿越外,还可见较多的 NF 阳性纤维围绕空洞边缘延伸,其 NF 阳性纤维数量较对照组明显增加($P < 0.05$),见图 1、表 2。



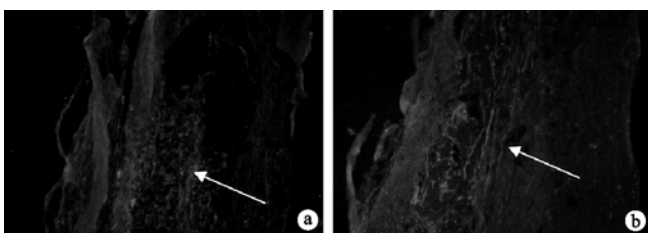
对照组

步行训练组

图 1 脊髓损伤部位 GFAP/NF 免疫荧光染色(GFAP/NF 免疫荧光双染,共聚焦显微镜)

三、2 组大鼠损伤部位 GAP-43 表达情况比较

2 组大鼠损伤部位周围均可见呈红色的排列凌乱的 GAP-43 表达,步行训练组 GAP-43⁺组织免疫荧光灰度值较对照组高($P < 0.05$),见图 2、表 2。



对照组

步行训练组

图 2 脊髓损伤部位 GAP-43 免疫荧光染色(荧光显微镜照相)

四、2 组大鼠皮质脊髓束再生情况

2 组大鼠损伤部位侧均未见 BDA 标记的纤维。

讨 论

步行训练是脊髓损伤患者常规康复训练方法之一,可通过促进脊髓可塑性来改善患者的步行功能。一般认为,步行训练主要促进脊髓的训练依赖性可塑性,但本研究结果显示,9 周的步行训练可增强脊髓损伤部位周围组织的 NF 和 GAP-43 表达,说明步行训练可增强脊髓的自发性可塑性,有利于动物后肢运动功能恢复。

NF 是神经原细胞骨架的主要组成成分,常用来反映中枢神经系统损伤后轴突再生和修复情况。GAP-43 是脊椎动物神经细胞膜上的一种特异磷蛋白,主要在发育过程和神经再生中有高表达,是生长锥导向信号转导的关键^[9],常用作中枢神经系统损伤后再生轴突生长和突触重塑的标志^[10]。本研究通过观察步行训练后脊髓损伤部位 NF 和 GAP-43 表达变化和轴突示踪分析发现,步行训练未能促进皮质脊髓束的再生,但能使损伤部位周围 NF 轴突数量和 GAP-43 表达增加,说明步行训练能促进损伤部位周围组织内轴突芽生和突触可塑性。

本研究结果还显示,10 周的步行训练使不完全性脊髓损伤大鼠后肢运动功能较对照组出现一定程度的提高,显示了步行训练改善脊髓损伤大鼠神经功能的有效性,这与大多数研究结果一致。然而, Kubasak 等^[11]和 Ramon-Cueto 等^[12]发现,单独的步行训练未能改善 T₁₀全横断模型大鼠的后肢运动功能,只有在结合嗅鞘细胞移植时才能使动物后肢运动功能出现明显改善。对此,我们认为可能主要与脊髓损伤模型和干预时间的不同有关。对不完全性脊髓损伤模型动物,步行训练可提高损伤部位周围组织的自发性可塑性,不仅有助于动物后肢运动功能恢复,而且为促进脊髓神经元回路的广泛重组(训练依赖性可塑性)提供了解剖基础,可进一步促进动物功能改善;在全横断模型,步行训练仅依赖损伤部位下 CPG 的重新激活(训练依赖性可塑性)来改善动物后肢运动功能,而结合细胞移植则不仅能重新激活 CPG 增强脊髓训练依赖性可

表 1 2 组大鼠后肢运动功能评分比较(分, $\bar{x} \pm s$)

组 别	只数	1 周	2 周	3 周	4 周	5 周
步行训练组	7	2.07 ± 0.98	4.07 ± 0.53	7.50 ± 0.41	10.00 ± 0.91 ^a	11.64 ± 0.94 ^b
对照组	7	2.21 ± 0.86	4.21 ± 1.52	6.93 ± 0.84	9.14 ± 0.48	9.57 ± 0.35
组 别	只数	6 周	7 周	8 周	9 周	10 周
步行训练组	7	12.57 ± 0.83 ^b	12.79 ± 0.86 ^b	12.64 ± 0.99 ^b	12.71 ± 1.04 ^b	12.86 ± 0.95 ^b
对照组	7	10.36 ± 0.38	10.50 ± 0.41	10.64 ± 0.63	10.64 ± 0.63	10.71 ± 0.95

注:与对照组同时时间点比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$

表 2 2 组大鼠脊髓损伤部位 NF 阳性纤维计数和 GAP-43 灰度值比较($\bar{x} \pm s$)

组 别	只数	神经纤维计数 (根/切片)	GAP-43 灰度值
步行训练组	7	23.62 ± 1.72 ^a	1.52 ± 0.15 ^a
对照组	7	20.23 ± 2.46	1.27 ± 0.58

注:与对照组同指标比较,^a $P < 0.05$

塑性,而且能通过细胞移植促进轴突再生增强脊髓的自发性可塑性,从而进一步促进大鼠后肢功能恢复。同时,干预时间也可能是导致结果差异的原因之一。我们在大鼠伤后 1 周开始步行训练,而 Kubasak 等^[11]和 Ramon-Cueto 等^[12]是在伤后 4 周开始步行训练,此时大鼠脊髓损伤已进入慢性期,瘢痕的形成、运动神经元的退变可能使脊髓的可塑性降低。虽然步行训练改善脊髓可塑性的机制已得到普遍认可,但步行训练如何增强脊髓可塑性的机制并不清楚,目前普遍关注的是“神经营养因子介导机制”^[13]和“神经递质介导的机制”^[14],对此的深入研究将有助于开发新的康复策略,进一步的研究正在进行之中。

参 考 文 献

- [1] Edgerton VR, Roy RR. Robotic training and spinal cord plasticity. Brain Res Bull, 2009,78:4-12.
- [2] Ditunno J, Scivoletto G. Clinical relevance of gait research applied to clinical trials in spinal cord injury. Brain Res Bull, 2009,78:35-42.
- [3] Dobkin B, Apple D, Barbeau H, et al. Weight-supported treadmill vs over-ground training for walking after acute incomplete SCI. Neurology, 2006,66:484-493.
- [4] Grasso R, Vanenko YP, Zago M, et al. Distributed plasticity of locomotor pattern generators in spinal cord injured patients. Brain, 2004, 127:1019-1034.
- [5] Goldshmit Y, Lythgo N, Galea MP, et al. Treadmill training after spinal cord hemisection in mice promotes axonal sprouting and synapse formation and improves motor recovery. J Neurotrauma, 2008,25:449-465.
- [6] Barriere G, Leblond H, Provencher J, et al. Prominent role of the spinal central pattern generator in the recovery of locomotion after partial spinal cord injuries. J Neurosci, 2008,28:3976-3987.
- [7] Young W. Spinal cord contusion models. Prog Brain Res, 2002, 137: 231-255.
- [8] Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. J Neurotrauma, 1995, 12:1-21.
- [9] Schwab ME. Structural plasticity of the adult CNS. Negative control by neurite growth inhibitory signals. Int J Dev Neurosci, 1996, 14:379-385.
- [10] Kawasaki T, Nishio T, Kawaguchi S, et al. Spatiotemporal distribution of GAP-43 in the developing rat spinal cord: a histological and quantitative immunofluorescence study. Neurosci Res, 2001,39:347-358.
- [11] Kubasak MD, Jindrich DL, Zhong H, et al. OEG implantation and step training enhance hindlimb-stepping ability in adult spinal transected rats. Brain, 2008,131:264-276.
- [12] Ramon-Cueto A, Cordero MI, Santos-Benito FF, et al. Functional recovery of paraplegic rats and motor axon regeneration in their spinal cords by olfactory ensheathing glia. Neuron, 2000,25:425-435.
- [13] Kempermann G, van Praag H, Gage FH. Activity-dependent regulation of neuronal plasticity and self repair. Prog Brain Res, 2000,127: 35-48.
- [14] Cotman CW, Berchtold NC. Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. Trends Neurosci, 2002, 25:295-301.

(修回日期:2010-05-24)

(本文编辑:松 明)

· 国际动态 ·

美国 FDA 正式批准保妥适 (BOTOX) 用于治疗成人肢体痉挛

2010 年 3 月 9 日美国食品和药物管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 正式批准 Allergan 公司生产的保妥适 (一种 A 型肉毒毒素, 英文通用名为: onabotulinumtoxin A) 用于治疗成人肘部、腕部和手指屈肌群的痉挛。

肌痉挛通常发生于中枢神经系统 (脑和脊髓) 损伤以后, 估计大约有 1/3 的脑卒中患者、60% 的重度多发性硬化 (MS) 患者以及 75% 的重度创伤性脑损伤后身体残疾的患者会发生需要治疗的肌痉挛。其中大约有 1/3 的患者可能需要用肉毒毒素治疗。

FDA 药物评价与研究中心神经系统产品部主任 Russell Katz 指出:“痉挛使肌肉僵硬、紧张, 继而导致疼痛, 影响患者日常的清洁卫生和活动, 并且还会影响患者的外貌。在临床试验中, 已证实保妥适可对上肢肌痉挛患者产生有益的治疗作用。”

目前保妥适已在 59 个国家被批准用于治疗成人肢体痉挛, 包括欧盟各国、加拿大、澳大利亚等。

保妥适的作用机理是: 暂时阻断神经肌肉连接, 导致痉挛肌肉的暂时性麻痹, 从而产生疗效。为了最大限度地帮助患者改善功能, 保妥适需与适宜的康复治疗联合应用。

需要警示的是: 局部注射保妥适所产生的效应有可能从注射部位扩散到身体的其它区域, 导致类似于肉毒杆菌毒素中毒的症状发生, 包括吞咽和呼吸困难, 而这些症状有可能是致命的。肌痉挛患者使用保妥适后最常报告的不良反应包括恶心、疲劳、支气管炎、肌肉无力和上臂疼痛等。