

doi:10.3969/j.issn.1003-6350.2014.11.0608
doi:10.3969/j.issn.1003-6350.2014.11.0608

•论著•

运动训练对脊髓损伤大鼠脊髓内神经生长因子及其受体 TrkA 表达的影响

贺晓玉¹, 周嘉嘉², 邓京捷¹, 黄霖²

(1. 广东省体育科学研究所, 广东 广州 510663;

2. 中山大学孙逸仙纪念医院, 广东 广州 510120)

【摘要】目的 研究运动训练对脊髓损伤(SCI)大鼠脊髓内神经生长因子(NGF)及其酪氨酸激酶受体 A(TrkA)表达的影响。**方法** 成年雌性 SD 大鼠 24 只分为假手术组($n=6$)、损伤对照组($n=9$)和运动训练组($n=9$)。采用通用型脊髓打击器建立大鼠 T₁₀ 脊髓损伤模型。损伤后 7 d 起, 对 SCI 大鼠进行 4 周运动训练, 假手术组和损伤对照组不进行运动训练。损伤前及损伤后第 1、2、3、4、5 周采用 BBB 评分评定大鼠运动功能, 训练结束后取 T₁₂~L₁ 节段脊髓组织行病理切片, 免疫组织化学法检测脊髓内 NGF 和 TrkA 蛋白表达及分布, Western blot 检测脊髓内 NGF 和 TrkA 蛋白含量。**结果** 损伤后第 3 周(即运动训练两周)起, 运动训练组 BBB 评分高于损伤对照组($P<0.05$)。NGF 免疫反应阳性产物多分布于脊髓前角, 运动训练组 NGF 阳性染色颗粒增多, 平均光密度值较假手术组及损伤对照组增加($P<0.05$)。TrkA 免疫反应阳性产物于脊髓前角、后角、中央管周围处出现分布; 运动训练组 TrkA 阳性染色颗粒增多, 平均光密度值较假手术组及损伤对照组增加($P<0.05$)。Western blot 结果显示运动训练组大鼠脊髓内 NGF 及 TrkA 表达较假手术组、损伤对照组增加($P<0.05$)。**结论** 运动训练可诱导 SCI 大鼠脊髓内 NGF 及其受体 TrkA 表达, 促进 SCI 大鼠运动功能恢复。

【关键词】 运动训练; 脊髓损伤; 神经生长因子; 酪氨酸激酶受体 A

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003—6350(2014)11—1563—04

Effects of exercise training on the expressions of nerve growth factor and tyrosine kinase receptor A in spinal cord of rats with spinal cord injury. HE Xiao-yu¹, ZHOU Jia-jia², DENG Jing-jie¹, HUANG Lin². 1. Guangdong Provincial Institute of Sports Science, Guangzhou 510663, Guangdong, CHINA; 2. Sun Yat-Sen Memorial Hospital Affiliated to Zhongshan University, Guangzhou 510120, Guangdong, CHINA

【Abstract】 Objective To study the effect of exercise training on the expressions of nerve growth factor (NGF) and tyrosine kinase receptor A (TrkA) in spinal cord of rats with spinal cord injury (SCI). **Methods** Twenty-four adult female SD rats were divided into three groups, exercise group (SCI-induction and exercises group, $n=9$), control group (SCI-induction without exercises group, $n=9$) and sham-operation group (no operation, without SCI and exercises, $n=6$). Rats with T10 spinal cord injury were produced by the universal spinal cord impact system. Exercise training began from day 7 after injury and lasted for 4 weeks. The hindlimb function was assessed by Basso-Beattie-Bresnahan (BBB) scale before injury and 1, 2, 3, 4 and 5 weeks post injury. The expressions of NGF and TrkA were detected by immunohistochemistry and Western blot. **Results** Since the 3rd week after injury (after 2 weeks of

基金项目: 广东省科技计划项目(编号: 2010B060500021)

通讯作者: 贺晓玉。E-mail: gzhxy2010@126.com

更高的凝集性, 当采集 2.7 ml 大鼠血时易发生凝血。我们比较研究了最终抗凝剂含量分别为 10%、15%、20%、30% 时所采血样的凝血状况。结果发现抗凝剂为 15% 时, 即采集 1.7 ml 的大鼠动脉血于内含 0.3 ml、0.109 M 的枸橼酸钠抗凝剂的真空采血管中时, 抗凝效果最好, 且不发生溶血现象, 所测各项指标变异较小。

参考文献

[1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草[S]. 7 卷. 上海:

上海科学技术出版社, 1999: 6074-6075.

- [2] 梁重栋. 藏药独一味的基础与临床研究[J]. 兰州医学院学报, 1987, 40(2): 47-49.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[S]. 北京: 化学工业出版社, 2000: 533-534.
- [4] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 184-186, 1270-1275.
- [5] 杜冠华, 李学军, 张永祥. 药理学实验指南 - 新药发现和药理学评价[M]. 北京: 科学出版社, 2004: 219-220.

(收稿日期: 2013-11-28)

exercise training), BBB scores of exercise group were significantly higher than control group ($P<0.05$). Immunohistochemistry result showed that positive immunologic reaction to NGF protein was mainly located in anterior horn of spinal cord and the expression level in exercise group was significantly higher than that in control group ($P<0.05$). Positive immunologic reaction to TrkA protein was located in anterior horn and dorsal horn and central canal of spinal cord and the expression level in exercise group was significantly higher than that in control group ($P<0.05$). Western blot result showed that expression of NGF and TrkA in exercise group significantly increased, compared with control group ($P<0.05$). **Conclusion** Exercise training might effectively induce the expression of NGF and TrkA in spinal cords and promote the recovery of hindlimb function of SCI rats.

【Key words】 Exercise training; Spinal cord injury; Nerve growth factor; Tyrosine kinase receptor A

脊髓损伤(Spinal cord injury, SCI)是脊柱损伤最严重的并发症,可导致损伤节段以下严重的运动、感觉及自主功能障碍,给患者带来严重的身心伤害,也给社会造成巨大的经济负担。针对SCI的早期治疗与临床康复已成为当今医学领域的一大课题。运动训练作为康复治疗的重要手段,广泛用于SCI患者的临床康复,其疗效也被大量研究所证实^[1-2]。运动训练促进SCI修复的神经生物学机制仍不十分清楚。神经生长因子(Nerve growth factor, NGF)是一种具有神经元营养及促进突起生长双重生物学功能的多肽因子,对中枢及周围神经元的发育、分化、生长、再生和功能特性的表达均起着重要作用^[3-4]。本研究在前期建立胸段脊髓打击损伤大鼠模型基础上,通过观察运动训练对SCI大鼠脊髓内NGF及其酪氨酸激酶受体A(Tyrosine kinase receptor A, TrkA)表达的影响,探讨运动训练促进SCI修复的可能机制,为脊髓损伤的康复治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组 健康成年雌性SD大鼠24只,体重(225 ± 25)g,购自南方医科大学动物中心。将其随机分为假手术组($n=6$)、损伤对照组(损伤后不训练, $n=9$)和运动训练组(术后1周开始训练,共4周, $n=9$)。

1.2 大鼠SCI模型制备 10%水合氯醛腹腔注射麻醉大鼠后,切除T₁₀椎板,暴露脊髓。采用通用型脊髓打击器(由中山大学脊髓损伤研究所提供)制备脊髓损伤模型^[5-6]。围手术期肌注青霉素20万IU/kg预防感染,连续3d;并定时进行膀胱按摩,协助排便。

1.3 运动训练 损伤一周后开始运动训练,每天两次,每次10 min,每周连续训练5 d,共训练4周。减重平板训练采用专用跑步机及减重装置。跑台速度为0.8 km/h。减重量为体重的20%~40%(随时间延长逐渐降低减重程度,第1周减重40%,第2周35%,第3周30%,第4周20%)。对照组置于笼内不进行任何康复运动训练。

1.4 运动功能评定 应用脊髓运动功能行为学评分BBB法观察SCI大鼠后肢功能恢复情况^[5-7]。完

全截瘫为0分,正常为21分。得分越高,表明运动功能越好。损伤前及损伤后1、2、3、4、5周分别由两名熟悉BBB评分标准的研究人员进行盲法评分。

1.5 脊髓标本取材 运动训练结束后(即损伤后5周),10%水合氯醛腹腔内注射麻醉,4%多聚甲醛磷酸缓冲液灌注固定后,取大鼠T₁₂~L₁节段脊髓,经固定、脱水、透明及石蜡包埋。假手术组和损伤对照组均在术后5周取材。

1.6 免疫组织化学检测 标本经固定后制成5 μm厚的石蜡切片,按PV-9000试剂盒(美国GBI公司)说明进行免疫组织化学二步法染色。光学显微镜下观察切片中组织染色、NGF及TrkA蛋白的表达分布情况。

1.7 Western blot检测 取脊髓组织充分研磨后抽提总蛋白,BCA法蛋白定量后,将30 μg蛋白样本经10%SDS-PAGE电泳分离,再转印至PVDF膜上。用含5%脱脂奶粉的TBST封闭2 h,加入NGF和TrkA一抗4℃孵育过夜,洗膜,再用辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育1 h。ECL化学发光系统检测蛋白信号。

1.8 统计学方法 采用SPSS16.0统计软件对数据进行统计学分析,采用单因素方差分析法(ANOVA)对组间差异进行统计, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

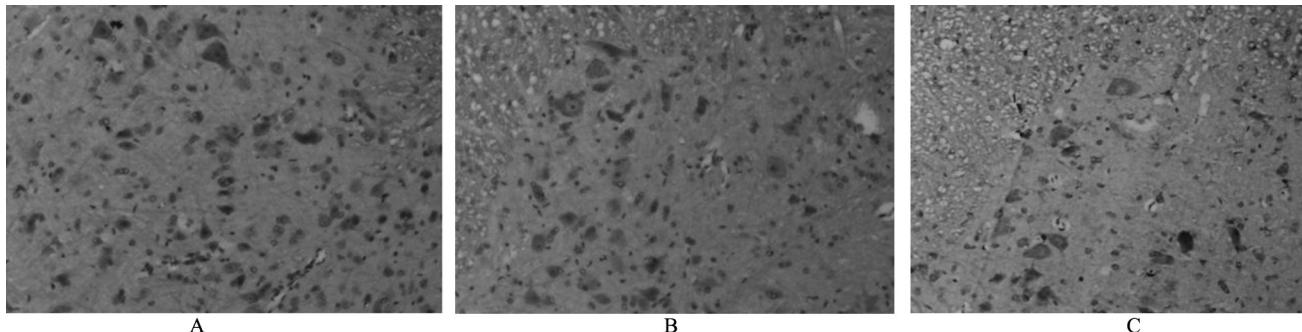
2.1 运动功能检测结果 运动训练组和损伤对照组的BBB评分自损伤后第2周开始升高,损伤后第3~5周时仍呈增加趋势,运动训练组较损伤对照组增加更明显,但两组BBB评分均低于假手术组,差异有统计学意义($P<0.05$)。自损伤后第3周(即运动训练两周)起,运动训练组BBB评分高于损伤对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),见表1。

2.2 NGF免疫组化检测结果 NGF免疫反应阳性产物多分布于脊髓前角的神经元内,脊髓后角及中央管周围也有出现。运动训练组NGF阳性染色颗粒明显增多(见图1),其平均光密度值较假手术组及损伤对照组增加,差异有统计学意义($P<0.05$),见图2。

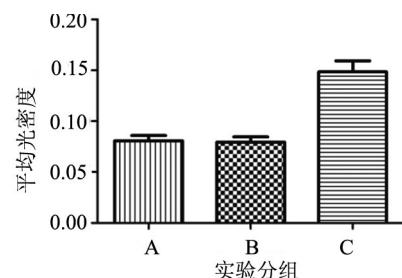
表1 SCI后不同时间点各组大鼠BBB评分变化($\bar{x}\pm s$)

组别	损伤前	损伤后1周	损伤后2周	损伤后3周	损伤后4周	损伤后5周
假手术组	21.00±0.00	21.00±0.00	21.00±0.00	21.00±0.00	21.00±0.00	21.00±0.00
损伤对照组	21.00±0.00	3.43±1.19 ^a	9.13±1.36 ^a	10.42±1.68 ^a	11.72±1.79 ^a	13.28±1.86 ^a
运动训练组	21.00±0.00	3.45±1.37 ^a	11.51±1.64 ^a	14.15±1.75 ^{ab}	16.05±1.98 ^{ab}	17.46±2.13 ^{ab}
F值	—	494.000	131.045	70.459	48.862	30.480
P值(a/b)	-/-	0.000/0.806	0.000/0.092	0.001/0.007	0.006/0.003	0.018/0.009

注:^a与假手术组比较, $P<0.05$; ^b与对照组比较, $P<0.05$ 。

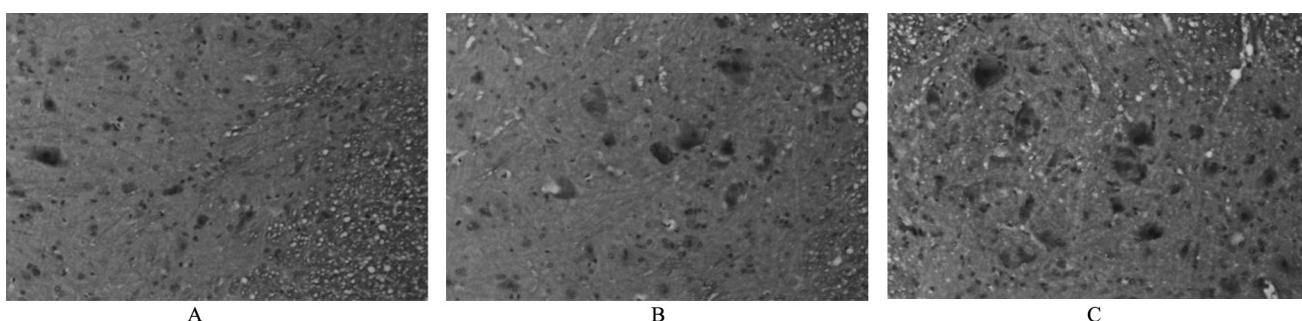
图1 免疫组化检测各组大鼠脊髓内NGF的表达(免疫组化染色, $\times 200$)

注:A,假手术组;B,损伤对照组;C,运动训练组。

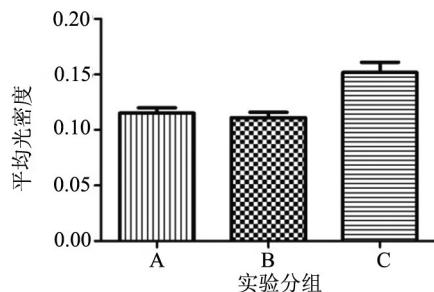
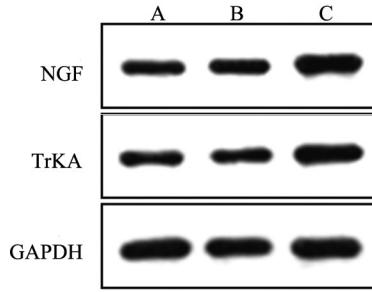
图2 免疫组化检测各组大鼠脊髓内NGF表达的平均光密度
注:A,假手术组;B,损伤对照组;C,运动训练组。

2.3 TrkA 免疫组化检测结果 TrkA 免疫反应阳性产物于脊髓前角、后角、中央管周围处均出现较多分布。运动训练组 TrkA 阳性染色颗粒增多见图3,其平均光密度值较假手术组及损伤对照组增加,差异有统计学意义($P<0.05$),见图4。

2.4 Western blot 检测结果 运动训练组大鼠脊髓内 NGF 和 TrkA 的表达比假手术组及损伤对照组明显增加,差异有统计学意义($P<0.05$),见图5。

图3 免疫组化检测各组大鼠脊髓内TrkA的表达(免疫组化染色, $\times 200$)

注:A,假手术组;B,损伤对照组;C,运动训练组。

图4 免疫组化检测各组大鼠脊髓内TrkA表达的平均光密度
注:A,假手术组;B,损伤对照组;C,运动训练组。图5 Western blot 检测各组大鼠脊髓内NGF和TrkA蛋白表达
注:A,假手术组;B,损伤对照组;C,运动训练组。

3 讨 论

临床研究表明,恰当的康复运动训练能够促进SCI患者肢体运动和感觉功能的恢复^[1-2],但其神经生物学分子基础尚不十分清楚。本研究通过建立SCI大鼠模型,观察运动训练对SCI大鼠肢体运动功能的影响。BBB评分是SCI实验研究中评价脊髓功能的一项重要指标,广泛应用于SCI大鼠后肢运动功能的评估。本实验结果显示,SCI后第1周各组BBB评分均在4分以下,随着时间的推移BBB评分逐渐增高,在SCI后前2周,对照组、运动训练组BBB评分并无显著差异,这与其他学者的研究结果相一致^[7]。在SCI后第3~5周时运动训练组BBB评分显著高于对照组,提示运动训练可促进SCI大鼠运动功能恢复。

NGF是神经系统内一类可促进和维持神经元生长、分化并影响突触可塑性的重要生物活性物质。大量研究已证实,NGF在形态、结构和功能等多方面影响神经元的分化^[8-9],NGF不仅刺激神经元胞体增大、诱导突起生长并促进树突发育,调控着神经分化相关功能蛋白的表达与修饰;而且NGF还能够促进受损中枢神经纤维生长新的轴突,与原来的靶细胞建立新的突触联系^[8-9]。体外培养PC12细胞发现,加入NGF1~2 d后PC12细胞可延伸出较短的神经突起^[10]。本研究发现,运动训练组SCI大鼠脊髓内NGF表达较对照组明显增加,表明运动训练可促进大鼠脊髓内NGF表达。提示运动训练可能通过增加脊髓内NGF表达来促进受损神经纤维的轴突再生,从而促进SCI大鼠运动功能恢复。

目前认为,NGF所具备的促使成熟神经元重塑的能力,有赖于NGF与其受体TrkA的结合^[3]。NGF受体分为高亲和力受体TrkA和低亲和力受体P75NTR,其中TrkA被认为是NGF主要的功能受体。NGF与TrkA结合后,可启动多种途径以促进神经元存活。对大鼠皮质注射NGF后,能够挽救因单眼剥夺诱导皱缩的外侧膝状体核神经元,并加速神经元的生长,这一作用依赖于大鼠皮质内TrkA的活化^[11]。NGF诱导的TrkA磷酸化能防止兴奋性氨基酸毒性作用引起的细胞凋亡。此外,TrkA不仅启动促进细胞存活的信号,同时还抑制P75NTR启动的死亡信号^[4,12]。本实验发现,运动训练组大鼠脊髓内TrkA的表达较对照组明显增加,表明运动训练可增强损伤脊髓处

TrkA蛋白的表达。其可能机制是NGF通过诱导TrkA磷酸化进而激活TrkA通路,从而促进SCI大鼠运动功能恢复。提示NGF/TrkA途径可能参与了运动训练促进SCI修复过程,可能是康复运动促进SCI修复的重要机制。

综上所述,本研究显示运动训练可增加SCI后脊髓内NGF及其受体TrkA的表达,促进SCI大鼠运动功能恢复。由此推测,运动训练可能是通过刺激NGF及TrkA的表达增加,激活NGF/TrkA途径,从而创造出有利于神经再生的微环境,促进脊髓损伤修复。

参 考 文 献

- [1] Wong AM, Leong CP, Su TY, et al. Clinical trial of acupuncture for patients with spinal cord injuries [J]. Am J Phys Med Rehabil, 2003, 82(1): 21-27.
- [2] Shin BC, Lee MS, Kong JC, et al. Acupuncture for spinal cord injury survivors in Chinese literature: a systematic review [J]. Complement Ther Med, 2009, 17(5-6): 316-327.
- [3] Spedding M, Gressens P. Neurotrophins and cytokines in neuronal plasticity [J]. Novartis Found Symp, 2008, 289: 222-233.
- [4] Ichim G, Tauszig-Delamasure S, Mehlen P. Neurotrophins and cell death [J]. Exp Cell Res, 2012, 318(11): 1221-1228.
- [5] 贺晓玉, 沈慧勇, 项 鹏, 等. 人神经干细胞移植对脊髓损伤大鼠后肢运动功能恢复的影响[J]. 中国运动医学杂志, 2010, 29(2): 208-210.
- [6] 黄 霖, 唐 勇, 杨 睿, 等. 通用型脊髓打击器的研制与脊髓损伤动物模型的建立[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2008, 18(9): 688-693.
- [7] 潘孟骁, 王红星, 丁晓晶, 等. 运动训练对大鼠损伤远端脊髓及骨骼肌血管内皮生长因子表达的影响[J]. 中国康复医学杂志, 2010, 25(7): 632-635.
- [8] Schliebs R, Arendt T. The cholinergic system in aging and neuronal degeneration [J]. Behav Brain Res, 2011, 221(2): 555-563.
- [9] Calissano P, Matrone C, Amadoro G. Nerve growth factor as a paradigm of neurotrophins related to Alzheimer's disease [J]. Dev Neurobiol, 2010, 70(5): 372-383.
- [10] Kudo TA, Kanetaka H, Shimizu Y, et al. Induction of neuritogenesis in PC12 cells by a pulsed electromagnetic field via MEK-ERK1/2 signaling [J]. Cell Struct Funct, 2013, 38(1): 15-20.
- [11] Wahle P, Di Cristo G, Schwerdtfeger G, et al. Differential effects of cortical neurotrophic factors on development of lateral geniculate nucleus and superior colliculus neurons: anterograde and retrograde actions [J]. Development, 2003, 130(3): 611-622.
- [12] Brodeur GM, Minturn JE, Ho R, et al. Trk receptor expression and inhibition in neuroblastomas [J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(10): 3244-3250.

(收稿日期:2013-12-10)