

减重步行激活 SCI 大鼠腰膨大前角神经元效应的激光共聚焦镜检研究

张纭 纪树荣 周红俊 范晓华 刘根林 郑樱 郝春霞 王一吉

【摘要】目的 探讨减重平板步行训练(BWSST)促进脊髓损伤(SCI)功能恢复的脊髓可塑性机制。**方法** 将 84 只成年雌性 Wistar 大鼠随意分为假手术组(Sham 组, $n = 18$)、胸髓横断模型组(SCI 组, $n = 33$)和减重平板步行训练组(BWSST 组, $n = 33$), 每组大鼠再随机分为 7, 15, 45 d 3 个亚组。建立大鼠胸髓完全横断模型, 观察 BWSST 对 SCI 大鼠后肢运动功能的影响。采用激光共聚焦镜检免疫荧光双标技术, 研究 SCI 大鼠腰髓前角腹内侧区神经元酪氨酸蛋白激酶受体(EphA4)、囊泡膜谷氨酸转运体 2(VGluT2)的表达, 以及两者双标免疫阳性细胞比率的变化。**结果** BWSST 组大鼠的后肢运动功能较 SCI 组大鼠明显改善。胸髓横断大鼠 BWSST 后, 腰髓前角腹内侧区 EphA4 和 VGluT2 的表达以及 EphA4/VGluT2 双标免疫阳性细胞比率均显著增加。**结论** BWSST 通过增强胸髓横断大鼠腰髓前角神经元 EphA4/VGluT2 的表达, 促进后肢运动功能的恢复。

【关键词】 脊髓损伤; 减重平板步行训练; 酪氨酸蛋白激酶受体; 囊泡膜谷氨酸转运体; 脊髓可塑性

An experimental study of neuronal activation through body-weight-supported treadmill training after spinal cord injury using laser confocal microscopy ZHANG Ying*, JI Shu-rong, ZHOU Hong-jun, FAN Xiao-hua, LIU Gen-lin, ZHENG Ying, HAO Chun-xia, WANG Yi-ji. *China Rehabilitation Research Center, Beijing Boai Hospital, Beijing 100068, China

【Abstract】Objective To investigate the effects of locomotor training on improving locomotor function after spinal cord injury (SCI) and the mechanism of spinal cord plasticity. **Methods** A model of complete thoracic cord transection was established using 84 adult female rats divided into sham, SCI and treadmill training (BWSST) groups. The hind limb locomotor function of all the rats was evaluated. The fluorescence intensities due to (EphA4), vesicular glutamate transporter 2 (VGluT2) and EphA4/VGluT2 double-positive neurons in the ventromedial area of the anterior horn of the lumbar cord were detected using immunofluorescence double labeling and laser confocal microscopy. **Results** The rats in the BWSST group showed better functional recovery in their hind limbs than those in the SCI group. BWSST was correlated with markedly increased EphA4, VGluT2 and EphA4/VGluT2 intensities in the ventromedial area. **Conclusion** BWSST improves hind limb locomotor function in rats with thoracic cord transections by elevating the expression of EphA4/VGluT2, promoting neuronal plasticity in the lumbar anterior horn.

【Key words】 Spinal cord injury; Body-weight-supported treadmill training; EphA4; Vesicular glutamate transporter 2; Spinal plasticity

众所周知, 中枢神经系统具有可塑性, 其可塑性的主要特点是使用依赖性和任务特异性^[1]。脊髓是控制运动的基本中枢, 脊髓内存在能自动激活伸屈肌群、使肢体节律运动产生步行的特殊的神经元环路——步行中枢模式发生器(central pattern generator, CPG)^[2]。脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)后, 受损脊髓部位以下未受损的区域内尚保留有完整的脊髓步行 CPG 神

经网络^[3]。

临床研究表明, 减重平板步行训练(body-weight-supported treadmill training, BWSST)不仅可使不完全 SCI 患者启动摆步的能力增强, 步行能力提高, 而且还能使完全性 SCI 患者运动时下肢肌产生与步行周期时相同步的肌电活动^[4,5]。由此, 我们采用大鼠胸髓完全横断模型, 从行为学及 CPG 神经元特异标志物的细胞免疫学方面, 观察 BWSST 是否通过增强受损部位以下脊髓内步行 CPG 的神经可塑性, 使之发生功能重组, 从而促进 SCI 后运动功能的恢复。

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2009.06.002

作者单位: 100068 北京, 中国康复研究中心北京博爱医院脊髓康复科, 首都医科大学康复医学院(张纭、纪树荣、周红俊、范晓华、刘根林、郑樱、郝春霞、王一吉); 山东省立医院康复科(范晓华)

材料与方法

一、动物分组

84 只健康成年雌性 Wistar 大鼠 [许可证编号 SCXK(京)2000-0012], 体重 250 ~ 300 g。随机分为假手术组 (Sham 组, $n = 18$)、胸髓横断模型组 (SCI 组, $n = 33$) 和减重平板步行训练组 (BWSTT 组, $n = 33$)。每组大鼠再随机分为 7, 15, 45 d 3 个亚组, 其中 Sham 组各亚组均为 6 只, SCI 组和 BWSTT 组各亚组为 11 只。

二、模型制备和术后处理

10% 水合氯醛 (300 mg/kg 体重) 腹腔麻醉, 俯卧固定, 备皮。自背部正中切开 $T_7 \sim T_9$ 椎体水平的皮肤、筋膜及皮下组织, 钝性剥离竖脊肌, 切除 T_8 椎板, 充分暴露 T_8 椎体水平的脊髓。Sham 组在行上述处理后, 直接逐层缝合肌肉、筋膜及皮肤。SCI 组和 BWSTT 组在 T_8 椎体水平, 用尖锐刀片, 自背侧至腹侧快速分层完全横断脊髓, 造成 2 mm 左右的脊髓缺损, 并抬起脊髓两断端确认横断的完全性。大鼠脊髓横断后即刻出现摆尾、双下肢抽搐或尿失禁等现象。压迫止血后, 逐层缝合。术后大鼠单笼饲养, 青霉素腹腔注射 3 d 预防感染, 每天辅助排尿、排便 2 ~ 4 次。

三、减重平板步行训练

BWSTT 组于脊髓横断损伤第 5 天开始进行 BWSTT^[6], 每天 1 次, 每次 30 min, 每周 5 次。开始减重量为大鼠体重的 50%, 跑台速度设为 7 ~ 10.5 m/min, 以后减重量和速度依大鼠的能力进行调整。Sham 组与 BWSTT 组不行 BWSTT。

四、行为学观察

分别于术前和术后 1, 7, 15, 45 d, 采用 Basso, Beattie 和 Bresnahan 介绍的大鼠运动功能评分法 (BBB 评分)^[7] 对各组大鼠后肢运动功能进行神经行为学评定。

五、取材、灌注固定和组织切片

分别于术后 7, 15, 45 d 进行, 10% 水合氯醛 (300 mg/kg 体重) 腹腔麻醉大鼠, 开胸, 经左心室-升主动脉插管行心脏灌注固定。先快速灌注温生理盐水 100 ml, 再灌注 4% 的多聚甲醛磷酸缓冲液 (phosphate-buffered saline, PBS) (0.1 mol/L, pH 值 7.2, 4℃) 200 ml。1 h 后, 取 $L_3 \sim L_5$ 脊髓腰膨大, 置 4% 的多聚甲醛 PBS 液内后固定, 200 g/L 蔗糖过夜沉底后, 将组织于 -70℃ 冰冻 2 h, 冠状位冰冻切片 (厚 10 μ m)。每块组织连续切片, 粘附至防脱片的载玻片上, 用于免疫组化检测。

六、激光共聚焦免疫荧光双标检测

组织切片室温干燥 90 min, PBS (pH 值 7.4) 冲洗;

3% 过氧化氢消化 2 min; 滴加封闭液, 室温孵育 30 min; 迅速滴加 1:50 稀释的兔抗神经元酪氨酸蛋白激酶受体 EphA4 多克隆一抗 (Santa Cruz Biotechnology, Inc. Europe) 和 1:200 稀释的小鼠抗囊泡膜谷氨酸转运体 2 (vesicular glutamate transporters, VGluT2) 单克隆一抗 (Chemicon International, Inc. USA), 4℃ 过夜; PBS 液冲洗; 滴加 1:200 稀释的异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 标记的山羊抗兔二抗 (Santa Cruz Biotechnology, Inc. Europe) 和花青 3 荧光素 (Cyanine 3, Cy3) 标记的绵羊抗小鼠二抗 (Sigma-Aldrich, Inc., USA), 暗盒 37℃ 孵育 1 ~ 2 h。阴性对照: 用 PBS 液代替一抗, 余步骤同前。激光共聚焦显微镜下分别用氩激光红通道和氩激光绿通道观察红、绿荧光标记物。

七、统计学分析

采用 SPSS 11.5 版统计软件包分析数据, 结果用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 ANOVA 进行统计分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、行为学观察

3 组大鼠术前 BBB 评分均为 21 分。Sham 组术后 BBB 评分仍为 21 分。SCI 组和 BWSTT 组大鼠术后 1 d BBB 评分均为 0 分; 7 d 与 15 d 时, 部分大鼠开始出现后肢单或双关节的运动, BBB 评分为 0 ~ 3 分, 但 SCI 组和 BWSTT 组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 45 d 时, 2 组大鼠部分后肢运动功能明显恢复 (BBB 评分均未超过 10 分), BWSTT 组大鼠 BBB 评分为 (6.500 \pm 1.281) 分, 明显高于 SCI 组的 (2.125 \pm 0.875) 分, 2 组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

二、激光共聚焦免疫荧光双标检测

1. EphA4 免疫荧光标记: FITC 标记的 EphA4 免疫阳性物质, 发出绿色荧光, 呈绿色大团块状, 浓集于细胞质内; 在细胞核内不表达。主要分布于脊髓前角 VIII、IX 层的神经元细胞内。

2. VGluT2 免疫荧光标记: Cy3 标记的 VGluT2 免疫阳性物质, 发出红色荧光, 呈红色细颗粒状, 浓集于细胞质内; 在细胞核内不表达。主要分布于脊髓前角 VIII、IX、X 层和后角 I、II 层的神经元细胞和神经终末内。

3. EphA4/VGluT2 免疫阳性细胞: EphA4/VGluT2 免疫阳性细胞, 因 EphA4 和 VGluT2 免疫阳性物质共存, 发出的绿色荧光与红色荧光相重叠而呈黄色荧光。主要为脊髓前角包括运动神经元和中间神经元在内的神经元细胞。

4. CPG 神经元细胞定量观察和分析: 选定脊髓前

角腹内侧区一矩形范围,作为 CPG 神经元细胞定量观察和分析区域^[8]。在激光共聚焦扫描显微镜下,定量测定该区域内 EphA4 和 VGluT2 的表达。每个区域测左、中、右 3 个视野的荧光值,取其平均值,并以切片作本底,两者相减后得到最终校正荧光值。测量在相同光学条件下完成。并且分别计数各组动物 EphA4/VGluT2 双标神经元和 EphA4 单标神经元数量,计算两者比值。

术后 7 d,与 Sham 组比较,SCI 组的 EphA4 和 VGluT2 表达均显著减少,同时 EphA4/VGluT2 双标免疫阳性细胞比率也显著降低,而 BWSTT 组仅 EphA4 表达显著减少;与 SCI 组比较,BWSTT 组 VGluT2 的表达以及 EphA4/VGluT2 双标免疫阳性细胞比率均增加。术后 15 d,与 Sham 组比较,SCI 组的 EphA4 和 VGluT2 表达仍低,同时 EphA4/VGluT2 双标免疫阳性细胞比率仍显著降低;而 BWSTT 组的 EphA4/VGluT2 双标免疫阳性细胞比率显著增加;与 SCI 组比较,BWSTT 组的 EphA4 和 VGluT2 表达,以及 EphA4/VGluT2 双标免疫阳性细胞比率均显著增加。术后 45 d,与 Sham 组比较,SCI 组 EphA4 的表达以及 EphA4/VGluT2 双标免疫阳性细胞比率仍较低,而 BWSTT 组 EphA4 的表达以及 EphA4/VGluT2 双标免疫阳性细胞比率则显著增加;与 SCI 组比较,BWSTT 组 EphA4 的表达以及 EphA4/VGluT2 双标免疫阳性细胞比率均显著增加。详见表 1 和图 1。

表 1 3 组大鼠脊髓前角腹内侧区 EphA4 和 VGluT2 的荧光强度值变化($\bar{x} \pm s$)

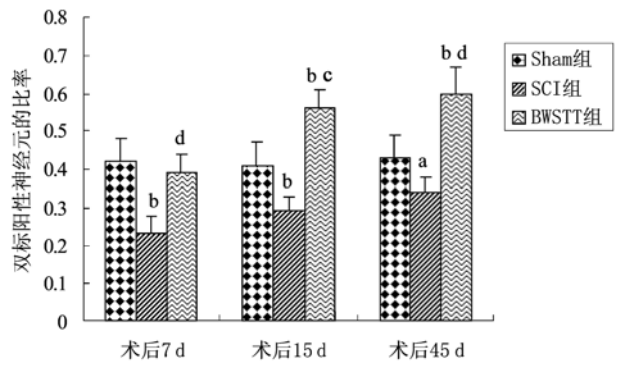
组 别	只数	EphA4	VGluT2
Sham 组	18		
术后 7 d		22.93 ± 4.20	19.19 ± 4.44
术后 15 d		24.04 ± 6.77	21.88 ± 3.51
术后 45 d		23.68 ± 2.27	23.29 ± 6.98
SCI 组	33		
术后 7 d		16.50 ± 3.18 ^b	14.88 ± 3.43 ^a
术后 15 d		17.15 ± 4.21 ^a	18.14 ± 1.80 ^a
术后 45 d		18.22 ± 2.49 ^b	23.36 ± 2.42
BWSTT 组	33		
术后 7 d		18.91 ± 3.13 ^{ac}	20.19 ± 2.8 ^d
术后 15 d		24.56 ± 3.67 ^d	23.81 ± 3.1 ^d
术后 45 d		26.95 ± 3.38 ^{ad}	24.12 ± 4.26

注:与 Sham 组相比,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$;与 SCI 组相比,^c $P < 0.05$,^d $P < 0.01$

讨 论

一、EphA4 和 VGluT2

因参与神经细胞间相互作用而倍受关注的 Eph 受体,属于目前已知成员最多的蛋白受体酪氨酸激酶家族,是外界刺激信息传递至细胞核,转化成细胞效应



注:与 Sham 组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$;与 SCI 组比较,^c $P < 0.05$,^d $P < 0.01$

图 1 各组双标阳性神经元的比率

的信号通路的关键组成^[9]。EphA4 在神经元的突触前膜和突触后膜表达,对突触结构和功能产生影响,参与成年神经可塑性的过程^[10]。胸髓横断后,腰髓内 EphA4 的表达降低,与抑制性微环境的出现有关。BWSTT 后 EphA4 表达的恢复与激活 Eph 受体、调节神经元之间的信息交流有关。

谷氨酸(glutamate, Glu)是中枢神经系统内重要的兴奋性神经递质,在突触的可塑性和信息传递及损伤的病理生理发展过程中起着非常重要的作用^[11]。VGluT2 作为中枢神经系统内 Glu 能终末的特异性标记物,分布于非对称性突触的突触前终末内,主要功能是将突触间隙 Glu 转运入突触体终止或将胞浆内的 Glu 特异性地蓄积在突触囊泡中^[12]。胸髓横断后,腰髓前角 VGluT2 表达的降低,可能与氧自由基效应有关。BWSTT 组 VGluT2 的表达较 SCI 组明显增多,说明 BWSTT 训练可很快逆转 VGluT2 被抑制的摄取功能,促进 Glu 的回收利用、降解神经元突触间隙过多积聚的 Glu,产生神经保护和抗神经毒性作用。45 d 时 SCI 组 VGluT2 的表达开始增加,证明随着时间的延长,VGluT2 可自然恢复部分功能。另外,转运体同时也可携带离子,转运体激活导致离子流产生的效应也有利于脊髓神经网络的形成。

二、CPG 阳性神经元

过去人们对高级脊椎动物 CPG 组织结构了解不多^[13,14],最近 Kullander 等^[8]对 CPG 结构的研究取得了突破性进展。他们对基因敲除小鼠进行研究后发现,EphA4 在步行 CPG 中起重要调控作用,扮演控制步行的角色。并确认脊髓腹内侧区的 EphA4/VGluT2 双标神经元,是对步行起兴奋作用的 CPG 网络中的激活成分。

本实验采用免疫荧光双标结合激光共聚焦显微镜技术,从细胞水平准确定量脊髓组织内 EphA4 和 VGluT2 表达的特点,动态监测 SCI 及训练干预后的变

化规律。研究发现,SCI 后脊髓步行 CPG 的感觉传入和中枢调节被破坏,EphA4/VGluT2 双标神经元表达显著减少,造成运动功能障碍。对 BWSIT 促进 SCI 后运动功能恢复的原因,人们一直推测与 CPG 神经元的激活有关,但目前尚无可靠依据。本研究发现,术后 15 d 和 45 d,与 SCI 组相比,BWSIT 组 EphA4/VGluT2 阳性神经元的表达明显增加,显示 BWSIT 可以激活脊髓步行 CPG 神经元进行自我调整、功能重组,使 CPG 网络中的兴奋成分增加,恢复部分运动功能。

三、脊髓可塑性

脊髓可塑性是 SCI 康复治疗的重要基础之一。由于 CPG 步行中枢主要位于腰髓,CPG 中各神经元之间的突触连接具有高度可塑性,若 SCI 后此神经网络仍然保留的话,就有可能通过电刺激、药物、物理治疗训练等刺激脊髓 CPG 神经元环路启动和重组,改善运动功能、促进步行能力^[15-17]。本实验证实,大鼠胸髓完全横断后,进行特定的 BWSIT,可以通过腰髓前角神经元在结构及功能上的修饰,有效改变脊髓节段内的突触活性,促进步行 CPG 神经环路发生各种适应性调节反应。另外,近来也发现,即使是通常都被假定为与长神经纤维束自身再生有关的脊髓不完全损伤,也存在脊髓可塑性的作用。Wedekind 等^[18]对大鼠脊髓压迫模型进行观察,发现 BBB 评分提高的同时,作为脊髓节段兴奋性探针的 F 波波幅明显增加,但标示脊髓上行和下行长神经纤维束功能的运动诱发电位和感觉诱发电位波幅无明显恢复,仍保持低水平,从而认为后肢功能的恢复至少部分与损伤部位以下脊髓步行 CPG 的自律性增加有关。

参 考 文 献

[1] Wolpaw JR, Carp JS. Plasticity from muscle to brain. *Prog Neurobiol*, 2006,78: 233-263.

[2] Dietz V. Spinal cord pattern generators for locomotion. *Clin Neurophysiol*, 2003,114:1379-1389.

[3] Grasso R, Ivanenko YP, Zago M, et al. Distributed plasticity of locomotor pattern generators in spinal cord injured patients. *Brain*, 2004,127:1019-1034.

[4] Protas EJ, Holmes SA, Qureshy H, et al. Supported treadmill ambulation training after spinal cord injury: a pilot study. *Arch Phys Med Rehabil*, 2001,82:825-831.

[5] Kawashima N, Nozaki D, Abe MO, et al. Alternate leg movement amplifies locomotor-like muscle activity in spinal cord injured persons. *J Neurophysiol*, 2005,93:777-785.

[6] Roy RR, Talmadge RJ, Hodgson JA, et al. Training effects on soleus of cats spinal cord transected (T12-13) as adults. *Muscle Nerve*, 1998,21:63-71.

[7] 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.

[8] Kullander K, Butt SJ, Lebert JM, et al. Role of EphA4 and EphrinB3 in local neuronal circuits that control walking. *Science*, 2003, 299:1889-1892.

[9] 余剑,曾进胜. Eph / Ephrin 与中枢神经可塑性. *中国临床康复*, 2002,6:3198-3199.

[10] Egea J, Nissen UV, Dufour A, et al. Regulation of EphA4 kinase activity is required for a subset of axon guidance decisions suggesting a key role for receptor clustering in Eph function. *Neuron*, 2005, 47:515-528.

[11] 窦国睿,刘涛,李金莲. 囊泡膜谷氨酸转运体在神经系统的研究进展. *神经解剖学杂志*, 2005,21:87-90.

[12] Freneau RTJr, Voglmaier S, Seal RP, et al. VGLUTs define subsets of excitatory neurons and suggest novel roles for glutamate. *Trends Neurosci*, 2004,27:98-103.

[13] MacKay-Lyons M. Central pattern generation of locomotion: a review of the evidence. *Phys Ther*, 2002,82:69-83.

[14] Marder E, Bucher D. Central pattern generators and the control of rhythmic movements. *Curr Biol*, 2001,11:986-996.

[15] Grillner S. The spinal locomotor CPG: a target after spinal cord injury. *Prog Brain Res*, 2002,137:97-108.

[16] Harkema SJ. Neural plasticity after human spinal cord injury: application of locomotor training to the rehabilitation of walking. *Neuroscientist*, 2001,7:455-468.

[17] Fouad K, Pearson K. Restoring walking after spinal cord injury. *Progr Neurobiol*, 2004,73:107-126.

[18] Wedekind C, Ullrich R, Klug N. F-wave amplitudes indicate evolving spinal autonomy during spontaneous recovery of hindlimb function in rat spinal cord contusion. *Spinal Cord*, 2006,44:44-48.

(修回日期:2008-12-22)

(本文编辑:松 明)

本刊办刊方向:

