

# 早期跑台训练对中重度颅脑外伤大鼠运动功能的影响

李爱萍 沈夏锋 胡永善 张彭跃 张宇玲 濮宏建

**【摘要】** 目的 观察早期跑台训练对中重度颅脑外伤大鼠运动功能的影响。方法 将 32 只成年 SD 大鼠制成中重度脑外伤模型,采用随机数字表法将其分为训练 A 组、训练 B 组、训练 C 组及对照组。训练 A 组、训练 B 组及训练 C 组大鼠分别于术后 24 h、3 d 和 7 d 时进行为期 2 周的电动跑台训练。于制模后第 6、12、18、24 及 28 天时分别采用足误试验 (foot-fault) 和圆筒试验 (cylinder test) 评定各组大鼠肢体运动协调能力及前肢运动功能;于制模后第 28 天时通过焦油紫 (CV) 染色观察各组大鼠脑体积缺失情况。结果 训练 A 组足误评分在制模后各时间点与对照组间差异均无统计学意义 (均  $P > 0.05$ );训练 C 组足误评分在制模后第 12、18、24 及 28 天时分别为 (4.70 ± 0.17) 分、(4.66 ± 0.09) 分、(4.81 ± 0.14) 分和 (4.84 ± 0.14) 分,与对照组间差异均具有统计学意义 (均  $P < 0.05$ );训练 B 组足误评分在制模后第 18、24 和 28 天时分别为 (4.62 ± 0.17) 分、(4.81 ± 0.12) 分和 (4.81 ± 0.09) 分,与对照组间差异均具有统计学意义 (均  $P < 0.05$ )。训练 C 组圆筒试验前肢不对称分值在制模后第 12 天时开始升高,在制模后第 28 天时为 (0.31 ± 0.04) 分,与对照组前肢不对称分值 [(0.17 ± 0.04) 分] 组间差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ );训练 A 组、训练 B 组前肢不对称分值在制模后不同时间点与对照组间差异均无统计学意义 (均  $P > 0.05$ )。制模后第 28 天时发现各跑台训练组大鼠脑体积缺失情况均较对照组有减少趋势,但组间差异均无统计学意义 (均  $P > 0.05$ )。结论 于颅脑损伤后 3 d 或 7 d 时进行为期 2 周的跑台训练,能改善模型大鼠肢体运动协调能力及前肢运动功能,其治疗过程与脑组织缺失体积无明显相关性。

**【关键词】** 颅脑损伤; 运动功能; 跑台训练

**The effect of early treadmill exercise on motor function deficits following moderate or severe traumatic brain injury** LI Ai-ping\*, SHEN Xia-feng, HU Yong-shan, ZHANG Peng-yue, ZHANG Yu-ling, PU Hong-jian.

\* Rehabilitation Medicine Center, Nanjing Military Region Sanatorium of Hangzhou, Hangzhou 310007, China

**【Abstract】 Objective** To investigate the effect of early rehabilitation on rats' motor performance after moderate or severe experimental traumatic brain injury (TBI). **Methods** After adult Sprague-Dawley rats had received moderate or severe TBI, they were randomly assigned to either a 24 hour exercise group (group A), a 3-day exercise group (group B), a 7-day exercise group (group C) or a control group. Each group was composed of 8 rats. The exercise group endured forced treadmill training on an electric treadmill for 14 consecutive days initiated 24 hours, 3 days or 7 days post TBI. The foot-fault and cylinder tests were performed on the 6th, 12th, 18th, 24th and 28th day post injury. On the 28th day the rats were sacrificed and the brains were removed and frozen. The frozen coronal brain sections were stained with cresyl violet (CV) for quantitative evaluation of cortical lesion volume. **Results** The rats in groups B and C showed significant decreases in the percentage of left forelimb foot faults compared with the control group at the 18th, 24th and 28th day after injury. In addition, the rats of group C demonstrated significant decreases in the percentage of left forelimb foot-fault at the 12th day after injury. There was no significant difference between group A and the control group in terms of foot fault scores in any of the subsequent test sessions. In the cylinder test the forelimb use asymmetry scores of neither group A nor group B were significantly different from the control group. Group C showed marked locomotor asymmetry improvement at day 28 post-injury. There was no significantly different loss of hemispheric tissue between those groups. **Conclusion** After treadmill exercise for 14 consecutive days initiated at 3 or 7 days following moderate or severe TBI, rats' motor function improved. The cortical lesion volume was not associated with recovery of motor function.

**【Key words】** Traumatic brain injury; Motor function; Treadmill training

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2013.04.006

基金项目:南京军区医药创新重点资助项目(09Z037)

作者单位:310007 杭州,南京军区杭州疗养院全军创伤康复中心(李爱萍);复旦大学附属华山医院康复医学科(沈夏锋、胡永善、张彭跃、张宇玲);复旦大学上海医学院神经生物学国家重点实验室(濮宏建)

随着现代急救医疗技术提高,颅脑外伤死亡率逐年降低,但仍有较多幸存者长期遗留严重运动、感觉、行为及认知功能障碍,迫切需要介入康复干预。目前临床对于颅脑外伤的康复研究相对滞后,现有文献报道,在颅脑外伤后进行运动训练可改善患者预后<sup>[1-7]</sup>,但关于颅脑外伤患者康复训练的最佳时间窗及训练强度仍未明确<sup>[2]</sup>。基于上述背景,本研究通过制作控制性皮质冲击损伤(controlled cortical impact, CCI)颅脑外伤大鼠模型,于制模后不同时间点分别给予电动跑台训练,并观察跑台训练对大鼠脑体积缺失及肢体运动功能的影响。现将结果报道如下。

## 材料与方法

### 一、主要试剂与仪器

主要实验试剂包括异氟醚(美国 Abbott 公司产)、焦油紫(美国 Sigma 公司产)等;主要实验仪器包括大鼠脑立体定向仪、控制性皮质冲击损伤装置、DSPT-202 型电动跑台(立泰生物科技有限公司产)、牙科钻及冰冻切片机(德国 Leica 公司产)等。

### 二、动物分组及模型制作

共选取健康成年 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 32 只,体重 250 ~ 270 g。采用随机数字表法将其分为 4 组,分别是训练 A 组、训练 B 组、训练 C 组及对照组,每组 8 只大鼠。

参照 Sutton 等<sup>[8]</sup>制作 CCI 模型的方法将上述大鼠制成 CCI 颅脑外伤大鼠模型,采用异氟醚气体诱导麻醉大鼠,待麻醉成功后将大鼠俯卧位固定于操作台上,额顶部皮肤剃毛消毒,沿中线矢状面切开、牵拉皮肤,小心刮开骨膜暴露颅顶骨;用牙科电钻沿中线右旁开 5 mm、前凶前 2.5 mm 开一直径 5 mm 骨窗,暴露完整硬脑膜,移动显微操作臂精确定位,用直径 5 mm 的不锈钢打击头对准圆形骨窗内的脑膜组织,设置打击头速度为 4.0 m/s,停留时间为 0.5 s,打击深度为 3.2 mm,造成中重度颅脑外伤<sup>[2-3]</sup>;然后小心止血、缝合伤口。如大鼠颅脑外伤后出现部分反射活动消失、对侧肢体功能障碍等表现则提示 CCI 模型制作成功。

### 三、制模后处理

本实验采用电动跑台机对 CCI 模型大鼠进行运动训练,该跑台机跑带尾部设置有一排电栅栏,如大鼠尾部触及电栅栏则给予电击,以驱使大鼠在电动跑带上以设定速度主动向前奔跑。训练 A 组、训练 B 组及训练 C 组大鼠分别于制模后 24 h、3 d 及 7 d 时开始电动跑台训练(跑台倾斜角度均为 0°),采用循序渐进的低强度训练方案,训练第 1 天跑台速度设定为 3 m/min,持续训练 30 min;训练第 2 天跑台速度依次设定为 3 m/min、6 m/min 及 9 m/min,每种速度均持续训练

10 min;训练第 3 天跑台速度依次设定为 6 m/min、9 m/min 及 12 m/min,每种速度均持续训练 10 min;训练第 4 ~ 14 天跑台速度均设定为 12 m/min,每次持续训练 30 min。对照组大鼠则于相同时间段放置在电动跑台机上,期间跑台机跑带未转动。

### 四、大鼠行为学评定

于制模前、制模后 6 d、12 d、18 d、24 d 及 28 d 时进行行为学评定,评定时间点统一为跑台训练结束后 2 h,具体评定方法如下。

1. 足误试验(foot-fault test):主要评价大鼠肢体运动协调功能,其操作步骤及评分标准参考 Gerlind 等<sup>[9]</sup>介绍的方法。每只大鼠仅评估左前肢,具体评分标准如下:0 分表示左前爪完全踩空,左前爪未接触到横档即掉下,身体失去正常姿势和平衡;1 分表示左前爪能放在横档上,但当该爪承重时滑下,导致掉落,影响正常行走;2 分表示左前爪能放在横档上,但当该爪承重时滑下,此时大鼠未掉落,也不影响其行走,其平衡和正常步态得以维持;3 分表示左前爪能放在横档上,但在承重前大鼠迅速抬起该爪并移到另一个横档上;4 分表示大鼠想将前爪放到一个横档上,但因没接触到该横档而放在另一横档上;5 分表示大鼠将左前爪放在横档上,但由腕关节、肘关节或爪趾承重;6 分表示大鼠能将左前爪正中部位放在横档上。

2. 圆筒试验(cylinder test):主要评价大鼠前肢使用时的不对称性,将大鼠放置于直径 20 cm、高 30 cm 透明圆柱型缸内,期间大鼠多用前肢支撑圆柱形缸壁进行站立、嗅探动作,采用摄像设备记录、分析大鼠 3 ~ 7 min 内优先使用左前肢来支撑体重进行身体移动的情况,具体指标包括大鼠站立、嗅探时分别使用左前肢、右前肢及双侧前肢支撑圆柱形缸壁的次数。实验分析员将该结果转换为使用脑损伤同侧(ipsilateral, I)前肢、对侧(contralateral, C)前肢及双侧(both, B)前肢的次数,并按以下公式计算各组大鼠前肢不对称使用分值(asymmetry score, SC)用于评价其患肢运动能力恢复情况,SC 分值 =  $(I + 1/2B) / (I + C + B) \times 100\%$ 。

### 五、脑体积缺失检查

各组大鼠于制模 28 d 跑台训练结束后经腹腔注射 10% 水合氯醛(4 ml/kg 体重)进行深度麻醉,经左心室快速灌注生理盐水 200 ml,在生理盐水灌注结束时迅速加入 4% 多聚甲醛溶液 200 ml,先快速灌注 100 ml,然后缓慢灌注剩余 100 ml。经后固定约 1 h 后取出脑组织浸入 20% 蔗糖溶液中,待其沉降后则浸入 30% 蔗糖溶液中直至脑组织沉底。将脱水脑组织置于冰冻切片机上行冠状切片,切片厚约 30  $\mu\text{m}$ ,自视交叉冠状平面开始切片,切至出现海马结构时为止,每 12 张切片取 1 张切片。将目标脑片置于原位杂交保护液

(-20 ℃)中保存待测。

各组大鼠脑片行焦油紫(cresyl violet, CV)染色以观察其脑组织缺失情况。采用 Image Tool 图像处理软件分析各组大鼠脑组织缺失面积(S),按照以下公式计算目标体积百分比,脑缺失体积 = 1/2 (S<sub>1</sub> + S<sub>2</sub> + S<sub>3</sub> + …… + S<sub>n</sub>) × 0.36,该值再除以对侧半球体积即得到相对缺失体积<sup>[10]</sup>。

## 六、统计学分析

本研究所得计量数据以( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用 SPSS 10.1 版统计学软件包进行数据分析,各组大鼠足误试验、圆筒试验结果及脑组织缺失体积组间比较采用方差分析, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

## 结 果

### 一、制模后不同时间点各组大鼠肢体运动协调功能比较

制模后各组颅脑外伤大鼠足误评分均较制模前明显下降,其中对照组足误评分在制模后第 6 天时达到最低值,以后略有增高,但增高幅度较小。训练 A 组大鼠足误评分在各时间点与对照组间差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$ );训练 B 组及训练 C 组大鼠足误评分从制模后第 6 天开始,均较对照组明显增高,其中训练 B 组大鼠足误评分在制模后 18、24 及 28 d 时与对照组间差异均具有统计学意义(均 $P < 0.05$ );训练 C 组大鼠足误评分在制模后 12、18、24 及 28 d 时与对照组间差异均具有统计学意义(均 $P < 0.05$ );训练 B 组及训练 C 组大鼠足误评分在制模后不同时间点其组间差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$ ),具体数据见表 1。

### 二、制模后不同时间点各组大鼠前肢运动功能比较

制模后发现对照组前肢不对称使用分值在各时间

点均无显著变化,提示该组大鼠患肢运动功能无明显提高。训练 A 组患肢不对称使用分值在制模后 24、28 d 时较对照组有增高趋势,但组间差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$ )。训练 B 组患肢不对称使用分值在制模后各时间点与对照组间差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。训练 C 组患肢不对称使用分值在制模后 12 d 时开始升高,在制模后 28 d 时与对照组间差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ),具体结果见表 2。

三、制模后 28 d 时各组大鼠脑组织缺失体积比较  
制模后 28 d 时训练 A 组、训练 B 组、训练 C 组及对照组大鼠脑组织缺失体积分别为( $31.14 \pm 1.83$ )mm<sup>3</sup>、( $30.31 \pm 2.64$ )mm<sup>3</sup>、( $30.54 \pm 1.82$ )mm<sup>3</sup>和( $32.41 \pm 3.52$ )mm<sup>3</sup>。与对照组比较,发现各跑台训练组大鼠脑组织体积缺失均有减小趋势,但组间差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$ )。

## 讨 论

随着交通及建筑业高速发展,近年来颅脑外伤发病率逐年升高,已引起国内、外临床高度关注。虽然有些药物在颅脑外伤动物实验中取得良好效果,但在临床应用中并未取得理想疗效,故康复干预仍是改善颅脑外伤患者肢体功能的重要手段<sup>[11-12]</sup>。

在众多颅脑外伤动物模型中,CCI 模型是一种常见的颅脑外伤动物模型,其应用范围较广泛,制模原理是通过高速运动的空气产生冲击力传导至不锈钢打击头,造成颅脑损伤<sup>[8]</sup>。该制模方法受个体差异影响较小,能精确控制气动装置的各项打击参数(如打击时间、速度及打击深度等),从而严格控制损伤程度及打击部位。本研究采用该方法制作 CCI 模型大鼠,以确保各组大鼠颅脑损伤程度一致,为后续实验创造良好基础。

表 1 制模后不同时间点各组大鼠足误评分结果比较(分, $\bar{x} \pm s$ )

组别	只数	制模前	制模后 6 d 时	制模后 12 d 时	制模后 18 d 时	制模后 24 d 时	制模后 28 d 时
训练 A 组	8	5.54 ± 0.09	4.28 ± 0.14	4.38 ± 0.09	4.40 ± 0.15	4.50 ± 0.15	4.30 ± 0.17
训练 B 组	8	5.75 ± 0.09	4.56 ± 0.18	4.49 ± 0.16	4.62 ± 0.17 <sup>a</sup>	4.81 ± 0.12 <sup>a</sup>	4.81 ± 0.09 <sup>a</sup>
训练 C 组	8	5.60 ± 0.11	4.37 ± 0.22	4.70 ± 0.17 <sup>a</sup>	4.66 ± 0.09 <sup>a</sup>	4.81 ± 0.14 <sup>a</sup>	4.84 ± 0.14 <sup>a</sup>
对照组	8	5.52 ± 0.08	4.31 ± 0.15	4.29 ± 0.12	4.24 ± 0.08	4.35 ± 0.12	4.42 ± 0.11

注:与对照组相同时间点比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$

表 2 制模后不同时间点各组大鼠患肢不对称使用分值结果比较(分, $\bar{x} \pm s$ )

组别	只数	制模前	制模后 6 d 时	制模后 12 d 时	制模后 18 d 时	制模后 24 d 时	制模后 28 d 时
训练 A 组	8	0.44 ± 0.04	0.22 ± 0.07	0.30 ± 0.05	0.22 ± 0.06	0.29 ± 0.05	0.26 ± 0.02
训练 B 组	8	0.56 ± 0.09	0.20 ± 0.02	0.20 ± 0.04	0.22 ± 0.03	0.16 ± 0.06	0.24 ± 0.04
训练 C 组	8	0.47 ± 0.05	0.16 ± 0.03	0.21 ± 0.06	0.30 ± 0.03	0.32 ± 0.04	0.31 ± 0.04 <sup>a</sup>
对照组	8	0.45 ± 0.06	0.16 ± 0.06	0.18 ± 0.06	0.18 ± 0.06	0.18 ± 0.05	0.17 ± 0.04

注:与对照组相同时间点比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$

目前有研究报道,早期介入康复干预可提高颅脑外伤患者扩展格拉斯哥预后量表(Glasgow outcome scale extended,GOSE)评分和残疾分级量表(disability rating scale,DRS)评分,改善其运动功能及认知能力,但关于康复早期介入的时机仍存在争议<sup>[7,13-14]</sup>。当前运动训练是颅脑外伤康复干预的主要手段,患者损伤程度、运动介入时间窗、运动方式、运动量及运动强度等都是影响康复疗效的重要因素。本研究足误试验结果显示,颅脑外伤后各组大鼠足误试验评分均显著降低,训练 B 组及训练 C 组大鼠经电动跑台训练后,其肢体运动协调功能均有一定程度改善,而训练 A 组大鼠肢体运动协调功能无明显提高,提示于颅脑外伤后 3 d、7 d 时介入跑台训练,能提高大鼠肢体运动协调功能。圆筒试验结果显示各组大鼠颅脑外伤后均出现前肢运动功能障碍,训练 C 组大鼠经跑台训练后,其肢体运动功能明显改善;而训练 B 组及训练 A 组大鼠经跑台训练后,其肢体运动功能均无显著提高,提示于颅脑外伤后 7 d 时介入跑台训练,能提高颅脑外伤大鼠肢体运动功能。本研究中训练 B 组大鼠其圆筒试验结果与足误试验结果表现不尽一致,其原因可能包括:本实验所采用的运动量及运动强度可能不是最佳参数,故未获得理想疗效;其次可能是圆筒试验能敏感评定运动功能障碍程度,但不能及时、准确反映功能障碍改善幅度<sup>[15]</sup>;第三有可能是观察时间偏短,需要更长时间才能发现圆筒试验评分值出现明显变化。本课题组下一步研究将重点探讨跑台训练对颅脑外伤大鼠的长期影响作用,包括观察跑台训练是否能持续改善颅脑外伤大鼠肢体运动功能。

通过比较各跑台训练组及对照组大鼠的脑组织缺失体积,发现组间差异均无统计学意义( $P > 0.05$ ),但本研究中有部分跑台训练组大鼠其肢体功能改善幅度明显优于对照组,其机制可能与促进大脑可塑性有关。如有学者研究后发现,运动训练能促进健康大鼠小脑、纹状体、海马及脑皮质血管组织再生,上调大脑中脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)、钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶 II(CAMK II)、cAMP 反应元件结合蛋白(cAMP response element binding protein, CREB)和突触蛋白 I(Synapsin I)等因子表达,而这些因子与颅内神经元突触可塑性密切相关<sup>[11-13]</sup>。相关动物实验报道,运动训练可明显提高晚期脑梗死大鼠运动功能,但其脑梗死灶体积并未见明显缩小,与本研究结果基本一致<sup>[16]</sup>。国外也有学者指出,颅脑外伤大鼠通过在丰富环境中进行运动训练,发现其神经功能评分显著提高,而其大脑体积缺失情况并未得到明显改善<sup>[13]</sup>。至于本实验通过何种途径促进颅脑外

伤大鼠运动功能改善,是否与促进脑功能重建、血管再生及上调神经营养因子表达等因素有关,还有待进一步深入探讨。

#### 参 考 文 献

- [1] Morganti-Kossmann MC, Yan E, Bye N. Animal models of traumatic brain injury: is there an optimal model to reproduce human brain injury in the laboratory. *Injury*, 2010, 41: s10-13.
- [2] 刘珍, 武衡, 谢明. 康复训练对脑出血大鼠神经细胞再生的影响. *中华物理医学与康复杂志*, 2011, 33: 731-735.
- [3] Katz DI, Polyak M, Coughlan D, et al. Natural history of recovery from brain injury after prolonged disorders of consciousness: outcome of patients admitted to inpatient rehabilitation with 1-4 year follow-up. *Prog Brain Res*, 2009, 177: 73-88.
- [4] Blake H, Batson M. Exercise intervention in brain injury: a pilot randomized study of Tai Chi Qigong. *Clin Rehabil*, 2009, 23: 589-598.
- [5] Bhamhani Y, Rowland G, Farag M. Effects of circuit training on body composition and peak cardiorespiratory responses in patients with moderate to severe traumatic brain injury. *Arch Phys Med Rehabil*, 2005, 86: 268-276.
- [6] Schwandt M, Harris JE, Thomas S, et al. Feasibility and effect of aerobic exercise for lowering depressive symptoms among individuals with traumatic brain injury: a pilot study. *J Head Trauma Rehabil*, 2012, 27: 99-103.
- [7] Andelic N, Bautz-Holter E, Ronning PA, et al. Does an early onset and continuous chain of rehabilitation improve the long-term functional outcome of patients with severe traumatic brain injury. *J Neurotrauma*, 2012, 29: 66-74.
- [8] Sutton RL, Lescaudron L, Stein DG. Unilateral cortical contusion injury in the rat: vascular disruption and temporal development of cortical necrosis. *J Neurotrauma*, 1993, 10: 135-149.
- [9] Metz GA, Whishaw IQ. Cortical and subcortical lesions impair skilled walking in the ladder rung walking test: a new task to evaluate fore- and hindlimb stepping, placing, and co-ordination. *J Neurosci Methods*, 2002, 115: 169-179.
- [10] Swanson RA, Morton MT, Tsao WG, et al. A semiautomated method for measuring brain infarct volume. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1990, 10: 290-293.
- [11] Menon DK. Unique challenges in clinical trials in traumatic brain injury. *Crit Care Med*, 2009, 37: s129-135.
- [12] Jain KK. Neuroprotection in traumatic brain injury. *Drug Discov Today*, 2008, 13: 1082-1089.
- [13] Lippert GM, Maegele M, Garbe J, et al. Late effects of enriched environment (EE) plus multimodal early onset stimulation (MEOS) after traumatic brain injury in rats: ongoing improvement of neuromotor function despite sustained volume of the CNS lesion. *Exp Neurol*, 2007, 203: 82-94.
- [14] Frankevičiute E, Krisciunas A. Evaluation of factors influencing effectiveness of kinesitherapy in patients after traumatic brain injury. *Medicina*, 2006, 42: 732-737.
- [15] 陈绍春, 潘伟生, 冯曜宇, 等. GCSF 治疗脑出血大鼠的行为学观测. *昆明医学院学报*, 2008, 6: 5-10.
- [16] 胡永善, 主编. 运动疗法应用研究进展. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 128.

(修回日期: 2013-01-16)

(本文编辑: 易 浩)