

· 基础研究 ·

康复训练对比格犬脊髓损伤后轴突再生微环境及运动功能的影响

张强 徐江 熊颖 朱碧峰 王伟

【摘要】目的 研究脊髓损伤后康复训练对轴突再生微环境的影响,并探讨康复训练对脊髓损伤后轴突再生、结构重建和功能恢复的可能作用机制。**方法** 实验动物健康成年比格犬 15 只,分为假手术组、模型组和运动训练组,每组 5 只。模型组和运动训练组建立脊髓半切损伤模型。从损伤后第 8 天起,运动训练组进行活动平板训练,模型组不训练。于损伤后第 60 天处死,采用免疫荧光双标技术检测星形胶质细胞在损伤周围区表达硫酸软骨素糖蛋白(CSPG)的情况,采用 Western blot 技术检测 CSPG 在损伤周围区的表达水平,采用银染技术观察脊髓损伤后轴突再生的情况,采用改良 Tarlov 评分评估各实验组动物运动功能。**结果** 运动训练组星形胶质细胞表达 CSPG 的阳性细胞数为(19.50 ± 1.17)%,较模型组(65.80 ± 3.69)% 明显减弱($P < 0.05$);Western blot 显示 CSPG 表达水平假手术组为 100%,模型组为(189.00 ± 11.75)%,运动训练组为(117.00 ± 9.63)%,组间差异有统计学意义($P < 0.05$);运动训练组神经轴突更加完整,排列更加规则、致密,溃变要少于模型组,运动功能评分显示运动训练组为 4.20 ± 0.23,高于模型组(3.30 ± 0.07),差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 脊髓损伤后康复训练可通过抑制星形胶质细胞表达 CSPG 等轴突再生抑制因子,改善受损轴突的再生微环境,促进机体的结构重建和功能恢复。

【关键词】 脊髓损伤; 神经再生; 康复训练; 硫酸软骨素糖蛋白; 轴突再生

Effects of rehabilitation on the axon regeneration microenvironment and motor function after spinal cord injury in beagle dogs ZHANG Qiang*, XU Jiang, XIONG Ying, ZHU Bi-feng, WANG Wei. * Department of Neurology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

Corresponding author: WANG Wei, Email: wwang_tjh@yahoo.com.cn

【Abstract】Objective To investigate the effects of rehabilitation training on the microenvironment for axon regeneration and the possible mechanisms promoting axon regeneration, reconstruction and functional compensation after spinal cord injury (SCI) in beagle dogs. **Methods** Fifteen beagles were divided into a sham operated group, an SCI model group and a rehabilitation training group. Spinal cord hemi-transection injury was carried out. From the 8th day after SCI, the rehabilitation training group was given treadmill training. All dogs were sacrificed 60 days post injury and samples were harvested. Chondroitin sulphate proteoglycan (CSPG) expression of astroglial cells around the injured area was observed using an immunofluorescence technique. The expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP) and CSPG protein in each group were semi-quantified by Western blot analysis. Axon regeneration was observed by silver staining. Motor function was assessed using modified Tarlov scores. **Results** In the rehabilitation training group, compared with the model group astroglial production of CSPG was reduced remarkably. Both CSPG expression and axon regeneration were enhanced and functional deficits improved. **Conclusions** Rehabilitation training can inhibit astroglial production of CSPG, improve the microenvironment for injured axon regeneration, and promote reconstruction and functional compensation after traumatic SCI.

【Key words】 Spinal cord injury; Nerve regeneration; Rehabilitation training; Chondroitin sulphate proteoglycan; Axon regeneration

成年哺乳动物脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2011.010.001

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81030021,30900450);中国博士后科学基金资助项目(201003482,20090450136)

作者单位:430030 武汉,华中科技大学同济医学院附属同济医院神经内科(张强、朱碧峰、王伟),康复医学科(徐江),放射科(熊颖)

通信作者:王伟,Email:wwang_tjh@yahoo.com.cn

后运动功能恢复困难,而造成不可逆性的神经功能缺损。近年来的研究提示其原因可能与损伤后不利于再生的微环境密切相关,包括抑制性因素的增多以及营养因子的产生减少等,其中以星形胶质细胞为主要成分的胶质瘢痕形成,以及其产生的包括硫酸软骨素糖蛋白(chondroitin sulphate proteoglycan, CSPG)在内的一些抑制性因子,是影响 SCI 后轴突再生的关键因素

之一^[1]。如何有效地控制 SCI 后胶质细胞的过度增殖和再生抑制因子的分泌以及改善损伤后中枢神经系统 (central nervous system, CNS) 微环境, 从而促进轴突再生, 是目前神经科学领域关注的焦点。

大量研究表明, 康复训练对改善缺血性脑梗死和 SCI 患者感觉、运动功能具有显著疗效; 动物实验也发现, 丰富环境刺激等康复训练对脑缺血和 SCI 大鼠功能恢复具有积极促进作用, 肢体制动则明显阻碍脑缺血大鼠运动功能恢复; 有研究认为, SCI 瘫痪肢体运动训练可以促进轴突再生和新的神经回路重建^[2]。我们前期的研究发现, 通过给予 CDK 抑制剂奥罗莫星 (olomoucine) 可以显著阻滞 SCI 后胶质细胞的过度活化和增殖, 抑制胶质瘢痕的形成、减少相关抑制性因子 CSPG 的产生, 从而有效改善受损轴突和突触的再生微环境, 促进肢体功能的恢复^[3]。本研究将实验动物分为假手术组、模型组和运动训练组, 采用改良的 Tarlov 评分评价脊髓损伤后大鼠后肢运动功能^[4], 使用免疫荧光双标结合 Western Blot 技术观察脊髓损伤灶周围区域胶质纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP) 及 CSPG 的表达情况, 用 Bielschowsky 银染观察脊髓损伤后轴突再生的情况, 旨在探讨康复训练对 SCI 后轴突再生、结构重建和功能恢复的作用机制。

材料与方法

一、实验动物及分组

健康成年比格犬 15 只, 由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供, 雌雄不限, 体重 (20 ± 1) kg。使用随机数字表法将动物分为假手术组 (n = 5)、模型组 (n = 5) 和运动训练组 (n = 5)。

二、动物模型的建立

脊髓半切损伤的模型制备参照 Tuszyński 等^[3]的方法, 1% 异氟醚 + 30% 氧 (O₂) 气体麻醉, 以 T₁₀ 棘突为中心, 暴露 5 mm 长的脊髓节段, 假手术组到此即可止血缝合。模型组和运动训练组则用手术剪纵向剪开硬脊膜, 以尖刀片紧贴脊髓后正中动脉左侧 (避免损伤后正中血管), 垂直刺入脊髓腹侧达骨质后划向左侧, 重复 1 次切割, 将左侧半完全离断。将明胶海绵贴于表面彻底止血, 逐层缝合肌肉和皮肤。术后给予抗生素, 必要时补液。每日膀胱按摩 2 次至其排尿反射恢复为止。以比格犬双下肢拖动行走为造模成功标准。

三、运动训练

损伤后第 8 天开始, 用自制装置将运动训练组比格犬悬吊固定于活动平板上, 平板启动后比格犬被动爬行活动患肢, 每日 2 次, 每次 5 min, 训练 53 d (即损伤后 60 d)。

三、免疫荧光双标方法

3 组比格犬于术后第 60 天在麻醉状态下, 取以伤段为中心、长约 15 mm 的损伤脊髓节段用 OTC 胶包裹, 放入 -80℃ 预冷戊二烷中速冻 1 min; 恒冷箱切片机中连续切片, 片厚 10 μm; 冰冻切片置 4% 多聚甲醛磷酸盐缓冲液中 (4℃) 固定 15 min; PBS 振荡清洗 2 次, 每次 5 min; 正常牛血清封闭 2 h; 将相邻切片分为 2 组, 分别滴加 GFAP 单克隆抗体 (1:50) 和兔抗 CSPG 多克隆抗体 (1:100), 4℃ 冰箱内在湿盒内孵育 48 h; PBS 振荡清洗 3 次, 每次 5 min; 滴加羊抗小鼠 FITC (1:100) 和羊抗兔 Cy3 (1:100) 的混合二抗, 室温避光孵育 1 h; PBS 振荡清洗 3 次, 每次 5 min; 流水冲洗 30 min 后, 50% 甘油封片, 荧光显微镜下观察。激发波长 488 nm 发射波长 525 nm 的 FITC 呈绿色荧光; 激发波长 550 nm 发射波长 565 nm 的 Cy3 呈红色荧光。

四、Western Blot 检测

各组动物于术后 60 d 时快速剥取损伤节段脊髓组织, 加入裂解液冰上孵育并彻底匀浆、离心后留取上清, 考马斯亮蓝 G-250 法测定蛋白浓度。聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白; 全湿式电转法转移到聚偏二氯乙烯膜上; 5% 脱脂奶粉封闭 2 h 后分别加入相应的一抗 (包括兔抗 GFAP 和 CSPG 抗体, 美国 Neomarkers 公司, 稀释度均为 1:100); 4℃ 孵育过夜。用 TBST 溶液洗涤 10 min × 3 次; 加入相对应的二抗 (HRP 标记羊抗兔 IgG, 1:5000), 37℃ 孵育 90 min; TBST 洗膜 10 min × 3 次, ECL 系统显色。凝胶成像分析系统摄像并进行分析, 结果以目的条带灰度值与同一样本肌动蛋白灰度值的比率来表示。

五、神经纤维 Bielschowsky 银染法

0.5% 高锰酸钾处理切片 5 min。水洗。2% 草酸处理切片 2 min。自来水洗, 蒸馏水洗。20% 硝酸银于 37℃ 中作用 60 min。直接入 10% 甲醛溶液中处理, 直至切片颜色转为黄色到棕色为止, 约 10 ~ 20 s。直接入氨银液处理 30 s。直接入 10% 甲醛处理 1 ~ 2 min。自来水洗。5% 硫代硫酸钠固定切片 5 min。脱水、透明、封固。镜下可见神经纤维呈深棕色至黑色, 背景呈淡棕色。整个过程, 应仔细操作, 防止污染造成背景染色。

六、运动功能评分

参照改良的 Tarlov 评分在造模 60 d 时进行行为学评分, 具体评分标准: 0 分, 后肢完全瘫痪; 1 分, 后肢软瘫, 可见肌肉收缩; 2 分, 可以有意识地活动后肢; 3 分, 不需要支持物可以站立; 4 分, 可以行走; 5 分, 可以攀爬 20 度倾角斜坡。

七、统计学分析

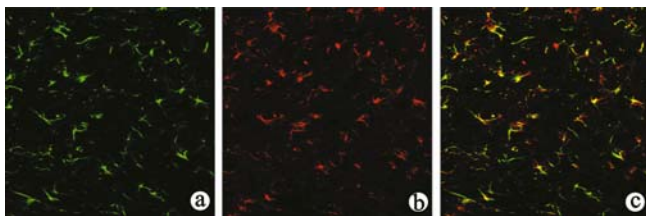
所得数据用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 统计处理应用 SPSS 11.0 软件包, 两组之间的比较行单因素方差分析后采

用 Tukey's post hoc 检验, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

结 果

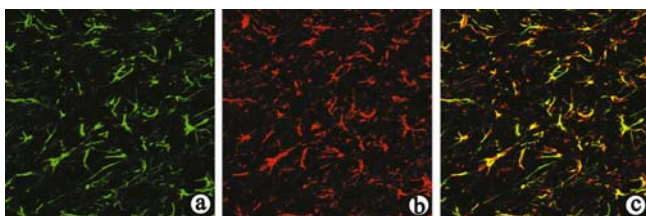
一、免疫荧光双标 CSPG 在星形胶质细胞表达情况

造模 60 d 时假手术组中星形胶质细胞数目很少, 细胞形态多为分枝状, 胞体较小, 极少数为 CSPG 阳性, 阳性率为 $(8.4 \pm 2.33)\%$, 见图 1; 模型组损伤周围区域 GFAP/CSPG 双标阳性的细胞数目明显增加, 阳性细胞数为 $(65.80 \pm 3.69)\%$, 与假手术组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 胞体变大变圆 (图 2); 运动训练组可以显著抑制 CSPG 在星形胶质细胞的表达, GFAP/CSPG 双标阳性的细胞数目较模型组减少 (图 3), 阳性细胞数为 $(19.50 \pm 1.17)\%$, 与 SCI 组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。



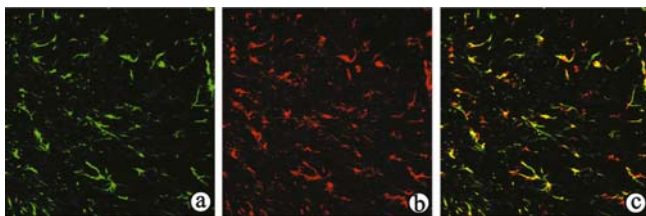
注: a 为 GFAP 图; b 为 CSPG 图; c 为 Merge 图

图 1 假手术组脊髓损伤灶周围区域星形胶质细胞表达 CSPG 情况 (免疫荧光双标, $\times 200$)



注: a 为 GFAP 图; b 为 CSPG 图; c 为 Merge 图

图 2 模型组脊髓损伤灶周围区域星形胶质细胞表达 CSPG 情况 (免疫荧光双标, $\times 200$)



注: a 为 GFAP 图; b 为 CSPG 图; c 为 Merge 图

图 3 运动训练组脊髓损伤灶周围区域星形胶质细胞表达 CSPG 情况 (免疫荧光双标, $\times 200$)

二、Western Blot 的 CSPG 表达情况

Western Blot 显示, 假手术组 CSPG 表达微弱, 模型组 60 d 时 CSPG 蛋白的表达明显升高, 运动训练可以显著抑制这一升高的趋势 (图 4)。假手术组 CSPG 表达水平为 100%, 模型组为 $(189.00 \pm 11.75)\%$, 运

动训练组为 $(117.00 \pm 9.63)\%$, 与 SCI 组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

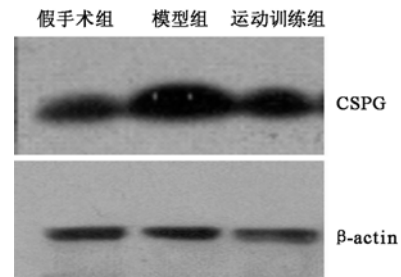


图 4 脊髓损伤灶周围区域 CSPG 蛋白表达水平 (Western Blot)

三、Bielschowsky 银染显示神经纤维

造模 60 d 时 Bielschowsky 银染结果显示, 假手术组神经纤维银染呈棕黄色着色, 排列整齐, 结构清晰, 没有明显溃变 (图 5a); 模型组轴突排列紊乱, 解剖联系中断, 有大量空洞形成 (图 5b); 而运动训练组轴突结构清晰, 分布均匀呈条索样 (图 5c); 提示运动训练可以促进轴突再生。



注: a 为假手术组; b 为模型组; c 为运动训练组

图 5 脊髓损伤后轴突再生情况 (银染, $\times 100$)

四、运动功能评分比较

改良的 Tarlov 评分结果发现, SCI 后 1 d 时比格犬均表现为完全性的后肢功能缺损, 提示模型建立成功。造模 60 d 时模型组和运动训练组后肢的运动功能较损伤后 1 d 时均有所改善, 模型组的改良 Tarlov 评分为 3.30 ± 0.07 , 运动训练组为 4.20 ± 0.23 , 两组之间差异明显 ($P < 0.05$), 提示运动训练可以显著改善脊髓损伤后大鼠的后肢运动功能 (图 6)。

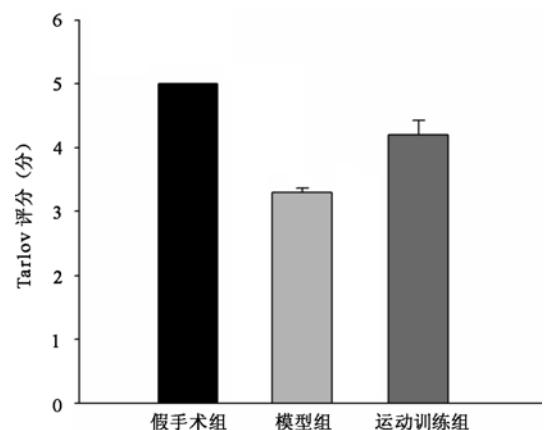


图 6 3 组比格犬脊髓损伤后运动功能评分

讨 论

本研究发现 SCI 后运动训练可以通过减少星形胶质细胞产生轴突再生抑制因子,改善损伤周围微环境,促进轴突再生并使得再生的轴突向损伤部位以下节段生长,运动功能评分也得以改善。提示 SCI 后运动训练作为一种有效的干预手段有望成为脊髓损伤新的治疗措施。

成年哺乳动物 CNS 损伤后轴突往往不能有效再生,而造成不可逆性的神经功能缺损。影响 CNS 有效修复的原因可以归结于以下两方面的作用:①CNS 神经元本身缺乏发生有效的再生能力;②它们的再生被抑制性的微环境所影响。后者可能起着更为重要的作用,其中以星形胶质细胞为主要成分的胶质瘢痕,以及其产生的一些抑制性因子,被认为是影响 CNS 损伤后轴突再生的关键因素之一^[1]。

脊髓损伤后星形胶质细胞明显活化增殖,表现为胞体肥大,突起增多增粗、中间纤维如 GFAP 的表达升高,并与活化增殖的小胶质细胞一起形成反应性胶质增生(reactive gliosis),最终形成致密的胶质瘢痕^[1,5]。CNS 损伤早期,胶质瘢痕成分主要由星形胶质细胞、小胶质细胞、少突胶质细胞和浸润的巨噬细胞组成;损伤后期星形胶质细胞逐渐替代其它细胞成分而成为最主要的组成成分^[6,7]。胶质瘢痕的形成虽然可以填充组织缺损,阻止正常细胞进一步受到损害,但更重要的是,瘢痕形成的物理屏障及其大量分泌的以 CSPG 为主要成分的抑制因子也会妨碍神经轴突的出芽性生长,阻碍神经环路的形成,从而影响机体的结构重建和功能恢复^[8,9]。

CSPG 是一组共价结合硫酸葡聚糖链的细胞外基质蛋白,在受损的 CNS 中主要是由活化增生的星形细胞产生,也可由少突胶质细胞前体细胞和脑脊膜细胞产生^[10]。CSPG 对细胞及细胞基质之间的信息转导和交流起至关重要的作用,影响轴突延长、轴突的路径选择等^[11]。Davies 等^[12]将背根神经元的生长轴突植入含丰富 CSPG 的瘢痕周围,当再生轴突达到瘢痕表面,接触到瘢痕中的 CSPG 后即停止生长,表明 CSPG 对 SCI 损伤后的轴突再生有着明显的抑制作用。Bradbury 等^[13]用软骨素酶降解损伤脊髓内的 CSPG,能明显促进感觉和运动轴突的再生,并恢复一定的机体功能。本研究发现,脊髓损伤后 CSPG 在胶质瘢痕中的表达明显增多,大部分与 GFAP 的表达重叠,直接提示 CSPG 可能大部分由星形胶质细胞合成分泌,并为神经元轴突再生的重要抑制因子;而脊髓损伤后运动训练可以明显减弱星形胶质细胞活化和增殖,抑制胶质瘢痕形成,有效降低 CSPG 在星形胶质细胞的表达。

银染结果也表明,轴突再生明显,并向损伤节段下方生长。研究还发现,脊髓损伤后运动训练能够明显改善比格犬瘫痪后肢的运动功能,由此推测其机制可能为脊髓损伤后运动训练抑制胶质细胞产生的 CSPG 等轴突再生抑制因子,有效地改善 SCI 后轴突再生微环境,最终有利于轴突再生和损伤后瘫痪后肢的功能恢复。本研究提示,脊髓损伤后运动训练可能通过改善 CNS 损伤后轴突的再生微环境而成为未来治疗的一个新措施。

参 考 文 献

- [1] Silver J, Miller JH. Regeneration beyond the glial scar. *Nat Rev Neurosci*, 2004, 5:146-156.
- [2] Bareyre FM, Kerschensteiner M, Raineteau O, et al. The injured spinal cord spontaneously forms a new intraspinal circuit in adult rats. *Nat Neurosci*, 2004, 7:269-277.
- [3] Zhu Z, Zhang Q, Xie M, et al. Inhibiting cell cycle progression reduces reactive astrogliosis initiated by scratch injury in vitro and by cerebral ischemia in vivo. *Glia*, 2007, 55:546-558.
- [4] Rokert AA, Al Jadid MS, Bin AS, et al. The effects of different rehabilitation strategies on the functional recovery of spinal cord injured rats; a experimental study. *Spine*, 2010, 35: E1273-E1277.
- [5] Kerasidis H, Wrathall JR, Gale K. Behavioral assessment of functional deficit in rats with contusive spinal cord injury. *J Neurosci Methods*, 1987, 20:167-179.
- [6] Fitch MT, Silver J. Activated macrophages and the blood-brain barrier: inflammation after CNS injury leads to increases in putative inhibitory molecules. *Exp Neurol*, 1997, 148:587-603.
- [7] Li HP, Homma A, Sango K, et al. Regeneration of nigrostriatal dopaminergic axons by degradation of chondroitin sulfate is accompanied by elimination of the fibrotic scar and glia limitans in the lesion site. *J Neurosci Res*, 2007, 85:536-547.
- [8] Morgenstern DA, Asher RA, Fawcett JW. Chondroitin sulphate proteoglycans in the CNS injury response. *Prog Brain Res*, 2002, 137:313-332.
- [9] Jones LL, Margolis RU, Tuszynski MH. The chondroitin sulfate proteoglycans neurocan, brevican, phosphacan, and versican are differentially regulated following spinal cord injury. *Exp Neurol*, 2003, 182:399-411.
- [10] Tang X, Davies JE, Davies SJ. Changes in distribution, cell associations, and protein expression levels of NG2, neurocan, phosphacan, brevican, versican V2, and tenascin-C during acute to chronic maturation of spinal cord scar tissue. *J Neurosci Res*, 2003, 71:427-444.
- [11] Snow DM, Brown EM, Letourneau PC. Growth cone behavior in the presence of soluble chondroitin sulfate proteoglycan (CSPG), compared to behavior on CSPG bound to laminin or fibronectin. *Int J Dev Neurosci*, 1996, 14:331-349.
- [12] Davies SJ, Goucher DR, Doller C, et al. Robust regeneration of adult sensory axons in degenerating white matter of the adult rat spinal cord. *J Neurosci*, 1999, 19:5810-5822.
- [13] Bradbury EJ, Moon LD, Popat RJ, et al. Chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord injury. *Nature*, 2002, 416:636-640.

(修回日期:2011-09-26)

(本文编辑:汪 玲)