

·基础研究·

运动训练对脊髓损伤后痉挛大鼠脊髓内钾-氯离子协同转运体2表达的影响*

方 露¹ 李向哲¹ 王红星² 谢财忠³ 丁 洁¹ 王 彤^{2,4}

摘要

目的:研究运动训练对脊髓损伤(SCI)后痉挛大鼠行为学表现及脊髓内钾-氯离子协同转运体2(KCC2)表达的影响,探讨KCC2在运动训练的解痉效应中的作用。

方法:将30只雌性SD大鼠随机分为假手术组、对照组、实验组。采用改良Allen撞击法建立脊髓损伤后痉挛模型,使用BBB评分、Ashworth评分来评估三组大鼠术后行为学变化,并于术后5周用免疫组化技术检测各组大鼠损伤远段脊髓KCC2表达。

结果:假手术组术后行为学评分一直保持正常。术后1d—5周,对照组和实验组的BBB评分均持续升高,且2组组内不同时间点的BBB评分差异均有显著性意义($P<0.05$)。术后2—5周,实验组评分均高于对照组,且差异均有显著性意义($P<0.05$)。对照组和实验组在术后1周左右出现痉挛,后痉挛程度逐渐加重,至术后5周左右降低,2组组内不同时间点的Ashworth评定结果差异均有显著性意义($P<0.05$)。术后3—5周,对照组评定等级均高于实验组,差异有显著性意义($P<0.05$)。三组大鼠脊髓运动神经元胞膜上KCC2表达水平比较,组间差异有显著性意义($P<0.05$)。与假手术组相比,其余两组大鼠KCC2蛋白表达下调($P<0.05$);与对照组相比,实验组能够明显上调KCC2蛋白的表达($P<0.05$),但仍低于假手术组($P<0.05$)。

结论:运动训练可以促进脊髓损伤后运动功能恢复,有效缓解痉挛,并可抑制KCC2表达的下调,运动训练的解痉效应可能是通过增加KCC2表达实现的。

关键词 运动训练;脊髓损伤;痉挛;钾-氯离子协同转运体2

中图分类号:R493;R651.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2017)-12-1326-05

Effects of exercise training on the expression of potassium-chloride cotransporter-2 in injured spinal cord of spastic rats/FANG Lu, LI Xiangzhe, WANG Hongxing, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2017, 32(12): 1326—1330

Abstract

Objective: To investigate the effect of exercise training on the behaviors and expression of potassium-chloride cotransporter-2 (KCC2) in injured spinal cord of spastic rats and explore the role of KCC2 in the antispasmodic effect of exercise training.

Method: Thirty female SD rats were randomly divided into three groups: sham operation group, control group, and experimental group. The spastic rat model with spinal cord injury (SCI) was induced by modified Allen's method, the change of behavior after operation was evaluated with the Ashworth scale and BBB scale. The expression of KCC2 in injured spinal cord was examined by immunohistochemistry at the 5th week post injury.

Result: The behavior of sham operation group didn't change. From the first day to fifth week after the operation, the BBB values of control group and experimental group both increased, and each group showed statisti-

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2017.12.002

*基金项目:国家自然科学基金面上项目(81171851、81672258)

1 南京医科大学第一临床医学院,江苏南京,210029; 2 南京医科大学第一附属医院康复中心; 3 南京军区南京总医院; 4 通讯作者
作者简介:方露,女,硕士研究生; 收稿日期:2017-04-28

cally significant in the scales at different time after the operation ($P<0.05$). At the 2nd-5th week, the BBB values of experimental group were higher than control group, and the differences between the 2 groups were statistically significant ($P<0.05$). Spasticity occurred about one week after the operation in control group and experimental group, and gradually aggravated afterwards. About 5 weeks after the operation, spasticity was somewhat alleviated. the Ashworth values was statistical significant at different time after the operation in each group ($P<0.05$). At the 3rd-5th week, the Ashworth values of control group were higher than those of experimental group, and the differences showed statistically significant ($P<0.05$). Immunohistochemistry results showed that there was significant difference in the KCC2 expression among 3 groups ($P<0.05$). Furthermore, compared with the sham operation group, the KCC2 expression upregulated in the other 2 group, compared with the control group, the KCC2 expression of the experimental group upregulated ($P<0.05$), but lower than sham operation group ($P<0.05$).

Conclusion: Exercise training might improve motor function and alleviate spasticity by promoting the KCC2 expression in injured spinal cord of rats with SCI.

Author's address The First Clinical Medical College of Nanjing Medical University, Nanjing, 210029

Key word exercise training; spinal cord injury; spasticity; potassium-chloride cotransporter-2

钾-氯协同转运蛋白-2 (potassium-chloride co-transporter-2, KCC2) 作为一种神经元特异性转运蛋白, 可通过维持胞内低 Cl^- 浓度状态来保持神经元的正常兴奋性, 是抑制性神经递质产生抑制性作用的分子基础^[1]。Boulenguez 等^[2]研究发现, 脊髓损伤 (spinal cord injury, SCI) 后大鼠体内 KCC2 表达水平下调 (尤其是在运动神经元胞膜上) 所导致的氯离子平衡电位的去极化和突触后抑制作用的减弱, 可能是 SCI 后痉挛产生的机制之一。运动训练是一种无创、无害、有效缓解 SCI 后痉挛的治疗方法, 其确切机制尚不明确。本实验拟通过对痉挛大鼠进行运动训练, 检测其行为学变化及 KCC2 表达及分布情况, 探讨运动训练的解痉作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

SPF 级成年雌性 SD 大鼠 (上海西普尔-必凯实验动物有限公司, 许可证号: SCXK (沪) 2013—0016) 30 只, 10 周龄, 体重约 210g。按随机数字表法分为 3 组: 假手术组, 对照组, 实验组, 每组 10 只。主要实验试剂: KCC2 兔多克隆抗体 (ab49917, Abcam), 山羊抗兔 IgG 抗体 (YFSA02, 南京翼飞雪生物技术有限公司)。

1.2 脊髓损伤后痉挛大鼠模型制作

根据文献中所常用的改良 Allen 撞击法^[3-4]来制作 SCI 后痉挛大鼠模型: 10% 水合氯醛 (0.3ml/100g

体重) 腹腔注射麻醉大鼠, 定位 T10 棘突, 常规备皮消毒, 行 T10 椎板切除术, 暴露脊髓。使用 Impactor I 型 SCI 打击器, 令 10g 小棒从 25mm 高处落到暴露的脊髓处, 以制作重度不完全性 SCI 模型。打击成功后可见大鼠后肢及尾巴出现痉挛性抽动, 标志造模成功。逐层缝合肌肉及皮肤, 局部碘伏消毒后放回笼内。术后予保暖、抗感染、辅助排尿等处理。

1.3 BBB 运动功能评分

根据 BBB 评分^[5]对大鼠后肢的运动功能进行评定。将大鼠置于一空旷平台, 观察大鼠后肢的关节活动、负重情况、步态、协调动作和精细动作等。此评分从 0—21 分共有 22 个等级, 等级越高, 后肢运动功能越好。评定前需排空膀胱, 评定过程中保持环境安静。由经过培训的实验外人员分别在 SCI 后 1d、1 周、2 周、3 周、4 周、5 周进行此评定。

1.4 Ashworth 痉挛分级评定

根据 Ashworth 评定^[6]对大鼠后肢的小腿三头肌痉挛程度进行评估。令大鼠仰卧, 测试者一手固定大鼠的头部并轻轻遮住大鼠的眼睛, 待大鼠放松后, 另一手被动活动大鼠踝关节。此评定从 0—4 级共有 5 个等级, 等级越高, 肌张力越高, 痉挛程度越高。评定前需排空膀胱, 评定过程中保持环境安静。由经过培训的实验外人员分别在 SCI 后 1d、1 周、2 周、3 周、4 周、5 周进行此评定。

1.5 运动训练

减重平板训练是国际常用运动训练方法。前期

课题已自行研制多通道减重步行训练系统,速度、减重程度可定量控制^[7]。运动组于损伤后第8天开始减重平板训练(大鼠支撑重量减少20%—40%),运动速度为6m/min,每次20min,每天训练2次,每周训练5d,训练时程为4周。实验组进行如上运动训练,假手术组和对照组不进行运动训练。

1.6 免疫组化

在损伤后5周,即训练结束后,10%水合氯醛腹腔内注射麻醉,4%多聚甲醛心脏灌注固定,取大鼠损伤区下2cm脊髓,经固定、脱水、透明、石蜡包埋。标本切片37℃烘片过夜,56℃烤1h,脱腊水化,3% H₂O₂孵育20min,微波修复抗原,恢复至室温后滴加10%山羊血清封闭液室温下孵育1h。按免疫组化常规步骤进行染色,滴加稀释的KCC2一抗(1:1500, ab49917, Abcam)覆盖标本,4℃过夜。次日复温30min,滴加组化二抗(1:200, YFSA02, 南京翼飞雪生物技术有限公司),DAB显色、中性树脂封片后置于显微镜下观察。KCC2阳性区域染成棕褐色。从每组中挑出免疫阳性运动神经元,采用Image J软件计算表面标记强度/胞体周长,以每组平均标记强度占假手术组平均标记强度的百分比来反映每组脊髓前角运动神经元胞膜上KCC2表达^[8-9]。

1.7 统计学分析

采用SPSS 20.0统计软件对实验结果进行统计学分析。所有计量资料经检验符合正态性和方差齐性。BBB评分使用重复测量方差分析,每个时间点的组间差异比较采用两个独立样本 t 检验,组内不同时间点差异比较采用单因素方差分析;KCC2表达含量使用单因素方差分析,后使用LSD检验进行两两比较。Ashworth评定使用Kruskal Wallis H秩和检验,后使用Nemenyi检验进行两两比较。

2 结果

2.1 行为学变化

2.1.1 BBB运动功能评分:对照组与实验组在时间主效应上的BBB评分差异有显著性意义($F=541.663, P<0.001$),2组在干预方式主效应上的BBB评分差异也有显著性意义($F=20.716, P<0.001$),且时间和干预方式之间存在交互作用($F=20.429, P<0.001$)。

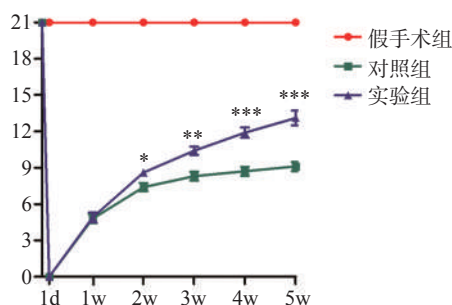
假手术组自苏醒后BBB评分一直保持在21分。术后1d—5周,对照组和实验组的BBB评分均持续升高,且2组组内不同时间点的BBB评分差异均有显著性意义($P<0.05$)。术后1d—1周,对照组与实验组BBB评分比较,差异均无显著性意义($P>0.05$);术后2—5周,实验组评分均高于对照组,且差异均有显著性意义($P<0.05$)。见图1。

2.1.2 Ashworth痉挛分级评定:假手术组自苏醒后肌张力一直保持正常,Ashworth评定为0级。对照组和实验组在术后1周左右出现痉挛,后痉挛程度逐渐加重,至术后5周左右降低,2组组内在不同时间点的Ashworth评定结果差异均有显著性意义($P<0.05$)。术后1—5周时,3组大鼠的Ashworth评定结果比较,差异有显著性意义($P<0.05$);术后1—5周时,对照组评定等级高于实验组,但术后1—2周差异无显著性意义($P>0.05$),至术后3—5周时,差异开始有显著性意义($P<0.05$)。见表1。

2.2 免疫组化检测

2.2.1 KCC2的定位:KCC2主要表达于神经元的胞膜、树突棘和树突干上,但只有胞膜上的KCC2负责维持胞内的低氯状态,位于树突干上的KCC2功能

图1 各组大鼠术后各时间点的BBB评分



注:实验组与对照组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$

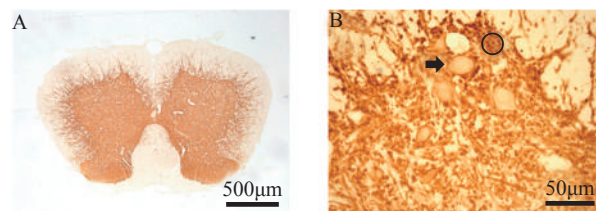
表1 对照组和实验组大鼠术后各时间点的Ashworth评分

	对照组(等级,n=10)					实验组(等级,n=10)					P
	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4	
1d	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	-
1周	2	7	1	0	0	3	6	1	0	0	0.690
2周	0	1	4	5	0	0	3	6	1	0	0.222
3周	0	0	1	7	2	0	2	7	1	0	0.027
4周	0	0	0	7	3	0	2	6	2	0	0.023
5周	1	0	7	2	0	2	5	3	0	0	0.036
P	0.000					0.000					

未明^[9]。使用免疫标记法对KCC2进行定位研究,发现大鼠脊髓灰质被广泛染成棕褐色,前角中运动神经元的胞膜和突起均被深染(图2),与文献结果一致。

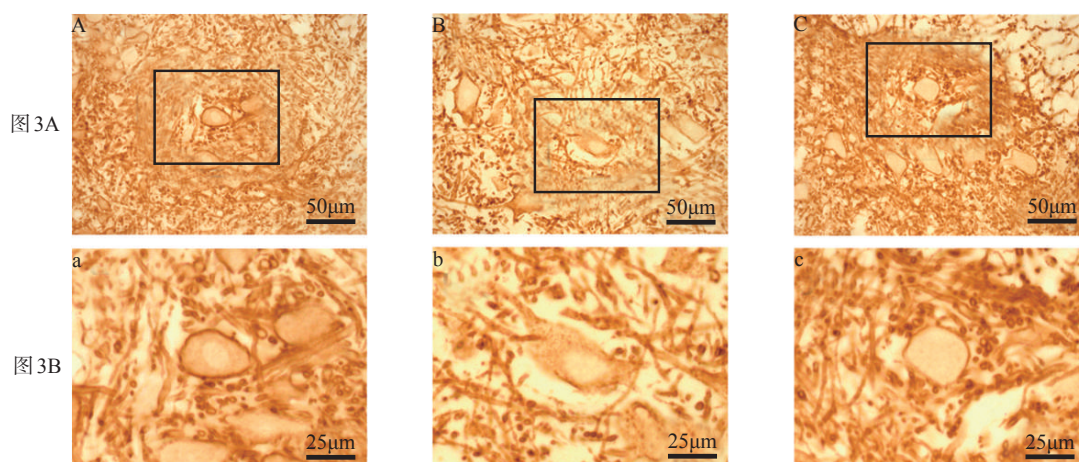
2.2.2 KCC2的表达:三组大鼠脊髓运动神经元胞膜上KCC2表达水平比较,组间差异有显著性意义($P<0.05$)。与假手术组相比,其余两组大鼠KCC2蛋白表达下调($P<0.05$);与对照组相比,实验组能够明显上调KCC2蛋白的表达($P<0.05$),但仍低于假手术组($P<0.05$)。见图3—4。

图2 大鼠脊髓中KCC2的定位 (免疫组化染色)



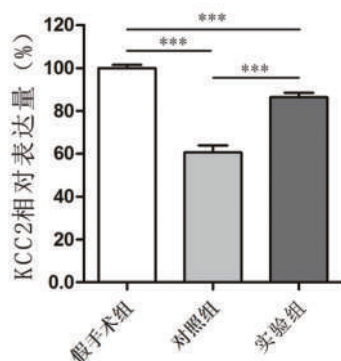
注:A.KCC2在脊髓横切面的分布($\times 50$);B.KCC2在脊髓灰质中的分布,箭头示免疫阳性运动神经元胞膜,圆圈示免疫阳性突起($\times 400$)。

图3 各组大鼠术后脊髓KCC2表达 (免疫组化染色)



注:A/a、B/b、C/c各代表假手术组、对照组、实验组,图a、b、c是图A、B、C($\times 400$)方框内区域放大后的图片。

图4 各组大鼠术后5周的KCC2表达



注:组间两两比较,*** $P<0.001$

3 讨论

痉挛状态是脊髓损伤后一种常见的康复问题,它限制了运动的范围,降低了运动的灵巧性,导致异

常姿势和疼痛的产生,严重影响患者的日常生活活动和个人卫生清洁^[10]。目前脊髓损伤后痉挛产生的机制尚不明确,主流的观点认为是由于各种脊髓上抑制神经通路兴奋性的改变和运动神经元兴奋性的增强^[11]。 γ -氨基丁酸、甘氨酸是最常见的抑制性神经递质,而它们受体的激活依赖于细胞内的低 Cl^- 状态^[12]。KCC2作为一种神经元特异性转运蛋白,是 Cl^- 转运至胞外的主要通道,也是维持正常或成熟神经细胞的超极化膜平衡电位(维持正常神经元胞内低 Cl^- 浓度状态)的基础。当抑制性神经递质激活其相应受体门控离子通道后,胞外 Cl^- 向胞内转移,从而产生超极化膜电位而抑制神经元的活性^[12]。在SCI等病理状态下,运动神经元胞膜的KCC2分布会减少,导致了胞内 Cl^- 聚集。当抑制性神经递质作用

于相应受体后,CI内流减少,甚至产生CI外向流动,最终细胞膜发生去级化,兴奋性增加^[13]。

痉挛的治疗方法多种多样,包括临床常用的口服解痉药、化学性神经毁损法(苯酚或乙醇注射)、肉毒毒素肌肉注射、外科介入^[14],以及我们康复科常用的理疗、手法牵伸、运动疗法等^[15]。其中,运动疗法作为一种安全、无毒、无害的治疗方法,其临床解痉效果已受到肯定^[16-17],有文献指出^[12,18],运动训练可通过促进KCC2表达来缓解痉挛。

本实验行为学评估发现,SCI后对照组和实验组BBB评分均逐渐增加,但均低于假手术组,而实验组评分一直高于对照组;SCI后对照组和实验组痉挛程度较假手术组均逐渐增加,但实验组相较于对照组,Ashworth评定等级较低,以上结果表明运动训练可以促进脊髓损伤后运动功能的恢复,并有效缓解痉挛。免疫组化检测脊髓KCC2表达,发现实验组表达量低于假手术组,但高于对照组,说明运动训练可显著上调脊髓中KCC2水平。

本研究一定程度上为临床运动解痉提供了依据和指导,但是有关KCC2的上下游调质以及各信号分子在痉挛产生过程中的具体机制仍不十分清楚。脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)及其酪氨酸激酶受体B(tyrosine kinase receptor B, TrkB)可影响KCC2的表达和功能活动^[12],Syoichi^[12]等通过使用TrkB阻滞剂取消了运动训练所带来的促进KCC2表达和缓解痉挛的作用,反向证明了BDNF/TrkB在运动训练促进KCC2表达从而缓解痉挛中的作用。本课题前期研究也发现,运动训练可通过增加损伤脊髓下段BDNF/TrkB的表达,促进SCI大鼠运动功能恢复^[19-20]。那么,运动训练是否同样可以通过促进BDNF/TrkB的表达来缓解痉挛呢? BDNF/TrkB表达的增加与KCC2表达的增加又存在着何种联系呢? 以上问题尚待研究。

参考文献

- [1] 李向哲,王彤. 脑源性神经营养因子对脊髓损伤后痉挛影响的研究进展[J]. 中国康复医学杂志,2016, 31(11): 1289—1292.
- [2] Boulenguez P, Liabeuf S, Bos R, et al. Down-regulation of the potassium-chloride cotransporter KCC2 contributes to spasticity after spinal cord injury[J]. Nat Med, 2010, 16(3): 302—307.
- [3] 曹雅娜,王红星,王彤,等. A型肉毒毒素注射联合运动训练对脊髓损伤大鼠运动功能及腓肠肌功能的影响[J]. 中华物理医学与康复杂志,2014, 36(12): 902—906.
- [4] 刘斯佳. BTXA对脊髓源性痉挛大鼠运动神经元兴奋性的影响[D]. 昆明医科大学, 2014.
- [5] Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats[J]. J Neurotrauma, 1995, 12(1): 1—21.
- [6] Dong HW, Wang LH, Zhang M, et al. Decreased dynorphin A (1-17) in the spinal cord of spastic rats after the compressive injury[J]. Brain Research Bulletin, 2005, 67(3): 189—195.
- [7] 徐冬晨,王红星,王彤. 大鼠部分重量支撑平板训练新模型在不完全性脊髓损伤运动功能改善中的应用[J]. 中国康复医学杂志,2010, 25(8): 721—724.
- [8] Wang Y, Chen Y, Chen L, et al. Cortical stimulation causes long-term changes in H-reflexes and spinal motoneuron GABA receptors[J]. J Neurophysiol, 2012, 108(10): 2668—2678.
- [9] Toda T, Ishida K, Kiyama H, et al. Down-regulation of KCC2 expression and phosphorylation in motoneurons, and increases the number of in primary afferent projections to motoneurons in mice with post-stroke spasticity[J]. PloS One, 2014, 9(12): e114328.
- [10] Gunduz A, Kumru H, Pascual-Leone A. Outcomes in spasticity after repetitive transcranial magnetic and transcranial direct current stimulations[J]. Neural Regen Res, 2014, 9(7): 712—718.
- [11] Rekand T, Hagen EM, Gronning M. Spasticity following spinal cord injury[J]. Tidsskr Nor Laegeforen, 2012, 132(8): 970—973.
- [12] Tashiro S, Shinozaki M, Mukaino M, et al. BDNF induced by treadmill training contributes to the suppression of spasticity and allodynia after spinal cord injury via upregulation of KCC2[J]. Neurorehabil Neural Repair, 2015, 29(7): 677—689.
- [13] Gackiere F, Vinay L. Contribution of the potassium-chloride cotransporter KCC2 to the strength of inhibition in the neonatal rodent spinal cord in vitro[J]. J Neurosci, 2015, 35(13): 5307—5316.
- [14] Sezer N, Akkus S, Ugurlu FG. Chronic complications of spinal cord injury[J]. World J Orthop, 2015, 6(1): 24—33.
- [15] Dietz V, Sinkjaer T. Spasticity[J]. Handb Clin Neurol, 2012, 109: 197—211.
- [16] Stampacchia G, Rustici A, Bigazzi S, et al. Walking with a powered robotic exoskeleton: Subjective experience, spasticity and pain in spinal cord injured persons[J]. NeuroRehabilitation, 2016, 39(2): 277—283.
- [17] 柳尧花,王丽华,王玉英,等. MOTOMed运动训练对脊髓损伤后肌痉挛的治疗作用[J]. 海军医学杂志, 2013, 34(6): 377—379.
- [18] Cote MP, Gandhi S, Zambrotta M, et al. Exercise modulates chloride homeostasis after spinal cord injury[J]. J Neurosci, 2014, 34(27): 8976—8987.
- [19] 刘兴波,雷晓婷,刘源,等. 大鼠脊髓损伤后神经生长因子BDNF轴突导向因子slit-2的表达变化[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2008, 28(7): 868—871.
- [20] 雷晓婷,刘兴波,王红星,等. 康复训练对脊髓损伤后大鼠脊髓内再生微环境的影响[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2009, 29(4): 429—434.