

运动训练对脊髓损伤大鼠 Nogo-A、NgR mRNA 表达的影响*

周治来¹ 陈银海^{2,3} 靳安民¹ 刘 巍²

摘要

目的:探讨运动训练对脊髓损伤(SCI)大鼠髓鞘源性神经抑制因子(Nogo-A)及其受体(NgR)mRNA 表达的影响。

方法:44只SD大鼠随机分为运动训练组16只、损伤组16只及假手术组12只,采用改良Allens打击法制作大鼠T10脊髓损伤模型。造模后每周应用BBB评分法观察大鼠后肢运动功能,在第8、10、14天处死大鼠,每组4只,以荧光定量PCR法测定不同时间点脊髓组织中Nogo-A与NgR mRNA相对含量。

结果:手术后第4—8周,运动训练组大鼠BBB评分明显高于SCI组;运动训练组与SCI组Nogo-A与NgR mRNA表达明显高于假手术组($P<0.05$),随着时间推移,运动训练组与SCI组Nogo-A与NgR mRNA表达量趋于下降。术后第8、10天,SCI组Nogo-A mRNA表达均显著高于运动训练组与假手术组($P<0.05$),至第14天,运动训练组与SCI组表达差异无显著性意义($P>0.05$),但均高于假手术组($P<0.05$),假手术组在各时间点表达差异均无显著性意义($P>0.05$);SCI组在各时间点NgR mRNA表达均高于运动训练组与假手术组($P<0.05$),运动训练组在第10天便下降至与假手术组差异无显著性意义($P>0.05$),假手术组在各时间点表达无差异($P>0.05$)。

结论:康复训练能减少Nogo-A、NgR mRNA的表达,促进脊髓损伤大鼠后肢功能的恢复。

关键词 脊髓损伤;康复训练;Nogo-A;NgR;BBB评分

中图分类号:R651.2,R493 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2011)-02-0143-05

Effects of exercise training on the expressions of Nogo-A、NgR mRNA in spinal cord injury rats/ZHOU Zhilai, CHEN Yin Hai, JIN Anmin, et al.//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2011, 26(2): 143—147
Abstract

Objective:To explore the effects of exercise training on the expression of Nogo-A and its receptor NgR in spinal cord injury(SCI) rats.

Method: Forty-four Sprague-Dawley rats were assigned into two groups (test group 32 rats and sham-operated group 12 rats) randomly. Rats of test group experienced modified Allen impactor (H=25mm) at T10, then were randomly divided into 2 groups equally: training-treated group and SCI group. The hindlimbs movement was assessed by Basso-Beattie-Bresnahan(BBB) scale and the injured spinal cord tissue was extracted for Nogo-A and NgR mRNA examination through SYBR Green real-time PCR on the 8th, 10th, 14th day after SCI.

Result: Compared with SCI group, the BBB score in exercise training-treated group showed marked improvement between the 4th week and the 8th week after injury ($P<0.05$). Compared with sham-operated group, the expressions of Nogo-A and NgR mRNA in training-treated group and SCI group increased significantly postoperation ($P<0.05$), then declined gradually as time prolonged. The expression of Nogo-A mRNA in SCI group was significantly higher than that in training-treated group and sham-operated group on the 8th and 10th day postoperation ($P<0.05$), there was no significant difference between SCI group and training-treated group on the 14th day, but all higher than that in

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2011.02.013

* 基金项目:广东省自然科学基金项目(8451051501000460)

1 南方医科大学珠江医院骨科中心,广州,510282; 2 南方医科大学珠江医院康复医学科; 3 通讯作者

作者简介:周治来,男,硕士研究生; 收稿日期:2010-01-24

sham-operated group at the three time points, there was no statistical difference among the three time points in sham-operated group. The expression NgR mRNA in SCI group was significant higher than that in the two other groups at three time points; otherwise, that in training-treated group decreased almost the same as that in sham-operated group on the 10th day postoperation ($P>0.05$). There was also no statistical difference among the three time points in sham-operated group.

Conclusion: Exercise training could down-regulate the expressions of Nogo-A and NgR mRNA in SCI rats effectively, and promote functional recovery of hindlimbs.

Author's address Dept. of Orthopedic, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou, 510282

Key word spinal cord injury; rehabilitation training; Nogo-A; NgR; BBB score

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)是一类高致残的中枢神经系统疾病,具有很高的致残率和严重的并发症,脊髓损伤的治疗一直是困扰神经生物学与神经康复学的重大难题。脊髓损伤后其功能恢复能力非常有限,主要原因是损伤后断端神经轴突的再生受到了严重抑制,随着对脊髓损伤研究的深入,相继发现了某些与抑制神经轴突再生相关的因素。2000年,Nogo基因的成功克隆是发现神经生长抑制因子十余年来首次重大突破^[1],目前研究结果证实Nogo-A具有神经轴突再生抑制作用,而NgR介导了Nogo-A的作用^[2]。近年来,康复训练促进脊髓损伤患者的感觉、运动功能已得到公认,但其神经生物学基础尚不清楚。运动训练作为一种康复训练方法,是否能通过减少抑制性因子Nogo-A及其受体NgR的表达而促进脊髓损伤大鼠后肢功能的恢复,为了进一步了解康复训练对脊髓损伤大鼠神经功能恢复的神经生物学基础,探讨其恢复机理,我们建立脊髓损伤大鼠模型,给予康复训练,在不同时间点观察其运动功能和Nogo-A、NgR mRNA表达的变化,为临床治疗提供理论及实践基础。

1 材料与方法

1.1 主要实验仪器

ABI7000 荧光定量 PCR 仪、滚筒式网状训练器(长 100 cm、直径 60 cm 的圆形网状仪器,底座有一固定架,一端有一手摇柄)、自制跑步训练器(5cm×5cm×13cm 的塑料箱,内置小型跑步机,在距跑步机 1cm 处有一平台)。

1.2 主要实验试剂

TRIzol 试剂盒:invitrogen, First Strand cDNA Synthesis Kit: Fermentas。

1.3 实验动物与分组

选用广东省医学实验动物中心提供的 SPF 级健康成年 SD 大鼠 44 只,雌雄不拘。体质量 180—237g,平均(213.79±11.52)g。将造型成功的大鼠随机分为:脊髓损伤组(SCI)(A组)16只,损伤后不进行特殊处理;脊髓损伤加康复训练组(B组)16只,损伤后对其进行康复训练,方法见下。对照组(C组)12只,进行假手术处理,只咬除椎板,不损伤脊髓。

1.4 实验方法

1.4.1 大鼠 SCI 模型制备:参照改良的重物打击法制备 T10 脊髓损伤动物模型^[3],打击量为 25g·cm。术后 1 周内每日给予腹腔注射青霉素 20 万单位 2 次以抗感染,并采取自然光照、自由进食及饮水。每日按摩膀胱 2 次至其排尿反射恢复为止。模型成功判断标准:大鼠尾巴出现痉挛性摆动,双下肢回缩样抖动及迟缓性瘫痪。

1.4.2 行为学观察:造型前后双盲法对所有大鼠进行 BBB 评分(Basso-Beattie-Bresnahan, BBB)^[4],由了解 BBB 评分而不了解本实验的人员进行,让每只大鼠在空旷平地上自由活动,每次评 3min,每只大鼠评 3 次,取平均值。完全截瘫为 0 分,正常为 21 分。

1.4.3 康复训练方法:本实验采用运动功能训练方法,包括跑台训练和滚筒式网状训练器,在脊髓损伤前 3 天,将所有大鼠放入康复训练器材内,进行适应性训练。脊髓损伤后,经过 2—3d 当动物 BBB 评分达到 1 分后立刻进行两种训练方法。①滚筒训练:将大鼠放在自制的网状滚筒训练器之中,以 5 转/min 的转速转动手摇柄,大鼠在圆筒内可进行抓握、攀爬等四肢肌肉运动训练。②跑台训练:参照相关文献^[5]及本人预实验情况,将大鼠前肢固定于跑步机平台上,当大鼠 BBB 评分在 1—6 分时,设定跑台速度

5.8cm/s,当 BBB 评分达到 7 分以上时,设定跑台速度 25cm/s,每天 30min,分 3 次进行,每次 10min,中间隔 5min,每周 5 次。

1.4.4 荧光定量 PCR。①组织材料的处理:于造模后第 8、10 和 14 天麻醉处死动物, A、B 组取出损伤点距近端 5mm 内脊髓组织,每个时间点 4 只, C 组于同一节段取出相应脊髓,为 3 只,将所取出脊髓组织迅速放入含有 1.0ml TRIzol 试剂的 1.5ml 离心管中,立即匀浆,放入 -80℃ 冰箱,以备 Nogo-A、NgR mRNA 水平表达的测定。②总 RNA 的提取:取组织样品至 1.5ml 离心管,加 1ml TRIzol 到离心管中,反复振荡约 5min。室温放置 10min 左右后,每 1ml TRIzol 中加入氯仿为 200 μ l,剧烈振荡约 1min,室温静置 5min,然后 12000g 冷冻离心 15min(4℃),取上清液约 450 μ l (每 1ml TRIzol 的吸取量)至含有 600 μ l 冷冻异丙醇的新离心管中,混匀,-20℃ 放置约 10min,12000g 冷冻离心 10min(4℃)。去上清,加入 500 μ l 冷冻的 75%乙醇,重悬,12000 转/min 冷冻离心 5min(6℃),去上清,再稍离,吸去上清液。风干约 5—10min,加入 DEPC 水 35 μ l 溶解沉淀,-80℃ 保存。③总 RNA 反转录:反应体系 20 μ l,其成分为: 5 \times 缓冲液 4 μ l, 10mmol/L dNTP 2 μ l,Olig(dT18)和 Ribolock 各 1 μ l, RNA 酶抑制剂 1 μ l,模板 RNA 5 μ l,加消毒去离子水至 20 μ l。反应条件: 37℃ 5min, 42℃ 60min, 70℃ 10min,产物在 -20℃ 保存。④引物合成:参照 GenBank 公布的 Nogo-A、NgR 和 GAPDH cDNA 序列,由广州鲁成生物技术有限公司合成(表 1)。⑤Q-PCR:反应体系 20 μ l,其成分为: Q-PCR Mix10 μ l,ddH₂O4 μ l,PCR Forward Primer(2 μ M) 2 μ l, Reverse Primer(2 μ M) 2 μ l,cDNA(1:5dilute) 2 μ l。反应条件:95℃ 预变性 5min、95℃ 变性 45s、56℃ 退火 45s、72℃ 延伸 20s,40 个循环;行融合曲线分析(NOTE:在实验中也设计了 NTC(No Template Control),其为阴性对照,即在反应中用水来代替模板 cDNA,其他试剂不变,从而来质控是否体系有污染)。

1.5 统计学分析

用 2- $\Delta\Delta$ Ct 法对 QF2 PCR 的结果进行相对定量统计,其中 Δ Ct=检测样品 Ct 值-内参 Ct 值; $\Delta\Delta$ Ct=阳性待测组样品 Δ Ct-正常样品组 Δ Ct。Ct 值

表 1 引物序列

名称	序列
Nogo-A	F:TCCACTCTGCTTTAGTAGTATGCTCTC R:GGGCAGGAAAACCCCTTT
NgR	F:GCGTCTGCTGAAATGCAC R:AAAGTCCCAAATGGAGAGTCATTG
GAPDH	F:CTCCCATTCTCCACCTTTG R:CCACCACCTGTTGCTGTAG

也称循环阈值,指在 Q-PCR 循环过程中荧光信号开始由本底进入指数增长阶段拐点所对应的循环次数。GAPDH 作为定量内参。两两样本比较用独立样本 *t* 检验;3 个样本比较用组间差异,*P*<0.05 为差异有显著性意义。

2 结果

2 只大鼠因在造模 1 周后 BBB 评分即达到 8 分而剔除,1 只因挤压膀胱时不慎膀胱破裂,2 只因泌尿系感染在造模后 1 周时死亡,均及时予以补充。

2.1 大鼠后肢运动功能评分

假手术组大鼠后肢运动功能在术前术后都保持在 21 分,损伤组在 2—4 周时恢复最明显,4—6 周达稳定状态(平台期),以后恢复幅度较小,造模后 10 周时 BBB 评分达(10.75 \pm 0.95)分。运动训练组恢复情况与假手术相似,造模后 1—3 周与假手术组比较无显著性差异(*P*>0.05),在造模后 4 周起, BBB 评分与假手术组比较有显著性差异(*P*<0.05),一直持续到造模后第 8 周,之后损伤组、运动训练组评分无差异(表 2)。

表 2 两组大鼠不同时间点的 BBB 评分 ($\bar{x}\pm s$, n=4)

	损伤组	运动训练组	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
1 周	1.81 \pm 0.75	1.75 \pm 0.77	0.23	0.818
10d	2.25 \pm 0.753	2.85 \pm 0.86	-1.79	0.086
2 周	3.38 \pm 0.52	3.63 \pm 0.52	-0.96	0.35
3 周	5.5 \pm 0.58	5.75 \pm 0.50	-0.65	0.537
4 周	6.5 \pm 0.58	8.0 \pm 0.81 ^①	-3.00	0.024
5 周	8.0 \pm 0.82	9.5 \pm 0.58 ^①	-3.00	0.024
6 周	8.25 \pm 0.50	10.0 \pm 0.82 ^①	-3.62	0.011
7 周	9.0 \pm 0.82	10.5 \pm 0.58 ^①	-3.00	0.024
8 周	9.25 \pm 0.50	10.75 \pm 0.50 ^①	-4.24	0.005
9 周	10.25 \pm 0.96	11.25 \pm 0.50	-1.85	0.114
10 周	10.75 \pm 0.95	11.5 \pm 0.58	-1.34	0.228

①与 A 组比较 *P*<0.05

2.2 荧光定量 PCR

PCR 产物分析 NgR mRNA 表达情况,假手术组 NgR mRNA 在各时间点均呈低水平表达,造模成功

后第 8 天,损伤组和运动训练组 NgR mRNA 表达明显升高,损伤组最高,三组之间差异具有显著性($P<0.05$),之后开始下降,运动训练组第 10 天即下降至与假手术组差异无显著性意义($P>0.05$),损伤组在各时间点均显著高于假手术组($P<0.05$),见表 3。与 NgR mRNA 的表达类似,假手术组 Nogo-A mRNA 在各时间点均呈低水平表达,造模成功后第 8 天,损

伤组和运动训练组 Nogo-A mRNA 表达明显升高,损伤组最高,三组之间差异具有显著性($P<0.05$),之后开始下降,至第 10 天,三组之间差异仍显著($P<0.05$),第 14 天,损伤组与运动训练组之间 Nogo-A mRNA 表达已差异无显著性意义($P>0.05$),但均高于假手术组($P<0.05$),见表 4。

表 3 NgR mRNA 在术后不同时间点的表达

($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	第 8 天	第 10 天	第 14 天
损伤组	4	0.342237±0.0323 ^{①②}	0.15506±0.0102 ^{①②}	0.11128±0.00429 ^{①②}
运动训练组	4	0.136503±0.005869 ^①	0.028252±0.00503	0.028575±0.00325
假手术组	3	0.031102±0.002235	0.03188±0.002597	0.032499±0.00264

①与同时时间点 C 比较 $P<0.05$;②与同时时间点 B 组比较 $P<0.05$

表 4 Nogo-A mRNA 在术后不同时间点的表达

($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	第 8 天	第 10 天	第 14 天
损伤组	4	0.3178799±0.06804 ^{①②}	0.268358±0.01477 ^{①②}	0.1306±0.01278 ^①
运动训练组	4	0.17349±0.014414 ^①	0.167208±0.00627 ^①	0.126657±0.000805 ^①
假手术组	3	0.108637±0.00675	0.101844±0.00795	0.10738±0.00358

①与同时时间点 C 比较 $P<0.05$;②与同时时间点 B 组比较 $P<0.05$

3 讨论

2000 年人们克隆出 Nogo 基因,由于启动子和剪切方式的不同,Nogo 基因编码三种蛋白质:Nogo-A、Nogo-B、Nogo-C。尤其是 Nogo-A,在体内和体外都表现出强烈的抑制轴突生长的作用。Nogo-A 主要由少突胶质细胞产生,存在于 CNS 白质内,可导致生长锥塌陷并抑制神经元突起的延伸,亦可被特异性抗体 IN-1 识别,具有抑制 CNS 再生的作用^[6]。2001 年,Fournier 等人运用碱性磷酸酶融合技术首次发现了 NgR,与 Nogo-A 的细胞外结构域 Nogo-66 结合,从而表现 Nogo-A 对中枢神经的抑制活性。虽然研究证实 NgR 尚需与其他的一些特殊蛋白质结合才能介导轴突抑制作用^[7],但无疑 NgR 是这个过程的中心。研究证实,脊髓损伤后,Nogo-A 和 NgR mRNA 或蛋白表达水平升高^[8],如何减少 Nogo-A 和 NgR 的表达,是促进损伤的脊髓恢复的关键,Freund P 等^[9]证实应用 Nogo-A 抗体可促进灵长类动物脊髓损伤后神经功能的恢复。康复训练促进受损的脊髓组织功能恢复已得到了肯定,但迄今有关康复训练与 Nogo-A、NgR mRNA 在 SCI 中的相关性研究报道鲜见。

对于脊髓损伤及其修复的实验研究来说,脊髓

功能的正确评价是一项重要的内容,BBB 评分广泛应用于评价 SCI 大鼠后肢运动功能,本实验 BBB 评分结果显示,SCI 后所有大鼠评分都在 2 分以下,随着时间推移,评分逐渐增加,但在前 3 周,损伤组、运动训练组评分差异并无显著性意义,这与张军军等人^[10]的研究结果相似,他们在研究细胞移植治疗脊髓损伤大鼠时表明:SCI 后 1—3 周,实验组大鼠与对照组 BBB 评分无显著性差异。本实验中,第 4—8 周,运动训练组评分显著高于损伤组,随后两周,两组评分又无显著差异,这提示运动功能训练可促进 SCI 大鼠运动功能的提前恢复。步星耀^[11]等的研究也认为运动功能训练可以通过训练兴奋瘫痪肌肉,向受损脊髓发放神经修复需求的冲动刺激,改善损伤脊髓的内环境,促进 SCI 后神经功能的恢复。

本实验和 Domeniconi M^[12]都发现,假手术组脊髓组织中均可见少量 Nogo-A、NgR mRNA 表达,这种在正常组织中表达的神经纤维生长抑制蛋白的生理意义可能是对已生长的中枢神经纤维束起界限作用,以免后来生长的纤维束侧枝长入结构已完好的纤维束中。但在成年中枢神经系统损伤后的病理条件下,这些抑制性因子却成为妨碍轴突再生的一个重要因素。本实验发现,脊髓损伤后,损伤组与运动

训练组 Nogo-A 和 NgR mRNA 表达均增高,随时间推移,两组表达量均逐渐下降。对于 Nogo-A mRNA,损伤组 SCI 后第 8 天表达量最高,随后逐渐下降,3 个时间点差异显著,运动训练组在 SCI 后第 8 天表达量即在一较低水平,至第 10 天无显著下降,这提示我们,运动功能训练应在脊髓损伤后尽早进行,争取早期即将 Nogo-A mRNA 降至较低水平。至第 14 天,损伤组、运动训练组表达已无差异,但均高于假手术组,说明运动功能训练可以提高 SCI 大鼠 Nogo-A mRNA 的下降速度,使其在更短时间内即降至一较低水平,而这对神经再生意义重大。我们前期研究结果也表明^[13],早期康复治疗对脊髓损伤患者的功能恢复有着重要意义。彭扬国等^[14]的研究也认为,早期介入康复训练,可以尽可能减少脊髓损伤患者的功能障碍,提高他们的功能独立性。至于为何给予运动功能训练后,Nogo-A mRNA 开始下降不明显,而后又显著下降,尚需进一步研究。对于 NgR mRNA,损伤组表达情况与 Nogo-A 类似,运动训练组却不同,在第 10 天运动训练组 NgR mRNA 即下降至与假手术组无差异,说明运动功能训练不仅能加速 SCI 大鼠 NgR mRNA 的下降,而且使其在观察期内即降至正常水平,据此似乎可以认为,运动功能训练对 SCI 大鼠 NgR mRNA 的影响较对 Nogo-A mRNA 的大。本实验探讨了两种康复训练方法对 SCI 大鼠 Nogo-A、NgR mRNA 表达的影响,为临床治疗提供相应的理论实验基础。

综上所述,运动训练可以有效减少脊髓损伤后 Nogo-A 和 NgR mRNA 的表达,促进脊髓损伤大鼠后肢运动功能的恢复。而在促进功能恢复的同时也必定伴随着对轴突的可塑性、内源性神经干细胞分化等的影响。

参考文献

- [1] Chen MS, Huber AB, van der Haar ME, et al. Nogo-A is a myelin-associated neurite outgrowth inhibitor and an antigen for monoclonal antibody IN-1[J]. *Nature*,2000,403(6768):434—439.
- [2] Fournier AE, Grandpre T, Strittmatter SM. Identification of a receptor mediating Nogo-66 inhibition of axonal regeneration[J]. *Nature*,2001,409(6818):341—346.
- [3] Scheff SW, Rabchevsky AG, Fugaccia I, et al. Experimental modeling of spinal cord injury: characterization of a force-defined injury device[J]. *J Neurotrauma*,2003,20(2):179—193.
- [4] 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.
- [5] Multon S, Franzen R, Poirrier A L, et al. The effect of treadmill training on motor recovery after a partial spinal cord compression-injury in the adult rat [J]. *J Neurotrauma*,2003,20(8):699—706.
- [6] Niederost B, Oertle T, Fritsche J, et al. Nogo-A and myelin-associated glycoprotein mediate neurite growth inhibition by antagonistic regulation of RhoA and Rac1 [J]. *J Neurosci*,2002,22(23):10368—10376.
- [7] Satoh J, Tabunoki H, Yamamura T, et al. TROY and LINGO-1 expression in astrocytes and macrophages/microglia in multiple sclerosis lesions [J]. *Neuropathol Appl Neurobiol*,2007,33(1):99—107.
- [8] 黄洁萍,翁金森,王锋,等. 骨髓间充质干细胞移植对急性脊髓损伤大鼠神经功能恢复及 Nogo-A 表达的影响 [J]. *中国康复医学杂志*,2009,24(7):582—586.
- [9] Freund P, Schmidlin E, Wannier T, et al. Anti-Nogo-A antibody treatment promotes recovery of manual dexterity after unilateral cervical lesion in adult primates—re-examination and extension of behavioral data[J]. *Eur J Neurosci*,2009,29(5):983—996.
- [10] 张军军,陈先,刘兰泽,等. 组织工程化干细胞移植治疗大鼠急性脊髓损伤的研究[J]. *中国康复医学杂志*,2009,24(4):335—337.
- [11] 步星耀,赵红卫,钱宝延,等. 自体骨髓间质干细胞移植联合神经营养因子及综合康复治疗脊髓损伤 [J]. *中华实用诊断与治疗杂志*,2009,(4):329—331.
- [12] Domeniconi M, Cao Z, Spencer T, et al. Myelin-associated glycoprotein interacts with the Nogo66 receptor to inhibit neurite outgrowth[J]. *Neuron*,2002,35(2):283—290.
- [13] 陈银海,姚红华. 早期康复对脊髓损伤患者 ADL 及功能独立性的影响[J]. *中国康复医学杂志*,2007,22(3):252—253.
- [14] 彭扬国,欧耀芬,李培,等. 早期康复对脊髓损伤患者功能独立性的影响[J]. *中国康复医学杂志*,2009,24(10):952—953.