DOI:10.16016/j.1000-5404.201607120

脊髓挫裂伤致大鼠认知功能受损的实验研究

罗泽汝心[1],谭波涛[1],覃小霞[1],伍亚民[2],刘 媛[2],江 龙[2],殷 樱[1],贾功伟[1],虞乐华[1] (400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院康复医学科[1];400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所第三研究室,创伤与烧伤国家重点实验室[2])

[摘要] **目的** 探究脊髓损伤后的认知、情绪改变以及脑内相关区域病理变化和内质网应激相关分子表达情况。**方法** 120 只成年 SD 雌性大鼠分为损伤组和对照组(每组 60 只)。制备脊髓 T_{10} 节段的 Allen 法打击损伤模型(打击力度 20 g×25 mm),对照组只接受椎板切除术。BBB 评分观察损伤后运动功能恢复情况,Morris 水迷宫和高架十字迷宫分别检测大鼠学习记忆功能和情绪改变。尼氏染色观察大脑神经细胞形态数量,快速高尔基体染色检测海马区域树突棘密度。Western blot 检测 GRP78 和 Caspase-12 蛋白在海马区域的表达变化。**结果** 高架十字迷宫检测损伤大鼠进入开臂次数明显减少,水迷宫空间探索测试结果显示损伤动物跨越平台次数明显下降($P<0.05$,$P<0.01$)。尼氏染色和快速高尔基体染色结果显示大鼠皮质和海马区域神经元形态和数量异常,海马区域树突棘密度下降($P<0.05$,$P<0.01$)。Western blot 检测结果显示脊髓损伤后内质网应激相关蛋白 GRP78 表达上调($P<0.05$,$P<0.01$)。**结论** 脊髓损伤后成年大鼠产生持续学习记忆能力下降,同时出现焦虑的情绪变化。这可能与脊髓损伤后海马和皮质区域发生的内质网应激引起海马与皮质区域神经细胞受损有关。

[关键词] 脊髓损伤;认知障碍;情绪变化;脑损伤;内质网应激

[中图法分类号] R-332;R651.2;R749.12 [文献标志码] A

Spinal cord contusion induces cognitive impairment in adult rats

Luo Zeruxin[1], Tan Botao[1], Qin Xiaoxia[1], Wu Yamin[2], Liu Yuan[2], Jiang Long[2], Yin Ying[1], Jia Gongwei[1], Yu Lehua[1] ([1]Department of Rehabilitation Medicine, the Second Hospital Affiliated to Chongqing Medical University, Chongqing, 400010; [2]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Department 3, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042, China)

[**Abstract**] **Objective** To explore the changes of cognition and emotion, morphological alteration of related brain regions, and the expression of endoplasmic reticulum stress related molecules in rats after spinal cord injury. **Methods** A total of 120 adult SD female rats were randomly divided into the injury group and the control group ($n=60$ for each group). Spinal cord injury model was established by inflicting T_{10} segment against 20 g × 25 mm combat strength as Allen method, while the rats of control group only received laminectomy. Basso, Beattie, and Bresnahan (BBB) scores were used to observe the recovery of motor function after injury. The behavioral changes of rats were detected by Morris water maze and elevated plus maze test. The morphology of brain nerve cells and the density of dendritic spines were observed after the Nissl's staining and FD staining. The expression of GRP78 and Caspase-12 protein in the hippocampus was detected by Western blotting. **Results** In overhead cross maze, the entries into open arms were significantly reduced in the rats after injury ($P<0.05$), so was the number of the rats leaping over platform in the water maze test ($P<0.01$). FD staining and Nissl's staining displayed abnormal morphology and number of

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81272159);重庆市教委科研项目(KJ1500237)

[通信作者] 虞乐华,E-mail:yulehuadoc@aliyun.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20161108.1446.005.html

neurons in the cortex and hippocampus in rats after spinal cord injury, and the density of dendritic spines in the hippocampus was decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The results of Western blotting showed that endoplasmic reticulum stress related protein, GRP78WB, was up-regulated ($P < 0.05$). **Conclusion** Spinal cord injury results in declines in continuous learning and memory abilities in adult rats, and anxiety is observed at the same time. It may be related to the impairment of the hippocampus and cortical areas in the hippocampus and cortex induced by endoplasmic reticulum stress after spinal cord injury.

[**Key words**] spinal cord injury; cognitive impairment; emotion changes; brain injuries; endoplasmic reticulum stress

Supported by the General Program National Natural Science Foundation of China (81272159) and the Scientific Research Project of Chongqing Municipal Education Commission (KJ1500237). Corresponding author: Yu Lehua, E-mail: yulehuadoc@aliyun.com

脊髓损伤(spinal cord injury,SCI)后产生的运动和感觉功能障碍一直是学者关注的重点,而认知、情绪改变因各种原因容易被忽略[1]。但已有研究表明,SCI患者会出现不同程度的记忆障碍、焦虑、抑郁等情况[2-4]。伴随预防医学、临床医学和康复医学的相互融入,脊髓损伤患者的治疗与康复逐渐成为一个综合的过程。人们也逐渐意识到该问题的重要性[1]。关于脊髓损伤后认知障碍的研究较少,更缺乏对相关机制的探究。我们在既往研究基础上,采用大鼠脊髓挫裂伤模型,观察伤后不同时间点大鼠的认知功能状况以及大鼠脑内的病理变化,并探索其可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料

雌性成年SD大鼠120只,体质量200~220 g,由第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供。动物生产许可:SCXK(渝)2012-0005。动物饲养及实验过程遵守实验动物管理及保护的有关规定。动物分为实验组和对照组(每组60只,每组下设5个时间点,每个时间点12只)。戊巴比妥钠(德国)、快速高尔基体染色试剂盒(FD rapid golgistain kit,美国)、兔抗大鼠葡萄糖调节蛋白78(glucose regulated protein 78 kD, GRP78, Bioworld,美国)、兔抗大鼠Caspase-12(Bioworld,美国),Allen打击器(RM2007,美国),冰冻切片机(Leica CM1900,德国),电泳仪、电泳槽(Bio-Rad,美国)。

1.2 动物模型建立

动物术前12 h禁食,以1%戊巴比妥钠(4 mL/kg)腹腔注射麻醉。常规备皮,消毒,咬开T_9~T_{11}椎板,显露脊髓。Allen打击器上建立力度为20 g×25 mm的挫裂伤模型。造模以损伤后大鼠后肢发生抽搐后瘫软、尾巴痉挛性摆动为标准。对照组仅显露脊髓,不做损伤处理。分别缝合肌肉和皮肤置于25~28 ℃动物房内。术后护理:每天1次青霉素1.6×10^5 U后腿肌肉丰厚处注射,连续3 d;每天3次按摩膀胱排尿,直到约1周后恢复自主排尿。

1.3 行为学评价

1.3.1 大鼠后肢运动功能(BBB评分) 造模后分别于相应时间点评估BBB评分。检测时对偏离平均值2分以上者剔除,之后补充。由1~2名熟悉BBB评分方法的非本组实验人员进行评分。

1.3.2 高架十字迷宫和Morris水迷宫实验 SCI后8、12周进行。保持室内适宜温度湿度,调节灯光,测试时间5 min,每只老鼠只测试1次,实验前安抚实验对象,充分适应实验环境,实验过程中从十字迷宫掉下地的老鼠予以剔除。记录开放臂进入次数和在迷宫内行进路程。每次实验后清洁器械表面避免留下气味。用Smart 2.0软件分析数据。

分别在损伤后7、11周进行水迷宫的训练和测试(测试时间正好落在第8周和第12周)。测试分为定位航行测试和空间探索测试。定位航行测试连续4 d,训练依次从迷宫的4个象限入水。每天第1次训练(测试)均从目标象限对侧象限头朝内放入水迷宫。前4 d定位巡航测试大鼠每天第1次找到平台的时间为潜伏期。第5天为空间探索测试,取消平台,在90 s内记录大鼠穿越平台次数。Smart 2.0软件(Panlab)分析数据。

1.3.3 病理染色和快速高尔基体染色 相应时间点行为学检测后,灌注动物,OCT冰冻切片包埋剂包埋组织,冰冻切片厚度15 μm行尼氏染色,观察海马皮质区域神经细胞形态。

快速高尔基体染色按说明进行换液染色。每组取4~6只样本,放入-80℃低温速冻后制备60 μm冰冻切片,切至完整海马区域且背景清晰5~10张切片。每张脑片观察海马区域末端树突,在400倍油镜下观察海马区域清晰基树突末端,统计方法以每10 μm树

突棘个数反映树突棘密度[5]。

1.3.4　Western blot 检测　　相应时间点取出海马组织冻存于液氮,收集完成各组标本后取出放入 PIPA 裂解液与蛋白酶抑制剂混合液中。经过研磨、低温超速离心、取上清液等过程,最后 BCA 试剂盒测蛋白浓度得到各组蛋白。之后进行凝胶电泳,曝光仪曝光条带并分析各组条带灰度值。

1.4　统计学分析

采用 SPSS 19.0 统计软件进行分析,所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 来表示。Morris 水迷宫实验潜伏时检测采用单因素方差分析。其余数据均用独立样本 t 检验,检验水准 $\alpha = 0.05$。

2　结果

2.1　一般情况

与对照组比较,损伤组大鼠精神萎靡,双下肢软瘫,并且出现尿潴留。1 周内部分大鼠出现血尿等现象,随着时间推移好转。10 d 左右可基本自主排尿。损伤组手术苏醒后评分均为 0,即损伤后后肢完全性瘫痪。术后各时间点损伤组和对照组比较,差异有统计学意义($P<0.01$,图 1)。

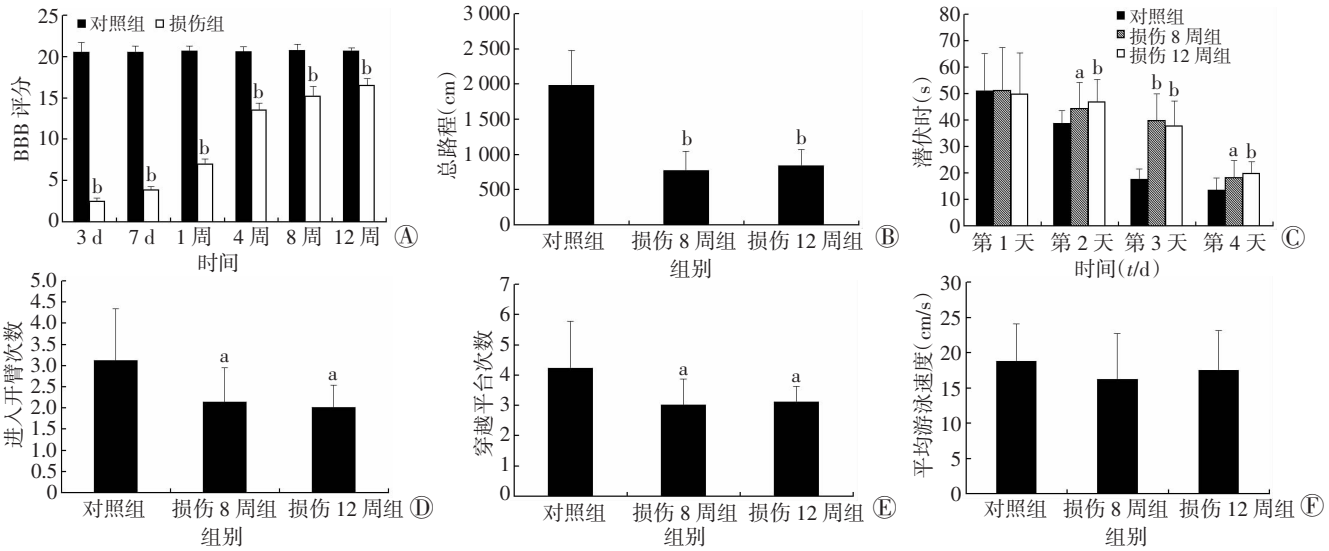
2.2　脊髓损伤大鼠高架十字迷宫和 Morris 水迷宫检测结果

高架十字迷宫检测结果显示,损伤大鼠进入开臂次数减少,相比对照组差异有统计学意义($P<0.05$)。但随着时间的推移,没有更加严重的迹象。动物活动的总路程有显著下降($P<0.01$),对照组大鼠平均活动总路程约为 20 m,损伤 8 周或 12 周后,大鼠平均活动总路程均在 10 m 之内。这提示大鼠在 SCI 后出现探索行为减弱的表现(图 1)。

水迷宫实验中,SCI 大鼠的定位巡航潜伏时间均出现下降趋势,结果显示,损伤大鼠潜伏时间在巡航的 2~4 d 均有所延长,差异具有统计学意义($P<0.05$,$P<0.01$)。探索实验结果显示,损伤 8 周和 12 周后的动物穿越平台的次数明显低于对照组($P<0.05$),且记录各组平均游泳速度差异无统计学意义($P>0.05$)。以上说明大鼠的空间记忆和学习能力在损伤后有所下降,但因损伤造成的运动功能损害对该行为学测试的影响可忽略(图 1)。

2.3　脊髓损伤大鼠脑组织尼氏染色观察

对照组海马与皮质区域椎体细胞排列整齐结构紧密,形态完整。而损伤组大鼠海马各区域以及部分皮质出现了病理改变。其中以齿状回、CA2 和 CA3 区域改变最明显,该区神经元细胞排列稀疏,结构紊乱。在皮质区域也可见锥体细胞减少、染色变浅等现象。这种变化早在 SCI 后 4 周即可发现,并持续到损伤后 12 周($P<0.05$,$P<0.01$)皮质区域在 SCI 后 8 周起也出现了神经细胞减少($P<0.05$,$P<0.01$,图 2、3)。



A:BBB 评分;B:高架十字迷宫动物活动路程;C:高架十字迷宫进入开臂平均用时;D:水迷宫测试平均潜伏时;E:水迷宫测试穿越平台次数;F:水迷宫测试平均游泳速度　a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与对照组比较

图 1　各组大鼠 BBB 评分、高架十字迷宫和 Morris 水迷宫检测结果

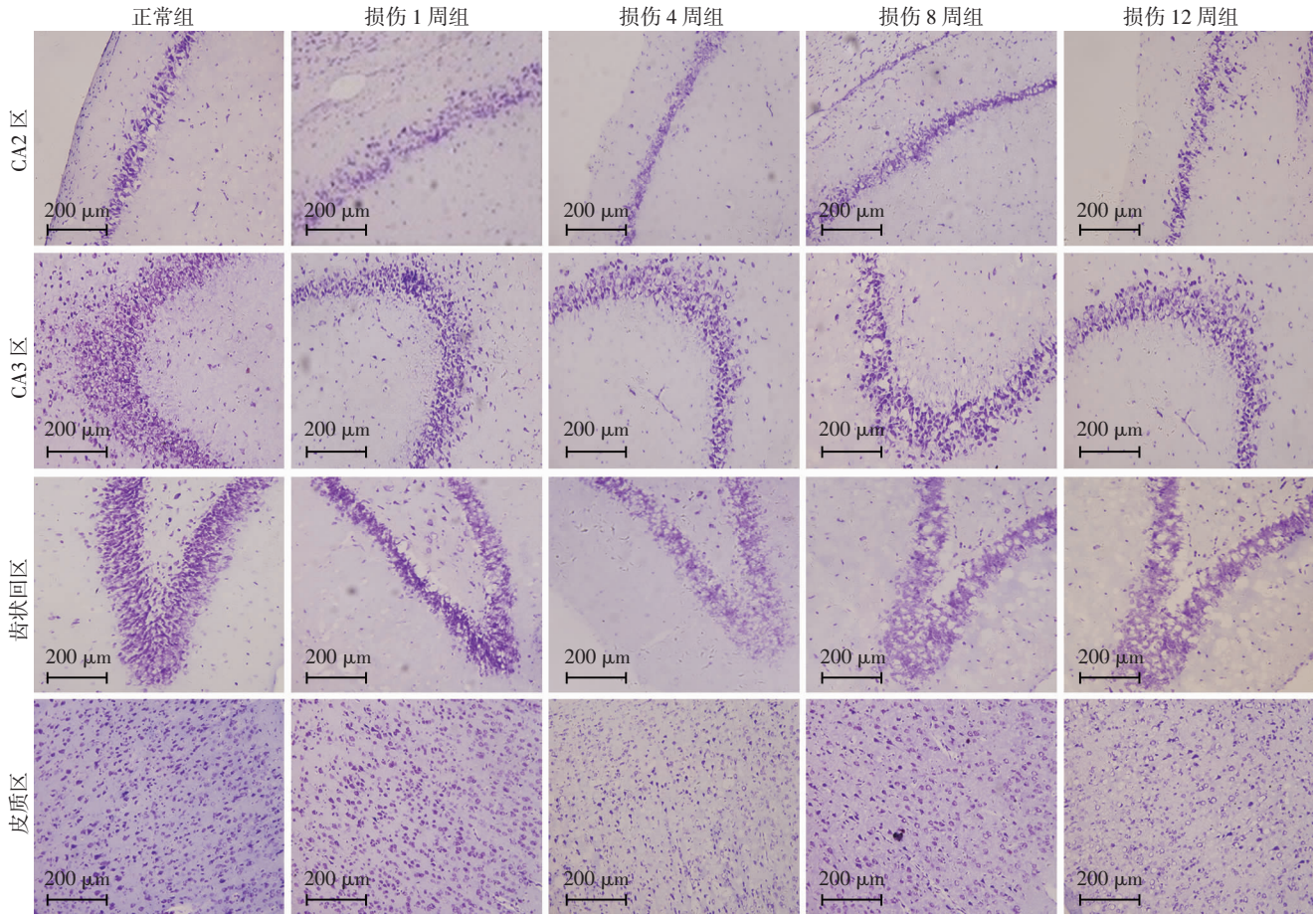
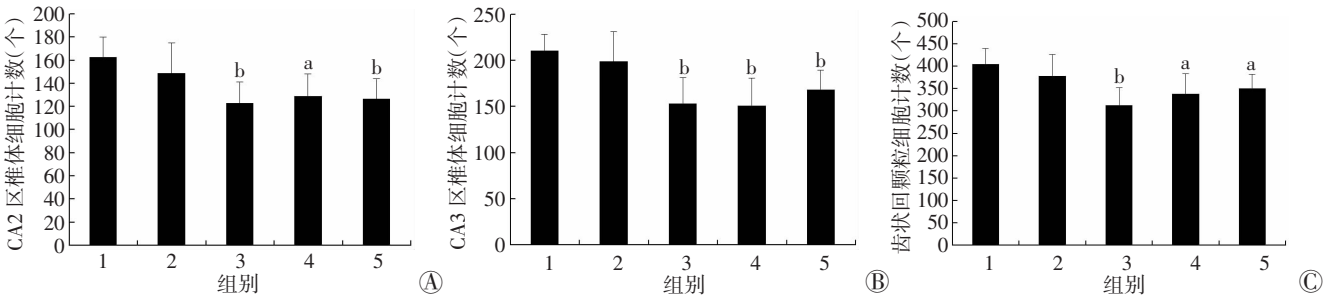


图 2　各组大鼠海马与皮质区域尼氏染色结果



1:对照组;2:损伤 1 周组;3:损伤 4 周组;4:损伤 8 周组;5:损伤 12 周组　A:CA2 区椎体细胞计数;B:CA3 区椎体细胞计数;C:齿状回颗粒细胞计数　a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与对照组比较

图 3　各组大鼠海马皮质各个区域尼氏染色结果定量分析

2.4　脊髓损伤大鼠脑组织树突棘染色观察

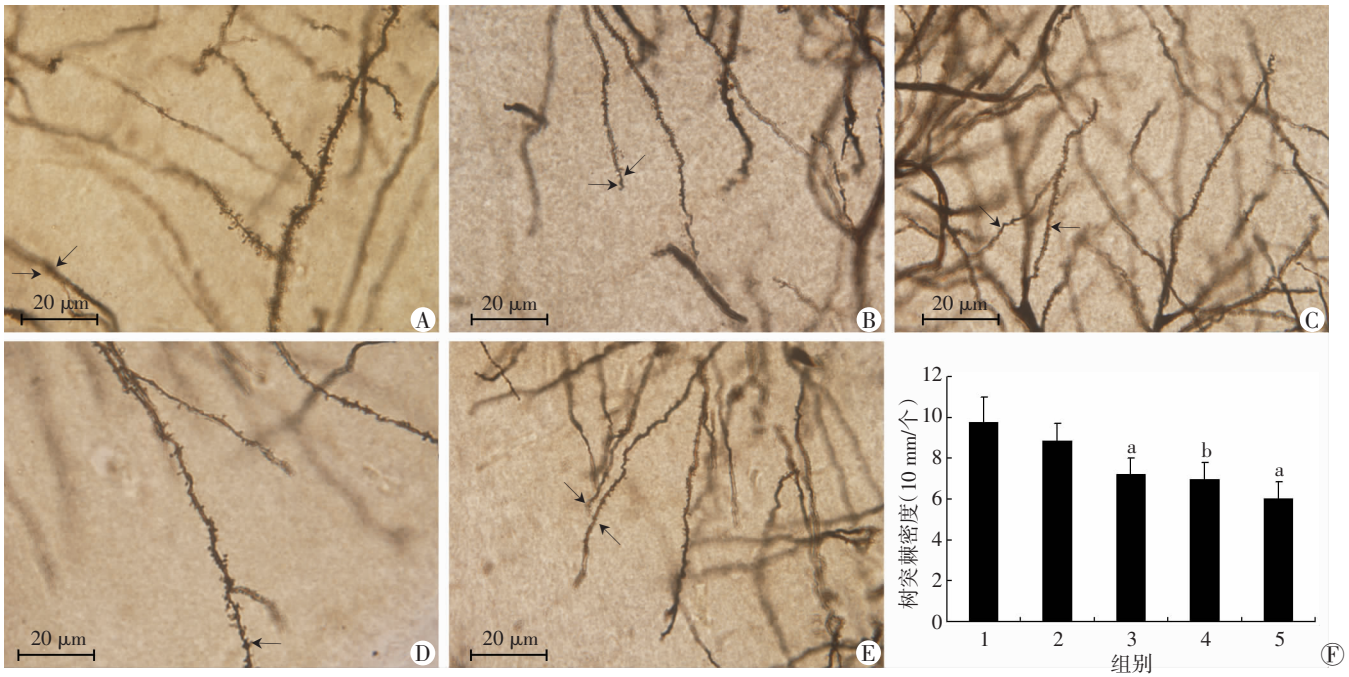
SCI 后海马区域 4 周与 8 周树突棘数量稀疏,与对照组比较,密度明显减少($P<0.05$,$P<0.01$,图 4)。

2.5　脊髓损伤大鼠海马组织 GRP78 和 Caspase-12 蛋白的表达情况

GRP78 蛋白在 SCI 后大鼠海马的表达明显高于对照组,且随着时间的推移表达续升高,但在损伤后 12 周有明显下降($P<0.01$)。Caspase-12 蛋白从损伤后 1 周表达增高,之后持续高表达。伤后各个时间点与对照组相比,差异有统计学意义(P <0.05,$P<0.01$,图 5)。

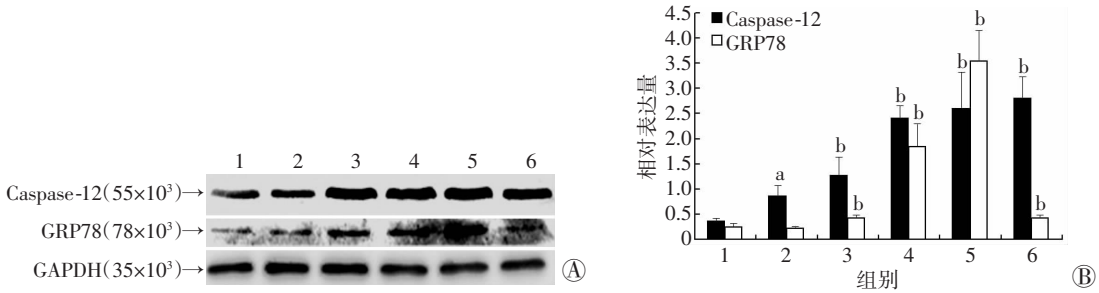
3　讨论

长期以来,学者们对 SCI 的研究主要集中在运动、感觉功能的缺失及其自主神经相关的并发症上,而对于损伤后造成的大脑认知障碍的研究较少。考虑到情感、记忆等认知功能在患者治疗和康复过程中的重要意义,研究脊髓损伤后相关问题的发生及可能原因显得尤为重要。



↑:示树突棘　1:对照组;2:损伤 1 周组;3:损伤 4 周组;4:损伤 8 周组;5:损伤 12 周组　A~E:分别为对照组,损伤 1、4、8、12 周组　a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与对照组比较

图 4　各组大鼠高尔基体染色结果



A:Western blot 检测结果;B:半定量分析结果　1:对照组;2:损伤 1 周组;3:损伤 2 周组;4:损伤 4 周组;5:损伤 8 周组;6:损伤 12 周组　a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与对照组比较

图 5　Western blot 检测各组大鼠海马组织 GRP78 和 Caspase-12 蛋白表达

我们的前期研究发现,SCI 大鼠在损伤 5 周后出现齿状回颗粒细胞数量减少,并且损伤后 8 周动物有学习记忆功能改变[6]。本研究进一步完善了 SCI 后大鼠认知功能的行为学评价,并增加了焦虑相关的行为学测试。对 SCI 后大鼠的脑内变化进行了相对系统的观察。我们验证了 SCI 大鼠 8 周后会出现学习和空间记忆能力下降。而且,通过高架十字迷宫实验发现,动物还有抑郁、恐惧和明显的探索兴趣减退等情绪障碍。同时,这些种变化会持续到损伤后 12 周。但是,海马、皮质部位的病理学改变却早于行为学变化。海马多个区域神经细胞在 4 周后即出线数量减少的情况。快速高尔基体染色结果证实,海马内树突棘密度随着时间推移逐渐减少、稀松,说明海马内部的纤维投射可能受损,也说明海马与皮质或大脑其他部位的信息链接可能不畅。最后,我们发现内质网应激相关蛋白 GRP78 和 Caspase-12 在损伤大鼠海马表达明显上调。这提示内质网应激、海马神经元的慢性炎症可能参与了大鼠 SCI 后的认知、情绪障碍。

脊髓损伤引起海马、皮质区域病理改变和认知障碍、情绪改变的机制尚不完全清楚。综合已有的相关报道,我们发现主要集中在以下两大主要方面:①脊髓损伤伴发有难以察觉脑组织结构损害。Wang 等[7]对 42 只成年雄狗进行了后肢高速冲击实验,发现在损伤仅 8 h 之后在损伤动物的海马和丘脑等处发生神经元

变性和脱髓鞘改变。此外 Zhang 等[8]对成年白猪行脊柱高速冲击非穿透性钝挫伤的研究中发现,损伤动物的记忆力等行为学方面有异常,动物在损伤后脑电图和脑内也有不同程度改变。②脊髓损伤介导的脑内继发性损伤。有学者发现 SCI 后大鼠脑内细胞周期激活,并发现了脑内有持续性炎症反应。与神经病理性疼痛密切相关的小胶质细胞在 SCI 慢性期也处于持续激活状态。通过竞争性抑制脑内 IL-6 的表达使得炎症减轻,并有助于功能恢复[9]。还有观点认为 SCI 后到脑海马和皮质区域神经元大量消失与皮质脊髓束联系切断又或是脊髓损伤后上行神经元凋亡有关,但该问题目前仍存在一定的争论[6]。本实验结果显示,SCI 后大鼠海马有内质网应激相关蛋白的激活,支持了慢性炎症的观点。

内质网应激(endoplasmic reticulum stress,ERS)是指某种原因导致细胞内质网生理功能发生紊乱的一种亚细胞器病理过程。严重持续的内质网应激可能引起与之有关的炎症和凋亡通路激活与 SCI 继发性损伤密切相关[10-12]。最近有研究指出,SCI 后 12 周脑内有内质网应激相关蛋白 GRP78 表达增高[13-14],本研究结果印证了这一观点。使用 Western blot 检测,我们发现脊髓挫裂伤后 1 周到 3 个月 GRP78 和 Caspase-12 蛋白总体趋势在海马表达逐渐升高,而 8 ~ 12 周 GRP78 蛋白表达的下降可能是持续强烈的内质网应激已经引起细胞稳态调节能力减弱,内质网功能失代偿[11]。这些结果说明脊髓损伤后海马可能产生持续严重的 ERS,并且参与了炎症和神经细胞凋亡等反应。然而对于内质网应激的发生和发展的具体机制以及是否是影响脊髓损伤后认知障碍等问题我们还不得而知,也需要更多的探索。

参考文献:

[1] Wu J, Raver C, Piao C, *et al*. Cell cycle activation contributes to increased neuronal activity in the posterior thalamic nucleus and associated chronic hyperesthesia after rat spinal cord contusion[J]. Neurotherapeutics, 2013, 10(3): 520 – 538. DOI: 10.1007/ s13311-013-0198-1

[2] Davidoff G N, Roth E J, Richards J S. Cognitive deficits in spinal cord injury: epidemiology and outcome[J]. Arch Phys Med Rehabil, 1992, 73(3): 275 – 284.

[3] Davidoff G, Morris J, Roth E, *et al*. Cognitive dysfunction and mild closed head injury in traumatic spinal cord injury [J]. Arch Phys Med Rehabil, 1985, 66(8): 489 – 491.

[4] Wilmot C B, Cope D N, Hall K M, *et al*. Occult head injury: its incidence in spinal cord injury[J]. Arch Phys Med Rehabil, 1985, 66(4): 227 – 231. DOI: 10.1016/0003-9993(85)90148-0

[5] 贾贺, 张博爱, 刘宇, 等. 慢性脑缺血大鼠海马 CA1 区锥体细胞树突形态及树突棘密度的变化[J]. 中国病理生理杂志, 2012, 28(1): 177 – 180. DOI: 10.3969/j.issn.1000-4718.2012.01.035

[6] 冯东亮, 南伟, 伍亚民, 等. 脊髓损伤大鼠的学习记忆功能与海马病理改变[J]. 中国康复理论与实践, 2015, 21(11): 1267 – 1272. DOI: 10.3969/j.issn.1006-9771.2015.11.007

[7] Wang Q, Wang Z, Zhu P, *et al*. Alterations of myelin basic protein and ultrastructure in the limbic system at the early stage of trauma-related stress disorder in dogs[J]. J Trauma, 2004, 56(3): 604 – 610. DOI: 10.1097/01.ta.0000058122.57737.0e

[8] Zhang B, Huang Y, Su Z, *et al*. Neurological, functional, and biomechanical characteristics after high-velocity behind armor blunt trauma of the spine[J]. J Trauma, 2011, 71(6): 1680 – 1688. DOI: 10.1097/TA.0b013e318231bce7

[9] Guerrero A R, Uchida K, Nakajima H, *et al*. Blockade of interleukin-6 signaling inhibits the classic pathway and promotes an alternative pathway of macrophage activation after spinal cord injury in mice[J]. J Neuroinflammation, 2012, 9: 40. DOI: 10.1186/1742-2094-9-40

[10] Hasnain S Z, Lourie R, Das I, *et al*. The interplay between endoplasmic reticulum stress and inflammation[J]. Immunol Cell Biol, 2012, 90(3): 260 – 270. DOI: 10.1038/icb.2011.112

[11] Penas C, Guzmán M S, Verdú E, *et al*. Spinal cord injury induces endoplasmic reticulum stress with different cell-type dependent response[J]. J Neurochem, 2007, 102(4): 1242 – 1255. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2007.04671.x

[12] Liu S, Sarkar C, Dinizo M, *et al*. Disrupted autophagy after spinal cord injury is associated with ER stress and neuronal cell death[J]. Cell Death Dis, 2015, 6: e1582. DOI: 10.1038/cddis.2014.527

[13] Yu Z, Luo H, Fu W, *et al*. The endoplasmic reticulum stress-responsive protein GRP78 protects neurons against excitotoxicity and apoptosis: suppression of oxidative stress and stabilization of calcium homeostasis[J]. Exp Neurol, 1999, 155(2): 302 – 314. DOI: 10.1006/exnr.1998.7002

[14] Wu J, Zhao Z, Kumar A, *et al*. Endoplasmic Reticulum Stress and Disrupted Neurogenesis in the Brain Are Associated with Cognitive Impairment and Depressive-Like Behavior after Spinal Cord Injury[J]. J Neurotrauma, 2016. DOI: 10.1089/ neu.2015.4348

(**收稿**:2016-07-19;**修回**:2016-09-30)

(编辑 王小寒)