DOI:10.16016/j.2097-0927.202207007

跑台训练对成年小鼠脊髓损伤后髓鞘结构修复的影响

苏 虹[1],潘 璐[1],朱 莹[1],王昀杭[1],刘 媛[2],杨 策[2],李 森[2],王海燕[2],龙在云[2],殷 樱[1],谭波涛[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,陆军特色医学中心野战外科研究部特殊环境战伤防治研究室,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室[2]

[**摘要**] **目的** 研究跑台训练对小鼠 T10 脊髓轻度挫伤后背侧皮质脊髓束(dorsal corticospinal tract,dCST)髓鞘结构修复的影响。**方法** 实验采用成年 C57/BL 雌性小鼠。12 只用于模型验证;另 30 只按随机数字表法分为(n=10):假手术组(只接受椎板切除)、脊髓损伤(spinal cord injury,SCI)组和跑台训练组[进行单侧(左侧)脊髓打击伤]。跑台训练组于术后 1 周开始进行为期 4 周的跑台训练(参数:12 m/min,30 min/次,1 次/d,5 d/周)。取材前 2 周,对各组小鼠进行初级运动皮质(primary motor cortex, M1)注射生物素化葡聚糖胺(biotinylated dextran amine,BDA)以示踪 dCST。4 周训练结束后进行组织取材。采用免疫荧光染色检测血小板源性生长因子受体 α(platelet-derived growth factor receptor α, PDGFRα)、Ki67 蛋白、少突胶质细胞转录因子 2(oligodendrocyte transcription factor 2,Olig2)、腺瘤性结肠息肉病蛋白(adenomatous polyposis coli protein, APC/CC1)、髓鞘碱性蛋白(myelin basic protein,MBP)表达情况;透射电镜(transmission electron microscope,TEM)观察左侧 dCST 区髓鞘化情况;在伤前、损伤后 1 周及训练后 1、2、4 周对各组小鼠进行左后肢运动功能评估(basso mouse scale,BMS)。**结果** 免疫荧光染色显示,SCI 组左侧 dCST 区内 PDGFRα/Ki67 双阳性细胞数量与 PDGFRα 阳性细胞数量的比值、Olig2/APC/CC1 双阳性细胞数量与 Olig2 阳性细胞数量的比值以及 MBP 的平均荧光强度较假手术组显著减少(P<0.01),而跑台训练组较 SCI 组有所增加(P<0.01)。TEM 结果显示,SCI 组左侧 dCST 区 G-ratio 较假手术组显著增加(P<0.01),而跑台训练组较 SCI 组有所降低(P<0.01)。在损伤后各个时间点中,跑台训练组的 BMS 评分有所改善,但与 SCI 组相比差异无统计学意义。**结论** 跑台训练能够促进 SCI 小鼠左侧 dCST 区中 OPCs 增殖、分化和 OLs 的成熟,增加髓鞘相关蛋白的表达并促进髓鞘结构的修复。

[**关键词**] 脊髓损伤;跑台训练;髓鞘修复;运动功能
[**中图法分类号**] R-332; R455; R651.2 [**文献标志码**] A

Effects of treadmill training on myelin structure repair after spinal cord injury in adult mice

SU Hong[1], PAN Lu[1], ZHU Ying[1], WANG Yunhang[1], LIU Yuan[2], YANG Ce[2], LI Sen[2], WANG Haiyan[2], LONG Zaiyun[2], YIN Ying[1], TAN Botao[1] [1]Department of Rehabilitation Medicine, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400010; [2]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injuries, Department of Special Environment War Wound Prevention and Treatment, Institute of Surgery Research, Army Medical Center of PLA, Chongqing, 400042, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effects of treadmill training on the repair of myelin structure of dorsal corticospinal tract (dCST) in mice with T10 spinal cord mild contusion. **Methods** Twelve adult

[**基金项目**] 国家自然科学基金青年科学基金(82002377);重庆市自然科学基金面上项目(cstc2019jcyj-msxmX0195);创伤烧伤与复合伤国家重点实验室开放基金资助项目(SKLKF202111)
[**通信作者**] 谭波涛,E-mail:303518@cqmu.edu.cn

2097-0927/Copyright © 2022, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

C57/BL female mice were used to construct and verify the model of spinal cord mild contusion, and another 30 mice were randomly divided into 3 groups ($n=10$): sham group, spinal cord injury (SCI) group, and treadmill training group. The mice of SCI and treadmill training groups were given unilateral (left) spinal cord contusion, while the sham group was given laminectomy only. A 4-week training scheme was conducted for the treadmill training group 1 week after SCI surgery (parameters: 12 m/min, 30 min/session, 1 time/day, 5 d/week). The primary motor cortex (M1) of mice in each group was injected with biotinylated dextran amine (BDA) to trace dCST 2 weeks before sampling, followed by the collection of tissue samples when the 4-week training finished. Then the expression levels of platelet-derived growth factor receptor α (PDGFRα), Ki67 protein, oligodendrocyte transcription factor 2 (Olig2), adenomatous polyposis coli protein (APC/CC1) and myelin basic protein (MBP) were detected by immunofluorescence assay. Transmission electron microscopy (TEM) was also used to observe the myelination in the left dCST area. Moreover, Basso Mouse Scale (BMS) was performed in each group to evaluate the motor function of left hindlimb before injury, 1 week after injury and 1, 2, and 4 weeks after training. **Results** Immunofluorescent labeling showed that the ratio of PDGFRα/Ki67 double positive cells to the total number of PDGFRα positive cells, the ratio of Olig2/APC/CC1 double positive cells to the total number of Olig2 positive cells, as well as the mean fluorescence intensity of MBP in the left dCST area of the SCI group were significantly lower than those of the sham group ($P<0.01$), while these indexes were higher in the treadmill training group than in the SCI group ($P<0.01$). TEM results indicated that the G-ratio of the left dCST area was elevated in the SCI group ($P<0.01$), but was reduced greatly in the treadmill training group ($P<0.01$). Finally, the BMS scores were improved in the treadmill group at each detection time point after injury, but there was no significant difference as compared with the SCI group ($P>0.05$). **Conclusion** Treadmill training can facilitate the proliferation and differentiation of oligodendrocytes precursor cells (OPCs), improve the maturation of oligodendrocytes (OLs) in the left dCST region, and increase the expression of myelin related proteins, thus promoting the repair of myelin structure after SCI in adult mice.

[**Key words**] spinal cord injury; treadmill training; myelin repair; motor function

Supported by the National Natural Science Foundation for Young Scholars of China (82002377), the General Program of Natural Science Foundation of Chongqing (cstc2019jcyj-msxmX0195) and the Open Project of State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injuries (SKLKF202111).
Corresponding author: TAN Botao, E-mail: 303518@cqmu.edu.cn

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)在青壮年人群中致残率高,临床上难以获得功能的完全康复。SCI后轴突的脱髓鞘改变损害了正常的传导特性,导致运动、感觉和自主功能障碍。因此,再髓鞘化是恢复SCI后机体功能的重要治疗靶点。少突胶质前体细胞(oligodendrocytes precursor cells,OPCs)在脱髓鞘损伤后会被激活,随后增殖并迁移到病变部位,根据微环境变化激活髓鞘基因相关转录程序,并分化为少突胶质细胞(oligodendrocytes,OLs),成熟的OLs将细胞质突起包裹在裸露的轴突周围,从而形成新的髓鞘[1]。自发性髓鞘再生在损伤后会启动[2],但这种内源性再生能力极为有限:损伤会导致OPCs和OLs的丢失;即使大量的OPCs会募集到病变部位,其分化成OLs的过程通常受阻;存活下来的OLs是否能够促进髓鞘修复目前也存在不同的观点[3-5]。长期脱髓鞘会造成轴突萎缩、神经变性,从而导致疾病进展。因此,外源性干预促进SCI后髓鞘的修复受到广泛的关注。运动训练是SCI患者康复治疗中必不可少的一部分。研究报道,连续3周的强制性跑台运动能够促进正常小鼠胼胝体的适应性髓鞘形成[6];对脱髓鞘模型动物(如实验性自身免疫性脑脊髓炎、饲铜、溶血磷脂毒素诱导)采取运动训练(如游泳、自愿跑轮)能够减少髓鞘丢失或促进髓鞘再生[7-9]。然而,既往的研究主要基于运动对髓鞘状态的观察,运动对SCI后少突胶质谱系细胞演变特别是OPCs的增殖、分化以及髓鞘化的影响尚不清楚。因此,本研究以促进SCI后髓鞘再生为切入点,探讨跑台训练对成年小鼠脊髓损伤后髓鞘结构修复过程及运动功能恢复的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

42只6~8周、体质量18~20 g的C57/BL雌性小

鼠,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供,动物生产许可证号:SCXK(湘)2019-0004。饲养于 12 h/12 h 昼夜交替、室温 25~28 ℃、湿度 40%~60%的通风环境中,给予自由饮食。其中,12 只小鼠分为假手术组和 SCI 组(n=6)用于验证 SCI 模型;30 只小鼠按照随机数字表法分为 3 组:假手术组、SCI 组、跑台训练组(n=10)。模型验证小鼠于术后 2 周取材,其余小鼠于术后 5 周取材。实验按照重庆医科大学动物伦理委员会相关规定进行。

1.2 SCI 模型制备

腹腔注射 0.5%戊巴比妥钠(100 mg/kg)麻醉小鼠,消毒备皮,切开背部皮肤,以颈背部脂肪垫为参照,脂肪垫下缘第一个棘突为 T9,再往下一个棘突即为 T10。钝性剥离筋膜和肌肉,去除 T10 棘突及椎板,暴露脊髓。假手术组接受椎板切除,但不损伤脊髓。SCI 组和跑台训练组接受 SCI,模型制备采用改良 Allen's 击打仪(美国罗格斯大学 W. M. Keck Center for Collaborative Neuroscience 的 Wise Young 教授惠赠),损伤部位为左背侧脊髓白质(避开中央血管),致伤强度为 2.5 mm×5 g。致伤后缝合背部肌肉及皮肤,给予皮下注射 0.5 mL 的 0.9%生理盐水补液,放回笼中并观察记录术后情况。术后 1 周内,每日对小鼠进行 3 次人工膀胱排空。

1.3 跑台训练方案

实验前对小鼠进行 5 d 的预训练,速度为 9 m/min,训练时间为 20 min。正式训练在 SCI 后 1 周开始,初始速度(热身速度)为 9 m/min[10],持续 5 min;一级速度为 12 m/min[11],持续 25 min;30 min/次,1 次/d,5 d/周,共训练 4 周。假手术组和 SCI 组则放在静止的跑道中待 30 min。

1.4 dCST 顺行示踪

取材前 2 周对小鼠进行 BDA 注射。腹腔注射 0.5%戊巴比妥钠麻醉小鼠,消毒备皮,沿头颅矢状线划开头部皮肤,暴露前囟,使用牙科钻于前囟右侧开一个颅窗,后将小鼠固定于立体定位仪上,微量注射器中吸取 10% BDA 溶液 2.4 μL(D1956,Thermo Fisher,美国)备用。定位前囟,沿着中线向前 0.5 mm、向后 0.5 mm,旁开 0.8 mm 和 1.2 mm,深 0.7 mm,共 4 个位点进行注射,0.6 μL/位点,速度为 0.2 μL/min,每个位点注射后滞针 3 min,后缓慢退针。注射完毕,缝合头部皮肤并消毒,放回笼中观察、记录。

1.5 灌注、取材与冰冻切片

每组取 7 只小鼠进行免疫荧光染色检测。过量麻醉小鼠后,依次使用 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS,C0103,博奥森,北京)和 4% 多聚甲醛溶液(PFA,科隆,成都)对小鼠进行经心灌注,灌注后取出小鼠大脑及下胸段脊髓,4 ℃下在 4% PFA 溶液中固定 24 h,然后在 18%、24%、30%的蔗糖溶液中梯度脱水,使用 O. C. T. 组织包埋剂(4583,Sakura,美国)包埋,沿着大脑冠状面和脊髓横切面进行 18 μm 冰冻切片(Cryo Star NX50,赛默飞,中国)。

1.6 免疫荧光染色

冰冻切片室温复温 15 min;0.01 mol/L PBS 浸洗 3 次,每次 8 min;0.3% Triton(T8787,Sigma,美国)通透 30 min;0.01 mol/L PBS 浸洗 3 次,每次 8 min;使用免疫荧光封闭液(P0260,碧云天,上海)室温封闭 60 min;加入一抗后室温过夜孵育,一抗分别为:兔来源抗 GFAP 抗体(1∶2 000;PA1-10019,赛默飞,中国),山羊来源抗血小板源性生长因子受体 α(platelet-derived growth factor receptor α, PDGFRα)、抗体(1∶100;AF1062,R&D systems,美国),兔来源抗 Ki67 抗体(1∶300;AB9260,Millipore,美国),兔来源抗少突胶质细胞转录因子 2(oligodendrocyte transcription factor 2,Olig2)抗体(1∶200;1D-710,IBL,日本),小鼠来源抗腺瘤性结肠息肉病蛋白(adenomatous polyposis coli protein, APC/CC1)抗体(1∶500;OP80,Millipore,美国),大鼠来源抗髓鞘碱性蛋白(myelin basic protein,MBP)抗体(1∶500;MAB386,Millipore,美国);次日,倒去一抗,0.01 mol/L PBS 浸洗 3 次,每次 8 min;加入 Alex Fluor-488 和 Alex Fluor-594 标记的驴来源抗兔、山羊、小鼠和大鼠的荧光二抗(1∶400,Jackson Laboratories,美国)后室温避光孵育 60 min;0.01 mol/L PBS 浸洗 3 次,每次 8 min;使用 DAPI(0.5 μg/mL;Sigma,美国)染细胞核,避光孵育 2 min;0.01 mol/L PBS 浸洗 3 次,每次 8 min;洗涤后晾干封片;静置于 4 ℃冰箱中 2~3 h,然后在激光共聚焦显微镜(A1+R,Nikon,日本)下观察染色情况,使用 Image J 对图像进行细胞计数和平均荧光强度分析。

1.7 透射电镜(transmission electron microscope,TEM)观察

每组取 3 只小鼠,过量麻醉后,依次使用 0.01 mol/L PBS、4% PFA、2.5% 戊二醛(G916055,麦克林,上海)混合溶液对小鼠进行经心灌注,灌注后取出小鼠下胸段脊髓,放在戊二醛溶液中于 4 ℃冰箱保存,脱水、包埋、切片。12 000 倍拍摄左侧 dCST 区。使用 Image J 测量和计算髓鞘厚度参数 G-ratio(等于轴突直径除以纤维直径)。

1.8 小鼠左后肢运动功能评估(basso mouse scale,BMS)评分

将小鼠放在 1 个空旷的场地并观察 4 min,正式评估之前先让小鼠进行环境预适应以保证评估结果准

确。于伤前,损伤后 1 周,训练后 1、2、4 周使用 BMS 评估小鼠的左后肢粗大运动情况[12]。

1.9 统计学分析

采用 GraphPad Prism 8 进行数据统计分析。结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示。采用 Anderson-Darling test 进行正态性检验。采用 Kruskal-Wallis test 非参数检验和 Dunn's multiple comparisons test 事后组间比较分析 G-ratio。采用双因素方差分析(two-way ANOVA)和 Tukey's multiple comparisons test 事后组间比较分析小鼠 BMS 得分。其余数据均采用单因素方差分析,并采用 Tukey's multiple comparisons test 进行事后组间比较。$P<0.05$ 被认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 SCI 模型成功建立

本模型主要观察部位为 T10 左侧 dCST 区(图 1A)。免疫荧光染色和 TEM 结果显示,相比于假手术组小鼠,SCI 组小鼠脊髓左背侧白质出现胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)阳性的细胞数量增加,提示星形胶质细胞增生(图 1B);左侧 dCST 区域出现广泛的髓鞘变薄、分层(图 1C)。以上结果表明,本实验成功建立了 T10 脊髓轻度挫伤模型,为后续研究髓鞘修复奠定了模型基础。

2.2 跑台训练增强 SCI 后 dCST 区 OPCs 的增殖能力

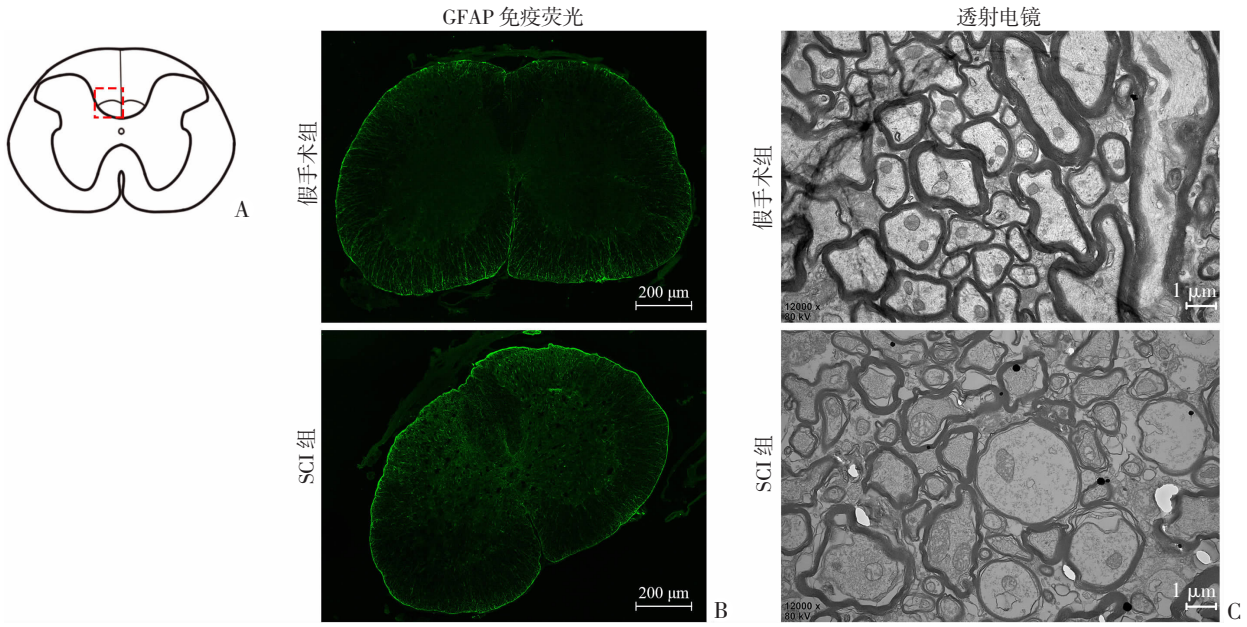
免疫荧光双标染色(图 2A)结果显示,SCI 组左侧 dCST 区内处于增殖状态的 OPCs(PDGFRα/Ki67 双阳性)与总 OPCs(PDGFRα 阳性)的比值较假手术组显著减少(0.59±0.06 *vs* 0.92±0.01, $P<0.01$,图 2B),跑台训练组左侧 dCST 区内处于增殖状态的 OPCs 与总 OPCs 的比值较 SCI 组有所增加(0.77±0.03 *vs* 0.59±0.06,$P<0.01$,图 2B)。以上结果表明,跑台训练增强 SCI 后 dCST 区 OPCs 的增殖能力。

2.3 跑台训练促进 SCI 后 dCST 区 OLs 的成熟

免疫荧光双标染色(图 3A)结果显示,SCI 组左侧 dCST 区内成熟的 OLs(Olig2/APC/CC1 双阳性)与少突胶质谱系细胞(Olig2 阳性)的比值较假手术组显著降低(0.52±0.07 *vs* 0.89±0.06,$P<0.01$,图 3B),跑台训练组左侧 dCST 区内成熟的 OLs 与少突胶质谱系细胞的比值较 SCI 组显著增加(0.75±0.02 *vs* 0.52±0.07,$P<0.01$,图 3B)。以上结果提示,跑台训练促进 SCI 后 dCST 区 OLs 的成熟。

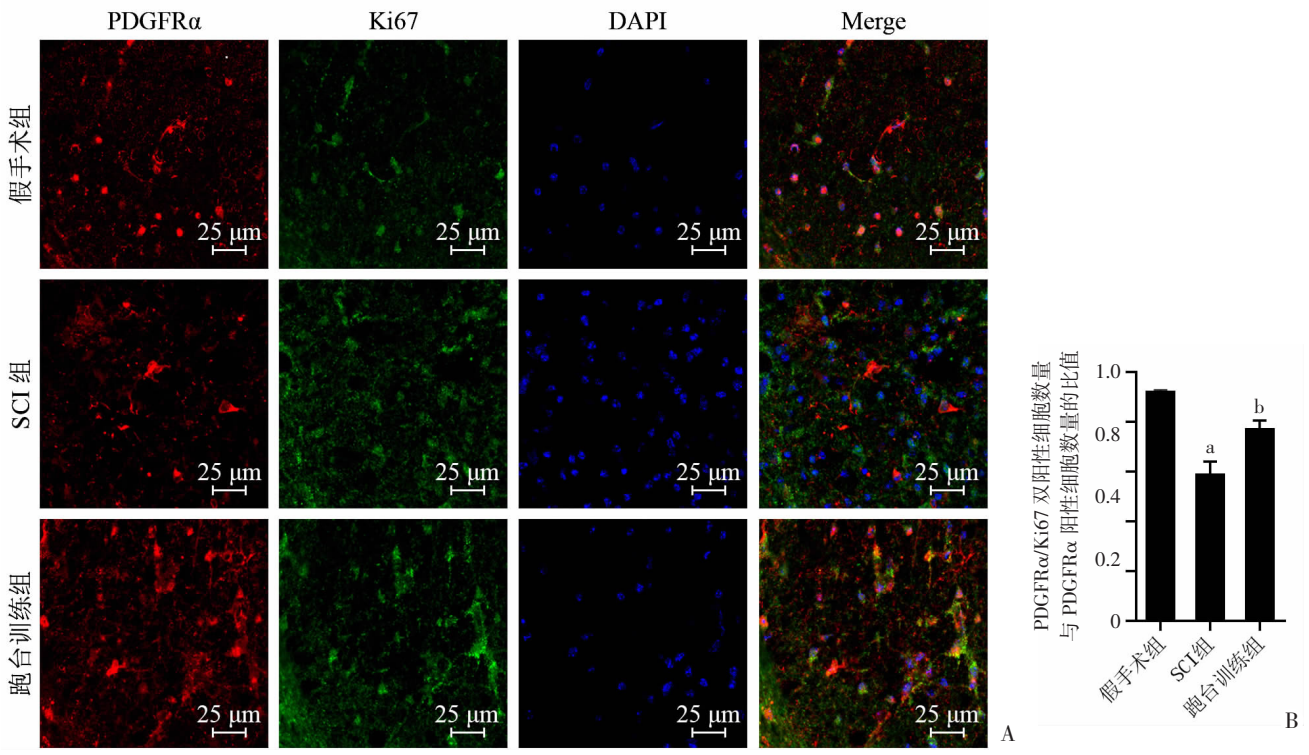
2.4 跑台训练增加 SCI 后 dCST 区 MBP 的表达并促进髓鞘形成

于小鼠右侧皮层 M1 区注射 BDA,顺行示踪左侧 dCST(图 4A)。免疫荧光双标染色(图 4B)结果显示:相比于假手术组(51.44±1.45),SCI 组左侧 dCST 区内 MBP 平均荧光强度显著下降[(30.17±2.89),$P<0.01$,图 4C];而跑台训练组左侧 dCST 区内 MBP 的平均荧光强度较 SCI 组有所增加且具有统计学差异[(39.58±2.63) *vs* (30.17±2.89),$P<0.01$,图 4C]。



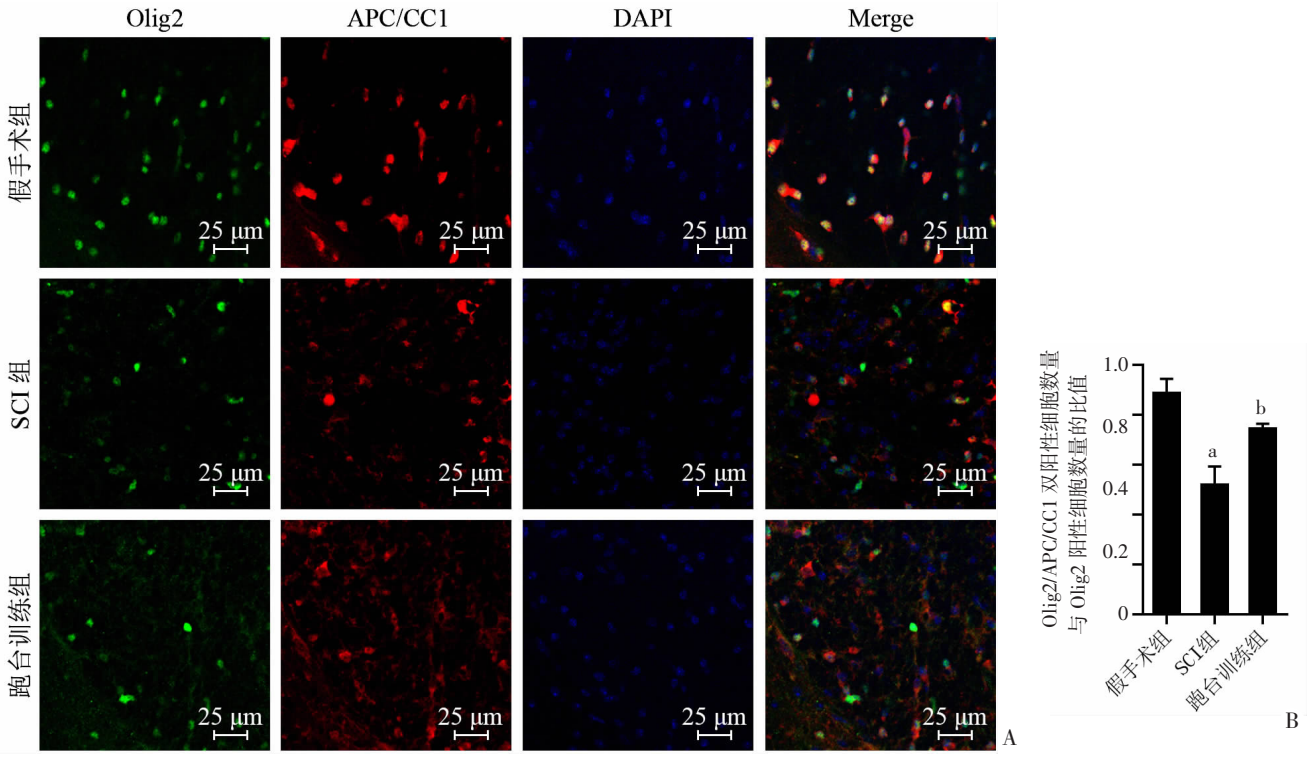
A:T10 脊髓冠状面示意图 红色线框:示左侧 dCST 区;B:免疫荧光染色观察左侧 dCST 区 GFAP 阳性星形胶质细胞激活情况 绿色:示 GFAP;C:透射电镜观察左侧 dCST 区髓鞘结构情况

图 1 小鼠 SCI 模型的建立与鉴定 ($n=6$)



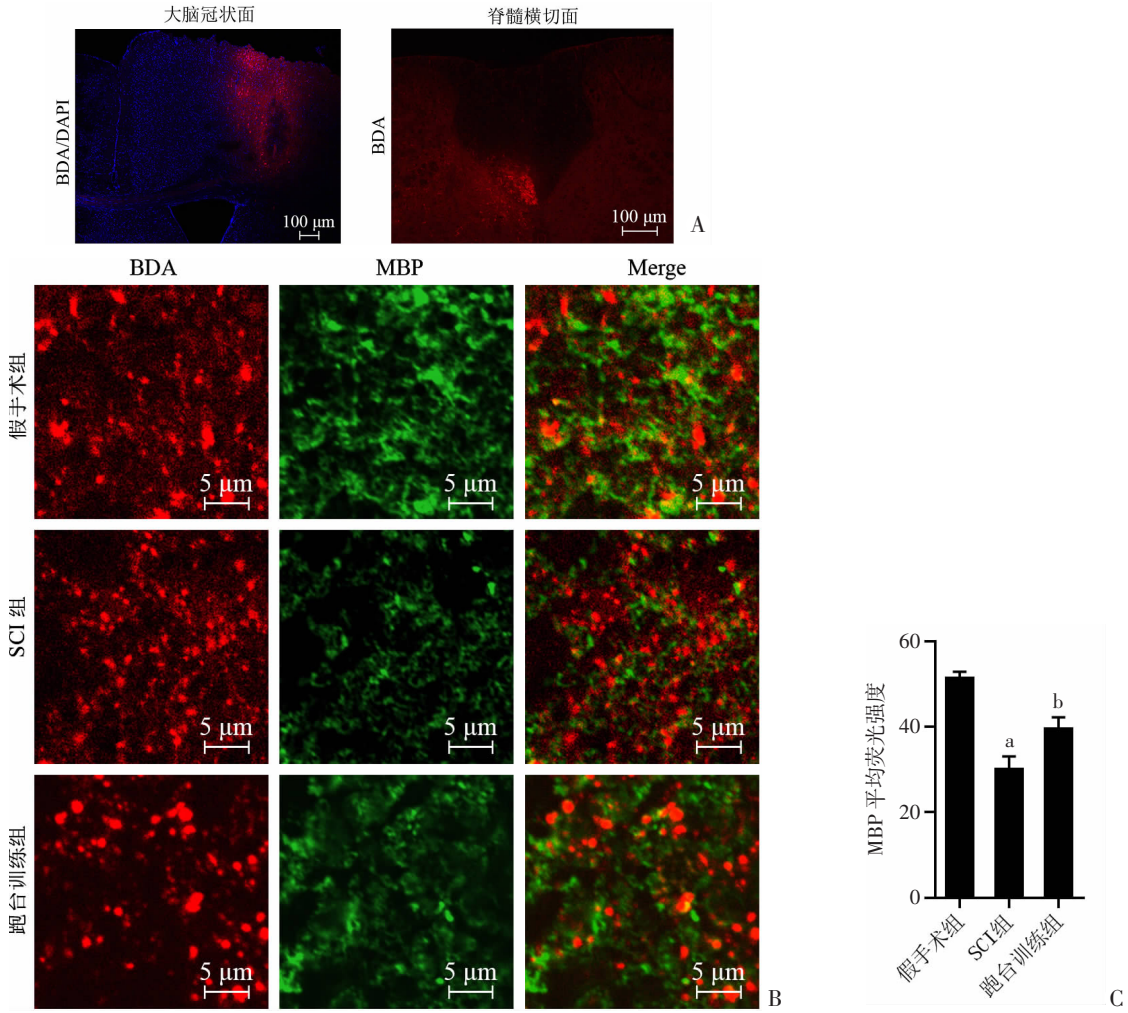
A:免疫荧光染色观察左侧 dCST 区 OPCs 的增殖情况　红色:示 PDGFRα(标记 OPCs),绿色:示 Ki67(标记增殖状态的细胞),蓝色:示 DAPI(标记细胞核);B:各组小鼠左侧 dCST 区 PDGFRα/Ki67 双阳性细胞数量与 PDGFRα 阳性细胞数量的比值($n=7,\bar{x}\pm s$)　a:$P<0.01$,与假手术组比较;b:$P<0.01$,与 SCI 组比较

图 2　跑台训练增强实验小鼠 SCI 后 dCST 区 OPCs 的增殖能力



A:免疫荧光染色观察左侧 dCST 区 OLs 的成熟情况　绿色:示 Olig2(标记少突胶质谱系细胞),红色:示 APC/CC1(标记 OLs),蓝色:示 DAPI;B:各组小鼠左侧 dCST 区 Olig2/APC/CC1 双阳性细胞数量与 Olig2 阳性细胞数量的比值($n=7,\bar{x}\pm s$)
a:$P<0.01$,与假手术组比较;b:$P<0.01$,与 SCI 组比较

图 3　跑台训练促进实验小鼠 SCI 后 dCST 区 OLs 的成熟



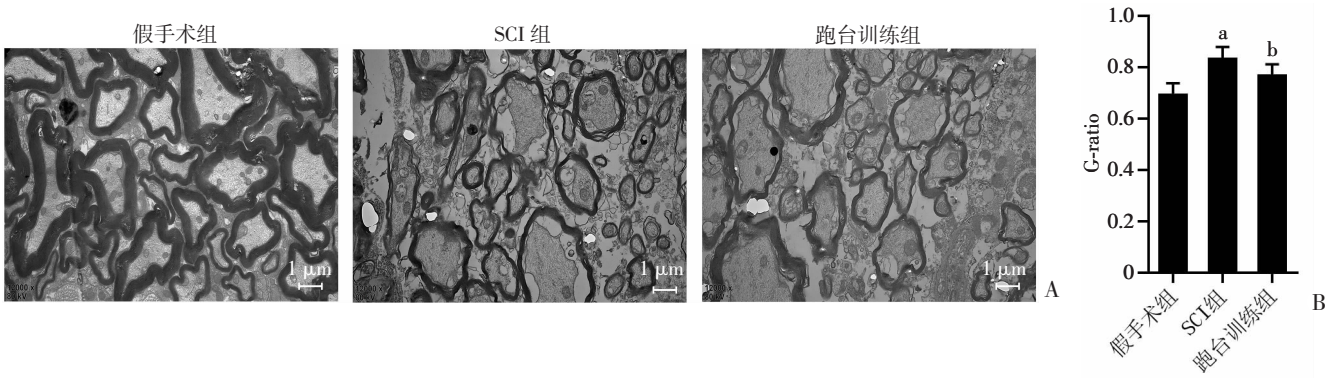
A:免疫荧光染色观察大脑右侧皮层 M1 区 BDA 注射情况与脊髓左侧 dCST 区 BDA 示踪情况　红色:示 BDA,蓝色:示 DAPI;B:免疫荧光染色观察左侧 dCST 区 BDA 阳性轴突和 MBP 阳性髓鞘染色情况　红色:示 BDA,绿色:示 MBP;C:各组小鼠左侧 dCST 区 MBP 平均荧光强度统计结果($n=7,\bar{x}\pm s$)　a:$P<0.01$,与假手术组比较;b:$P<0.01$,与 SCI 组比较

图 4　跑台训练增加实验小鼠 SCI 后 dCST 区 MBP 的表达

TEM 观察髓鞘结构显示:假手术组左侧 dCST 区中髓鞘结构完整致密;SCI 组存在广泛、严重的脱髓鞘或髓鞘变薄、分层以及轴突萎缩的情况;而跑台训练组脱髓鞘程度较轻,轴突保留相对较好(图 5A)。G-ratio 是一种描述髓鞘厚度的参数,等于轴突直径除以纤维直径,比值等于 1 时表示脱髓鞘。统计结果显示:SCI 组左侧 dCST 区 G-ratio 较假手术组显著增加(0.83±0.05 *vs* 0.69±0.04,$P<0.01$,图 5B),跑台训练组左侧 dCST 区 G-ratio 较 SCI 组有所降低(0.77±0.04 *vs* 0.83±0.05,$P<0.01$,图 5B)。以上结果表明,跑台训练增加 SCI 后 dCST 区 MBP 的表达并促进髓鞘修复。

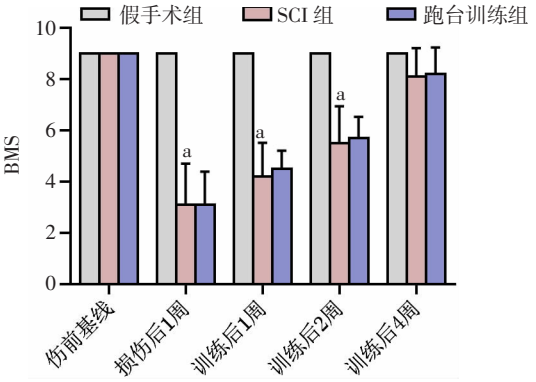
2.5　跑台训练对 SCI 小鼠 BMS 评分结果的影响

BMS 评分结果显示(图 6):损伤后 1 周及训练后 1、2 周,SCI 组 BMS 评分均较假手术组显著减少(分别为 3.10±1.60 *vs* 9.00±0.00、4.20±1.32 *vs* 9.00±0.00、5.50±1.43 *vs* 9.00±0.00,$P<0.01$);在损伤后各个时间点中跑台训练组 BMS 得分逐渐提高,但与 SCI 组比较无统计学差异(3.10±1.29 *vs* 3.10±1.60,4.50±0.71 *vs* 4.20±1.32,5.70±0.82 *vs* 5.50±1.43,8.20±1.03 *vs* 8.10±1.10,$P>0.05$)。以上结果表明,跑台训练对 SCI 小鼠后肢运功功能恢复的作用不显著。



A:透射电镜观察左侧 dCST 区髓鞘结构情况;B:各组小鼠左侧 dCST 区 G-ratio 分析($n=3$,$\bar{x}\pm s$) a:$P<0.01$,与假手术组比较;b:$P<0.01$,与 SCI 组比较

图 5 跑台训练降低实验小鼠 SCI 后 dCST 区的 G-ratio



a:$P<0.01$,与假手术组比较

图 6 各组小鼠 BMS 评分结果 ($n=10$, $\bar{x}\pm s$)

3 讨论

3.1 轻度脊髓挫伤模型成功建立

皮质脊髓束(corticospinal tract,CST)是由运动皮层直接投射到脊髓的信号传导束,是产生自主运动的关键;而 SCI 导致下行传导束的结构或功能受损,造成来自大脑信号突然且持续地丧失,从而影响了运动功能。因此,本研究着重观察 SCI 后 CST 及后肢运动功能。挫伤是脊髓短暂地受到物理冲击,与临床上大多数 SCI 患者发病原因相似[13]。团队前期开发了一种诱导小鼠 dCST 脱髓鞘的模型:采用改良 Allen's 击打仪制备轻度脊髓挫伤模型,从而造成轴突大部分保留和广泛性脱髓鞘[14]。本研究沿用该模型,发现 SCI 后脊髓背侧白质出现 GFAP 阳性的星形胶质细胞增生,并且 dCST 区域出现广泛的髓鞘变薄、分层,这与前期研究结果相一致,表明本研究成功建立了 SCI 模型,这为接下来研究 SCI 后髓鞘修复奠定了模型基础。

脱髓鞘后最初的 2 周内,OPCs 在病变处迅速聚集,随后增殖并分化为 OLs,进而形成新的髓鞘结构[15]。然而,这种自发的髓鞘再生是远远不够的。在慢性脱髓鞘部位中,尽管有大量的 OPCs 迁移到病变区域,但这些 OPCs 出现分化阻滞[16]。因此,促进 OPCs 的分化是髓鞘修复的关键。文献报道,OLs 中过表达 Olig2 的转基因小鼠在溶血磷脂胆碱诱导的胼胝体脱髓鞘后显示出 OPCs 分化能力和再髓鞘化能力增强[17]。在脱髓鞘模型的动物实验中也显示出细胞移植在促进 OPCs 增殖和分化上的效果[18-19]。然而,病毒传递、基因调控和侵入性的手术干预在临床转化中仍存在一些局限。通过硬膜外电刺激、化学遗传学技术来激活神经元活动以促进 OPCs 分化和 OLs 成熟的相关研究已为经颅电刺激等非侵入性神经肌肉调节技术在临床 SCI 患者中的应用提供了强有力的证据[14, 20]。而运动是一种需要患者主动参与的治疗方法,更加符合康复医学的理念;在动物实验中也发现运动能够减少髓鞘丢失或促进髓鞘再生:运动训练可以增加高脂饮食小鼠脊髓中髓鞘蛋白脂蛋白(proteolipid protein,PLP)和 MBP 表达,减少高脂饮食导致的 OPCs 和 OLs 丢失[21]。在溶血磷脂毒素诱导小鼠脊髓脱髓鞘后,立即进行自愿跑轮训练可以促进 OLs 的形成,增加再生髓鞘的厚度[9]。运动还能调节慢性脑低灌注小鼠小胶质细胞和星形胶质细胞的表型,促进髓鞘碎片清除和 OPCs 的增殖和分化,从而修复白质和改善认知功能[22-23]。由此可见,运动在促进髓鞘修复方面有很大的潜力。

3.2 跑台训练的适宜时机

SCI 后大量 OLs 死亡、髓鞘结构紊乱、CNS 常驻免疫细胞被激活并与浸润的外周白细胞一起引起炎症[24],同时继发性损伤如水肿、缺血、兴奋性毒性、氧化应激和自由基积累也随之而来[25]。在这种环境下,

过早地开始运动训练可能会加重损伤程度。然而,若运动训练开始时间太晚,在慢性期局部有大量死亡细胞碎片、损伤后反应性星形胶质细胞激活导致胶质瘢痕的形成可能会阻碍轴突再生和髓鞘修复,神经功能下降导致神经对运动训练的敏感性降低,从而影响治疗效果[26-27]。此外,研究显示,胸髓挫伤模型动物多数采取在 SCI 后 1 周进行跑台运动的方式进行[11,28],因此,本研究在 SCI 后 1 周开始跑台训练。JAMES 等[29]发现小鼠脊髓挫伤后 1 周内脊髓背侧上行柱轴突传导完全阻滞,在亚急性期(2~4 周)内恢复一定程度的传导能力,在慢性期(3 ~6 个月)传导能力没有进一步改善。BACMEISTER 等[4]对脱髓鞘模型小鼠的前肢运动皮层进行纵向双光子成像,结果显示,脱髓鞘后神经元会立即表现出高度兴奋,此时小鼠的学习能力受损,进行前肢伸取训练会短暂地抑制 OLs 的生成,但延迟训练(脱髓鞘后 10 天)则增加了 OPCs 分化和 OLs 的生成,表明运动训练和 OLs 之间存在复杂的动力学关系。本研究在 SCI 后 1 周开始进行 4 周的跑台训练可能可以在内源性髓鞘修复的基础上维持并提高脱髓鞘轴突的髓鞘再生能力。然而,目前尚不清楚脱髓鞘期间进行运动是否有协同或者拮抗作用,团队后续将对 SCI 后运动时间进行探索,优化运动时间以在内源性髓鞘修复基础上驱动更强有力的髓鞘再生。

3.3 跑台训练促进 OPCs 增殖、OLs 成熟和髓鞘化

本研究采用了 OPCs 标记物(PDGFRα)与 Ki67 免疫荧光共染来检测 OPCs 的增殖状况,发现跑台训练组左侧 dCST 区内处于增殖状态的 OPCs 在总 OPCs 中的占比高于 SCI 组,表明跑台训练增强了损伤后 OPCs 的增殖能力,这一结果支持了先前的报道。本研究使用少突胶质谱系细胞标记物(Olig2)和成熟的 OLs 标记物(APC/CC1)免疫荧光共染来检测 OLs 的成熟情况,发现跑台训练组左侧 dCST 区内成熟的 OLs 在少突胶质谱系细胞中的占比较 SCI 组显著增加,证实了跑台训练增加了 SCI 后 dCST 区中成熟的 OLs 的数量。显然,这是跑台训练促进损伤后髓鞘再生的关键一步。接着,本研究采用免疫荧光染色和 TEM 来观察髓鞘结构。皮质注射 BDA 可以更好地标记 dCST。我们发现跑台训练组 dCST 区内 BDA 阳性轴突周围的 MBP 表达强度比 SCI 组高;电镜也观察到跑台训练降低了 G-ratio,即髓鞘厚度更大,表明跑台训练能够改善 dCST 轴突髓鞘化情况。

3.4 跑台训练促进髓鞘修复的机制探讨

在分子机制方面,我们考虑运动促进髓鞘修复可能与以下这些途径相关:①本团队前期发现,跑台训练可以提高 SCI 小鼠运动皮质中脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor,BDNF)、胰岛素样生长因子 1(insulin-like growth factor,IGF-1)水平[10]。而 BDNF 在脱髓鞘后 OPCs 的招募中发挥作用。VONDRAN 等[30]发现双环己酮草酰二腙(cuprizone,CPZ)诱导的脱髓鞘引起胼胝体中 BDNF 蛋白水平降低,BDNF 杂合缺陷小鼠在脱髓鞘后出现 OPCs 增殖减少、MBP 表达降低,表明 BDNF 可能通过调节脱髓鞘损伤后的 OPCs 数量以及髓鞘相关蛋白的表达来发挥作用。OPCs 成功通过 G_2/M 期对细胞周期的退出和随后分化成能够形成髓鞘的 OLs 在髓鞘发育或者髓鞘修复过程中是必要的。MIN 等[31]在体外验证了 IGF-1 能够加速 OPCs 的 G_2/M 期进程。此外,IGF-1 还参与招募的 OPCs 分化为 OLs[32]。由此可以推测,跑台训练可能通过提高如 BDNF 和 IGF-1 等生长因子和营养因子的表达等来促进 OPCs 的增殖、分化和 OLs 的成熟。②运动可以上调骨骼肌和大脑中过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子 1α(peroxisome proliferator activated receptor γ coactivator 1 α,PGC1α)的表达[33-34]。近来有研究显示,在小鼠脊髓脱髓鞘后立即进行自愿跑轮训练可以激活 PGC1α,促进 OLs 的形成,增加再生髓鞘的厚度;然而,当 OLs 中的 PGC1α 被敲除后,即使接受了跑轮训练,病变处 G-ratio 没有下降,表明 PGC1α 是运动促进髓鞘增厚的关键因子[9]。另外,先前已有研究证明了 PGC1α 在 CNS 中调控着髓鞘发育,对髓鞘结构和致密成分的生成十分重要[35]。因此,我们推测,跑台训练可能通过上调 PGC1α 水平来促进 OPCs 的增殖、分化和 OLs 的成熟以及髓鞘化。

我们注意到,与 SCI 组相比,在损伤后各个时间点跑台训练组 BMS 得分逐渐提高,但二者在统计学上没有明显的差异,考虑可能的原因是:①本研究采用的模型损伤程度相对较轻,对小鼠的运动功能影响较小;而 BMS 是一个简化的、半定量的粗大运动评估量表,主要评估足踝关节活动、前肢与后肢的协调情况、行走时足爪的位置和躯干稳定性[12]。因此,需要采用更加系统、精细的后肢运动功能评定方法以观察后肢关节活动情况和测量具体的步态参数,从而更好地评估本研究中跑台训练带来的行为学变化情况。②尽管本研究发现运动增强了髓鞘再生能力,但再生髓鞘期间形成的髓鞘的厚度比正常髓鞘小,再髓鞘轴突动作电位的传导速度较完整轴突慢[36]。这可能不足以导致跑台训练组在 SCI 后有更明显的功能恢复表现。

综上所述,跑台训练能够促进 SCI 小鼠左侧 dCST 区中 OPCs 增殖、分化和 OLs 的成熟,增加髓鞘相关蛋白 MBP 的表达和髓鞘厚度,从而促进轴突髓鞘解剖学上的修复,由此可以推断,跑台训练对 SCI 后髓鞘修复

有积极影响,未来有必要深入研究跑台训练等运动疗法促进 SCI 髓鞘修复的分子机制。

参考文献:

[1] FRANKLIN R J M, FFRENCH-CONSTANT C. Regenerating CNS myelin—from mechanisms to experimental medicines [J]. Nat Rev Neurosci, 2017, 18(12): 753-769. DOI: 10.1038/nrn.2017.136.

[2] HESP Z C, GOLDSTEIN E Z, MIRANDA C J, *et al*. Chronic oligodendrogenesis and remyelination after spinal cord injury in mice and rats[J]. J Neurosci, 2015, 35(3): 1274-1290. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2568-14.2015.

[3] CRAWFORD A H, TRIPATHI R B, FOERSTER S, *et al*. Pre-existing mature oligodendrocytes do not contribute to remyelination following toxin-induced spinal cord demyelination [J]. Am J Pathol, 2016, 186(3): 511-516. DOI: 10.1016/j.ajpath.2015.11.005.

[4] BACMEISTER C M, BARR H J, MCCLAIN C R, *et al*. Motor learning promotes remyelination via new and surviving oligodendrocytes[J]. Nat Neurosci, 2020, 23(7): 819-831. DOI: 10.1038/s41593-020-0637-3.

[5] PAN S, CHAN J R. Clinical applications of myelin plasticity for remyelinating therapies in multiple sclerosis [J]. Ann Neurol, 2021, 90(4): 558-567. DOI: 10.1002/ana.26196.

[6] CHEN K, ZHENG Y H, WEI J, *et al*. Exercise training improves motor skill learning via selective activation of mTOR [J]. Sci Adv, 2019, 5(7): eaaw1888. DOI: 10.1126/sciadv.aaw1888.

[7] SHAHIDI S H, KORDI M R, RAJABI H, *et al*. Exercise modulates the levels of growth inhibitor genes before and after multiple sclerosis [J]. J Neuroimmunol, 2020, 341: 577172. DOI: 10.1016/j.jneuroim.2020.577172.

[8] MANDOLESI G, BULLITTA S, FRESEGNA D, *et al*. Voluntary running wheel attenuates motor deterioration and brain damage in cuprizone-induced demyelination [J]. Neurobiol Dis, 2019, 129: 102-117. DOI: 10.1016/j.nbd.2019.05.010.

[9] JENSEN S K, MICHAELS N J, ILYNTSKYY S, *et al*. Multimodal enhancement of remyelination by exercise with a pivotal role for oligodendroglial PGC1α [J]. Cell Rep, 2018, 24(12): 3167-3179. DOI: 10.1016/j.celrep.2018.08.060.

[10] 詹祖雄, 谭波涛, 王昀杭, 等. 跑台运动对成年脊髓损伤小鼠运动功能及运动皮质 mTOR 信号通路的影响[J]. 解放军医学杂志, 2022, 47(7): 685-693. DOI: 10.11855/j.issn.0577-7402.2022.07.0685.
ZHAN Z X, TAN B T, WANG Y H, *et al*. Effects of treadmill exercise on the motor function and mTOR signal pathway in motor cortex of adult mice after spinal cord injury[J]. Med J Chin PLA, 2022, 47(7): 685-693. DOI: 10.11855/j.issn.0577-7402.2022.07.0685.

[11] SHIN H Y, KIM H, KWON M J, *et al*. Molecular and cellular changes in the lumbar spinal cord following thoracic injury: regulation by treadmill locomotor training[J]. PLoS One, 2014, 9(2): e88215. DOI: 10.1371/journal.pone.0088215.

[12] BASSO D M, FISHER L C, ANDERSON A J, *et al*. Basso Mouse Scale for locomotion detects differences in recovery after spinal cord injury in five common mouse strains[J]. J Neurotrauma, 2006, 23(5): 635-659. DOI: 10.1089/neu.2006.23.635.

[13] ALIZADEH A, DYCK S M, KARIMI-ABDOLREZAEE S. Traumatic spinal cord injury: an overview of pathophysiology, models and acute injury mechanisms[J]. Front Neurol, 2019, 10: 282. DOI: 10.3389/fneur.2019.00282.

[14] LUO M L, YIN Y, LI D F, *et al*. Neuronal activity-dependent myelin repair promotes motor function recovery after contusion spinal cord injury[J]. Brain Res Bull, 2021, 166: 73-81. DOI: 10.1016/j.brainresbull.2020.11.009.

[15] HASSANNEJAD Z, SHAKOURI-MOTLAGH A, MOKHATAB M, *et al*. Oligodendrogliogenesis and axon remyelination after traumatic spinal cord injuries in animal studies: a systematic review[J]. Neuroscience, 2019, 402: 37-50. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2019.01.019.

[16] KUHLMANN T, MIRON V, CUI Q, *et al*. Differentiation block of oligodendroglial progenitor cells as a cause for remyelination failure in chronic multiple sclerosis [J]. Brain, 2008, 131(Pt 7): 1749-1758. DOI: 10.1093/brain/awn096.

[17] WEGENER A, DEBOUX C, BACHELIN C, *et al*. Gain of Olig2 function in oligodendrocyte progenitors promotes remyelination[J]. Brain, 2015, 138(Pt 1): 120-135. DOI: 10.1093/brain/awu375.

[18] KIM J W, HA K Y, MOLON J N, *et al*. Bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation for chronic spinal cord injury in rats[J]. Spine, 2013, 38(17): E1065-E1074. DOI: 10.1097/brs.0b013e31829839fa.

[19] ZHANG J, BULLER B A, ZHANG Z G, *et al*. Exosomes derived from bone marrow mesenchymal stromal cells promote remyelination and reduce neuroinflammation in the demyelinating central nervous system[J]. Exp Neurol, 2022, 347: 113895. DOI: 10.1016/j.expneurol.2021.113895.

[20] LI Q, HOUDAYER T, LIU S, *et al*. Induced neural activity promotes an oligodendroglia regenerative response in the injured spinal cord and improves motor function after spinal cord injury [J]. J Neurotrauma, 2017, 34(24): 3351-3361. DOI: 10.1089/neu.2016.4913.

[21] YOON H, KLEVEN A, PAULSEN A, *et al*. Interplay be-

tween exercise and dietary fat modulates myelinogenesis in the central nervous system[J]. Biochim Biophys Acta, 2016, 1862(4): 545-555. DOI: 10.1016/j.bbadis.2016.01.019.

[22] JIANG T, ZHANG L Y, PAN X N, *et al*. Physical exercise improves cognitive function together with microglia phenotype modulation and remyelination in chronic cerebral hypoperfusion[J]. Front Cell Neurosci, 2017, 11: 404. DOI: 10.3389/fncel.2017.00404.

[23] JIANG T, LUO J, PAN X N, *et al*. Physical exercise modulates the astrocytes polarization, promotes myelin debris clearance and remyelination in chronic cerebral hypoperfusion rats[J]. Life Sci, 2021, 278: 119526. DOI: 10.1016/j.lfs.2021.119526.

[24] DAVID S, KRONER A. Repertoire of microglial and macrophage responses after spinal cord injury[J]. Nat Rev Neurosci, 2011, 12(7): 388-399. DOI: 10.1038/nrn3053.

[25] OYINBO C A. Secondary injury mechanisms in traumatic spinal cord injury: a nugget of this multiply cascade[J]. Acta Neurobiol Exp (Wars), 2011, 71(2): 281-299.

[26] NORRIE B A, NEVETT-DUCHCHERER J M, GORASSINI M A. Reduced functional recovery by delaying motor training after spinal cord injury[J]. J Neurophysiol, 2005, 94(1): 255-264. DOI: 10.1152/jn.00970.2004.

[27] ROLLS A, SHECHTER R, LONDON A, *et al*. Two faces of chondroitin sulfate proteoglycan in spinal cord repair: a role in microglia/macrophage activation[J]. PLoS Med, 2008, 5(8): e171. DOI: 10.1371/journal.pmed.0050171.

[28] WANG H X, LIU N K, ZHANG Y P, *et al*. Treadmill training induced lumbar motoneuron dendritic plasticity and behavior recovery in adult rats after a thoracic contusive spinal cord injury[J]. Exp Neurol, 2015, 271: 368-378. DOI: 10.1016/j.expneurol.2015.07.004.

[29] JAMES N D, BARTUS K, GRIST J, *et al*. Conduction failure following spinal cord injury: functional and anatomical changes from acute to chronic stages[J]. J Neurosci, 2011, 31(50): 18543-18555. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4306-11.2011.

[30] VONDRAN M W, SINGH H, HONEYWELL J Z, *et al*. Levels of BDNF impact oligodendrocyte lineage cells following a cuprizone lesion[J]. J Neurosci, 2011, 31(40): 14182-14190. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.6595-10.2011.

[31] MIN J, SINGH S, FITZGERALD-BOCARSLY P, *et al*. Insulin-like growth factor I regulates G2/M progression through mammalian target of rapamycin signaling in oligodendrocyte progenitors[J]. Glia, 2012, 60(11): 1684-1695. DOI: 10.1002/glia.22387.

[32] KOUTSOUDAKI P N, PAPASTEFANAKI F, STAMATAKIS A, *et al*. Neural stem/progenitor cells differentiate into oligodendrocytes, reduce inflammation, and ameliorate learning deficits after transplantation in a mouse model of traumatic brain injury[J]. Glia, 2016, 64(5): 763-779. DOI: 10.1002/glia.22959.

[33] PARK J S, HOLLOSZY J O, KIM K, *et al*. Exercise training-induced PPARβ increases PGC-1α protein stability and improves insulin-induced glucose uptake in rodent muscles[J]. Nutrients, 2020, 12(3): 652. DOI: 10.3390/nu12030652.

[34] WRANN C D, WHITE J P, SALOGIANNNIS J, *et al*. Exercise induces hippocampal BDNF through a PGC-1α/FNDC5 pathway[J]. Cell Metab, 2013, 18(5): 649-659. DOI: 10.1016/j.cmet.2013.09.008.

[35] CAMACHO A, HUANG J K, DELINT-RAMIREZ I, *et al*. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-coactivator-1 alpha coordinates sphingolipid metabolism, lipid raft composition and myelin protein synthesis[J]. Eur J Neurosci, 2013, 38(5): 2672-2683. DOI: 10.1111/ejn.12281.

[36] HASSANNEJAD Z, YOUSEFIFARD M, AZIZI Y, *et al*. Axonal degeneration and demyelination following traumatic spinal cord injury: a systematic review and meta-analysis[J]. J Chem Neuroanat, 2019, 97: 9-22. DOI: 10.1016/j.jchemneu.2019.01.009.

(收稿:2022-07-02;修回:2022-09-14)

(编辑 吴培红)