

# 基于腺苷酸激活蛋白激酶-自噬信号通路探讨 减重平板训练对脊髓损伤大鼠运动功能的影响

蔡吉利<sup>1</sup>, 翟晨元<sup>1</sup>, 王尊<sup>1,2</sup>, 伍琦<sup>3</sup>, 方露<sup>1,4</sup>, 王钰<sup>1</sup>, 王彤<sup>4\*</sup>

1 南京医科大学康复医学院, 江苏 南京 210029;

2 南京中医药大学针灸推拿学院·养生康复学院, 江苏 南京 210023;

3 南华大学衡阳医学院附属第一医院, 湖南 衡阳 421001;

4 南京医科大学第一附属医院, 江苏 南京 210029

\* 通信作者: 王彤, E-mail: wangtong60621@163.com

收稿日期: 2024-02-15; 接受日期: 2024-05-25

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(82172541)

DOI: 10.3724/SP.J.1329.2024.04009

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



**摘要 目的** 基于腺苷酸激活蛋白激酶(AMPK)-自噬信号通路探讨减重平板训练对脊髓损伤(SCI)大鼠运动功能的影响及其作用机制。**方法** 选择30只10周龄SPF级雌性SD大鼠,按照随机数字表法分为假手术组、模型组和运动组,每组10只。模型组和运动组均采用Allen's法制作T<sub>10</sub>不完全性脊髓损伤模型,假手术组仅进行假手术。3组均于SCI造模前3d进行预适应运动训练,以适应跑台环境。运动组于造模后第8天进行减重平板训练,减重为大鼠体质量的20%~40%,跑台速度6 m/min,20 min/次,2次/d,持续训练3周;假手术组和模型组造模后均自由活动,不进行减重平板训练。分别在造模后第1、7、14、21、28天采用脊髓损伤行为学(BBB)评分法评估各组大鼠后肢运动功能;于干预结束后(SCI后第28天)采用步态分析处理系统评估大鼠的步态参数(足印面积、步幅长度、触地强度、摆动速度和运动速度);采用尼氏染色法观察脊髓神经元形态及数目;采用Western blot法检测脊髓组织p-AMPK、t-AMPK、LC3、p62蛋白表达水平。**结果** ① BBB评分:与假手术组比较,模型组、运动组造模后第1、7、14、21、28天BBB评分明显更低,差异均具有统计学意义( $P<0.05$ );与模型组同一时间点比较,运动组造模后14、21、28天BBB评分明显更高,差异均具有统计学意义( $P<0.05$ );模型组、运动组内不同时间点BBB评分比较,差异均具有统计学意义( $P<0.05$ )。② 步态参数:与假手术组比较,模型组足印面积、触地强度、摆动速度、步幅长度和运动速度均明显更低,运动组足印面积明显更低,差异均具有统计学意义( $P<0.05$ );与模型组比较,运动组第28天足印面积、触地强度、摆动速度、步幅长度和运动速度均明显更高,差异均具有统计学意义( $P<0.05$ )。③ 脊髓前角神经元形态及数目:与假手术组比较,模型组脊髓前角神经元数目明显减少( $P<0.05$ ),可见细胞核固缩。与模型组比较,运动组脊髓前角可见较为清晰的尼氏体,细胞核固缩程度降低,脊髓前角神经元存活数目增加( $P<0.05$ )。④ p-AMPK、t-AMPK、LC3、p62蛋白表达水平:与假手术组比较,模型组LC3 II/LC3 I明显降低,p62明显升高,差异均具有统计学意义( $P<0.05$ );与模型组比较,运动组LC3 II/LC3 I、p-AMPK/t-AMPK明显升高,p62明显降低,差异均具有统计学意义( $P<0.05$ )。**结论** 减重平板训练可改善SCI大鼠神经功能和后肢运动功能,这可能与激活脊髓AMPK-自噬信号通路有关。

**关键词** 脊髓损伤;减重平板训练;腺苷酸激活蛋白激酶;自噬;运动功能;神经功能

引用格式:蔡吉利,翟晨元,王尊,等.基于腺苷酸激活蛋白激酶-自噬信号通路探讨减重平板训练对脊髓损伤大鼠运动功能的影响[J].康复学报,2024,34(4):370-376.

CAI J L, ZHAI C Y, WANG Z, et al. Effect of body weight supported treadmill training on motor function of rats with spinal cord injury based on AMPK-autophagy signaling pathway [J]. Rehabil Med, 2024, 34(4): 370-376.

DOI: 10.3724/SP.J.1329.2024.04009

©《康复学报》编辑部, 开放获取 CC BY-NC-ND 4.0 协议

© Rehabilitation Medicine, OA under the CC BY-NC-ND 4.0

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)是一种严重的中枢神经系统损伤性疾病,致残率高、并发症复杂,给患者个人、家庭及社会带来沉重的负担<sup>[1-2]</sup>。自噬是机体重要的生理过程,可以清除蛋白质聚集体和降解受损的细胞器及其他成分以维持细胞稳态<sup>[3]</sup>。研究表明,SCI后自噬抑制会加剧脊髓神经元受损和神经炎症<sup>[4-5]</sup>,进而阻碍SCI后的功能恢复。因此,调节自噬水平对SCI后功能恢复具有重要意义。

运动训练作为一种无创的非药物干预方法,临床研究显示其对SCI后功能恢复具有促进作用<sup>[6-7]</sup>。减重平板训练是常用的运动训练方式,通过对患者进行合理减重,能够有效解决患者因下肢瘫痪等因素导致的步行训练困难问题,并被证实具有较好的临床疗效<sup>[8-9]</sup>。本课题组前期研究发现,减重平板训练能够有效缓解SCI后神经病理性疼痛和减轻痉挛<sup>[10-11]</sup>,但其具体机制仍处于探索阶段。以往研究结果显示,SCI后运动具有神经保护功能<sup>[12-13]</sup>。但是运动训练是否能够调节SCI后自噬水平及其具体机制仍未形成共识。

腺苷酸激活蛋白激酶(adenosine monophosphate-activated protein kinase, AMPK)是生物体内能量传感器,激活AMPK被认为能够增强细胞自噬。有研究发现,运动能够上调p-AMPK水平,提高骨骼肌、大脑的自噬水平<sup>[14-15]</sup>。但运动是否通过影响自噬水平,促进SCI后运动功能恢复尚不清楚。本研究基于AMPK-自噬信号通路探讨减重平板训练对SCI大鼠运动功能的影响及其作用机制,以期为运动干预SCI提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

选择10周龄SPF级雌性SD大鼠30只,体质量(230±20)g,由浙江维通利华实验动物技术有限公司[实验动物生产许可证号:SCXK(浙)2019-0001]生产,饲养于南京医科大学医药实验动物中心[实验动物使用许可证号:SYXK(苏)2020-0022]。所有实验均已通过南京医科大学动物实验伦理委员会审批(审批号:IACUC-2206045)。

### 1.2 主要实验仪器和试剂

**1.2.1 主要实验仪器** 脊髓打击器(深圳市瑞沃德生命科技股份有限公司,型号:68097);小动物实验跑步机(北京众实迪创科技发展有限公司,型号:ZS-PT-III);步态分析处理系统(北京众实迪创科技发展有限公司,型号:ZS-BT/S);高速冷冻离心机及

酶标仪均购自美国Thermo公司;电泳仪及转膜仪均购自美国Bio-Rad公司;全自动化学发光图像分析系统(上海天能生命科学有限公司,型号:Tanon 5200)。

**1.2.2 主要实验试剂** BCA蛋白浓度测定试剂盒(美国Thermo公司);RIPA组织细胞快速裂解液、蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂、发光液均购自碧云天生物技术研究所;p-AMPK抗体(沈阳万类生物科技有限公司,批号:WL05103);LC3抗体(沈阳万类生物科技有限公司,批号:WL01506);AMPK抗体(英国Abcam公司,批号:ab32047);p62抗体(杭州荟丹生物科技有限公司,批号:A95292); $\beta$ -actin抗体(武汉爱博泰克生物科技有限公司,批号:AC026)。

### 1.3 实验方法

**1.3.1 实验动物分组** 实验大鼠按照随机数字表法分为假手术组、模型组和运动组,每组10只。

**1.3.2 动物模型制作** 模型组和运动组均采用Allen's法制作T<sub>10</sub>不完全性脊髓损伤模型,损伤剂量为10g×25mm(打击头直径2.5mm)。大鼠造模时出现双后肢抽动或尾巴摆动并且脊髓局部立即出现水肿和淤血,苏醒后双后肢瘫痪即模型构建成功。假手术组仅单纯摘除椎板,暴露脊髓。术后膀胱按摩辅助排便排尿,2次/d,直至SCI大鼠形成自主排便排尿。

#### 1.3.3 干预方法

**1.3.3.1 预适应训练** 3组均于SCI造模前3d进行预适应运动训练,以适应跑台环境。

**1.3.3.2 运动组** 于造模后第8天进行减重平板训练<sup>[10]</sup>,减重为大鼠体质量的20%~40%,依据大鼠后肢运动功能恢复情况调整,跑台速度6m/min,20min/次,2次/d,持续训练3周。

**1.3.3.3 假手术组和模型组** 2组造模后均自由活动,不进行减重平板训练。

### 1.4 观察指标

**1.4.1 大鼠后肢运动功能** 分别在造模后第1、7、14、21、28天采用脊髓损伤行为学(Basso-Beattie-Bresnahan, BBB)评分法评估各组大鼠后肢运动功能。评估时,2名盲法观察者将大鼠放入空地,使用从0分(无任何运动)~21分(正常运动)的评分量表评估大鼠后肢关节运动、协调和重量支撑情况。记录2个观察者评分结果的平均值。

**1.4.2 步态参数** 于干预结束后(SCI后第28天)采用步态分析处理系统(北京众实迪创科技发展有限公司,型号:ZS-BT/S)评估大鼠的步态参数(足印面积、步幅长度、触地强度、摆动速度和运动速度)。

评估过程在黑暗、无干扰因素的环境下进行,各组大鼠被放置在水平玻璃走道的一端,并自发地向另一端跑去,仪器记录跑步过程中前、后肢步态参数。完成测量后,首先使用配套的Walk Analyzer软件进行自动分析,然后手动排除不相关的数据,如鼻子、腹部或尾巴与走道的接触。

**1.4.3 脊髓神经元形态及数目** 行为学分析和步态分析结束后,采用尼氏染色法观察脊髓神经元形态及数目。处死各组大鼠后取脊髓组织,4%多聚甲醛固定,脱水,石蜡包埋,制作脊髓横切切片。经脱蜡、水化后进行尼氏染色,透明、封片后,于显微镜下观察和分析脊髓神经元形态及数目。

**1.4.4 脊髓组织 p-AMPK、t-AMPK、LC3、p62 蛋白表达水平** 采用 Western blot 法检测脊髓组织 p-AMPK、t-AMPK、LC3、p62 蛋白表达水平。取出于-80℃冻存的脊髓组织,加入适量裂解液,在冰上进行剪碎研磨,4℃ 13 000 r/min 离心 15 min,转移上清液于 EP 管。经 BCA 定量后加入适量上样缓冲液,100℃加热变性 5 min。依据蛋白相对分子质量制备分离胶(15%,8%)和浓缩胶(5%),上样(20 μg 蛋白量),80 V 恒压电泳跑胶后 300 mA 恒流转膜,5%脱脂奶粉室温封闭 2 h,弃去封闭液后 TBST 缓冲

液清洗 3 次,每次 10 min,加入一抗 4℃ 孵育过夜;TBST 缓冲液再清洗 3 次,10 min/次,加入二抗常温孵育 2 h;TBST 缓冲液再清洗 3 次,10 min/次,用化学发光液浸泡条带片刻后置于全自动化学发光图像分析系统显影,导出数据进行条带灰度值分析。

**1.5 统计学方法**

采用 SPSS 27.0 软件进行统计学分析。计量资料符合正态分布以( $\bar{x}\pm s$ )表示,组内多个时间点比较采用重复测量方差分析;多组间比较采用方差分析,组间两两比较,方差齐采用 Tukey 检验;不服从正态分布以  $M(P_{25}, P_{75})$  表示,多组间比较采用多样本 Kruskal-Wallis  $H$  秩和检验。 $P<0.05$  为差异具有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 3组 BBB 评分比较**

与假手术组比较,模型组、运动组造模后第 1、7、14、21、28 天 BBB 评分明显更低,差异均具有统计学意义( $P<0.05$ );与模型组同一时间点比较,运动组造模后第 14、21、28 天 BBB 评分明显更高,差异均具有统计学意义( $P<0.05$ );模型组、运动组内不同时间点 BBB 评分比较,差异均具有统计学意义( $P<0.05$ )。见表 1。

表 1 3组不同时间点 BBB 评分比较( $\bar{x}\pm s$ ) 分  
 Table 1 Comparison of BBB score in three groups at different times ( $\bar{x}\pm s$ ) Scores

组别	n	造模后				
		第1天	第7天	第14天	第21天	第28天
假手术组	8	21.00±0.00	21.00±0.00	21.00±0.00	21.00±0.00	21.00±0.00
模型组	8	0.00±0.00 <sup>1)</sup>	1.75±0.38 <sup>1)3)</sup>	2.56±0.68 <sup>1)4)</sup>	5.31±1.13 <sup>1)5)</sup>	7.19±0.96 <sup>1)6)</sup>
运动组	8	0.00±0.00 <sup>1)</sup>	1.81±0.53 <sup>1)3)</sup>	4.13±1.27 <sup>1)2)4)</sup>	9.06±3.16 <sup>1)2)5)</sup>	12.69±3.63 <sup>1)2)6)</sup>

注:与假手术组比较,1)  $P<0.05$ ;与模型组同一时间点比较,2)  $P<0.05$ 。与造模后第 1 天比较,3)  $P<0.05$ ;与造模后第 7 天比较,4)  $P<0.05$ ;与造模后第 14 天比较,5)  $P<0.05$ ;与造模后第 21 天比较,6)  $P<0.05$ 。

Note: Compared with the sham operation group, 1)  $P<0.05$ ; compared with the model group at the same time, 2)  $P<0.05$ . Compared with the 1st day after modeling, 3)  $P<0.05$ ; compared with the 7th day after modeling, 4)  $P<0.05$ ; compared with the 14th day after modeling, 5)  $P<0.05$ ; compared with the 21th day after modeling, 6)  $P<0.05$ .

**2.2 3组步态参数比较**

与假手术组比较,模型组足印面积、触地强度、摆动速度、步幅长度和运动速度均明显更低,运动组足印面积明显更低,差异均具有统计学意义( $P<0.05$ );与模型组比较,运动组第 28 天足印面积、触地强度、摆动速度、步幅长度和运动速度均明显更高,差异均具有统计学意义( $P<0.05$ )。见表 2。

**2.3 3组大鼠脊髓前角神经元形态及数目比较**

尼氏染色结果显示,假手术组脊髓前角神经元形态正常,细胞质清晰,细胞核均匀;与假手术组比较,模型组脊髓前角神经元数目明显减少( $P<0.05$ ),可见细胞核萎缩。与模型组比较,运动组脊髓前角可见较为清晰的尼氏体,细胞核固缩程度降低,脊髓前角神经元存活数目增加( $P<0.05$ )。见图 1、表 3。

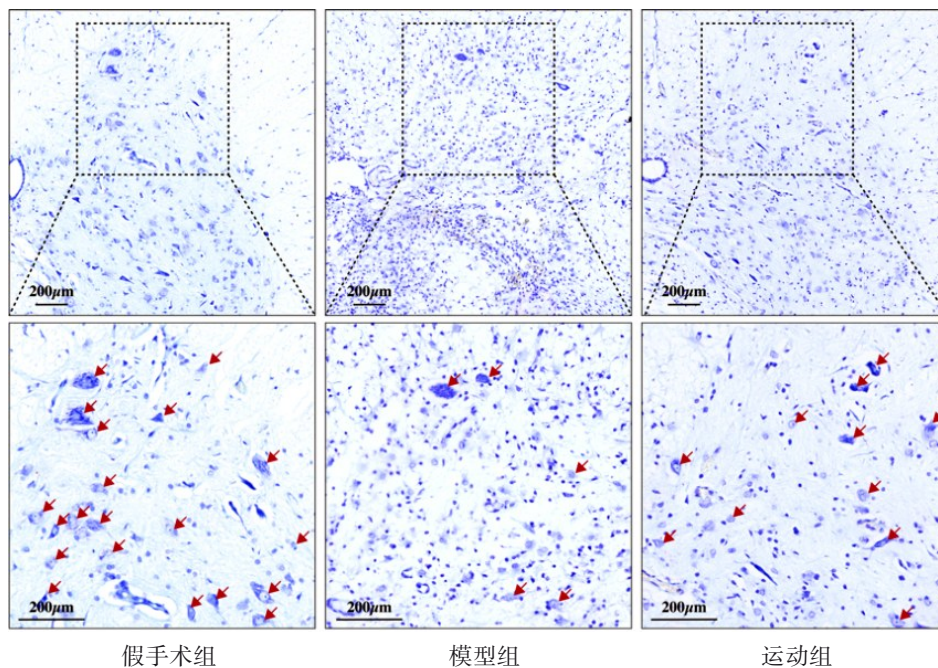
表2 3组步态参数比较[M(P<sub>25</sub>,P<sub>75</sub>)]

Table 2 Comparison of gait parameters in three groups [M(P<sub>25</sub>,P<sub>75</sub>)]

组别	n	足印面积/cm <sup>2</sup>	步幅长度/cm	触地强度	摆动速度/(cm/s)	运动速度/(cm/s)
假手术组	8	2.16(1.92,2.56)	11.22(10.20,12.34)	180.68(172.06,182.07)	79.50(70.35,80.41)	19.84(14.99,21.45)
模型组	8	0.14(0.00,0.52) <sup>1)</sup>	6.39(0.00,9.15) <sup>1)</sup>	85.43(0.00,125.54) <sup>1)</sup>	15.15(0.00,30.25) <sup>1)</sup>	4.59(0.00,10.73) <sup>1)</sup>
运动组	8	1.45(1.12,1.88) <sup>1)2)</sup>	12.68(10.71,13.19) <sup>2)</sup>	181.12(173.17,191.14) <sup>2)</sup>	80.63(71.46,90.78) <sup>2)</sup>	22.88(14.28,24.94) <sup>2)</sup>

注:与假手术组比较,1) P<0.05;与模型组比较,2) P<0.05。

Note: Compared with the sham operation group, 1) P<0.05; compared with the model group, 2) P<0.05.



注:红色箭头表示脊髓神经元。

Note: Red arrows indicate spinal cord neurons.

图1 3组脊髓神经元形态(x20)

Figure 1 Morphology of spinal cord neurons in three groups (x20)

表3 3组大鼠脊髓神经元数量比较(x̄±s)

Table 3 Comparison of number of spinal cord neurons in three groups (x̄±s)

组别	n	神经元数量/个
假手术组	4	22.00±1.83
模型组	4	6.50±2.52 <sup>1)</sup>
运动组	4	13.00±2.94 <sup>1)2)</sup>

注:与假手术组比较,1) P<0.05;与模型组比较,2) P<0.05。

Note: Compared with the sham operation group, 1) P<0.05; compared with the model group, 2) P<0.05.

### 2.4 3组 p-AMPK、t-AMPK、LC3、p62 蛋白表达水平比较

与假手术组比较,模型组 LC3 II/LC3 I 明显降低, p62 明显升高, 差异均具有统计学意义 (P<

0.05)。与模型组比较,运动组 LC3 II/LC3 I、p-AMPK/t-AMPK 明显升高, p62 明显降低, 差异均具有统计学意义 (P<0.05)。见图2和表4。

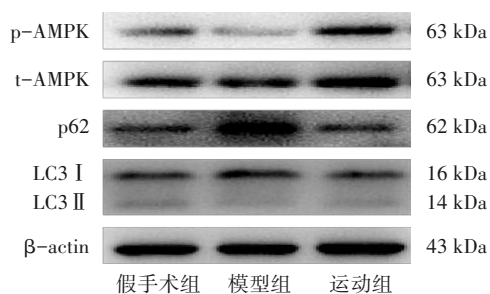


图2 3组 p-AMPK、t-AMPK、LC3、p62 蛋白免疫印迹图

Figure 2 Protein band figure of p-AMPK, t-AMPK, LC3 and p62 protein in three groups

表4 3组自噬相关蛋白表达水平比较( $\bar{x}\pm s$ )

Table 4 Comparison of autophagy-related protein expression levels in three groups ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	n	LC3 II / LC3 I	p62	p-AMPK/t-AMPK
假手术组	4	1.00±0.12	1.00±0.06	1.00±0.12
模型组	4	0.69±0.18 <sup>1)</sup>	1.48±0.16 <sup>1)</sup>	0.62±0.46
运动组	4	1.12±0.09 <sup>2)</sup>	1.22±0.10 <sup>2)</sup>	1.23±0.16 <sup>2)</sup>

注:与假手术组比较,1)  $P<0.05$ ;与模型组比较,2)  $P<0.05$ 。

Note: Compared with the sham operation group, 1)  $P<0.05$ ; compared with the model group, 2)  $P<0.05$ .

### 3 讨论

SCI是一种严重的神经系统损伤性疾病,其病理生理过程分为原发性和继发性2个阶段<sup>[15]</sup>。原发性损伤属于不可逆性损伤,因而目前SCI的治疗干预多聚焦于减轻继发性损伤带来的影响,进而改善SCI后功能的恢复。

#### 3.1 减重平板训练可改善SCI大鼠后肢运动功能

本研究结果显示,与模型组同一时间点比较,运动组造模后第14、21、28天BBB评分明显更高,运动组造模后第28天足印面积、触地强度、摆动速度、步幅长度和运动速度均明显更高,提示减重平板训练可改善SCI大鼠后肢运动功能。这可能与以下因素有关:①减轻大鼠神经病理性疼痛。通过增加SCI大鼠损伤远端脊髓后角谷氨酸脱羧酶-65/67的合成,改善神经病理性疼痛<sup>[10]</sup>。②缓解SCI后痉挛。通过上调SCI后钾-氯协同转运蛋白-2表达,控制痉挛的发生<sup>[11]</sup>。③增强脊髓可塑性。能够上调神经营养因子的表达,促进脊髓神经组织的修复,重建功能性神经环路,进而促进运动功能的恢复。

#### 3.2 减重平板训练提高SCI大鼠脊髓局部自噬水平,促进神经元存活

本研究结果显示,与模型组比较,运动组脊髓前角尼氏体清晰可见,细胞核固缩程度降低,神经元存活数目增加,LC3 II / LC3 I、p-AMPK/t-AMPK明显升高,p62明显降低,提示减重平板训练提高SCI大鼠脊髓局部自噬水平,促进神经元存活。自噬是SCI后一种重要的细胞生存途径,其可以分解受损的细胞器以维持细胞内平衡,促进细胞存活<sup>[16]</sup>。SCI后自噬受损会加剧脊髓神经炎症导致的神经功能缺损;自噬缺陷也会导致SCI后神经修复能力受损<sup>[17]</sup>。LC3及p62蛋白是经典的自噬标记物,可以反映自噬的水平。在自噬过程中,LC3 I会被泛素样体系修饰和加工,与自噬体液泡膜表面的磷脂酰乙醇胺(phosphatidylethanolamine, PE)结合,形成与自噬体液泡膜结合的LC3 II。自噬体液泡膜的延

伸和完成离不开LC3 II,LC3 II表达水平或LC3 II / LC3 I是反映自噬体液泡数量的直接指标<sup>[18]</sup>,与自噬水平呈正相关关系。有研究表明,某些形式的自噬过程具有高度选择性,这种选择性的自噬途径需要能够特异性结合蛋白质聚集体或受损细胞器,并将其递送到自噬体的接头蛋白,p62就是重要的接头蛋白之一<sup>[19]</sup>。p62可以通过其泛素相关的结构域(ubiquitin-associated domain, UBA domain)识别泛素化修饰标记的底物蛋白,自噬体与溶酶体融合形成自噬溶酶体促进底物蛋白的降解<sup>[20]</sup>。p62蛋白表达水平能够间接反映自噬体的清除水平<sup>[21]</sup>。减重平板训练可使SCI大鼠LC3 II / LC3 I明显升高,p62明显降低,提高细胞自噬水平,从而改善神经功能。这与JIANG等<sup>[22]</sup>研究结果相似。

#### 3.3 减重平板训练改善SCI大鼠神经功能和后肢运动功能可能与激活AMPK-自噬信号通路有关

本研究结果显示,与模型组比较,运动组p-AMPK/t-AMPK明显升高,提示减重平板训练改善SCI大鼠神经功能和后肢运动功能可能与激活AMPK-自噬信号通路有关。AMPK作为一种与能量代谢密切相关的激酶,能够感知细胞内能量,在机体能量耗竭时被磷酸化修饰激活<sup>[23]</sup>。AMPK能够促进神经元自噬和抑制细胞凋亡,改善SCI后神经运动功能<sup>[24]</sup>。减重平板训练是一种耗能的治疗干预方式,与机体能量代谢密切相关<sup>[25]</sup>。减重平板训练激活AMPK介导的自噬可能有以下2个方面功能:①激活神经细胞自噬,可以抑制神经元凋亡,促进SCI后大鼠神经功能恢复;②上调小胶质细胞自噬水平,促进小胶质细胞活化,提高其在损伤局部的清除速度和吞噬作用<sup>[26]</sup>,改善局部微环境,促进神经元存活和神经功能恢复。

### 4 小结

减重平板训练可改善SCI大鼠神经功能和后肢运动功能,这可能与激活脊髓AMPK-自噬信号通路有关。减重平板训练作为一种温和且无创的全身

性治疗手段,可能涉及多种作用机制,本研究仅基于 AMPK-自噬信号通路探讨减重平板训练调控脊髓局部自噬水平的机制,并未涉及激活 AMPK 的亚细胞定位。下一步研究还需全面考虑多种机制的协同作用,并探讨激活 AMPK 的亚细胞定位,以期为减重平板训练干预 SCI 后运动功能障碍提供理论依据。

## 参考文献

- [1] 张浩,刘宇,肖世宁,等. 中国创伤性脊髓损伤患者流行病学特征的 Meta 分析[J]. 中国脊柱脊髓杂志,2023,9(5):397-407. ZHANG H, LIU Y, XIAO S N, et al. Epidemiological characteristics of traumatic spinal cord injury in China: a meta-analysis [J]. Chin J Spine Spinal Cord, 2023, 9(5): 397-407.
- [2] 中国残疾人康复协会脊髓损伤康复专业委员会. 创伤性脊柱脊髓损伤诊断与治疗专家共识(2022 版)[J]. 中国老年保健医学, 2022, 20(4): 6-9. China Association of Rehabilitation of Disabled Persons Society of Spinal Cord Injuries. Expert consensus on diagnosis and treatment of traumatic spinal cord injury (2022 edition) [J]. Chin J Geriatr Care, 2022, 20(4): 6-9.
- [3] KIM K H, LEE M S. Autophagy: a key player in cellular and body metabolism [J]. Nat Rev Endocrinol, 2014, 10(6): 322-337.
- [4] ZHANG H J, NI W F, YU G X, et al. 3,4-Dimethoxychalcone, a caloric restriction mimetic, enhances TFEB-mediated autophagy and alleviates pyroptosis and necroptosis after spinal cord injury [J]. Theranostics, 2023, 13(2): 810-832.
- [5] LI Y, JONES J W, M C CHOI H, et al. cPLA2 activation contributes to lysosomal defects leading to impairment of autophagy after spinal cord injury [J]. Cell Death Dis, 2019, 10(7): 531.
- [6] ZHANG F, CARNAHAN J, RAVI M, et al. Combining spinal cord transcutaneous stimulation with activity-based training to improve upper extremity function following cervical spinal cord injury [J]. Annu Int Conf IEEE Eng Med Biol Soc, 2023, 2023: 1-4.
- [7] EDWARDS D J, FORREST G, CORTES M, et al. Walking improvement in chronic incomplete spinal cord injury with exoskeleton robotic training (WISE): a randomized controlled trial [J]. Spinal Cord, 2022, 60(6): 522-532.
- [8] 王晓亮, 吴文广. 减重平板步行训练对不完全性脊髓损伤患者的康复效果观察[J]. 医学理论与实践, 2020, 33(23): 4030-4031. WANG X L, WU W G. Observation on rehabilitation effect of weight-loss treadmill walking training on patients with incomplete spinal cord injury [J]. J Med Theory Pract, 2020, 33(23): 4030-4031.
- [9] 郭立敏, 李文涵. 减重平板训练对脊柱胸腰段骨折术后伴脊髓损伤病人的影响[J]. 全科护理, 2021, 19(27): 3831-3833. GUO L M, LI W H. Effect of weight-loss treadmill training on patients with spinal cord injury after thoracolumbar fracture [J]. Chin Gen Pract Nurs, 2021, 19(27): 3831-3833.
- [10] 李向哲, 丁洁, 王庆华, 等. 减重平板训练对脊髓损伤大鼠神经病理性疼痛及脊髓后角谷氨酸脱羧酶-65/67 表达的影响[J]. 中国康复理论与实践, 2021, 27(2): 131-136. LI X Z, DING J, WANG Q H, et al. Effects of body weight-supported treadmill training on neuropathic pain and expression of glutamate decarboxylase (GAD)-65/67 in spinal dorsal horn of rats with spinal cord injury [J]. Chin J Rehabil Theory Pract, 2021, 27(2): 131-136.
- [11] 丁洁, 李向哲, 方露, 等. 阻断 BDNF-Trk B 信号通路后运动训练对脊髓损伤后大鼠痉挛状态及脊髓内 GAD65 表达的影响[J]. 中国康复医学杂志, 2019, 34(5): 501-507. DING J, LI X Z, FANG L, et al. Effects of exercise training on the expression of GAD65 after blocking BDNF-Trk B pathway in spastic rats with spinal cord injury [J]. Chin J Rehabil Med, 2019, 34(5): 501-507.
- [12] 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. 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 People's Liberation Army, 2022, 47(7): 685-693.
- [13] ZHAN Z X, PAN L, ZHU Y, et al. Moderate-intensity treadmill exercise promotes mTOR-dependent motor cortical neurotrophic factor expression and functional recovery in a murine model of crush spinal cord injury (SCI) [J]. Mol Neurobiol, 2023, 60(2): 960-978.
- [14] ZENG Z Z, LIANG J L, WU L W, et al. Exercise-induced autophagy suppresses sarcopenia through Akt/mTOR and Akt/FoxO3a signal pathways and AMPK-mediated mitochondrial quality control [J]. Front Physiol, 2020, 11: 583478.
- [15] BAYOD S, DEL VALLE J, CANUDAS A M, et al. Long-term treadmill exercise induces neuroprotective molecular changes in rat brain [J]. J Appl Physiol, 2011, 111(5): 1380-1390.
- [16] LI J, CAO Y, LI L N, et al. Neuroprotective effects of oxymatrine via triggering autophagy and inhibiting apoptosis following spinal cord injury in rats [J]. Mol Neurobiol, 2023, 60(8): 4450-4471.
- [17] LI Y, LEI Z F, RITZEL R M, et al. Impairment of autophagy after spinal cord injury potentiates neuroinflammation and motor function deficit in mice [J]. Theranostics, 2022, 12(12): 5364-5388.
- [18] ZHOU K L, SANSUR C A, XU H Z, et al. The temporal pattern, flux, and function of autophagy in spinal cord injury [J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(2): 466.
- [19] VARGAS J N S, HAMASAKI M, KAWABATA T, et al. The mechanisms and roles of selective autophagy in mammals [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2023, 24(3): 167-185.
- [20] JEONG S J, ZHANG X Y, RODRIGUEZ-VELEZ A, et al. p62/SQSTM1 and selective autophagy in cardiometabolic diseases [J]. Antioxid Redox Signal, 2019, 31(6): 458-471.
- [21] 梁钰莹, 黄泳, 刘俊升, 等. 自噬与神经系统疾病[J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(3): 111-119. LIANG Y Y, HUANG Y, LIU J S, et al. Autophagy and neurological diseases [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(3): 111-119.
- [22] JIANG Y C, HWANG D J, KOO J H, et al. Association of exercise-induced autophagy upregulation and apoptosis suppression with

- neuroprotection against pharmacologically induced Parkinson's disease [J]. *J Exerc Nutrition Biochem*, 2018, 22(1): 1-8.
- [23] STEINBERG G R, HARDIE D G. New insights into activation and function of the AMPK [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2023, 24(4): 255-272.
- [24] LIN S, TIAN H, LIN J Q, et al. Zinc promotes autophagy and inhibits apoptosis through AMPK/mTOR signaling pathway after spinal cord injury [J]. *Neurosci Lett*, 2020, 736: 135263.
- [25] SPAULDING H R, YAN Z. AMPK and the adaptation to exercise [J]. *Annu Rev Physiol*, 2022, 84: 209-227.
- [26] WU Y Q, XIONG J, HE Z L, et al. Metformin promotes microglial cells to facilitate myelin debris clearance and accelerate nerve repairment after spinal cord injury [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2022, 43(6): 1360-1371.

## Effect of Body Weight Supported Treadmill Training on Motor Function of Rats with Spinal Cord Injury Based on AMPK–Autophagy Signaling Pathway

CAI Jili<sup>1</sup>, ZHAI Chenyuan<sup>1</sup>, WANG Zun<sup>1,2</sup>, WU Qi<sup>3</sup>, FANG Lu<sup>1,4</sup>, WANG Yu<sup>1</sup>, WANG Tong<sup>4\*</sup>

<sup>1</sup> School of Rehabilitation Medicine, Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu 210029, China;

<sup>2</sup> School of Acupuncture–Moxibustion and Tuina, School of Health Preservation and Rehabilitation, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, Jiangsu 210023, China;

<sup>3</sup> The First Affiliated Hospital of University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China;

<sup>4</sup> The First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu 210029, China

\*Correspondence: WANG Tong, E-mail: wangtong60621@163.com

**ABSTRACT Objective** To explore the effect and mechanism of body weight supported treadmill training on motor function of rats with spinal cord injured (SCI) based on the adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK)-autophagy signaling pathway. **Methods** A total of 30 10-week-old female SD rats were randomly divided into sham operation group, model group, and exercise group, with 10 cases in each group. Allen's method was used to establish T<sub>10</sub> incomplete spinal cord injury models in the model group and the exercise group, while the sham operation group only underwent sham operation. All the three groups received preconditioning exercise training for 3 days before SCI modeling to adapt to the treadmill environment. From the 8th day after modeling, the exercise group received treadmill training with weight reduction of 20%-40% of the body mass, and the treadmill speed was set at 6 m a minute, 20 minutes a time, twice a day for 3 weeks. The sham operation group and the model group were allowed to move freely without treadmill training after modeling. Basso-Beattie-Bresnahan (BBB) method was used to assess motor function of hind limbs of rats at the 1st, 7th, 14th, 21st and 28th days after modeling. Gait analysis system was used to assess gait parameters (footprint area, stride length, touchdown intensity, swing speed and movement speed) after intervention (at the 28th day after SCI). Nissl staining was used to observe the morphology and count of spinal cord neurons. Western blot method was used to detect the protein expression levels of p-AMPK, t-AMPK, LC3 and p62 in spinal cord tissue. **Results** (1) BBB score: compared with the sham operation group, the BBB score of the model group and the exercise group were significantly lower at the 1st, 7th, 14th, 21st and 28th days after modeling ( $P < 0.05$ ). Compared with the model group at the same time, the BBB score of the exercise group was significantly higher at the 14th, 21st and 28th days after modeling, and the differences were statistically significant ( $P < 0.05$ ). The BBB score in the model group and the exercise group were compared at different times, and the differences were statistically significant ( $P < 0.05$ ). (2) Gait parameters: compared with the sham operation group, the footprint area, touchdown intensity, swing speed, stride length and movement speed were significantly lower in the model group, and the footprint area was significantly lower of the exercise group ( $P < 0.05$ ); compared with the model group, the footprint area, touchdown intensity, swing speed, stride length and movement speed were significantly higher in the exercise group at the 28th day after modeling, and the differences were statistically significant ( $P < 0.05$ ). (3) Morphology and number of neurons in the anterior horn of the spinal cord: compared with the sham operation group, the number of neurons in the anterior horn of the spinal cord reduced significantly in the model group ( $P < 0.05$ ), and nuclear pyknosis was observed. Compared with the model group, Nissl bodies were more clearly observed in the exercise group, nuclear pyknosis reduced significantly, and the number of surviving neurons in the anterior horn of the spinal cord increased significantly ( $P < 0.05$ ). (4) Protein expression levels of p-AMPK, t-AMPK, LC3, and p62: compared with the sham operation group, LC3 II/LC3 I decreased significantly in the model group, and p62 increased significantly ( $P < 0.05$ ). Compared with the model group, LC3 II/LC3 I and p-AMPK/t-AMPK increased significantly in the exercise group, and p62 decreased significantly ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Body weight supported treadmill training can improve the neurological function and hindlimb motor function of rats with SCI, which may be related to the activation of the spinal AMPK-autophagy signaling pathway.

**KEY WORDS** spinal cord injury; body weight supported treadmill training; AMPK; autophagy; motor function; neurological function

DOI:10.3724/SP.J.1329.2024.04009