

王晓歌,鲍金宇,杨帅,等. 跑台运动上调 BDNF/TrkB-CREB 通路改善神经性疼痛模型大鼠焦虑样行为 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(9): 1149-1159.

WANG X G, BAO J Y, YANG S, et al. Treadmill exercise up-regulates BDNF/TrkB-CREB pathway to improve anxiety-like behavior in neuropathic pain rats [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(9): 1149-1159.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.09.006

跑台运动上调 BDNF/TrkB-CREB 通路改善神经性疼痛模型大鼠焦虑样行为

王晓歌¹, 鲍金宇², 杨帅³, 吕怡杭³, 臧卫东⁴, 李翠^{3,4*}

(1. 郑州工商学院体育学院, 郑州 451400; 2. 北京师范大学体育与运动学院, 北京 100875;

3. 郑州大学体育学院(校本部), 郑州 450001; 4. 郑州大学基础医学院, 郑州 450001)

【摘要】 目的 本研究拟探究中低强度跑台运动对慢性坐骨神经压迫损伤(chronic constriction injury of the sciatic nerve, CCI)模型大鼠的痛行为和焦虑样行为的影响,并研究 BDNF/TrkB-CREB 通路参与运动缓解 CCI 大鼠疼痛及焦虑行为的神经机制。**方法** 将 32 只 SD 雄性大鼠按照体重随机方法分为 4 组:假手术(Sham)组、模型(CCI)组、假手术 + 运动(Sham + Exe)组、模型 + 运动(CCI + Exe)组,其中 Sham + Exe 组、CCI + Exe 组大鼠进行 4 周的跑台训练。在术前及术后不同时间点检测各组大鼠机械缩足阈值(paw withdrawal threshold, PWT)和热缩足潜伏期(paw withdrawal latency, PWL),采用高架十字迷宫实验和旷场实验评估大鼠的焦虑样行为,采用实时荧光定量逆转录 PCR(real-time quantitative reverse transcription PCR, RT-qPCR)和免疫蛋白印迹实验检测海马组织中的脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)、酪氨酸激酶受体(tyrosine kinase receptor B, TrkB)、环磷酸腺苷效应元件结合蛋白(cAMP-response element binding protein, CREB)的 mRNA 及蛋白表达。**结果** (1) CCI 组大鼠术后 7、14、21、28、35 d 的术侧 PWT 和 PWL 显著低于 Sham 组($P < 0.001$),与 CCI 组相比,CCI + Exe 组术侧 PWT 在 21 d 后显著增加($P < 0.05$),术侧 PWL 在 14 d 后显著增加($P < 0.05$);(2)与 Sham 组相比,CCI 组大鼠停留在高架十字迷宫开放臂的时间百分比显著降低($P < 0.001$),在闭合臂的时间百分比显著升高($P < 0.01$),CCI + Exe 组开放臂时间百分比比较 CCI 组显著升高($P < 0.05$);(3) CCI 组大鼠在旷场中央区域停留的时间百分比,较 Sham 组显著降低($P < 0.001$),CCI + Exe 组与 CCI 组相比显著增加($P < 0.05$);(4)与 Sham 组相比,CCI 组大鼠海马中的 BDNF、TrkB、CREB mRNA 和蛋白表达均显著降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),4 周的跑台运动使 BDNF、TrkB、CREB mRNA 以及蛋白的表达显著增加($P < 0.05$)。**结论** 四周跑台运动缓解了 CCI 模型大鼠的机械痛敏和热痛敏,并且缓解了慢性疼痛诱导的焦虑样行为;上调 BDNF/TrkB-CREB 通路可能是运动缓解慢性疼痛,改善焦虑情绪的机制之一。

【关键词】 跑台运动;神经病理性疼痛;焦虑;BDNF;TrkB;CREB

【中图分类号】 Q95-33

【文献标志码】 A

【文章编号】 1005-4847 (2024) 09-1149-11

Treadmill exercise up-regulates BDNF/TrkB-CREB pathway to improve anxiety-like behavior in neuropathic pain rats

WANG Xiaoge¹, BAO Jinyu², YANG Shuai³, LYU Yihang³, ZANG Weidong⁴, LI Cui^{3,4*}

(1. School of Physical Education, Zhengzhou Technology and Business University, Zhengzhou 451400, China;

2. College of Physical Education and Sports, Beijing Normal University, Beijing 100875, China; 3. School of

Physical Education (Main Campus), Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China; 4. School of Basic

Medical Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China)

【基金项目】 河南省自然科学基金(242300420378)。

Funded by the Natural Science Foundation of Henan Province (242300420378)。

【作者简介】 王晓歌,女,助教,硕士,研究方向:运动与人体生理学。Email:wxgxiaoge@163.com

【通信作者】 李翠,女,讲师,博士,研究方向:运动与神经可塑性。Email:lc@zzu.edu.cn

Corresponding author: LI Cui. E-mail: lc@zzu.edu.cn

[Abstract] Objective To investigate the effects of low-to-moderate intensity treadmill exercise on pain and anxiety-like behaviors in rats with chronic constriction injury of the sciatic nerve (CCI), and to explore the neural mechanism of the exercise-related brain-derived neurotrophic factor (BDNF)/tropomyosin receptor kinase B (TrkB)-cAMP-response element binding protein (CREB) pathway in relieving pain and anxiety behaviors in CCI rats. **Methods** Thirty-two D rats were divided randomly into four groups: sham group, CCI group, sham + exercise (Sham + Exe) group, and CCI + exercise (CCI + Exe) group. Rats in the exercise groups underwent treadmill training for 4 weeks. The paw withdrawal threshold (PWT) and paw withdrawal latency (PWL) were measured before and at different time points after the operation. The elevated plus maze (EPM) and open field test (OFT) were used to evaluate anxiety-like behaviors in the rats. mRNA and protein expression levels of BDNF, TrkB, and CREB in the hippocampus were detected by real-time quantitative reverse transcription PCR and Western Blot, respectively. **Results** (1) The PWT and PWL on the operative side of the rats were significantly lower in the CCI compared with the sham group at 7, 14, 21, 28, and 35 days after the operation ($P < 0.001$). The PWT on the ipsilateral side was significantly increased in the CCI + Exe group after 21 days compared with the CCI group ($P < 0.05$), and the PWL on the ipsilateral side increased significantly after 14 days ($P < 0.05$). (2) The EPM result showed that rats in the CCI group spent a significantly lower proportion of time in the open arms ($P < 0.001$) and significantly more time in the closed arms compared with the sham group ($P < 0.01$). Rats in the CCI + Exe group spent significantly more time in the open arms than the CCI group ($P < 0.05$). (3) The OFT result showed that rats in the CCI group spent a significantly lower proportion of time in the central area of the open field compared with the sham group ($P < 0.001$), while the percentage of time was significantly increased in the CCI + Exe group compared with the CCI group ($P < 0.05$). (4) BDNF, TrkB, and CREB mRNA and protein levels in the hippocampus were significantly lower in the CCI group compared with the sham group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Four-week treadmill exercise increased the mRNA and protein expression levels of BDNF, TrkB, and CREB in the hippocampus of CCI rats ($P < 0.05$). **Conclusions** Four weeks of treadmill exercise alleviates mechanical and thermal hyperalgesia and anxiety induced by chronic pain in CCI rats. Up-regulation of the BDNF/TrkB-CREB pathway may be one of the mechanisms by which exercise relieves chronic pain and improves anxiety.

[Keywords] treadmill exercise; neuropathic pain; anxiety; BDNF; TrkB; CREB

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

慢性疼痛已成为世界公认的公共卫生问题,目前,全球慢性疼痛的平均患病率达 38%,而中国慢性疼痛患者超 3 亿人^[1]。神经病理性疼痛(neuropathic pain, NP)是由躯体感觉神经系统病变或疾病引起的慢性疼痛,痛感极强,迁延难治,严重影响人们的生活质量^[2]。NP 患者除了疼痛的持续性感受以及痛觉过敏反应外,常伴随焦虑、抑郁、兴趣缺失、动机行为下降等情感障碍^[3]。NP 引起的情绪变化可增强对疼痛的感知,从而形成恶性循环。疼痛与焦虑共病的发病机制复杂,病程持续时间长,长期服药引发的耐受性差及副作用成了临床治疗的难题,因此寻求一种更为可行的、有效的治疗方案仍是一项重大挑战。运动作为一种非药理学方法,其治疗疾病的有效性 & 益处已被广泛证明^[4-6],但运动发挥作用的机制尚未充分阐明。

NP 可以诱导中枢敏化,使疼痛 & 情绪相关脑区发生可塑性变化,近年来研究发现海马体在疼痛

和情绪调控中扮演着关键角色^[7]。海马灰质体积与焦虑抑郁评分呈负相关^[8],还有证据表明疼痛患者海马体积减小^[9],但体力活动可以增加海马和额叶皮层的灰质体积^[10]。脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)是一种重要的神经调节因子,并且在海马和大脑皮层中高度表达^[11]。BDNF 主要与跨膜受体酪氨酸激酶受体(tyrosine kinase receptor B, TrkB)结合引发细胞内级联反应,并在外周和中枢神经系统的疼痛传递过程中发挥着重要作用^[12]。BDNF/TrkB 信号激活后可以触发环磷腺苷效应元件结合蛋白(cAMP-response element binding protein, CREB)的磷酸化,同时活化的 CREB 又可以增强 BDNF 的转录,进而促进神经细胞生存,增加突触可塑性 & 神经发生^[13]。动物研究显示 BDNF^{Met/Met} 和 BDNF 敲除小鼠均表现出焦虑样行为^[14],外源性补充 BDNF 可以诱导神经发生并增加海马中的 BDNF 水平,从而在小鼠中产生抗抑

郁和抗焦虑的作用^[15]。研究表明,慢性坐骨神经压迫损伤(chronic constriction injury of the sciatic nerve, CCI)模型大鼠海马中 BDNF 表达下调,并观察到疼痛症状自发改善时 BDNF 表达的降低可以被逆转^[16],提示疼痛及焦虑的发病机制可能与海马中的 BDNF 有关。另有研究发现,电针治疗可以上调海马 BDNF/TrkB-CREB 信号通路促进突触可塑性,起到缓解慢性炎症性疼痛模型大鼠的疼痛及抑郁样行为的作用^[17],但是运动能否通过调控 BDNF 及下游通路发挥镇痛及抗焦虑作用尚未报道。

基于此,本研究选用 CCI 模型大鼠,通过行为学和分子生物学的方法,观察跑台运动对 CCI 模型大鼠的疼痛及焦虑样行为的影响,并从 BDNF/TrkB-CREB 通路方面探究运动缓解疼痛及焦虑的机制,为运动缓解慢性疼痛及焦虑症状提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

32 只 6 ~ 8 周龄,体重 180 ~ 220 g 的雄性 SPF 级 SD 大鼠购于郑州大学动物实验管理中心【SCXK(豫)2022-0001】。饲养于郑州大学生命科学学院【SYXK(豫)2019-0002】。饲养环境为 SPF 级,温度 22 ~ 25 ℃,相对湿度为 40% ~ 60%,12 h 明暗交替,实验动物自由进食和饮水,定期更换鼠笼,保持垫料清洁干燥。实验过程及操作均符合郑州大学生命科学伦理审查要求,动物实验和动物护理获得郑州大学生命科学伦理审查委员会批准(ZZUIRB 2022-68)。

1.1.2 主要试剂与仪器

BDNF (Abcam, ab108319); TrkB (Abcam, ab187041); CREB (Cell Signaling, #9197); GAPDH (Proteintech, 60004-1-Ig); RNA 样本保存液 (CWBIO, CW0592S); RNA 提取试剂盒 (Axygen, 23518KD1); 反转录试剂盒 (Thermo, K1622); PCR 扩增试剂盒 (Thermo, K0252); SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒 (CWBIO, CW0022S); 增强型 RIPA 裂解液 (BOSTER, AR0102)。

非吸收性手术尼龙线(环球,4-0); von Frey 纤维丝 (Stoelin, 美国); 热辐射测痛仪 (UGOBASILES, R. L, 意大利); PCR 仪 (Biometra, 德国); 吸入式动物麻醉机 (瑞沃德, 深圳); 高架十字迷宫 (北京众实迪创科技发展有限公司, 北京); 旷场 (北京众

实迪创科技发展有限公司, 北京); 高灵敏化学发光成像系统 (Bio-Rad, 美国); QuantStudio 实时荧光定量 PCR 系统 (Thermo Fisher Scientific, 美国); 动物实验跑步机 (上海欣软信息科技有限公司 XR-PT-10B, 中国)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组

按照体重随机分组方法将 32 只 SD 大鼠随机分为假手术(Sham)组、模型(CCI)组、假手术 + 运动(Sham + Exe)组、模型 + 运动(CCI + Exe)组,每组 8 只。

1.2.2 CCI 模型制备

大鼠经 4% 异氟烷诱导麻醉 2 ~ 3 min, 2% 浓度维持麻醉。大鼠麻醉后将左腿手术部位周围毛发剔除,用生理盐水及碘伏对皮肤进行消毒,钝性分离大鼠左侧股二头肌,暴露坐骨神经。将 CCI 组和 CCI + Exe 组大鼠使用非吸收性手术尼龙线(4-0)轻度结扎坐骨神经,打 4 个结扎环,每个结扎环之间间隔 1 ~ 2 mm,结扎环以恰好可以在神经末梢滑动为宜,最后缝合肌肉和皮肤并进行消毒。手术后将动物放在加热垫上,直至苏醒。Sham 组和 Sham + Exe 组只需要暴露大鼠左坐骨神经而无需进行结扎,并采用单纯间断缝合法缝合肌肉和皮肤并进行消毒。

1.2.3 运动干预

大鼠造模 7 d 后,对 Sham + Exe 组和 CCI + Exe 组大鼠进行跑台运动干预,本研究选择为期 4 周的中低强度跑台运动干预,大鼠首先经过 3 d 的适应性训练,训练方案为:第 1 天 6 m/min 的速度运动 30 min,第 2 天 7 m/min 的速度运动 30 min,第 3 天 8 m/min 的速度运动 30 min。正式训练的训练方案为:8 m/min 的速度运动 5 min,然后以 10 m/min 的速度运动 25 min,共训练 4 周,每周 5 d,跑台无坡度。此运动方案强度对应 42.8% ~ 57.58% × VO_{2max} 强度^[18]。

1.2.4 行为学测试

机械性缩足阈值(paw withdrawal threshold, PWT):采用经典的“Up-Down”法进行实验测定^[19],选取 7 根呈对数递增强度的 von Frey 丝进行测试,从 2.0 g 开始逐次增加至 26.0 g (2.0、6.0、8.0、10.0、15.0、26.0 g)。将 von Frey 丝通过金属网眼垂直刺向大鼠后足底中心皮肤,每次刺激持续 8 ~ 10 s,观察反应。若大鼠在刺扎时间内或在移开 von

Frey 丝时出现快速的缩足或舔足反应,则记为阳性;若无反应,则视为阴性。如果测试为阴性则选用下一级递增的 von Frey 丝刺激;若反应为阳性,则选相邻递减的 von Frey 丝进行刺激。当检测过程中第 1 次为阳性反应后再进行 4 次检测即可,同时,在测量已累计达到 9 次时,无论是否出现阳性,停止测试。测试结果通过“Up-Down”法特定计算将克度值转换为 PWT 值(g)。

热缩足潜伏期(paw withdrawal latency, PWL):采用 HARGREAVES 等^[20]的方法测量,在进行测量前,将每只大鼠分别放置于一个透明玻璃观察框内,让大鼠在安静的环境中适应 30 min,并提前打开热痛检测仪预热。热源的热刺激强度保持恒定,仪器设置为当大鼠抬起脚时,或者在 15 s 后,热刺激自动关闭。在大鼠处于安静且清醒的状态下,将红外光源对准大鼠后足底中央,按下计时开关并记录大鼠热缩足时间。此操作进行 3 次,每次之间至少间隔 20 min。通过取 3 次测量的平均值,得出大鼠的热痛缩足潜伏期。

高架十字迷宫实验(elevated plus maze test, EPM):高架十字迷宫实验装置包括一对开放臂(50 cm × 10 cm)、一对闭合臂(50 cm × 10 cm × 30 cm)和中央区域(10 cm × 10 cm)部分,装置上方装有一架红外摄像头记录动物活动情况。测试方法参考姜宁等^[21]的研究,测试前,先将大鼠放置于行为学测试室安静环境下适应 1 h。测试时,设置各组光照强度为 100 ~ 150 lx,将大鼠头部朝向开放臂置于高架中央区域,测试人员放下大鼠后迅速撤离监控区,开启录像,数据采集时间为 5 min。计算开放臂和闭合臂停留时间百分比。

旷场实验(open filed test, OFT):旷场实验装置包括隔音测试箱和数据采集分析系统,在箱子正上方安装摄像头,记录大鼠在箱内的活动情况。实验测试前,先将大鼠放置于行为学测试室安静环境下适应 1 h。实验开始时将大鼠放置于 100 cm × 100 cm × 40 cm 箱子底部的中央区域(60 cm × 60 cm),各组光照强度控制在 100 ~ 150 lx,记录大鼠 5 min 内行驶的总距离及停留在中央区域和外周区域的时间百分比。

1. 2. 5 取材

异氟烷麻醉大鼠,取出大鼠脑组织,浸泡在预冷的 PBS 缓冲液中,从脑中剥离海马体。Western Blot 检测的海马体组织进行低温研磨提取全细胞蛋

白进行实验测试;PCR 检测的海马体组织先放入 RNA 保护液,4℃ 过夜,随后抽出保护液进行实验测试。

1. 2. 6 实时荧光定量逆转录 PCR (real-time quantitative reverse transcription PCR, RT-qPCR)

大鼠海马体的总 RNA 通过 TRIzol 法提取,oligo dT 为通用引物,使用 ThermoScript 逆转录酶,三步法逆转录。每个样品 3 个复孔,目的基因设计特异性的正向和反向引物(见表 1)。反应在实时 PCR 仪器中进行,65 ~ 95 ℃ 溶解曲线,反应完成后,Bio-Rad Prime PCR 软件分析荧光信号数据,计算各反应管 Ct 值。所得数据以 GAPDH 为内参照,采用 2^{-ΔΔCt} 方法计算各目的基因的相对表达。

表 1 RT-qPCR 引物序列
Table 1 RT-qPCR primer sequences

引物名称 Primer name	引物序列(5' - 3') Primer sequence(5' - 3')
GAPDH	F:GACATGCCGCTGGAGAAAC R:AGCCCAGGATGCCCTTAGT
BDNF	F:CCCAAGAGGTTAAAGTGATAGAAG R:TAGGCAGAATGACCAATGTC
TrkB	F:TGCTCAAGTTGGCGAGACAT R:CAGGCACTTCTCTCGTTCAGT
CREB	F:TGTTGTTCAAGCTGCCTCTGGTG R:GCTTCTTCAGCAGGCTGTGTAGG

1. 2. 7 Western Blot

将海马体从大脑中分离出来,用含有蛋白酶抑制剂混合物的 RIPA 裂解液提取总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度,制备 2 μg/μL 上样蛋白。等量蛋白样品在 10% Tris-Tricine SDS-PAGE 凝胶电泳上分离,上样后电泳,转膜。蛋白转入 PVDF 膜后,在 5% BSA 封闭液中室温封闭 2 h。封闭结束后加入一抗 BDNF(1 : 1000)、CREB(1 : 800)、TrkB(1 : 500)、GAPDH(1 : 1000)4 ℃ 孵育过夜。TBST 洗涤 3 次,每次 10 min,加入二抗室温孵育 2 h。TBST 洗涤 3 次后用高灵敏化学发光成像系统进行成像,Image J version 2. 1. 0 软件对结果进行相对定量分析。

1. 3 统计学分析

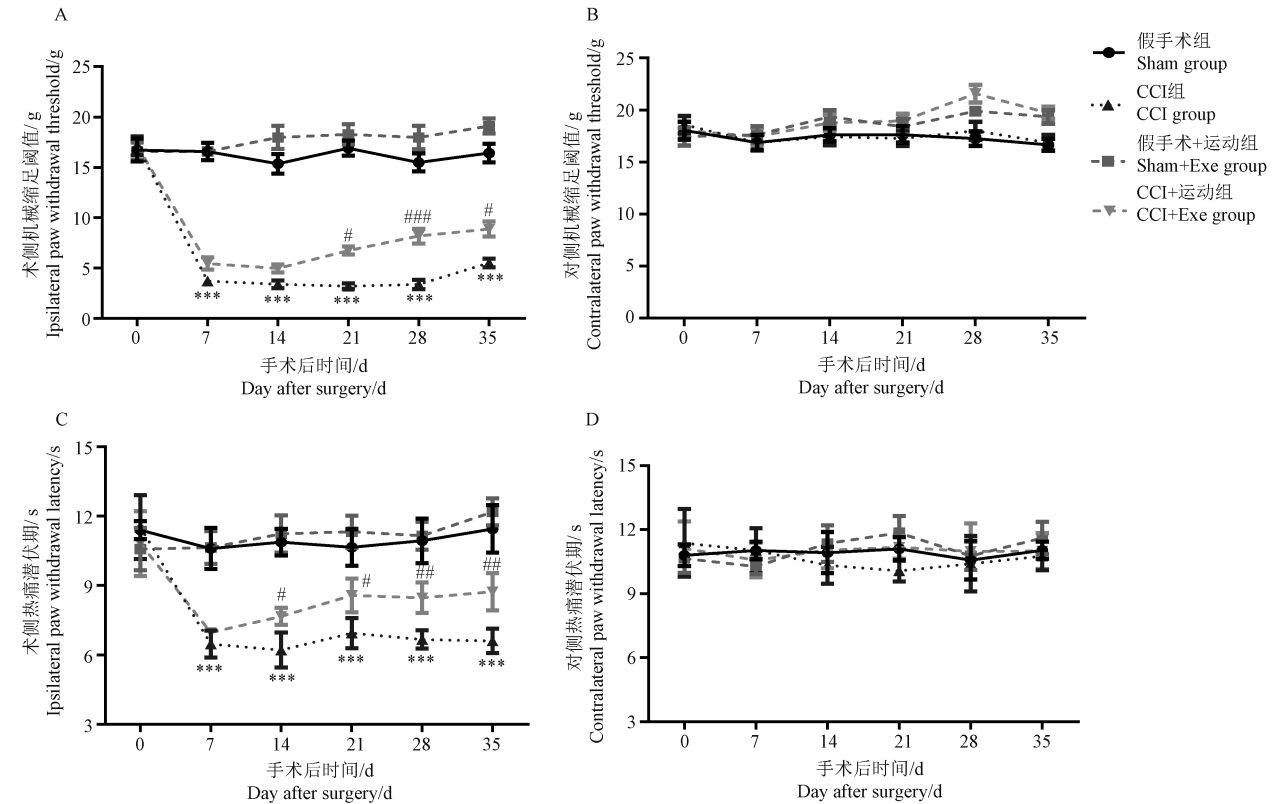
实验数据采用 GraphPad Prism 9. 0 进行作图和统计学分析,实验结果均以平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。不同时间点痛行为的比较采用重复测量方差分析,两组间比较采用 *t* 检验,运动干预阶段 4 个组之间的比较采用双因素方差(Two-way ANOVA)分析。*P* < 0. 05 表示具有统计学意义。

2 结果

2.1 跑台运动对 CCI 模型大鼠痛行为的影响

痛行为学结果显示,与 Sham 组相比,CCI 组大鼠术后 7、14、21、28、35 d 的机械缩足阈值和热缩足潜伏期显著降低($P < 0.001$,图 1A; $P < 0.001$,图 1C),Sham 组和 Sham + Exe 组之间差异无显著性。

与 CCI 组相比,运动显著缓解了 21 d 后的机械痛敏反应($P < 0.05$,图 1A)和 14 d 后的热痛敏反应($P < 0.05$,图 1C)。同时观察大鼠对侧机械缩足阈值和热缩足潜伏期差异无显著性($P > 0.05$,图 1B, 1D)。结果表明,慢性坐骨神经压迫损伤模型手术降低了大鼠的机械痛阈和热痛阈,而 4 周的跑台运动对机械痛阈值和热痛阈值有改善作用。



注:A:术侧PWT;B:对侧PWT;C:术侧PWL;D:对侧PWL;与Sham组相比,*** $P < 0.001$;与CCI组相比,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$,### $P < 0.001$ 。(下图同)

图1 各组大鼠机械痛和热痛测试结果($n = 8$)

Note. A. PWT of the ipsilateral side. B. PWT of the contralateral side. C. PWL of the ipsilateral side. D. PWL of the contralateral side. Compared with Sham group, *** $P < 0.001$. Compared with CCI group, # $P < 0.5$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$. (The same in the following figures)

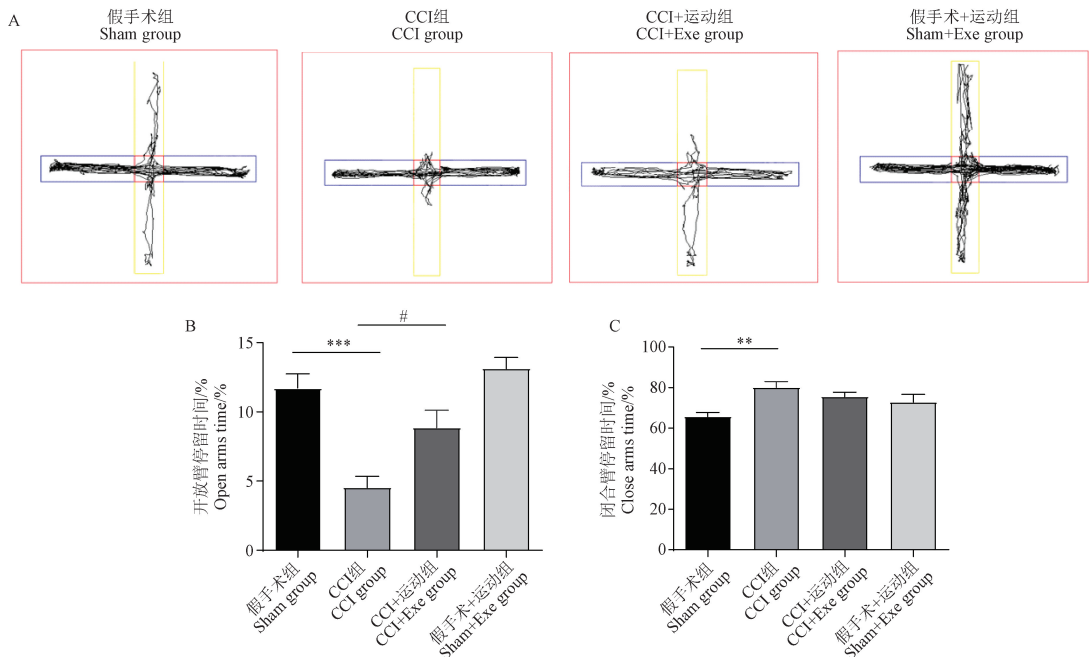
Figure 1 Results of the mechanical and thermal pain test in each group of rats($n = 8$)

2.2 跑台运动对 CCI 大鼠十字高架迷宫行为学的影响

EPM 行为学测试中大鼠活动轨迹如图 2A 所示。结果显示,与 Sham 组相比 CCI 组大鼠进入开放臂停留的时间百分比显著降低($P < 0.001$,图 2B),进入闭合臂的时间百分比显著升高($P < 0.01$,图 2C),提示 CCI 造模可诱导大鼠焦虑样行为的发生。与 CCI 组相比,CCI + Exe 组大鼠开放臂停留时间百分比显著升高($P < 0.05$,图 2B),但在闭合臂中停留的时间百分比差异无显著性,见图 2C。

2.3 跑台运动对 CCI 大鼠旷场行为的影响

OFT 行为学测试中大鼠活动轨迹如图 3A 所示,4 组大鼠在旷场中行驶的总路程无显著性差异(图 3B)。CCI 组大鼠在中央区域停留的时间百分比与 Sham 组相比显著降低($P < 0.001$,图 3C);与 CCI 组相比,CCI + Exe 组大鼠在中央区域停留的时间百分显著增加($P < 0.05$,图 3C),在外周区域活动的时间百分比无显著性差异(见图 3D)。结果提示,CCI 造模不影响大鼠的运动表现,且 4 周跑台运动可缓解 CCI 模型大鼠的焦虑样行为。

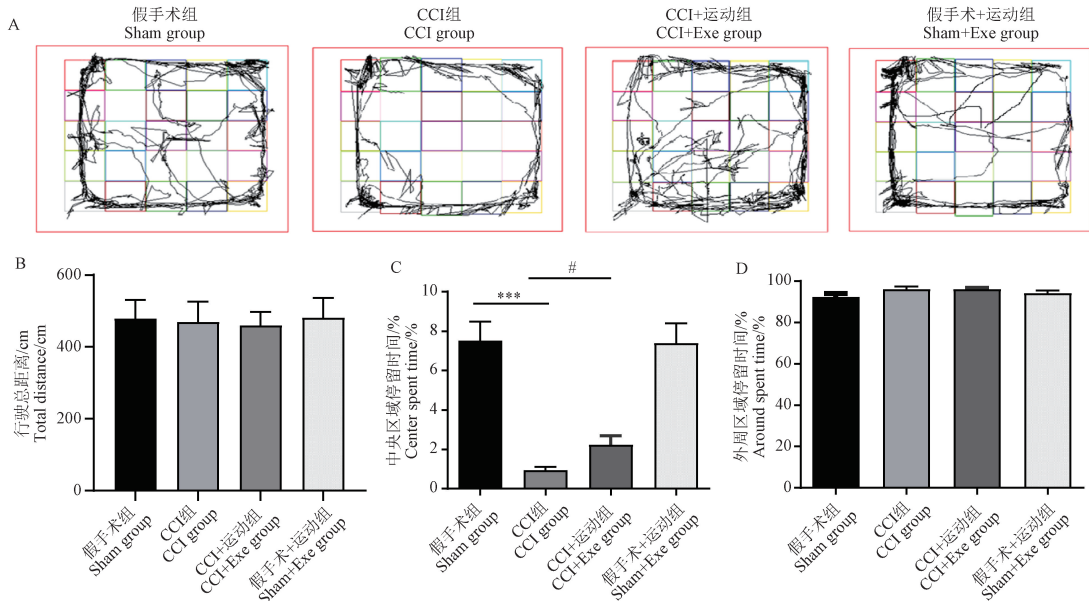


注:A:大鼠高架十字迷宫实验活动轨迹图;B:大鼠在高架十字迷宫开放臂停留的时间百分比;C:大鼠在高架十字迷宫闭合臂停留的时间百分比;与 Sham 组相比, ** $P < 0.01$ 。(下同)

图 2 各组大鼠高架十字迷宫实验测试结果($n = 8$)

Note. A. Activity trajectory map of the elevated plus maze test. B. Percentage of time spent in the open arms of the elevated plus maze. C. Percentage of time spent in the closed arms of the elevated plus maze test. Compared with Sham group, ** $P < 0.01$. (The same in the following figures)

Figure 2 Results of the elevated plus maze test in each group of rats($n = 8$)



注:A:大鼠旷场实验活动轨迹图;B:大鼠在旷场中行驶的总距离;C:大鼠在旷场中央区域停留的时间百分比;D:大鼠在旷场外周区域停留的时间百分比。

图 3 各组大鼠旷场实验测试结果($n = 8$)

Note. A. Activity trajectory of rats in the open field test. B. Total distance travelled in the open field. C. Percentage of time spent in the central area of the open field. D. Percentage of time spent in the periphery area of the open field.

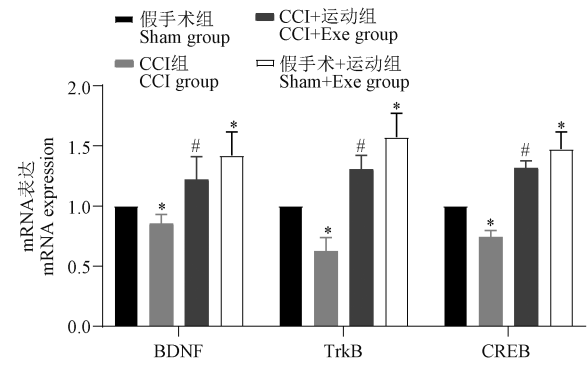
Figure 3 Results of open field test in rats of each group($n = 8$)

2.4 跑台运动对 CCI 大鼠 BDNF/TrkB/CREB 相关 mRNA 表达的影响

RT-qPCR 实验结果如图 4 所示,与 Sham 相比, CCI 大鼠海马中的 BDNF、TrkB、CREB mRNA 的表达显著降低 ($P < 0.05$), Sham + Exe 组的 BDNF、TrkB、CREB mRNA 的表达较 Sham 组显著增加 ($P < 0.05$)。CCI + Exe 组大鼠海马中的 BDNF、TrkB、CREB mRNA 的表达均高于 CCI 组,且差异具有显著性 ($P < 0.05$)。提示 CCI 诱导的疼痛和焦虑可以使 BDNF、TrkB、CREB mRNA 表达降低,而 4 周的跑台运动可以提高大鼠海马中 BDNF、TrkB、CREB mRNA 的表达。

2.5 跑台运动对大鼠 BDNF/TrkB/CREB 蛋白表达的影响

Western Blot 实验结果显示,与 Sham 组相比, CCI 组大鼠海马中的 BDNF、TrkB、CREB 蛋白表达均显著降低 ($P < 0.001$,图 5A; $P < 0.01$,图 5B, 5C), Sham + Exe 组蛋白表达均有升高,但差异无显著性。CCI + Exe 组大鼠海马中 BDNF、TrkB、CREB

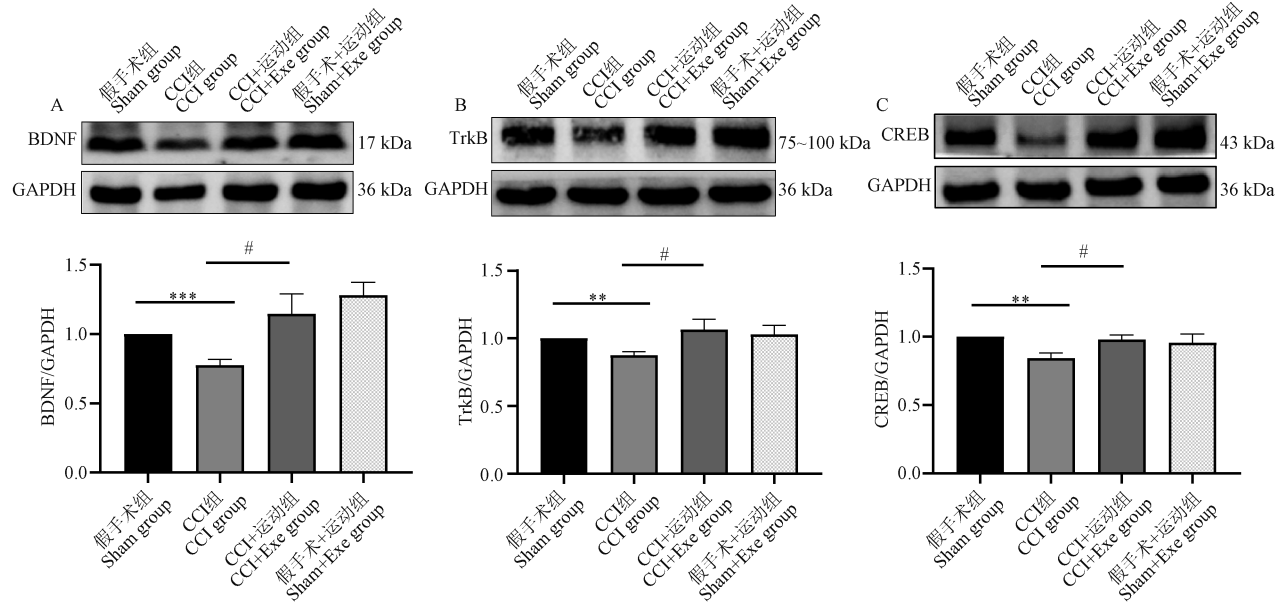


注:与 Sham 组相比, * $P < 0.05$ 。
图 4 各组大鼠海马中 BDNF、TrkB 和 CREB mRNA 的表达($n = 3$)

Note. Compared with Sham group, * $P < 0.05$.

Figure 4 Expression of BDNF, TrkB, and CREB mRNA in the hippocampus of rats in each group($n = 3$)

的蛋白表达高于 CCI 组大鼠 ($P < 0.05$),提示 CCI 诱导的焦虑可以使 BDNF、TrkB、CREB 蛋白表达降低,四周的跑台运动能够逆转 CCI 大鼠海马中 BDNF、TrkB、CREB 的蛋白表达。



注:A;BDNF 蛋白条带及蛋白表达统计图;B;TrkB 蛋白条带及蛋白表达统计图;C;CREB 蛋白条带及蛋白表达统计图。

图 5 各组大鼠海马中 BDNF、TrkB、CREB 蛋白的表达($n = 5$)

Note. A. Representative bands and quantification of BDNF protein. B. Representative bands and quantification of TrkB protein. C. Representative bands and quantification of CREB protein.

Figure 5 Expression of BDNF, TrkB and CREB proteins in the hippocampus of rats in each group($n = 5$)

3 讨论

NP 主要表现为异常性疼痛、痛觉过敏和自发性疼痛等特征^[22],它不仅引起疼痛感知,还常伴有

抑郁、焦虑等不良情绪反应^[23]。本研究发现 CCI 模型可以诱导大鼠的焦虑样行为,与海马中 BDNF、TrkB、CREB 的表达下降密切相关。4 周的中低强度跑台运动可以缓解 CCI 大鼠的疼痛及焦虑样行为,

并且可以上调 BDNF、TrkB、CREB 的表达。揭示了 BDNF/TrkB-CREB 通路参与运动缓解 CCI 诱导的疼痛及焦虑样行为中的作用机制,为运动改善疼痛及焦虑病症提供理论支撑。

NP 发病机制复杂,研究中常选取不同的动物模型探讨疼痛的发病机制,常见的 NP 模型有 CCI 模型、部分坐骨神经结扎模型 (partial sciatic nerve ligation, PSNL)、脊神经结扎模型 (spinal nerve ligation, SNL)、坐骨神经分支结扎模型 (spared nerve injury, SNI) 等^[24]。本研究采用 CCI 模型大鼠,在术后 7、14、21、28、35 d 检测痛行为学变化,结果表明 CCI 大鼠术侧肢体表现出显著的机械痛敏反应和热痛敏反应。慢性疼痛是负面情绪的重要诱因^[25],研究表明神经病理性疼痛、纤维肌痛、慢性内脏痛等动物模型都伴有焦虑样行为^[26]。有研究显示,PSNL 模型大鼠在造模后第 4 周至第 8 周表现出显著的焦虑样行为^[27],CCI 模型诱导的焦虑样行为多见于 CCI 术后 2 ~ 6 周^[28]。本研究在 CCI 术后的 5 周同样检测到大鼠的焦虑样行为,提示神经病理性疼痛可以诱导啮齿类动物的焦虑样行为。

目前临床上治疗疼痛及焦虑的药物种类繁多但副作用较大,长期服用会引起眩晕、嗜睡、耐受性差、药物成瘾等情况,严重影响患者的生活质量。因此疼痛及焦虑的非药物治疗方法引起了越来越多的重视,体育锻炼作为康复治疗的一种手段已被证明可以有效地缓解慢性疼痛或焦虑^[29-30]。运动对慢性疼痛动物模型的有益影响已得到广泛证明,Meta 分析显示,规律的有氧运动可以增加不同神经病理性疼痛模型动物的机械性缩足反射阈值和热缩足潜伏期^[31],不同形式的运动例如游泳、跑步机和转轮运动等,均可以减低 NP 相关的机械痛和热痛敏感性^[32]。有研究发现,2 h 的急性游泳运动可短暂减轻 SNL 模型大鼠的触觉痛敏感性,4 周的长期游泳运动可使 SNL 模型大鼠的痛阈值降低甚至完全恢复到正常值^[33]。CHO 等^[34]采用 8 m/min 的速度低强度跑台运动,每天运动 30 min 共 14 d,发现无论是造模前还是造模后开始运动,均可以缓解 SNI 模型大鼠的神经病理性疼痛。本研究采用的是 CCI 造模 1 周后进行跑台运动,为期 4 周,每周运动结束后检测痛行为学变化。运动强度对应 42.8% ~ 57.58% 最大摄氧量强度^[18],属于中低强度有氧运动。本研究结果显示 PWT 在运动后第 2 周显著增加,PWL 在运动后第 1 周表现出差异性,表明不

同的运动时间对机械痛和热痛敏感性的缓解程度不同。

临床研究发现每周 2 ~ 3 次的中低强度运动可以显著缓解焦虑患者的焦虑状态^[35],8 周的低强度体育锻炼可以显著改善纤维肌痛女性患者的疼痛感知、焦虑、抑郁及生活质量等^[36]。本研究在 4 周的运动干预结束后进行焦虑行为测试,结果显示 CCI 大鼠在 EPM 开放臂和 OFT 中央区域停留的时间百分比显著提高,提示 4 周的跑台运动可以缓解慢性疼痛诱导的焦虑样行为。这与 ZHOU 等^[37]的研究相似,证明连续 15 d,30 min/d 的自主转轮运动可以有效缓解完全弗氏佐剂 (complete Freund's adjuvant, CFA) 诱导的慢性炎性痛模型小鼠的疼痛和焦虑样行为。LOPES 等^[38]研究同样表明,从造模后第 15 天以 70% 最大摄氧量的强度连续运动 8 d,可以显著缓解 CCI 模型大鼠的疼痛及焦虑样行为。本研究结果支持先前的动物研究,并验证了临床观察的证据,即神经损伤疼痛伴焦虑患者受益于体育锻炼。

BDNF 主要在神经元和神经胶质细胞的胞体中合成,存在于整个大脑,并且在海马体和皮质中高表达^[11]。BDNF 与其特异性受体 TrkB 结合,可增强海马的突触传递能力^[17],并在疼痛传递及负面情绪调节过程中发挥重要作用^[39]。CREB 被称为转录增强因子,参与神经元生长发育、突触可塑性和长期记忆形成的调控^[40-41]。研究发现 BDNF 与受体 TrkB 结合后可以促进 CREB 的磷酸化,另一方面 CREB 作为转录因子,可以增强 BDNF 的转录^[42]。BDNF/TrkB-CREB 信号通路在维持神经增长,神经细胞分化和神经元的存活等方面发挥重要作用,由于其重要的生理功能使之成为各种疾病病理生理学研究的关键信号通路^[43]。BDNF/TrkB-CREB 通路与负面情绪及疼痛密切相关,研究发现 CCI 模型大鼠诱导的焦虑样行为与海马脑区 CREB 和 BDNF 表达减少有关^[38],壬基酚 (nonylphenol, NP) 诱导的焦虑模型大鼠中海马神经元损伤及 BDNF/TrkB-CREB 蛋白和 mRNA 表达下降^[44]。本研究结果同样显示 CCI 大鼠海马中 BDNF、TrkB、CREB mRNA 及蛋白表达下降,说明 CCI 模型大鼠的疼痛和焦虑样行为与海马 BDNF/TrkB-CREB 通路的受损有关。

多项研究表明,BDNF 可能是运动缓解疼痛^[45]和发挥脑保护作用^[46-47]的关键因子。运动可以通过调节 BDNF 水平抑制疼痛状态下伤害性神经元的

生长,促进健康神经元的再生^[5]。研究发现 CCI 模型大鼠同侧脊髓背角 BDNF 的表达增加与神经病理性疼痛的发展有关,而无论是每周 3 d 的低频运动还是每周 5 d 的高频运动(55%最大摄氧量强度)都可以通过抑制脊髓背角中的神经胶质细胞活化和 BDNF 表达来减轻神经性疼痛^[48]。疼痛状态下海马中 BDNF 的表达与脊髓背角 BDNF 的表达相反,研究发现 CFA 诱导的慢性炎性疼痛动物模型会降低海马中的 BDNF 表达,而这些影响与神经发生受损和焦虑有关,但富集环境与自主运动相结合的干预方法可以促进海马 BDNF 的表达以及神经发生缓解疼痛伴随的焦虑样行为^[49]。本研究通过 4 周的跑步机运动促进了 CCI 模型大鼠海马中 BDNF 的 mRNA 及蛋白表达,起到了缓解疼痛及焦虑的作用。运动同样可以促进 BDNF 的下游通路发挥神经保护作用,研究表明游泳训练可以通过增强 BDNF/TrkB 信号通路促进神经保护作用,进而抑制糖尿病模型小鼠大脑皮层的细胞凋亡^[50]。YANG 等^[17]研究发现电针通过上调海马 BDNF/TrkB-CREB 信号通路促进突触可塑性,起到缓解慢性炎症性疼痛模型大鼠的疼痛及抑郁样行为的作用。本研究采用 4 周跑台运动发现 CCI 大鼠经过运动之后海马脑区的 BDNF、TrkB、CREB 的 mRNA 和蛋白表达显著增加,表明运动可以促进 BDNF、TrkB、CREB 的高度表达,进而缓解 CCI 大鼠诱导的疼痛以及焦虑样行为,研究进一步证实了 BDNF 下游通路蛋白表达增加可能是运动缓解慢性疼痛诱导的焦虑样行为的机制之一。

综上,本研究证明了神经病理性疼痛可诱导大鼠出现焦虑样行为,且 4 周跑台运动通过上调海马 BDNF/TrkB-CREB 通路蛋白改善大鼠的疼痛和焦虑状态,为运动缓解慢性疼痛及焦虑症状提供理论基础。

参 考 文 献(References)

[1] 樊碧发. 中国疼痛医学发展报告 [M]. 北京: 清华大学出版社; 2020.
FAN B F. Report on development of pain medicine in China [M]. Beijing: Tsinghua University Press; 2020.

[2] FINNERUP N B, KUNER R, JENSEN T S. Neuropathic pain: from mechanisms to treatment [J]. *Physiol Rev*, 2021, 101 (1): 259-301.

[3] YALCIN I, BARROT M. The anxiodepressive comorbidity in chronic pain [J]. *Curr Opin Anaesthesiol*, 2014, 27(5): 520-527.

[4] VANCAMPFORT D, HEISSEL A, WACLAWOVSKY A, et al.

Precision-based exercise in people with anxiety and stress related disorders: Are there interindividual differences in anxiolytic effects? An ancillary meta-analysis of randomized controlled trials [J]. *Psychiatry Res*, 2022, 317: 114803.

[5] LEITZELAR B N, KOLTYN K F. Exercise and neuropathic pain: a general overview of preclinical and clinical research [J]. *Sports Med Open*, 2021, 7(1): 21.

[6] BLUMENTHAL J A, ROZANSKI A. Exercise as a therapeutic modality for the prevention and treatment of depression [J]. *Prog Cardiovasc Dis*, 2023, 77: 50-58.

[7] SHI H J, WANG S, WANG X P, et al. Hippocampus: molecular, cellular, and circuit features in anxiety [J]. *Neurosci Bull*, 2023, 39(6): 1009-1026.

[8] GOLD A L, STEUBER E R, WHITE L K, et al. Cortical thickness and subcortical gray matter volume in pediatric anxiety disorders [J]. *Neuropsychopharmacology*, 2017, 42(12): 2423-2433.

[9] LIU H Y, CHOU K H, CHEN W T. Migraine and the hippocampus [J]. *Curr Pain Headache Rep*, 2018, 22 (2): 13.

[10] ERICKSON K I, LECKIE R L, WEINSTEIN A M. Physical activity, fitness, and gray matter volume [J]. *Neurobiol Aging*, 2014, 35(2): S20-S28.

[11] PEROVIC M, TESIC V, MLADENOVIC DJORDJEVIC A, et al. BDNF transcripts, proBDNF and proNGF, in the cortex and hippocampus throughout the life span of the rat [J]. *Age*, 2013, 35(6): 2057-2070.

[12] CAPPOLI N, TABOLACCI E, ACETO P, et al. The emerging role of the BDNF-TrkB signaling pathway in the modulation of pain perception [J]. *J Neuroimmunol*, 2020, 349: 577406.

[13] ESVALD E E, TUVIKENE J, SIRP A, et al. CREB family transcription factors are major mediators of BDNF transcriptional autoregulation in cortical neurons [J]. *J Neurosci*, 2020, 40 (7): 1405-1426.

[14] CHEN Z Y, JING D, BATH K G, et al. Genetic variant BDNF (Val66Met) polymorphism alters anxiety-related behavior [J]. *Science*, 2006, 314(5796): 140-143.

[15] SCHMIDT H D, DUMAN R S. Peripheral BDNF produces antidepressant-like effects in cellular and behavioral models [J]. *Neuropsychopharmacology*, 2010, 35(12): 2378-2391.

[16] SAFFARPOUR S, SHAABANI M, NAGHDI N, et al. *In vivo* evaluation of the hippocampal glutamate, GABA and the BDNF levels associated with spatial memory performance in a rodent model of neuropathic pain [J]. *Physiol Behav*, 2017, 175: 97-103.

[17] YANG P, CHEN H, WANG T, et al. Electroacupuncture promotes synaptic plasticity in rats with chronic inflammatory pain-related depression by upregulating BDNF/TrkB/CREB signaling pathway [J]. *Brain Behav*, 2023, 13(12): e3310.

[18] 董亚南. SD、Wistar 大鼠最大摄氧量的增龄特征与运动强度的量化研究 [D]. 曲阜: 曲阜师范大学; 2018.

DONG Y N. Quantitative study on aging characteristics and

- exercise intensity of SD and Wistar rats with maximum oxygen uptake [D]. Qufu: Qufu Normal University; 2018.
- [19] CHAPLAN S R, BACH F W, POGREL J W, et al. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw [J]. *J Neurosci Methods*, 1994, 53(1): 55–63.
 - [20] HARGREAVES K, DUBNER R, BROWN F, et al. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia [J]. *Pain*, 1988, 32(1): 77–88.
 - [21] 姜宁, 姚彩虹, 叶帆, 等. 大小鼠焦虑行为实验方法概述 [J]. *中国实验动物学报*, 2022, 30(5): 698–704.
 - JIANG N, YAO C H, YE F, et al. Overview of animal behavioral tests of anxiety [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2022, 30(5): 698–704.
 - [22] XU D, MA X, SUN C, et al. Emerging roles of circular RNAs in neuropathic pain [J]. *Cell Prolif*, 2021, 54(12): e13139.
 - [23] WILLIAMS A C, CRAIG K D. Updating the definition of pain [J]. *Pain*, 2016, 157(11): 2420–2423.
 - [24] ABOUD C, DUVEAU A, BOUALI-BENAZZOUE R, et al. Animal models of pain: diversity and benefits [J]. *J Neurosci Methods*, 2021, 348: 108997.
 - [25] ABDUL M, YAN H Q, ZHAO W N, et al. VTA-NAc glutaminergic projection involves in the regulation of pain and pain-related anxiety [J]. *Front Mol Neurosci*, 2022, 15: 1083671.
 - [26] KREMER M, BECKER L J, BARROT M, et al. How to study anxiety and depression in rodent models of chronic pain? [J]. *Eur J Neurosci*, 2021, 53(1): 236–270.
 - [27] DANG T N, TIEN S N, OCHI R, et al. Enhanced anxiety-like behavior induced by chronic neuropathic pain and related parvalbumin-positive neurons in male rats [J]. *Behav Brain Res*, 2024, 459: 114786.
 - [28] FONSECA-RODRIGUES D, AMORIM D, ALMEIDA A, et al. Emotional and cognitive impairments in the peripheral nerve chronic constriction injury model (CCI) of neuropathic pain: a systematic review [J]. *Behav Brain Res*, 2021, 399: 113008.
 - [29] STONEROCK G L, HOFFMAN B M, SMITH P J, et al. Exercise as treatment for anxiety: systematic review and analysis [J]. *Ann Behav Med*, 2015, 49(4): 542–556.
 - [30] BELAVY D L, VAN OOSTERWIJCK J, CLARKSON M, et al. Pain sensitivity is reduced by exercise training: Evidence from a systematic review and meta-analysis [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2021, 120: 100–108.
 - [31] GUO J B, CHEN B L, WANG Y, et al. Meta-analysis of the effect of exercise on neuropathic pain induced by peripheral nerve injury in rat models [J]. *Front Neurol*, 2019, 10: 636.
 - [32] RUIMONTE-CRESPO J, PLAZA-MANZANO G, DÍAZ-ARRIBAS M J, et al. Aerobic exercise and neuropathic pain: insights from animal models and implications for human therapy [J]. *Biomedicine*, 2023, 11(12): 3174.
 - [33] ECHEVERRÍA-RODRÍGUEZ O, GODÍNEZ-CHAPARRO B, GÓMEZ-GARCÍA M V, et al. Participation of angiotensin-(1-7) in exercise-induced analgesia in rats with neuropathic pain [J]. *Peptides*, 2021, 146: 170670.
 - [34] CHO Y H, SEO T B. The timing point of exercise intervention regulates neuropathic pain-related molecules in the ipsilateral dorsal root ganglion neurons after sciatic nerve injury [J]. *J Exerc Rehabil*, 2022, 18(5): 286–293.
 - [35] STUBBS B, VANCAMPFORT D, ROSENBAUM S, et al. An examination of the anxiolytic effects of exercise for people with anxiety and stress-related disorders: a meta-analysis [J]. *Psychiatry Res*, 2017, 249: 102–108.
 - [36] IZQUIERDO-ALVENTOSA R, INGLÉS M, CORTÉS-AMADOR S, et al. Low-intensity physical exercise improves pain catastrophizing and other psychological and physical aspects in women with fibromyalgia: a randomized controlled trial [J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2020, 17(10): 3634.
 - [37] ZHOU Y S, MENG F C, CUI Y, et al. Regular aerobic exercise attenuates pain and anxiety in mice by restoring serotonin-modulated synaptic plasticity in the anterior cingulate cortex [J]. *Med Sci Sports Exerc*, 2022, 54(4): 566–581.
 - [38] LOPES B C, MEDEIROS L F, STEIN D J, et al. tDCS and exercise improve anxiety-like behavior and locomotion in chronic pain rats via modulation of neurotrophins and inflammatory mediators [J]. *Behav Brain Res*, 2021, 404: 113173.
 - [39] SUN B, LV Y, XU H, et al. Effects of vortioxetine on depression model rats and expression of BDNF and Trk B in hippocampus [J]. *Exp Ther Med*, 2020, 20(3): 2895–2902.
 - [40] WANG C S, KAVALALI E T, MONTEGGIA L M. BDNF signaling in context: From synaptic regulation to psychiatric disorders [J]. *Cell*, 2022, 185(1): 62–76.
 - [41] NOTARAS M, VAN DEN BUUSE M. Neurobiology of BDNF in fear memory, sensitivity to stress, and stress-related disorders [J]. *Mol Psychiatry*, 2020, 25(10): 2251–2274.
 - [42] WANG H, XU J, LAZAROVICI P, et al. cAMP response element-binding protein (CREB): a possible signaling molecule link in the pathophysiology of schizophrenia [J]. *Front Mol Neurosci*, 2018, 11: 255.
 - [43] YE Y L, ZHONG K, LIU D D, et al. Huanglian-Jie-du-Tang extract ameliorates depression-like behaviors through BDNF-TrkB-CREB pathway in rats with chronic unpredictable stress [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2017, 2017: 7903918.
 - [44] TANG L, LI S, YU J, et al. Nonylphenol induces anxiety-like behavior in rats by regulating BDNF/TrkB/CREB signal network [J]. *Food Chem Toxicol*, 2022, 166: 113197.
 - [45] BAI J, GENG B, WANG X, et al. Exercise facilitates the M1-to-M2 polarization of microglia by enhancing autophagy via the BDNF/AKT/mTOR pathway in neuropathic pain [J]. *Pain Physician*, 2022, 25(7): E1137-E1151.
 - [46] WALSH J J, TSCHAKOVSKY M E. Exercise and circulating BDNF: Mechanisms of release and implications for the design of exercise interventions [J]. *Physiol Appl Nutr Metab*, 2018, 43(11): 1095–1104.
 - [47] CEFIS M, CHANEY R, WIRTZ J, et al. Molecular mechanisms

underlying physical exercise-induced brain BDNF overproduction [J]. Front Mol Neurosci, 2023, 16: 1275924.

[48] SUMIZONO M, SAKAKIMA H, OTSUKA S, et al. The effect of exercise frequency on neuropathic pain and pain-related cellular reactions in the spinal cord and midbrain in a rat sciatic nerve injury model [J]. J Pain Res, 2018, 11: 281-291.

[49] ZHENG J, JIANG Y Y, XU L C, et al. Adult hippocampal neurogenesis along the dorsoventral axis contributes differentially

to environmental enrichment combined with voluntary exercise in alleviating chronic inflammatory pain in mice [J]. J Neurosci, 2017, 37(15): 4145-4157.

[50] CHENG S M, LEE S D. Exercise training enhances BDNF/TrkB signaling pathway and inhibits apoptosis in diabetic cerebral cortex [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(12): 6740.

[收稿日期] 2024-03-10

《中国实验动物学报》再次入编《中文核心期刊要目总览》

依据文献计量学的原理和方法,经研究人员对相关文献的检索、统计和分析,以及学科专家评审,《中国实验动物学报》再次入编《中文核心期刊要目总览》2023 年版(即第 10 版)动物学/人类学类的核心期刊!

《中文核心期刊要目总览》采用定量评价和定性评的学术水平和学术影响进行综合评价,受到学术界的广泛认同。

目前,本刊为中国科学引文数据库来源期刊、中国学术期刊综合评价数据库来源期刊、中国学术期刊综合评价数据库(CAJCED)统计源期刊、《中国学术期刊文摘》来源期刊;被中国生物学文献数据库、《中国核心期刊(遴选)数据库》、《中国科技论文统计源期刊》(中国科技核心期刊)、《中文核心期刊要目总览》等数据库收录。

感谢编委、专家们的帮助与支持,感谢广大作者和读者朋友的厚爱与信任。本刊编辑部将始终坚守办刊宗旨,不忘初心,严谨办刊,开拓进取,不断创新,向世界一流期刊看齐。

