

运动训练对大鼠局灶性脑缺血后微血管新生的影响

刘传玉¹ 梅元武¹ 张小乔¹

摘要 **目的:**探讨运动训练对局灶性脑缺血后微血管新生的影响。**方法:**55 只 SD 大鼠随机分为假手术对照组、模型组、康复组;模型组和康复组动物以线栓法制成大鼠左侧大脑中动脉梗死模型,康复组术后 1 天开始进行运动训练,每周 5 天,共 4 周;其余两组常规饲养。以免疫组织化学法检测血管内皮生长因子(VEGF)、因子表达,测定微血管密度。**结果:**大鼠大脑中动脉栓塞后,缺血区神经元变性、坏死,VEGF 和因子在缺血周边区表达明显增加,经运动训练干预后,VEGF 和因子表达大量增加,微血管数目明显增加。**结论:**运动训练可通过促 VEGF 表达上调,促进微血管新生。

关键词 脑缺血;血管内皮生长因子;毛细血管新生;运动训练

中图分类号:R743,R493,R87 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2006)-01-0053-04

Effects of rehabilitative training on VEGF expression and angiogenesis of rats with cerebral infarction/LIU Chuanyu, MEI Yuanwu, ZHANG Xiaoqiao//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2006, 21(1): 53—56

Abstract Objective: To evaluate the effects of rehabilitative training on VEGF expression and angiogenesis and its role in functional outcome after cerebral infarction in rats. **Method:** 55 male SD rats were divided into control group, model group and rehabilitation group randomly. The rat models of focal cerebral infarction were established with unilateral middle cerebral artery (MCA) suture occlusion method in model group and rehabilitation group. The rats in rehabilitation group were given exercising everyday, while those in other groups were reared in their original living state. VEGF expression and angiogenesis was measured in the boundary zone to brain infarction at 1d, 3d, 7d, 14d, and 28d. **Result:** It was found that VEGF expression started at 1d, and subsequently increased, reached peak value at the 3d, faded away until 14d in model group and rehabilitation group. VEGF expression was mainly detected in the boundary zone of the infarcts at every timepoint. To compare with model group, VEGF expression of rehabilitation group was significantly increased in 3d and 7d after MCAO. Compare with control group, the microvessel density (MVD) in model group and rehabilitation group were significantly increased in 14d and 28d after MCAO, especially in rehabilitation group. **Conclusion:** Rehabilitative training can increase the expression and promote the blood vessel proliferation in rats with cerebral infarction.

Author's address Dept. of Neurology, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, 430022

Key words cerebral ischemia; vascular endothelial growth factor; rehabilitative training; angiogenesis

脑血管病,特别是缺血性脑血管病是当前社会最常见的疾病之一,其高死亡率、高致残率严重地影响了人们的生活。近年来,脑血管病的康复日益受到重视,众多研究已证实康复训练对提高脑血管患者的生存质量、减少残疾具有极其重要的作用,临床用于治疗缺血性脑血管病取得良好疗效。为进一步研究其作用机制我们应用免疫组化技术、图像分析技术,探讨运动训练对大鼠脑缺血半暗区血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)表达和毛细血管新生的影响,探讨其分子机制,为临床应用运动训练治疗急性脑梗死提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物:成年健康雄性 SD 大鼠,体质量 200—280g,周龄 12 周左右,普通级,由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供。

平衡木让鼠在其上行走, 主要训练平衡功能。转棒训练: 取长 150cm, 直径 4.5cm 的木棒 1 根, 其中点固定在 3r/min 的转动器上, 分别向左右交替转动, 可训练动态的平衡功能。

1.1.3 主要试剂: VEGF 和因子免疫试剂盒均购自北京中山公司。

1.2 实验方法

1.2.1 实验动物分组: 随机取 5 只大鼠作为假手术组, 只分离血管, 不插入线栓, 饲养 28d 取材。其余制造大鼠大脑中动脉栓塞模型 (middle cerebral artery occlusion, MCAO), 将造模成功、符合入选条件并存活的 50 只大鼠再随机分为模型组和运动康复训练组 (康复组), 各 25 只, 康复组在 MCAO 后 24h 给予运动康复训练, 连续训练 4 周; 模型组常规饲养; 各组再按不同时间点随机分成 5 组, 分别于缺血后 1d、3d、7d、14d、28d 取材。

1.2.2 MCAO 动物模型的建立: 参照廖维靖和 Longa 等^[2-3]的大鼠大脑中动脉缺血模型造模方法。大鼠腹腔注射 10% 的水合氯醛 (350mg/kg 体重) 麻醉, 仰卧固定于手术台上, 颈部正中切口, 长约 2cm, 暴露分离左侧颈总动脉 (CCA) 和颈外动脉, 结扎颈外动脉, 在距 CCA 分叉近端 0.5—0.6cm 处结扎 CCA, 结扎颈外动脉根部及分支。在颈总动脉近分叉处剪一小口, 经此插入直径 0.20mm 头端圆钝的渔线, 经颈总动脉分叉处通过颈内动脉入颅至大脑中动脉的起始部以阻断大脑中动脉血流, 插入深度为 19.0 ± 0.5 mm。结扎颈总动脉, 缝合皮肤。动物苏醒后表现为提尾时右侧前肢内收屈曲; 同侧 Horner 征; 爬行时向右划圈; 站立时右侧倾倒。凡具有上述四项体征者列入研究对象, 共用大鼠 95 只, 有 50 只符合入选条件并存活到规定时间。

1.2.3 康复训练方法: 康复组大鼠术后 24h 开始康复训练, 每天置于滚筒式网状训练器内转动训练 20min, 平衡木、转棒上行走训练 20min, 共 40min; 每周 5 次, 共进行 4 周。

1.2.4 标本采集: 处死前将大鼠深麻醉后用生理盐水 200ml 快速左心室灌注冲洗, 再用 4% 多聚甲醛 (pH7.4, 0.01M PB 配置) 300ml 先快后慢灌注固定, 灌注时间 45—60min, 灌注完毕立即断头取脑, 于前囟前 2mm 到后囟取脑, 4% 多聚甲醛后固定 (不超过

24h), 蒸馏水浸泡 4h, 常规乙醇脱水、二甲苯透明、浸蜡、包埋。石蜡切片机连续冠状切片 (片厚 $7\mu\text{m}$), 每隔 $100\mu\text{m}$ 连续取 3 张, 相邻切片分为 2 套分别用于 VEGF 和因子的免疫组化测定。

1.2.5 VEGF 和因子免疫组织化学检测方法: 采用免疫组化 SAB 法检测 VEGF 和因子, 操作步骤严格按照说明书进行。

1.2.6 VEGF 图像分析: 每张切片取梗死周边区不同的 3 个视野进行照像 (Olympus 光学显微镜, 10×20), 用 HMIAS-2000 型彩色图像分析系统测定梗死周边区 (本实验指梗死外侧边皮质区域 1mm 范围内) 免疫表达物的平均光密度值 (OD 值), 取 3 个视野的均值作为该切片结果参与统计分析。因在每个标本中取 3 张切片, 故每个时间点有 15 张切片结果。

2.2 微血管密度

因子免疫组织化学染色结果显示, 微血管形态不规则, 管腔由染成棕黄色的内皮细胞围成。康复组动物缺血 14d 和 28d 时缺血周边区可见较多散在的单个内皮细胞, 而其它组动物相应部位仅见少见散在的单个内皮细胞。微血管计数: 缺血 14d 和 28d 时

缺血周边区模型组明显多于假手术组, 差异有显著性意义; 而康复组缺血 14d 和 28d 时缺血周边区微血管计数明显多于假手术组和相应时间的模型组, 差异有显著性意义。各组动物缺血周边区微血管密度比较见表 2。

表 2 各组大鼠缺血周边区微血管密度比较

(血管数/mm², $\bar{x} \pm s$)

组别	缺血 1d	缺血 3d	缺血 7d	缺血 14d	缺血 28d
假手术组					55.7±23.5
模型组	61.6±19.6	62.1±25.6	68.9±23.4	74.6±24.3 ^①	80.1±24.8 ^①
康复训练组	60.4±21.7	63.4±28.7	76.2±25.1	92.8±24.5 ^{②③}	99.6±26.6 ^{②③}

与假手术对照组比较^① $P<0.05$, ^② $P<0.01$; ^③与模型组比较 $P<0.05$

3 讨论

研究表明, 脑缺血、缺氧可诱导 VEGF 及其受体的表达, 并激活血管新生机制, 新生血管形成可在一定程度上减轻神经功能的缺失, 微血管新生的范围与程度直接关系到缺血边缘区血流的改善, 影响神经元生理功能的恢复, 从而决定了患者的预后, 尤其是在梗死周围半暗带中新生血管的数量与中风患者的存活率直接相关^[5-6]。Krupinski 等^[7]定量分析了 10 例卒中死亡患者脑组织中新生血管密度与生存时间关系, 发现有 9 例患者缺血半球内微血管密度明显增加, 以缺血半暗区增加更为显著, 与患者的生存时间呈正相关。

血管再生是一个极其复杂的过程, 涉及内皮细胞分裂、血管基底膜及细胞外基质的降解和内皮细胞迁移等; 新血管的形成来源于先前存在的血管的内皮细胞增殖, 而内皮细胞增殖有赖于 VEGF 的刺激^[8]。VEGF 是强效的有丝分裂原, 可直接或间接地影响血管再生的各个环节, 在人和动物胚胎发育阶段呈广泛性高水平表达, 介导生理过程的大血管形成和微血管再生。VEGF 为分泌性蛋白, 作用于特异性受体, 从而保护脑毛细血管内皮细胞, 防止毛细血管消失, 同时刺激内皮细胞增殖, 血管新生, 神经功能迅速恢复^[9-10]。新近的研究表明, VEGF 还可通过抑制脑缺血后神经细胞凋亡、调节离子通道、促进神经发生、直接神经营养等机制促进神经功能恢复^[11-12]。

既往的研究发现, 脑缺血后血流增加可诱导 VEGF 的大量表达^[13-14], 运动康复训练具有改善侧枝循环、增加脑缺血后脑血流量的作用^[1], 因此从理论上讲, 具有诱导 VEGF 表达的可行性, 本实验结果显示, 在脑缺血 1d 时 VEGF 开始表达, 3d 达高峰, 此后开始减少, 14d 时表达基本恢复正常, 其对侧非缺血脑组织自缺血 1d 后亦开始有少量 VEGF 表达, 7d 时表达恢复正常。各时间点

- ciated virus gene transfer is associated with improvement of brain ischemia injury in the gerbil [J]. Pharmacol Res, 2003,48 (3):309—317.
- [7] Issa R, Krupinski J, Bujny T, et al. Vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, in human brain tissue after ischemic stroke[J]. Lab Invest, 1999, 79(4): 417—425.
- [8] Risau W. Mechanisms of angiogenesis[J]. Nature, 1997, 386(17): 671—674.
- [9] Jin KL, Mao XO, Greenberg D. Vascular endothelial growth factor: Direct neuroprotective effect in vitro ischemia[J]. PNAS, 2000,97(18):10242—10247.
- [10] Sun Y, Jin K, Xie L, et al. VEGF-induced neuroprotection, neurogenesis, and angiogenesis after focal cerebral ischemia[J]. J Clin Invest, 2003, 111(12): 1843—1851.
- [11] Sun FY, Guo X. Molecular and cellular mechanisms of neuroprotection by vascular endothelial growth factor [J]. J Neurosci Res, 2005,79(1-2):180—184.
- [12] 栗世方, 王任直, 李桂林. 血管内皮生长因子治疗脑缺血实验研究进展[J]. 中国科学院学报, 2005, 27(1): 115—119.
- [13] Hayashi T, Abe K, Suzuki H. Rapid induction of vascular endothelial growth factor gene expression after transient middle cerebral artery occlusion in rats [J]. Stroke, 1997, 28(10):2039—2044.
- [14] 邢影, 徐忠信, 莽靖, 等. 大鼠局灶性脑缺血—再灌注损伤血管内皮细胞生长因子表达的研究[J]. 中国危重病急救医学, 2005, 17(3):174—176.

(上接 34 页)

- man hemiparetic spasticity[J]. J Neurol, 1991, 238: 293—298.
- [5] Krebs HI, Ferraro M, Buerger SP, et al. Rehabilitation robotics: pilot trial of a spatial extension for MIT-Manus [J]. J Neuro-engineering Rehabil, 2004, 1: 1—15.
- [6] Brown P. Pathophysiology of spasticity [J]. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 1994, 57: 773—777.
- [7] Bobath K, Bobath B. A treatment of cerebral palsy based on the analysis of the patient's motor behaviour [J]. Br J Phys Med, 1952;15: 107—117.
- [8] Voss DE, Ionta MK, Myers BJ. Proprioceptive neuromuscular facilitation patterns and techniques [M]. 3rd ed. Philadelphia: Harper and Row, 1985.
- [9] Brunnstrom S. Movement therapy in hemiplegia [M]. New York: Harper and Row, 1970.
- [10] Nuyens GE, De Weerd WJ, Spaepen AJ Jr, et al. Reduction of spastic hypertonia during repeated passive knee movements in stroke patients [J]. Arch Phys Med Rehabil, 2002, 83: 930—935.
- [11] Griffiths RI. Shortening of muscle fibres during stretch of the active cat medial gastrocnemius muscle: the role of tendon compliance[J]. J Physiol, 1991, 436: 219—236.
- [12] Magnusson SP, Simonsen EB, Aagaard P, et al. Biomechanical responses to repeated stretches in human hamstring muscle in vivo[J]. Am J Sports Med, 1996, 24: 622—628.
- [13] Given JD, Dewald JP, Rymer WZ. Joint dependent passive stiffness in paretic and contralateral limbs of spastic patients with hemiparetic stroke [J]. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 1995, 59: 271—279.
- [14] Jahnle MT, Proske U, Struppler A, et al. Measurements of muscle stiffness, the electromyogram and activity in single muscle spindles of human flexor muscles following conditioning by passive stretch or contraction [J]. Brain Res, 1989, 493: 103—112.
- [15] Smith JL, Hutton RS, Eldred E, et al. Postcontraction changes in sensitivity of muscle afferents to static and dynamic stretch[J]. Brain Res, 1974, 78:193—202.
- [16] Hoehler FK, McCann MA, Bernick DL, et al. Habituation of the Hoffmann reflex[J]. Brain Res, 1981, 220: 299—307.
- [17] Rothwell JC, Day BL, Beradelli A, et al. Habituation and conditioning of the human long latency stretch reflex [J]. Exp Brain Res, 1986, 63: 197—204.
- [18] Rudomin P.