

· 基础研究 ·

运动训练对脑梗死大鼠行为学及突触形态结构参数的影响

杨 敏¹ 李 涛¹ 余 茜^{1,2}

摘要 目的:研究运动训练对脑梗死大鼠行为学的影响并从突触形态结构可塑性角度探讨其机制。方法:用线栓法制作大鼠大脑中动脉脑梗死(MCAO)模型,32只Wistar大鼠随机分为模型组和康复组。康复组于手术后第5d开始进行滚筒、转棒、走平衡木、网屏训练,对大鼠进行运动能力和学习记忆能力测评观察其行为学变化,电镜观察缺血侧感觉运动区和CA3区突触形态结构的变化。结果:第5周时康复组和模型组转棒活动、平衡木活动、网屏训练比较差异有显著性意义($P<0.05$),学习记忆能力比较康复组与模型组差异有非常显著性意义($P<0.01$)。康复组两脑区(患侧感觉运动皮质和海马CA3区)突触界面曲率、突触活性区长度增加,与模型组比较差异有显著性意义($P<0.05$)。PSD厚度和穿孔性突触百分率明显增加,与模型组比较差异有非常显著性意义($P<0.01$)。结论:运动训练促进脑梗死大鼠运动能力和学习记忆能力的恢复,其机制可能与脑梗死大鼠缺血侧感觉运动皮质和海马CA3区突触结构参数改变有关。

关键词 脑梗死;行为学;运动训练;突触结构;大鼠

中图分类号:R493,R743 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2007)-01-0024-04

Effects of motor training on behavior and synaptic structures morphology in cerebral infarction rats/YANG Min, LI Tao, YU Qian//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2007, 22(1):24—27

Abstract Objective: To study the changes of behavior and synaptic structures morphology in cerebral infarction rats after motor training. To discuss the mechanism of behavior rehabilitation and plasticity of synaptic structures in cerebral infarction. **Method:** An animal model was made by occlusion of the middle cerebral artery (MCAO). Thirty-two 2-month old male Wistar rats were divided into the rehabilitation group and the model group randomly. Motor training (balancing, grasping, rotating and walking exercises) were applied to the rats of the rehabilitation group at the 5th day post operation (40min/d and 6 times per week), while those in the model group were reared in their original living state. Rotating bar activity, balancing wood activity, and net screen were tested at the 5th week after operation. The structures morphology of synapse in sensory-motor cortex and hippocampus CA3 area at ischemia side were observed under electron microscope. **Result:** Motor ability of rehabilitation group was better than that of the model group. Compared with the model group, rotating bar activity, balancing wood activity and net screen test of the rehabilitation group were significant different at 5th week ($P<0.05$). Both learning and memory abilities were improved in those rats following the motor training ($P<0.01$). The synaptic curvatures and the synapse length of the active area improved obviously in the rats of rehabilitation group in contrast to those of model group ($P<0.05$). The post-synaptic density (PSD) and percentage of perforated synapses increased significantly in the rats of rehabilitation group in comparison to those of model group ($P<0.01$). **Conclusion:** Motor training can promote recovery of cerebral infarcted neural function, ability of motor learning and memory in rats, which are likely to be related to the synaptic changes in sensory-motor cortex and the hippocampus CA3 area and increased synaptic plasticity.

Author's address Dept. of Physiotherapy and Rehabilitation, Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou, 646000

Key words cerebral infarction; behavior; motor training; synaptic structure; rats

随着社会的发展,医学科学的进步,慢性病已成为医疗的重要问题。脑卒中是神经系统的常见病和多发病。脑梗死约占全部脑卒中的80%,患者常有相应的运动、感知觉、行为能力以及学习记忆障碍。目前大量研究提示运动训练能通过促进中枢神经系统的神经再生、修复和突触的可塑性而改善机体功

能。Stroemer等^[1]证实神经元轴突的发芽和突触形成与动物的行为学恢复密切相关。近年来,在神经恢复

1 四川省泸州医学院附属医院康复医学科, 646000

2 通讯作者:余茜(四川省泸州医学院附属医院康复医学科, 646000)

作者简介:杨敏,女,硕士,主治医师

收稿日期:2006-01-10

机制中突触可塑性问题备受关注。突触可塑性是神经科学领域近年来进展最快, 取得成果最大的研究领域。在余茜等^[2]的前期研究中已对运动训练后脑梗死大鼠学习记忆能力与健侧脑内突触形态结构变化的关系做了探讨。本研究利用电镜技术观察运动训练后脑梗死大鼠患侧脑内感觉运动区和海马 CA3 区突触形态结构参数变化, 探讨运动对突触可塑性的影响以及与行为学恢复的关系。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

健康雄性 Wistar 大鼠 32 只, 体重 280 ± 50 g, 周龄 8 周, 由泸州医学院实验动物科提供。分为模型组(脑梗死自由活动组)和康复组(脑梗死运动训练组), 每组各 16 只大鼠。

1.2 局灶性脑缺血模型

按照小泉线栓法制成右侧大脑中动脉缺血梗死模型^[3]。用 1% 的戊巴比妥钠按照 $30-40$ mg/kg 对大鼠进行腹腔麻醉, 固定于手术台上, 颈部右旁中切开, 分离右颈总动脉、颈内动脉、颈外动脉。在翼腭动脉起始部置一血管夹, 结扎切断颈外动脉, 在颈外动脉的起始部剪一直径 0.2 mm 的小口, 将预先用紫药水煮过且染成紫色的强力尼龙钓鱼线(直径 0.22 mm, 长 20 mm), 离头端 4 mm 处均匀地涂上一层聚胺酯轻漆, 使其头端形成一光滑的锥形, 头端直径约 0.25 mm。线栓从颈外动脉残端插入, 经颈动脉分叉后沿颈内动脉入颅, 至大脑前动脉, 稍感阻力时停止, 插入深度从分叉部计约 $17-19$ mm, 然后用手术线结扎颈总动脉分叉处, 最后缝合皮肤, 手术完毕后放回鼠笼正常喂食和饮水, 术后注意对动物进行保温。模型成功标志是动物苏醒后表现为提尾时左侧前肢内收屈曲; 同侧 Hornor 氏征; 爬行时向左划圈; 站立时左侧倾倒。凡具有上述四项体征者列入研究对象。

1.3 运动训练

康复组于术后休息 4d, 从第 5d 起开始采用自制仪器进行运动训练: ①滚筒网状式训练仪: 为一长 100 cm, 直径 60 cm 的圆形网状仪器, 底座有一固定架, 一端有一手摇柄, 将大鼠放于其中让其被动跑笼, 训练大鼠抓握、旋转及行走能力。②平衡训练: 将大鼠放于距地面 5 cm 高, 长 150 cm、宽 2 cm 的方木棒上, 用食物诱导其行走, 训练平衡能力。③网屏训练: 将大鼠放于网眼 1 cm $\times$ 1 cm, 网宽 50 cm $\times$ 40 cm 的网屏上, 网屏距地面高度 80 cm, 下铺 12 cm 厚的海绵。网屏由水平逐步垂直并保持 5 s, 观察大鼠是否

从网屏上掉下来或用前爪抓住网屏。大鼠在网屏上的时间越长反映肌力越好, 训练大鼠的抓握能力及肌力。④转棒训练: 为一长 150 cm, 直径 4.5 cm 的空心铝棒一根, 其中点固定在 3 r/min 的转动器上, 分别向左右交替转动, 以训练其动态平衡。以上训练每天共计 40 min, 每周 6 d。

1.4 运动功能及学习记忆能力的评定

模型组和康复组于手术后 5 周进行运动能力和学习记忆能力测评。运动能力的测评包括了平衡木测评、转棒测评及网屏实验测评, 均采用各自的评分标准进行^[4]。学习记忆行为学测试采用 Y-迷宫进行。

Y-型迷宫^[5]测试: Y-型迷宫为一三等臂式迷宫, 每臂顶端设有一信号灯, 以此提示“危险区”。信号灯亮 6 s, 此臂即为危险区, 通以 36 V 交流电, 刺激大鼠在通电后从所在的亮臂跑到暗臂。训练中始终有一臂为安全区, 安全区以无规则的次序变换。实验在安静、光线较暗的环境中进行。实验前, 将大鼠放入迷宫, 使其适应 5 min, 然后开始实验。大鼠在通电后从所在亮臂跑到另一亮臂记为错误, 跑到暗臂记为正确。每天训练 30 min, 连续刺激 10 次后大鼠休息 2 min, 记录大鼠学会(连续 10 次训练中有 9 次正确即学会)所需的训练次数, 训练次数越少的表明大鼠学习能力越强, 以此作为判断大鼠学习分辨能力的指标。

1.5 透射电镜技术

运动能力和学习记忆检查完毕后, 两组大鼠(模型组和康复组)各取 8 只, 用 1% 的戊巴比妥钠腹腔麻醉后固定于手术台上, 参照 Woolsey 的新皮质机能分区法和边缘系统解剖图取右侧大脑感觉运动皮质和海马 CA3 区各取 2 mm $\times$ 2 mm $\times$ 5 mm 组织, 将所取脑组织切成 1 mm $\times$ 1 mm $\times$ 1 mm 大小的小块, 固定于 3% 戊二醛和 4% 多聚甲醛固定液中。行常规电镜包埋、醋酸铀和枸橼酸铅双染, 用超薄切片机切片。每份标本制作 2 张铜网由左上角至右下角的斜线上移动, 采用 HU-12A 型透射电镜随机摄取突触像 5 张, 15000 倍显微照片, 再光学放大至 30000 倍。

1.7 突触形态参数的定量分析

用 IS-4400 图像分析仪测量突触间隙宽度、突触后致密物(postsynaptic density, PSD)的厚度、突触后膜的弦长和弧长以及突触活性区的长度。其中活性区长度与 PSD 厚度参考 Guldner^[6]方法测量; 突触界面曲率的测量参数参照 Jones 等^[7]的方法进行, 即活性区弧长与相应的弦长之比等于界面曲率; 突触间隙宽度用多点平均法测定。每组 40 张照片。

1.8 统计学分析

用 SPSS11.5 软件进行统计学分析。 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。对大鼠运动能力、学习记忆能力测评, 以及突触结构参数检测统计结果均采用 t 检验进行两两比较。

2 结果

2.1 运动能力和学习记忆评分

见表 1。运动能力评分: 康复组优于模型组, 其术后 5 周转棒行走训练、平衡木步行训练和网屏实验比较差异均有显著性意义 ($P < 0.05$)。

表 1 康复组与模型组运动功能评分 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	转棒行走训练	平衡木行走测评	网屏试验	Y-迷宫学习分辨能力
模型组	16	0.88±0.64	2.00±0.53	0.63±0.52	103.38±12.35
康复组	16	0.25±0.46 ^①	1.38±0.52 ^①	0.13±0.35 ^①	70.88±9.40

①两组比较 $P < 0.05$

学习记忆能力评分: 两组大鼠在手术后 5 周进行学习记忆能力测评, 结果显示康复组 Y-迷宫学习分辨能力明显优于模型组, 其达到掌握标准所需次数明显少于模型组, 两组比较有非常显著性意义 ($P < 0.01$)。

2.2 突触形态结构

拍摄的两组大鼠缺血侧运动感觉皮质和海马

表 2 两组大鼠缺血侧皮质感觉运动区和海马 CA3 区突触结构参数

($\bar{x} \pm s$)

结构参数	片数	皮质感觉运动区		海马 CA3	
		模型组	康复组	模型组	康复组
突触间隙宽度 (nm)	40	20.05±2.78	18.93±2.27	21.03±2.64	19.85±2.67
PSD 厚度 (nm)	40	59.40±11.58	66.90±11.66 ^②	60.08±12.19	67.68±11.65 ^②
突触界面曲率	40	1.023±0.046	1.044±0.034 ^①	1.027±0.037	1.047±0.035 ^①
活性区长度 (nm)	40	327.88±36.78	344.25±36.06 ^①	326.13±39.67	344.78±42.06 ^①
穿孔性突触 (%)	40	8.30	22.08 ^②	8.75	22.58 ^②

①康复组和模型组比较 $P < 0.05$, ②康复组和模型组比较 $P < 0.01$

3 讨论

突触 (synapse) 是神经元间或神经元及其效应细胞间具有特化结构和信息传递功能的接触区域, 是神经元之间结构和功能的接触点。中枢神经系统突触功能和结构的可塑性变化是神经康复的基础。突触结构和突触数量的变化都会影响脑传递的功能。脑缺血大鼠随缺血时间的延长, 会出现突触结构异常, 突触密度下降^[8]。Briones 等^[9-11]认为成年大脑损伤后在与损伤邻近相关的特定位置有适应性可塑性变化, 这一可塑性变化过程受损伤后康复训练的调控。其通过对运动训练后脑缺血大鼠齿状回突触学形态和与新陈代谢相关的超微结构变化的观察, 发现运动训练使齿状回的分子内层和分子外层的突触数量和突触前末梢的线粒体数量明显增加, 并在齿状回及其相邻的结构发现明显增多的颗粒细胞。但突触前末梢的线粒体大小没有显著改变。这表明运动训练能促进突触的可塑性改变, 其机制可能与

CA3 区 Gray I 型突触图像均符合兴奋性突触形态特征, 具有典型的不对称界面, 突触后有浓密的电子致密物, 突触小泡呈圆形, 突触后膜比突触前膜明显增厚。模型组突触多为平直型突触, 即突触前、后膜近于直线且平行, 少数突触的前后膜轻度弯曲形成微凹型或微凸型, 一般只有一个活性区域, 突触小泡明显减少, 线粒体变性明显。康复组突触多表现为凹型或凸型突触, 多数为凹型突触, 或有突触后部突入突触前部; 康复组突触的体积比较大, 大多有两个以上的活性区, 突触小泡明显增多, 向活性区靠拢, 细胞浆内线粒体双层结构完整, 线粒体内嵴清楚。具体结构形态见图 1—4 (见后置彩色插页 1)。

2.3 透射电镜突触形态图像分析仪统计结果

统计结果显示康复组两脑区 (缺血侧皮质运动感觉区和海马 CA3 区) 突触界面曲率、突触活性区长度增加, 与模型组比较差异有显著性意义 ($P < 0.05$), 康复组 PSD 厚度和穿孔性突触百分率明显增加, 与模型组比较有非常显著性意义 ($P < 0.01$)。两组大鼠两脑区突触间隙宽度比较差异无显著性意义 ($P > 0.05$)。两组大鼠运动感觉皮质和海马 CA3 区突触界面结构参数测量统计结果见表 2。

运动训练促进脑缺血大鼠突触前轴突末梢的线粒体的数量增加有关。其实验也发现运动训练诱使脑梗死大鼠齿状回神经生长, 证实运动训练对脑损伤和未受伤大鼠均能在海马齿状回诱导超微结构变化, 表现为突触数量增加、多样性突触出现以及穿孔突触数量增加等突触可塑性变化。

余茜^[2, 12-13]研究发现, 脑梗死大鼠运动训练组健侧感觉运动皮质和海马 CA3 区的突触界面曲率、突触后致密物厚度和穿孔性突触数量明显增加, 突触结构发生可塑性变化, 使健侧突触传递功能增强, 实现了对脑梗死大鼠学习记忆的改善, 同时运动训练可使脑梗死大鼠海马 CA3 区突触效应的习得性 LTP 的形成速度明显快于不给予任何训练的模型组, 海马 CA3 区 PS 峰潜伏期明显缩短, 运动可影响健侧海马 CA3 区 NMDA 受体通道开放电导水平、开放时间和开放概率, 表明运动训练促进脑梗死大鼠学习记忆能力的恢复是通过健侧海马神经元 NMDA

受体通道特性的改变而实现,以上研究表明运动训练可以改善脑梗死大鼠的学习记忆能力与其促进突触形态和功能可塑性改变密切相关。

在本试验中康复组脑缺血大鼠通过训练其运动能力和学习记忆能力明显改善,而同时其缺血侧感觉运动皮质和与记忆密切相关海马 CA3 区的突触超微结构表现为突触小泡的增多,突触界面曲率和突触活性区长度的增加,以及突触 PSD 厚度和穿孔性突触的数量明显增加。突触小泡内主要为神经递质,脑缺血使突触小泡的数量减少,而运动训练可以使突触小泡的数量增加,使得神经兴奋时更多的递质释放到突触间隙,从而改善其行为学。突触界面曲率是突触结构可塑性的一个重要参数,有可能作为神经递质释放状况的标志。脑缺血发生以后,突触界面曲率减小,从而减少了神经元接触面,降低了神经信息。研究发现弯曲型突触比平直型突触内有更多的线粒体,也即弯曲型突触处于更活跃的状态^[14]。运动训练使突触界面曲率的增加,从而保证了突触释放的递质可以达到靶部位,减少向周围间隙扩散,提高突触传递的效率。PSD 是突触后膜内侧胞质面的一种均质性的致密物,含有多种蛋白和酶,易受影响而发生数量与构象变化,它的变化反映突触后膜上受体与离子通道的变化。PSD 增厚和增长可能是突触功效增强的物质基础。PSD 厚度是中枢突触结构可塑性的重要参数,研究表明 PSD 厚度与学习记忆的训练与学习记忆的保持能力密切相关。大鼠脑缺血后,PSD 厚度是减少的,而运动训练使康复组大鼠缺血侧两脑区的 PSD 厚度增加可能影响了突触的传递功能,从而改善了脑缺血大鼠的行为能力。突触活性区长度也是反映突触形态学的特征性参数之一。突触前膜与聚集成簇的突触小泡相接触形成突触活性区,突触活性区与突触泡吐作用的时效性密切相关^[15],其长度也可反映突触接触面积的大小,也可以代表神经递质释放的有效面积。脑缺血发生后,突触活性区长度变短,而运动训练后在缺血侧大脑运动皮质和海马 CA3 区的突触活性长度增加,增大接触面积,有利于递质与受体更有效的结合,以及递质作用后被重新摄取,从而提高神经信息传递的有效性。Geinisman 等认为穿孔性突触可能是突触重建和转换的中间过程^[16]。中枢神经系统穿孔性突触(perforated synapse)随环境因素、视觉训练而增加,随年龄增大和记忆减退而减少。同时其研究发现节段形 PSD 可能参与形成了一种高效能的突触连接^[17]。突触穿孔现象可能是突触分裂的中间步骤,而且突触穿孔后 PSD 变为节段性,出现多个活性区,使得不

同受体簇的不同活性区传递功能大大加强,进一步增强了突触传递功效。肖鹏等^[18]发现海马 CA3 区穿孔性突触数量在学习前后有明显变化。突触间隙是一个神经元与其他神经元相沟通的地方,脑缺血导致突触结构破坏,突触间隙增宽,本实验中两组大鼠大脑感觉运动皮质和海马 CA3 区的突触间隙宽度差异无显著性意义。

由此可见,运动训练可以促进脑梗死大鼠的运动能力和学习记忆能力的恢复,其机制可能在于运动促进了大脑相应区域的突触结构和传递的可塑性变化,使神经系统的功能重组和代偿。

参考文献

- [1] Stroemer RP, Kent TA, Hulsebosch CE. Neocortical neural sprouting, synaptogenesis, and behavioral recovery after neocortical infarction in rats[J]. Stroke, 1995, 26(11): 2135—2144.
- [2] 余茜, 李晓红, 吴士明. 运动训练后脑缺血大鼠学习记忆与健侧脑内突触结构变化的关系[J]. 中华物理医学与康复杂志, 2002, 24(7): 399—402.
- [3] 屈秋民, 曹振玲, 杨剑波. 线栓法大鼠脑中动脉闭塞局灶性脑缺血模型 Longa 法和小泉法的比较[J]. 中华神经科杂志, 2000, 33(5): 289.
- [4] 徐莉, 李玲, 陈景藻, 等. 康复训练对大鼠脑梗死神经功能恢复的影响[J]. 中华物理医学与康复杂志, 2000, 22(2): 86—88.
- [5] 赵崇侃, 程光, 陈启盛. 一种智能化的 Y 迷宫[J]. 中国应用生理学杂志, 1997, 13: 363—365.
- [6] Guldner FH, Ingham CA. Increase in postsynaptic density material in optic target neurons of the rat suprachiasmatic nucleus after bilateral enucleation[J]. Neurosci Lett, 1980, 17(1—2): 27—31.
- [7] Jones DG. Synaptic plasticity and perforated synapses: their relevance for an understanding of abnormal synaptic organization[J]. APMIS Suppl, 1993, 40: 25—34.
- [8] 王慧鹃, 李陈莉, 赵秀丽, 等. 大鼠脑缺血后突触超微结构的变化[J]. 解剖学杂志, 2003, 26(6): 587—590.
- [9] Briones TL, Suh E, Jozsa L, et al. Changes in number of synapses and mitochondria in presynaptic terminals in the dentate gyrus following cerebral ischemia and rehabilitation training[J]. Brain Res, 2005, 1033(1): 51—57.
- [10] Briones TL, Suh E, Hattar H, et al. Dentate gyrus neurogenesis after cerebral ischemia and behavioral training[J]. Biol Res Nurs, 2005, 6(3): 167—179.
- [11] Briones TL, Suh E, Jozsa L, et al. Behaviorally-induced ultrastructural plasticity in the hippocampal region after cerebral ischemia[J]. Brain Res, 2004, 997(2): 137—146.
- [12] 余茜, 李晓红, 吴士明, 等. 运动康复对脑梗死大鼠学习记忆能力和 LTP 的影响[J]. 中华物理医学与康复杂志, 2002, 24(3): 140—143.
- [13] 余茜, 李晓红, 刘曦, 等. 康复训练对脑梗死大鼠学习记忆与健侧海马神经元 NMDA 受体通道的影响[J]. 中华物理医学与康复杂志, 2002, 24(11): 683—686.
- [14] Dyson SE, Jones DG. Quantitation of terminal parameters and their inter-relationships in maturing central synapses: A perspective for experimental studies[J]. Brain Res, 1980, 183(1): 43—59.
- [15] Rosenmund C, Rettig J, Brose N. Molecular mechanisms of active zone function[J]. Curr Opin Neurobiol, 2003, 13(5): 509—519.
- [16] Geinisman Y, Detolledo-Morrell L, Morrell F, et al. Synapse restructuring associated with the maintenance phase of hippocampal long-term potentiation[J]. J Comp Neurol, 1996, 368(3): 413—423.
- [17] Geinisman Y, Detolledo-Morrell L, Morrell F, et al. Structural synaptic plasticity associated with the induction of long-term potentiation is preserved in the dentate gyrus of aged rats[J]. Hippocampus, 1992, 2(4): 445—456.
- [18] 肖鹏, 何胜昔, 许世彤, 等. 海马 CA3 区突触结构在记忆中的变化[J]. 中国行为医学科学, 2005, 14(1): 26—28.