

康复训练对脑缺血损伤大鼠血管生成素的影响*

郑庆平¹ 胡永善¹ 白玉龙¹ 孙莉敏¹ 朱大年² 崔晓³ 贾杰¹

摘要 目的: 研究运动训练能否促进大鼠局部脑缺血再灌注后的功能恢复并从血管生成素及其受体的角度探讨其机制。**方法:** 成年雄性 SD 大鼠 18 只, 随机分成运动组、静止组、假手术组。每组 6 只。大脑中动脉闭塞(MCAO)法造模 24h 后, 运动组给予 2 周的电动跑台训练, 每天 30min。采用神经行为学评分、脑梗死体积评价神经功能恢复情况; 免疫组化法从蛋白水平观察 Ang-1、2, Tie-2 的表达情况。**结果:** 2 周后, 运动组的神经行为学评分高于静止组, 脑梗死体积减小具有显著性意义, Ang-1、Tie-2 的蛋白表达显著高于静止组与假手术组。**结论:** 运动训练能够促进脑缺血大鼠神经功能恢复, 这种改变可能与 Ang/Tie-2 通路的上调有关。

关键词 脑缺血; 跑台; 血管生成素; 大鼠

中图分类号: R743.3, R493 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-1242(2007)-03-0193-04

The effect of rehabilitation training on angiopoietin in ischemia brain injury rats/ZHENG Qingping, HU Yongshan, BAI Yulong, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2007, 22(3): 193—196

Abstract Objective: To determine if exercises could induce expression of angiopoietin/Tie pathway, in association with angiogenesis; and if angiogenic changes correlated with reduced brain injury in stroke. **Method:** Adult male Sprague Dawley rats (2.5 month old, n=18) exercised on a treadmill 30min each day for 2 weeks, or housed as non-exercised controls for 2 weeks. **Result:** Exercises increased protein (determined by immunohistochemistry) expression of angiopoietin-1 and Tie-2 significantly at the end of 2 weeks ($P<0.05$). In two-week-exercising rats subjected to 1-h MCA occlusion, neurological deficits and infarct volume reduced significantly. **Conclusion:** Exercises can reduce brain injury in stroke. The reduced damage is associated with angiogenesis, possibly induced by angiogenic factors following exercises. Physical exercises up-regulates protein levels of the angiopoietin/Tie-2 pathway.

Author's address Dept. of Rehabilitation, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai, 200040

Key words cerebral ischemia; treadmill; angiopoietin; rats

早期的康复训练可改善患者运动功能, 提高其生活自理能力, 这已通过大量的临床实践为人们所接受, 并在已完成的国家科委“九五”攻关课题“脑血管意外的早期康复研究”和“十五”攻关课题“脑血管意外后三级康复方案的研究”中的得到证实。但是其内在的机制仍尚待研究。

有研究证实, 梗死体积和神经行为学的改善与大脑中动脉供血区的血流量和速度密切相关^[1]。在新生血管形成调节途径中, 血管生成素(angiopoietins, Ang)及其内皮特异性酪氨酸激酶受体 Tie 通路是一种新发现的调节血管生成的重要信息途径。本研究试图观察康复训练与 Ang/Tie 变化的关系, 从而探讨康复训练可能改善脑梗死动物神经功能的机制。

1 材料与方法

1.1 动物及分组

雄性成年 SD 大鼠 (复旦大学医学院动物实验中心提供, 清洁级), 体重 220—250g, 2.5 月龄, 18 只。在进行大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery

occlusion, MCAO)造模手术前随机分为: 跑步训练组(stroke-exercise, SE 组)、静止组(stroke-no exercise, SNE 组)、假手术组(Sham 组)。每组 6 只。笼内饲养, 给予充足食物和饮水, 每日 12h 光照, 室温 $23\pm1^{\circ}\text{C}$ 。

1.2 大鼠大脑中动脉缺血/再灌注模型(MCAO/R)制备

采用 Longa 线栓法阻塞大鼠右侧大脑中动脉造成缺血^[2]。大鼠经 10%水合氯醛(300mg/kg, i.p.)麻醉后, 行颈部正中切口, 钝性分离左颈总动脉, 左颈外动脉和左颈内动脉。结扎左颈外动脉分支枕动脉、甲状腺上动脉, 动脉夹暂时夹闭左颈内动脉分支翼腭

* 基金项目: 复旦大学基础和临床交叉基金(校 200681); 复旦大学附属华山医院科研启动基金(2005131)

1 复旦大学附属华山医院康复科, 复旦大学上海医学院康复与运动医学系, 上海乌鲁木齐中路 12 号, 200040

2 复旦大学上海医学院生理和病理生理实验室

3 上海长宁区天山中医院

作者简介: 郑庆平, 女, 硕士研究生

收稿日期: 2006-10-30

动脉。结扎左颈外动脉远心端,斜剪一切口,将预先处理过的 4—0 尼龙线(ETHILON,美国强生公司)的圆钝端沿切口插入近心端。于斜切口处剪断左颈外动脉,将近心端下拉至与左颈内动脉成一直线,将 4—0 尼龙线沿左颈内动脉走向缓慢推进,直至尼龙线顶端感阻塞感,约距左颈总动脉分叉 18—20mm 处。60min 后,缓慢退出尼龙线,缝合皮肤。在缺血全过程中,大鼠肛温控制在 $37\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 。清醒后回笼,自由进食。假手术组,手术步骤同缺血组,只是不阻塞大脑中动脉。在第 1 次给水合氯醛后约 1.5h,各组大鼠在同一时刻补加水合氯醛 0.2ml。

1.3 跑台训练

跑台训练采用立泰生物科技有限公司制造 DSPT-202 型五跑道电动跑台。各组大鼠在手术前均经过适应性跑步训练 3d,每天 30min。在动物缺血再灌注后 24h,运动组予以跑台训练,每天 30min,每周 5d,连续 2 周。跑台参数设置如下:平板斜度: 0° 。履带传输速度:术前 3d:12m/min,术后第 1 天:5m/min;第 2 天:8m/min;第 3 天及以后:12m/min。

剩余两组同样抓取,但不作跑台干预。

1.4 模型神经功能缺失体征评分

依照 Longa 等^[2]的方法,大鼠神经学评分术后每天评定。使用六分法评价大鼠缺血后运动及行为学缺陷,具体如下:5 分:正常;4 分:对侧前肢持续弯曲;3 分:瘫痪侧抵抗侧推力的能力下降;2 分:拉鼠尾时向瘫痪侧旋转;1 分:鼠自由行动时向瘫痪侧旋转;0 分:鼠被放在地面上无自发活动。

1.5 脑组织冰冻切片及脑缺血梗死程度测定

大鼠脑组织采用灌注法固定。经蔗糖梯度脱水后下沉后连续冠状冰冻切片(2.0mm—4.0mm Bregma 平面),自视交叉出现开始,至腹侧海马出现为止,片厚 $30\mu\text{m}$ 。切片入脑保护液, -20°C 保存。

进行脑梗死体积测定时,每 8 张(即隔 $240\mu\text{m}$)取 1 张脑片,1%甲苯胺蓝染色以鉴定存活细胞。然后采用 Q500W 型图象分析仪得到鼠脑各 Bregma 平面的梗死面积后,用梯形公式计算每个动物的缺血灶梗死体积绝对值。计算公式如下:

$$V(\text{mm}^3) = 1/2 \times (S_1 + S_2 + S_3 + \dots + S_n) \times 0.24$$

为排除个体差异及水肿的影响,进一步将计算所得的绝对值与对侧半球体积相比,得到一个相对值,即相对梗死体积^[3]。

1.6 免疫组织化学染色

选取 Bregma 0.2mm 的脑片(以前连合后部出现为特征)从保护液中挑出,依次进行以下实验操作: PBS 漂洗 $\rightarrow$ 0.3% H_2O_2 室温 20min $\rightarrow$ PBS 漂

洗 $\rightarrow$ 5% BSA 封闭液 37°C 20min $\rightarrow$ 用兔多克隆抗 Ang-1 抗体(1:150, 武汉)、兔多克隆抗 Ang-2 抗体(1:150, 武汉)、兔多克隆抗 Tie-2 抗体(1:200, 武汉)在 37°C 孵育 1h, 4°C 过夜 $\rightarrow$ PBS 漂洗 $\rightarrow$ 即用型生物素化的抗兔 IgG (武汉) 37°C 孵育 20min $\rightarrow$ PBS 漂洗 $\rightarrow$ 亲和素-生物素-过氧化物酶复合物(武汉) 37°C 孵育 20min $\rightarrow$ PBS 漂洗 $\rightarrow$ DAB (武汉) 显色 5—10min。切片呈色后移于蒸馏水中终止反应 $\rightarrow$ 常规脱水、透明、封片。

阴性对照用 PBS 代替一抗进行孵育,其余步骤同上。

阳性表达的测定: 阳性结果为细胞浆中出现棕黄色颗粒。选取纹状体背侧的额顶叶皮质(缺血周边区)及纹状体背外侧(缺血中心区),经 Olympus BX5 显微镜采用 10 倍物镜采集图像,读取每视野棕黄色颗粒数。

1.7 统计学分析

采用 SPSS10.0 统计软件进行分析,所有定量数据进行正态性和方差齐性检验,多组均数间的比较采用单向方差分析,满足方差齐性要求的数据采用 LSD 法进行各组均数的多重比较,否则采用 Dunnett's T3 法比较多变量相关分析中的双变量相关分析。用 Kruskal-Wallis 分析进行两组间比较,需要调整检验水准: $\alpha' = \alpha/N$, N 为所需检验的次数, $N = n(n-1)/2$, n 为参加检验的组数。本实验 $n=3$,故在原 $\alpha=0.05$ 的检验水准上,调整 $\alpha' = 0.017$ 即 $P < 0.017$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 梗死体积测定

脑片经 Q500W 型图象分析仪和公式计处理后得出的相对梗死体积值用平均值 $\pm$ 标准差表示。运动组、静止组和假手术组的相对梗死体积分别为: $4\% \pm 2\%$ 、 $19.64\% \pm 9.7\%$ 和 0。可见,静止组的相对梗死体积最大。经单向方差分析提示组间有显著性差异。Post-hoc 分析提示运动组的梗死体积显著小于静止组($P < 0.05$)。

2.2 神经行为学评分

术后第 1 天起,运动组和静止组的神经行为学评分就显著小于假手术组,而运动组自术后第 3 天起神经行为学评分就显著高于静止组且一直持续到 2 周末($P < 0.017$),见表 1。

2.3 免疫组化结果

2.3.1 形态学:实验发现,血管生成素及其受体阳性细胞主要分布在缺血侧纹状体背外侧(缺血中心区)

和额顶叶皮质上(缺血周边区);缺血侧的 Ang/Tie 阳性染色主要呈神经元样,卵圆形或锥形,核大而圆,常有突起存在(图 1A, 见前置彩色插页 8);从缺血中心区到缺血周边区,其数量逐渐增加;少部分阳性染色为内皮细胞样,在缺血中心区和周边区均匀分布(图 1B, 见前置彩色插页 8)。

表 1 各组大鼠术后神经行为学评分

(中位数)

组别	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天	第 6 天	第 7 天	第 11 天	第 14 天
运动组	2 ^③	2.5 ^③	3 ^{①③}	4 ^{①③}	4 ^{①③}	4 ^{①③}	4 ^{①②}	4 ^{①②}	4 ^{①②}
静止组	2 ^③	2 ^③	2 ^③	2 ^③	2 ^③	2.5 ^③	2.5 ^③	3 ^③	3 ^③
假手术组	5	5	5	5	5	5	5	5	5

①与静止组比 $P<0.017$;②与假手术组比 $P<0.017$;③与假手术组比 $P<0.003$

表 2 Tie-2、Ang-1、Ang-2 在各组的表达情况

($\bar{x}\pm s$, 个/100 倍视野)

组别	Tie-2		Ang-1		Ang-2	
	皮质	纹状体	皮质	纹状体	皮质	纹状体
运动组	114.67±20.61 ^{①②}	155.67±12.71 ^{①②}	154.33±27.64 ^{①②}	222.83±34.99 ^{①②}	61.00±9.36 ^②	28.50±7.34 ^②
静止组	52.00±6.10 ^②	71.83±11.07	38.33±7.12	68.00±8.32 ^②	50.67±8.26	22.00±6.60
假手术组	20.00±5.83	60.00±8.10	23.50±4.09	2.00±0.89	8.83±2.86	5.33±1.75

①和静止组相比 $P<0.05$, ②与假手术比 $P<0.05$

3 讨论

运动训练能促进脑缺血疾病的康复,无论在动物实验中还是临床实践中都已受到肯定和重视。它不仅能改善患侧肢体功能和心血管适应性^[6],还能促进损伤大脑的神经恢复^[4-6]。卒中后运动模式目前国内多采用游泳、转棒、滚筒、网屏、平衡木训练等方法,但存在运动量控制不稳定、不能精准调控运动量和运动强度等缺点。跑台训练是目前国际通行的卒中后运动模式,本研究引进电动跑台动力装置,克服了上述训练手段的不足,有利于对运动量的量化。运动量采取循序渐进的适宜运动,每天的跑台速度由第 1 天的 5m/min,3d 内逐渐加至 12m/min,经过我们的观察,该运动强度不会引起大鼠应激性体重减轻。

本实验结果显示,与静止组相比,运动组的梗死体积显著减小,神经行为学评分显著提高,都提示早期康复训练更有助于脑缺血大鼠神经功能的恢复。

在啮齿动物的胚胎发育过程中,脑血管的发育主要是通过血管发生(angiogenesis),而在成年人类和啮齿动物脑内,新生血管的生成则只在以下病理生理条件(如缺血^[7]、低氧等因素)下发生,原先存活的毛细血管经发芽或潜在吻合血管枝增大形成新血管,过程包括内皮细胞趋化移动、增殖,形成新管腔,周细胞、血管平滑肌细胞等血管周围细胞的移入、黏附至内皮层形成完整的血管壁;血管丛经重塑(修剪)形成成熟的血管系统等。最近的研究发现,Ang 及其受体(Tie)调节通路是一种新发现的调节血管生成的重要信息途径,它对促成血管形成后期的血管的成熟、稳定性及重建方面扮演着非常重要

2.3.2 表达情况:运动组的 Ang-1,2 及 Tie-2 无论是皮质区还是纹状体区的表达均较假手术组显著增加($P<0.05$),其中 Ang-1 和 Tie-2 的表达还显著高于静止组($P<0.05$)。静止组的皮质区 Tie-2 的表达显著高于假手术组($P<0.05$),静止组纹状体区 Ang-1 的表达显著高于假手术组($P<0.05$),见表 2。

的角色^[8]。血管生成素最早是从人结肠癌细胞中分离得到的,该蛋白质家族有 4 个成员:Ang1—4,目前研究较多的是 Ang1—2,它们具有共同的结构,即由 3 个结构域组成的糖蛋白:N-端疏水性分泌信号肽、介导同源寡聚体形成的 α -螺旋样结构域和 C-端介导配体活性的纤维蛋白原样结构域,特异性作用于内皮细胞,具有很强的促血管生成活性。Tie 为 Ang 内皮特异性酪氨酸激酶受体,Tie-1 和 Tie-2 是酪氨酸激酶家族的 2 个主要成员,它们很早已被证实是在血管发生的成熟阶段中发挥作用。Tie-2 又称作 TEK,由 8 个功能区的细胞外结构域和一个酪氨酸激酶结构域的胞内部分组成。目前已知的血管生成素都结合在受体 Tie-2 上,Tie-2 的细胞内结构域可结合多种蛋白分子行使功能。

Lin^[9]和 Wang^[10]等均发现,脑缺血后梗死区 Ang/Tie 系统表达上调。Ang-1 与受体 Tie-2 结合后,表达活化 Tie-2 的内皮细胞促进血管萌芽和分支,募集内皮周围支持细胞,促进血管重塑和成熟,形成完整的血管壁,并通过调节内皮细胞和血管周围间质细胞的相互作用维持血管管腔的完整性和稳定性^[11],向梗死灶生长^[12];同时活化内皮细胞磷脂酰肌醇激酶(PI3),使凋亡抑制剂生成增多,对抗内皮细胞凋亡,减轻缺血性脑卒中后大鼠血脑屏障通透性的增加;Ang-2 则在血管内皮生长因子的协同下,能促进血管增生^[13],表现出血管生成的协同效应。

最近的研究表明,Ang/Tie 通路在药物^[14]、细胞因子治疗^[7]、脑缺血前的运动训练^[15]等脑缺血性损伤治疗手段中的作用都得到了证实。本实验观察到,康复训练后脑缺血区的 Ang-1、Tie-2 的表达显著增

加, 但 Ang-2 的增加无显著性意义。这在蛋白水平验证了我们的设想, Ang/Tie 通路在康复训练后有所上调, 它可能是康复训练改善神经功能的机制之一。更多关于血管生成素及其受体在脑缺血后脑功能康复与重塑过程中的作用, 有待于进一步的研究。

参考文献

- [1] Treger I, Streifler JY, Ring H. The relationship between mean flow velocity and functional and neurologic parameters of ischemic stroke patients undergoing rehabilitation [J]. Arch Phys Med Rehabil, 2005,86(3):427—430.
- [2] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. Stroke, 1989,20(1):84—91.
- [3] Swanson RA, Morton MT, Tsao-Wu G, et al. A semiautomated method for measuring brain infarct volume [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 1990,10(2): 290—293.
- [4] Gomez-Pinilla F, Ying Z, Roy RR, et al. Voluntary exercise induces a BDNF-mediated mechanism that promotes neuroplasticity[J]. J Neurophysiol, 2002, 88(5):2187—2195.
- [5] Ang ET, Wong PT, Mochhala S, et al. Neuroprotection associated with running: is it a result of increased endogenous neurotrophic factors[J]? Neuroscience, 2003, 118(2):335—345.
- [6] Ding Y, Li J, Luan X, et al. Exercise pre-conditioning reduces brain damage in ischemic rats that may be associated with regional angiogenesis and cellular overexpression of neurotrophin [J]. Neuroscience, 2004, 124(3):583—591.
- [7] Lee ST, Chu K, Jung KH, et al. Granulocyte colony-stimulating factor enhances angiogenesis after focal cerebral ischemia [J]. Brain Res, 2005, 1058 (1-2): 120—128.
- [8] Ardeli AA, McCullough LD, Korach KS, et al. Estradiol regulates angiopoietin-1 mRNA expression through estrogen receptor- α in a rodent experimental stroke model [J]. Stroke, 2005,36(2):337—341.
- [9] Zhang ZG, Zhang L, Croll SD, et al. Angiopoietin-1 reduces cerebral blood vessel leakage and ischemic lesion volume after focal cerebral embolic ischemia in mice [J]. Neuroscience, 2002, 113(3):683—687.
- [10] Wang RG, Zhu XZ. Expression of angiopoietin-2 and vascular endothelial growth factor in mice cerebral cortex after permanent focal cerebral ischemia [J]. Acta Pharmacol Sin, 2002, 23(5):405—411.
- [11] Yancopoulos GD, Klagsbrun M, Folkman J. Vasculogenesis, angiogenesis, and growth factors: ephrins enter the fray at the border[J]. Cell, 1998,93(5):661—664.
- [12] Valable S, Montaner J, Bellail A, et al. VEGF-induced BBB permeability is associated with an MMP-9 activity increase in cerebral ischemia: both effects decreased by Ang-1[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2005,25(11): 1491—1504.
- [13] Zhu Y, Lee C, Shen F, et al. Angiopoietin-2 facilitates vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis in the mature mouse brain[J]. Stroke, 2005,36(7): 1533—1537.
- [14] Chen J, Zhang C, Jiang H, et al. Atorvastatin induction of VEGF and BDNF promotes brain plasticity after stroke in mice[J]. Cereb Blood Flow Metab, 2005,25(2):281—290.
- [15] Ding YH, Luan XD, Li J, et al. Exercise-induced overexpression of angiogenic factors and reduction of ischemia/reperfusion injury in stroke[J]. Curr Neurovasc Res, 2004,1(5): 411—420.

中国康复医学会第十届全国脑血管病康复学术会议 暨中国康复医学会脑血管病专业委员会换届大会征文及会议通知

中国康复医学会脑血管病专业委员会, 拟于 2007 年 10 月 26—29 日在古城西安市召开“中国康复医学会第十届全国脑血管病康复学术会议暨中国康复医学会脑血管病专业委员会换届大会”。本次大会由中国康复医学会脑血管病专业委员会主办, 西安交通大学医学院第二附属医院承办, 第四军医大学西京医院神经内科和陕西省康复医学会神经疾病康复专业委员会协办。本次会议授予与会者国家级 I 类继续教育学分 10 分。

会议内容: 学术交流; 专题报告、专题讨论、大会交流和技术讲座; 召开中国康复医学会脑血管病专业委员会换届会议。

征文内容: 凡与脑血管疾病的康复治疗、康复护理有关的内容如: 脑血管病临床康复相关的基础研究; 脑血管病临床康复诊疗方面的研究; 脑血管病功能评定方法和临床应用; 脑血管病三级康复网络的建设和社区康复; 脑血管病运动障碍现代治疗新技术; 脑血管病感知觉、认知和精神心理的诊治; 康复工程在脑血管病中的应用等。

征文要求: 1000 字摘要, 欢迎 E-mail 投稿, 如为文字稿请附软盘。作者姓名和单位写在文题下, 并留下联系电话和 E-mail 地址。稿件截止日期: 2007 年 8 月 30 日; 联系地址: 西安市西五路 157 号西安交通大学医学院第二附属医院神经内科, 710004; 联系人: 张巧俊, 袁海峰; 电话: 029-88557790、87580032; 电子邮箱: zhangqj@mail.xjtu.edu.cn; 会议具体地点和日程另行通知。

中国康复医学会脑血管病专业委员会