

早期“强制性使用”运动疗法对局灶性脑梗死大鼠行为学评分及神经生长因子的影响

张晓钰¹

摘要 **目的:**探讨脑卒中后早期强制性使用单侧肢体对局灶性脑梗死大鼠行为学评分及大脑皮质梗死周围(NGF)表达的影响。**方法:**健康雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠, 用大鼠大脑中动脉线栓法(MCAO)建立永久性缺血模型, 按照 Zea-Longa 的方法对动物的行为缺陷进行评分, 选取 1—3 分者 60 只, 将 60 只大鼠随机分为 2 组, 健侧前肢固定组(A 组)30 只, 未固定组(B 组)30 只, 7d 时解除固定, 再采用随机区组法分为 14d 时处死组和 21d 处死组, 各组动物在 7d 时和处死前做神经功能评分(Longa 评分), 采用免疫组织化学(SP)方法观察 NGF 蛋白的表达; 采用(POD 法)原位杂交方法检测 NGF mRNA 表达。**结果:**固定组与未固定组相比, 早期“强制性使用”运动疗法可以改善 14d 及 21d 的行为学评分, 有显著性意义($P < 0.05$); 在梗死周围皮质 NGF 蛋白和 NGF mRNA 的表达, 固定组 14d 时表达均明显高于非固定组($P < 0.05$), 而在 21d 时无显著性意义。**结论:**早期“强制性使用”运动疗法可以改善神经功能的恢复, 从基因水平来提高 NGF 的表达可能为其发挥作用的机制之一。

关键词 脑梗死; 强制性使用运动疗法; 大鼠; 神经生长因子

中图分类号: R493.743 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-1242(2007)-06-0509-03

Effects of early constraint-induced movement therapy for the grade of behavior and expression of NGF on focal cerebral infarction rats/ZHANG Xiaoyu/Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2007, 22(6):509—511

Abstract **Objective:** To study the effects of early constraint-induced movement therapy for the grade of behavior of focal cerebral infarction rats and expression of NGF in the peripheral around infarction. **Method:** Healthy male Sprague-Dawley rats, model with cerebral infarction was established according to Zea-Longa by blocking middle cerebral artery (MCA) with a nylon thread. Following middle cerebral artery occlusion (MCAO) with 1—3 grading according to Longa, the rats were randomly divided into two groups: constraint-induced movement therapy group (A group, 30) and non constraint-induced movement therapy group (B group, 30). Relieved fixation at 7th day. Then divided into 14th and 21st day execution at random. All rats were evaluated the behavior scores in the 7th day and before sacrificing and the samples were processed by immunohistochemistry to evaluate effects of NGF expression, hybridization in situ to evaluate effects of NGF mRNA expression. **Result:** Comparing with the control group (group B), constraint-induced movement therapy group (group A) can improve the behavior on the 14th day and 21st day ($P < 0.05$) and there was a significant up-regulation of the expression of NGF and NGF mRNA ($P < 0.05$) in the peripheral tissue around infarction on 14th day, but was not significant improved on 21st day ($P > 0.05$). **Conclusion:** Constraint-induced movement therapy may up-regulate of the expression of NGF in genetic transcription level to protect the infarction injury.

Author's address Dept. of General Rehabilitation, China Rehabilitation Research Center, Beijing, 100068

Key words focal cerebral infarction; constraint-induced movement therapy; rats; nerve growth factor

近年来针对脑卒中后遗症期患者的“强制性使用”运动疗法的效果逐渐得到肯定。但脑缺血损伤后早期“强制性使用”运动疗法研究很少, 其对肢体功能恢复有何影响及机制尚不十分清楚, 限制了“强制性使用”运动疗法的广泛使用。研究表明早期运动训练可增加神经生长因子的表达, 可能参与了脑缺血损伤后脑的可塑性变化过程且与功能恢复有关^[1]。本研究通过对行为学评分的观察及梗死周围神经生长因子(nerve growth factor, NGF)表达的影响, 探讨早期强制性使用单侧肢体对局灶性脑梗死大鼠的影

响及其机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠, 二级动物, 3—4 月龄, 体重 280—350g, 由首都医科大学动物研究中心提供。

1 中国康复研究中心综合康复科, 北京丰台南门外路 10 号, 100068

作者简介: 张晓钰, 女, 主治医师, 硕士

收稿日期: 2006-10-23

1.2 实验方法

采用稍加改良的 Zea-Longa 法, 将 SD 大鼠制备为大脑中动脉局灶缺血模型, 术中大鼠出现呼吸困难, 出血过多者弃之。术后 2h 动物清醒后用单盲法进行 5 分制评分。0 分及 4 分者弃去, 1—3 分大鼠入选。60 只大鼠采用随机化方法分为健侧前肢固定组 30 只, 未固定组 30 只。7d 时全部解除固定, 再用随机区组的方法分为 14d 处死组和 21d 处死组。固定组大鼠用 10% 的水合氯醛麻醉将固定的前肢置于自然屈曲位置, 用手术缝线将皮肤缝在一段 3cm 长的铁丝上(铁丝尾端与绕在胸部的铁环相连)共缝合 3—4 针, 然后用石膏缠绕固定该肢体部分限制其活动, 固定后仍饲养于原标准笼中, 自由饮水、进食, 手术后第 7d 去除固定。术后至处死前若有大鼠死亡, 则补以同批次相似体质量大鼠。

1.3 观察指标

1.3.1 神经功能缺损评分:在术后 7d、处死前大鼠前进行 Zea-Longa 5 分制评分法

1.3.2 神经营养因子:NGF 蛋白表达的测定用 SP 免疫组织化学染色及测定, 所有切片染色均采用相同条件, 每批染色均设阴性对照。阴性对照用 PBS 替代一抗孵育切片, 结果为阴性。结果判定阳性细胞的胞浆、胞膜、轴突着色呈棕黄色。NGFmRNA 表达的测定用 mRNA 原位杂交(POD)法, 所有切片染色均采用相同条件, 每批染色均设阴性对照。阴性对照用预杂交液代替寡核苷酸探针, 结果为阴性。结果判定阳性细胞的胞浆着色呈棕黄色。

1.3.3 图像分析:用 Leica DM LB2 显微镜/Pixera Penguin 150CL 数码相机/Viewfinder 3.0 图像采集系统采图, Simple PCI-8 图像分析软件对图像进行分析。每只动物取 3 张切片, 光镜下分析脑梗死周围皮质 5 个视野, 取平均灰度值进行统计学分析。该分析仪器的灰度级为 0—256 灰级, 平均灰度表示阳性细胞的反应强度, 平均灰度越高, 说明反应强度越低。

1.4 统计学分析

所有各组数据均采用均数±标准差表示, 对所得数据用 SPSS12.0 软件包进行数据分析, 组间计量资料比较采用单因素方差分析, 计数资料采用秩和检验。 $P<0.05$ 为有显著性意义。

2 结果

2.1 神经功能学评分

在解除固定后评分, 固定组(A 组)和非固定组(B 组)之间神经功能学评分无显著性意义 ($P>$

0.05)。14d 和 21d 时, 与非固定组相比, 固定组大鼠的神经功能缺损显著改善($P<0.05$)。见表 1。

2.2 脑组织 NGF 蛋白及 mRNA 的表达

2.2.1 NGF 蛋白的表达:术后 14d 时, 与非固定组相比, 固定组在梗死区周围 NGF 蛋白表达水平较高, 组间比较有显著性意义($P<0.05$), 术后 21d 时两组 NGF 蛋白表达比较无显著性意义(图 1, 见前置彩色插页 11)(表 2)。

2.2.2 NGFmRNA 的表达:与非固定组相比, 固定组在梗死区周围 NGFmRNA 表达水平在 14d 时较高, 组间比较有显著性意义 ($P<0.05$), 在 21d 时两组 NGFmRNA 表达比较无显著性意义 ($P>0.05$)(图 2, 见前置彩色插页 11)(表 2)。

表 1 固定组和非固定组神经功能缺损评分

组别	术后 7d	术后 14d	术后 21d
固定组	3.04±0.41	2.13±0.56 ^①	1.27±0.17 ^①
非固定组	2.97±0.76	2.67±0.23	1.93±0.24

①与非固定组比较: $P<0.05$

表 2 梗死区周围皮质两组 NGF 蛋白及 NGF mRNA 阳性表达灰度值比较 ($\bar{x}\pm s, n=30$)

组别	NGF 蛋白		NGF mRNA	
	14d	21d	14d	21d
固定组	132.76±11.04 ^①	164.88±13.46	80.33±14.02 ^①	136.14±11.68
非固定组	149.04±13.70	168.1±16.29	91.37±13.52	138.02±14.92

①与非固定组比较: $P<0.05$

3 讨论

强制性使用运动疗法是由美国 Alabama 大学神经科学研究人员通过动物实验而发展起来的治疗上神经元损伤的一种训练方法。其理论基础来自于习得性误用的形成及其矫正过程。基本概念是在生活环境中限制脑损伤患者使用健侧上肢, 强制性反复使用患侧上肢。临床研究证明脑卒中慢性期应用强制性使用运动疗法可促进功能的恢复^[2-3]。其在急性期的应用国内外对此研究较少, 且研究结果不尽一致。有研究表明^[4], 卒中后急性期适当的强制性运动, 可以促进肢体功能的恢复, 可能与促进梗死灶周围神经细胞黏附因子的表达, 对梗死灶周围脑组织可塑性变化有一定的影响。但亦有研究表明^[5], 早期“强制性使用”运动可能通过增高颅内局部温度而不利于神经细胞的恢复, 从而不利于神经功能的恢复。

近年来围绕缺血病理机制的研究, 发现了许多神经保护剂和神经营养因子, 有研究发现脑神经细胞的损伤程度与 NGF 的表达水平密切相关^[6-7]。研究发现 NGF 可以促进缺血后神经元的存活和生长发育并能够防止他们受损死亡, 改善神经元的病理状态, 促进受损神经元再生及分化成熟, 在中枢神经系统损伤修复中具有重要的作用。NGF 也具有促进

多巴胺神经元、运动神经元、前脑胆碱能神经元、丘脑和海马神经元等存活和营养作用。在发育脑和成熟脑功能和结构的可塑性变化中,也可能有重要的作用。

已有研究发现康复训练能诱导缺血周边区神经生长因子的表达^[8]。但早期强制性使用对脑缺血损伤后 NGF 及其 mRNA 表达的影响尚未见报道。本研究发现早期强制性使用运动疗法可以改善局灶性脑梗死大鼠 14d 和 21d 的行为学评分。本研究亦发现早期强制性使用运动疗法可以促进梗死周围 14d 时的 NGF 蛋白及 NGFmRNA 的表达。NGFmRNA 表达水平与 NGF 蛋白相一致,说明这种调节作用可能发生于转录水平。NGF 蛋白的提高可能为其疗法改善神经功能恢复的作用机制之一。NGF 广泛而持久的高表达可能与中枢神经系统可塑性变化及神经功能恢复有关。强制运动疗法使患者被动运动训练可能增强恢复过程中脑的可塑性变化并有益于功能的恢复,但其促进神经营养因子表达、增加脑可塑性变化的机制还需进一步的研究。本试验仅对早期强制性使用和 NGF 表达之间关系进行初步探讨。它们二者之间的诱导过程,以及是否有其他神经递质参与介导,还需进一步研究。

Debow 等^[9]研究表明,早期强制性使用运动疗法与康复训练相结合,可以更好的促进出血性脑卒中大鼠肢体功能的恢复,减少脑损伤体积,我们将对脑缺血大鼠做此方面的观察。

本实验为动物实验,尚不能完全代表人体内的情况,但为临床上应用早期强制性使用运动疗法提供了一定的基础研究资料。

参考文献

- [1] 贾子善,槐雅萍,何春年,等. 运动训练对局灶性脑梗死大鼠梗死灶周围皮质神经细胞黏附分子 mRNA 及胶质细胞源性神经营养因子 mRNA 表达的影响 [J]. 中国临床康复,2006,10(2):120—122.
- [2] Taub E, Uswatte G, King DK, et al. A placebo-controlled trial of constraint-induced movement therapy for upper extremity after stroke[J]. Stroke, 2006,37(4):1045—1049.
- [3] Taub E, Uswatte G, Morris DM. Improved motor recovery after stroke and massive cortical reorganization following Constraint-induced movement therapy [J]. Phys Med Rehabil Clin N Am, 2003,14(10):77—91.
- [4] 槐雅萍,贾子善,张立军,等. 早期强制性使用对局灶性脑梗死大鼠大脑皮质神经细胞黏附因子表达的影响[J]. 中国康复医学杂志,2005,20(1):12—14.
- [5] Debow SB, McKenna JE, Kolb B, et al. Immediate constraint-induced movement therapy causes local hyperthermia that exacerbates cerebral cortical injury in rats [J]. Can J Physiol Pharmacol, 2004,82(4):231—237.
- [6] Takeda A, Onodera H, Sugimoto A, et al. Coordinated expression of messenger RNAs for nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 in the rat hippocampus following transient forebrain ischemia [J]. Neuroscience, 1993,55 (1) :23—31.
- [7] Hsu CY, An G, Liu J S, et al. Expression of immediate early gene and growth factor mRNAs in a focal cerebral ischemia model in the rat [J]. Stroke, 1993, 24 (12) :178—181.
- [8] 秦颖,马丽媛,倪金霞,等. 康复训练对急性脑梗死大鼠行为学及神经生长因子及脑源性神经营养因子的影响 [J]. 中国临床康复,2006,10(24):85—87.
- [9] Debow SB, Davies ML, Clarke HL, et al. Constraint-induced movement therapy and rehabilitation exercises lessen motor deficits and volume of brain injury after striatal hemorrhagic stroke in rats[J]. Stroke, 2003,34(4):1021—1026.

向康复科医师推荐 ——《骨科临床检查图解》(第5版)

近年来,骨关节创伤患者日益增多,术后的康复越来越受到患者的重视,骨关节康复医师的需求也越来越多。体格检查和阅读 X 线片是骨关节康复医师的基本功。然而国内系统介绍骨科检查的书籍并不多。《骨科临床检查图解》就是一本以图解的形式专论骨科临床检查的专著。全书共 13 章,第一二章为骨科检查的一般原则和四肢周围神经的检查,其他 11 章分别介绍了颈、肩、肘、腕、手、胸腰椎、髋、膝、胫骨、踝、足的检查技术。每个章节一般首先介绍该部位常见骨科疾病的特点,然后采用图解与简单文字介绍相结合的方式,按骨科常用的望、触、动诊的顺序讲解体格检查,最后介绍常见的正常和异常 X 线片。以上 3 个部分前后呼应、编排新颖、逻辑性强。其突出的特点是图文并茂、系统讲解,易于读者理解、记忆和掌握各种骨科体格检查的要点及相应的临床意义。另外,本书对正常和异常 X 线片及图示的讲解,也有助于读者提高阅读 X 线片的能力。

该书由山东科学技术出版社最新出版,16 开,精装,310 页,定价 68 元,全国各新华书店及医药卫生书店销售。