

· 基础研究 ·

运动训练改善脑缺血大鼠梗死体积与神经行为能力的实验研究*

徐丽丽¹ 白玉龙¹ 胡永善¹ 吴毅^{1,4} 崔晓² 朱大年³

摘要 目的:观察运动训练能否促进大鼠局部脑缺血再灌注后的神经功能恢复,并且观察早期运动训练对脑缺血再灌注后梗死体积的影响,从而探讨其促进功能恢复的机制。**方法:**成年雄性 SD 大鼠 24 只,随机分成运动训练组、对照组和假手术组,每组 8 只。大脑中动脉闭塞(MCAO)法造模 24h 后,运动训练组给予跑台训练,每天 30min,连续训练 2 周,对照组及假手术组给予相同的抓取和固定。采用神经行为学评分评价造模情况及神经功能的恢复情况;甲苯胺蓝染色观察大鼠局部脑缺血再灌注后梗死体积的大小。**结果:**2 周后,运动训练组的神经行为学评分明显高于对照组($P<0.05$),并低于假手术组($P<0.05$);运动训练组的脑梗死体积明显小于对照组($P<0.05$)。**结论:**脑缺血再灌注后早期运动训练能够减小脑梗死体积,促进脑缺血大鼠神经功能的恢复。

关键词 脑缺血再灌注;运动训练;梗死体积

中图分类号:R743, R493 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2008)-02-0100-03

The effect of physical training on the infarct volume and neurological behavior after focal cerebral ischemia and reperfusion in rats/XU Lili,BAI Yulong,HU Yongshan,et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2008, 23(2): 100—102

Abstract Objective:To investigate whether physical training can improve neurological function and reduce the infarct volume after focal cerebral ischemia. **Method:**Twenty-four male adult Sprague-Dawley rats (2—3month old) were subjected to 60 mins right middle cerebral artery occlusion(MCAO). All rats were randomly assigned to one of the three groups: physical training group, control group and sham operation group. Physical training group underwent 30 mins treadmill training per day for 2 weeks 24h after MCAO procedure. **Result:**After two weeks, the neurological score in physical training group was higher than those underwent spontaneous recovery ($P<0.05$).The infarct volume in physical training group was smaller than the controls ($P<0.05$). **Conclusion:** Physical training can improve neurological function and reduce the infarct volume after focal cerebral ischemia and reperfusion.

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

Key words cerebral ischemia and reperfusion; physical training; infarct volume

脑卒中后早期的运动训练可以促进患者运动功能恢复,提高其生活自理能力,减轻家庭乃至整个社会的经济负担,这已通过大量的临床实践所证实^[1-2]。但运动训练促进脑缺血损伤后神经功能恢复的内在机制尚待研究。有研究证实,在大鼠脑缺血再灌注前预跑步可减轻脑水肿^[3],减小梗死体积,减轻缺血性脑损伤后的神经功能缺陷^[4];而脑缺血再灌注后的自主训练可以改善神经行为学缺陷而不能减小脑梗死体积^[5]。本研究试图观察大鼠脑缺血后早期运动训练对脑梗死体积及神经行为学的影响,探讨运动训练促进神经功能恢复的机制所在。

1 材料与方法

1.1 动物与分组

雄性成年 SD 大鼠(上海市中科院提供,清洁级),体重 220—250g,2.5 月龄,24 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:运动训练组(physical training,PT 组)、静止对照组(stroke-noexercise,SNE 组)、假手术组(sham 组)。每组 8 只。笼内饲养,给予充足的食物和饮水,每日 12h 光照,室温 $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ 。

1.2 大鼠大脑中动脉缺血/再灌注模型(MCAO/R)制备

采用 Longa^[6]线栓法阻塞大鼠右侧大脑中动脉

* 基金项目:复旦大学基础和临床交叉基金(校 200681);上海市长宁区卫生局科研基金资助项目(2004104001)

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

2 上海长宁区天山中医院

3 复旦大学上海医学院生理和病理生理实验室

4 通讯作者:吴毅(复旦大学附属华山医院康复医学科,200040)

作者简介:徐丽丽,女,硕士研究生

收稿日期:2007-10-08

造成缺血。大鼠经 10% 水合氯醛 (300mg/kg, i.p.) 麻醉后, 行颈部正中切口, 钝性分离右侧颈总动脉、右颈外动脉和右颈内动脉。结扎右颈外动脉分支枕动脉、甲状腺上动脉, 动脉夹暂时夹闭右颈内动脉分支翼腭动脉。结扎并剪断右颈外动脉远心端, 斜剪一切口, 将预先处理过的尼龙线的圆钝端沿切口插入近心端。将颈外动脉的近心端拉至与右颈内动脉成一直线, 沿右颈内动脉缓慢推进尼龙线, 直至尼龙线顶端感阻塞感, 约距右颈总动脉分叉 18—20mm 处。缺血 60min 后, 缓慢退出尼龙线, 缝合皮肤。在手术过程中, 大鼠肛温控制在 (37±0.5)℃。清醒后回笼, 自由进食。假手术组的手术步骤同缺血组, 只是尼龙线栓不入颅, 不阻塞大脑中动脉。

1.3 模型评价-神经功能缺失体征评分

MCAO 术后 24h 依照 Longa^[5] 的方法对大鼠进行神经行为学评分。使用 6 分法评价大鼠脑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: 大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。评分为 0—4 分的大鼠表明造模成功, 并将评分为 2—4 分的大鼠入组。干预 1 周及 2 周后分别对大鼠神经功能进行再次评定, 观察其神经运动功能的恢复情况。

1.4 处理方法

运动训练组: 跑台训练 (treadmill training) 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 10min。在大鼠缺血再灌注后 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, 术后第 2 天: 8m/min, 第 3 天及以后: 12m/min。

1.5 脑组织冰冻切片及脑缺血梗死程度测定

干预 2 周后, 各组大鼠脑组织采用灌注法固定。经蔗糖梯度脱水下沉后连续冠状冰冻切片 (2.0—4.0mm, Bregma 平面), 自视交叉出现开始, 至腹侧海马出现为止, 片厚 30μm, 置脑保护液, -20℃ 保存。

进行脑梗死体积测定时, 每 12 张 (即间隔 360μm) 取一张脑片, 1% 甲苯胺蓝染色以鉴定存活细胞。然后采用 Q500W 型图像分析仪得到鼠脑各 Bregma 平面的脑梗死面积后, 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:

$$V(\text{mm}^3) = 1/2 \times (S_1 + S_2 + S_3 + \dots + S_n) \times 0.36$$

为排除个体差异及脑水肿的影响, 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。

1.6 统计学分析

数据采用 SPSS11.5 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因素方差分析, 满足方差齐性要求的数据采用 LSD 法进行各组均数的两两比较, 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。计量资料符合正态性分布者以平均值±标准差表示, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义; 计数资料以中位数表示, 组间差异用 Kruskal-Wallis 分析比较, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义, 组内不同时间比较采用配对资料的非参数检验。

2 结果

2.1 脑梗死体积测定

染色后的脑冰冻切片经 Q500W 型图像分析仪和公式计算处理后得出相对梗死体积值。运动训练组、对照组和假手术组的相对梗死体积分别为: 13.40%±4.99%、29.16%±6.27% 和 0, 对照组的相对梗死体积最大。经单因素方差分析提示组间差异有显著性意义。LSD 检验提示运动训练组的梗死体积显著小于对照组 ($P < 0.05$)。

2.2 神经行为学评分

术后 24h 起, 运动训练组和对照组的神经行为学评分没有明显差异, 但两组的评分均显著小于假手术组。干预 1 周后, 运动训练组的神经行为学评分显著高于对照组 ($P < 0.05$), 这一作用持续到训练 2 周后。MCAO 术后静止对照组的神经功能也有一定的恢复, 但要到 2 周后才有明显提高 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 各组大鼠 MCAO 术后神经行为学评分 (中位数)

组别	动物数	24h	1 周	2 周
运动组	8	2 ^③	3.5 ^{①③④}	4 ^{①②③④}
对照组	8	2.5 ^③	3(2.83) ^③	3(3.33) ^{③④}
假手术组	8	5	5	5

①运动组与对照组比较 $P < 0.05$; ②组内与第 1 周的评分相比 $P < 0.05$; ③与假手术组比较 $P < 0.05$; ④与术后 24h 比较 $P < 0.05$ 。括号中为对照组神经行为学评分的均数。

3 讨论

早期运动训练在促进缺血性脑损伤后神经功能恢复中的作用已被大量的动物实验及临床实践所证实。运动训练不仅可以改善患侧肢体运动功能, 提高 ADL 能力及步行能力^[7], 还可以提高注意及学习能力^[8], 改善患者的认知功能^[9]。目前, 国内多采用转棒、滚筒、网屏、平衡木等作为实验动物脑缺血后运动训

练的方法,存在运动量控制不稳定、不能精确控制运动强度等缺点。本实验采用国际通用的跑台训练,对脑缺血后运动训练进行量化。在脑缺血再灌注前对所有大鼠进行适应性训练,每天 10min,训练强度为 12m/min;术后,采取循序渐进的运动训练方案,跑台速度由第 1 天的 5m/min 逐渐增加至 12m/min,使大鼠能够适应术后的运动训练。

Yang 等^[10]的实验发现,MCAO 术后 24h 早期开始进行运动训练对神经行为学的改善优于术后 1 周开始的训练。本实验结果也表明,与静止对照组相比,脑缺血再灌注后 24h 开始早期的运动训练可以明显减小脑梗死体积,神经行为学评分显著提高。早期运动训练对神经行为学的改善作用在训练后 1 周就很明显,与对照组相比差异有显著性意义 ($P < 0.05$),第 2 周训练时,缺血大鼠的神经功能继续改善,与第 1 周相比有显著性意义 ($P < 0.05$)。Marin R^[5]的研究则发现大鼠脑缺血后的自主训练也可以使神经行为缺陷有一定程度的恢复,但是脑梗死体积并无明显的缩小。本实验中,静止对照组也有一定的自发活动,2 周后相对梗死体积较大,为 $29.16\% \pm 6.27\%$;其神经行为学也有一定的改善,但这一变化较慢,直到术后 2 周对照组的神经行为学评分与术后 24h 相比才有比较明显的差别 ($P < 0.05$)。

大脑中动脉栓塞所致的缺血性脑损伤多会影响患侧的初级运动皮质,其邻近的运动皮质也会受损^[11]。Gertz^[12]的研究发现脑缺血后的运动训练可以增加脑血流量,促进长期的功能恢复;这可能是运动训练增加脑血流量,改善缺血周边半暗带血供状态,减轻水肿的作用,从而减轻了初级运动皮质及其邻近运动皮质的损伤。Ang ET^[13]的研究则表明,跑台训练可减小脑缺血后的梗死体积,可能与内源性神经营养因子增多有关。Ding^[14]发现包含平衡及协调能力的训练也能促进脑缺血损伤后神经功能的恢复。本实验观察到大鼠脑缺血再灌注早期进行运动训练可以明显的促进其神经功能恢复,减小梗死体积,验证了我们对于运动训练脑保护作用的设想。但是运动训练如何发挥其脑保护作用及其促进神经功能恢复的机制还需要进一步的探讨。

参考文献

- [1] 胡永善,朱玉连,杨培君,等.早期康复治疗对急性脑卒中患者运动功能的影响[J].中国康复医学杂志,2002,17(3):145—147.
- [2] 胡永善,朱玉连,杨培君,等.早期康复治疗对急性脑卒中患者日常生活能力的影响[J].中国康复医学杂志,2002,17(4):215—217.
- [3] Davis W, Mahale S, Carranza A, et al. Exercise pre-conditioning ameliorates blood-brain barrier dysfunction in stroke by enhancing basal lamina [J]. Neurological Research, 2007, 29(4):382—387.
- [4] Li J, Luan X, Clark JC, et al. Neuroprotection against transient cerebral ischemia by exercise pre-conditioning in rats. [J]. Neurological Research, 2004, 26(4):404—408.
- [5] Marin R, Williams A, Hale S, et al. The effect of voluntary exercise exposure on histological and neurobehavioral outcomes after ischemic brain injury in the rat[J]. Physiology & Behavior, 2003, 80(2-3):167—175.
- [6] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. Stroke, 1989, 20(1):84—91.
- [7] Langhammer B, Lindmark B, Stanghelle JK. Stroke patients and long-term training: is it worthwhile? A randomized comparison of two different training strategies after rehabilitation[J]. Clinical Rehabilitation, 2007, 21(6):495—510.
- [8] Ploughman M, Attwood Z, White N, et al. Endurance exercise facilitates relearning of forelimb motor skill after focal ischemia [J]. European Journal of Neuroscience, 2007 25 (11):3453—3460.
- [9] Pyoria O, Talvitie U, Nyrkko H, et al. The effect of two physiotherapy approaches on physical and cognitive functions and independent coping at home in stroke rehabilitation. A preliminary follow-up study [J]. Disability & Rehabilitation, 2007, 29 (6):503—511.
- [10] Yang YR, Wang RY, Wang PS. Early and late treadmill training after focal brain ischemia in rats [J]. Neuroscience Letters, 2003, 339(2):91—94.
- [11] Gharbawie OA, Kleim JA, Whishaw IQ, et al. Middle cerebral artery (MCA) stroke produces dysfunction in adjacent motor cortex as detected by intracortical microstimulation in rats[J]. Neuroscience, 2005, 130(3): 601—610.
- [12] Gertz K, Priller J, Kronenberg G, et al. Physical activity improves long-term stroke outcome via endothelial nitric oxide synthase-dependent augmentation of neovascularization and cerebral blood flow [J]. Circulation Research, 2006, 99(10):1132—1140.
- [13] 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.
- [14] Ding Y, Li J, Lai Q, et al. Motor balance and coordination training enhances functional outcome in rat with transient middle cerebral artery occlusion [J]. Neuroscience, 2004, 123 (3):667—674.