

# 运动训练对大鼠试验性脑出血后血肿周围组织细胞凋亡的影响

李红玲<sup>1</sup> 曹慧芳<sup>1</sup> 田苗<sup>2</sup> 张丽<sup>2</sup> 李春岩<sup>3</sup>

**摘要 目的:** 观察运动训练对血肿周围组织细胞凋亡的影响。**方法:** 120只SD大鼠被随机分为3组, 实验组(40只, 出血并运动)、对照组(40只, 出血不运动)和假手术组(40只, 无出血, 不运动), 前两组又分为术后24h, 7d, 14d, 21d, 28d, 5个时相点, 每个时相点3只用于TUNEL, 5只用于流式细胞仪检测。**结果:** TUNEL阳性细胞数在脑出血(ICH)24h时实验组和对照组无区别, 但与假手术组相比差异有非常显著性( $P < 0.01$ ), 凋亡于ICH术后7—14d一度下降, 21d后回升, 28d又下降, 但实验组表达明显低于对照组( $P < 0.05$ )。凋亡不仅存在于血肿周围组织和皮质, 海马区也可见明显凋亡现象。流式细胞分析: 不同时间细胞凋亡率的变化趋势与TUNEL阳性细胞数一致, 而且实验组凋亡率明显低于对照组, 差异有显著意义( $P < 0.05$ ), 但双参数分析较单参数灵敏性更高, 差异有非常显著意义( $P < 0.01$ )。**结论:** 运动训练可以通过抑制脑出血后血肿周围的神经细胞凋亡, 从而改善神经功能。

**关键词** 运动训练; 脑出血; 神经细胞凋亡; 流式细胞分析; 大鼠

中图分类号: R493, R743 文献标识码: A 文章编号: 1001-1242(2008)-02-0103-04

**The physical exercises effect on apoptosis of neuronal cells surrounding intracerebral hemorrhage in rats/LI Hongling, CAO Huifang, TIAN Miao, et al.//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2008, 23 (2): 103—106**

**Abstract Objective:** To investigate the effects of cage-running exercises on apoptosis of neuronal cells surrounding the hematoma in ICH rats. **Method:** A total of 120 male SD rats were randomly divided into three groups, trial group (ICH with EX n=40), control group (ICH with no EX n=40) and sham operated group (no ICH, no EX n=40). The rats brains were harvested at the 24th h, 7th d, 14th d, 21st d, 28th d after ICH. Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate-biotin in situ nick end-labeling (TUNEL) was used to detect deoxyribonucleic acid (DNA) fragmentation. Flow cytometry assay (FCA) was quantified for DNA. **Result:** ① TUNEL-positive cells appeared in the periphery of hematoma and hippocampus. The number of TUNEL-positive cells was nearly zero in the sham-operated group, and this number increased markedly in control group from the 14th d to 28th d after ICH, but it reduced in trial group at the same time. Even though, the number of TUNEL-positive cells in two groups once decreased from the 7th—14th d, but the number of TUNEL-positive cells in trial group was less than that in control group. There was a significant difference between two groups ( $P < 0.05$ ). ② The apoptotic regularity of flow cytometry assay was similar to that of TUNEL-positive cell. But the apoptotic rate of neuronal cells in Annexin V-P was more higher than that in PI. **Conclusion:** Exercises training (cage-running) can inhibit the number of apoptotic cells.

**Author's address** Dept. of Rehabilitation, The Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang, 050000

**Key words** exercises training; intracerebral hemorrhage; apoptosis of neuronal cells; flow cytometry assay; rats

运动改善缺血性脑卒中的功能障碍已有结论, 但有关运动对脑出血方面的研究很少, 国外有作者认为, 康复训练也有益于脑出血大鼠<sup>[1-2]</sup>。国内李红玲等<sup>[3]</sup>研究也显示跑笼运动训练可改善出血性脑损伤的功能障碍。但有关运动促进脑出血(intracerebral hemorrhage, ICH)模型后功能恢复的机制尚不清楚, 因此, 本研究旨在通过大鼠尾状核脑出血模型, 应用跑笼对大鼠进行运动训练, 观察不同时间点血肿周围组织细胞凋亡情况, 以判断运动对出血性脑损伤细胞凋亡的影响, 并进一步探讨运动

改善神经功能的机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物与分组

1 河北医科大学第二医院康复科, 石家庄市和平西路215号, 050000

2 河北医科大学二院研究生

3 通讯作者: 李春岩(河北医大二院神经内科, 050000)

作者简介: 李红玲, 女, 博士, 主任医师, 教授

收稿日期: 2007-9-11

实验动物用健康雄性 SD 大鼠 120 只, 体重 280—300g, 由河北医科大学基础医学院实验动物中心提供, 以标准饲料和纯净水喂养, 饲养环境为我院动物室多层层流架(石家庄), 恒温(20—25℃)。脑立体定位仪。随机分为两 3 组, 实验组(40 只)、对照组(40 只)、假手术组(40 只), 前两组又分为术后第 24h, 7d, 14d, 21d, 28d, 5 个时相点, 每个时相点 3 只用于 TUNEL 检测, 5 只用于流式细胞仪检测。

## 1.2 材料与试剂

脑立体定位仪(江湾 I 型 C); 数码相机(日本 NIKON COOLPIX950 型); OLYMPUS 光学显微镜(日本 NIKON 公司); 恒温干燥箱(北京市朝阳区来广营医疗器械厂); 石蜡切片机(德国 LEICA, RM2135); HH-42 快速恒温数显箱(常州国华电器); -20℃冰箱(日本 NOVUM); 麻醉药速眠新 II(长春军需大学兽医研究所生产); VII 型胶原酶(美国 Sigma 公司), 用生理盐水配制成 0.2U 胶原酶/ $\mu\text{l}$  的溶液。Epics-XL II 型流式细胞仪(flow cytometry assay, FCA, 美国 Beckman Coulter 公司); Annexin V-FITC 凋亡试剂盒(北京宝赛生物技术有限公司); TUNEL 试剂(美国 Sigma 公司); 其余试剂由河北医科大学四院肿瘤研究所提供。

## 1.3 动物模型建立与标本采集

参照 Rosenberg 方法<sup>[4]</sup>, 实验组采用 0.5U 胶原酶/ $2.5\mu\text{l}$  生理盐水诱导大鼠(尾状核位置)脑出血模型, 然后于术后第 24h 开始对其进行运动训练, 具体训练用具及方法参见文献[3]; 对照组操作方法同实验组, 即脑出血模型但不进行运动训练。假手术组, 操作方法同实验组, 但不注射胶原酶, 只注射同等剂量的生理盐水, 而且不进行运动训练。然后于不同时间点断头处死动物(各组 5 只), 取出大脑, 经脑表面穿刺点冠状切开标本, 剔除血肿, 取血肿周围厚约 2mm 的新鲜脑组织 0.5g, 放入备好的细胞培养液用于流式细胞仪检测。各组 3 只大鼠于不同时间点处死后, 取出大脑, 去除额极 2mm 前部脑组织, 经脑表面穿刺点冠状切开标本, 取穿刺点后约 4mm 的脑组织, 放入 4% 多聚甲醛液固定, 经脱水、透明、石蜡包埋, 用于 TUNEL 检测。

## 1.4 单细胞混悬液的制备

将脑组织放在 120 目不锈钢网上, 其下置一平皿, 用眼科剪刀将组织剪碎, 用眼科镊子轻搓组织块, 边搓边用生理盐水冲洗, 直至将组织搓完。然后将平皿中的混悬液用 300 目铜网过滤去除细胞团, 收集细胞悬液, 以 1000r/min 速度离心 4min。

## 1.5 检测细胞 DNA(凋亡)含量的单参数分析 PI 法

取  $1 \times 10^5$  0.1ml, 加入 10% 鸡红细胞作为内参标准, 与样品同步染色, 加入碘化丙啶(PI: 50mg/L, triton-x100 1.0%) 1ml, 在 4℃ 冰箱染色 30min, 以 500 目铜网过滤, 使样品成为合格的单细胞混悬液, 即可上机检测。

## 1.6 检测细胞膜成分变化的磷脂结合蛋白(Annexin V)联合 PI 法

调整待测细胞浓度为  $5 \times 10^5$  个/ml, 取 1ml 细胞, 1000r/min, 离心 5min, 弃上清液后, 再次离心(条件同上) 5min。取  $10\mu\text{l}$  Annexin V-FITC 溶液和  $5\mu\text{l}$  PI 到  $50\mu\text{l}$  细胞悬液中, 轻混匀, 4℃ 冰箱反应 30min。之后, 加入 Binding 缓冲液, 上机检测。流式细胞仪激发光源为 15mW 氩离子激光器, 激光波长为 488nm, 用 Muticycle AV 分析软件对 DNA 细胞周期拟合分析。检测前以 flow-check Fluorpheres( $10\mu\text{m}$ ) 荧光微球(REF 6605359. Beckman Coulter, Inc. Fullerton, CA 92835.) 作标准样品调整仪器 CV 值在 2% 以内。

## 1.7 TUNEL 检测

细胞凋亡采用 TUNEL 法。具体步骤按试剂盒说明书进行, 工作浓度 1:100。凋亡细胞以细胞核呈棕黄色着色为阳性细胞。随机选择 5 个视野, 然后算出每高倍(400 $\times$ ) 镜下阳性细胞数。

## 1.8 统计学分析

应用 State8.0 软件进行分析。数据以均数 $\pm$ 标准差表示, 各组均数的比较行单因素方差分析进行两两比较。

## 2 结果

### 2.1 细胞凋亡检测结果

本实验, TUNEL 阳性细胞数在 ICH 第 24h 时实验组和对照组无区别, 分别为  $88.0 \pm 15.7$  和  $91.0 \pm 16.9$ , 但与假手术组相比有非常显著性差异  $P < 0.01$ , 两组在 ICH 后第 7—14d 凋亡一度表达下降, 第 21d 后开始回升, 第 28d 后又出现下降趋势, 但实验组表达明显低于对照组, 第 14—28d 差异有显著性意义( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ , 见表 1)。凋亡不仅存在于血肿周围组织和皮质, 海马区也可见明显凋亡现象。

### 2.2 单参数分析 PI 法

ICH 后第 24h 实验组和对照组凋亡率(DNA 含量)表达一致, 均高于假手术组。第 7—14d 一度表现凋亡下降, 第 21d 回升, 第 28d 时又下降, 变化趋势与 TUNEL 阳性细胞数一致。而且实验组凋亡率(在 DNA 二倍体 G0/G1 期前可见亚 G1 峰)明显低于对照组, 差异有显著性意义( $P < 0.05$ , 见表 2)。

### 2.3 双参数分析 Annexin V-PI 法

ICH 后 24h 实验组和对照组凋亡率表达一致, 差异无显著性, 均高于假手术组。7—14d 一度表现凋亡下降, 21d 回升, 28d 时又下降, 变化趋势与单参

数 PI 法一致, 但凋亡率较 PI 更高, 实验组明显低于对照组, 差异有非常显著性意义 ( $P < 0.01$ , 表 3)。

表 1 运动训练在不同时间点对各组大鼠 TUNEL 阳性细胞表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	动物数	第 24h	第 7d	第 14d	第 21d	第 28d
实验组	15	78±5.38 <sup>③</sup>	39.0±2.55 <sup>③</sup>	11.0±1.58 <sup>②③</sup>	41.2±5.8 <sup>①③</sup>	13.6±4.67 <sup>①③</sup>
对照组	15	82±6.27 <sup>③</sup>	40.4±2.07 <sup>③</sup>	17.2±1.30 <sup>③</sup>	55.4±11.78 <sup>③</sup>	21.4±4.45 <sup>③</sup>
假手术组	15	2.50±2.38	2.20±1.48	2.43±1.35	3.03±1.10	3.78±1.45

与对照组比较: ① $P < 0.05$ , ② $P < 0.01$ ; 与假手术组比较: ③ $P < 0.01$

表 2 运动训练在不同时间点对各组大鼠细胞凋亡率的影响(单参数 PI) ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	动物数	第 24h	第 7d	第 14d	第 21d	第 28d
实验组	25	3.56±0.77 <sup>②</sup>	0.37±0.87 <sup>①</sup>	0.16±0.59 <sup>①</sup>	5.86±2.01 <sup>①②</sup>	3.12±0.76 <sup>①②</sup>
对照组	25	3.43±0.83 <sup>④</sup>	1.03±0.56 <sup>④</sup>	0.98±0.72 <sup>③</sup>	11.99±3.26 <sup>④</sup>	6.44±1.95 <sup>④</sup>
假手术组	25	0.88±0.96	0.45±0.75	0.44±0.76	0.48±0.85	0.38±1.45

①与对照组比较  $P < 0.05$ ; ②与假手术组比较  $P < 0.01$ ; 与假手术组比较: ③ $P < 0.05$ , ④ $P < 0.01$

表 3 运动训练在不同时间点对各组大鼠细胞凋亡率的影响(双参数 Annexin V-PI) ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	动物数	第 24h	第 7d	第 14d	第 21d	第 28d
实验组	25	19.64±0.68 <sup>②</sup>	10.31±0.96 <sup>①②</sup>	3.72±0.89 <sup>①</sup>	22.59±4.0 <sup>①②</sup>	12.6±0.85 <sup>①②</sup>
对照组	25	20.12±0.57 <sup>③</sup>	16.07±1.57 <sup>②</sup>	8.61±0.72 <sup>②</sup>	39.5±5.67 <sup>②</sup>	20.48±1.87 <sup>②</sup>
假手术组	25	3.79±0.86	2.48±0.83	3.44±0.76	4.34±0.87	2.78±1.45

①与对照组比较  $P < 0.05$ , ②与假手术组比较  $P < 0.01$

### 3 讨论

细胞凋亡是一个遗传性的程序化细胞死亡 (programmed cell death, PCD) 过程, 是细胞在基因调控下有序死亡的形式<sup>[5]</sup>。它与细胞坏死这种被动过程在形态特征和生化方面都有本质的区别。凋亡的形态特征包括细胞浆固缩、体积缩小、细胞皱缩, 以及细胞核致密等<sup>[6]</sup>。生化特征是凋亡细胞核内 DNA 被核酸内切酶降解为 180—220bp 整数倍大小的片段, 在琼脂糖凝胶电泳上可呈现 DNA 梯形带。

检测 DNA 裂点以检测凋亡的技术有两种<sup>[7-8]</sup>, 一种是原位缺口平移 (in situ nick translation, IN-ST) 技术, 即利用 DNA 多聚酶将标记的核苷酸整合到凋亡细胞内断裂的 DNA 处的 3' 末端; 另一种是末端脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记 (terminal deoxynucleotidyl transferase, TdT-mediated dUTP nick end labeling, TUNEL) 技术, 是利用 TdT 将核苷酸从 5' 末端整合到双链缺损或断裂的 DNA 链上, 以修复 DNA, 已标记的核苷酸可显示出修复的片段。

这两种技术可以检测早期的细胞凋亡, 特异性和敏感性都较高, 就其敏感性而言, TUNEL 鉴定高于 ISNT 鉴定, 尤其在细胞凋亡的早期。本研究应用 TUNEL 技术检测血肿周围组织细胞凋亡情况, 结果显示: 实验组和对照组 TUNEL 阳性细胞数明显高于假手术组, 说明 ICH 后有细胞凋亡发生。实验组在运动 21d 后出现 TUNEL 阳性细胞下调, 对照组虽也有下调趋势, 但两组相比, 实验组明显低于对照组, 差异有显著性意义 ( $P < 0.05$ ), 且持续到第 28d。

由此说明跑笼运动训练可以抑制神经细胞凋亡, 进而改善 ICH 后神经功能恢复。值得讨论的还有, 实验组和对照组在 ICH 后第 7—14d 有一度下调表现, 这可能与这段时间大鼠遭受 ICH 后所表现的体重减轻<sup>[3]</sup>, 体质下降, 反应能力下降有关。

目前在基础研究中, 凋亡的定量分析主要依靠 FCA。包括单参数和双参数分析。检测 DNA 含量的单参数分析 PI 法原理是<sup>[9]</sup>, 细胞经低渗缓冲液或乙醇、TritonX-100 处理后通透性增强, 胞膜上会出现小的漏洞, 由于细胞凋亡后 DNA 断裂, 在洗涤和染色过程中小片断 DNA 会从细胞内漏出, 使细胞 DNA 含量低于正常的二倍体含量。用碘化丙啶 (PI) 染色后分析, 会在二倍体峰前出现一个亚二倍体峰, 即 A 峰 (apoptosis peak), 可根据此峰的高低或面积计算凋亡细胞的百分率。此法快速、准确, 简单易行, 所需样本少, 可大批量定量检测凋亡标本。本研究应用 PI 法检测 DNA 含量, 结果与 TUNEL 阳性细胞计数有同样变化趋势, 说明定量与定性分析结果一致。

检测膜成分变化的磷脂结合蛋白 V (Annexin V) 联合 PI 的双参数法: 1992 年 Fabok 报道, 在凋亡早期位于细胞膜内侧的磷脂酰丝氨酸 (PS) 在凋亡时会迁移至细胞膜外侧<sup>[10]</sup>。1995 年 Vermes<sup>[11]</sup> 利用对 PS 有高度亲和力的磷脂结合蛋白 V 来检测细胞凋亡。由于坏死细胞 PS 亦暴露于外表, 使 Annexin V 结合阳性。因此单独使用 Annexin V 不能区分细胞坏死或凋亡。必须同时采用 PI 这一坏死细胞染色阳性的染料将坏死细胞区分出来。正常活细胞 Annexin V、PI 均低染, 凋亡细胞 Annexin V 高染, PI

低染,死亡细胞 Annexin V、PI 均高染。文献报道凋亡时膜上 PS 外露早于 DNA 断裂,因此该法检测早期凋亡较 TUNEL 更为灵敏。且该法不需固定细胞,避免了 TUNEL 因固定出现的 DNA 片段丢失,因此被认为是目前最为理想的凋亡定量检测方法。本研究应用 Annexin V-PI 法检测确实显示出比 TUNEL 法和 PI 法更敏感。TUNEL 于运动后第 21d 才表现出与对照组的区别,而 Annexin V-PI 在运动第 7d 时即表现出与对照组的显著性差异。而 PI 法相对 Annexin V-PI 法敏感性差,原因可能是在凋亡早期虽然有 DNA 裂点出现,但尚未出现 DNA 片断的大量丢失,因此 PI 法不能检测出早期凋亡;其次,发生于 S 期或 G2/M 期的凋亡的细胞即使有 DNA 片断丢失,也不低于二倍体细胞的 DNA 含量,所以 PI 检出的凋亡率低。

有关运动与凋亡的关系, Kim 等<sup>[12]</sup>将动物分为 3 组,轻度锻炼、中度锻炼和对照组。对照组大鼠放在踏车上 30min/d,不活动。训练前 1h 腹腔注射 BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridine), 共 7d。两组运动大鼠 BrdU 阳性细胞数较对照组明显增多,各组间 TUNEL 阳性细胞数表达很少,且差异无显著性意义。结果表明,踏车运动在不改变凋亡情况下,增加海马齿状回的细胞增殖。Sim 等采用双侧颈总动脉阻断 5min 制作一过性全脑梗死模型,然后让沙鼠在踏车上跑,30min/d,共 4 周。通过检测 TUNEL 阳性细胞,免疫组化 caspase 染色,减压抑制回避任务等。结果发现,4 周锻炼后可通过抑制海马区缺血引起的凋亡神经细胞死亡,改善短期记忆<sup>[13]</sup>有关运动对脑出血方面的研究很少,但有作者认为运动也有益于 ICH 大鼠,但作用机制尚不清楚。Lee 等<sup>[2]</sup>对胶原酶诱导的脑出血模型大鼠,ICH 后 24h 进行踏车运动,30min/d,共 10d。结果发现运动不仅可以抑制血肿体积扩大,增加齿状回细胞增值,还可抑制 caspase-3 的表达。caspase-3 在神经细胞凋亡中起重要作用,从而说明,运动可以抑制凋亡。本研究应用胶原酶诱导脑出血模型,对大鼠进行跑笼运动训练,通过组织学观察、TUNEL 定性和流式细胞定量检测凋亡情况,结果显示运动训练可降低凋亡细胞的表达,与 Lee 的结果一致。

#### 4 结论

运动训练可以通过抑制脑出血后血肿周围的神

经细胞凋亡,从而改善神经功能。流式细胞单参数和双参数表达结果趋势一致,但表达量有很大差异,说明双参数检测敏感性和特异性更好。

#### 参考文献

- [1] Lee HH, Shin MS, Kim YS, et al. Early treadmill exercise decreases intrastriatal hemorrhage-induced neuronal cell death and increases cell proliferation in the dentate gyrus of streptozotocin-induced hyperglycemic rats [J]. *J Diabetes Complications*, 2005, 19(6): 339-346.
- [2] Lee HH, Kim H, Lee MH, et al. Treadmill exercise decreases intrastriatal hemorrhage-induced neuronal cell death via suppression on caspase-3 expression in rats [J]. *Neurosci Lett*, 2003, 352(1): 33-36.
- [3] 李红玲,刘春辉,葛艳萍,等. 运动训练对脑出血大鼠神经功能恢复的影响 [J]. *中华物理医学与康复杂志*, 2006, 28 (10): 649-652.
- [4] Rosenberg GA, Mun-Bryce BS, Wesley M, et al. Collagenase-induced intracerebral hemorrhage in rats [J]. *Stroke*, 1990, 21(5): 801-807.
- [5] Savill J, Fadok V, Hensen P, et al. Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis [J]. *Immunol Today*, 1993, 14: 131.
- [6] Perer ME, Heuffider AE, Hengartner MO. Advances in apoptosis research [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 12736-12737.
- [7] Zychlinsky A, Fitting C, Cavailon JM, et al. Interleukin 1 is released by macrophages during apoptosis induced by shigella flexneri [J]. *J Clin Invest*, 1994, 94(3): 1328-1333.
- [8] Gold R, Schmied M, Rothe G, et al. Differentiation between cellular apoptosis and necrosis by combined use of in situ labelling and nick translation techniques [J]. *Lab Invest*, 1994, 71(1): 219-225.
- [9] 矫毓娟,刘江红. 细胞凋亡的检测方法 [J]. *中国神经免疫学和神经病学杂志*, 2004, 11(1): 53-56.
- [10] Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, et al. Exposure of phosphatidyl serine on the surface of apoptotic lymphocytes and surface phenotype of murine lymphocytes [J]. *J Immunol Methods*, 1995, 188: 219.
- [11] Vermes I, Haanen C, Steffen-Nakken H, et al. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidyl serine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V [J]. *J Immunol Methods*, 1995, 184(1): 39.
- [12] Kim SH, Kim HB, Jang MH, et al. Treadmill exercise increase cell proliferation without altering of apoptosis in dentate gyrus of Sprague-Dawley rats [J]. *Life Sci*, 2002, 71(11): 1331-1334.
- [13] Sim YJ, Kim H, Kim JY, et al. Long-term treadmill exercise overcomes ischemia-induced apoptotic neuronal cell death in gerbils [J]. *Physiol Behav*, 2005, 84(5): 733-738.