

·基础研究·

# 常规和强化运动训练对脑缺血再灌注大鼠海马齿状回区 nestin 表达的影响

陆 敏<sup>1</sup> 张苏明<sup>2,4</sup> 常立英<sup>3</sup> 王义辉<sup>2</sup> 朱 舟<sup>2</sup>

**摘要 目的:**探讨应用常规和强化运动训练对脑缺血再灌注大鼠海马齿状回区 Nestin 表达的影响。**方法:**54 只 Wistar 大鼠随机分为造模对照组(A 组)、常规运动训练组(B 组)和强化运动训练组(C 组),采用大鼠局灶性脑缺血再灌注模型,大脑中动脉阻塞 1h,再灌注 7d、14d 和 21d,应用免疫组织化学方法分别检测各组大鼠缺血侧和对侧海马齿状回区 nestin 的表达情况。**结果:**3 组大鼠均表现为第 7 天时的海马区阳性细胞最多,而且在各时间点的缺血侧海马 DG 区的 nestin 阳性细胞数均明显多于对侧 DG 区。第 7 天、第 14 天和第 21 天时,B 组和 C 组大鼠缺血侧海马区 nestin 阳性细胞数均较 A 组明显增多,差异有显著性( $P<0.01$ ),但 B 组和 C 组间大鼠缺血侧海马区 nestin 阳性细胞数无显著性差异。**结论:**脑缺血再灌注大鼠海马区 nestin 阳性细胞的增多存在时间规律及原位增殖特性,运动训练可显著增强 nestin 阳性表达的数量,但强化运动训练并不能增强此作用。

**关键词** 脑缺血再灌注;运动训练;巢蛋白

中图分类号:R743.3,R493 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2008)-11-0986-04

**Effects of conventional and intensive exercise training on the expression of nestin in the hippocampus dentate gyrus after cerebral ischemia-reperfusion/ LU Min, ZHANG Suming, CHANG Liying, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2008, 23(11): 986—989**

**Abstract Objective:**To explore the effect of conventional and intensive exercise training on the expression of nestin in the hippocampus dentate gyrus (DG) after cerebral ischemia-reperfusion. **Method:**Fifty-four Wistar rats were randomized into a control group (Group A), a conventional exercise training group (Group B), and an intensive exercise training group (Group C). The middle cerebral arteries (MCA) of rats were occluded for 1 hour, then reperfused for 7<sup>th</sup>, 14<sup>th</sup> and 21<sup>st</sup> days. Immunohistochemistry was used to detect the expression of nestin in the hippocampus dentate gyrus of rats. **Result:**There was the largest number of Nestin-positive cells in the DG in all groups on the 7<sup>th</sup> day after cerebral ischemia-reperfusion. Nestin-positive cells in ipsilateral DG were significantly more than those in the counter part at different time points. Significant increase of Nestin expression were detected in rats of Group B and C at different time points after cerebral ischemia-reperfusion, compared with Group A. We also found that there were no significant difference of Nestin-positive cells between Group B and Group C. **Conclusion:**The increase of Nestin-positive cells in the DG existed time-regularity and in situ proliferation characteristic after cerebral ischemia-reperfusion. Exercise training can significantly promote the expression of Nestin. But intensive exercise training can not enhance this function.

**Author's address** Dept. of Rehabilitation Medicine, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, 430030

**Key words** cerebral ischemia-reperfusion; exercise training; nestin

脑卒中后神经功能缺损的恢复与改善一直是神经康复学研究的热点之一,在一定时期内脑卒中的神经功能缺损可有不同程度的自行改善,目前认为残存脑组织的可塑性发挥了重要作用。近期研究表明,神经系统具有比以往人们想象的大得多的可塑性,这种可塑性不仅包含受损后神经系统内在的调整与代偿,而且还包含通过外在手段的干预恢复或重建受损的神经功能,运动训练就是其中一种非常重要的干预手段<sup>[1-2]</sup>。神经的再生在康复机制中的研究报道较少,由于巢蛋白(nestin)是目前作为识别神

经干细胞的重要标志蛋白,本实验通过观察常规和强化运动训练对成年脑缺血再灌注大鼠海马齿状回区 nestin 表达的影响,以探讨运动训练的神经发生机制和运动训练的强度变化对神经发生的影响,为脑卒中治疗提供一种新的思路。

1 华中科技大学同济医学院附属同济医院康复医学科, 武汉, 430030

2 华中科技大学同济医学院附属同济医院神经内科

3 襄樊市中心医院神经内科

4 通讯作者

作者简介: 陆敏,女,博士,副教授

收稿日期:2007-11-14

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物与分组

成年雄性 Wistar 大鼠 54 只,由华中科技大学同济医学院动物试验中心提供,体重 200—250g,随机分为造模对照组(A 组)、常规运动训练组(B 组)和强化运动训练组(C 组),每组各 18 只。各组大鼠在组内又随机分为 7、14 和 21d 3 个小组,每小组 6 只,分别于术后第 7 天、第 14 天和第 21 天取材。A 组造模后不做任何处理,B 组和 C 组大鼠均从造模 24h 后开始接受运动训练,3 组大鼠饲养条件相同。

### 1.2 脑缺血再灌注实验动物模型制作

参照 Longa 线栓法<sup>[3]</sup>制作大脑中动脉梗阻(middle cerebral artery occlusion,MCAO)再灌注实验动物模型,大鼠用 6% 水合氯醛(0.5ml/100g)行腹腔注射麻醉,仰卧位固定,常规备皮消毒,取颈正中切口,游离右侧颈总动脉(CCA)、颈内动脉(ICA)、颈外动脉(ECA),结扎 ECA、CCA 近心端,血管夹夹闭 ICA 远端,在 CCA 的分叉处下方剪一小口,插入直径为 0.23mm、末端涂以硅酮的尼龙鱼线,顺 ICA 走行轻轻推进尼龙线,直到遇到轻微阻力为止,由分叉处计算平均插入深度约 18.0±0.5mm,以阻断右大脑中动脉入口,造成右侧大脑中动脉供血区的缺血;1h 后拔出线栓恢复再灌注,并缝扎切口。模型成功的标志是动物苏醒后左侧前肢屈曲、行走左转或左侧跌倒,不合格的动物剔除。

### 1.3 运动训练

B 组和 C 组运动训练项目相同,包括平衡木上行走训练、转棒上转动训练及网屏抓握训练,B 组每日上午训练 1 次,训练时间为 1h,C 组前 3 日的训练强度与 B 组相同,但从造模后第 4d 开始每日训练次数增加为 2 次,上午和下午各 1 次,每次训练时间仍为 1h。

**1.3.1 平衡木上行走训练:**采用长 170cm、宽 2cm 的方木棒,置于距地面 50cm 处,用食物诱导大鼠在方木棒上行走,下方置海绵垫保护,训练其平衡能力。

**1.3.2 转棒上转动训练:**将大鼠置于长 150cm、直径 4.5cm、距离地面 50cm 高的圆木棒上,圆木棒中点固定在 5r/min 的转动器上,棒下方置海绵垫保护,训练大鼠的抓握和动态平衡能力;

**1.3.3 网屏训练:**网屏为 50cm×40cm 网带,网眼为 1cm×1cm,网屏距地面高度为 80cm,下方铺海绵垫保护,先将网屏水平放置,将老鼠放在其上,再缓缓将网屏竖直,然后在网屏竖直位状态下用手转动网屏,训练大鼠的抓握能力。

### 1.4 取材切片

造模后第 7 天、第 14 天和第 21 天分别将各组大鼠用生理盐水 150ml 心脏灌注,然后用 4% 多聚甲醛 200ml 心脏灌注固定,30min 后断头取脑。根据大鼠脑图谱在距前囟 4mm 处(相当于大鼠海马区)冠状切取 2mm 厚包含左右半球的组织块,浸泡于 4% 多聚甲醛溶液中固定,24h 内进行常规脱水、石蜡包埋。切厚 5μm 薄片。

### 1.5 nestin 免疫组化染色

切片常规脱蜡至水后,加入 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 室温下孵育 20min 以灭活内源性过氧化物酶,然后放入 0.01mol/L 柠檬酸盐缓冲液中行微波抗原修复,滴加 5% 牛血清白蛋白封闭液,室温下放置 20min,甩去多余液体,不洗,滴加小鼠抗大鼠巢蛋白抗体(1:400, Chemicon 公司),4℃ 下过夜,滴加生物素化山羊抗小鼠 IgG(1:150, 北京中山公司),37℃ 孵育 30min, 滴加辣根酶标记酶联卵白素工作液(1:150, 北京中山公司),37℃ 孵育 30min, 二氨基联苯胺显色,双蒸水多次洗涤,苏木素轻度复染,脱水,透明,中性树胶封片。以上各步间除特殊说明外,均用磷酸盐缓冲液振洗 5min×3 次。

### 1.6 图像分析

切片置于 Olympus 显微镜下观察脑梗死同侧和对侧海马齿状回区,以胞浆内呈黄色或棕黄色为 nestin 阳性细胞。每只大鼠取 3 张非连续切片,在相同的光亮程度下,每部位各随机在高倍镜下(×400)取 3 个非重叠视野进行计数,以此得到脑梗死同侧和对侧海马齿状回区的 nestin 阳性细胞的平均数。采用 Olympus Micro Image4.0 图像处理系统进行图像分析。

### 1.7 统计学分析

采用 SPSS 10.0 统计软件对数据进行统计分析和处理,实验数据以均数±标准差表示,组间比较采取单因素方差分析,组内两样本均数比较采用配对 t 检验,P<0.05 为差异有显著性意义。

## 2 结果

各组大鼠局灶性脑缺血后第 7 天、第 14 天和第 21 天时缺血侧和对侧海马 DG 区 nestin 阳性细胞数结果见表 1。3 组大鼠 nestin 阳性细胞的时间分布规律相同,都表现为局灶性脑缺血后第 7 天海马区阳性细胞最多,缺血后第 14 天和第 21 天阳性细胞逐渐减少,分布稀疏,而且 3 组大鼠在各时间点的缺血侧海马 DG 区的 nestin 阳性细胞数均明显多于对侧 DG 区。局灶性脑缺血后第 7 天、第 14 天和第 21

**表 1 各组大鼠局灶性脑缺血后不同时间点海马 nestin 阳性细胞数 ( $\bar{x} \pm s$ , 个/400 倍视野)**

组别/时间	缺血侧 DG 区	对侧 DG 区
<b>造模对照组(A 组)</b>		
第 7 天	18.54±2.42	8.09±1.33 <sup>③</sup>
第 14 天	11.28±2.73	5.63±2.08 <sup>③</sup>
第 21 天	5.36±2.55	2.86±1.77 <sup>③</sup>
<b>常规运动训练组(B 组)</b>		
第 7 天	24.72±3.94 <sup>①</sup>	9.10±1.02 <sup>③</sup>
第 14 天	18.78±2.37 <sup>②</sup>	6.26±1.23 <sup>③</sup>
第 21 天	12.52±3.06 <sup>②</sup>	3.17±1.44 <sup>③</sup>
<b>强化运动训练组(C 组)</b>		
第 7 天	25.17±2.09 <sup>①</sup>	9.17±1.06 <sup>③</sup>
第 14 天	18.16±2.80 <sup>②</sup>	5.78±1.39 <sup>③</sup>
第 21 天	12.73±2.53 <sup>②</sup>	3.34±1.23 <sup>③</sup>

与 A 组缺血侧比较:① $P<0.05$ , ② $P<0.01$ ; 与同组缺血侧比较:③ $P<0.01$ 。  
天,B 组和 C 组大鼠缺血侧海马区 nestin 阳性细胞较 A 组明显增多,有显著性差异,但 B 组和 C 组间差异无显著性意义。

### 3 讨论

运动训练是临床较为常用的脑梗死康复治疗手段,虽有研究表明它们可通过多种途径干预脑缺血过程,包括对神经营养因子、神经元、神经胶质细胞的影响以及抑制神经细胞凋亡等方面<sup>[4-5]</sup>,但着眼于对脑缺血后内源性神经干细胞影响的研究较少,而且目前尚未见到探讨不同强度的运动训练对其影响的实验研究报道。

神经组织是高度分化的组织,长期的传统观念认为成年哺乳动物中枢神经组织不再具有再生的能力。但近年研究证实,成年哺乳动物包括人的中枢神经系统中均存在神经干细胞(neural stem cell, NSC),主要位于海马齿状回(dentate gyrus,DG)和侧脑室室下区(the subventricular zone, SVZ),只是绝大多数处于静止状态<sup>[6-7]</sup>。神经干细胞具有无限的增殖分裂能力,自体神经干细胞在缺血、损伤等病理条件下可以增殖、迁移及分化,部分增殖细胞分化为神经元,参与神经网络的重建,显示出在中枢神经系统损伤后自我修复的潜在作用,其中缺血已被证明是促使神经干细胞内源性增殖的强烈诱导因素<sup>[8]</sup>,这也为脑梗死后神经组织结构修复及功能康复带来了新的希望。巢蛋白属于类中间丝,其功能可能与维持原始细胞特殊的形态、参与细胞迁移等有关,巢蛋白在干细胞增殖旺盛阶段出现并大量表达的现象,提示其在干细胞自我更新并保持多潜能增加细胞抗损伤的能力具有其他中间纤维无法取代的作用,nestin 阳性细胞具有干细胞特征,由成年大鼠中枢神经系统中分离出的 nestin 阳性细胞在体外培养中呈集落性生长,并分化出神经元与胶质细胞的前体细胞,因此巢蛋白目前已成为识别神经干细胞的重要标志蛋

白<sup>[9]</sup>。

本实验结果显示,局灶性脑缺血损伤后,两侧海马 DG 区的 nestin 阳性细胞数在梗死后第 7 天最多,第 14 天时有所下降,第 21 天时数目最少,而且 3 组大鼠在各时间点的缺血侧海马 DG 区的 nestin 阳性细胞数均多于对侧 DG 区,此结果与其他实验研究结果相似<sup>[10]</sup>,表明神经干细胞的增殖可在缺血后较短时间内发生,而且很快达到增殖高峰,这也提示,给予适应的可能促进其进一步增殖、迁移和分化的干预手段时,干预的介入时间显得极为重要,若能在其达到增殖高峰前给予干预,可能促进神经损伤修复的意义和作用更大。

缺血侧海马 DG 区的 nestin 阳性细胞数均多于对侧 DG 区,提示出局灶性缺血性脑损伤可以刺激神经干细胞原位增殖,其可能的机制是脑梗死后局部存在可以促进神经干细胞原位增殖的信号物质或存在诱导神经干细胞迁移、趋向的因子,并且损伤侧局部的病理生理环境适宜新生细胞的生长增殖。Nakatomi<sup>[11]</sup>认为脑损伤可以引起一些神经生长因子释放增加从而激发神经干细胞原位增殖,当然,这些增殖的神经干细胞的发展方向、增殖分化机制以及在脑梗死中的作用还有待于进一步深入研究。

运动训练组在脑梗死后第 7 天、第 14 天和第 21 天各时间点海马区神经干细胞数量均高于相同时间点的局灶性脑缺血损伤后未接受治疗组(对照组),说明局灶性脑缺血损伤后,运动训练可以提高内源性神经干细胞增殖水平,其中的机制还不十分清楚。有研究表明运动训练可以使损伤局部的神经营养因子水平增高<sup>[12]</sup>,而神经营养因子水平的增高则可促进内源性神经干细胞的增殖。另有报道<sup>[13]</sup>运动训练可以改变海马 NMDA 受体通道特性,使兴奋性谷氨酸通过 NMDA 受体使细胞去极化,引起细胞内与增殖有关的基因转录和蛋白表达增强,最终导致细胞增殖水平上调。

康复训练的强度问题也日益受到关注,已有大量临床研究证明高强度的康复治疗可改善脑卒中患者的功能预后<sup>[14-15]</sup>,而且不同强度的康复训练对脑缺血后相关区域神经胶质细胞影响的研究已见报道,研究结果表明强化训练组大鼠在造模后 14d 时行为学评分以及缺血海马区和梗死灶周围的 GFAP 表达的免疫活性明显高于常规康复训练组<sup>[16]</sup>,但也有学者得到了相反的结论<sup>[17]</sup>,本实验结果表明常规和强化运动训练组间对海马 DG 区的 nestin 阳性细胞数的影响无明显差异,即强化运动训练并不能增强缺血后 nestin 阳性细胞的增殖,但因本研究仅以

增加训练次数的方式作为强化运动训练的方法,而未涉及到运动训练内容、训练量、训练时间等方面的变化,因此今后还应在这些方面进行更深研究。

## 参考文献

- [1] Briones TL, Suh E, Josza 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.
- [2] 谭来勋,孙圣刚,张双国,等.脑梗死大鼠运动训练后星形胶质细胞与突触和运动功能的变化[J].中华物理医学与康复杂志,2005,27(10):581—584.
- [3] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniotomy in rats [J]. *Stroke*, 1989,20:84—91.
- [4] 张松涛,李玲,邱建勇,等.康复训练对大鼠脑梗死灶周围BDNF表达的影响[J].中国康复理论与实践,2003,9(3):130—141.
- [5] Teresita, LB, Julie W, Magdalena W, et al. Astrocytic changes in the hippocampus and functional recovery after cerebral ischemia are facilitated by rehabilitation training [J]. *Behavioral Brain Research*, 2006,171:17—25.
- [6] Gage FH. Mammalian neural stem cells [J]. *Science*, 2000, 287 (5457):1433—1438.
- [7] Rossella G, Angela G, Luca B, et al. Neural stem cells [J]. *Circ Res*, 2003, 92(6):598—608.
- [8] Goulsd E, Gross CG. Neurogenesis in adult mammals: some progress and problems[J]. *J Neurosci*, 2002, 22(3): 619—623.
- [9] Yagita Y, Kitagawa K, Sasaki T, et al. Differential expression of Musashil and nestin in the adult rat hippocampus after ischemia[J]. *J Neurosci Res*, 2002, 69(6): 750—756.
- [10] 周晓琳,赵永波,段淑荣,等.脑梗死后康复训练对成年大鼠海马结构中神经干细胞的影响[J].神经疾病与精神卫生,2004,4(6):430—434.
- [11] Nakatomi H, Okabe S, Yamaoto S, et al. Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors[J]. *Cell*, 2002,110 (4): 429—441.
- [12] 唐强,秦颖,倪金霞,等.脑梗死大鼠康复训练后脑功能恢复及免疫组织化学改变[J].中国康复理论与实践,2003,9(3):136—138.
- [13] 余茜,李晓红,刘羲,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] Sonoda S, Saitoh E, Nagai S, et al. Full-time integrated treatment program, a new system for stroke rehabilitation with conventional rehabilitation [J]. *Am J Phys Med Rehabil*, 2004,83(2):88—93.
- [15] Meinzer M, Elbert T, Wienbruch C, et al. Intensive language training enhances brain plasticity in chronic aphasia [J]. *BMC Biol*, 2004, 25(2): 20.
- [16] 陆敏,张苏明,常立英,等.不同强度康复训练对脑缺血再灌注大鼠运动功能和胶质酸性蛋白表达的影响[J].中华物理医学与康复杂志,2007,29(2):76—79.
- [17] Rodgers H, Mackintosh J, Price C, et al. Does an early increased intensity interdisciplinary upper limb therapy programme following acute stroke improve outcome [J]? *Clin Rehabil*, 2003, 17(6): 579—589.

(上接 982 页)

- in physiological and metabolic variables in male Wistar rats[J]. *Mech Aging Dev*, 2000,113:23—35.
- [2] 晁诗兴,胡亚哲,王和平,等.不同负荷游泳运动对大鼠肾脏滤过屏障形态结构和功能影响的研究 [J]. 体育科学,2007,27(2): 42—45.
- [3] 刘丽萍,柴戬臣,赵丽瑞,等.游泳训练对大白鼠肾组织自由基代谢及肾脏超微结构的影响[J].体育科学,1997,17(3):68—69.
- [4] 邓玉强,金其贵,律海涛.有氧运动和大豆多肽对高脂饮食大鼠脂肪肝形成的干预作用研究 [J]. 中国体育科技,2008,44(3): 115—119.
- [5] 金其贵,张美玲,潘艳娟,等.有氧运动和大豆多肽对高脂饮食大鼠胰岛素抵抗形成和血脂代谢的干预作用[J].北京体育大学学报,2008,31(1):40—43.
- [6] 郑陆,隋波,潘力平,等.过度训练动物模型的建立[J].中国运动医学杂志,2000,19 (2): 179—181.
- [7] Lowry L, Forsythe CE. Protein and overtraining: potential applications for free-living athletes [J]. *J Int Soc Sports Nutr*, 2006,3(1):42—50.
- [8] 王启荣,杨则宜.长时间运动导致低血睾酮的可能机制及其干预手段[J].西安体育学院学报,2005 ,22(1):78—80.
- [9] Maestu J, Jurimae J, Jurimae T. Hormonal response to maximal rowing before and after heavy increase in training volume in highly trained male rowers [J]. *J Sports Med Phys Fitn*, 2005,45(1):121—126.
- [10] 王启荣,周丽丽,李世成,等.耐力训练和益气补肾中药对睾酮合成的调节因素-StAR蛋白和P450ccc酶mRNA表达的影响 [J].中国运动医学学杂志,2005,24(2):137—142.
- [11] 衣雪洁,常波,张庆荣.运动性低血睾酮发生机理的研究[J].北京体育大学学报,2006,29(4):477—480.
- [12] 严翊,谢敏豪.运动对睾酮及其代谢影响的研究现状[J].中国运动医学杂志,2007,26(6):773—776.
- [13] Rajala UM, Keinänen-Kiukaanniemi SM, Hirss PK, et al. Associations of total testosterone and sex hormone-binding globulin levels with insulin sensitivity in middle-aged finnish men[J]. *Diabetes Care*, 2007 ,30:13.
- [14] 冯连世,李开刚.运动员机能评定常用生理生化指标测试方法及应用[M].北京:人民体育出版社,2002,25—41.
- [15] 黄力平,宋光耀,许豪文,等.持续不同时间的游泳运动对饮食性高脂症大鼠肝肾超微结构的影响[J].中国物理医学与康复杂志,2001,23(6):337—339.
- [16] Brown DA, Lynch JM, Armstrong CJ, et al. Susceptibility of the heart to ischaemia-reperfusion injury and exercise-induced cardioprotection are sex-dependent in the rat [J]. *J Physiol*, 2005,564:619—630.
- [17] Tang FC. Influence of branched -chain amino acid supplementation on urinary protein metabolite concentrations after swimming [J]. *Journal of the American College of Nutrition*, 2006,25(3):188—194.
- [18] Lund U, Rippe A, Venturoli D, et al. Glomerular filtration rate dependence of sieving of albumin and some neutral proteins in rat kidneys [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2003, 284: 1226—34.
- [19] 许豪文.运动生物化学[M].北京:高等教育出版社,2001.346—347.
- [20] French JP, Quindry JC, Falk DJ, et al. Ischemia-reperfusion-induced calpain activation and SERCA2a degradation are attenuated by exercise training and calpain inhibition [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006, 290: 128—136.
- [21] Cheng A, Caffrey M. Free radical mediated x-ray damage of model membranes[J]. *Biophys J*, 1996,70:2212—2222.
- [22] Xu KY, Zweier JL, Becker LC. Oxygen-free radicals directly attack the ATP binding site of the cardiac Na<sup>+</sup>,K<sup>(+)</sup>-ATPase. *Ann*[J]. *N Y Acad Sci*, 1997, 834: 680.
- [23] 王启荣,李肃反,杨则宜,等.补充大豆多肽对中长跑运动员训练期生化指标的影响[J].中国运动医学杂志,2004,23(1):33—37.
- [24] 彭莉,王启荣,毕秋芸.补充大豆多肽对运动性骨骼肌损伤影响的实验研究[J].体育科学,2006,26(12):36—44.