

跑台训练对大鼠脑缺血再灌注后脑组织基质金属蛋白酶-2和血管内皮生长因子表达的影响*

马跃文¹ 强 琳¹

摘要

目的:探讨跑台训练对大鼠脑缺血再灌注神经功能恢复和缺血脑组织中MMP-2和VEGF表达的影响。

方法:用线栓法制作Wistar大鼠大脑中动脉梗死再灌注模型,35只大鼠随机分为假手术组、跑台训练组和手术对照组。跑台训练和手术对照组又分为跑3天、跑7天、跑14天3个亚组,各亚组及假手术组每组5只大鼠。跑台组于术后第3天开始给予跑台训练,假手术组及手术对照组不予跑台训练。于跑3天、跑7天、跑14天3个时间点进行神经功能评估后处死大鼠。采用RT-PCR技术测定缺血区脑组织中MMP-2及VEGF的水平。

结果:跑台训练组在跑7天、跑14天神神经功能评分明显低于对照组($P < 0.05$)。跑台训练组缺血区脑组织在跑7天、跑14天MMP-2水平高于对照组($P < 0.05$),各时间点VEGF水平均高于对照组($P < 0.05$)。

结论:跑台训练能通过上调MMP-2及VEGF的表达,促进血管形成和神经再生等,有利于脑损伤后神经功能的恢复。

关键词 脑缺血;跑台训练;基质金属蛋白酶-2;血管内皮生长因子

中图分类号:R743.3,R493 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2012)-06-0519-05

Effects of treadmill training on matrix metalloproteinases-2 and vascular endothelial growth factor in ischemic brain of rats after cerebral ischemia-reperfusion/ MA Yuewen, QIANG Lin//*Chinese Journal of Rehabilitation Medicine*, 2012, 27(6): 519—523

Abstract

Objective: To study the effects of treadmill training on the recovery of neurological function and the expression of MMP-2 and VEGF in ischemic brain of rats after cerebral ischemia-reperfusion.

Method: A total of thirty-five male adult Wistar rats were given cerebral ischemia-reperfusion and were randomly divided into sham-operated group, control group and exercise group, with treadmill running. Neurological function was measured at the 24h after the operation, the 3rd, the 7th and the 14th day after the beginning of exercise respectively. RT-PCR was used to detect the expression of MMP-2 and VEGF in the ischemic brain at the 3rd, 7th and 14th day.

Result: Compared with those in the control group, the behavior scores in exercise group was much lower at the 7th and 14th day ($P < 0.05$). MMP-2 expression in exercises group was higher than in the control group at the 7th and 14th day ($P < 0.05$). The expression of VEGF in the exercise group was greater than that in the control group at all points ($P < 0.05$).

Conclusion: The expression of MMP-2 and VEGF in the brain ischemic area can be improved through treadmill training. It can promote recovery of neurological function by developing neurogenesis and promoting vascularization after cerebral infarction.

Author's address Department of Rehabilitation Medicine, The First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang, 110001

Key word cerebral ischemia; exercise; matrix metalloproteinases-2; vascular endothelial growth factor

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2012.06.008

*基金项目:2010年辽宁省教育厅科研项目计划(L2010646);2010年辽宁省高等学校科学技术计划项目(2010225034)

1 中国医科大学附属第一医院康复医学科,沈阳,110001

作者简介:马跃文,女,主任医师,教授;收稿日期:2011-06-10

缺血性脑血管病是当今社会最常见的疾病之一,减少其发病率、死亡率和致残率是基础医学和临床医学的一个重要研究课题。临床调查显示,康复治疗可以改善急性缺血性脑血管病患者的运动功能,降低其神经功能缺损积分^[1],降低致残率。运动训练是脑梗死后康复治疗方法中的重要手段,但其确切机制尚不明确。研究证明脑卒中的恢复与神经重塑及神经血管发生密切相关。本研究通过大脑中动脉缺血再灌注模型,观察运动功能训练能否对基质金属蛋白酶-2(matrix metalloproteinases-2, MMP-2)及血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)表达产生影响,从而探讨其部分机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

健康雄性 Wistar 大鼠 35 只,体重 250—350g,清洁级,由中国医科大学实验动物部提供,笼内饲养,予充足的食物和饮水,室温(23±2)℃。随机将大鼠分为假手术组 5 只,跑台训练组和手术对照组各 15 只。跑台训练组和手术对照组又根据观察时间点不同分为跑 3 天、跑 7 天、跑 14 天 3 个亚组,每个亚组 5 只大鼠。

1.2 动物模型制备

采用改良的 Longa EZ 线栓法^[2]制备大脑中动脉梗死(middle cerebral artery occlusion, MCAO)后再灌注模型。大鼠经 10%水合氯醛(350mg/kg)腹腔麻醉后,仰卧绑定,颈前部正中切口,分离出右侧颈总动脉、颈内动脉和颈外动脉,结扎颈外动脉远心端、颈总动脉近心端,用微动脉夹夹闭颈内动脉的远心端。在颈总动脉靠近分叉处剪一小口,将预先处理过的鱼线(线身直径 0.265mm,线头直径 0.34±0.02mm)的圆钝端沿切口插入颈内动脉,结扎颈总动脉的插线处,然后撤掉动脉夹,将鱼线缓缓送入,直至大脑中动脉,鱼线插入深度平均为 18—20mm,以阻断该侧大脑中动脉的血流,最后缝合颈部切口。此时大鼠左眼虹膜颜色变浅,缺血 2h 后拔出鱼线,实行再灌注。动物苏醒出现右侧 Horner 综合征,右侧眼裂变小,瞳孔缩小,出现左侧偏瘫,以左上肢为明显,提尾悬拉出现左上肢蜷缩屈曲或被动性过度

伸展,同时出现向左侧转圈,跌倒。假手术对照组处理措施参照手术组,但线栓不入颅。模型建立后 3 天内给予庆大霉素 2 万 U 腹腔注射。

1.3 电动跑台运动训练

跑台(treadmill training)采用改良后人用跑步机作为电动跑台。各组大鼠在手术前均经过适应性跑步训练 3d,30min/d。在大鼠缺血再灌注后第 3 天,运动组予以跑台训练,30min/d,每周 5d。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。手术对照组每天进行和运动组同样的抓取,但不予跑台训练。

1.4 神经行为学评分

MCAO 术后 24h 依照 Longa 等^[3]的方法对大鼠进行神经行为学评分。Longa 评分分为 6 个等级:0 分:正常,无神经功能缺损;1 分:左侧前爪不能完全伸展,轻度神经功能缺损;2 分:行走时,大鼠向左侧(瘫痪侧)转圈,中度神经功能缺损;3 分:行走时,大鼠身体向左侧(瘫痪侧)倾倒,重度神经功能缺损;4 分:不能自发行走,有意识丧失。5 分:死亡。评分为 1—4 分的大鼠表明造模成功,并将评分为 1—3 分的大鼠入组。0 分、4 分或死亡剔除,再随机补充。在跑台 3 天、7 天、14 天 3 个时间点对相应组别大鼠再次依此进行神经功能评定,观察其运动功能的恢复情况。

1.5 取材与检测

各组大鼠于相应时间断头处死,假手术组于假手术后第 3 天处死,取前凶前 2mm 至前凶后 3mm 右侧脑组织,取梗死周围脑组织用于抽提总 RNA。从基因文库中检索大鼠 MMP-2 和 VEGF 基因序列,应用 Primers 5.0 软件设计引物,由 TAKALA 公司合成。

MMP-2 上游引物 5'-GCA ACC ACA ACC AAC TAC GAT-3',

下游引物 5'-CAT TCC CTG CGA AGA ACA CA-3',
扩增片段为 496bp,VEGF

上游引物 5'-GGA CAT CTT CCA GGA GTA CC-3',
下游引物 5'-CGC ATG ATC TGC CAT AGT GCA-3',
扩增片段为 147bp。

内参照物 β -actin 上游引物为 5'-TAA AGA CCT CTA TGC CAA CAC-3',

下游引物为 5'-TAA AGC CAT GCC TAA TGT CTC-3',

扩增片段为 357bp。大鼠脑组织匀浆,按照 Trizol 试剂说明抽提脑组织总 RNA。所得 RNA 进行定量和纯度分析,逆转录成 cDNA 模板,用于 RT-PCR 检测。反应程式:MMP-2 及 β -actin: 94℃ 30s, 53℃ 30s, 72℃ 30s; VEGF: 94℃ 30s, 58℃ 30s, 72℃ 30s, 均 30 个循环。PCR 产物于 2% 琼脂糖凝胶上电泳,紫外灯下拍照,行成像分析,以 Image J 软件(NIH)对产物条带吸光度值进行计算。结果以“目的基因灰度值/ β -actin 灰度值”比值表示。

1.6 统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计软件进行统计学分析,结果用均数 $\pm$ 标准差表示,组间比较采用方差分析。

2 结果

2.1 各组大鼠各时间点神经功能评分

假手术组各大鼠术后 24h Longa 神经功能评分均为 0 分,跑台训练组及手术对照组各亚组之间大鼠术后 24h Longa 神经功能评分无显著性差异($P > 0.05$)。跑台训练组大鼠缺血再灌注后跑台第 7 天及第 14 天时,其神经功能评分均较对照组降低,差异有显著性意义($P < 0.05$)。见表 1,表 2。

2.2 RT-PCR 检测结果

大鼠脑缺血再灌注后脑组织 MMP-2mRNA 表达增加。跑台组与对照组相比在第 7 天、第 14 天有显著差异($P < 0.05$),第 7 天为高峰。见图 1,表 3。

脑缺血再灌注后大鼠脑组织 VEGFmRNA 表达水平增高,在术后各时间点跑台组与对照组比较均增高($P < 0.05$)。见图 2,表 4。

2.3 MMP-2 和 VEGF 在梗死脑组织中表达相关性
将梗死脑组织中 MMP-2 及 VEGF 的表达进行

表 1 各亚组大鼠造模后 24h Longa 评分比较 ($\bar{x} \pm s$, 分)				
组别	只数	3 天亚组	7 天亚组	14 天亚组
跑台训练组	15	2.40 $\pm$ 0.55	2.60 $\pm$ 0.55	2.60 $\pm$ 0.55
对照组	15	2.60 $\pm$ 0.55	2.40 $\pm$ 0.89	2.40 $\pm$ 0.55

表 2 各组大鼠不同时间点 Longa 评分比较 ($\bar{x} \pm s$, 分)				
组别	只数	第 3 天	第 7 天	第 14 天
跑台训练组	15	2.20 $\pm$ 0.45	1.60 $\pm$ 0.55 ^①	1.20 $\pm$ 0.55 ^①
对照组	15	2.60 $\pm$ 0.55	2.40 $\pm$ 0.55	2.00 $\pm$ 0.71

①与手术对照组比较, $P < 0.05$

相关性分析, $r = -0.436$, $P = 0.104$, 本实验中二者表达无相关性。

3 讨论

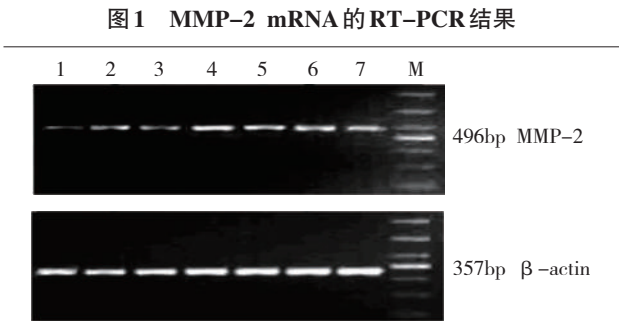
神经功能评估反映缺血性脑损伤的程度, 本实验采用 Longa 神经功能评分来反映各组大鼠术后各时间点神经行为方面的改变。从评分结果看, 各亚组大鼠术后 24 小时 Longa 神经功能评分无显著性差

表 3 各组大鼠各时间点 MMP-2mRNA 表达 ($\bar{x} \pm s$, 目的基因灰度值/ β -actin 灰度值的比值)			
组别	第 3 天	第 7 天	第 14 天
假手术组	0.30 $\pm$ 0.03		
跑台组	0.42 $\pm$ 0.03	0.89 $\pm$ 0.05 ^①	0.61 $\pm$ 0.05 ^①
对照组	0.38 $\pm$ 0.04	0.73 $\pm$ 0.03	0.44 $\pm$ 0.04

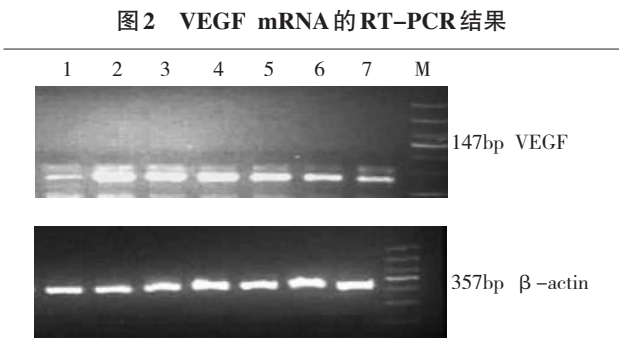
①与对照组比较 $P < 0.05$

表 4 各组大鼠各时间点 VEGFmRNA 表达 ($\bar{x} \pm s$, 目的基因灰度值/ β -actin 灰度值的比值)			
组别	第 3 天	第 7 天	第 14 天
假手术组	0.32 $\pm$ 0.05		
跑台组	1.57 $\pm$ 0.04 ^①	1.22 $\pm$ 0.03 ^①	0.50 $\pm$ 0.04 ^①
对照组	1.23 $\pm$ 0.04	0.91 $\pm$ 0.03	0.33 $\pm$ 0.06

①与对照组比较 $P < 0.05$



注: M: DNA Maker 带, 1: 假手术组, 2, 4, 6: 分别为跑 3 天、跑 7 天、跑 14 天跑台训练组, 3, 5, 7: 分别为跑 3 天组、跑 7 天组、跑 14 天组的对照组。



注: M: DNA Maker 带, 1: 为假手术组, 2, 4, 6: 分别为跑 3 天、跑 7 天、跑 14 天的跑台训练组, 3, 5, 7: 分别为跑 3 天组、跑 7 天组、跑 14 天组的对照组。

异($P > 0.05$),假手术组大鼠评分均为0分,说明跑台组及对照组各亚组间术后无组间差异,且假手术组未造成大鼠神经功能损伤。造模对照组、跑台训练组出现的神经功能缺损,说明对照组、跑台组大鼠均有一定程度的皮质缺血,造模较理想。本实验中我们发现跑台组大鼠缺血再灌注后第7天及第14天时,其神经功能评分均较对照组降低,差异有显著性意义($P < 0.05$),说明早期康复训练确实能促进受损神经功能恢复。

MMPs是一组锌依赖性蛋白酶家族,能降解细胞外基质,参与人体正常生长发育、创伤愈合和一系列的病理过程,如转移癌、关节炎、动脉粥样硬化、肺纤维化等^[4]。近年来,MMPs和脑缺血的关系开始受到人们的关注,其中MMP-2和MMP-9与脑血管病关系的研究较多。MMPs在脑缺血恢复阶段对促进血管再生^[5]及神经再生^[6]有着其重要的作用。Reeves等^[7]指出MMP-2与神经损伤后突触的再生和神经元的可塑性有关。在本研究中我们发现跑台组及对照组大鼠脑组织MMP-2水平在MCAO术后均增高且于第7天达高峰。如Rosenberg等^[8]用酶谱法检测自发性高血压鼠和Wistar-Kyoto鼠持续MCAO后1h、3h、12h、24h和5天的MMPs表达,发现梗死脑组织内MMP-2直到缺血后5天才有明显增加($P < 0.05$)。Romannic等^[9]也观察到大鼠MCAO后24hMMP-2出现在梗死区的巨噬细胞,其活性在第5天达到高峰,至缺血后第30天时仍有明显的低水平表达,MMP-2可能有助于巨噬细胞向缺血区域的转移,利于缺血后期组织修复过程中细胞碎片的清理。Rosenberg等^[10]还有研究显示MCAO再灌注后第5天和21天在缺血区周围的星形细胞中可见MMP-2的浓重染色。大鼠慢性脑缺血时MMP-2主要来源于小胶质细胞和内皮细胞,这些细胞有助于白质内微血管床的重构^[11]。血管再生也是脑缺血后修复的重要过程,在血管生成过程中,内皮细胞要穿过ECM和基质外的纤维支架,而MMPs在ECM的降解过程中起着重要的作用。这些提示MMP-2与脑损伤后组织神经修复及血管再生有关。在本实验中,第7天和14天,跑台组大鼠脑组织中MMP-2的表达高于对照组,差异有显著性意义($P < 0.05$),跑台组神经功能评分优于对照组,提示在运动训练的

刺激下,MMP-2表达增加,可能有助于神经功能恢复。有研究^[12]发现MMPs通过多种途径促进大脑重塑,通过调整细胞外基质促进树突重塑,通过降解神经胶质瘢痕促使轴突延伸及修复。Biernaskie等^[13]认为,康复训练能促进与神经功能恢复密切相关的未损害皮质运动区神经树突的生长,尤其是早期的康复训练(发病后第5天),能增加树突分支的数量。故我们推测:脑缺血恢复期,在运动训练的持续作用下,MMP-2表达增加并发挥一定的积极作用。其作用机制可能在于:MMP-2通过促进血管再生及神经再生,来增加缺血脑组织的氧供,促进大脑重塑,从而促进神经功能的恢复。

血管内皮生长因子是一种高度特异的血管内皮细胞有丝分裂素,与相应受体特异性结合,作用于血管内皮细胞,诱导内皮细胞增殖及毛细血管形成,促进血管新生及侧支循环建立,改善缺血周围区血供,减轻缺血性脑损伤^[13]。Sun等^[14-15]的实验证实VEGF通过抑制脑缺血后神经细胞凋亡、调节离子通道、促进神经和血管再生、直接营养神经等机制促进神经功能恢复。本实验中,脑缺血后VEGF表达增加,其中3天为高峰,跑台训练组各时间点VEGF均较对照组明显增加($P < 0.05$)。缺血可刺激脑组织表达VEGF,同时VEGF具有促进新生血管的形成,营养神经和神经保护等作用^[16-17]等作用,在新血管形成之前,对神经系统起着直接保护作用,有助于延长细胞的存活时间,直到新血管形成。VEGF表达增强可能是运动训练促进功能恢复的机制之一。我们推断康复训练可诱导脑梗死区VEGF的表达,促进血管生成,改善缺血区的血液供应,保护神经细胞,从而促进神经功能恢复。

Wang等^[19]研究表明,VEGF能够通过VEGF受体调节MMP-2的表达,而MMP-2又能降解细胞外基质,从而释放更多的VEGF,这便建立了一个正反馈调节环路来促进新生血管形成。早期Lamoreaux等^[20]研究发现VEGF通过促进MMP-2表达及抑制TIMP-1、2的表达来调节上皮细胞分泌的MMP活化。VEGF增强了MMP-2的释放,加快基底膜的降解和内皮细胞的迁移,促进了血管形成^[21]。同时,MMP-2降解细胞外基质的过程中,将一些与细胞外基质结合的生长因子如bFGF、TGF- β 等释放出来,

这些生长因子不但能促进MMPs酶原的合成,而且能够上调VEGF的表达^[22]。底煜^[23]等的实验中MMP-2与VEGF表达呈正相关,共同促进视网膜新生血管的形成。由以上研究我们认为,MMP-2与VEGF之间相互促进、互为因果,最终导致内皮细胞增生、迁移,促进梗死脑组织血管再生。MMP-2及VEGF的表达受多种因子的影响,如白介素-1(IL-1)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、表皮生长因子(EGF)等。在本实验中,梗死区脑组织MMP-2与VEGF的表达经统计学分析未呈现出相关性,考虑与以下原因有关:①本实验样本量较小;②在实验中所涉及影响MMP-2及VEGF表达的因子较多,如TNF- α 、IL-1等。

运动训练是促进脑缺血后神经功能恢复的有效手段,可通过多种途径发挥其积极效应。在运动训练的刺激下,脑缺血再灌注大鼠缺血脑组织MMP-2及VEGF表达增加,促进血管形成和神经再生,可能是运动康复训练促进脑缺血后功能恢复的机制之一。

参考文献

- [1] Purvis T, Cadilhac D, Donnan G, et al. Systematic review of process indicators: including early rehabilitation interventions used to measure quality of acute stroke care[J]. *Int J Stroke*, 2009, 4(2):72—80.
- [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] Biernaskie J, Cheruenco G, Corbett D. Efficacy of rehabilitative experience declines with time after focal ischemic brain injury[J]. *J Neurosci*, 2004, 24(5):1245—1254.
- [4] Mandal M, Mandal A, Das S, et al. Clinical implications of matrix metalloproteinases[J]. *Mol Cell Biochem*, 2003, 252(1—2):305—329.
- [5] Lee SR, Kim HY, Rogowska J, et al. Involvement of matrix metalloproteinase in neuroblast cell migration from the subventricular zone after stroke[J]. *J Neurosci*, 2006, 26(13):3491—3495.
- [6] Wang L, Zhang ZG, Zhang RL, et al. Matrix metalloproteinase 2 (MMP2) and MMP9 secreted by erythropoietin-activated endothelial cells promote neural progenitor cell migration[J]. *J Neurosci*, 2006, 26(22):5996—6003.
- [7] Reeves TM, Prins ML, Zhu J, et al. Matrix metalloproteinase inhibition alter functional and structural correlates of deafferentation-induced sprouting in the dentate gyrus[J]. *J Neurosci*, 2003, 23(32):10182—10189.
- [8] Rosenberg GA, Navratil M, Barone F, et al. Proteolytic cascade enzymes increase in focal cerebral ischemia in rat[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1996, 16(3):360—366.
- [9] Romanic AM, White RF, Arleth AJ, et al. Matrix metalloproteinase expression increases after cerebral focal ischemia in rats: inhibition of matrix metalloproteinase-9 reduces infarct size[J]. *Stroke*, 1998, 29(5):1020—1030.
- [10] Rosenberg GA, Cunningham LA, Wallace J, et al. Immunohistochemistry of matrix metalloproteinases in reperfusion injury to rat brain: activation of MMP-9 linked to stromelysin-1 and microglia in cell cultures[J]. *Brain Res*, 2001, 893(1—2):104—112.
- [11] Ihara M, Tomimoto H, Kinoshita M, et al. Chronic cerebral hypoperfusion induces MMP-2 but not MMP-9 expression in the microglia and vascular endothelium of white matter[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2001, 21(7):828—834.
- [12] Yong VW. Metalloproteinases: mediators of pathology and regeneration in the CNS[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2005, 6(12):931—944.
- [13] Thomas KA. Vascular endothelial growth factor, a potent and selective angiogenic agent[J]. *J Biol Chem*, 1996, 271(2):603—606.
- [14] Sun Y, Jin K, Xie L, et al. VEGF-induced neuroprotection, neurogenesis, and angiogenesis after focal cerebral ischemia[J]. *J Clin Invest*, 2003, 111(12):1843—1851.
- [15] Sun FY, Guo X. Molecular and cellular mechanisms of neuroprotection by vascular endothelial growth factor[J]. *J Neurosci Res*, 2005, 79(1—2):180—184.
- [16] Krum JM, Mani N, Rosenstein JM. Angiogenic and astroglial responses to vascular endothelial growth factor administration in adult rat brain[J]. *Neuroscience*, 2002, 110(4):589—604.
- [17] Gerber HP, Hillan KJ, Ryan AM, et al. VEGF is required for growth and survival in neonatal mice[J]. *Development*, 1999, 126(6):1149—1159.
- [18] Lamoreaux WJ, Fitzgerald ME, Reiner A, et al. Vascular endothelial growth factor increases release of gelatinase A and decreases release of tissue inhibitor of metalloproteinases by microvascular endothelial cells in vitro[J]. *Microvasc Res*, 1998, 55(1):29—42.
- [19] Wang H, Keiser JA. Vascular endothelial growth factor up-regulates the expression of matrix metalloproteinases in vascular smooth muscle cells: role of flt-1[J]. *Circ Res*, 1998, 83(8):832—840.
- [20] Lamoreaux WJ, Fitzgerald ME, Reiner A, et al. Vascular endothelial growth factor increases release of gelatinase A and decreases release of tissue inhibitor of metalloproteinases by microvascular endothelial cells in vitro[J]. *Microvasc Res*, 1998, 55(1):29—42.
- [21] Hofmann UB, Westphal JR, Van Muijen GN, et al. Matrix metalloproteinases in human melanoma[J]. *J Invest Dermatol*, 2000, 115(3):337—344.
- [22] Waas ET, Hendriks T, Lomme RM, et al. Plasma levels of matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 correlate with disease stage and survival in colorectal cancer patients[J]. *Dis Colon Rectum*, 2005, 48(4):700—710.
- [23] 底煜,陈晓隆.MMP-2和VEGF在视网膜新生血管中的表达及意义[J].*眼科研究*,2009,27(12):1089—1093.