

·基础研究·

强化训练对局灶性脑缺血大鼠信号素3a及其受体神经纤毛蛋白-1 mRNA表达的影响*

张振燕¹ 王 强^{2,3} 王佩佩² 王玉阳¹

摘要

目的:观察不同强度的游泳训练对局灶性脑缺血大鼠Sema 3a及其受体神经纤毛蛋白(NRP-1) mRNA表达的影响;探讨强化游泳训练对局灶性脑缺血大鼠的神经保护机制。

方法:采用线栓法建立左侧大脑中动脉阻塞2h再灌注动物模型。60只造模成功的雄性SD大鼠随机分为训练1组、训练2组、训练3组和对照组,每组15只。训练1组大鼠每天游泳1次,每次5min;训练2组大鼠每天游泳1次,每次10min;训练3组大鼠每天游泳2次,每次10min;对照组大鼠不做任何训练。另取15只大鼠为假手术组,不阻塞大脑中动脉血流,不做任何训练。以上5组大鼠又随机分为术后3d、7d、14d 3个时相点,每个时相点5只大鼠。采用Zausinger评分法评价神经功能缺损情况。应用RT-PCR测定缺血侧大脑皮质Sema 3a和NRP-1的mRNA表达量。

结果:假手术组神经功能正常。对照组各时相点的神经功能评分与假手术组同时相点相比,差异均有显著性意义($P < 0.05$);各训练组训练3d、7d、14d后的神经功能改善情况优于同时相点对照组($P < 0.05$),训练3组受损神经功能改善最明显,其训练3、7、14d后Zausinger神经功能评分分别为(2.40 ± 0.55)、(3.40 ± 0.55)和(4.20 ± 0.84)。训练1、2、3组各时相点Sema 3a和NRP-1的mRNA表达量明显低于对照组同时相点($P < 0.05$),且训练3组Sema 3a和NRP-1的mRNA表达量降低较其他各训练组更明显,其训练3、7、14d后,Sema 3a与GAPDH的mRNA表达水平之比分别为(0.62 ± 0.06)、(0.53 ± 0.10)和(0.42 ± 0.06),NRP-1与GAPDH的mRNA表达水平之比分别为(0.64 ± 0.13)、(0.53 ± 0.08)和(0.38 ± 0.10)。

结论:运动训练可以减少脑缺血再灌注大鼠Sema 3a和NRP-1的mRNA表达量,从而恢复受损神经功能;强化运动训练能够取得更好的效果。

关键词 强化训练;局灶性脑缺血;Sema 3a;NRP-1;神经再生

中图分类号:R493.2 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2013)-05-0398-05

Effects of intensive training on expressions of semaphorin 3a and its receptor neuropilin-1 in rats after focal cerebral ischemia/ZHANG Zhenyan, WANG Qiang, WANG Peipei, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2013, 28(5): 398—402

Abstract

Objective:To observe the effects of swimming training at different intensities on the mRNA expressions of semaphorin 3a and its receptor neuropilin-1 in rats after focal cerebral ischemia, and to explore the possible neuroprotective mechanism of intensive-swimming training in rats after focal cerebral ischemia.

Method:To establish animal model of cerebral ischemia-reperfusion in rats, the intraluminal thread method was applied to cause left middle cerebral artery occlusion MCAO for 2h and before reperfusion. Sixty male model SD rats were randomly divided into training group 1 (swimming for 5 min once a day), training group 2 (swimming for 10 min once a day), training group 3 (swimming for 10 min twice a day) and control group (no training), 15

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2013.05.003

*基金项目:山东省教育厅科研发展计划(J09LF22)

1 山东省青岛大学医学院,266021; 2 山东青岛大学医学院附属医院康复医学科; 3 通讯作者

作者简介:张振燕,女,在读研究生; 收稿日期:2012-08-16

rats in each group. Another 15 rats in assigned to sham-operation group were subject to no MCAO and no training. All the five groups were randomly divided into three subgroups of the 3rd, 7th and 14th d, 5 rats in each group. Neurological function was evaluated by Zausinger scores. Expressions of Sema 3a and NRP-1 were detected by RT-PCR.

Result: The neurological function in sham-operation groups was normal. The differences of Zausinger scores at the same time points between sham-operation group and control group were statistically significant ($P < 0.05$). The improvement of neurological function in all training groups, was significantly better than those in controls at the 3rd, 7th and 14th d after swimming training ($P < 0.05$), especially in training group 3. Zausinger scores at the 3rd d, 7th d and 14th d after swimming training were (2.40 ± 0.55) , (3.40 ± 0.55) and (4.20 ± 0.84) respectively. The levels of expressions of Sema 3a-mRNA and NRP-1-mRNA in all training groups were lower than those in controls at the 3rd, 7th and 14th d after swimming training ($P < 0.05$), and the decrease of expressions of Sema 3a-mRNA and NRP-1-mRNA in training group 3 was significantly more obviously compared with other training groups ($P < 0.05$). At the 3rd, 7th and 14th d after swimming training, the rates of expressions of Sema 3a-mRNA and reduced glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase (GAPDH) were (0.62 ± 0.06) , (0.53 ± 0.10) and (0.42 ± 0.06) respectively, the rates of expressions of NRP-1-mRNA and GAPDH were (0.64 ± 0.13) , (0.53 ± 0.08) and (0.38 ± 0.10) respectively.

Conclusion: Exercise training can decrease the expressions of Sema 3a-mRNA and NRP-1-mRNA in rats after cerebral ischemia-reperfusion. Hence, it can improve the injured neurological function and promoted the recovery of sensory function and motor function, and the more intensive the training was, the better the effects were.

Author's address Department of Rehabilitation Medicine, The Affiliated Hospital of Qingdao University Medical College, Qingdao, 266005

Key word intensive training; focal cerebral ischemia; Sema 3a; NRP-1; nerve regeneration

国内外大量研究证实,中枢神经系统损伤后,受损的神经元轴突就会重新生长,并建立新的突触联系,从而改善受损的神经功能^[1-3]。运动训练能够加速神经损伤后的轴突生长和突触重构^[4-7],并促进受损肢体功能的恢复^[8-10],但何种训练强度能够取得最佳效果及可能的神经生物学机制尚未明确。Sema 3a是信号素(semaphorins)的一种,是一种轴突导向分子,对神经细胞起排斥和抑制性作用。最先被确定的也是研究最充分的化学排斥性因子^[11-12],NRP-1是其受体^[13],两者共同参与神经损伤后轴突的修复与再生,而且主要发挥抑制性神经生长导向作用^[14-16]。本实验采用不同强度的游泳训练方法对局灶性脑缺血大鼠进行训练,并采用RT-PCR的方法对其缺血侧大脑皮质Sema 3a及其受体NRP-1的mRNA表达进行半定量测定,旨在探讨不同强度的游泳训练对局灶性脑缺血大鼠神经功能的影响及可能的神经保护机制。

1 材料与方法

1.1 脑缺血再灌注大鼠模型制备

成年健康雄性SD大鼠116只,体重240—260g,清洁级,由山东济宁鲁抗大鼠饲养中心提供(合格证号SLXK2008002),参照Longa法^[17]经颈外动脉线栓法制备左侧大脑中动脉阻塞(MCAO)2h再灌注模型。造模成功的标志:大鼠苏醒后出现左侧Horner征,提尾悬空时右前肢屈曲、内收,爬行时向右侧转圈。按照Zausinger等^[18]神经行为评分法,将麻醉清醒后评分1—4分的大鼠纳入研究。假手术组造模方法同上,但不阻塞大脑中动脉血流。

1.2 随机分组与训练方法

参照王佩佩等^[19]采用的大鼠游泳训练量,将纳入研究的大鼠按随机数字表法分为训练1组、训练2组、训练3组、对照组、假手术组,每组15只;以上5组大鼠又随机分为术后第3、7、14天3个时相点,每个时相点5只大鼠。训练1、2、3组大鼠均于缺血再灌注24h后开始进行游泳训练:训练1组每天游泳1次,每次5min;训练2组每天游泳1次,每次10min;训练3组每天游泳2次,每次10min。每只大鼠单独放于水深0.6m、长0.8m、宽0.8m的长方体透明玻璃容器中,水温29—31℃,水面距容器0.4m,以使大鼠

不能抓到容器边缘。对照组、假手术组大鼠不做任何训练。

1.3 Zausinger评分

Zausinger 评分法^[18]评定标准:0分,不能自发行走;1分,自由走动状态下向病变对侧旋转;2分,抓住鼠尾,大鼠向病变对侧旋转;3分,对于施向病变对侧的侧压力抵抗力下降者;4分,不能伸直病变对侧前爪,甚至全身向对侧屈曲;5分,无神经功能缺损。

1.4 RT-PCR 测定 Sema 3a-mRNA 与 NRP-1-mRNA 的表达水平

严格按照无菌条件分离出左侧大脑皮质,-80℃保存。取出-80℃保存的大脑皮质,用 Trizol RNA 提取试剂盒提取组织总 RNA,K5500 测定总 RNA 的纯度和浓度,-80℃保存总 RNA。cDNA 第一链合成后 42℃反转录 30min,95℃ 5min 灭活反转录酶,4℃ 5min 冷却降温,-20℃保存 cDNA。以反转录的 cDNA 作为 PCR 模板,扩增。其中 Sema 3a、NRP-1 和 GAPDH (reduced glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase)的引物特点如下表 1。制备 2%琼脂糖凝胶,取 RT-PCR 产物 4μl,加 6 × loadbuffer1 μl,120V 电压下电泳 30min,用 UVP 凝胶图像成像系统拍摄并储存图像,用 Image J 图像分析系统分析图像并记录结果。见表 1。

表 1 Sema 3a、NRP-1 和 GAPDH 的引物特点

引物	上游引物	下游引物	PCR 产 物(bp)	最适温 度(℃)
Sema 3a	5'-AAAGTCGCTTT CACTCCCAAG-3'	5'-ACTGGCACAGG TGATGACTTC-3'	318	61
NRP-1	5'-CACCCGCGAG TACAACCTTC-3'	5'-AGTCAGTGGG TCTCCATTCCT-3'	151	54
GAPDH	5'-GCCAGAATGTC TTGTGAGAGC-3'	5'-CCCATACCCA CCATCACACC-3'	207	58

1.5 统计学分析

采用 SPSS 17.0 统计软件对数据进行统计分析,所有实验数据均以均数 ± 标准差表示。采用单因素方差分析, $P<0.05$ 表示差异具有显著性意义。

2 结果

2.1 Zausinger 评分

假手术组无神经功能缺损。对照组各时相点的行为评分均低于假手术组同时相点($P<0.05$);各训

练组的行为评分高于同时相点对照组($P<0.05$),且训练 3 组评分增加最明显(表 2)。

表 2 各组大鼠 Zausinger 评分比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	训练 3d 后	训练 7d 后	训练 14d 后
假手术组	5.00 ± 0.00	5.00 ± 0.00	5.00 ± 0.00
对照组	0.40 ± 0.55 ^①	1.20 ± 0.45 ^①	2.00 ± 0.71 ^①
训练 1 组	1.20 ± 0.45 ^②	1.80 ± 0.45 ^②	2.60 ± 0.55 ^②
训练 2 组	1.80 ± 0.45 ^{②③}	2.60 ± 0.55 ^{②③}	3.40 ± 0.55 ^{②③}
训练 3 组	2.40 ± 0.55 ^{②③④}	3.40 ± 0.55 ^{②③④}	4.20 ± 0.84 ^{②③④}

注:与假手术组比较,① $P<0.05$;与对照组比较,② $P<0.01$;与运动训练 1 组比较,③ $P<0.05$;与运动训练 2 组比较,④ $P<0.05$ 。

2.2 强化游泳训练对各组大鼠 Sema 3a-mRNA 表达水平的影响

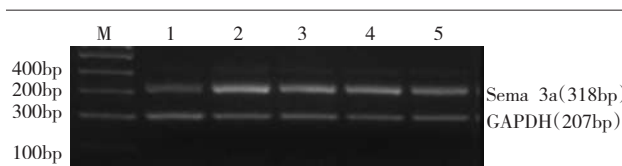
各组大鼠均有 Sema 3a-mRNA 的表达,对照组大鼠 Sema 3a-mRNA 表达量最多,假手术组 Sema 3a-mRNA 表达量最少,各训练组大鼠缺血侧皮质 Sema 3a-mRNA 表达量明显低于对照组($P<0.05$),且训练 3 组 Sema 3a-mRNA 表达量减少最明显(见表 3、图 1)。

表 3 各组大鼠 Sema 3a 与 GAPDH 的 mRNA 表达水平之比 ($\bar{x}\pm s$)

组别	训练 3d 后	训练 7d 后	训练 14d 后
假手术组	0.29 ± 0.05	0.31 ± 0.05	0.33 ± 0.07
对照组	0.88 ± 0.05 ^①	0.86 ± 0.06 ^①	0.79 ± 0.04 ^①
训练 1 组	0.79 ± 0.06 ^②	0.76 ± 0.06 ^②	0.71 ± 0.07 ^②
训练 2 组	0.71 ± 0.09 ^{②③}	0.67 ± 0.06 ^{②③}	0.58 ± 0.05 ^{②③}
训练 3 组	0.62 ± 0.06 ^{②③④}	0.53 ± 0.10 ^{②③④}	0.42 ± 0.06 ^{②③④}

注:与假手术组比较,① $P<0.05$;与对照组比较,② $P<0.01$;与运动训练 1 组比较,③ $P<0.05$;与运动训练 2 组比较,④ $P<0.05$ 。

图 1 14d Sema 3a 与 GAPDH 的 RT-PCR 产物电泳结果



M=Mark; 1=假手术组; 2=对照组; 3=训练 1 组; 4=训练 2 组; 5=训练 3 组

2.3 强化游泳训练对各组大鼠 NRP-1-mRNA 表达水平的影响

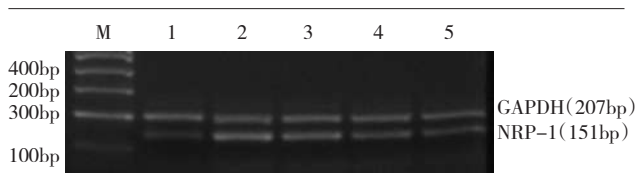
各组大鼠均有 NRP-1-mRNA 的表达,对照组大鼠 NRP-1-mRNA 表达量最多,假手术组 NRP-1-mRNA 表达量最少,各训练组大鼠缺血侧皮质 NRP-1-mRNA 表达量明显低于对照组($P<0.05$),且训练 3 组 NRP-1-mRNA 表达量减少最明显(表 4、图 2)。

表4 各组大鼠NRP-1与GAPDH的mRNA表达水平之比($\bar{x} \pm s$)

组别	训练3d后	训练7d后	训练14d后
假手术组	0.19 ± 0.04	0.21 ± 0.04	0.22 ± 0.06
对照组	1.16 ± 0.15 ^①	1.01 ± 0.09 ^①	0.93 ± 0.11 ^①
训练1组	0.96 ± 0.13 ^②	0.87 ± 0.15 ^②	0.74 ± 0.09 ^②
训练2组	0.81 ± 0.08 ^{②③}	0.68 ± 0.15 ^{②③}	0.56 ± 0.09 ^{②③}
训练3组	0.64 ± 0.13 ^{②③④}	0.53 ± 0.08 ^{②③④}	0.38 ± 0.10 ^{②③④}

与假手术组比较,① $P < 0.05$;与对照组比较,② $P < 0.01$;与运动训练1组比较,③ $P < 0.05$;与运动训练2组比较,④ $P < 0.05$ 。

图2 14d NRP-1与GAPDH的RT-PCR产物电泳结果



M=Mark; 1=假手术组; 2=对照组; 3=训练1组; 4=训练2组; 5=训练3组

3 讨论

1992年, Luo等^[20]在研究介导蝗虫胚胎中神经生长锥导向的分子时,发现了对神经细胞起排斥性和抑制性作用的 semaphorins 分子家族。其中, Sema 3a是该家族中最典型的也是最先被确定的化学性排斥因子,主要发挥抑制性轴突导向作用^[11-12]。NRP-1是Sema 3a的受体,两者结合后形成受体复合体,共同参与调节轴突的导向、分支、成束以及突触的形成^[13-16, 24-25]。Fujita等^[21]研究发现,缺血性脑损伤后,缺血侧大脑皮质中Sema 3a及其受体NRP-1的表达明显上调。Shirvan等^[22]研究证实,缺血性脑梗死后,凋亡神经元产生并分泌Sema 3a,诱导临近神经元细胞群的凋亡和坏死,且这种诱导作用能够被其受体NRP-1的抗体所阻断。Jiang等^[23]的研究指出, Sema 3a可以通过NRP-1诱导皮质神经元的死亡,而NRP-1则可通过Fer激酶介导Sema 3a诱导神经元的死亡。另有研究证实, Sema 3a及其受体NRP-1能够诱导轴突生长锥塌陷,从而抑制轴突修复与再生^[24-26]。以上研究均说明Sema 3a及其受体NRP-1参与了缺血性脑损伤后神经元存活与生长、轴突修复与再生的调节。但是迄今鲜有运动训练与Sema 3a、NRP-1在局灶性脑缺血中的相关性研究报道。

神经行为学评定是观察局灶性脑缺血后神经损伤与修复程度的一项重要指标。本实验采用不同强

度的游泳训练方法对局灶性脑缺血大鼠进行训练,并观察其受损神经功能改善情况。Zausinger评分结果显示,对照组大鼠没有神经功能缺损,局灶性脑缺血后各组对照组大鼠评分都在3分以下;游泳训练后,各训练组大鼠的评分均较对照组增加,与以往研究证实的运动训练能够改善受损神经功能的结果一致^[27-30]。另外,本实验研究还发现,运动训练3组大鼠Zausinger评分明显高于其他运动训练组,经过14d的强化游泳训练的大鼠评分增加最明显,运动功能几乎接近正常,证实强化训练能够更好地促进局灶性脑缺血后受损神经功能的恢复。

国内外大量文献报道了有关运动训练促进脑梗死后神经功能恢复机制的研究。Lee等^[31]对局灶性脑缺血大鼠分别进行轻、中、重度运动训练,轻、中度的运动训练能够更好地减少脑梗死面积和增加脑梗死区星形胶质细胞的表达,从而改善受损神经功能。Gertz等^[32]研究发现,运动训练能够增加骨髓和脾脏内的内皮祖细胞及血管内皮内的一氧化氮合酶,进而加速新生血管形成、增强血管通透性及增加脑血流量,从而改善缺血周边半暗带血供状态、促进受损肢体功能的恢复。本实验采用RT-PCR的方法对不同强度游泳训练大鼠大脑皮质Sema 3a及其受体NRP-1的mRNA表达进行半定量测定,探讨运动训练促进局灶性脑缺血大鼠神经功能恢复可能的神经再生与修复机制。研究发现,假手术组大脑皮质内均可见Sema 3a、NRP-1 mRNA微量表达,其生理意义可能是其抑制正常组织中轴突异常的突起和延伸、保证正常神经功能不受影响。缺血性脑梗死后,对照组和训练组所有大鼠Sema 3a、NRP-1 mRNA表达量均明显增加,游泳训练各组大鼠Sema 3a和NRP-1的mRNA表达量均较对照组大鼠减少,表明运动训练能够降低Sema 3a、NRP-1的表达,受损神经功能的恢复可能与Sema 3a、NRP-1表达减少促使轴突加快修复与再生相关。

本实验结果还发现, Sema 3a、NRP-1表达随每天训练时间的延长和总天数的增加而减少,强化游泳训练(每天游泳20min)14d组的大鼠减少最明显,表明强化训练能够更好地降低Sema 3a、NRP-1表达,进而更好地促使神经修复与再生、改善受损神经功能。

4 结论

运动训练可以减少局灶性脑缺血后 Sema 3a 及其受体 NRP-1 mRNA 的表达,从而促进缺血性脑损伤后的神经功能恢复,且强化训练能够取得更好的效果。其机制可能与运动训练降低 Sema 3a、NRP-1 表达,进而促进神经元的存活和生长、轴突的修复与再生、突触的形成与重塑相关。但是,本实验尚存在不足之处,是否训练强度越大,越有利于神经修复与再生,神经功能改善也越好;还是随训练强度增大后形成疲劳训练,反而不利于神经功能的恢复;以上问题尚有待于进一步研究证实。

参考文献

- [1] Skaper SD. Neuronal growth-promoting and inhibitory cues in neuroprotection and neuroregeneration[J]. *Methods Mol Biol*, 2012, 846:13—22.
- [2] Xu NJ, Henkemeyer M. Ephrin reverse signaling in axon guidance and synaptogenesis[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2012, 23(1): 58—64.
- [3] 谭峰,霍绮雯,陈强. 中枢神经系统轴突再生抑制因子 Nogo-A 的研究进展[J]. *中华神经医学杂志*, 2008,7(3):319—321.
- [4] OH MJ, Seo TB, Kwon KB, et al. Axonal outgrowth and Erk1/2 activation by training after spinal cord injury in rats[J]. *J Neurotrauma*, 2009,26(11): 2071—2082.
- [5] Sabatier MJ, Redmon N, Schwartz G, et al. Treadmill training promotes axon regeneration in injured peripheral nerves[J]. *Exp Neurol*, 2008,211 (2):489—493.
- [6] 周治来,陈银海,刘巍,等. 运动训练对脊髓损伤大鼠 Nogo-A、NgR mRNA 表达的影响[J]. *中国康复医学杂志*, 2011,26(2): 143—147.
- [7] 刘罡,吴毅,胡永善,等. 跑台训练对脑缺血大鼠脑组织超微结构及突触素表达的影响[J]. *中国康复医学杂志*, 2008,23(10): 872—874.
- [8] Yang YR, Chang HC, Wang PS, et al. Motor performance improved by exercises in cerebral ischemic rats[J]. *J Mot Behav*, 2012,44(2):97—103.
- [9] Seo HG, Kim DY, Park HW, et al. Early motor balance and coordination training increased synaptophysin in subcortical regions of the ischemic rat brain[J]. *J Korean Med Sci*, 2010,25(11):1638—1645.
- [10] 席建明,冯晓东. 核心力量训练对脑卒中患者步行及平衡能力的影响[J]. *中国康复医学杂志*, 2011,26(8):777—778.
- [11] Luo Y, Raible D, Raper JA. Collapsin: a protein in brain that induces the collapse and paralysis of neuronal growth cones[J]. *Cell*, 1993,75(2):217—227.
- [12] Vachkov IH, Huang X, Yamada Y, et al. Inhibition of axonal outgrowth in the tumor environment: involvement of class 3 semaphorins[J]. *Cancer Sci*, 2007, 98(8):1192—1197.
- [13] Fujisawa H, Kitsukawa T. Receptors for collapsing/semaphorins[J]. *Curpin Neurobiol*, 1998,8(5):587—592.
- [14] Takahashi T, Fournier A, Nakamura F, et al. Plexin-neuropilin-1 complexes form functional semaphorin-3A receptors[J]. *Cell*, 1999,99(1):59—69.
- [15] Takahashi T, Strittmatter SM. Plexin autoinhibition by the plexin sema domain[J]. *Neuron*, 2001,29(2):429—439.
- [16] Castellani V, Falk J, Rougon G. Semaphorin3A-induced receptor endocytosis during axon guidance responses is mediated by L1 CAM[J]. *Mol Cell Neurosci*, 2004,26(1):89—100.
- [17] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. *Stroke*, 1989, 20: 84—91.
- [18] Zausinger S, Hungerhuber E, Bachtmann A, et al. Neurological impairment in rats after transient middle cerebral artery occlusion: a comparative study under various treatment paradigms[J]. *Brain Res*, 2000, 863(12):94—105.
- [19] 王佩佩,吴艺玲,王强. 不同游泳训练强度对脑缺血再灌注大鼠胶质纤维酸性蛋白及碱性成纤维细胞生长因子表达的影响[J]. *中国物理医学与康复杂志*, 2012,34 (5):334—349.
- [20] Luo Y, Raible D, Raper JA. Collapsin: a protein in brain that induces the collapse and paralysis of neuronal growth cones[J]. *Cell*, 1993,75(2):217—227.
- [21] Fujita H, Zhang B, Sato K, et al. Expressions of neuropilin-1, neuropilin-2 and semaphorin 3A mRNA in the rat brain after middle cerebral artery occlusion[J]. *Brain Res*, 2001, 914(1-2):1—14.
- [22] Shirvan A, Ziv I, Fleminger G, et al. Semaphorins as mediators of neuronal apoptosis[J]. *J Neurochem*, 1999,73(3):961—971.
- [23] Jiang SX, Whitehead S, Aylsworth A, et al. Neuropilin 1 directly interacts with Fer kinase to mediate semaphorin 3A-induced death of cortical neurons[J]. *J Biol Chem*, 2010, 285:9908—9918.
- [24] Montolio M, Messegue J, Masip I, et al. A semaphorin 3A inhibitor blocks axonal chemorepulsion and enhances axon regeneration[J]. *Chem Biol*, 2009, 16: 691—701.
- [25] Hou ST, Keklikian A, Slinn J, et al. Sustained up-regulation of semaphorin 3A, Neuropilin1, and doublecortin expression in ischemic mouse brain during long-term recovery[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008,367: 109—115.
- [26] De Winter F, Holtmaat AJ, Verhaagen J. Neuropilin and class 3 semaphorins in nervous system regeneration[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2002,515:115—139.
- [27] Li L, Rong W, Ke Z, et al. Muscle activation changes during body weight support treadmill training after focal cortical ischemia: A rat hindlimb model[J]. *J Electromyogr Kinesiol*, 2011,21(2):318—326.
- [28] Wallace AC, Talelli P, Dileone M, et al. Standardizing the intensity of upper limb treatment in rehabilitation medicine[J]. *Clin Rehabil*, 2010, 24 (5):471—478.
- [29] 徐丽丽,白玉龙,胡永善,等. 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[J]. *中国康复医学杂志*, 2008, 23(2):100—102.
- [30] 郭丽云,史长青,王璐萍,等. 运动疗法对脑卒中后疲劳患者运动功能和日常生活活动能力的影响[J]. *中国康复医学杂志*, 2011,26(7):676—678.
- [31] Lee SU, Kim DY, Park SH, et al. Mild to moderate early exercise promotes recovery from cerebral ischemia in rats[J]. *Can J Neurol Sci*, 2009, 36 (4):443—449.
- [32] 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]. *Mol Cell Neurosci*, 1999,14(4-5):301—316.