

·基础研究·

运动训练对脑缺血大鼠神经功能及梗死边缘区细胞增殖与凋亡的影响*

李莉莉¹ 胡昔权^{1,3} 张丽颖¹ 罗 婧¹ 潘三强²

摘要

目的:探讨运动训练对急性脑缺血大鼠神经功能及脑皮质梗死边缘区细胞增殖与凋亡的影响。

方法:采用改良 Zea-Longa 线栓法制作大鼠中动脉阻塞(MCAO)模型,将大鼠随机分成运动训练组(n=15)、对照组(n=15)和假手术组(n=9)。运动训练组大鼠从术后1d开始每天予以跑笼运动训练;对照组和假手术组大鼠置于普通笼内饲养,不予以任何针对性训练。3组大鼠在造模术后1d、8d和15d分别进行神经功能评分(mNSS),并采用Ki67免疫荧光、TUNEL法分别观察脑皮质梗死边缘区细胞增殖、凋亡,以Western印迹法检测Bcl-2与Bax蛋白表达的情况。

结果:在造模术后8d和15d,训练组大鼠的神经功能评分(mNSS)均明显优于对照组,差异有显著性意义($P < 0.05$);免疫荧光结果显示,训练组大鼠脑皮质梗死边缘区Ki67阳性细胞增加,且以造模术后8d最明显,与对照组相比,差异有显著性意义($P < 0.05$);在造模术后8d和15d,训练组TUNEL阳性细胞数较对照组明显减少,同时,训练组梗死边缘区Bcl-2的表达高于对照组,Bax的表达低于对照组。

结论:运动训练能够促进急性脑梗死大鼠神经功能的恢复,其机制可能与促进皮质梗死边缘区细胞增殖、减少细胞凋亡有关。

关键词 脑梗死;运动训练;细胞增殖;细胞凋亡

中图分类号:R493,R743 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2013)-06-0528-05

Effects of exercise training on neural function and cell proliferation and apoptosis in rats with acute cerebral infarction/LI Lili, HU Xiquan, ZHANG Liying, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2013, 28(6): 528—532

Abstract

Objective: To study the effects of exercise training on neural function and cell proliferation as well as cell apoptosis in the peri-infarction region in rats with acute cerebral infarction.

Method: Permanent cerebral ischemia was induced by left middle cerebral artery occlusion(MCAO)in adult Sprague-Dawley rats. Rats were randomly divided into a exercise training group(n=15), a control group and a sham surgery group. Wheel running was administered to the rats of exercise training group at day 1 after MCAO. The rats in the latter two groups were fed in standard cages without any special training exercise. Their neurological functions were measured with modified neurological severity score(mNSS) at the 1std, 8thd and 15thd after MCAO. Ki67 and TUNEL method were used to observe cell proliferation and apoptosis, and Western blotting was used to detect the expressions of Bcl-2 and Bax in the peri-infarction region.

Result: The rats in exercise training group showed significantly better neurological function at 8d and 15d post MCAO($P < 0.05$), and significantly less TUNEL-positive cells($P < 0.05$) as compared with control group.

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2013.06.009

*基金项目:国家自然科学基金资助项目(81071607);广东省科技计划项目(2011B060300013)

1 中山大学附属第三医院康复医学科,广州,510630;2 暨南大学医学院解剖学教研室;3 通讯作者

作者简介:李莉莉,女,住院医师;收稿日期:2013-03-28

Ki67 cell proliferation increased obviously in exercise training group versus those in control group, especially at day 8. Moreover, Western blotting result showed up-regulation of Bcl-2 and down-regulation of Bax in exercise training group.

Conclusion: Exercise training can facilitate functional recovery after cerebral infarction in rats, and this may be partially attributed to the increase of cell proliferation and the decrease of cell apoptosis.

Author's address Department of Rehabilitation Medicine, the Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou, 510630

Key word cerebral infarction; exercise training; cell proliferation; cell apoptosis

脑卒中是造成神经功能障碍和长期残疾的主要原因之一。研究证实,运动训练能够改善脑卒中患者的运动功能,提高其日常生活活动能力^[1-2],然而,其具体机制尚未完全阐明。有研究表明,运动训练促进神经功能恢复的原因可能与增加细胞增殖、减少细胞凋亡有关^[3-6]。本研究通过观察运动训练对脑梗死大鼠神经功能及脑皮质梗死边缘区细胞增殖与凋亡的影响,探讨脑梗死后神经功能恢复的可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物模型建立与分组

1.1.1 实验动物与造模:SPF级成年SD雄性大鼠49只,体重250—280g,购自广东省医学实验动物中心[许可证号SCXK(粤)2008-0002]。按电脑随机数字表的方法随机选取40只大鼠术前禁食,自由饮水,以3.5%水合氯醛按1ml/100g体重剂量行腹腔注射麻醉,参照Zea-Longa线栓法^[7]制作大鼠左侧大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型。余下9只大鼠作假手术组,麻醉同上,但只暴露、分离血管与神经,不以线栓阻断左侧大脑中动脉的血流。

1.1.2 入组标准:MCAO后6h采用改良的Bederson标准进行神经功能评分^[8],选择评分为1—3分(苏醒后出现左眼Horner征、提尾时右侧前肢屈曲或爬行时向右侧转圈即追尾现象)的左侧MCAO大鼠纳入本研究。

1.1.3 分组:剔除麻醉及手术意外死亡的大鼠,将符合入组标准的MCAO大鼠30只按电脑随机数字表方法随机分为运动训练组(n=15)和对照组(n=15)。

1.2 运动训练方法

运动训练组于造模术后24h开始每天给予跑笼运动训练^[9]。跑笼直径20cm,长度40cm,由电动马

达带动。每天训练1次,每次20min,每周6次,共训练2周。训练强度按循序渐进的原则进行,其中前4d 5r/min,中间4d 10r/min,后4d 15r/min。对照组与假手术组大鼠则置于普通笼内饲养,除自由饮水、进食、活动外,不予以任何针对性训练。

1.3 大鼠神经功能评定

分别于造模术后第1d(24h)、8d和15d采用改良神经损伤程度评分(modified neurological severity score, mNSS)^[10]进行评估。该评分方法包括运动功能测试、感觉功能测试、平衡能力和反射缺失与异常运动4部分,每部分又分为若干小项,总计18分。总分1—6分为轻度损伤,7—12分为中度损伤,13—18分为重度损伤。

1.4 大鼠脑组织取材与观察

1.4.1 取材与切片:两组大鼠在造模术后第1、8和15天各时间点进行神经功能评分后,以3.5%水合氯醛(1ml/100g体重)行腹腔注射麻醉,4℃生理盐水和4%多聚甲醛进行心脏灌注,然后断头取脑,将脑组织置入4%多聚甲醛溶液中固定,经梯度蔗糖脱水、包埋后制作冰冻切片,片厚20μm。

1.4.2 免疫荧光染色:切片室温下干燥,经0.01M PBS液水化10min;置于0.01M柠檬酸钠抗原修复液(98—100℃)中抗原修复5min;室温下冷却后经0.01M PBS漂洗3次,每次5min;1%Triton X-100室温下破膜30min;0.01M PBS漂洗3次,加入山羊血清室温下封闭1h;加入兔抗Ki67单克隆抗体(1:250, Abcam)湿盒内4℃过夜;取出湿盒复温15min,0.01M PBS漂洗3次;加入山羊抗兔Alexa Fluor 555(1:1000, Cell Signaling Technology)室温下避光孵育1h;0.01M PBS漂洗3次,抗荧光淬灭封片液封片,置于荧光显微镜下观察。采用Image-Pro Plus6.0软件计数阳性细胞。

1.4.3 TUNEL 检测:应用罗氏 TUNEL(terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labling,末端脱氧核苷酸转移酶介导的dUTP 缺口末端标记)凋亡细胞检测试剂盒,按照试剂盒说明书操作。绿色荧光为凋亡信号。采用 Image-Pro Plus6.0 软件计数阳性细胞。

1.4.4 Western 印迹法检测:将组织样本用裂解液裂解,取 20 μ l 裂解样品液,进行 SDS-PAGE 蛋白电泳,表达产物电转移至 PVDF 膜上进行免疫反应(一抗为兔抗 Bcl-2、兔抗 Bax 抗体,1:1000 稀释),化学发光法显影,并以 β -actin 为内参对照。采用 Image J 图像分析系统计算光密度值,为了减少蛋白不均匀降解造成的误差,结果以相对光密度值(目的条带光密度值/同一样品 β -actin 条带光密度值)表示。

1.5 统计学分析

数据以均数 $\pm$ 标准差表示,应用 SPSS16.0 统计软件进行统计分析,所有数值均经方差齐性及正态性检验,采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异有显著性意义。

2 结果

2.1 大鼠造模后各时间点神经功能评估结果

训练组与对照组大鼠的 mNSS 评分在造模 1d 后均逐渐下降。造模术后 1d 时,训练组与对照组的评分差异无显著性意义($P > 0.05$);而造模术后 8d 和 15d 时,两组的评分差异均有显著性意义($P < 0.05$)见表 1。

表 1 训练组与对照组大鼠 mNSS 评分比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	术后第 1 天	术后第 8 天	术后第 15 天
训练组	15	9.44 $\pm$ 1.51	4.67 $\pm$ 1.00 ^①	2.33 $\pm$ 0.58 ^①
对照组	15	9.22 $\pm$ 1.48	5.89 $\pm$ 0.78	4.00 $\pm$ 0.82

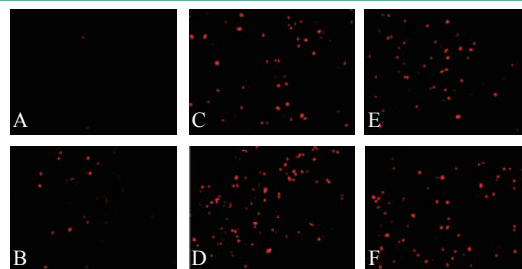
①与对照组比较 $P < 0.05$

2.2 大鼠皮质梗死边缘区 Ki67 免疫荧光染色结果

假手术组大鼠脑皮质增殖细胞很少,造模术后大鼠皮质梗死边缘区 Ki67 阳性细胞明显增加。在造模术后 8d 时,Ki67 阳性细胞数量最多,15d 时有所下降。训练组与对照组相比,在 1d 和 15d 时,两组 Ki67 阳性细胞数量的差异无显著性意义($P > 0.05$);而在 8d 时,训练组的 Ki67 阳性细胞数明显多于对照组,两组间的差异有显著性意义($P < 0.05$),图 1—2。

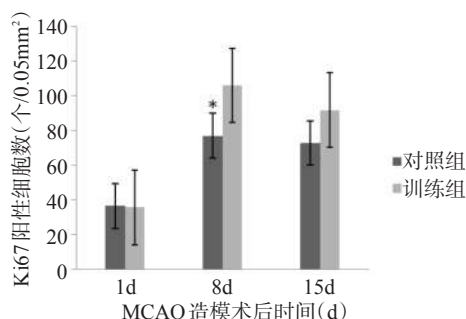
图 1 各组大鼠脑梗死边缘区 Ki67 表达情况

(免疫荧光染色, $\times 400$)



A 为假手术组, B 为 MCAO 术后 1d, C 为对照组术后 8d, D 为训练组术后 8d, E 为对照组术后 15d, F 为训练组术后 15d

图 2 Ki67 阳性细胞数比较



注:与对照组比较, * $P < 0.05$

2.3 大鼠皮质梗死边缘区 TUNEL 检测结果

假手术组大鼠脑皮质几乎没有 TUNEL 阳性细胞,造模术后 1d 时,皮质梗死边缘区 TUNEL 阳性细胞数量明显增多,8d 时有所下降,至 15d 时进一步降低。造模术后 1d 时,训练组与对照组 TUNEL 阳性细胞数的差异无显著性意义($P > 0.05$);而在造模术后 8d 和 15d 时,训练组 TUNEL 阳性细胞数明显少于对照组($P < 0.05$),见图 3—4。

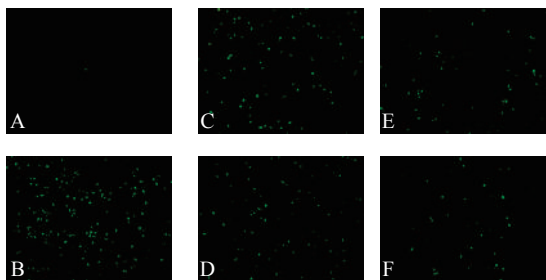
2.4 大鼠皮质梗死边缘区 Bcl-2、Bax 蛋白表达结果

造模术后 8d 和 15d 时,Bcl-2 蛋白表达均高于相应对照组,15d 时两组 Bcl-2 蛋白表达的差异有显著性意义($P < 0.05$);造模术后 8d 和 15d 时,Bax 蛋白表达均低于相应对照组,8d 时两组 Bax 蛋白表达的差异有显著性意义($P < 0.05$),见图 5。

3 讨论

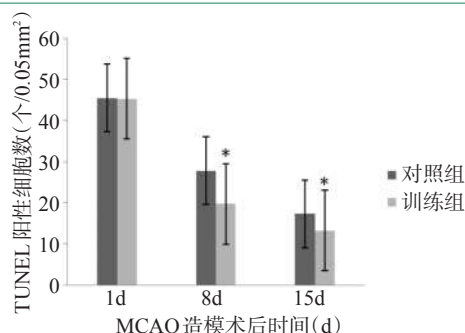
已有研究证实,大鼠局灶性脑缺血后进行各种运动训练或置于丰富环境中有利于其神经功能的恢复^[11-16]。多数学者认为脑梗死后运动训练介入的时

图3 各组大鼠脑梗死边缘区TUNEL标记
(免疫荧光染色, ×200)



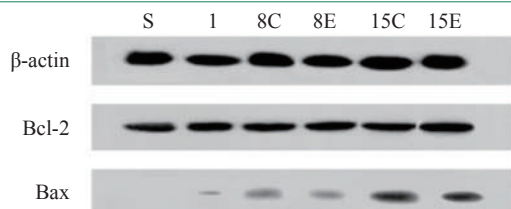
注:A为假手术组,B为MCAO术后1d,C为对照组术后8d,D为训练组术后8d,E为对照组术后15d,F为训练组术后15d

图4 TUNEL阳性细胞数比较



注:与对照组比较,* $P<0.05$

图5 大鼠皮质梗死边缘区Bcl-2、Bax蛋白表达



注:S假手术组,E运动训练组,C对照组,数字为MCAO后时间(d)

间越早,神经功能恢复越好。有研究发现,大鼠脑梗死后24h开始运动训练,其神经功能较对照组明显改善^[17-19]。本研究从造模术后1d开始采用跑笼训练器对脑梗死大鼠进行运动训练,结果发现,训练组较对照组更能改善大鼠的神经功能。造模术后1d,运动训练尚未介入时,两组在mNSS评分方面无差异。造模术后8d和15d时,训练组均比对照组评分低,说明早期运动训练能够改善脑梗死大鼠的神经功能。这一结果与上述观点一致。但是,关于脑损伤后康复训练介入的时间问题目前尚未得出一致结论。也有作者报道,脑梗死大鼠过早开始康复训练

会扩大脑梗死体积,加重脑损伤,不利于神经功能的恢复^[20]。本研究过程中未观察到早期运动训练对脑梗死大鼠神经功能恢复的不利影响,这可能与本实验中训练强度较低有关。因此,究竟脑缺血后何时开始康复训练及设定何种训练强度对神经功能的恢复最有利,未来有必要进一步深入研究。

脑缺血可引发一系列复杂的病理生理过程。脑缺血可促进神经再生^[21-22]。Takagi等^[22]报道,小鼠全脑缺血后神经祖细胞的增殖水平提高,海马齿状回神经再生增强可能是对缺血损伤的代偿反应,而这又是海马缺血后促进功能恢复的因素之一。本实验结果支持以上观点。在本研究中,我们采用Ki67作为增殖细胞的标志。Ki67是一种内源性核抗原,在细胞周期的G1、S、G2和M期均表达,是已知的增殖抗原中最具增殖能力的代表性指标,也是目前应用最广泛的增殖细胞标记之一。我们发现,脑缺血运动训练组大鼠皮质梗死边缘区的细胞增殖水平较对照组进一步增强,说明运动训练可提高脑缺血皮质的细胞增殖水平,对于促进神经干细胞增殖并分化为神经细胞修复受损神经系统具有重要作用。结合神经功能评估结果,相应时间点训练组大鼠的mNSS评分均低于对照组,提示脑梗死大鼠神经功能的恢复可能与运动训练促进脑缺血皮质梗死边缘区细胞增殖有关。运动训练促进细胞增殖及神经再生的机制目前尚未完全阐明,可能与神经营养因子增加等有关^[23-24]。研究表明,大鼠脑缺血后其脑内基质细胞衍生因子1(stromal cell-derived factor, SDF-1)及其受体CXCR4的表达增加^[25],而SDF-1可能参与运动训练促进脑缺血后的神经再生^[26-27],提示SDF-1/CXCR4可能在运动训练促进脑缺血后神经再生进而改善神经功能的过程中发挥重要作用。

现有研究表明,脑缺血可启动凋亡程序,引发神经元死亡^[28]。在细胞凋亡的过程中,染色体DNA断裂,TUNEL法可识别含有断裂DNA片段的细胞并使其染色,从而标记凋亡细胞。本实验发现,训练组TUNEL阳性细胞数较对照组明显减少,说明运动训练可抑制细胞凋亡。目前与凋亡相关的蛋白主要分为两大类:抗凋亡蛋白和促凋亡蛋白。其中,Bcl-2和Bax是与细胞凋亡密切相关的具有拮抗作用的因子。Bcl-2是定位在线粒体和粗面内质网上的抗凋

亡蛋白,其水平的增高可抑制多种凋亡刺激因子作用下 caspase 家族蛋白酶的活化,从而抑制细胞凋亡。Bax 是最早发现的促凋亡成员之一,能促进细胞凋亡。本研究显示,与对照组相比,训练组皮质梗死边缘区 Bcl-2 表达升高、Bax 表达降低。上述结果表明,运动训练可通过增加抗凋亡蛋白、减少促凋亡蛋白来抑制细胞凋亡,减轻脑损伤。

综上所述,运动训练能够增加脑梗死大鼠皮质梗死边缘区的细胞增殖并通过促进抗凋亡蛋白、减少促凋亡蛋白的表达来减缓细胞凋亡,这可能是运动训练促进脑梗死后神经功能恢复的机制之一。

参考文献

- [1] Stock R, Mork PJ. The effect of an intensive exercise programme on leg function in chronic stroke patients: a pilot study with one-year follow-up [J]. *Clinical Rehabilitation*, 2009, 23(9): 790—799.
- [2] Dobkin BH. Training and exercise to drive poststroke recovery [J]. *Nat Clin Pract Neurol*, 2008, 4(2):76—85.
- [3] Lee SH, Kim YH, Kim YJ, et al. Enforced physical training promotes neurogenesis in the subgranular zone after focal cerebral ischemia [J]. *J Neurol Sci*, 2008, 269(1-2):54—61.
- [4] Leasure JL, Grider M. The effect of mild post-stroke exercise on reactive neurogenesis and recovery of somatosensation in aged rats [J]. *Exp Neurol*, 2010, 226(1):58—67.
- [5] Wurm F, Keiner S, Kunze A, et al. Effects of skilled forelimb training on hippocampal neurogenesis and spatial learning after focal cortical infarcts in the adult rat brain[J]. *Stroke*. 2007, 38(10):2833—2840.
- [6] 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.
- [7] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20:84—91.
- [8] Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, et al. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of neurologic examination [J]. *Stroke*, 1986, 17:472—476.
- [9] 郑海清, 胡昔权, 方杰, 等. 运动训练对脑梗死大鼠梗死边缘区突触可塑性的影响[J]. *中华医学杂志*, 2012, 92(9):628—633.
- [10] Chen JL, Sanberg PR, Li Y, et al. Intravenous administration of human umbilical cord blood reduces behavioral deficits after stroke in rats [J]. *Stroke*, 2001, 32:2682—2688.
- [11] Yang YR, Wang RY, Wang PS, et al. Treadmill training effects on neurological outcome after middle cerebral artery occlusion in rats [J]. *Can J Neurol Sci*, 2003, 30(3):252—258.
- [12] Chang HC, Yang YR, Wang SG, et al. Effects of treadmill training on motor performance and extracellular glutamate level in striatum in rats with or without transient middle cerebral artery occlusion [J]. *Behav Brain Res*, 2009, 205(2):450—455.
- [13] 郑海清, 胡昔权, 潘三强, 等. 康复训练对脑梗死大鼠功能恢复及皮质梗死边缘区神经细胞超微结构的影响[J]. *中国康复医学杂志*, 2008, 23(7):605—608.
- [14] 胡昔权, 郑海清, 燕铁斌, 等. 康复训练对脑梗死大鼠运动功能及 GAP-43、SYN 表达的影响[J]. *中华物理医学与康复杂志*, 2008, 30(4):217—221.
- [15] Hicks RR, Zhang L, Atkinson A, et al. Environmental enrichment attenuates cognitive deficits, but does not alter neurotrophin gene expression in the hippocampus following lateral fluid percussion brain injury [J]. *Neuroscience*, 2002, 112(3):631—637.
- [16] Briones TL, Rogozinska M, Woods J, et al. Environmental experience modulates ischemia-induced amyloidogenesis and enhances functional recovery [J]. *J Neurotrauma*, 2009, 26(4):613—625.
- [17] 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.
- [18] Matsuda F, Sakakima H, Yoshida Y. The effects of early exercise on brain damage and recovery after focal cerebral infarction in rats [J]. *Acta Physiol (Oxf)*, 2011, 201(2): 275—287.
- [19] Zhang P, Zhang Q, Pu H, et al. Very early-initiated physical rehabilitation protects against ischemic brain injury [J]. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2012, 4:2476—2489.
- [20] Risedal A, Zeng JS, Johansson BB. Early training may exacerbate brain damage after focal brain ischemia in the rat [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1999, 19(9):997—1003.
- [21] Liu J, Solway K, Messing RO, et al. Increased neurogenesis in the dentate gyrus after transient global ischemia in gerbils [J]. *Journal of Neuroscience*, 1998, 18(19):7768—7778.
- [22] Takagi Y, Nozaki K, Takahashi J, et al. Proliferation of neuronal precursor cells in the dentate gyrus is accelerated after transient forebrain ischemia in mice [J]. *Brain Res*, 1999, 831(1-2):283—287.
- [23] Chae CH, Lee HC, Jung SL, et al. Swimming exercise increases the level of nerve growth factor and stimulates neurogenesis in adult rat hippocampus [J]. *Neuroscience*, 2012 Apr 16.
- [24] Li Y, Luikart BW, Birnbaum S, et al. TrkB regulates hippocampal neurogenesis and governs sensitivity to antidepressant treatment[J]. *Neuron*, 2008, 59(3):399—412.
- [25] Bastian S, Stefan S, Volker H, et al. Enhanced expression of the CXCL12/SDF-1 chemokine receptor CXCR7 after cerebral ischemia in the rat brain[J]. *Neuroimmunol*, 2008, 198: 39—45.
- [26] 翟志永, 聂莹雪, 赵传胜. 强制性运动疗法对脑缺血后神经修复的作用及分子机制[J]. *中国全科医学*, 2008, 2:177—181.
- [27] Zhao C, Wang J, Zhao S, et al. Constraint-induced movement therapy enhanced neurogenesis and behavioral recovery after stroke in adult rats[J]. *Tohoku J Exp Med*, 2009, 218(4):301—308.