

强制性使用运动疗法对大鼠脑缺血后神经可塑性的影响

张璇¹ 张林亭¹ 张霞¹

摘要

目的:观察强制性使用运动疗法对大鼠脑梗死区周围皮质的生长相关蛋白-43(GAP-43)、突触素(SYP)表达的影响,探讨其促进脑缺血后神经可塑性的机制。

方法:采用自体血栓注入并闭塞大脑中动脉的方法制备局灶脑缺血模型。将90只健康SD大鼠随机分为假手术组(Sham组)、局灶脑缺血模型组(MCAO模型)、强制性运动疗法组(CIMT组)各30只。在局灶脑缺血模型成功后7天,运动疗法组建立强制性使用运动疗法模型。参照Bederson评分标准对各组大鼠进行神经功能缺损评分。采用原位杂交技术检测脑梗死区周围皮质GAP-43及SYP mRNA的表达。采用免疫组化技术检测GAP-43及SYP蛋白表达。

结果:与模型组比较,运动疗法组在制模后2、4、8周神经功能缺损评分明显降低,而GAP-43及突触素mRNA及蛋白表达在各时间点均明显高于对照组。

结论:强制性使用运动疗法能改善大鼠脑缺血神经功能,其机制可能与运动疗法能够促进梗死灶周围皮质GAP-43及SYP的表达,从而促进脑缺血后的突触发生与重塑有关。

关键词 强制性使用运动疗法;脑缺血;生长相关蛋白;突触素

中图分类号:R743.3 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2014)-07-615-04

Effects of constraint-induced movement therapy on neural plasticity after cerebral ischemia in rats/
ZHANG Xuan,ZHANG Linting,ZHANG Xia//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2014, 29(7):
615—618

Abstract

Objective:To investigate the effects of constraint-induced movement therapy (CIMT) on the expressions of growth-associated protein 43(GAP-43) and synaptophysin(SYP) after focal cerebral ischemia in rats.

Method:A focal cerebral ischemia model of rat was established by embolizing left middle cerebral artery with autologous blood clots. Ninety healthy Sprague-Dawley rats were randomly divided into 3 groups: sham group, CIMT group, and focal cerebral ischemia(MCAO) group, 30 in each group. The CIMT group rats were forced to use their impaired limbs by placing their nonimpaired fore-limbs in casts at the 7th day after MCAO. The behavior scores were evaluated. Expressions of GAP-43, SYPmRNA and protein were detected by means of in situ hybridization histochemistry technique and immunohistochemistry.

Result:Compared with MCAO group, the scores of neurological deficit were significantly lower, and the expressions of GAP-43, SYPmRNA and protein were obviously higher in CIMT group.

Conclusion:CIMT could improve neurological function of rats after cerebral ischemia.The possible mechanism was closely related to up-regulation of expressions of GAP-43 and SYP, thus to improve neural plasticity.

Author's address The Department of Neurology,The First People's Hospital of Jining, Shandong,272000

Key word constraint-induced movement therapy;cerebral ischemia;growth-associated protein-43; synaptophysin

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2014.07.005

1 济宁市第一人民医院神经科,272000

作者简介:张璇,女,博士,主任医师; 收稿日期:2013-09-03

脑缺血后神经功能恢复非常有限,幸存者中大多遗留不同程度的神经功能缺损,后期的神经康复治疗非常重要。强制性使用运动疗法(constraint-induced movement therapy, CIMIT)是近年来备受关注的一种新的康复治疗技术,主要通过限制健侧肢体活动,达到强化使用和训练患侧肢体的目的,进而促进患肢的运动功能恢复。强制性使用运动疗法用于临床脑卒中患者的康复治疗已获得显著疗效^[1-2],得到国、内外学者的一致认同和肯定。本研究观察了CIMIT对脑缺血后神经功能重塑的影响,并探讨其作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康SD大鼠90只,雌雄不拘,质量250—280g。将其随机分为强制性使用运动组(CIMIT组)、MCAO模型组和假手术组(Sham组),每组30只。

1.2 实验方法

1.2.1 左侧大脑中动脉闭塞局灶性脑缺血模型的制备:方法参照文献^[3],用3.5%水合氯醛1ml/kg腹腔麻醉大鼠后,取左侧颈部直切口,分离左颈总动脉(CCA)、颈内动脉(ICA)、颈外动脉(ECA),电凝ECA分支甲状腺上动脉、枕动脉,结扎颈内动脉重要分支翼腭动脉。离断ECA,假手术组到此步为止。从ECA插入24号静脉留置针,将针芯拔出,取动脉血0.5—1.0ml,4000r/min离心1min。按5:1吸取血浆及少量红细胞共100 μ l,加入50万U/L凝血酶1 μ l及1mol/L氯化钙20 μ l,立即混匀,吸入麻醉导管,稍待片刻,将血栓注入盛有生理盐水或PBS的玻璃皿内,用剪刀剪成多个长1.5—2mm的栓子,制成直径为0.35mm,长为1.5—2mm的血栓,用麻醉导管吸取5—8个血栓,接到静脉留置针末端,快速将栓子推入ICA内,结扎ECA,恢复CCA到ICA的血流。动物苏醒后立即进行神经功能缺失评分,而局灶性脑缺血模型大鼠则表现精神差,右前肢瘫痪无力,屈曲内收。将模型成功的大鼠入选,术后动物分笼饲养,给予正常进食饮水,室温控制在25℃。

1.2.2 强制性使用运动疗法干预:脑缺血模型成功7天后给予进行功能评定,CIMIT组大鼠用3.5%水合氯醛麻醉,将健侧前肢置于自然屈曲位置固定,用手

术缝线将皮肤缝在一段3cm长的铁丝上(铁丝尾端与绕在胸部的铁环相连),然后用石膏缠绕固定该肢体,部分限制其活动,固定后仍饲养于原笼中。手术后第8周解除固定。

1.2.3 Bederson评分:参照改良的Bederson评分标准^[4],分别在脑缺血后1、2、4、8周进行神经功能缺损评分。

1.2.4 原位杂交技术检测生长相关蛋白growth-associated protein(GAP-43)及SYPMRNA的表达:每组随机取5只大鼠于治疗2周、4周、8周后,经4%的多聚甲醛灌注固定后,断头取脑,经多聚甲醛后固定、梯度脱水、石蜡包埋,将包埋后的脑组织经切片机切为5 μ m厚切片烘干备用。采用原位杂交技术检测GAP-43及SYPMRNA的表达。

1.2.5 免疫组化观察GAP-43及突触素(synaptophysin, SYP)的表达:①GAP-43、SYP免疫组织化学检测方法:切片常规脱蜡至水后依次加入3% H₂O₂甲醇溶液,室温,10min;正常山羊血清,室温,10min;分别加入抗GAP-43抗体和抗SYP抗体,置湿盒4℃过夜;生物素标记的二抗,室温,10min;链霉卵白素—过氧化物酶溶液,室温,10min。然后滴加新鲜配制的DAB-H₂O₂显色液,室温显色5—10min。自来水冲洗,脱水,透明,苏木素复染细胞核1—3min,再水洗10min以上。梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树脂封片,光镜下观察。细胞呈紫蓝色。阳性细胞胞浆呈棕黄色,显微镜下观察,照相。②每张切片结果在40倍物镜下观察显色的有无及强弱,用计算机图像分析系统TD-2000处理,采集图像输入计算机,以灰度计算所选视野阳性染色的单位面积(阳性细胞的面积占所选整个视野面积的百分比),每张切片取梗死灶边缘区互不重叠的5个视野,其均值即为该标本每个高倍镜视野中阳性细胞的单位面积。

1.3 统计学分析

数据采用均数 $\pm$ 标准差表示,运用SPSS 12.0统计学软件包分析,采用单因素方差分析方法统计,其中两两比较采用Student-Newman-Keuls法,显著性水平为0.05。

2 结果

2.1 神经功能缺损评分

见表1,在强制性运动开始前,即大鼠脑缺血模型术后1周,CIMT组和对照组Bederson评分比较无显著性差异($P>0.05$),但均明显高于假手术组。随着缺血后神经功能的自然恢复,在脑缺血第1、2、4、8周等时间点,两组神经功能缺损评分都在逐渐降低,后一时间点均比前一时间点评分降低($P<0.05$),提示脑缺血后大脑有自然恢复功能。而CIMT组经过强制性使用运动疗法的干预,在第2、4、8周等时间点神经功能缺损评分均明显低于对照组($P<0.01$),提示强制性使用运动疗法能够在自然功能恢复的基础上进一步促进神经功能改善。

表1 3组大鼠神经功能缺损评分的比较 ($\bar{x}\pm s$)

	第1周	第2周	第3周	第4周
假手术组	0	0	0	0
对照组	2.8±0.7 ^①	2.6±0.4 ^{①②}	2.4±0.5 ^{①②}	2.0±0.3 ^{①②}
CIMT组	2.8±0.8	2.7±0.4 ^{②③}	2.2±0.2 ^{②③}	1.7±0.1 ^{②③}

①与假手术组 $P<0.01$;②与同组的上一个时间点比较均 $P<0.05$;③与对照组比较 $P<0.01$

2.2 CIMT对GAP-43 mRNA表达的影响

见表2,与假手术组比较,在第2周时对照组大鼠缺血灶边缘脑组织GAP-43 mRNA表达明显增多。随着缺血时间延长,对照组缺血灶边缘脑组织GAP-43 mRNA表达逐渐减少,第4周时已明显减少,在第8周时与假手术组比较无显著性差异($P>0.05$),而CIMT组随着缺血时间延长,其缺血灶边缘脑组织GAP-43 mRNA表达也在逐渐减少,但在各时间点其缺血灶边缘脑组织GAP-43 mRNA表达均比对照组表达明显增加,在第8周时其GAP-43 mRNA表达亦明显高于假手术组($P<0.01$)。

2.3 CIMT对GAP-43 蛋白表达的影响

见表3,免疫组化观察结果显示:假手术组大鼠在皮质和相应脑区GAP-43均有表达,且双侧对称。其中皮质、海马及第三脑室周围灰质GAP-43的免疫活性高于其他部位,呈小点状或细颗粒状沉积。CIMT组及对照组梗死中心区未见GAP-43表达,梗死周边区GAP-43的免疫活性明显高于假手术组,于缺血后第2周及第4周达较高水平,第8周已明显下降。而CIMT组GAP-43蛋白表达在各时间点均比对照组明显增高,CIMT组在第8周时亦明显高于对照组及假手术组($P<0.01$)。

2.4 CIMT对SYP mRNA表达的影响

见表4,MCAO对照组在脑缺血第2、4周时SYPmRNA明显高于假手术组($P<0.05$),在第8周时SYPmRNA的表达和假手术组已无显著性差异($P>0.05$),提示在脑缺血损伤后机体可通过内源性因子调节促进大脑功能重塑,随着时间延长,这种作用减弱。而在CIMT组,在各个时间点SYPmRNA均高于对照组($P<0.01$),即使在第8周时,也明显高于假手术组,说明CIMT可以促进大脑功能重塑、突触重建、新生,从而促进神经功能恢复。

2.5 CIMT对SYP蛋白表达的影响

见表5,假手术组大鼠大脑皮质及相应脑区均有SYP免疫产物沉积,两半球对称分布,SYP免疫反应产物为棕黄色点状或颗粒状,主要分布在神经毡内,有些颗粒围绕在神经元周围,衬托出神经细胞体的轮廓。颗粒的大小与突触类型及免疫反应强弱

表2 CIMT对GAP-43 mRNA及蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s$)

时间点	组别		
	假手术组	对照组	CIMT组
第2周	0.51±0.06	2.14±0.52 ^①	5.19±1.12 ^{③④}
第4周	0.58±0.03	1.79±0.05 ^{①②}	4.18±0.32 ^{②④}
第8周	0.55±0.07	0.59±0.07 ^③	1.37±0.03 ^{①②④}

①与假手术组 $P<0.01$;②分别与同组的上一个时间点比较均 $P<0.01$;③与假手术组 $P>0.05$;④与对照组比较 $P<0.01$

表3 CIMT对GAP-43蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s$)

时间点	假手术组	对照组	CIMT组
第2周	11.41±1.16	39.74±8.4 ^{①③}	63.19±5.42 ^{③④}
第4周	11.18±4.30	33.69±4.75 ^{①②}	57.38±6.12 ^{②④}
第8周	11.93±3.97	13.69±2.27 ^{②③}	43.37±5.80 ^{①②④}

①与假手术组 $P<0.01$;②分别与同组的上一个时间点比较均 $P<0.01$;③与假手术组 $P>0.05$;④与对照组比较 $P<0.01$

表4 CIMT对SYPmRNA表达的影响 ($\bar{x}\pm s$)

时间点	假手术组	对照组	CIMT组
第2周	11.41±1.16	39.74±8.4 ^{①③}	63.19±5.42 ^{③④}
第4周	11.18±4.30	33.69±4.75 ^{①②}	57.38±6.12 ^{②④}
第8周	11.93±3.97	13.69±2.27 ^{②③}	43.37±5.80 ^{①②④}

①与假手术组 $P<0.01$;②分别与同组的上一个时间点比较均 $P<0.01$;③与假手术组 $P>0.05$;④与对照组比较 $P<0.01$

表5 CIMT对SYP蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s$)

时间点	假手术组	对照组	CIMT组
第2周	4.41±1.16	18.74±3.79 ^③	37.19±4.02 ^{③④}
第4周	4.18±0.30	9.69±2.75 ^②	25.38±2.12 ^{②④}
第8周	4.93±0.97	5.69±0.27 ^{②③}	13.37±1.80 ^{①②④}

①与假手术组 $P<0.01$;②分别与同组的上一个时间点比较均 $P<0.01$;③与假手术组 $P>0.05$;④与对照组比较 $P<0.01$

有关,胞浆内颗粒状产物较少见,白质及胶质细胞不着色。

对照组在缺血后各个时间点 SYP 免疫表达增强,在第 1 周最显著,第 2 周及第 4 周也有较高水平表达,在第 8W 时基本表达减弱,和假手术组已无显著性意义。CIMT 组在治疗前第 1 周时和对照组比较无显著差异,在第 2 周及第 4 周时,表达明显高于第 1W,治疗后各时间点免疫表达均比对照组显著增高 ($P<0.01$)。

3 讨论

强制性运动疗法是以中枢神经系统可塑性为基础发展起来的一种康复治疗技术,这些技术有效地提高了脑卒中患者和其他神经系统损伤患者的运动功能^[5]。本实验结果也显示强制性运动疗法可显著降低神经功能缺损评分,可有效改善脑缺血大鼠的神经功能。正电子发射型计算机断层显像和功能磁共振(fMRI)是反映脑的可塑性变化和大脑皮质功能重组的有效手段^[6]。最新的研究进一步证实,接受 CIMT 治疗,偏瘫患者的患侧上肢功能改善,同时损伤侧的感觉运动皮质的活动明显增加,两者有显著的相关性,提示 CIMT 促进脑功能重组可能是其促进偏瘫后功能恢复的机制^[7]。

GAP-43 在中枢神经系统及周围神经系统的发育和再生中的轴突生长锥内有较高含量,GAP-43 是神经元发育、神经生长及再生、突触形成和重建的标志性物质^[8]。正常情况下 GAP-43 呈低水平表达状态,在脑缺血、脑损伤等应激情况下出现大量表达,该分子的表达影响着神经的再生能力。本实验结果显示脑缺血后大鼠梗死区周围脑组织的 GAP-43mRNA 及蛋白表达在第 2 周明显高于假手术组,而在第 4 周时表达明显下降,在第 8 周时与假手术组已无显著性差异,说明脑缺血后脑组织有自然恢复及突触重建的作用。在 CIMT 组,与脑缺血对照组比较,在各时间点其 GAP-43mRNA 及蛋白表达均明显增高,在第 8 周时也明显高于假手术组,说明强制性使用运动疗法可上调脑缺血后脑组织 GAP-43 的表达,对大鼠脑缺血后自然恢复及突触重建有明显促进作用,并能延长 GAP-43 高表达的时间,进一步促进脑梗死后神经功能的重塑及恢复。

SYP 是一种位于突触囊泡膜上的钙结合蛋白,SYP 能调节神经元突起延伸,参与突触的形成。体外培养的小鼠海马神经元,敲除突触素 I 基因后,神经元的突起较野生型显著变短、小且缺乏分支,若敲除突触素 II 或 III 基因,则根本不能延伸形成轴突^[9];在神经元长出突起后,突触形成之前使用反义寡核苷酸对突触素的表达进行阻断,可抑制突触的形成^[10]。Daly 等^[11]发现突触素参与了细胞的内存作用,他们破坏突触前膜内的突触素后,递质的循环再利用受到影响,导致递质释放明显衰减,说明突触素对突触功能维持也是必需的,突触数量的增加则提示新生突触的形成^[12]。SYP 既是突触发生的标志,又是突触传递效能水平的反映。脑缺血损伤后,大量神经细胞死亡和凋亡,突触结构崩溃,且由于神经元的代谢和蛋白的合成能力下降,同时轴浆运输减退,SYP 的表达也随之下降。缺血损伤作为一种刺激可以引起突触素的变化,目前对脑缺血后 SYP 变化的报道差异较大。陈加俊等^[13]报道,突触存在可塑性:表现为脑梗死后 SYP 免疫阳性物先下降,而后逐渐增加。而丰岩清等^[14]等报道脑缺血再灌注后第 3 天 SYN 免疫活性明显升高,第 7 天达到高峰,第 14 天开始下降,第 21 天已降至对照组水平。本实验结果显示,脑缺血后第 2 周,在 MCAO 对照组 SYPmRNA 及蛋白表达明显高于假手术组,在第 4 周表达已明显下降,在第 8 周时与假手术组无显著性差异。与刘传玉等^[15]报道一致,说明脑缺血后大鼠存在自然恢复及突触代偿的机制。而在 CIMT 组,其 SYPmRNA 及蛋白表达在第 2、4、8 周各时间点均明显高于脑缺血对照组,虽然随着时间延长,表达逐渐下降,但在第 8 周时也明显高于假手术组。说明强制性使用运动疗法可明显促进脑缺血后大鼠突触重建及神经功能恢复,并能延长突触素高表达状态的时间,进一步使脑损伤后神经功能得到持续改善。

综上所述,中枢神经系统突起发生、延伸及突触连结的形成是脑组织缺血性损伤后神经可塑性的重要表现形式,强制性使用运动疗法能促进缺血周边区 GAP-43 和 SYP 表达而进一步促进缺血损伤后轴突芽生和新的突触形成,有利于神经功能恢复。说明强制性使用运动疗法至少可通过上调 GAP-43

(下转第 623 页)