

·基础研究·

游泳及转笼训练对脑缺血再灌注大鼠神经功能及梗死灶Nogo-A、NgR表达的影响*

周媛媛¹ 赵克芳¹ 李立² 李超彦¹

摘要

目的:观察不同强度游泳及转笼训练对脑缺血再灌注大鼠神经轴突生长抑制剂-A(neurite outgrowth inhibitor-A, Nogo-A)、神经轴突生长抑制剂(Nogo receptor, NgR)表达的影响。

方法:将105只Wistar雄性大鼠随机均分为假手术组、对照组和游泳及转笼训练1、2、3组,后4组采用线栓法建立大脑中动脉闭塞实验动物模型,假手术组方法同上,但不阻塞大脑中动脉血流。在造模成功后24h进行游泳及转笼训练,游泳及转笼训练1、2、3组分别于训练后第3天、第7天、第14天行神经功能评分,后处死大鼠取脑免疫组化测定Nogo-A、NgR阳性蛋白的表达。假手术组、对照组不进行训练。

结果:游泳及转笼训练组Bederson行为学评分分别于训练后第3天、第7天、第14天较对照组降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),游泳及转笼训练1、2、3组行为学评分组间比较有显著性差异($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。对照组脑梗死体积与假手术组比较明显增大($P < 0.01$),游泳及转笼训练1、2、3组大鼠与对照组比较,脑梗死体积明显减小($P < 0.01$)。对照组脑梗死组织中Nogo-A表达均明显高于假手术组($P < 0.05$)。训练后第3天,游泳及转笼训练3组Nogo-A表达明显低于对照组($P < 0.05$);第7天,游泳及转笼训练1、2、3组Nogo-A表达均明显低于对照组($P < 0.05$),游泳及转笼训练3组Nogo-A表达明显低于游泳及转笼训练2组($P < 0.05$);训练后第3天、第7天,游泳及转笼训练2、3组NgR表达均明显低于对照组($P < 0.05$),游泳及转笼训练3组NgR表达明显低于游泳及转笼训练2组($P < 0.05$);第14天,游泳及转笼训练3组NgR表达明显低于对照组($P < 0.05$)及游泳和转笼训练2组($P < 0.05$)。

结论:游泳及转笼训练能促进脑缺血再灌注大鼠神经功能恢复,且神经功能恢复与康复训练强度呈正相关,其对脑功能的保护作用可能与降低Nogo-A、NgR表达有关。

关键词 游泳; 转笼; 康复; 脑缺血再灌注; 神经功能; 神经轴突生长抑制剂-A; 神经轴突生长抑制剂-A受体

中图分类号:R743.3, R493 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2016)-01-0020-05

Effects of different intensities of swimming and rolling cage on neurological function and expressions of Nogo-A and NgR in cerebral ischemia reperfusion rats/ZHOU Yuanyuan, ZHAO Kefang, LI Li, et al// Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2016, 31(1): 20—24

Abstract

Objective: To investigate the effects of swimming and rolling cage of different intensities on neurological function and expressions of neurite outgrowth inhibitor-A(Nogo-A) and Nogo receptor(NgR) in cerebral ischemia reperfusion(CIR) rats.

Method: One hundred and five male Wistar rats were randomly divided into sham group, control group and rehabilitation group 1,2,3. Intraluminal thread method was applied to make the left middle cerebral artery occlusion for 2h. After cerebral infarction for 24h, rats in rehabilitation group 1 were trained by swimming once a day for 5min, rolling cage once a day for 20min; Rats in rehabilitation group 2 swimming twice a day for

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2016.01.005

*基金项目:河南省教育厅自然科学基金项目(2011C310012)

1 漯河医学高等专科学校基础医学部,漯河,462002; 2 河南省人民医院神经内科

作者简介:周媛媛,女,硕士,副教授; 收稿日期:2015-02-02

5min each time, rolling cage twice a day for 20min each time; Rats in rehabilitation group 3 swimming twice a day for 10min each time, rolling cage twice a day for 30min each time; the behavioral score and expressions of Nogo-A and NgR in brain tissue were observed on the 3th d, 7th d and 14th d after training. The Sham group and control group had no training.

Result: Bederson evaluation scores decreased significantly in rehabilitation group 1,2,3 compared with control group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$) on the 3th d, 7th d and 14th d after training, it were significantly different among rehabilitation group 1,2,3. The infarction volume of control group were significantly different compared with sham group ($P < 0.01$). The infarction volume of rehabilitation group 1,2,3 decreased significantly compared with control group ($P < 0.01$). Expression of Nogo-A increased in control group compared with sham group ($P < 0.05$), expression of Nogo-A decreased in rehabilitation group 3 compared with control group ($P < 0.05$) on the 3th d, and decreased in rehabilitation group 1,2,3 compared with control group ($P < 0.05$) on the 7th d, Nogo-A of rehabilitation group 3 decreased compared with rehabilitation group 2 ($P < 0.05$). Expression of NgR decreased in rehabilitation group 2,3 compared with control group ($P < 0.05$) on the 3th d and 7th d, NgR of rehabilitation group 3 decreased compared with rehabilitation group 2 ($P < 0.05$) on the 3th d and 7th d, NgR of rehabilitation group 3 decreased compared with control group ($P < 0.05$) and the rehabilitation group 2 ($P < 0.05$) on the 14th d.

Conclusion: The swimming and rolling cage of different intensities can improve the neurological function in cerebral ischemia reperfusion rats, and the intensity was positively correlated with neurologic function recovery. The swimming and rolling cage of different intensities may decrease the expressions of Nogo-A and NgR.

Author's address Department of Basic Medical, Luohe Medical College, Luohe, 462002

Key word swimming; rolling cage; rehabilitation; cerebral ischemia reperfusion; neurological function; neurite outgrowth inhibitor-A; neurite outgrowth inhibitor-A receptor

脑缺血再灌注损伤(cerebral ischemia reperfusion injury, CIR)是一种引发脑卒中后神经功能受损的快速级联反应,其中炎症反应程度与脑损害程度呈正相关,直接影响患者预后^[1]。中枢神经系统内神经轴突生长抑制剂-A(neurite outgrowth inhibitor-A, Nogo-A)与其受体(nogo receptor, NgR)结合后可抑制轴突生长^[2],主要通过激活细胞内炎症信号核转录因子- κ B(nuclear factor-kappa B, NF- κ B)通路^[3]或改变胞内钙离子浓度实现^[4]。研究发现康复训练可以不同程度改善CIR后的神经系统及运动系统功能障碍情况^[5],但机制并不明确。因此本实验通过观察不同强度游泳及转笼训练对CIR后神经系统、运动系统功能及脑内Nogo-A和NgR受体表达的影响,探讨强化游泳及转笼训练对CIR大鼠神经功能恢复的影响及与Nogo-A、NgR的表达相关性可能存在的机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康雄性清洁级Wistar大鼠,共105只,体重(260±55)g,由郑州大学医学院实验动物中心提供(合格证号:20130016)。

1.2 试剂和仪器

试剂:兔抗Nogo-A IgG,兔抗NgR, SABC试剂盒, DAB显色试剂盒均由武汉博士德生物工程有限公司提供。

1.3 模型制备及方法

参照Longa法制作大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型^[6]。腹腔注射(0.35mL/100g)10%水合氯醛,麻醉大鼠后切开颈部皮肤,玻璃针分离右侧颈总动脉、颈内动脉及颈外动脉;夹住右颈总动脉近心端及颈内动脉起始处,于颈总动脉剪一缺口,将线团由缺口入颈内动脉处,结扎颈内动脉起始处,移去动脉夹将线团推进,遇阻力即停,2h后再行灌注并清理伤口。假手术组只分离动脉,不结扎不插线。神经功能学评分1—3分为成功模型,可进行实验。受试大鼠随机分成游泳及转笼训练1组、游泳及转笼训练2组、游泳及转笼训练3

组、对照组及假手术组,每组21只;上述各组按手术或假手术后第3天、第7天、第14天在组内随机分为3个亚组,每个亚组7只。游泳及转笼训练的3组大鼠均从缺血再灌注24h后开始进行游泳及转笼训练:游泳及转笼训练1组大鼠游泳1次/d,5min/次,滚筒训练20min/次,1次/d;游泳及转笼训练2组大鼠游泳2次/d,5min/次,滚筒训练20min/次,2次/d;游泳及转笼训练3组大鼠游泳2次/d,10min/次。滚筒训练30min/次,2次/d。游泳训练时每只鼠单独置于一水深0.6m,0.8m×0.8m×1m的长方体容器内,水温29—31℃。滚筒训练:采用自制滚筒式网状训练器,长55cm,直径45cm,底座用固定架固定,手摇柄转动滚筒,6r/min,对照组、假手术组大鼠不做任何训练,自由活动。

1.4 神经功能评价

在训练后第3天、第7天、第14天进行Bederson行为学评分测定^[7]。无神经功能缺失为0分,不能完全伸展左侧前肢为1分,向左转圈为2分,向左倾倒3分,不能自发行走,意识水平降低为4分。1—3分为成功模型,可进行实验。

1.5 梗死体积测定

各组大鼠于训练后第3天、第7天、第14天分别取3只经左心室灌注生理盐水后断头取脑,于-20℃冰箱冷冻20min,于视交叉处前后间隔2mm连续作脑冠状切片,厚度5μm,每隔10张取1张,共取5张,于2% TTC磷酸盐缓冲液中避光孵育,30min后置于含4%多聚甲醛的PBS液固定。Motic Images Advanced 3.0图像分析系统测定梗死体积。相对梗死体积=直接梗死体积/同侧半球体积×100。

1.6 免疫组化测定

训练后第3天、第7天、第14天分别于评分后取脑组织,切片后行SABC免疫组化染色,利用图像分析系统测定Nogo-A、NgR蛋白含量值。选大鼠右侧大脑半球取相同部位5张脑片,各选5个不重复高倍镜视野(×400),取平均值。

1.7 统计学分析

采用SPSS 18.0统计软件进行分析,所有数值结果用均数±标准差表示,组间比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 神经行为功能

剔除死亡及不成功模型大鼠,大鼠模型成功率为73%。在进行不同强度的游泳及转笼训练后,显示训练后第3天,游泳及转笼训练2、3组行为学评分明显低于对照组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),游泳及转笼训练3组明显低于游泳及转笼训练1组($P < 0.05$);第7天,游泳及转笼训练2、3组行为学评分明显低于对照组($P < 0.01$),游泳及转笼训练2、3组行为学评分明显低于游泳及转笼训练1组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),游泳及转笼训练3组明显低于游泳及转笼训练2组($P < 0.05$);第14天,游泳及转笼训练1、2、3组行为学评分明显低于对照组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),游泳及转笼训练2、3组行为学评分明显低于游泳及转笼训练1组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),游泳及转笼训练3组明显低于游泳及转笼训练2组($P < 0.05$);在各个时间点假手术组评分明显低于对照组($P < 0.01$),假手术组术后评分未见异常变化。见表1。

表1 CIR大鼠Bederson评分比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	训练后第3天	训练后第7天	训练后第14天
假手术组	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
对照组	2.32±0.50 ^①	1.97±0.41 ^①	1.72±0.57 ^①
游泳及转笼训练1组	2.13±0.55	1.86±0.51	1.24±0.65 ^③
游泳及转笼训练2组	1.93±0.50 ^③	1.35±0.57 ^{②④}	0.73±0.56 ^{②④}
游泳及转笼训练3组	1.73±0.31 ^{②④}	0.88±0.47 ^{②⑤⑥}	0.11±0.35 ^{②⑤⑥}

与假手术组比较:① $P < 0.01$;与对照组比较:② $P < 0.01$;③ $P < 0.05$;与游泳及转笼训练1组比较:④ $P < 0.05$;⑤ $P < 0.01$;与游泳及转笼训练2组比较:⑥ $P < 0.05$

2.2 梗死体积比较

与假手术组比较,对照组脑梗死体积有明显差异性变化($P < 0.01$),游泳及转笼训练1、2、3组大鼠与对照组比较,脑梗死体积明显减小($P < 0.01$)。游泳及转笼训练2、3组脑梗死体积明显低于游泳及转笼训练1组($P < 0.01$);游泳及转笼训练3组脑梗死体积明显低于游泳及转笼训练2组($P < 0.01$)。见表2。

2.3 游泳及转笼训练后大鼠脑梗死组织周围Nogo-A及NgR的表达

对照组脑梗死组织中Nogo-A表达均明显高于假手术组($P < 0.05$);训练后第3天,游泳及转笼训

表2 CIR大鼠相对脑梗死体积比较 ($\bar{x}\pm s, \%$)

组别	训练后第3天	训练后第7天	训练后第14天
假手术组	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
对照组	79.56±1.50 ^①	41.70±1.11 ^①	32.62±0.86 ^①
游泳及转笼训练1组	62.63±1.57 ^②	31.86±0.56 ^②	25.31±0.65 ^②
游泳及转笼训练2组	53.13±1.90 ^{②③}	22.85±2.07 ^{②③}	17.73±1.06 ^{②③}
游泳及转笼训练3组	42.18±0.44 ^{②③④}	10.89±1.34 ^{②③④}	9.81±1.33 ^{②③④}

与假手术组比较:① $P < 0.01$;与对照组比较:② $P < 0.01$;与游泳及转笼训练1组比较:③ $P < 0.01$;与游泳及转笼训练2组比较:④ $P < 0.01$
 训练3组 Nogo-A 表达明显低于对照组 ($P < 0.05$);第 7

天,游泳及转笼训练1、2、3组 Nogo-A 表达均明显低于对照组 ($P < 0.05$),游泳及转笼训练3组 Nogo-A 表达明显低于游泳及转笼训练2组 ($P < 0.05$)。见表3。

训练后第3天、第7天,游泳及转笼训练2、3组 NgR 表达均明显低于对照组 ($P < 0.05$),游泳及转笼训练3组 NgR 表达明显低于游泳及转笼训练2组 ($P < 0.05$);第14天,游泳及转笼训练3组 NgR 表达明显低于对照组 ($P < 0.05$)及游泳及转笼训练2组 ($P < 0.05$)。见表4。

表3 游泳及转笼训练后大鼠脑组织 Nogo-A 的表达 ($\bar{x}\pm s$)

组别	训练后第3天	训练后第7天	训练后第14天
假手术组	38077.60±2432.56	7300.12±2504.66	8026.50±2533.80
对照组	43121.56±2567.45 ^①	47170.00±2933.11 ^①	41032.62±2650.36 ^①
游泳及转笼训练1组	42062.63±2549.57	45770.00±2856.55 ^②	40825.61±2800.65
游泳及转笼训练2组	40953.83±2491.69	44322.58±2908.87 ^②	40917.43±3006.05
游泳及转笼训练3组	38542.78±2900.44 ^②	41100.89±2781.34 ^{②③}	39539.81±2911.17

与假手术组比较:① $P < 0.05$;与对照组比较:② $P < 0.05$;与游泳及转笼训练1组比较:③ $P < 0.05$

表4 游泳及转笼训练后大鼠脑组织 NgR 的表达 ($\bar{x}\pm s$)

组别	训练后第3天	训练后第7天	训练后第14天
假手术组	58677.60±3432.56	57696.12±3512.67	58454.50±3243.09
对照组	57631.06±3325.67	55971.00±3229.19	57410.32±3655.70
游泳及转笼训练1组	50204.62±3450.65	49905.00±3328.43	54340.65±3275.45
游泳及转笼训练2组	42855.73±3549.01 ^①	43032.25±3509.09 ^①	53091.66±3110.60
游泳及转笼训练3组	38542.78±2900.44 ^{①②}	41100.89±2781.34 ^{①②}	39539.81±2911.17 ^{①②}

与对照组比较:① $P < 0.05$;与游泳及转笼训练1组比较:② $P < 0.05$

3 讨论

脑缺血后血流中断,随之再灌注是一个连续性的病理生理过程,此过程中发生一系列反应变化,如氧化反应,氨基酸毒性产生、胞内钙稳态失衡、炎症反应通路激活等^[8]。其中的炎性反应程度决定了缺血再灌注后脑损伤的程度。炎性反应的发生与胞内炎症信号 NF-kB 通路的激活有关。Nogo 蛋白、少突胶质细胞——髓磷脂糖蛋白(OMgp)及髓鞘相关蛋白(MAG)是抑制中枢神经系统轴突再生的三种抑制因子,其中 Nogo 蛋白的一种分型 NogoA 蛋白抑制作用最强,通过与受体 NgR 结合^[9],介导胞内炎症信号 NF-kB 通路激活^[10],使得炎性介质释放,如:TNF- α 、IL1 β 、ICAM-1^[11],从而损伤神经元活性,抑制轴突生长。研究也发现降低胞内钙离子浓度可抑制 NogoA 的轴突抑制作用,因此 NogoA 对轴突作用和钙离子浓度变化有一定关系^[4]。

通过康复训练可促进脑梗死大鼠肢体运动功能的改善,下调 Nogo-A/NgR/Rho-A 蛋白水平,降低 Nogo-A 阳性细胞表达^[12];电刺激大鼠运动功能的恢复明显改善,双侧电刺激 Nogo-A 和 NgR 的表达较单侧电刺激组低,提示电刺激的肢体功能改善作用可能与抑制 Nogo-A 和 NgR 的表达有关^[13]。以上结论说明有效干预可改善 CIR 后神经功能下降的状况,并且此作用和降低 Nogo-A 表达有一定的关系。因此我们选取不同强度的游泳转笼训练作用于大鼠,观察模型大鼠的神经功能恢复情况,寻找最适宜的刺激强度,供给临床应用参考;同时测定脑梗死灶周 Nogo-A 和 NgR 的表达,探讨游泳及转笼训练与蛋白表达的相关性进行分析。

本结果发现游泳及转笼训练组行为学评分训练后均降低,且游泳及转笼训练1—3组组间比较有显著性差异,训练后脑梗死体积明显减小,提示康复训

练可以改善 CIR 后神经功能损伤,并且训练强度与神经功能恢复成正比;训练后第 3 天,游泳及转笼训练 3 组 Nogo-A 表达明显低于对照组,第 7 天,游泳及转笼训练 1、2、3 组 Nogo-A 表达均明显低于对照组,游泳及转笼训练 3 组 Nogo-A 表达明显低于游泳及转笼训练 2 组,提示康复训练可能参与了抑制 Nogo-A 蛋白的表达;训练后第 3 天、第 7 天,游泳及转笼训练 2、3 组 NgR 表达均明显低于对照组,游泳及转笼训练 3 组 NgR 表达明显低于游泳及转笼训练 2 组,第 14 天,游泳及转笼训练 3 组 NgR 表达明显低于对照组及游泳及转笼训练 2 组,提示康复训练也与下调 NgR 相关,研究结果与上述观点一致。

综上所述,游泳及转笼训练可促进 CIR 大鼠神经功能恢复,且康复训练强度与神经功能恢复呈正相关,其效应或与降低 Nogo-A、NgR 表达含量,抑制 NF- κ B 通路激活有关,其具体机制尚不清楚,有待进一步研究证实。

参考文献

- [1] Freedman JE, Vitseva O, Tanriverdi K. The role of the blood transcriptome in innate inflammation and stroke[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2010, (1207):41—45.
- [2] Schimmele B, Plückthun A. Identification of a functional epitope of the Nogo receptor by a combinatorial approach using ribosome display[J]. *J Mol Biol*, 2005, 352(1):229—241.
- [3] Hsieh SH, Ferraro GB, Fournier AE. Myelin-associated inhibitors regulate cofilin phosphorylation and neuronal inhibition through LIM kinase and Slingshot phosphatase[J]. *J Neurosci*, 2006, 26(3):1006—1015.
- [4] 熊南翔,赵洪洋,张方成,等.钙离子参与 Nogo-A 抑制轴突生长的作用[J].*解剖学报*,2005,36(6):582—585.
- [5] 李超,温红梅,窦祖林,等.运动训练对脑梗死大鼠运动功能及 Nogo-A/NgR1/Rho-A 的影响[J].*中国康复医学杂志*,2013,28(10):894—898.
- [6] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. *Stroke*, 1989, 20(1):84—91.
- [7] Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, et al. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination[J]. *Stroke*, 1986, 17(3):472—476.
- [8] 梅志刚,王明智,刘晓洁,等.葛根素对大鼠脑缺血再灌注损伤 α 7nAChR、NF- κ Bp65 及 STAT3 mRNA 表达的影响[J].*中华中医药杂志*,2013,28(1):113—117.
- [9] Giger RJ, Venkatesh K, Chivatakarn O, et al. Mechanisms of CNS myelin inhibition: evidence for distinct and neuronal cell type specific receptor systems[J]. *Restor Neurol Neurosci*, 2008, 26(2—3):97—115.
- [10] 戴金祥,陈铿,金卫林,等.Proline rich 结构域介导 Nogo-A 激活 NF- κ B 信号[J].*生物化学与生物物理进展*,2009,36(3):371—377.
- [11] Danton GH, Dietrich WD. Inflammatory mechanisms after ischemia and stroke[J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2003, 62(2):127—136.
- [12] 赵春禹,张通,钮竹,等.强迫性上肢训练对缺血性脑卒中大鼠神经传导束的影响[J].*中国康复理论与实践*,2007,13(5):404—406.
- [13] 杨冰,张秀清,唐吉友,等.电刺激对脑梗死大鼠运动功能恢复及 Nogo-A、NgR 表达的影响[J].*山东大学学报(医学版)*,2008,46(10):931—935.