

·基础研究·

跑笼训练与技巧性取食训练对脑梗死恢复期大鼠认知功能的影响*

孙瑞芳¹ 温红梅^{1,4} 曾妍¹ 李超¹ 孙巨² 张婵娟¹ 曾佩珊¹ 邹淑怡³

摘要

目的:比较脑梗死恢复期进行跑笼训练与技巧性取食训练对短暂性大脑中动脉闭塞(tMCAO)大鼠认知功能的影响。

方法:50只雄性SD大鼠经利手筛选及技巧性取食预训练后,根据tMCAO术后神经功能评分将大鼠分为四组:技巧性取食组(n=7)、跑笼组(n=8)、对照组(n=6)、假手术组(n=6),于术后第1、14、28、42、56天进行改良神经功能缺损程度评分(mNSS),于术后第56天进行Morris水迷宫实验。

结果:从第28天起技巧性取食组与跑笼组的mNSS均低于对照组($P < 0.001$),且技巧性取食组低于跑笼组($P < 0.05$)。水迷宫实验第1天、第2天和第4天跑笼组和对照组平均游泳路径长度较假手术组长($P < 0.05$),第1天和第4天技巧性取食组的平均游泳路径长度较跑笼组和对照组短($P < 0.05$);tMCAO各组穿越平台次数较假手术组少($P < 0.05$),技巧性取食组及跑笼组穿越平台次数较对照组多($P < 0.05$),且技巧性取食组较跑笼组多($P < 0.05$)。

结论:运动训练能够改善脑梗死恢复期大鼠的认知功能,且技巧性取食训练比跑笼训练效果更佳。

关键词 运动训练; 短暂性大脑中动脉闭塞; 恢复期; 认知功能

中图分类号:R743.3, R493 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2018)-04-0392-05

Effects of running wheel exercise and skilled reaching training on the cognitive function in rats with transient middle cerebral artery occlusion at the recovery stage/SUN Ruifang, WEN Hongmei, ZENG Yan, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2018, 33(4): 392—396

Abstract

Objective: To compare effects of running wheel exercise and skilled reaching training on the cognitive function in rats with middle cerebral artery occlusion (tMCAO) at the recovery stage.

Method: Fifty adult male Sprague-Dawley rats after pre-training and handedness filtering were divided into four groups: skilled reaching group (n=7), running wheel group (n=8), control group (n=6) and sham group (n=6) were included in the final behavioral study according to Bederson score. Each group was assessed with mNSS on day 1, 14, 28, 42, 56 and Morris water maze test was carried out on day 56 after operation.

Result: The mNSS was higher in control group than exercise groups($P < 0.001$) and running wheel group's scores were higher than skilled reaching group($P < 0.05$) from day 28. The swimming distance at the first, the second and the fourth day of water maze test were longer in the control group and the running wheel group as compared with that in the sham group($P < 0.05$). And the swimming distance in the skilled reaching group was shorter than that in the control group and running wheel group at the first and the fourth day of water maze test($P < 0.05$). The times of crossing the platform in the tMCAO groups were less than that in the sham group($P < 0.05$). The crossing times in the skilled reaching group and the running wheel group were more than

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2018.04.004

*基金项目:国家自然科学基金面上项目(81472156;81672259)

1 中山大学附属第三医院康复科,广州,510630; 2 广东省广州市番禺区人民法院康复科; 3 中山大学附属第五医院康复科; 4 通讯作者
作者简介:孙瑞芳,女,硕士研究生; 收稿日期:2017-10-15

that in the control group($P < 0.05$). In addition, the times in the skilled reaching group was higher than that in the running wheel group($P < 0.05$).

Conclusion: Exercise training can improve cognitive function of tMCAO rats at recovery stage. In addition, skilled reaching training is superior to running wheel exercise in promoting cognitive rehabilitation.

Author's address Dept. of Rehabilitation Medicine, The Third Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou, 510630

Key word exercise training; transient middle cerebral artery occlusion; recovery stage; cognitive function

目前我国每年新发脑血管病患者约270万,每年死于脑血管病的患者约130万,脑卒中已经成为中国居民第一位死因^[1]。脑梗死占全部脑卒中的70%,具有高发病率、高致残率、高死亡率、高复发率的特点,主要会导致运动功能障碍、认知功能障碍等^[2]。认知功能障碍是脑梗死后常见的功能障碍,影响到其他功能的康复,是脑梗死后功能康复的重点、难点和薄弱之处^[3]。相比于无认知障碍的患者,有认知障碍的患者日常生活受到显著影响,生存质量严重下降,给个人、家庭及社会带来沉重的负担,应予以足够的重视。目前,大多数研究都聚焦于脑梗死急性期的康复干预,恢复期的康复治疗研究较少,且对于脑梗死恢复期的患者,更多的关注点在于运动功能障碍,而认知障碍常被忽略^[4]。既往研究表明,早期运动训练能够改善脑梗死后的运动及认知功能^[5-7],我们的研究显示脑梗死大鼠早期进行跑笼运动与技巧性取食训练对运动功能恢复的作用不同^[8]。本研究从脑梗死恢复期的康复干预入手,比较跑笼训练与技巧性取食训练对脑梗死大鼠恢复期认知功能的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物:SPF级雄性SD大鼠130只,体重240—260g,由广东中医药大学动物实验中心提供,许可证号:SCXK(粤)2013-0034,所有动物均饲养于中山大学(生命科学学院中药与海洋药物实验室)SPF级实验环境中,许可证号:SYXK(粤)2014-0020,采用已消毒颗粒型大鼠饲料喂养,饮用消毒灭菌水,环境温度控制在20—25℃。

1.1.2 主要仪器与试剂:XR-XC105型Morris水迷宫视频分析系统(上海欣软信息科技有限公司),跑笼训练仪器(中国南方科技大学),技巧性取食装置

(自制),4—0硅胶包被线栓[直径(0.37±0.02)mm](深圳瑞沃德生命科技有限公司),10%水合氯醛(国药集团化学试剂有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 技巧性取食预训练:将大鼠置于一个长34cm、宽14cm、高29cm的无盖透明长方体装置中,为防止食物掉入装置内,底部由金属棒构成,掉入装置内的食物可从金属棒之间的间隙掉落,装置前壁中间有一条宽1cm的纵向缝隙供大鼠抓取食物用,一个可移动的平台,平台上距前壁1cm处有一直径1cm、顶部有凹陷的金属杆^[8]。预训练时将食物置于平台上缝隙正中的位置,大鼠吃完一颗食物需转身才给予下一颗食物,15min内吃到25颗食物为达标,达标后将食物置于距离缝隙1cm的位置,使大鼠伸出前肢抓取食物,观察以区分其利手(用同一只手抓取食物≥7/10次抓取)。区分左右利手后,将金属杆置于利手对侧缝隙边缘,以利于利手的抓取,阻止非利手的抓取,每次抓取25次,一天6次,抓取成功率>60%为达标(抓取成功是指抓住并吃掉食物)^[9]。预训练达标后短暂性大脑中动脉闭塞(transient middle cerebral artery occlusion, tMCAO)造模。

1.2.2 tMCAO动物模型制备:将预训练达标的SD大鼠,予以10%的水合氯醛(4ml/kg)腹腔注射麻醉,局部备皮消毒,颈部正中切口2—2.5cm,分离左侧颈总动脉(common carotid artery, CCA),预置缝线备用,沿CCA向上分离颈外动脉(external carotid artery, ECA),结扎CCA及ECA近心端。用微动脉夹夹闭CCA远心端,于CCA两端之间近结扎线处剪一切口,将线栓的硅胶侧从切口插入,用缝线轻轻打一活结,取下动脉夹,稍提ECA继续缓慢插入线栓至感觉到阻力,将CCA远心端的缝线扎紧,剪线缝合手术切口并消毒,90min后将线栓拔出^[10]。假手术组大鼠用10%水合氯醛麻醉后只暴露、分离、结

扎血管,不插线栓。

1.2.3 模型评价:采用改良的Bederson评分方法进行神经功能评分^[11]:0分:无神经功能缺失体征;1分:提尾时损伤对侧前肢屈曲;2分:前肢屈曲及对侧抵抗力下降;3分:向对侧转圈;4分:向对侧转圈及意识障碍;5分:死亡。神经功能评分1—3分的大鼠纳入本研究,最终技巧性取食组13只,跑笼组17只,对照组13只,假手术组12只纳入研究。

1.2.4 动物分组:50只雄性SD大鼠经利手筛选及技巧性取食预训练后,将15只右利手大鼠入组技巧性取食组,其余45只大鼠随机分为:跑笼组、对照组、假手术组。根据tMCAO术后神经功能评分及死亡率,最终入组:技巧性取食组7只、跑笼组8只、对照组6只、假手术组6只。为了统一左侧脑梗死,技巧性取食训练的大鼠均为右利手。

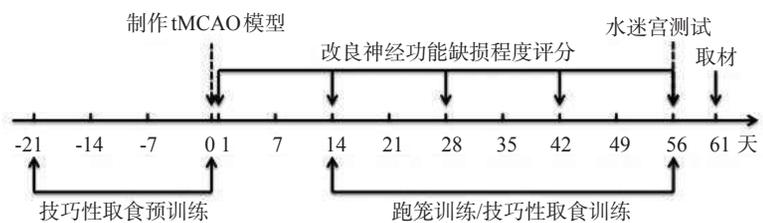
1.2.5 改良大鼠神经功能缺损评分(modified neurological severity scores, mNSS)^[12]:该评分包括运动功能、感觉功能和反射缺失3大项,共计18小项。未能完成该项检查或反射缺失计1分。10—18分为严重损伤,5—9分为中度损伤,1—4分为轻度损伤,于术后第1、7、14、21、28、42、56天评分。

1.2.6 跑笼训练:跑笼训练组大鼠造模后第10—14天开始运动训练。跑笼运动训练采用常用的跑笼训练方法:将大鼠放置在一个直径21cm、长26cm的滚笼中,由马达带动滚笼旋转,方向和转速均可自行调节。术后第10—14天开始训练,每日上、下午各训练1次,训练强度为5r/min,每次训练20min。对照组大鼠不予以上述针对性强化训练,但可在笼内饮水、进食及自由活动。

1.2.7 技巧性取食训练:技巧性取食训练组大鼠造模后第10—14天开始技巧性取食训练^[13],参照已有的方法进行^[8],将大鼠置于技巧性取食装置内,金属杆置于前壁缝隙的左侧,将食物颗粒放置在金属杆顶端,大鼠使用右上肢抓取食物,抓取一颗食物后转身再给下一颗食物,每日上、下午各1次,每次训练20min。对照组大鼠不予以上述训练,但可在笼内饮水、进食及自由活动。

1.2.8 Morris水迷宫实验:Morris水迷宫水池直径160cm、高50cm,水深22cm,水温控制在22—26℃。水池分为一、二、三、四象限,在水池壁各个象限中点分别贴有4个不同形状的标记。选第三象限正中放置高20cm、直径12cm的平台,没入水下2cm,迷宫外参照物保持固定。实验正式开始前1天将大鼠放入水迷宫进行适应;实验连续进行6天,第1—5天为定位航行试验,将大鼠由第一至第四象限面朝池壁的标记放入水中,记录大鼠找到水下平台的路程^[14],即平均游泳路径长度;第6天为空间探索试验,撤去平台,将大鼠从第一象限放入水中,记录其在60s内穿越原平台位置的次数。水迷宫实验在脑梗死后第28天、第56天分别进行,评估大鼠空间学习和记忆能力。见图1。

图1 实验流程图



1.3 统计学分析

应用SPSS 23.0进行数据分析,对所有数据进行正态性检验,符合正态分布即用均数±标准差表示。改良神经功能缺损评分、每日平均游泳路径长度的结果采用重复测量的方差分析,若存在交互效应则进行重复测量设计的简单效应分析,若无交互效应则对每个时间点进行单因素方差分析。穿越原平台所在位置次数的结果采用单因素方差分析,不符合方差齐性的采用秩和检验。

2 结果

2.1 改良神经功能缺损程度评分结果

改良神经功能缺损评分结果经重复测量方差分析存在交互效应($F=68.95, P < 0.001$),进行重复测量设计的简单效应分析。脑梗死各组大鼠与假手术组相比均有运动、感觉障碍($F=170.40, P < 0.001$),随着观察时间的延长,各组运动、感觉功能逐渐改善($F=811.02, P < 0.001$),从第28天起技巧性取食组与跑笼组均优于对照组($P < 0.001$),且技巧性取食组

优于跑笼组($P < 0.05$),见表1。

2.2 Morris水迷宫实验结果

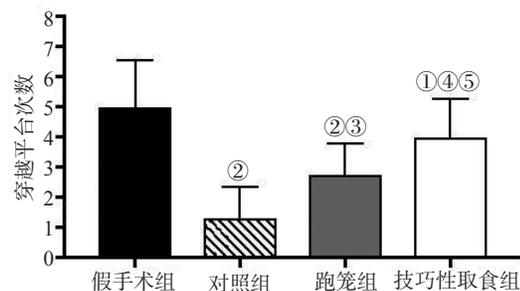
2.2.1 定位航行实验结果:每日平均游泳路径长度结果经重复测量方差分析存在交互效应($F = 3.178$, $P < 0.05$),采用重复测量设计的简单效应分析。各组每日平均游泳路径长度均随观察时间逐渐缩短($F = 58.33$, $P < 0.001$),水迷宫实验第1天、第2天和第4天跑笼组和对照组平均游泳路径长度较假手术组长($P < 0.05$),第1天和第4天技巧性取食组的平均游泳路径长度较跑笼组和对照组短($P < 0.05$)(图2)。

2.2.2 空间探索实验结果:脑梗死大鼠穿越原平台所在位置的次数结果经正态性检验和方差齐性检验,符合正态分布及方差齐性($P > 0.1$),采用单因素方差分析。tMCAO各组穿越平台次数均较假手术组少($P < 0.05$),技巧性取食组与跑笼组较对照组多($P < 0.05$),且技巧性取食组较跑笼组多($P < 0.05$),见图3。

3 讨论

运动训练是脑梗死后常用的康复治疗方法,既往脑梗死后运动训练的诸多研究关注点都在于脑梗

图3 脑梗死大鼠穿越原平台所在位置的次数



与假手术组相比:① $P < 0.05$;② $P < 0.001$;与对照组相比:③ $P < 0.05$;④ $P < 0.001$;与跑笼组相比:⑤ $P < 0.05$

死急性期,而且没有研究对比跑笼训练与技巧性取食训练在改善脑梗死大鼠认知功能中的不同。因此本研究从脑梗死恢复期的康复训练出发,对比了技巧性取食训练与跑笼训练对脑梗死恢复期大鼠认知功能的影响,为今后临床康复治疗工作提供参考。

本研究发现缺血90min再灌注大鼠tMCAO术后存在认知功能障碍,进一步证实了我们之前制作的脑梗死后认知障碍模型的可靠性^[10]。之前的研究观察到术后28天,本研究观察到术后56天,发现认知功能障碍持续存在,与既往研究结果一致^[15-16],而不像运动、感觉功能障碍随着时间逐渐恢复,为卒中后认知障碍的干预治疗提供了较长的时间窗。我们发现脑梗死后第10—14天开始的跑笼训练可以改善认知功能,既往研究的跑笼运动均在急性期开始,表明急性期跑笼训练能够改善脑梗死大鼠的认知功能^[17-18],在脑梗死恢复期进行跑笼训练为本研究的一个创新点,为临床上脑梗死恢复期运动训练干预提供了实验依据。

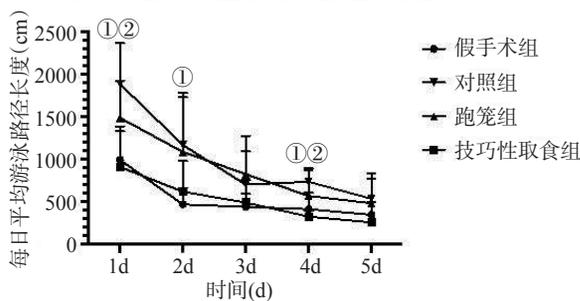
本实验发现脑梗死后第10—14天开始的技巧性取食训练能改善认知功能,既往研究大多从脑梗死急性期开始进行技巧性取食训练,表明急性期技巧性取食训练能够改善患侧上肢的运动功能^[19],有研究表明大鼠脑出血急性期技巧性取食训练能够增加海马部位GAP-43的表达,从而推断技巧性取食训练能够改善脑出血大鼠的认知功能^[20],有关恢复期技巧性取食训练的研究将其作为一种评估手段,故脑梗死恢复期技巧性取食训练对认知功能的影响

表1 脑梗死大鼠改良神经功能缺损评分 ($\bar{x} \pm s$, 分)

时间点	假手术组 (n=6)	对照组 (n=6)	跑笼组 (n=8)	技巧性取食组 (n=7)
第1天	1.00±0.00	10.50±0.84 ^①	9.88±0.84 ^①	10.29±0.76 ^①
第14天	0.50±0.50	5.67±0.52 ^①	5.00±0.76 ^①	5.00±0.82 ^①
第28天	0.00±0.00	4.67±0.52 ^①	2.88±0.35 ^{①③}	2.14±0.90 ^{①③④}
第42天	0.00±0.00	4.00±0.18 ^①	2.75±0.46 ^{①③}	1.14±0.90 ^{①③⑤}
第56天	0.00±0.00	3.50±0.50 ^①	2.13±0.64 ^{①③}	0.71±0.76 ^{②③⑤}

与同时间假手术组相比:① $P < 0.001$;② $P < 0.05$;与同时间对照组相比:③ $P < 0.001$;与同时间跑笼组相比:④ $P < 0.05$;⑤ $P < 0.001$

图2 术后56d脑梗死大鼠每日平均游泳路径长度



跑笼组、对照组与假手术组相比:① $P < 0.05$;技巧性取食组与跑笼组、对照组相比:② $P < 0.05$

为本研究的另一创新点,为临床上脑梗死恢复期运动训练提供不同的选择。

技巧性取食训练能够改善脑梗死大鼠的认知功能,其可能的原因是运动活动的增加是灰质和白质可塑性的有效刺激因子,技巧性取食训练能够促进少突胶质细胞亚型的转化,使感觉运动皮质和胼胝体新分化的GST π^+ 和CNPase $^+$ 少突胶质细胞的数量增加^[21],从而促进神经功能的恢复。技巧性取食训练后,海马部位的生长相关因子(GAP-43)表达增加,GAP-43聚集于生长锥,与记忆信息及突触可塑性密切相关^[20]。技巧性取食训练能够增加脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)的表达,而BDNF可能会通过影响大脑的分子变化促进神经可塑性^[22]。此外,技巧性取食训练还能够促进皮质脊髓束选择性的轴突重塑,有助于对大脑功能的恢复^[23]。

跑笼训练与技巧性取食训练在改善脑梗死后认知功能方面的比较目前还没有相关研究,是本研究的另一创新点。本研究通过对比发现相同时间的简单重复运动和复杂的技巧性运动对脑梗死后认知功能的改善效果不同,可能的原因是技巧性取食训练是一种复杂的高难度运动训练,不仅需要前肢的精细运动,而且需要认知的参与(运动学习、通过思考调整姿势)^[9],此外,有研究表明,前肢的感觉运动与认知功能密切相关,前额叶皮质是接受来自前肢的感觉、预测前肢运动的重要脑区^[24]。本研究提示,临床上采用对患侧上肢有针对性、需要通过学习和思考来完成的运动训练方法,有可能达到较简单重复运动更好的认知康复效果,尚需要进一步的临床研究进行验证。我们下一步拟对两种运动训练模式改善脑梗死后认知功能的机制进行探讨。

参考文献

[1] 国家卫生计生委防治工程委员会. 中国卒中流行报告2015[M]. 北京:中国协和医科大学出版社,2015.

[2] 吴亚哲,陈伟伟. 中国卒中流行概况[J]. 心脑血管病防治杂志, 2016,16(6):410—414.

[3] Cumming TB, Marshall RS, Lazar RM. Stroke, cognitive deficits, and rehabilitation: still an incomplete picture[J]. Int J Stroke, 2013, 8(1):38—45.

[4] 中国卒中学会卒中后认知障碍管理专家委员会. 卒中后认知障碍管理专家共识[J]. 中国卒中杂志,2017,12(6):519—531.

[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表达的影响[J]. 中国康复医学杂志,2013, 28(10):894—903.

[6] Karssemeijer EG, Bossers WJ, Aaronson JA, et al. The effect of an interactive cycling training on cognitive functioning in older adults with mild dementia: study protocol for a randomized controlled trial[J]. BMC Geriatrics, 2017, 17(1): 73.

[7] Jonasson LS, Nyberg L, Kramer AF, et al. Aerobic exercise intervention, cognitive performance, and brain structure: results from the physical influences on brain in aging(PHIBRA) study[J]. Front Aging Neurosci, 2017, (8):336.

[8] Zhang C, Zou Y, Li K, et al. Different effects of running wheel exercise and skilled reaching training on corticofugal tract plasticity in hypertensive rats with cortical infarctions [J]. Behav Brain Res, 2018, (336):166—172.

[9] Zemmar A, Kast B, Lussi K, et al. Acquisition of a high-precision skilled forelimb reaching task in rats[J]. J Vis Exp, 2015, (100):e53010.

[10] 孙巨,温红梅,李超,等. 不同缺血再灌注时间对脑梗死大鼠运动及认知功能的影响[J]. 中国康复医学杂志,2017,32(5):495—500.

[11] Tan F, Li H, Ma M, et al. Protective effect of treatment with low-dose glioclazide in a model of middle cerebral artery occlusion and reperfusion in rats[J]. Brain Res, 2014, (1560):83—90.

[12] Gao Y, Chen T, Lei X, et al. Neuroprotective effects of polydatin against mitochondrial-dependent apoptosis in the rat cerebral cortex following ischemia/reperfusion injury[J]. Mol Med Rep, 2016, 14(6):5481—5488.

[13] Adkins DL, Jones TA. D- amphetamine enhances skilled reaching after ischemic cortical lesions in rats[J]. Neurosci Lett, 2005, 380(3):214—218.

[14] 潘华,李强. 论游泳训练对不同性别大鼠Morris水迷宫测试成绩的影响[J]. 西南师范大学学报(自然科学版),2012,37(10): 163—167.

[15] Yousuf S, Atif F, Sayeed I, et al. Long-term behavioral deficits and recovery after transient ischemia in middle-aged rats: Effects of behavioral testing[J]. Restor Neurol Neurosci, 2015, 33(3):251—261.

[16] Mijajlović MD, Pavlović A, Brainin M, et al. Post-stroke dementia - a comprehensive review[J]. BMC Medicine, 2017, 15(1):11.

[17] Toval A, Baños R, De la Cruz E, et al. Habituation training improves locomotor performance in a forced running wheel system in rats[J]. Front Behav Neurosci, 2017, (11): 42.

(下转第418页)