

·基础研究·

康复训练对缺血性脑卒中小鼠突触蛋白 I 和突触后致密蛋白-95 表达的影响*

张秋月¹ 郑 卉¹ 姚智超¹ 张小郁¹ 汪江碧^{1,2}

摘要

目的:探究局部缺血性脑卒中后康复训练对突触蛋白 I (Synapsin I) 和突触后致密蛋白-95(PSD-95)表达的影响。
方法:光栓法建立局部缺血脑卒中模型,随机分为假手术组(n=9)、缺血组(n=9)、缺血+训练组(n=9),术后 16h 开始对缺血+训练组进行康复训练,持续至 21 天,分别于术后第 1、3、7、14、21 天对小鼠进行行为学测试。康复训练的方法有加速转棒训练、爬梯子训练、平衡木训练、悬挂训练,2 次/d。21 天后取脑做 Western Blot 分析 Synapsin I、PSD-95 的表达水平。
结果:行为测试结果表明,脑卒中后第 1 天缺血组和缺血+训练组疲劳转棒的成绩和抓力显著低于假手术组($P<0.01$),在训练后第 3 天,缺血+训练组转棒成绩增高至假手术组水平,均明显高于缺血组($P<0.05$),在训练第 7 天后,转棒成绩三组间无差异;前肢抓力恢复较慢,训练第 7 天后,缺血+训练组抓力提高至假手术组水平,较缺血组高($P<0.05$)。Western Blot 结果显示,术后 21 天,缺血组 PSD-95 表达水平明显低于假手术组($P<0.01$),缺血+训练组显著高于缺血组($P<0.01$);Synapsin I 表达水平缺血组较假手术组低($P<0.05$),缺血+训练组显著高于缺血组($P<0.01$)。
结论:局部缺血性脑卒中后康复训练促进小鼠脑功能恢复与突触蛋白 Synapsin I 和 PSD-95 表达的增加有关。
关键词 脑缺血;康复训练;动物行为;突触蛋白;突触蛋白 I;突触后致密蛋白-95
中图分类号:R743.3;R493 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2019)-03-0262-07

Effects of rehabilitation training on Synapsin I and PSD-95 expression following ischemic stroke in mice/
ZHANG Qiuyue, ZHENG Hui, YAO Zhichao, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2019, 34
(3): 262—266

Abstract

Objective: To explore the effect of functional recovery of rehabilitation training and its mechanism following ischemic stroke in mice.
Method: Ischemic stroke was induced by photothrombosis. All mice were randomly divided into three groups: sham group, ischemia group and Ischemia + training group. In training group, the training was performed from 16h after operation and lasted for 21 days. The methods of rehabilitation training include accelerated rotarod training, climb ladder training, balance beam training and hanging wire training twice a day. Behavioral tests were given at 1, 3, 7, 14, and 21 days. All animals were decapitated at 21 days. The expression of PSD-95 and Synapsin I were detected by Western Blot.
Result: Rotarod performance and limb grip in ischemia group and ischemia+training group were reduced significantly compared to sham group at 1 day after stroke ($P<0.01$). Compared to ischemia group, rotarod performance in ischemia+training group was raised to the sham group level at 3 days following stroke ($P<0.05$). There were no significance among three groups from 7 days after stroke. Limb grip restored more slowly.

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2019.03.003

*基金项目:国家自然科学基金面上项目(31471045)

1 兰州大学基础医学院,甘肃省,兰州市,730000; 2 通讯作者

作者简介:张秋月,女; 收稿日期:2018-03-15

Grip increased to sham group level after 7days training with significant difference with ischemia group ($P<0.05$). Western Blot analysis revealed the level of PSD-95 and Synapsin I in ischemia group reduced significantly compared to sham group ($P<0.01$, $P<0.05$, respectively). However, both of them were increased significantly after training ($P<0.01$).

Conclusion: Increased Synapsin I and PSD-95 may involve in promoting functional recovery in ischemic stroke mice.

Author's address School of Basic Medicine, Lanzhou University, Lanzhou, 730000

Key word ischemic stroke; rehabilitation training; animal behavior; synaptic protein; Synapsin I; PSD-95

脑卒中目前已成为世界公认的三大致死疾病之一,其中缺血性脑卒中约占脑卒中总数的60%,患者中有70%以上会出现不同程度的后遗症^[1-2]。临床目前最有效的治疗方法是溶栓治疗,但溶栓治疗的窗口期短,并有一定的出血风险^[3-4]。临床实践已表明,缺血性脑卒中患者的部分脑功能可通过康复训练逐渐恢复,但具体的细胞和分子机制尚不清楚。Pagnussat等^[5]比较了非技巧性训练和技巧性训练后发现,虽然只有技巧性训练提高了缺血后大脑突触蛋白(Synapsin) I和突触后致密蛋白95(postsynaptic density protein 95, PSD95)的表达水平,但也说明了脑功能的恢复与突触蛋白之间有一定的关系。

越来越多的实验数据表明,脑卒中引起的功能丧失可以通过适当的运动获得不同程度的恢复,其恢复的程度与运动开始的时间以及运动的类型及方式密切相关^[6-7]。功能的恢复与神经环路的重建有关,而神经环路的重建有赖于神经元之间突触的形成,因此,如何有效刺激神经元建立新的突触对脑功能的恢复至关重要^[8]。实验数据也表明脑功能的损伤与修复会伴随着突触数量或密度的改变^[9]。突触传递受许多蛋白的调控,其中 Synapsin I 和 PSD-95 与谷氨酸的释放以及受体功能有关,因此在脑损伤恢复的研究中显得尤为重要^[5]。许多研究表明,药物治疗和物理干预促进脑损伤和老年痴呆的功能恢复与 Synapsin I 和 PSD-95 表达水平的升高有关^[10]。本研究旨在通过动物行为测试和分子检测技术,探究脑缺血性损伤后功能的恢复与突触蛋白 Synapsin I 和 PSD-95 之间的关系,为进一步揭示康复训练促进脑功能恢复的机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

成年昆明鼠(18—22g),雌雄不拘(由兰州大学动物实验中心提供),18—22℃,12h—12h黑—白交替饲养,自由进食水。预训练3天后,进行手术,随机分为假手术组、缺血组、缺血+训练组。

1.2 方法

1.2.1 预训练:所有小鼠术前进行3天的预训练。方法为先将小鼠放于静止的疲劳转移棒(ZB-200中国成都)上5min,待小鼠熟悉后,启动转棒,在5min内将速度从10r/min匀加速至40r/min,小鼠掉落重新放回转棒直至训练结束^[11]。进行3轮训练,每轮间隔5min,每天2次。

1.2.2 术前动物挑选:经过3天训练后,挑选在疲劳转棒上能坚持200s以上的小鼠,然后将一个自制的三角形握持装置连接至高敏的张力传感器(JZ300中国北京)上,采用BL-410生物信息采集系统软件测量小鼠前肢抓力:使小鼠前肢抓住金属三角杆,缓慢向后拖拽鼠尾,当小鼠前肢松开时该系统记录的最高值即为小鼠前肢最大抓力,每只小鼠测5次,计算平均值,挑选前肢抓力超过60g的小鼠用于后续实验。

1.2.3 建立缺血性脑卒中模型:局部缺血脑卒中模型:利用光化学栓塞法建立脑缺血动物模型^[12],腹腔注射盐酸氯胺酮(100mg/kg)/甲苯噻嗪溶液(15mg/kg)麻醉后,将小鼠固定在手术台上,做头部正中切口,用牙科钻于感觉运动皮质区(Bregma点右1.5mm,后0.5mm处为中心)打磨头骨至小血管在解剖镜下清晰可见为止,眼窝窝静脉丛注射孟加拉红(10mg/ml, 4ml/kg),用绿光照射3min,照射面积为1.0mm²。于术后12h进行神经功能评分,方法参照改良的Bederson标准^[13],选择评分2—3分(提尾时右侧前肢屈曲或爬行时向右侧转圈及追尾现象)的小鼠作为实验对象。随机分为缺血组和缺血+训

练组。假手术组仅用绿光照射不注射孟加拉红。而后对缺血+训练组小鼠术后16h开始进行康复训练持续至21天。

1.2.4 康复训练方法:加速转棒训练:将小鼠放在疲劳转棒仪上,在5min内转速从10r/min匀加速至20r/min,掉落的小鼠需重新放回转棒上,直至训练结束,每天两次^[12]。主要训练小鼠增强体力和耐力以及锻炼感觉运动的协调能力。

爬梯子训练:将一根50cm长的梯子斜靠在墙上(与地面呈60°夹角,格与格间为2cm),让小鼠从上至下,又从下至上,来回往返3次,每天训练2次^[12]。主要训练小鼠全身的协调能力。

平衡木训练:取一根长1.2m的木棒平放在距地面7cm高的支架上,让小鼠反复从一侧爬到另一侧。5min/次,2次/d^[12]。主要训练小鼠的平衡功能。

悬挂训练:将小鼠悬挂在一根长75cm,直径1.5mm,距地面50cm的铁丝一端,诱导其利用两前肢交替运动从一侧爬到另一侧,5min/次,2次/d^[12]。主要训练小鼠前肢的抓握能力。

上述训练的强度循序渐进进行。小鼠造模后初始训练时由于肢体瘫痪明显,实验人员需要给予必要的辅助。以上训练只针对缺血+训练组小鼠。

1.2.5 行为学测试:分别对所有小鼠于术前和术后1、3、7、14、21天进行行为测试。

疲劳转棒测试:将小鼠放于静止的转棒上5min,待小鼠适应后,启动转棒,在5min内匀加速从10r/min至40r/min,记录小鼠掉落的时间,每只小鼠测3次,间隔5min^[12],求平均值,用于统计学分析。

抓力测试:让小鼠前肢抓住金属三角杆,缓慢向后拖拽小鼠尾巴,当小鼠前肢松开时记录最高值即为最大抓力^[12],每只小鼠测5次,求平均值,用于统计分析。

1.2.6 取材:在21天后,将各组小鼠用乌拉坦(150mg/ml)麻醉(0.17ml/20g),用PBS溶液30ml进行心脏灌流,取脑,于-80℃冻存,做Western Blot时分别取分布在感觉运动皮质区的梗死区及其周围1—2mm脑组织用于蛋白的检测分析。

1.2.7 Western Blot:裂解提取蛋白,制成蛋白样,电泳,转膜,用奶粉-TBST溶液封闭,加一抗(1:2000, Anti-Synapsin I (Cell Signaling, cat#5297) Anti-

PSD95(abcam ab12093))4℃过夜,二抗(1:5000(中山金桥ZB3201))1h后进行曝光,成像分析。

1.3 统计学分析

所有的行为测试和数据分析均采用双盲法进行。使用SPSS 17.0软件对数据进行统计学分析。行为测试数据采用一般线性模型的重复测量进行分析,均数间进行两两比较。Western Blot数据采用单因素方差分析。所有的结果用均数±标准误来表示, $P<0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 康复训练对缺血性脑卒中小鼠行为学功能的影响

为了验证康复训练的效果,我们分别在术前,术后第1、3、7、14和21天对所有小鼠进行行为学测试,疲劳转棒测试主要用来评价感觉运动协调功能,前肢抓力测试评价前肢的肌力。

行为测试结果显示,术后1天缺血和缺血+训练组小鼠疲劳转棒成绩和前肢抓力显著低于假手术组($P<0.01$),说明本模型是成功的。术后第3天,缺血组的转棒成绩仍然低于假手术组($P<0.05$),但缺血+训练组与假手术组无差异,说明训练促进了缺血后引起的运动功能失调的恢复;术后7天、14天,假手术组、缺血组和缺血+训练组三组间均无显著差异,说明小鼠存在很强的自我恢复能力。前肢抓力测试结果表明,术后第3天,缺血组和缺血+训练组仍明显低于假手术组($P<0.01$),术后第7天,缺血+训练组前肢抓力高于缺血组($P<0.05$),与假手术组无差异,说明训练促进了前肢抓力的恢复,但恢复的速度要明显落后于协调能力的恢复;第14天和21天,缺血+训练组前肢抓力显著高于缺血组($P<0.01$),说明训练进一步促进了肌力的恢复(见图1)。

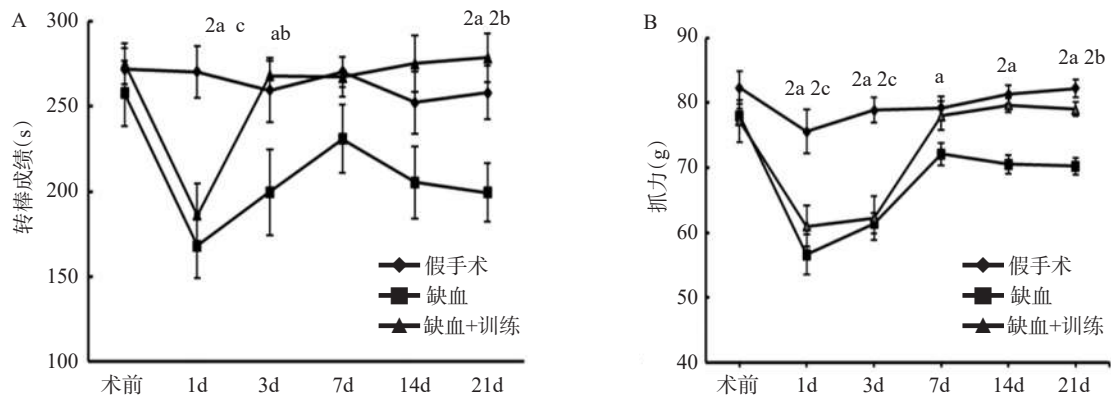
2.2 康复训练对缺血性脑卒中小鼠PSD-95和Synapsin I表达水平的影响

康复训练促进了缺血性脑卒中小鼠功能受损的恢复可能与提高突触的可塑性有关,而PSD-95和Synapsin I是调控突触可塑性的关键分子,为了进一步研究康复训练促进缺血性脑卒中小鼠功能恢复的机制,我们采用Western Blot技术,检测了缺血半影区突触蛋白PSD-95和Synapsin I的表达水平。

结果表明缺血后 Synapsin I 的表达水平较假手术组明显降低($P < 0.05$), PSD-95 的表达水平显著低于假手术组($P < 0.01$), 训练后, Synapsin I 和 PSD-95 的表达水平较缺血组显著升高($P < 0.01$)。说明

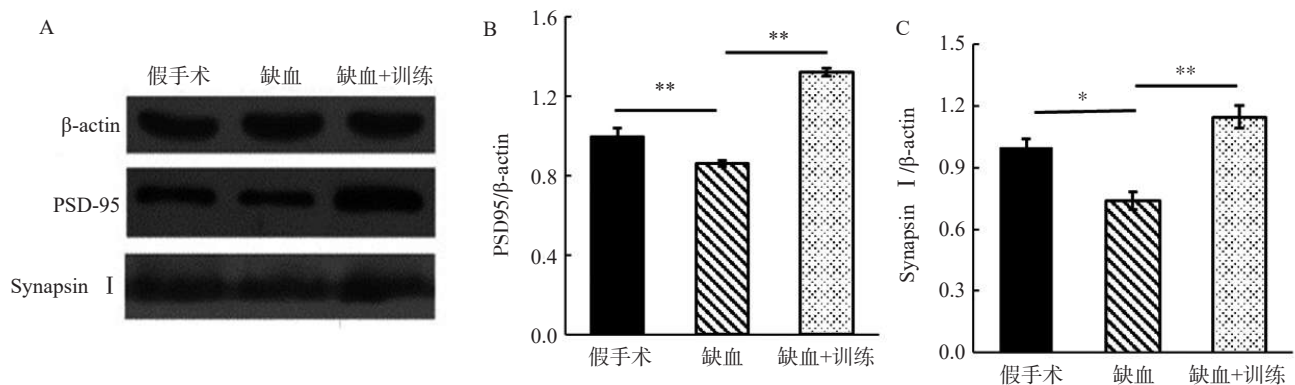
缺血损伤使神经元丢失, 突触数量减少, 而康复训练能够促使损伤周围突触蛋白的表达增强, 提高了突触的可塑性, 从而有利于动物行为的恢复(图2)。

图1 康复训练对缺血性脑卒中小鼠动物行为的影响



A: 为转棒测试结果。从术后3天起, 康复训练促进了缺血后引起的平衡失调的恢复($n=9$)。B: 为前肢抓力测试结果。从术后7天起, 康复训练提高了缺血后引起的前肢抓力的降低($n=9$)。2a: $P < 0.01$, a: $P < 0.05$ (缺血 vs 假手术); 2b: $P < 0.01$, b: $P < 0.05$ (缺血+训练 vs 缺血); 2c: $P < 0.01$, c: $P < 0.05$ (缺血+训练 vs 假手术)。

图2 脑组织损伤区周围中 PSD-95 和 Synapsin I 的表达量



A: 为脑组织损伤区周围 PSD-95 与 Synapsin I Western Blot 结果。B: 为脑组织损伤区周围 PSD-95 的表达量。C: 为脑组织损伤区周围 Synapsin I 的表达量。* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。

3 讨论

康复训练是目前临床治疗脑卒中的有效辅助手段, 且其促进损伤后脑功能恢复的效果已在动物实验和临床试验中得到证实^[14-15]。选择适当的训练方式和训练时长对脑功能的恢复有至关重要的作用, 且康复训练进行的越早, 恢复效果越好^[16]。康复训练促进脑功能恢复的机制虽然还不清楚, 但有实验

表明适宜运动能够减少炎症因子的表达, 增加脑源性生长因子和血管内皮生长因子以及突触蛋白表达^[8,17], 说明适宜的运动能够抑制炎症反应, 促进细胞增殖, 增加突触的可塑性, 机制的进一步阐明将能够更好地指导康复训练在临床上的疗效。

相对于 MCAO 模型和颈总动脉结扎模型, 本实验选用的光化学诱导栓塞的动物模型, 易于操作, 可

重复性好,光照时间及范围均可控,更容易控制缺血部位及范围,可保证脑局部组织永久缺血,且死亡率低^[18]。对缺血性脑卒中小鼠在术后16h进行康复训练,小鼠受损的运动功能得到明显改善,与以往的结果一致,说明及早有效的训练能够促进损伤后的功能恢复^[19-20]。本实验联合使用多种训练方法,包括加速转棒、爬梯子、平衡木、悬挂训练,其中加速转棒训练能够增强动物的体力和耐力,与目前常用跑台训练的目的相一致,另外为了避免从转棒上掉落下来,要求动物跑的速度要与转棒的转速保持一致,因此也训练了小鼠的肢体协调能力^[21]。爬梯子是一种全身性运动,能够促进整个机体的协调能力^[22],平衡木主要是训练小鼠的平衡协调能力^[23],悬挂训练的目的在于迫使患侧肢体的被动使用,促进其功能的恢复^[24],这种全身运动和局部训练相结合的训练方式对于损伤后脑功能的恢复是必要和有效的^[25],说明及早的、适合的、全身性的、多样性的训练方式对于脑功能的恢复至关重要。

脑损伤后,如脑卒中和脑创伤,脑功能的恢复与可塑性密切相关,为了证实康复训练促进脑功能的恢复与大脑可塑性的关系,我们检测了与突触传递相关的关键蛋白:Synapsin I与PSD-95。Synapsin I主要通过磷酸化与去磷酸化作用来调节突触囊泡储存池的稳定、突触囊泡的可移动性、神经递质释放的动力学,Synapsin I磷酸化依赖于 Ca^{2+} 与CaMII结合,进而激活PKA,促使囊泡移动和神经递质的释放^[26],Synapsin I调控着突触传递的效应、神经元的连接,能够反映大脑的可塑性程度^[5,27-28]。本结果显示缺血损伤引起Synapsin I降低,而康复训练促进了其表达水平的提高,说明康复训练促进功能的恢复与提高Synapsin I的表达,增强大脑可塑性密切相关。PSD-95分布在突触后膜上,能够结合多种受体和离子通道以及相关的信号蛋白,比如AMPA受体和NMDA受体以及电压依赖性钾离子通道^[28],调节着突触的成熟和稳定,在突触可塑性中发挥着重要的作用^[27]。PSD-95能够参与NMDA受体的簇集反应,而NMDA受体单独表达则没有这种簇集形成,从而保证了突触信号传递的有效进行^[29]。本结果显示康复训练促进了缺血性脑卒中小鼠PSD-95表达量提高,说明康复训练通过提高PSD-95表达,

增强了突触的可塑性,促进了缺血后脑功能的恢复。

本实验以动物行为以及分子检测技术研究了康复训练对行为恢复和关键突触蛋白的影响,结果表明,康复训练促进了动物行为的恢复与Synapsin I和PSD-95表达水平的提高,这些结果说明,康复训练促进缺血性脑功能恢复的机制可能与突触可塑性有关,具体的信号途径需要在以后的实验中进一步探究。

参考文献

- [1] 吴亚哲, 陈伟伟. 中国脑卒中流行概况[J]. 心脑血管病防治, 2016,16(6):410—414.
- [2] 宇传华, 罗丽莎, 李梅, 等. 从全球视角看中国脑卒中疾病负担的严峻性[J]. 公共卫生与预防医学, 2016,27(1):1—5.
- [3] 曹江慧, 刘广志, 周军, 等. 脑微出血对急性脑梗死患者溶栓治疗后出血转化及功能预后的影响:一项Meta分析[J]. 神经损伤与功能重建, 2015,(5):399—402.
- [4] 姚敏, 吴江. 急性脑梗死溶栓治疗的研究与展望[J]. 脑卒中与神经疾病, 2007,24(1):123—125.
- [5] Pagnussat AS, Simao F, Anastacio JR, et al. Effects of skilled and unskilled training on functional recovery and brain plasticity after focal ischemia in adult rats[J]. Brain Res, 2012,1486:53—61.
- [6] Nie J, Yang X. Modulation of synaptic plasticity by exercise training as a basis for ischemic stroke rehabilitation[J]. Cellular & Molecular Neurobiology, 2017,37(1):5—16.
- [7] Kim G, Kim E. The effects of antecedent exercise on motor function recovery and brain-derived neurotrophic factor expression after focal cerebral ischemia in rats[J]. Journal of Physical Therapy Science, 2013,25(5):553.
- [8] Xing Y, Yang SD, Dong F, et al. The beneficial role of early exercise training following stroke and possible mechanisms[J]. Life Sciences, 2018,198:32—37.
- [9] 徐振华. 针刺不同刺激量对脑缺血后功能恢复及突触可塑性促进作用的研究[J]. 广州中医药大学, 2005.
- [10] 王海潮. Calpain活性与PSD-95在AD模型小鼠脑组织中的表达差异研究[J]. 北京:北京交通大学, 2016.
- [11] 汪江碧. 孕酮联合康复训练对小鼠缺血性脑卒中的影响及机制研究[J]. 兰州大学, 2013.
- [12] Wang J, Feng X, Du Y, et al. Combination treatment with progesterone and rehabilitation training further promotes behavioral recovery after acute ischemic stroke in mice[J]. Restorative Neurology & Neuroscience, 2013,31(4):487—499.
- [13] 李红玲, 赵巧艳, 王红莲, 等. 脑卒中实验动物的行为学检测方法[J]. 中国康复医学杂志, 2006,21(6):560—562.
- [14] Wong R, Ray D, Kendall DA. Progesterone pharmacokinetics in the mouse: implications for potential stroke therapy[J]. Journal of Pharmacy & Pharmacology, 2012,64(11):1614—1620.
- [15] Brown AW, Schultz BA. Recovery and rehabilitation after stroke[J]. Seminars in Neurology, 2010,30(05):511—517.

(下转第279页)