

# 康复训练促进大鼠脑缺血半暗带区星形胶质细胞向神经元转化的作用研究\*

郭金赫<sup>1</sup> 夏青<sup>1,2</sup> 范文<sup>1</sup> 王慎军<sup>1</sup> 郭永明<sup>1</sup>

## 摘要

**目的:**观察不同时间点康复训练对大鼠中动脉栓塞(MCAO)模型大鼠脑缺血半暗带区星形胶质细胞(AS)及新生神经元的影响,研究康复训练对星形胶质细胞转化为神经元的作用及可能机制。

**方法:**选用雄性Wistar大鼠42只,随机分为空白组、1d康复组、1d对照组、7d康复组、7d对照组、14d康复组、14d对照组。各组大鼠造模后进行神经功能评分,评分结果作为各自的0d组。脑缺血后24h开始对大鼠实施康复训练,20min/次/d,于训练后1d、7d、14d进行大鼠运动功能检测和脑组织取材。通过神经功能评分评定大鼠运动功能改善情况;免疫荧光染色法和Western Blot检测缺血半暗带区胶质纤维酸性蛋白(GFAP)、双皮质素(DCX)及神经源性分化因子(NeuroD1)的表达。

**结果:**比较各组前后行为学评分发现,7d康复组、7d对照组、14d康复组、14d对照组有差异性,训练后较0d组评分明显降低( $P<0.001$ );组间比较提示7d康复组行为学评分较7d对照组有明显改善( $P<0.05$ )。免疫荧光法和Western Blot检测GFAP表达发现,14d康复组较14d对照组GFAP表达明显减少( $P<0.01$ );与空白组相比,1d康复组GFAP表达明显增高( $P<0.001$ ),14d康复组GFAP表达明显降低( $P<0.05$ )。免疫荧光法和Western Blot检测DCX表达发现,14d康复组DCX表达较14d对照组明显升高;与空白组比较,14d康复组DCX表达明显升高( $P<0.05$ )。Western Blot检测NeuroD1表达发现,1d、7d康复组较相应对照组NeuroD1表达明显升高( $P<0.05$ );与空白组比较,1d、7d、14d康复组NeuroD1表达均明显升高( $P<0.05$ )。

**结论:**康复训练可有效改善MCAO大鼠的运动功能,活化缺血半暗带区的星形胶质细胞,并使局部新生神经元增多,且新生的神经元有可能是在神经源性分化因子NeuroD1的调控下由星形胶质细胞转化而来的。

**关键词** 康复训练;脑缺血;半暗带;星形胶质细胞;神经元;NeuroD1

**中图分类号:**R493,R743 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2019)-12-1403-08

Effects of rehabilitation training on the transformation of astrocytes into neurons in the ischemic penumbra region/GUO Jinhe, XIA Qing, FAN Wen, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2019, 34 (12): 1403—1410

## Abstract

**Objective:** Observing the effects of rehabilitation training at different time points on astrocyte (AS) and neonatal neurons in the cerebral ischemic penumbra of rats with middle cerebral artery occlusion (MCAO) model. Studying the role and possible mechanisms in AS transforming into neurons.

**Method:** Forty-two male Wistar rats were randomly divided into blank group, 1d rehabilitation group, 1d control group, 7d rehabilitation group, 7d control group, 14d rehabilitation group and 14d control group. Neurological function of rats in each group was evaluated after modeling, and the scoring results were taken as their 0d group. 24 hours after cerebral ischemia, rehabilitation training for rats started daily, 20min/d. Motor function

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2019.12.003

\*基金项目:天津市应用基础与前沿技术研究计划青年项目(16JCQNJC12400);天津市教委科研计划项目(2017KJ163)

1 天津中医药大学,天津市,301617; 2 通讯作者

作者简介:郭金赫,男,博士研究生; 收稿日期:2018-11-17

test and brain tissue were taken at day 1, day 7 and day 14. 4 kind scores were taken for ethological evaluation. The expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP), double cortisol (DCX) and neurogenic differentiation factor(NeuroD1) in the ischemic penumbra was detected by immunofluorescence staining and Western Blot.

**Result:** The ethological scores decreased gradually in both groups, but the rehabilitation group decreased even more( $P<0.001$ ). Immunofluorescence and Western Blot detection showed that expression of GFAP in rehabilitation group was significantly lower than control group at day 14( $P<0.01$ ). Comparing with the blank group, the expression of GFAP in the 1d rehabilitation group was significantly higher( $P<0.001$ ), and significantly lower in 14d rehabilitation group( $P<0.05$ ). Immunofluorescence and Western Blot detection showed that the DCX expression in the 14d rehabilitation group was significantly higher than the 14d control group and blank group( $P<0.05$ ). The expression of NeuroD1 in the rehabilitation group was significantly higher than that in the control group at day 1 and day 7( $P<0.05$ ), and significantly higher than that in blank group at day 1,7 and 14( $P<0.05$ ).

**Conclusion:** Rehabilitation training can effectively improve the motor function of MCAO rats, activate astrocytes in the ischemic penumbra, and increase local neonatal neurons. Neonatal neurons may be transformed from the astrocyte glial cells under the control of neurogenic differentiation factors NeuroD1.

**Author's address** Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, 301617

**Key word** rehabilitation training; cerebral ischemia; penumbra; astrocytes; neurons; NeuroD1

脑卒中具有高发病率、高死亡率、高致残率的特点<sup>[1]</sup>。中国每年新增脑卒中患者数量以及发病率增长速度均高于世界平均水平。中国已成为全世界脑卒中发病率最高、死亡率次高的国家<sup>[2]</sup>。康复训练作为脑卒中患者不可或缺的治疗方案,其临床作用显著。大量临床研究表明,康复训练能够有效促进脑缺血后功能障碍的恢复,其机制可能与脑的重塑有关<sup>[3-4]</sup>。星形胶质细胞(astrocyte, AS)作为脑内重要的细胞种类之一,以往的研究多将其看做神经元的支持细胞,认为其功能包括为神经元提供营养等。因此,有关星形胶质细胞在康复训练改善脑卒中功能障碍的作用研究也大都集中在它的保护功能上。然而近年来的大量研究使人们对星形胶质细胞有了新的认识。2014年10月《科学》报道,通过追踪诱导脑卒中的小鼠,脑损伤区域的星形胶质细胞可以发育为成熟的神经元<sup>[5]</sup>。美国宾夕法尼亚州立大学的研究人员于2015年利用小分子化合物成功地将神经胶质细胞重编程为具有功能的神经元<sup>[6]</sup>。因此,在一定的刺激条件下,大脑内的星形胶质细胞具有转化为神经元的潜能。本研究以大脑中动脉栓塞大鼠为模型,探讨康复训练改善脑缺血功能障碍的部分机制,为临床应用提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

选用230—250g清洁级雄性Wistar大鼠(北京维通利华实验动物技术有限公司)42只。

### 1.2 药品与试剂

小鼠抗胶质纤维酸性蛋白(GFAP)、兔抗双皮质素(DCX)、Alexa Fluor488标记山羊抗小鼠IgG、Alexa Fluor 594—驴抗兔IgG,由英国Abcam公司提供;Protein G Magnetic Beads,由Cell Signaling公司提供;BCA蛋白浓度测定试剂盒(增强型),由Bioswamp公司提供。

### 1.3 仪器

Cryotome E型冰冻切片机(Thermo,美国);ECLIPSE TI—SR型倒置荧光显微镜(NIKON,日本);DS—U3型成像系统(NIKON,日本);mini protean 3 cell型电泳仪(BIO—RAD,美国);酶标仪(雷勃,芬兰);离心机(Eppendorf,德国);UPT优普特实验室超纯水器(Millipore,法国)。

### 1.4 动物分组及康复训练

将42只大鼠随机分为空白组、1d康复组、1d对照组、7d康复组、7d对照组、14d康复组、14d对照组,每组6只。除空白组外,其余各组均采用线栓法制作大鼠大脑中动脉栓塞模型(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型。各组大鼠造模后进行神经功能评分,评分结果作为各自的0d组。其中对照组大鼠造模后不进行干预措施,自由活动;康复组大鼠在脑缺血24h后,实施康复训练。训练方式

包括自制滚筒式网状训练、平衡木训练、转棒训练、网屏训练,每个项目训练5min,共20min/次/d,训练周期分别为1d、7d、14d。康复训练疗效指标以大鼠运动功能评分为主。训练结束后进行运动功能评分、脑组织取材。

### 1.5 线栓法制作大鼠MCAO模型

综合Zea Longa<sup>[7]</sup>和陈春富等<sup>[8]</sup>的方法,先麻醉大鼠,将大鼠固定在鼠板上。剪去颈前的鼠毛,用碘伏消毒,沿颈部正中切开皮肤,钝性分离皮下组织,分离到气管前肌后,沿右侧胸锁乳突肌肌腱向下分离,见到搏动点后,小心分离动脉鞘、迷走神经,分离好后见光滑的颈总动脉(CCA),随后分离颈内动脉(ICA)和颈外动脉(ECA)。在近心端结扎颈总,并结扎颈外,在颈总动脉靠近分叉处系上一根棉线,但不要系紧,以备结扎线栓用。用动脉夹夹闭颈内动脉,随后用眼科剪在颈总动脉上剪一小口,插入鱼线,松开动脉夹,将鱼线缓缓送入颈内动脉,插入深度约18—20mm左右。扎紧线栓,缝合皮肤,用碘伏擦净并消毒颈部皮肤,防止感染。手术后将大鼠放在温室保温。

### 1.6 行为学评定

待大鼠苏醒后,对其进行行为学评分,剔除评分过低、造模不成功者,其余记录评分。使用同一批次大鼠,继续造模,保证每组大鼠数量满足实验需求。1d、7d、14d后再次对大鼠进行评分。行为学检测评分结果采用综合评分,即各项评分相加后的评分<sup>[9-10]</sup>,具体评定方法及标准如下:

神经功能评定:按Bederson等制定的标准评分,评分分为4级。0分:未见行为缺陷;1分:前肢屈曲(即提尾悬空实验阳性);2分:侧推抵抗力下降(即侧向推力实验阳性),伴前肢屈曲,无转圈行为;3分:同2级行为,伴自发性旋转。

平衡木行走测评:评分标准共分6个等级。0分:能跳上平衡木,在上面行走不会跌到;1分:能跳上平衡木,在上面行走,跌倒机会少于50%;2分:能跳上平衡木,在上面行走,大于50%;3分:在健侧后肢帮助能跳上平衡木,但受累的瘫侧后肢不能帮助向前移动;4分:在平衡木上不能行走,但可坐在上面;5分:将鼠放在平衡木上会掉下来。

转棒上行走测评:评分标准分为4个等级。0

分:转动过程中,鼠可在棒上行走;1分:转动过程中,鼠不会掉下来,时间60s以上;2分:转动开始后鼠从棒上掉下来;3分:转动开始前,鼠就从棒上掉下来。

网屏实验:评分标准分为4个等级。0分:前爪握住网屏大约5s之久,不会掉下来;1分:暂时握住网屏,滑落一段距离,但没有掉下来;2分:在5s内掉下来;3分:网屏转动时,鼠即刻掉下来。

### 1.7 分子生物学检测指标

免疫荧光法检测缺血半暗带GFAP、DCX表达:用4%多聚甲醛对大鼠进行脑组织固定并取材(心脏灌注),距额叶前端3mm和9mm处切取半暗带,保留中间6mm厚的脑组织块。随后将脑组织放进蔗糖溶液中进行梯度脱水处理。脱水后用OCT包埋组织,放入冰冻切片机内进行冠状面连续切片,切片厚度为8μm。水浴锅持续加热切片,使用EDTA抗原修复缓冲液进行抗原修复,时间约15min。自然冷却后在脱色摇床上。晃动洗涤3次,每次5min。切片稍甩干后滴加3%BSA均匀覆盖组织,室温封闭30min。轻甩掉封闭液,在切片上滴加稀释好的小鼠来源GFAP一抗(1:400)或兔来源DCX一抗(1:500),切片平放于湿盒内4℃孵育过夜。(湿盒内加少量水防止抗体蒸发)。第二天将玻片置于脱色摇床上晃动洗涤3次,每次5min。稍甩干后在滴加按稀释好的山羊抗小鼠IgG荧光二抗(1:1000)或驴抗兔IgG荧光二抗(1:1000),避光室温孵育1h。随后置于PBS(pH7.4)中在脱色摇床上晃动洗涤3次,每次5min。稍甩干后用含DAPI的抗荧光衰减封片剂封片。最后切片于尼康倒置荧光显微镜下观察并采集图像。

Western Blot定量检测缺血半暗带GFAP、DCX、NeuroD1表达:麻醉大鼠,取出新鲜脑组织,并保留右侧缺血半暗带区。取出备用组织,用1×PBS洗涤2次,吸去PBS,加入裂解液,4℃充分裂解细胞。将BCA试剂A与试剂B按体积比为50:1配制适量BCA工作液,充分混匀;各孔加入160μl BCA工作液;把酶标板放在振荡器上振荡30s,37℃放置30min,测定吸光度,绘出标准曲线。将PAGE胶放入电泳槽中,加入适量电泳缓冲液。湿转转膜,90V转膜50min。转膜前将PVDF膜在甲醇中浸泡

5min,再孵育于电转缓冲液中2min。5%脱脂奶粉室温封闭2h或4℃过夜。稀释抗体,小鼠来源GFAP一抗(1:1000)或兔来源DCX一抗(1:1000)或兔来源一抗NeuroD1(1:1000),4℃孵育过夜。孵育一抗的膜用PBST洗涤3次,每次5min。按照1:10000稀释HRP标记的二抗,山羊抗小鼠IgG二抗(1:10000)或山羊抗兔IgG二抗(1:10000),和膜室温孵育1h。用PBST洗涤3次,每次5min。最后进行ECL化学发光检测。

### 1.8 统计学分析

运用SPSS20.0软件对数据进行统计分析,行为学评分以均数±标准差表示。其他指标以均数±标准误表示。组内前后比较采用配对 $t$ 检验,多组间均数比较采用单因素方差分析,组间多重比较用Tukey法, $P<0.05$ 为差异有显著性意义。

## 2 结果

### 2.1 康复训练对MCAO大鼠运动功能的影响

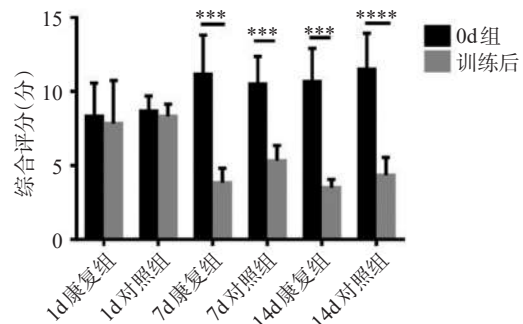
在相应时间点对大鼠进行行为学评分,7d康复组、7d对照组、14d康复组训练后与各自0d组比较,评分明显降低( $P<0.001$ );对照组14d与0d时比较,评分明显降低( $P<0.0001$ )。康复组与相应的对照组评分比较,7d康复组与7d对照组比较,评分明显降低( $P<0.05$ )。结果见图1。康复组和对照组大鼠评分均呈下降趋势,即均有运动功能的改善,但康复组的评分明显低于对照组,且康复组1d—7d下降较快,7d—14d下降趋于平稳。结果见图2。说明脑缺血大鼠自身有较强恢复性,康复训练能有效促进脑缺血大鼠运动功能的恢复,且前7d训练疗效可能更加明显。

### 2.2 康复训练对脑缺血半暗带区星形胶质细胞的影响

免疫荧光法检测缺血半暗带区GFAP阳性细胞数目,与相应时间点对照组比较,1d康复组GFAP阳性细胞数目无明显差异;7d、14d康复组GFAP阳性细胞数目明显减少。与空白组相比,1d康复组GFAP阳性细胞数目无明显差异;7d、14d康复组GFAP阳性细胞数目明显减少。结果见图2。

Western Blot检测GFAP表达水平发现:1d和7d康复组与相应时间点对照组相比GFAP表达无显

图1 各组行为学检测综合评分结果



训练前后比较,\*\*\* $P<0.001$ ;\*\*\*\* $P<0.0001$

著性差异( $P>0.05$ );14d康复组较对照组GFAP表达明显减少( $P<0.01$ )。与空白组相比,1d康复组GFAP表达明显增高( $P<0.001$ );7d康复组无明显变化( $P>0.05$ );14d康复组GFAP表达明显降低( $P<0.05$ )。结果见图3。

### 2.3 康复训练对DCX表达的影响

免疫荧光检测DCX阳性细胞数目,与相应时间点对照组比较,1d康复组DCX阳性细胞数目无明显差异;7d康复组DCX阳性细胞数目有少量增加;14d康复组DCX阳性细胞数目明显增加。与空白组比较,1d康复组DCX阳性细胞数目无明显差异;7d康复组、14d康复组DCX阳性细胞数目明显增加。结果见图4。

Western Blot检测DCX蛋白表达水平发现,1d和7d康复组较对照组DCX蛋白表达均无显著性差异( $P>0.05$ );14d康复组较对照组DCX蛋白表达明显升高( $P<0.05$ )。与空白组相比,1d康复组和7d康复组的DCX蛋白表达均无明显差异( $P>0.05$ );14d康复组DCX蛋白表达明显升高( $P<0.05$ )。见图5。

### 2.4 康复训练对NeuroD1表达的影响

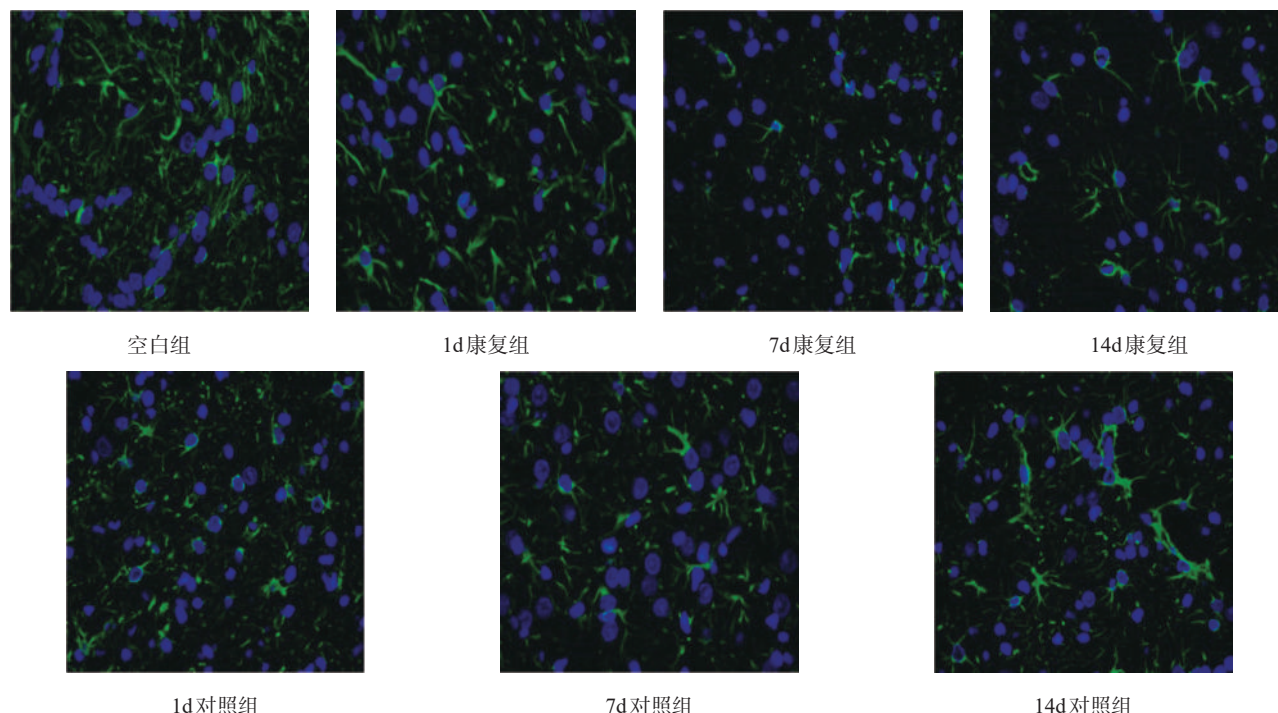
Western Blot检测NeuroD1表达水平发现:与相应时间点对照组相比,1d和7d康复组NeuroD1表达均明显升高( $P<0.05$ );14d康复组NeuroD1表达无显著性差异( $P>0.05$ )。与空白组相比,1d康复组、14d康复组NeuroD1表达明显升高( $P<0.05$ );7d康复组NeuroD1表达显著升高( $P<0.001$ )。见图6。

## 3 讨论

选择正确的训练方法能够更快的促进神经功能

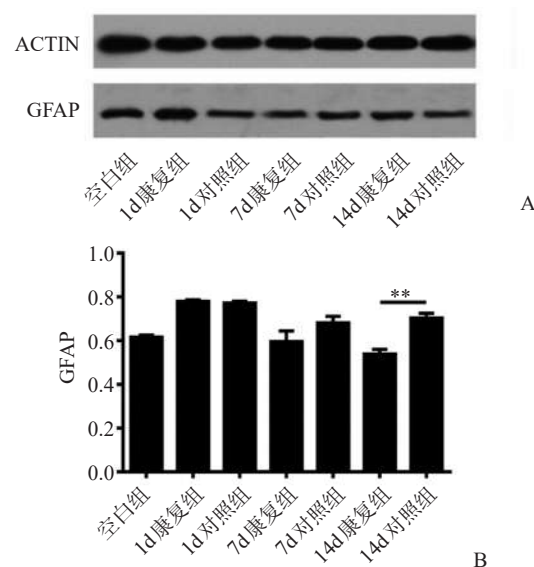
图2 免疫荧光观察GFAP在缺血半暗带区阳性细胞的表达

(免疫荧光染色,400×)



的恢复。目前实验动物康复训练的方式主要分为传统和新兴两种。传统的方式包括电刺激肌肉收缩、游泳、跑台等,其优点是便于操作,器材简单。近年来出现一些新兴的改良训练方式如转笼训练、举重、负重爬等,能够有效刺激大鼠肌肉的恢复<sup>[11]</sup>。2016年国外的一篇报道中已经出现利用四足机器人对大鼠进行康复训练的方法,并实现运动功能的明显改善<sup>[12]</sup>。动物康复模型的不断发展,使实验过程更加科学严谨,结果更加真实。但要根据实际情况选择适合实验的训练方式。对于脑缺血大鼠,应着重进行行走、抓握、平衡以及肌力训练等,我们选出四种目前被广泛应用并方便有效的训练方法:自制滚筒式网状训练、平衡木训练、转棒训练、网屏训练<sup>[13]</sup>。训练器材参照徐莉等<sup>[14]</sup>人的方法进行制备。大量实验应用已经证实这四种方法的有效性,如蒋天伟等<sup>[15]</sup>的实验表明,在进行滚筒训练、平衡木训练、转棒训练17d后,脑缺血再灌注大鼠神经功能评分显著降低( $P<0.05$ ),并且神经再生抑制因子Nogo-A、NgR蛋白的表达降低( $P<0.05$ ),大脑功能较对照组明显好转,说明了康复训练的有效性。在实验中,我们综合文献资料的研究成果以及实验环境的适宜

图3 蛋白印迹观察GFAP在缺血半暗带区的蛋白表达



注:与对照组比,\*\* $P<0.01$

性,采取较稳定的训练方式,使大鼠保持较好状态,减少训练过程中大鼠的死亡。本实验训练前后大鼠康复功能评分结果:与7d对照组相比,7d康复训练可明显改善其运动功能,14d康复组与对照组大鼠

图4 免疫荧光观察DCX在缺血半暗带区的阳性细胞表达

(免疫荧光染色,400×)

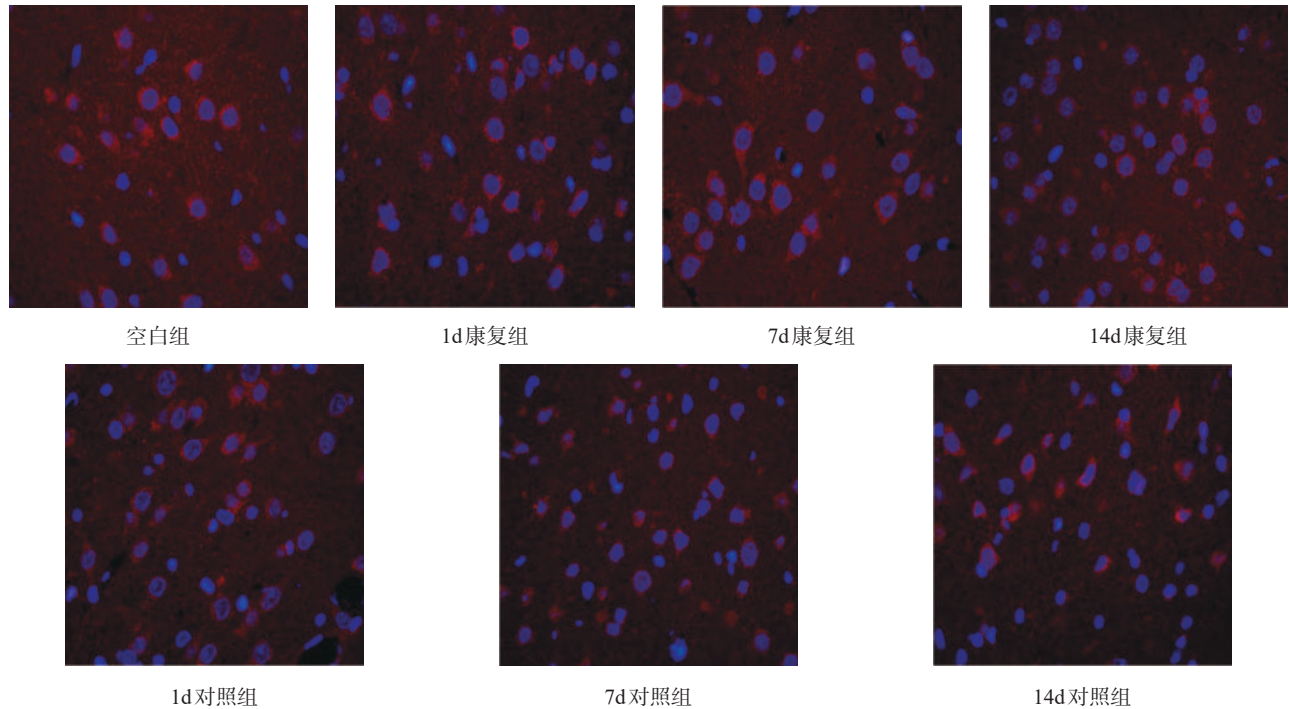


图5 蛋白印记观察DCX在缺血半暗带区的蛋白表达

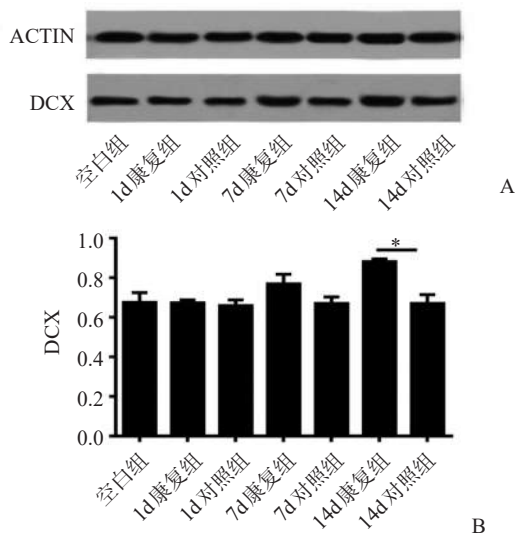
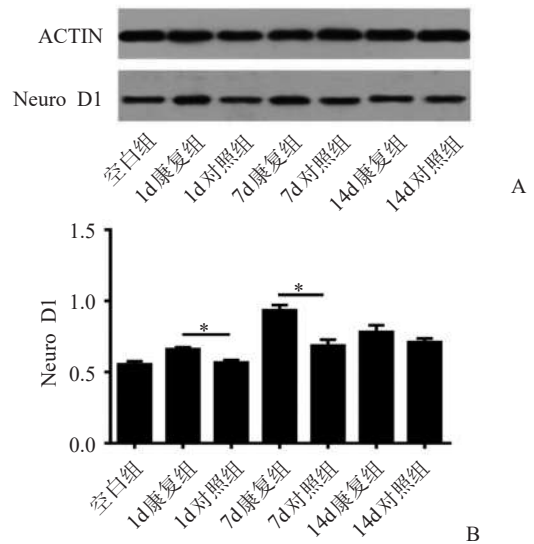


图6 蛋白印记观察NeuroD1在缺血半暗带区的蛋白表达



注:与对照组比,\* $P<0.05$

的运动功能均恢复较好,显示目前的训练方法具有可行性。

康复训练改善大脑运动功能的疗效显著,但其潜在机制尚不明确。国外学者研究表明康复训练联合电针治疗可以恢复大鼠缺氧缺血后的髓鞘成分,

注:与对照组比,\* $P<0.05$

并且通过上调涉及CREB/BDNF信号传导的少突胶质细胞生成,改善运动和记忆功能<sup>[16]</sup>。同时,康复训练明显促进大鼠运动功能的恢复,增加了神经营养因子NT-3、GDNF的表达以及上调NT-3的结合受体酪氨酸激酶C(trkC)<sup>[17]</sup>。而Ahn<sup>[18]</sup>的研究都表明康

复训练能够影响与突触相关因子的表达。其机制可能是康复训练参与调节突触粘附分子,促进突触可塑性以及神经元细胞增殖。此外,有研究表明康复训练能够降低炎症介质的表达,从而保护脑组织,促进神经功能的恢复。如Zhang等<sup>[19]</sup>观察到康复训练下调MCAO大鼠细胞因子白细胞介素-1 $\beta$ 和趋化因子单核细胞趋化蛋白-1的表达。近年研究证明康复训练可以通过影响脑血管的血流、组织修复等改善脑缺血后功能障碍。Ma等<sup>[20]</sup>发现康复训练促进了血管再生。实验中血管内皮生长因子相关基因和蛋白在缺血后随着时间的推移表达增加,而康复训练增强它们的表达。本实验对脑缺血大鼠进行康复训练,通过行为学检测,结果发现康复训练能够有效促进脑缺血大鼠运动功能的恢复,同时指标检测结果表明康复训练促进了脑缺血大鼠神经功能的恢复。

星形胶质细胞是中枢神经系统中数量最多的细胞,在脑部疾病的恢复中发挥重要作用。目前对于脑缺血后星形胶质细胞的变化存在双重认识,一方面脑缺血后AS活化,变为反应性星形胶质细胞,可以在多条途径发挥保护神经元的作用,如产生抗氧化物质谷胱甘肽、分泌神经营养因子、促红细胞生成素等改善大脑功能。同时脑缺血后星形胶质细胞也通过产生兴奋性氨基酸、释放炎症介质、降低缝隙连接等损伤神经<sup>[21]</sup>。针对脑缺血后AS的具体变化,早期研究表明缺血周边AS反应性增殖。也有学者发现<sup>[22]</sup>,缺血后2天内几乎没有AS反应性增生,并且在该时间段内的AS数量有减少趋势。对于缺血周边的研究<sup>[23-24]</sup>,结果显示脑缺血后AS被激活,并缓慢大量增殖,至缺血后7天达到高峰期。GFAP是星形胶质细胞活化的标志物。形态学上的改变以及GFAP表达水平升高是活化星形胶质细胞增生的主要特征,可用来检测AS在大脑内的表达情况。

此外,本研究的结果表明,急性期半暗带区GFAP表达上升,7d组、14d组半暗带区星形胶质细胞减少,并且康复训练促进了这一过程。与此同时,康复训练后第7天DCX明显增多,并到第14天一直缓慢增殖。即在康复训练的干预下,脑缺血半暗带区GFAP阳性细胞减少,而DCX阳性细胞增多。近年来的研究发现,当受到外界刺激时,AS的信号通路可能被改变,向与其属性最为接近的细胞转化。

而神经元与AS同由神经母细胞分化而来,所以细胞与分子层面探究提示脑缺血后AS有向神经元转化的趋势<sup>[25-26]</sup>。

国内外的研究表明在一定的干预措施下,AS向神经元转化,存在多种潜在机制。Liu等<sup>[27]</sup>发现在星形胶质细胞中转入单个转录因子Ascl1,能够让它们直接在所在小鼠脑内转化成为神经元。Magnusson等<sup>[28]</sup>通过实验研究认为调控星形胶质细胞转化为神经元的信号机制为Notch信号通路。也有研究者们利用基因重编程技术在体外培养AS,通过如Sox2、NeuroD1、NGN2、Sox11、Ascl1等多种转录因子诱导AS直接转分化为神经元。最近的研究中,上海的研究团队成功建立新的激活系统SPH(SunTag-p65-HSF1),该系统能够使基于dCas9的转基因技术更高效的激活。为了进一步验证该激活平台是否可以用来研究神经系统的功能,研究者在中脑定点注射了靶向三个转录因子Ascl1,Neurog2以及Neurod1的AAV-sgRNA,结果显示星形胶质细胞可以直接被转化为功能性神经元<sup>[29]</sup>。在AS转化为神经元的研究中,小分子化合物是重要的诱导工具。研究证实小分子“鸡尾酒”VCR(V, VPA, 3 mM; C, CHIR99021, 3  $\mu$ M; R, Repsox, 1  $\mu$ M)。能诱导小鼠星形胶质细胞转化为神经细胞<sup>[30]</sup>。Gao等<sup>[31]</sup>在VCR的基础上,增添三个附加小分子(forskolin、i-bet 151和isx-9),在诱导两周后,可显著改变培养的人类成体星形胶质细胞。这些被诱导的细胞呈现典型的神经元形态,表达神经元标记物,并显示神经元的电生理特性。全基因组RNA序列分析表明,诱导的神经元细胞的全基因表达谱与人胚胎干细胞分化神经元的基因表达谱相似。

大量的研究已经证实多条途径能够诱导AS向神经元转化,NeuroD1作为神经元分化因子,是神经分化过程中的重要正性调控因子之一,在神经系统发育的终末阶段充当神经元的一种分化基因。研究发现,NeuroD1对神经系统发育、成熟和神经再生有重要作用。过表达NeuroD1可将爪蟾胚胎的外胚层中所有类型的细胞转化为完全分化的神经元<sup>[32]</sup>,而NeuroD1基因敲除的小鼠神经系统的某些细胞死亡,导致神经系统方面的功能障碍<sup>[33]</sup>。Guo Z等<sup>[34]</sup>学者发现通过基因技术将NeuroD1基因导入反应性

胶质细胞中,反应性胶质细胞可表达神经元的特异性蛋白,并且可检测到神经电活动。

在本实验中,通过免疫蛋白印迹检测发现,脑缺血后 NeuroD1 的表达逐渐增加,并在缺血后第 7 天达到高峰,至缺血第 14 天 NeuroD1 表达依然高于空白组,并且康复训练促进这一过程。结合 GFAP 与 DCX 的表达情况,GFAP 在缺血第 1 天急性增加后,从第 1 天到第 14 天表达逐渐下降,DCX 的表达从第 1 天至第 14 天表达逐渐升高。并且与对照组相比,康复训练促进了 GFAP 和 DCX 的表达变化。通过数据分析,基于 NeuroD1、DCX 的表达上调和 GFAP 的表达下降的结果,我们推测康复训练可能通过调控神经元分化因子 NeuroD1 的表达,促使星形胶质细胞向神经元转化。由于目前绝大多数的研究并未找到切实有效的促进脑可塑的方法,研究结果还不能转化应用于临床。但是我们的结果对提高康复训练治疗缺血性脑血管疾病的临床疗效可能提供指导意义。

## 参考文献

- [1] Fisher M. Stroke and TIA:epidemiology, risk factors,and the need for early intervention[J]. Am J Manag Care, 2008, 14(2):204—11.
- [2] 王陇德.中国卒中防治报告[M]. 北京:中国协和医科大学出版社,2015.
- [3] 杨志华,罗曹靖.常规康复治疗与运动康复疗法在脑卒中康复治疗中的应用分析[J]. 中外医学研究,2015,13(1):128—129.
- [4] 金华平.常规与运动康复疗法在脑卒中康复治疗中的应用效果[J]. 中西医结合心血管病电子杂志,2017,5(32):147—148.
- [5] Magnusson JP, Göritz C, Tatarishvili J, et al.A latent neurogenic program in astrocytes regulated by Notchsignaling in the mouse[J]. Science, 2014, 237(2014):237—241.
- [6] Zhang L, Yin JC, Yeh H, et al.Small molecules efficiently reprogram human astroglial cells into functional neurons[J]. Cell Stem Cell, 2015, 17(6):735—747.
- [7] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20(1):84—91.
- [8] 陈春富,李劲松.栓线法大鼠局灶性脑缺血模型的研究[J]. 中风与神经疾病, 1996,13(1):18—19.
- [9] 卿鹏,柴铁劬,丁红梅,等.双侧电针结合康复训练对局灶性脑缺血/再灌注损伤大鼠海马 CA3 区神经生长相关蛋白 43 及突触素表达的影响[J]. 针刺研究, 2016, 41(4):314—320.
- [10] 王魁花,白蓉,胡慧华,等.神经生长因子联合康复训练对脑梗死大鼠神经行为学及脑源性神经营养因子、Bax 表达的影响[J]. 临床神经病学杂志, 2013, 26(3):202—205.
- [11] 李俊平,徐玉明,王瑞元.常用动物运动模型的方式与发展[J]. 北京体育大学学报,2006,29(12):1669—1671.
- [12] Udoekwere UI, Oza CS, Giszter SF. Teaching adult rats spinalized as neonates to walk using trunk robotic rehabilitation: elements of success, failure, and dependence[J]. J Neurosci, 2016, 36(32):8341—8355.
- [13] 刘启,李梦醒,刘芳,等.针刺联合丰富康复训练对脑缺血损伤大鼠神经功能及 NGF、BDNF 表达的影响[J]. 云南中医学院学报, 2016, 39(1):1—5.
- [14] 徐莉,李玲,陈景藻.康复训练对大脑海梗死神经功能恢复的影响[J]. 中华物理医学与康复杂志,2000,22(2):86—88.
- [15] 蒋天伟,李立,陈顺强.康复训练对局灶性脑缺血再灌注损伤大鼠运动功能恢复及 Nogo-A、NgR 表达的影响[J]. 中国康复医学杂志, 2013, 28(8):768—770.
- [16] Pak ME, Da HJ, Hong JL, et al. Combined therapy involving electroacupuncture and treadmill exercise attenuates demyelination in the corpus callosum by stimulating oligodendrogenesis in a rat model of neonatal hypoxia-ischemia[J]. Exp Neurol, 2018, 300:222—231.
- [17] Chung JY, Kim MW, Im W, et al. Expression of neurotrophin-3 and trkC following focal cerebral ischemia in adult rat brain with treadmill exercise[J]. Biomed Res Int, 2017, 2017(4):9248542.
- [18] Ahn JH, Park JH, Park J, et al. Long-term treadmill exercise improves memory impairment through restoration of decreased synaptic adhesion molecule 1/2/3 induced by transient cerebral ischemia in the aged gerbil hippocampus[J]. Experimental Gerontology, 2018, 103:124—131.
- [19] Zhang Y, Cao RY, Jia X, et al. Treadmill exercise promotes neuroprotection against cerebral ischemia-reperfusion injury via downregulation of pro-inflammatory mediators[J]. Neuropsychiatr Dis Treat, 2016, 12:3161—3173.
- [20] Ma Y, Qiang L, He M. Exercise therapy augments the ischemia-induced proangiogenic state and results in sustained improvement after stroke[J]. Int J Mol Sci, 2013, 14(4): 8570.
- [21] Chen X, Zhang X, Liao W, et al. Effect of physical and social components of enriched environment on astrocytes proliferation in rats after cerebral ischemia/reperfusion injury[J]. Neurochem Res, 2017, 42(5):1308—16.
- [22] Song S, Zheng X, Wen S, et al. Change of serum soluble intercellular adhesion molecule and basic fibroblast growth factor in patients with acute cerebral infarction and its clinical significance[J]. Zhonghua Yi Xue Za Zhi, 2002, 82(21):

(下转第 1455 页)