

强化运动训练对脑缺血再灌注大鼠运动功能及MAP-2表达的影响

陆敏¹ 张苏明^{3,4} 常立英² 王义辉³ 朱舟³

摘要 目的:探讨应用常规和强化运动训练对脑缺血再灌注大鼠运动功能以及海马区和梗死灶周围微管相关蛋白-2(MAP-2)表达的影响。方法:采用大鼠局灶性脑缺血再灌注模型,大脑中动脉阻塞1h,再灌注第7、14和21天,54只造模成功的大鼠随机分为造模对照组(A组)、常规运动训练组(B组)和强化运动训练组(C组),分别采用姿势反射试验、肢体不对称应用试验和角落试验观察各组大鼠的运动功能。结果:3组实验大鼠的3项行为学测试评分在造模后24h均无明显差异,但在第7、14和21天时则有一定差异,与A组比较,除造模后第21天时B组角落试验评分外,B组和C组3项测试评分在造模后第7天、14d和21日均明显好于A组;与B组比较,除造模后第21天肢体不对称应用试验评分外,C组评分在第14天和21日均明显好于B组。MAP-2的免疫组化结果显示,与A组比较,B组和C组在海马区和梗死灶周围MAP-2表达的光密度值在第14天和21天时均明显高于A组,而且C组MAP-2表达的光密度值在第14天和21天时也明显高于B组。结论:运动训练可促进脑缺血再灌注大鼠运动功能的恢复,其机制可能与脑内MAP-2水平上调有关,强化运动训练的效果更明显。

关键词 缺血再灌注;运动训练;微管相关蛋白-2

中图分类号:R743,R493 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2009)-02-0099-04

Effects of intensive exercise training on motor function and the expression of MAP-2 in rats after cerebral ischemia-reperfusion/LU Min, ZHANG Suming, CHANG Liying, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2009, 24(2):99-102

Abstract Objective:To explore the effects of conventional and intensive exercise training on motor function and the expression of MAP-2 in the hippocampus and around the cerebral infarcted area of rats after cerebral ischemia-reperfusion. **Method:**The middle cerebral artery occlusion (MCAO) models was used.The middle cerebral arteries(MCA) of rats were occluded for 1 hour, then reperfused for 7,14 and 21 days. Fifty-four MCAO model-rats were randomized into a control group (Group A), a conventional exercise training group (Group B) and an intensive exercise training group (Group C). Neurologic functional behavior tests (postural reflex test, limb asymmetrical usage test and corner test) were performed to test motor function. **Result:** Except on the 24h after cerebral ischemia-reperfusion, there were some differences of neurological function behavior tests' scores among the three groups on the 7th, 14th and 21th day. The scores of Group B and C, except the score of corner test of Group B on the 21th day, were significant better than that of Group A on the 7th, 14th and 21th day. The scores of Group C, except the score of limb asymmetrical usage test of Group C on the 21th day, were significant better than that of Group B on the 14th and 21th day. In the hippocampus and around the cerebral infarcted area of rats, significant increase of MAP-2 immunoreactivity were detected in Group B and C, compared with that of group A on the 14th day and 21th day. Significant increase of MAP-2 immunoreactivity of Group C were detected on the 14th and 21th day, compared with that of Group B. **Conclusion:**Exercise training can promote motor functional recovery. The function enhancement may be partially due to the upregulation of MAP-2 and GFAP. Intensive exercise training is more effective.

Author's address Department of Rehabilitation Medicine, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan,430030

Key words cerebral ischemia-reperfusion; exercise training; microtubule associated protein-2

神经可塑性是现代神经生物学的主题之一,神经科学界已取得共识,成熟脑组织的结构和功能具有可塑性,在一定时期内脑卒中神经功能缺损可有不同程度的自行改善,目前认为残存脑组织的可塑性发挥了重要作用,促进脑缺血后的神经再生已成为治疗脑缺血性损伤的根本途径之一。近期研究表

明,神经系统具有比以往人们想象大得多的可塑性,

1 华中科技大学同济医学院附属同济医院康复医学科,武汉,430030

2 湖北襄樊市中心医院神经内科

3 华中科技大学同济医学院附属同济医院神经内科

4 通讯作者

作者简介:陆敏,女,博士,副教授

收稿日期:2007-07-06

这种可塑性不仅包含受损后神经系统内在的调整与代偿,而且还包含通过外在手段的干预恢复或重建受损的神经功能,运动训练就是其中一种非常重要的干预手段,脑卒中后的运动训练在临床上取得了肯定的效果,但其确切机制尚不十分清楚。已有研究表明微管相关蛋白-2 (microtubule associated protein-2, MAP-2)是脑缺血损害后敏感的标志物,可以反映神经元损害情况^[13],虽然既往有报道证明运动训练能上调脑缺血周边区 MAP-2 表达水平^[14],但尚未见到不同训练强度的运动训练方法能否对其产生影响的实验研究。本研究中,用线栓法制作大鼠大脑中动脉闭塞后再灌注模型,分别采取常规和强化运动训练方法,然后通过行为学评估及运用免疫组化方法测定海马区和梗死灶周围神经元标志物 MAP-2 的免疫活性,探讨常规和强化运动训练对脑缺血再灌注大鼠运动功能的影响及其可能机制,为脑卒中临床规范化运动训练模式的确定提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

成年雄性 Wistar 大鼠 54 只,由华中科技大学同济医学院动物试验中心提供,体重 200—250g。随机分为 3 组:造模对照组(A 组)、常规运动训练组(B 组)和强化运动训练组(C 组),每组各 18 只,3 组大鼠饲养条件相同。各组大鼠在组内又随机分为 7d 组、14d 组和 21d 组,每组 6 只。

1.2 脑缺血再灌注实验动物模型制作

参照 Kuge 线栓法^[1]制作大鼠中动脉梗阻 (middle cerebral artery occlusion, MCAO) 再灌注实验动物模型,大鼠用 6%水合氯醛行腹腔注射麻醉,仰卧位固定,常规备皮消毒,取颈正中切口,游离右侧颈总动脉(CCA)、颈内动脉(ICA)、颈外动脉(ECA),结扎 ECA、CCA 近心端,血管夹夹闭 ICA 远端,在 CCA 的分叉处下方剪一小口,插入直径为 0.25mm、末端 5mm 涂以硅胶的尼龙鱼线,顺 ICA 走行轻轻推进尼龙线,直到遇到轻微阻力为止,由分叉处计算平均插入深度约 18.0 ± 0.5 mm,以阻断右大脑中动脉入口,造成右侧大脑中动脉供血区的缺血,用丝线固定线栓在 CCA 内,1h 后拔出线栓恢复再灌注,结扎 CCA,并缝扎切口。模型成功的标志是动物苏醒后左侧前肢屈曲、行走左转或左侧跌倒,不合格的动物剔除。

1.3 运动训练

B 组和 C 组大鼠均从造模 24h 后开始接受运动

训练,两组训练项目相同,包括平衡木上行走训练、转棒上转动训练及网屏抓握训练,B 组每日上午训练 1 次,每种训练方法的训练时间为 20min,总训练时间为 1h,C 组前 3d 的训练强度与 B 组相同,但从造模后第 4d 开始每日训练次数增加为 2 次,上午和下午各 1 次,每次训练时间仍为 1h,两组均为每周训练 6d,均训练至取材前。

1.3.1 平衡木上行走训练:采用长 170cm、宽 2cm 的方木棒,诱导大鼠在方木棒上行走,训练其平衡和行走能力。

1.3.2 转棒上转动训练:将大鼠置于长 150cm、直径 4.5cm 的圆木棒上,圆木棒中点固定在 10r/min 的转动器上,以 10 圈/min 的速度转动,训练大鼠的抓握和动态平衡能力。

1.3.3 网屏训练:网屏为 50cm×40cm 网带,网眼为 1cm×1cm,训练时先将网屏水平放置,将大鼠放于其上,再缓缓将网屏竖直,然后在网屏竖直位状态下顺时针或逆时针方向用手以 $90^\circ/1-2s$ 的速度转动网屏,训练大鼠的抓握能力。

1.4 动物行为学评价

所有行为学评价由对实验分组不知情的同一研究人员完成,在造模后第 24h、7、14 和 21 天进行行为学评价。

1.4.1 姿势反射试验(postural reflex test)^[2-3]:距地面 1m 提起鼠尾,观察其前肢屈曲情况,每次每只鼠记录 20 次活动,评分标准:0 分(正常):双前肢完全伸展;1 分(轻度异常):左前肢贴向前胸,右前肢伸展;2 分(重度异常):左前肢贴向前胸,上半身卷曲。每只鼠每次的最后得分为 20 次评分的平均分。

1.4.2 肢体不对称应用试验 (limb use asymmetry test)^[3-4]:用于测试的器械是一直径 18cm、高 30cm 透明的玻璃圆桶,正常大鼠在圆桶中会不时站立,用双侧前肢交替或同时触及桶壁,应用双侧前肢的频率应该大致相等,有缺血脑损伤的大鼠偏瘫侧肢体应用较少,观察并记录双侧前肢的应用情况,对每只大鼠每次记录 20 次活动,以肢体应用的百分率计算最后得分:

$$\text{得分} = (R-L)/(R+L+B) \times 100\%$$

R : 右侧前肢(健侧)独立应用次数; L : 左侧前肢(患侧)独立应用次数; B : 双前肢同时应用次数。

1.4.3 角落试验(corner test)^[3-4]:将被测查的大鼠置于两块 $20 \times 30 \times 15$ cm 大小的硬板中间,两硬板前端夹角 30° ,从大鼠身体两侧由尾部向头部缓慢移动硬板,正常情况下来自双侧刺激信号强度相等,故向右或左侧转身的次数应基本相等,缺血性脑损害的

大鼠由于偏瘫的影响,向健侧转身的次数明显增多,每次每只鼠观察10次,按公式计算得分:

得分=向健侧转身次数/试验的总次数×100%。

1.5 取材切片

造模后第7、14和21天分别将各组大鼠用生理盐水150ml心脏灌注,然后用4%多聚甲醛200ml心脏灌注固定,30min后断头取脑。根据大鼠脑图谱在距前囟4mm处(相当于大鼠海马区)冠状切取2mm厚包含左右半球的组织块,浸泡于4%多聚甲醛溶液中固定,24h内进行常规脱水、石蜡包埋。切片厚5 μ m薄片。

1.6 免疫组织化学染色检测 MAP-2 的表达

组织切片经脱蜡、至水,置3% H_2O_2 甲醇孵育10min以消除内源性过氧化物酶活性,微波抗原修复15min,5%小牛人血白蛋白(BSA)封闭20min,滴加兔抗MAP-2抗体(1:100,武汉博士德公司),4 $^{\circ}C$ 孵育过夜,0.01M磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗做阴性对照,滴加生物素标记山羊抗小鼠IgG(北京中山生物技术公司)及辣根酶标记酶联卵白素(北京中山生物技术公司)37 $^{\circ}C$ 各孵育30min,DAB显色,苏木素轻度复染,然后脱水、透明、封片。

1.7 图像分析

切片置于Olympus光学显微镜下观察脑梗死同侧海马齿状回区和梗死灶周围,棕黄色颗粒为免疫阳性细胞,所有阴性对照切片不着色或仅呈淡的背景色。采用OLYMPUS Micro Image 4.0图像处理系统进行图像分析。每只大鼠取3张不连续切片,400倍视野下,从每张切片随机选取脑梗死同侧海马齿状回区和梗死灶周围各3个不重叠视野,统计出每个视野内MAP-2的免疫反应产物光密度(optical density, OD)值。各组所有标本检测均在相同光源和光学条件下完成。

1.8 统计学分析

采用SPSS10.0统计软件对数据进行统计分析,实验数据以均数 \pm 标准差表示,组间比较采用单因素方差分析, $P<0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 动物行为学评分

在造模后24h,3组实验大鼠3项行为学测试评分均无明显差异,但在第7、14和21天时的行为学测试结果则有一定差异。与A组比较,除造模后第21天时B组角落试验评分外,B组和C组3项测试评分在造模后第7天($P<0.05$)、14天($P<0.05$ 或0.01)和21天($P<0.05$ 或0.01)均明显好于A组;与

B组比较,除造模后21天肢体不对称应用试验评分外,C组评分在14天和21日均明显好于B组($P<0.05$)。具体结果见表1。

2.2 脑梗死同侧海马 DG 区和梗死灶周围区 MAP-2 的表达

3组大鼠均表现为造模第7d时MAP-2的免疫染色强度最弱,3组间无明显差异;造模第14d和21d时,A组大鼠MAP-2免疫活性较第7d时增加,但B组($P<0.05$)和C组($P<0.01$)增加更明显,而且C组明显高于B组($P<0.05$),具体结果见表2,3组大鼠脑梗死同侧海马DG区和梗死灶周围区MAP-2的表达情况分别见图1—2(见前置彩色插页)。

表1 3组大鼠在各时间点行为学评定比较 ($\bar{x}\pm s$,分)

组别	时间	鼠数	姿势反射试验	肢体不对称应用试验	角落试验
A组	24h	18	1.760 \pm 0.245	0.742 \pm 0.073	0.912 \pm 0.014
	第7天	18	1.482 \pm 0.351	0.698 \pm 0.042	0.875 \pm 0.011
	第14天	12	1.227 \pm 0.127	0.554 \pm 0.034	0.798 \pm 0.007
	第21天	6	0.873 \pm 0.196	0.294 \pm 0.027	0.672 \pm 0.006
B组	24h	18	1.751 \pm 0.231	0.754 \pm 0.034	0.906 \pm 0.012
	第7天	18	1.208 \pm 0.217 ^①	0.500 \pm 0.032 ^①	0.745 \pm 0.010 ^①
	第14天	12	0.905 \pm 0.186 ^①	0.391 \pm 0.056 ^①	0.665 \pm 0.012 ^①
	第21天	6	0.531 \pm 0.159 ^①	0.123 \pm 0.069 ^①	0.632 \pm 0.009
C组	24h	18	1.757 \pm 0.334	0.745 \pm 0.037	0.910 \pm 0.011
	第7天	18	1.210 \pm 0.260 ^①	0.492 \pm 0.052 ^①	0.746 \pm 0.010 ^①
	第14天	12	0.604 \pm 0.185 ^{②③}	0.245 \pm 0.036 ^{②③}	0.590 \pm 0.010 ^{①③}
	第21天	6	0.308 \pm 0.194 ^{②③}	0.121 \pm 0.033 ^①	0.553 \pm 0.008 ^{①③}

与A组相同时间点比较:① $P<0.05$,② $P<0.01$;与B组相同时间点比较:③ $P<0.05$

表2 3组大鼠在各时间点 MAP-2 的表达 ($\bar{x}\pm s$, OD)

组别	时间	鼠数	脑梗死同侧海马 DG 区	梗死灶周围区
A组	第7天	6	0.243 \pm 0.034	0.246 \pm 0.036
	第14天	6	0.296 \pm 0.037	0.309 \pm 0.035
	第21天	6	0.307 \pm 0.045	0.310 \pm 0.048
B组	第7天	6	0.245 \pm 0.053	0.248 \pm 0.047
	第14天	6	0.343 \pm 0.051 ^①	0.352 \pm 0.046 ^①
	第21天	6	0.346 \pm 0.035 ^①	0.354 \pm 0.042 ^①
C组	第7天	6	0.259 \pm 0.047 ^①	0.262 \pm 0.039
	第14天	6	0.388 \pm 0.048 ^{②③}	0.394 \pm 0.042 ^{②③}
	第21天	6	0.389 \pm 0.039 ^{②③}	0.397 \pm 0.047 ^{②③}

与A组相同时间点比较:① $P<0.05$,② $P<0.01$;与B组相同时间点比较:③ $P<0.05$

3 讨论

运动训练的早期介入,可明显提高脑卒中患者的功能恢复率,其神经康复机制受到广泛关注。研究证实,脑缺血损伤后功能缺损的恢复在一定程度上有赖于中枢神经系统所固有的功能重组的代偿能力,在损伤区周围区域所观察到的重组现象就反映了这种自发的神经系统可塑性调节^[5-6],但其潜在机制尚不是十分清楚,本实验结果显示,脑缺血再灌注大鼠经运动训练后,行为学评分明显优于对照组,提示运动训练可促进脑缺血再灌注大鼠肢体功能的恢复。海马区和梗死灶周围区的定量免疫组化显示,海

马区和梗死灶周围区 MAP-2 的免疫活化水平在缺血后第 14 和 21 天显著高于对照组,从分子水平提示这种肢体功能恢复的机制可能与神经再生有关。

MAP-2 是微管组装的启动因子,研究提示,所有 MAP-2 亚型在体外都能诱导微管蛋白组装,并可能通过提高微管的生长速率与修复频率等途径促进微管生长^[8]。MAP-2 在成熟脑中高浓度集中于树突,而轴突缺失^[9]。MAP-2 对树突的延伸、分支起重要作用,据报道,MAP-2 免疫活性的改变与树突细胞骨架改变呈平行变化,MAP-2 缺失脑区的树突崩溃,MAP-2 增高的脑区树突出芽^[5,10]。因 MAP-2 在神经元树突生长中发挥重要作用,因而常作为神经元突起的生长标志物。本研究结果显示运动训练组在脑缺血再灌注后第 14 和 21 天,海马区和梗死灶周围区 MAP-2 的免疫活性明显高于对照组,表明运动训练有助于神经元可塑性变化,这也与其他文献报道结果相一致^[14]。脑缺血再灌注第 7 天时,各组 MAP-2 免疫活性无明显差异,可能是由于在损伤早期(数小时或数天),因神经元细胞骨架损害导致细胞骨架蛋白的减少,因而在损伤早期运动训练不能对细胞骨架蛋白产生影响,已有研究表明脑损伤后 MAP-2 的表达情况与损伤时间具有显著相关性,其原因在于在损伤后数小时和数天,MAP-2 表达反映的是细胞骨架的降解程度,而在数周后则反映了树突重建的程度^[7],由此并结合本研究结果,我们也可初步推断出,脑缺血后神经元树突生长发生可能在 1 周以后,运动训练对此有促进作用。

功能训练的强度问题也日益受到关注,国外文献报道将脑卒中患者分为每周 5d 治疗组和每周 7d 治疗组,两组在入院时 FIM 评分无明显差异,但每周 7d 治疗组的住院天数明显缩短,而且出院时的 FIM 评分明显好于每周 5d 治疗组^[11],还有文献报道强化语言训练明显改善语言功能,而且与损伤周围皮质重组和可塑性相关^[12]。国内也有临床研究证明强化康复训练可改善脑卒中患者的功能^[15-16]。但是有关康复治疗强度对神经可塑性影响的实验研究目前见到的文献报道较少,不同强度的功能训练是否能引起脑缺血后相关区域神经细胞活性表达发生不同的变化呢?目前尚未见到类似的研究报道。本研究将接受功能训练的大鼠设计为常规运动训练组和强化运动训练组,强化训练组每次训练内容与常规运动训练组相同,但训练次数每日增加 1 次,研究结果表明强化训练组大鼠在造模后第 14 和 21 天时行为学评分明显好于常规运动训练组,认为高强度训练有利于脑损伤后运动能力的恢复,本研究试图从脑

损伤相关区域神经元活性方面探讨其可能的分子学机制,结果显示,强化训练组大鼠缺血海马区和梗死灶周围的 MAP-2 的免疫活性也明显高于常规运动训练组,即强化训练组大鼠表现出更高的神经元活性,这为进一步探讨临床高强度康复治疗的效果奠定了初步的实验基础。当然,大脑对运动功能的控制不仅与神经元活性有关,还有许多可能的相关因素因实验条件的限制本研究未涉及到,而且本研究仅以增加训练次数的方式作为强化运动训练的方法,而未涉及到运动训练内容等方面的变化,因此,还应在这些方面进行深入地研究。

参考文献

- [1] Kuge Y, Minematsu K, Yamaguchi T, et al. Nylon monofilament for intraluminal middle cerebral artery occlusion in rats[J]. Stroke, 1995, 26: 1655—1657.
- [2] Hua Y, Schallert T. Behavioral test after intracerebral hemorrhage in the rat[J]. Stroke, 2002, 33: 2478—2484.
- [3] Zhang L, Schallert T. A test for detecting longterm sensorimotor dysfunction in the mouse after focal cerebral ischemia [J]. J Neurosci Meth, 2002, 117: 207—214.
- [4] Hunter AJ, Hatcher J, Virley D, et al. Functional assessments in mice and rats after focal stroke[J]. Neuropharmacology, 2000, 39: 806—816.
- [5] Zepeda A, Sengpiel F, Guagnelli MA, et al. Functional reorganization of visual cortex maps after ischemic lesions is accompanied by changes in expression of cytoskeletal proteins and NMDA and GABAA receptor subunits[J]. J Neurosci, 2004, 24: 1812—1821.
- [6] Mittmann T, Eysel UT. Increased synaptic plasticity in the surround of visual cortex lesions in rats [J]. Neuro Report, 2001,12: 3341—3347.
- [7] Briones TL, Woods J, Wadoska M, et al. Amelioration of cognitive impairment and changes in microtubule-associated protein 2 after transient global cerebral ischemia are influenced by complex environment experience [J]. Behav Brain Res, 2006, 168: 261—271.
- [8] Kowalski RJ, Williams RC. Microtubule associated protein 2 alters the dynamic properties of microtubule assembly and disassembly[J]. Biol Chem, 1993, 268: 9847—9855.
- [9] Hirokawa N, Funakoshi T, Sato-Hurada R, et al. Selective stabilization of tau in axons and microtubule-associated protein 2C in cell bodies and dendrites contributes to polarized localization of cytoskeletal proteins in mature neurons[J]. J Cell Biol, 1996, 132: 667—679.
- [10] Sanchez C, Diaz-Nido J, Avila J. Phosphorylation of microtubule associated protein 2 (MAP2) and its relevance for the regulation of neuronal cytoskeletal function [J]. Prog Neurobiol, 2000, 61: 133—168.
- [11] Sonoda S, Saitoh E, Nagai S, et al. Full-time integrated treatment program, a new system for stroke rehabilitation with conventional rehabilitation [J]. Am J Phys Med Rehabil, 2004, 83: 88—93.
- [12] Meinzer M, Elbert T, Wienbruch C, et al. Intensive language training enhances brain plasticity in chronic aphasia [J]. BMC Biol, 2004, 2: 20.
- [13] Pettiew L, Holtz ML, Craddock SD, et al. Microtubular proteolysis in focal cerebral ischemia [J]. J Cerebral Blood Flow Metab, 1996, 16: 1189—1120.
- [14] 王亚男,石秉霞,郭云良,等.运动训练对大鼠脑缺血再灌注后肢体功能恢复及微管相关蛋白含量的影响[J].中华物理医学与康复杂志,2004,26:12—15.
- [15] 姚红华,陈银海.强化训练对脑卒中偏瘫患者上肢运动功能的影响[J].中国康复医学杂志,2007,22(2): 142—143.
- [16] 迟相林,王道珍,郭兆荣,等.强化康复训练对脑卒中后偏瘫痉挛状态的影响 [J]. 中国康复医学杂志,2007,22 (12): 1087—1089.