

· 基础研究 ·

不同时间窗被动运动对脑梗死大鼠 脑源性神经生长因子及 B 细胞淋巴瘤/ 白血病-2 基因表达的影响

王梦滢 李嫚 梅元武 黎刚 方媛

【摘要】目的 通过观察不同时间窗被动运动对脑梗死大鼠脑源性神经生长因子(BDNF)及 B 细胞淋巴瘤/白血病-2 基因(Bcl-2)表达的影响,从而探讨康复训练的介入时机及相关治疗机制。**方法** 共选取 100 只成年健康雄性 SD 大鼠,并将其随机分为被动训练组、模型组、假手术组及正常对照组,采用线栓法将被动训练组及模型组大鼠制成左侧大脑中动脉栓塞/再灌注模型,假手术组大鼠手术期间不阻断大脑中动脉血流,正常对照组实验期间未给予特殊处理。被动训练组大鼠于脑缺血再灌注后不同时间窗给予被动运动训练。各组大鼠于实验进行 14 d 后取脑组织制成标本,采用 PCR 技术检测各组大鼠脑梗死灶周边区 BDNF 及 Bcl-2 的表达情况。**结果** 各组大鼠均检测到 BDNF 及 Bcl-2 阳性表达,并且以被动训练组术后 24 h、48 h 亚组 BDNF 及 Bcl-2 表达水平相对较高,与其它各组间差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 于脑梗死后 24~48 h 内给予被动运动训练,可促进大鼠脑梗死灶周围区 BDNF 及 Bcl-2 表达增强,从而加速受损神经功能恢复。

【关键词】 被动运动; 脑梗死; 脑源性神经生长因子; B 细胞淋巴瘤/白血病-2 基因

Passive movement and the expression of brain derived neurotrophic factor and the B cell lymphoma/leukemia-2 gene after cerebral infarction WANG Meng-die, LI Man, MEI Yuan-wu, LI Gang, FANG Yuan. Department of Neurology, Huazhong University of Science & Technology, Wuhan 430022, China
Corresponding author: FANG Yuan, Email: fangyuan28@hotmail.com

【Abstract】Objective To observe the effects of passive movement on the functional outcome after occlusion of the middle artery in the brain and reperfusion, and to explore the molecular mechanisms involved. **Methods** Cerebral infarction models were established in rats using left middle cerebral artery occlusion (MCAO). The survivors were randomly divided into a passive movement group and a natural recovery group. There was also a sham-operated group and a normal group. Passive movement treatment (twice a day, twenty min per time) was started at different times after reperfusion. The expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and B cell lymphoma/leukemia-2 gene (Bcl-2) were determined using real-time PCRs. **Results** Expression of BDNF and Bcl-2 was detected around the infarction area in both groups. The expression of BDNF and Bcl-2 was highest in the sub-groups where passive movement was begun 24 or 48 h after the operation. **Conclusions** The expression of BDNF and Bcl-2 in the brain peaks when daily, moderate intensity passive movement is administered beginning 24 to 48 h after reperfusion. Passive movement might have a protective and rehabilitative effect after cerebral infarction.

【Key words】 Passive movement; Cerebral infarction; Brain-derived neurotrophic factor; B cell lymphoma/leukemia-2 gene

脑梗死是严重危害人类生命健康的常见疾病之一,其发病率、致残率及死亡率均居各类疾病之首。目前临床治疗脑梗死的方法较多,但疗效均不够理想,如其中部分治疗措施(如亚低温干预、神经元保护等)由

于疗效尚未肯定或因技术要求高、风险较大限制了使用。近年来康复医学的发展为脑梗死患者提供了新的治疗策略,如早期介入康复训练可有效降低患者致残率,提高生活质量;但过早开展康复训练又有可能加重病情,影响功能恢复,目前国内、外对于脑梗死患者发病后何时介入康复干预尚未达成共识。本研究通过观察被动运动训练对脑梗死大鼠缺血半暗带皮质脑源性神经生长因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)及 B 细胞淋巴瘤/白血病-2 基因(B-cell lymphoma/leuke-

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2010.07.002

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30640010)

作者单位:430022 武汉,华中科技大学同济医学院附属协和医院神经内科

通信作者:方媛,Email: fangyuan28@hotmail.com

mia2, Bcl-2)mRNA 表达的影响,从而探讨脑梗死后被动运动训练的时间窗以及相关治疗机制,为临床治疗脑梗死患者提供实验依据。现报道如下。

材料与方法

一、实验材料

共选取健康雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 100 只,普通级,由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供,大鼠体重(250 ± 30)g,鼠龄 12 周,采用随机数字表法将上述大鼠分为被动训练组、模型组、假手术组及正常对照组,每组 25 只,各组再根据术后开始干预的时间窗细分为术后 6 h、12 h、24 h、48 h 及 72 h 共 5 个亚组,每个亚组有 5 只大鼠。

二、脑梗死动物模型制作

被动训练组及模型组大鼠均制成脑梗死动物模型,参照廖维靖等^[3]介绍的大鼠大脑中动脉缺血/再灌注模型制作方法,采用 10% 水合氯醛按每千克体重 350 mg 进行腹腔注射麻醉,待麻醉剂生效后于颈部正中切口,钝性分离并暴露左侧颈总动脉和颈内动脉,结扎颈总动脉近心端,将头端涂有多聚赖氨酸、直径为 0.28 mm 的尼龙线经颈总动脉分叉处插入颈内动脉以阻断血流,插入深度约为(18.0 ± 1.0)mm,于脑梗死持续 90 min 后小心拔出线栓即形成血液再灌注。脑梗死大鼠模型制作成功标准如下:大鼠苏醒后提尾时出现右侧前肢内收屈曲;左侧 Horner 征阳性;爬行时向右侧划圈;站立时向右侧倾倒等,凡实验大鼠术后具有上述表现即提示制模成功。假手术组大鼠手术操作同上,但线栓插入深度仅为 10~15 mm(即线栓只进入颈内动脉而未到达大脑中动脉),术中未能阻断大脑中动脉血流。

三、被动运动训练

被动训练组大鼠分别于制模成功后 6 h、12 h、24 h、48 h 及 72 h 时给予被动运动训练,采用自制动物被动牵引仪,该仪器由固定台、定速马达(35 转/min)、连杆传动系统、足掌固定板、控制开关等组成^[1,2],首先将大鼠捆扎制动,并将其患侧前肢足掌固定于足掌固定板上,然后开启被动牵引仪,使大鼠患侧前肢进行被动脚踏车运动,被动训练期间保证实验大鼠前肢肘关节得到充分屈伸活动,每次训练持续 20 min,每天训练 2 次,中间间隔 15 min。模型组、假手术组大鼠也于相应时间点进行捆扎处理,但未给予被动运动训练;正常对照组大鼠继续常规饲养,无特殊处理。

四、大鼠脑内 BDNF 及 Bcl-2 mRNA 检测

各组实验大鼠于干预 14 d 后采用过量 10% 水合氯醛深度麻醉,于冰盘上快速断头取脑,切取脑梗死灶

周边组织约 100 mg,每份标本取约 1×10^5 个细胞,去上清液后加入 Trizol 溶液 0.5 ml,混匀后静置 10 min;每管加入氯仿 200 μ l,用手振摇 15 s;于 4 $^{\circ}$ C 环境下以 12 000 转/min 离心 15 min;取上清液 400 μ l,加入等体积异丙醇混匀, -20 $^{\circ}$ C 环境下静置 30 min;然后于 4 $^{\circ}$ C 环境下以 12 000 转/min 离心 10 min;去上清液,经 75% 乙醇洗涤、沉淀、离心后,去净残余上清液,在室温环境下晾干;采用 50 μ l 经焦碳酸二乙酯处理过的三蒸水溶解沉淀,选择紫外分光光度计测定其浓度及纯度,在逆转录酶 M-MLV 作用下,将 mRNA 逆转录成 cDNA 分子,采用 SYBR Green I 荧光染料技术进行实时定量多聚酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR),以获取各组标本标准曲线,采用计算机分析 Ct 值。引物设计序列如下,BDNF 上游引物:5'-CCCTTC-TACACTTTACCTCTTG-3',下游引物:5'-GTTTCAC-CCTTTCCACTCCTA-3'; Bcl-2 上游引物:5'-GG-GACGCGAAGTGCTATTGGTA-3',下游引物:5'-CAG-GCTGGAAGGAGAAGATGC-3'。

五、统计学分析

本研究计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,采用 2003 版 Excel 软件进行数据整理,应用 SPSS 13.0 版统计学软件包进行统计分析, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义;首先对所得数据进行重复测量方差分析,再按组别、时间因素分层进行单因素方差分析和单组重复测量方差分析,组间两两比较采用 Tukey 法。

结 果

一、不同时间窗干预对各组大鼠 BDNF 表达的影响

对相同时间窗各亚组大鼠比较后发现,正常对照组及假手术组各亚组 BDNF mRNA 组间差异均无统计学意义($P > 0.05$);而被动训练组及模型组各亚组 BDNF mRNA 与正常对照组及假手术组各亚组比较,发现组间差异均有统计学意义($P < 0.05$);被动训练组与模型组比较,发现各亚组 BDNF mRNA 组间差异均有统计学意义($P < 0.05$),提示于脑梗死后 6~72 h 内给予被动运动训练,能显著增强大鼠 BDNF 表达。对组内不同时间窗亚组比较后发现,正常对照组及假手术组各亚组 BDNF mRNA 组内差异均无统计学意义($P > 0.05$);而被动训练组及模型组各亚组 BDNF mRNA 组内差异均具有统计学意义($P < 0.01$),均以术后 24 h 亚组 BDNF mRNA 表达水平相对较高,且此时被动训练组 BDNF mRNA 表达水平明显高于模型组($P > 0.05$),提示不同时间窗给予被动运动训练对脑梗死大鼠 BDNF 表达具有显著影响作用,具体数据详见表 1。

二、不同时间窗干预对各组大鼠 Bcl-2 表达的影响

对相同时间窗各亚组大鼠比较后发现,正常对照组及假手术组各亚组 Bcl-2 mRNA 组间差异均无统计学意义($P > 0.05$);而被动训练组及模型组各亚组 Bcl-2 mRNA 与正常对照组及假手术组各亚组比较,发现组间差异均有统计学意义($P < 0.05$);被动训练组与模型组比较,发现各亚组 Bcl-2 mRNA 组间差异均有统计学意义($P < 0.05$),提示于脑梗死后 6 ~ 72 h 内给予被动运动训练,能显著增强大鼠 Bcl-2 表达。对组内不同时间窗亚组比较后发现,正常对照组及假手术组各亚组 Bcl-2 mRNA 组内差异均无统计学意义($P > 0.05$);而被动训练组及模型组各亚组 Bcl-2 mRNA 组内差异均具有统计学意义($P < 0.01$),其中被动训练组术后 24 h 亚组及模型组术后 48 h 亚组 Bcl-2 mRNA 表达水平相对较高,提示不同时间窗给予被动运动训练对脑梗死大鼠 Bcl-2 表达具有显著影响作用,具体数据详见表 1。

讨 论

相关研究发现,机体缺血性脑梗死病灶中存在缺血半暗带区,且半暗带区内神经细胞损伤在一定时间内具有动态变化及可逆性特点,故在特定时间内采取适当治疗可显著抑制半暗带区神经细胞凋亡,减轻神经元损伤,从而降低脑梗死患者致死率及致残率,有效提高患者生活质量^[4]。近年来有学者发现,人体中枢神经系统具有强大的可塑性,神经受损后可通过轴突再生、神经细胞发芽等方式促进脑功能重组,从而发挥代偿功能,这也是脑梗死后康复训练的理论基础,通过增强脑皮质功能重组促进受损神经功能恢复。目前有研究报道,脑卒中患者的预后与康复介入时间具有一定相关性,康复介入时间可作为影响预后的独立因素,

如康复训练介入时间越早,则患者功能恢复越显著;但过早活动患侧肢体有可能导致脑梗死范围进一步扩大,加重脑损害,影响脑功能重塑^[4-7]。基于上述背景,本研究推测,脑梗死后盲目地活动或制动患肢均不利于患者神经功能恢复,而由康复训练介导的脑功能重组可能存在一个时间窗效应,本研究通过观察脑梗死后不同时间窗实施被动运动训练对大鼠 BDNF 及 Bcl-2 表达的影响,从而初步探讨康复训练治疗缺血性脑梗死的时间窗及可能机制。

目前已知 BDNF 属于神经营养因子中的一种,具有保护神经元、促进受损神经元修复等作用。本研究采用 PCR 技术检测脑缺血后不同时间窗开始被动运动训练对大鼠脑梗死周边区 BDNF 表达的影响,发现被动训练组各亚组 BDNF 表达水平均显著高于模型组各相应亚组,与 Kim 等^[8]研究结果基本一致,且以被动训练组术后 24 h 及 48 h 亚组表达水平相对较高,提示康复训练介入时间可能是影响脑梗死预后的重要因素之一。模型组部分亚组 BDNF 表达水平均显著低于正常对照组及假手术组相应亚组,可能与该组大鼠脑损伤程度相对较重有关。目前关于被动运动训练促进大鼠脑梗死灶周边区 BDNF 表达的确切机制尚不清楚,可能与患肢被动运动时产生的持续体感及位置觉输入刺激有关,这些传入刺激可通过神经传导通路兴奋整个大脑皮质,激活双侧大脑半球间存在的潜伏通路,充分发挥未受损组织的代偿作用,从而促进脑梗死后神经功能恢复;但也有学者研究后发现,脑梗死大鼠经康复训练后并未见 BDNF 含量明显改变,并认为 BDNF 未涉及康复训练介导的神经保护机制^[9]。本研究认为,造成上述不同研究结果间差异的原因可能与康复训练形式、康复介入及持续时间、标本取材部位不同等因素有关。

表 1 不同时间窗干预对各组大鼠脑梗死灶 Bcl-2 及 BDNF mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s$)

组 别	只数	Bcl-2 mRNA 表达	BDNF mRNA 表达	组 别	只数	Bcl-2 mRNA 表达	BDNF mRNA 表达
被动训练组				正常对照组			
术后 6 h 亚组	5	2.49 ± 0.25	1.96 ± 0.13	术后 6 h 亚组	5	1.04 ± 0.12 ^{ab}	1.07 ± 0.15 ^{ab}
术后 12 h 亚组	5	4.51 ± 0.14	4.36 ± 0.13	术后 12 h 亚组	5	1.06 ± 0.21 ^{ab}	1.05 ± 0.21 ^{ab}
术后 24 h 亚组	5	23.72 ± 0.36	23.48 ± 0.36	术后 24 h 亚组	5	1.10 ± 0.24 ^{ab}	1.09 ± 0.09 ^{ab}
术后 48 h 亚组	5	23.59 ± 0.14	22.61 ± 0.14	术后 48 h 亚组	5	1.03 ± 0.28 ^{ab}	1.14 ± 0.26 ^{ab}
术后 72 h 亚组	5	1.17 ± 0.13	0.85 ± 0.13	术后 72 h 亚组	5	1.02 ± 0.09 ^{ab}	1.30 ± 0.29 ^{ab}
模型组				假手术组			
术后 6 h 亚组	5	0.10 ± 0.02 ^a	0.20 ± 0.02 ^a	术后 6 h 亚组	5	1.03 ± 0.06 ^{ab}	1.04 ± 0.17 ^{ab}
术后 12 h 亚组	5	0.24 ± 0.04 ^a	0.74 ± 0.04 ^a	术后 12 h 亚组	5	1.08 ± 0.17 ^{ab}	1.06 ± 0.19 ^{ab}
术后 24 h 亚组	5	0.23 ± 0.02 ^a	1.58 ± 0.02 ^a	术后 24 h 亚组	5	1.02 ± 0.28 ^{ab}	1.16 ± 0.20 ^{ab}
术后 48 h 亚组	5	0.63 ± 0.06 ^a	0.62 ± 0.02 ^a	术后 48 h 亚组	5	1.04 ± 0.15 ^{ab}	1.02 ± 0.22 ^{ab}
术后 72 h 亚组	5	0.36 ± 0.05	0.05 ± 0.02	术后 72 h 亚组	5	1.05 ± 0.14 ^{ab}	1.15 ± 0.37 ^{ab}

注:与相同时间窗被动训练组各亚组比较,^a $P < 0.05$;与相同时间窗模型组各亚组比较,^b $P < 0.05$

大量实验研究表明,凋亡是脑缺血后神经元死亡的重要形式之一。在脑梗死急性期阶段,凋亡细胞主要出现在缺血灶半影区,并且脑缺血后迟发性神经元死亡的主要方式也是细胞凋亡。有研究证实,BDNF 可通过调节 Bcl 及 Bax 水平从而影响细胞凋亡^[10],故本研究采用 PCR 技术检测各时间窗被动运动训练对脑梗死周边区 Bcl-2 表达的影响,结果发现被动训练组各亚组 Bcl-2 mRNA 表达水平均显著高于模型组各相应亚组,且以术后 24 h 及 48 h 亚组表达水平相对较高,其变化趋势与 BDNF mRNA 相似。由此本研究推测,被动运动训练可能直接或间接通过诱导 BDNF 表达来促进脑缺血半影区 Bcl-2 表达,从而减轻脑梗死后迟发性神经元损伤,抑制细胞凋亡;另外被动运动训练还能通过改善局部血液循环、维持关节韧带活动度、抑制肌肉痉挛、提高能量代谢等途径促进神经功能恢复^[11]。

综上所述,本研究认为脑梗死后康复训练干预存在时间窗效应,在特定时间范围内通过被动活动患侧肢体,有利于上调脑缺血周边区 BDNF 及 Bcl-2 表达,促进受损神经功能恢复,抑制细胞凋亡;至于临床上如何在不加重脑梗死患者损伤前提下尽早介入康复训练(包括被动运动形式、频率、强度、开始及持续时间等),还需更进一步深入研究。

参 考 文 献

- [1] Houle JD, Morris K, Skinner RD, et al. Effects of fetal spinal cord tissue transplants and cycling exercise on the soleus muscle in spinalized rats. *Muscle Nerve*, 1999, 22: 846-856.
- [2] 潘孝贵,高润. 去神经大鼠骨小梁结构变化及被动运动的逆转作用. *中国临床康复*, 2005, 9: 182-183.
- [3] 廖维靖,刘淑红,范明,等. 线栓阻断大鼠大脑中动脉制作缺血性脑损伤模型的改良. *中华物理医学与康复杂志*, 2002, 24: 345-348.
- [4] Marin R, Williams A, Hale S, et al. The effect of voluntary exercise exposure on histological and neurobehavioral outcomes after ischemic brain injury in the rat. *Physiol Behav*, 2003, 80: 167-175.
- [5] Myint JM, Yuen GF, Yu TK, et al. A study of constraint-induced movement therapy in subacute stroke patients in Hong Kong. *Clin Rehabil*, 2008, 22: 112-124.
- [6] Bland ST, Schallert T, Strong R, et al. Early exclusive use of the affected forelimb after moderate transient focal ischemia in rats functional and anatomic outcome. *Stroke*, 2000, 31: 1144-1152.
- [7] Leasure JL, Schallert T. Consequences of forced disuse of the impaired forelimb after unilateral cortical injury. *Behav Brain Res*, 2004, 150: 83-91.
- [8] Kim MW, Bang MS, Han TR, et al. Exercise increased BDNF and trkB in the contralateral hemisphere of the ischemic rat brain. *Brain Res*, 2005, 1052: 16-21.
- [9] Cechetti F, Fochesatto C, Scopel D, et al. Effect of a neuroprotective exercise protocol on oxidative state and BDNF levels in the rat hippocampus. *Brain Res*, 2008, 1188: 182-188.
- [10] Schabitz UR, Sommer C, Zoder W, et al. Intravenous BDNF reduces infarct size and counterregulates Bax and Bcl-2 expression after temporary focal cerebral ischemia. *Stroke*, 2000, 31: 2212-2217.
- [11] Ding Q, Vaynman S, Souda P, et al. Exercise affects energy metabolism and neural plasticity-related proteins in the hippocampus as revealed by proteomic analysis. *Eur J Neurosci*, 2006, 24: 1265-1276.

(修回日期:2010-05-20)

(本文编辑:易 浩)

· 消息 ·

《骨科》征稿启事

《骨科》为专业性医学学术期刊,由华中科技大学同济医学院附属同济医院骨科陈安民教授担任主编,编委会由全国著名骨科专家组成。国内外公开发行,CN 42-1799/R。本刊为双月刊,逢双月 20 日出版。本刊现为《中国学术期刊综合评价数据库》统计源刊,并被《中国生物医学期刊引文数据库-CMCI》、《中文科技期刊数据库》、中国生物学文献数据库、《中国核心期刊(遴选)数据库》、《中国生物学文摘》、《中国学术期刊(光盘版)》、“中文生物医学期刊文献数据库-CMCC”、“中国期刊网”、“万方数据-数字化期刊群”等收录。

本刊由原《华中医学杂志》改名而成。《华中医学杂志》历史悠久,由医学泰斗裘法祖教授于 1964 年创刊,有较高的学术价值和国内外影响力。本刊宗旨:坚持贯彻党的卫生工作方针政策,介绍骨外科学及其相关领域的临床新进展、新技术、新方法,推动与骨科临床密切相关的基础理论研究,促进国内外骨科学术交流。该刊以广大骨科医生及从事与骨科工作有关人员为读者对象。

本刊主要设有论著、经验介绍、实验研究、专家述评、专家笔谈、临床病例(理)讨论、综述、讲座、短篇报道等栏目。《骨科》面向全国,欢迎全国各地作者踊跃投稿。

来稿时请写明作者单位的详细地址、邮政编码、办公电话以及 Email,以便联系。

来稿请寄:武汉市解放大道 1095 号同济医院内《骨科》编辑部,邮政编码:430030;联系电话:027-83662649;Email:orthopaedics2009@163.com(请勿寄给个人)。

《骨科》编辑部