

· 基础研究 ·

运动训练对缺血再灌注大鼠纹状体中代谢型谷氨酸 I 组受体基因表达的影响

张曦 郭青川 贾杰

【摘要】目的 研究运动训练对缺血再灌注大鼠纹状体 I 组代谢型谷氨酸受体 (mGluR I) 水平变化的影响,以探讨运动训练对缺血性脑梗死的保护机制。方法 将 2~3 月龄雄性成年 SD 大鼠 18 只随机分为假手术组、缺血再灌注模型组 (缺血再灌注组) 和缺血再灌注后运动训练 2 周组 (运动训练组),每组 6 只大鼠。于运动训练组运动训练 2 周后,3 组大鼠同时断头取脑,采用逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 技术分析大鼠缺血部位纹状体脑组织内的代谢型谷氨酸受体 1 型 (mGluR1) 和代谢型谷氨酸受体 5 型 (mGluR5) 的信使核糖核酸 (mRNA) 表达水平。结果 缺血再灌注组大鼠纹状体 mGluR1 和 mGluR5 的 mRNA 升高明显 ($P < 0.01$),运动训练组大鼠纹状体 mGluR1 和 mGluR5 的 mRNA 较缺血再灌注组有明显下调 ($P < 0.01$)。结论 运动训练可以使缺血再灌注大鼠 I 组代谢型谷氨酸受体 (mGluR I) 水平下调,这可能是抑制兴奋毒性谷氨酸的产生的重要机制之一。

【关键词】运动训练; 缺血再灌注损伤; 谷氨酸; 谷氨酸受体

The effect of treadmill training on metabotropic glutamate receptor of a rat model of middle cerebral artery occlusion ZHANG Xi*, GUO Qing-chuan, JIA Jie. * Department of Rehabilitation, No. 3 Hospital of Xin Xiang Medical Collage, Xinxiang 453003, China

Corresponding author: JIA Jie, Email: drjiajie@163.com

【Abstract】Objective To observe the effect of treadmill training on metabotropic glutamate receptor of a middle cerebral artery occlusion model in rat and its underlying mechanisms. Methods Sprague-Dawley male rats of 2 or 3 months old were randomly divided into 3 groups: a sham operation group, an ischemia-reperfusion group and a treadmill training group (subject to 2 weeks of training after the ischemia-reperfusion). All the animals were sacrificed after 2 weeks of training and their brains were sampled for measurement of the expression level of the striatum mGluR I-mRNA, using RT-PCR technique. Results The striatum mRNA of mGluR1 and mGluR5 was significantly elevated in the ischemia-reperfusion group ($P < 0.01$), but treadmill training significantly suppressed the elevation of the expression of mRNA of mGluR1 and mGluR5 ($P < 0.01$). Conclusions Treadmill training can significantly downregulate mGluR I-mRNA expression. This might be one of the important mechanisms for inhibition of the excitatory glutamate production.

【Key words】Exercise training; Ischemia-reperfusion injury; Glutamate; Glutamate receptor

运动训练作为脑卒中康复的主要手段,目前已经被广泛应用于临床^[1]。谷氨酸 (glutamate, GLU) 是中枢神经系统 (central nervous system, CNS) 中含量最为丰富的一种兴奋性氨基酸,可对神经发育、突触可塑性的维持、神经元回路的形成及学习过程起关键作用^[2]。然而,GLU 也是一种潜在的神经毒素,是引起缺血性脑损伤的重要因素之一。代谢型谷氨酸受体 (metabotropic glutamate receptors, mGluRs) 在谷氨酸的释放中发挥重要作用^[3]。张毅等^[4]发现代谢型谷氨

酸受体 1 型 (metabotropic glutamate receptor 1, mGluR1) 和代谢型谷氨酸受体 5 型 (metabotropic glutamate receptor 5, mGluR5) 都参与了缺血再灌注后的病理过程。相关研究表明^[5],运动训练可促进微血管的生成,增加脑血流量、减轻脑水肿。目前,关于运动训练后 mGluRs 基因水平的变化尚未见报道。本研究旨在通过观察运动训练对脑缺血再灌注大鼠纹状体中 mGluR1 和 mGluR5 的信使核糖核酸 (messenger ribonucleic acid, mRNA) 水平的影响,来分析运动训练对脑缺血再灌注损伤可能的保护机制,为临床康复治疗提供实验依据。

材料和方法

一、实验动物及分组

基金项目:中国博士后基金(20070420597)

作者单位:453003 新乡,河南省新乡医学院临床三系康复医学科(张曦、郭青川);复旦大学附属华山医院康复医学科,复旦大学上海医学院康复与运动医学系(贾杰)

通讯作者:贾杰,Email: drjiajie@163.com

2~3 月龄雄性成年 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 18 只, 体重 250~300 g, 由中科院上海实验动物中心提供, 在进行大脑中动脉闭塞 (middle cerebral artery occlusion, MCAO) 造模前随机分成 3 组, 即假手术组、缺血再灌注模型组 (缺血再灌注组)、缺血再灌注后运动训练 2 周组 (运动训练组), 每组大鼠 6 只。

二、模型制备

缺血再灌注组和运动训练组大鼠 MCAO 模型采用 Longa 等^[7]改进的方法, 大鼠用 10% 水合氯醛 (300 g/kg 体重) 腹腔注射麻醉, 颈部正中切口, 钝性分离左侧颈总动脉, 左颈外动脉和颈内动脉。动脉结扎颈外动脉下端, 用动脉夹分别夹住颈外和颈内动脉远端。在颈总动脉分叉处剪一小口, 将预先特制的尼龙线 (将长 40 mm 直径为 0.23 mm 尼龙线一端 0.5 mm 加热成光滑球形) 插入颈内动脉结扎颈总动脉分叉处的插线, 撤动脉夹, 将尼龙线缓缓进入 18~20 mm, 以阻断该侧大脑中动脉血流为目的, 2 h 后拔出尼龙线, 缝合切口。假手术组仅分离左侧颈总动脉、颈外动脉和颈内动脉, 不阻断大脑中动脉血流, 缝合切口。大鼠清醒后参照 Longa 的方法评分^[6]: 0 分为无神经系统症状; 1 分为不能完全伸展对侧前爪; 2 分为爬行时转圈; 3 分为向对侧倾倒; 4 分为不能自行行走, 意识丧失。达到 1~3 分为造模成功, 采用差额补充的方法以保证每组的实验例数。

三、运动训练方法

3 组大鼠于造模成功后均采取室温饲养, 普通饲料, 自由饮水。运动训练组于造模成功后开始运动训练, 使用电动跑台运动, 将大鼠放在不断向后运动的履带上, 为避免履带后部的电栅栏电击, 大鼠会不断地在电动履带上向前运动, 大鼠每次运动 30 min, 每日 1 次, 电动跑台速度维持在 12~15 m/min^[7]。

四、脑内核糖核酸抽提

将 3 组大鼠均于运动训练组训练 2 周处死后断头取脑。在 4℃ 快速分开两侧大脑半球, 在额极和枕极各取 2 mm, 得到缺血区纹状体组织, 随后用 Trizol (Invitrogen) 分别进行核糖核酸 (ribonucleic acid, RNA) 提取。用紫外 (A260) 分光光度计测定总 RNA 浓度, 并计算 OD_{A260/A280} 值进行 RNA 电泳, 检测 RNA 的纯度和完整性。

五、逆转录-聚合酶链反应分析

逆转录-聚合酶链反应 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 分析采用 Access RT-PCR System (Promega 公司生产) 分析 mGluR-1 和 mGluR-5 的基因表达水平, β -actin 为参照。mGluR-1 基因引物序列: 上游 (正义链) 引物——5'-AAAGGC-TATGGCATTGCGA-3', 下游 (反义链) 引物——5'-CTC-

GATTAAGGCAACCAGCA-3', 扩增片段为 207 bp。mGluR-5 基因引物序列: 上游 (正义链) 引物——5'-TGCAATGCTCTGGAAGTTCCA-3', 下游 (反义链) 引物——5'-GGAAGCTGGCGGATTTTGAT-3' 扩增片段为 514 bp。 β -actin (内参照) 引物序列: 上游 (正义链) 引物——5'-AGTGTGACGTTGACATCCGT-3'; 下游 (反义链) 引物——5'-GACTCATCGTACTCCTGCTT-3'; 扩增片段为 240 bp。所有引物均有上海英俊公司合成。总反应体积为 50 μ l, 包括: 2 抽提的总 RNA, 5 $\times$ 反应液 10 μ l, 混合的各为 10 mM: 的 dNTP 1 μ l, 25 mM MgSO₄ 2 μ l, 上游引物 (20 pmol/ μ l) 和下游引物 (20 pmol/ μ l) 各 2 μ l, 以及 AMV 逆转录酶 (5 U/ μ l) 和 Tfl DNA 聚合酶 (5 U/ μ l) 各 1 μ l。反应条件为 48℃ 逆转录 45 min, 94℃ 变性 2 min, PCR 扩增为 94℃ 变性 30 s, 60℃ 退火 1 min, 68℃ 延伸 2 min, 40 个循环, 最后 68℃ 延伸 7 min。反应产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳, 溴乙锭染色, 使用 FR980 凝胶电泳分析系统 (复日公司产品) 进行半定量分析。以 β -actin 为参照, 计算分析各组目的基因扩增产物的相对光密度值和 β -actin 的扩增产物的光密度比值, 比值的大小反映了目的基因的 mRNA 表达水平的高低。

六、统计学分析

应用 SPSS 13.0 统计软件进行 AVOVA 分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。所有结果均以 ($\bar{x} \pm s$) 表示。

结 果

一、提取的 RNA 的完整性检测

将 3 组大鼠提取组织匀浆抽提得到的 RNA, 经紫外分光光度测定, OD_{A260/A280} 的比值在 2.0 与 2.1 之间。凝胶电泳显示清晰的 18S 和 28S 两根条带。说明所提取的 RNA 完整。

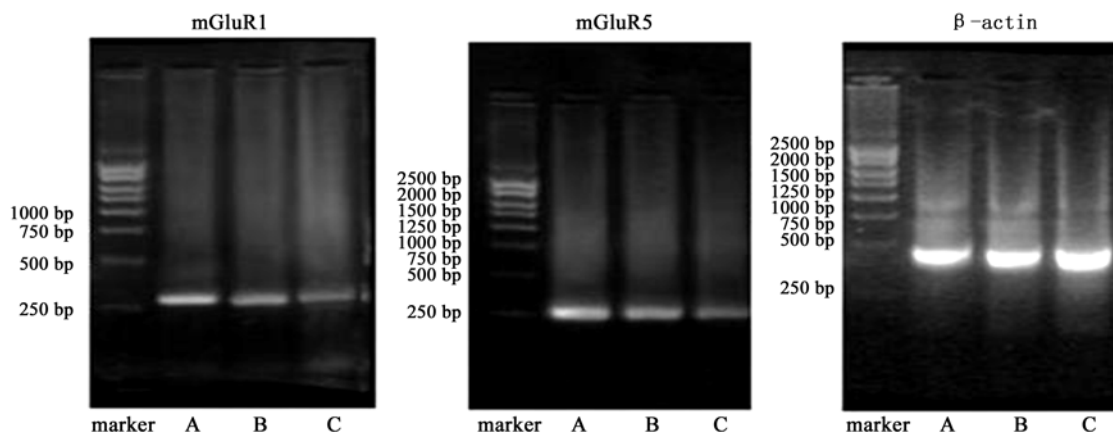
二、3 组大鼠 mGluR1 和 mGluR5 的 mRNA 表达的比较

3 组大鼠 mGluR1 和 mGluR5 的 mRNA 表达的比较见图 1, 3 组大鼠 mGluR1 和 mGluR5 的 mRNA 光密度值见表 1。

表 1 3 组大鼠 mGluR1 和 mGluR5 的 mRNA 光密度值 ($\bar{x} \pm s$)

组 别	n	mGluR1	mGluR5	β -actin
假手术组	6	14509.02 $\pm$ 698.52	17525.99 $\pm$ 792.55	162289.81 $\pm$ 327.16
缺血再灌注组	6	45284.43 $\pm$ 1052.27 ^a	69544.50 $\pm$ 1869.28 ^a	164126.81 $\pm$ 260.03
运动训练组	6	29039.33 $\pm$ 854.90 ^{ab}	36206.79 $\pm$ 991.60 ^{ab}	160438.77 $\pm$ 187.04

注: 与假手术组比较, ^a $P < 0.01$, 与缺血再灌注组比较, ^b $P < 0.01$



注:A 为缺血再灌注组;B 为运动训练组;C 为假手术组

图1 缺血再灌注、运动、假手术 mGluR1 和 mGluR5 的 mRNA 表达比较

讨 论

谷氨酸是脑内重要的兴奋性神经递质,也是一种潜在的神经毒素。正常生理条件下由于体内摄取系统存在,使细胞外谷氨酸维持一个较低的正常水平,这是一个动态平衡过程;在脑缺血时,谷氨酸大量释放并过度刺激谷氨酸受体,产生兴奋性毒性,就可能导致神经细胞的死亡,造成广泛的脑组织坏死。谷氨酸受体可以分为两类:离子型谷氨酸受体 (ionotropic glutamate receptors, iGluRs) 和代谢型谷氨酸受体 mGluRs。中枢神经系统中高度表达的代谢型谷氨酸受体,在谷氨酸的释放中发挥重要作用^[3]。代谢型谷氨酸受体属于 G 蛋白偶联受体,目前已克隆出 3 个组 8 个单位。I 组 mGluR 包括 mGluR1 和 mGluR5, II 组 mGluR 包括 mGluR2 和 mGluR3, III 组 mGluR 包括 mGluR4、mGluR6、mGluR7 和 mGluR8。免疫组化研究证实 I 组代谢型谷氨酸受体主要位于皮质、纹状体、丘脑底核、黑质网状部的突触后膜。I 组 mGluR 与磷脂酶 C 偶联,磷脂酶 C 被激活后促使磷脂酰肌醇水解,产生三磷酸肌醇和二酰基甘油,使 Ca^{2+} 从细胞内钙库释放出来,并激活蛋白激酶 C,引起神经细胞的兴奋。还有研究指出,三磷酸肌醇的产生还将促使 Ca^{2+} 的内流,致使细胞内 Ca^{2+} 浓度升高,发生 Ca^{2+} 非依赖性的谷氨酸释放^[8]。所以脑缺血的时间不同,细胞外聚集的谷氨酸的来源也不同,早期主要是 Ca^{2+} 依赖性出胞式谷氨酸释放,缺血时间加长会变成 Ca^{2+} 非依赖性的谷氨酸的释放。

Sommer 等^[9]通过缺血耐受实验,发现 mGluR1b 和 mGluR5 的表达下调保护了易受缺血损伤的神经细胞。张毅等^[4]研究证实 I 组代谢型谷氨酸受体确实在脑缺血再灌注后的 mRNA 表达会发生变化,表达水平会升高, mGluR1 比 mGluR5 的基因表达水平会有更大的上升幅度。郝玉曼等^[10]认为缺血再灌注可引起

mGluR1a 表达上调,且与神经元损伤程度平行。这些与我们的研究结果的一部分是一致的。本研究发现,运动训练后的缺血再灌注大鼠 I 组代谢型谷氨酸受体表达,较不运动的缺血再灌注大鼠会有明显下调,这在基因水平印证了我们开始的设想。但是我们也发现,可能由于 I 组代谢型谷氨酸受体的 mGluR 1 和 mGluR 5 作用机制不同,两者之间的基因表达并不一样,这可能是由于在缺血再灌注损伤中由诱发因素不同引起的。我们看到 mGluR 1 和 mGluR 5 的基因表达水平的上调提示 I 组代谢型谷氨酸受体在局灶性脑缺血再灌注神经元损伤中发挥重要作用,所以 mGluR 1 和 mGluR 5 的表达强弱是谷氨酸发挥效应的一个重要调节因素。运动的脑保护机制,也可能是由于运动影响了兴奋性氨基酸的释放^[11,12],它诱导了同源性阿片系统与谷氨酸递质相互作用发生变化。阿片与吗啡类物质是 N-甲基-D-门冬氨酸受体的非竞争性拮抗剂,运动增加了内源性阿片类物质释放,抑制了梗塞后发生的谷氨酸对 NMDA 受体的兴奋性毒性刺激,从而减轻了脑损害。运动训练后大鼠 mGluR 1 和 mGluR 5 的基因表达较未运动大鼠都会有明显下调,是否说明运动训练可以抑制兴奋性毒性谷氨酸产生,还有待我们继续深入研究。

运动训练是一种简单的、易于接受的脑卒中康复方法,目前已经广泛应用于临床^[1]。运动可以增强缺血性脑卒中大鼠神经功能的恢复^[13],加强突触重建和功能修复,促进运动功能恢复^[14],可以减少脑梗死体积、改善神经功能^[7,15]。我们推断, I 组代谢型谷氨酸受体的下调,可能是运动训练抑制兴奋毒性谷氨酸产生的重要机制之一,但具体的内在联系还有待进一步探讨。

参 考 文 献

- [1] 胡永善,吴毅,朱玉连,等 规范三级康复治疗促进脑卒中偏瘫患

- 者综合功能的临床研究. 中华物理医学与康复杂志, 2005, 27: 43-45.
- [2] Lee I, Kesner RP. Differential contribution of NMDA receptors in hippocampal subregions to spatial working memory. *Nat Neurosci*, 2002, 5: 162-168.
- [3] 梅和珊, 王永利. 脑缺血时谷氨酸释放机制. 中国药理学通报, 2005, 21: 393-396.
- [4] 张毅, 苏敏, 秦洁行, 等. 缺血再灌注大鼠脑内代谢型谷氨酸受体 1 和代谢型谷氨酸受体 5 的 mRNA 水平变化. 脑与神经疾病杂志, 2005, 13: 264-266.
- [5] Nuyens GE, De Weerd WJ, Spaepen AJ Jr, et al. Reduction of spastic hypertonia during repeated passive knee movements in stroke patients. *Arch Phys Med Rehabil*, 2002, 83: 930-935.
- [6] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*, 1989, 20: 84-91.
- [7] 贾杰, 胡永善, 吴毅, 等. 预运动训练对大鼠脑梗死后脑内谷氨酸水平动态变化的影响. 中华物理医学与康复杂志, 2008, 30: 361-365.
- [8] Nishizawa Y. Glutamate release and neuronal damage in ischemia. *Life Sci*, 2001, 69: 369-81.
- [9] Sommer C, Roth SU, Kuhn R, et al. Metabotropic glutamate receptor subtypes are differentially expressed after transient cerebral ischemia without, during and after tolerance induction in the gerbil hippocampus. *Brain Res*, 2000, 87: 172-180.
- [10] 郝玉曼, 罗祖明, 周东代, 等. 代谢型谷氨酸受体 1a 在大鼠脑缺血再灌注损伤中的基因表达变化. 中华老年心脑血管病杂志, 2004, 46: 119-122.
- [11] Wahl F, Allix M, Plotkine M, et al. Neurological and behavioral outcomes of focal cerebral ischemia in rats. *Stroke*, 1992, 23: 267-272.
- [12] Amir S. Involvement of endogenous opioids with forced swimming induced immobility in mice. *Physiol Behav*, 1982, 28: 2491.
- [13] 孙莉敏, 郑庆平, 胡永善, 等. 运动对缺血性脑卒中大鼠血管生成素基因表达的影响. 中华物理医学与康复杂志, 2007, 29: 85-88.
- [14] 谭来勋, 孙圣刚, 张双国. 脑梗死大鼠运动训练后星形胶质细胞与突触和运动功能的变化. 中华物理医学与康复杂志, 2005, 27: 581-584.
- [15] 贾杰, 胡永善, 吴毅, 等. 预运动训练对脑梗死大鼠脑内谷氨酸及其受体的影响研究. 中国运动医学杂志, 2008, 30: 443-446.

(修回日期: 2008-09-09)

(本文编辑: 阮仕衡)

· 研究快报 ·

一种基于人体行走模式的下肢瘫痪功能性低频电刺激治疗仪

燕铁斌 程曙光

【摘要】 目的 研发一种能模拟人体行走模式的功能性低频电刺激治疗仪。**方法** 在前期临床研究基础上, 根据人体正常行走时下肢主要肌群的收缩时序, 研发出一种四通道功能性低频电刺激治疗仪, 电刺激频率 1 ~ 100 Hz, 电流强度 0 ~ 110 mA, 脉宽 ≤ 600 ms, 连续输出, 该治疗仪的电刺激模式可在步态周期中不同时序阶段同时或分别刺激相应肌群。**结果** 通过分析实验室结果得知, 该电刺激治疗仪能诱发下肢肌群产生类似于正常步行时的动作, 基本达到预定设计目的。**结论** 本课题组研发的多通道功能性低频电刺激治疗仪可用于中枢神经损伤后下肢瘫痪的康复治疗。

【关键词】 功能性电刺激; 低频电刺激; 行走模式

中枢神经损伤后常导致患者下肢瘫痪, 严重影响其生活质量, 早日恢复行走功能不仅是康复治疗的重要目标, 也是患者及其家属最关心的问题之一^[1,2]。本研究对现有电刺激治疗仪的局限性进行分析, 并根据正常人体行走模式^[3,4], 研发了专门用于治疗下肢瘫痪的多通道低频电刺激治疗仪。

一、对现有电刺激治疗仪的刺激模式分析

大量文献证明, 国内、外现有用于治疗中枢神经损伤后下

肢瘫痪的电刺激治疗仪, 特别是低频电刺激治疗仪, 虽然可在一定程度上改善患者下肢功能、提高步行能力^[5-10], 但相关文献报道中所使用的电刺激治疗仪多采用单通道或双通道刺激模式, 不符合人体正常行走模式, 在一定程度上制约了电刺激的治疗效果。

1. 单通道电刺激治疗仪

该仪器只有一路刺激脉冲输出通道, 治疗模式单一, 每次只能刺激 1 块肌肉或具有相同收缩功能的一组肌群, 故只能改善单一活动方向的肌肉或肌群功能, 如采用单路电刺激治疗脑损伤偏瘫患者足下垂时, 通过刺激胫前肌引起足背伸活动(为踝关节单一方向单轴运动), 从而达到改善胫前肌收缩功能的目的。

2. 双通道电刺激治疗仪

基金项目: 广东省科技厅 (2007B031502005)

作者单位: 510120 广州, 中山大学附属第二医院康复医学科 (燕铁斌); 上海立邦高技术有限公司 (程曙光)

通讯作者: 燕铁斌, Email: Dr. yan@126.com