

· 基础研究 ·

运动训练对大鼠脑出血后血肿周围基质金属蛋白酶-9 表达的影响

王多姿 郭富强 张红艳 孙皓 孙祥荣 曾宪容 汪瑾宇 吴文斌 潘福琼

【摘要】目的 探讨运动训练对大鼠脑出血后神经功能恢复和脑组织中基质金属蛋白酶-9(MMP-9)表达的影响。**方法** 将 64 只 Sprague-Dawley 大鼠随机分为运动组及对照组,采用自体血注入法制作脑出血模型。运动组每天给予平衡、抓握、行走等运动训练,对照组置于普通笼内自由活动。在术后第 3、7、14 和 21 天进行神经功能评估,并断头取脑组织制成标本,采用免疫组织化学法和原位杂交技术测定脑组织中 MMP-9 的水平。**结果** 运动组与对照组神经功能评分在第 3 天最低,第 21 天评分最高;2 组比较,除第 3 天外,其余各时间点差异均有统计学意义($P < 0.05$)。运动组第 3 天 MMP-9 蛋白及 mRNA 有少量的表达,第 7 天达到高峰,之后逐渐下降;对照组 MMP-9 表达在第 3 天最高,第 7 天显著下降至最低值;MMP-9 蛋白的表达与其 mRNA 表达变化一致。2 组第 3 天、第 7 天 MMP-9 蛋白和 mRNA 水平比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);而第 14 天、第 21 天比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 早期运动训练能抑制 MMP-9 的表达而起到神经保护作用;中期 MMP-9 的表达增加,并发挥一定的积极作用,推测可能与组织重构和血管修复从而促进神经功能的恢复有关。

【关键词】 运动训练; 脑出血; 基质金属蛋白酶-9; 大鼠

The effects of exercises on the expression of matrix metalloproteinase-9 in perihematomal brain tissue after intra cerebral hemorrhage in rats WANG Duo-zi*, GUO Fu-qiang, ZHANG Hong-yan, SUN Hao, SUN Xiang-rong, ZENG Xian-rong, WANG Jin-yu, WU Wen-bing, PAN Fu-qiong. * Department of Neurology, Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu 610072, China

Corresponding author: GUO Fu-qiang, Email: guofuqiang2005@126.com

【Abstract】Objective To study the effects of exercises training on the recovery of neurological function and the expression of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in perihematomal brain tissue after intra cerebral hemorrhage (ICH) in rats. **Methods** Sixty-four male adult Sprague-Dawley rats were randomly divided into exercises group and control group. ICH model was induced by autoblood injection. The rats in exercises group were given balance, grasping and walking exercises every day. The rats in control group exercised freely in standard cages. Neurological function in both groups was measured at the 3rd, 7th, 14th and 21st d. All the rats were sacrificed and the concentration of MMP-9 was measured with immunohistochemical method and in situ hybridization. **Results** In both groups neurological function scores was lowest at the 3rd d, were highest at the 21st d. There was no significant difference between two groups at the 3rd d, but at the 7th, 14th and 21st d the differences between two groups were significant ($P < 0.05$). In exercises group, MMP-9 expressed weakly at the 3rd d, and peaked at the 7th d, then declined gradually. In control group, MMP-9 expression peaked at the 3rd d, then decreased slowly. MMP-9 protein expression was in accord with mRNA. MMP-9 expression in exercises group was significantly different from control group on the 3rd and 7th d ($P < 0.05$), but not at the 14th and 21st d ($P > 0.05$). **Conclusions** Early exercises can inhibit the expression of MMP-9 that could play a role in protecting neurons. Daily exercises can stimulates the expression of MMP-9 so as to have a positive role in midstage of disease. MMP-9 may be involved in tissue remodelling and vascular repairing, which prompt neurofunction recovery.

【Key words】 Exercises; Rat; Intracerebral hemorrhage; Matrix metalloproteinase-9

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2009.08.002

基金项目:四川省卫生厅科研课题(020091),四川省中医药管理局科研课题(200669)

作者单位:610072 成都,四川省人民医院神经内科(王多姿、郭富强、张红艳、孙皓、孙祥荣、曾宪容、汪瑾宇、吴文斌),康复医学科(潘福琼)

通信作者:郭富强,Email:guofuqiang2005@126.com

康复训练被循证医学证实能有效地帮助脑出血患者恢复神经功能。但目前,我国对脑出血的治疗仍以药物为主,康复训练没有得到临床医生足够的重视。其重要的原因可能是因为康复训练的作用机制未完全阐明。基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)是 Zn^{2+} 依赖性中性蛋白酶家族中基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMPs)的重要成员,涉及基底膜和细胞外基质成分的降解,与脑出血后发生的一系列病理生理过程如脑水肿、炎症反应、细胞凋亡等密切相关^[1]。目前,国内外鲜见运动训练对脑出血后脑组织 MMP-9 影响的相关报道。本实验采用自体血注入法建造大鼠脑出血模型,然后给予平衡、抓握、行走等功能训练,在不同时间段进行 MMP-9 的检测及神经功能的评估,观察大鼠神经功能恢复情况,研究运动训练对大鼠脑出血后神经功能恢复的影响及其机制。报道如下。

材料与方法

一、实验动物与分组

健康雄性清洁级 Sprague-Dawley 大鼠 64 只,周龄约 12 周,体重 250 ~ 350 g,由四川省医学科学院动物研究所提供。所有大鼠采用自体血注入法制成脑出血模型,术后随机分为对照组和运动组,每组再按模型制作完成后时间随机分为第 3 天、第 7 天、第 14 天和第 21 天 4 个亚组,每亚组 8 只大鼠。运动组每天给予平衡、抓握、行走等训练,对照组自由活动。各组分别在不同时间点进行行为神经功能评定,并断头取脑组织测定 MMP-9 的表达情况。

二、大鼠脑出血模型制作

参考文献[2]介绍的方法,将大鼠称重后用 10% 水合氯醛按 300 mg/kg 体重麻醉,俯卧位固定于立体定位仪上;常规消毒后在头部正中切一长约 1 cm 切口,逐层剥离皮肤暴露前囟;调整立体定位仪,使固定于其上的微量注射仪针尖定位于前囟前 0.2 mm、左侧中线旁开 3 mm,用微型电钻钻一小孔穿透颅骨到达脑膜但不损伤脑组织;大鼠断尾取血,用微量注射仪吸取新鲜血液约 50 μ l,沿着钻好的小孔垂直进针 5.5 mm (相当于尾状核),缓慢注射完自体不凝血后缓慢退针;石蜡封闭小孔并缝合头皮。

阳性实验大鼠的选择:参照神经功能评定方法^[3],0 分为无神经系统功能缺失症状,活动正常;1 分为不能完全伸展对侧前肢;2 分为出现向对侧转圈;3 分为行走时身体向偏瘫侧方向倾倒;4 分为不能自行行走;5 分为动物死亡。得分 1 ~ 4 分视为造模成功,得分为 0 分或 5 分者被淘汰。造模大鼠死亡 3 只被淘汰,均补足使总数保持 64 只。在相应的时间点处死大鼠前再进行一次神经功能评分。

三、运动训练方法

运动组大鼠造模 24 h 后,每天于网状滚筒式运动训练仪内进行跑步训练,平衡木上进行行走训练,网屏上进行抓握训练。对照组在饲养笼内自由活动,不给予任何干预措施^[4]。

1. 滚笼训练:采用自制电动网状自动式滚筒,长为 1.0 m,直径 0.6 m,中部均分为 4 格,每格滚笼中放入 1 只大鼠。第 1 天训练强度为 5 转/min,每天每只大鼠训练 10 min,以后每天强度为 8 转/min,每训练 5 d 休息 1 d。

2. 平衡木训练:平衡木为长 170.0 cm,宽 2.0 cm,厚 1.5 cm 的长方形木棒。将平衡木平行放置于离地面 7.0 cm 处,让大鼠在上面爬行,每天训练 10 min,每训练 5 d 休息 1 d。

3. 网屏训练:先将网屏水平放置并将老鼠置于其上,然后迅速将网屏垂直抬高至距离地面 80.0 cm 处,并放置海绵垫以防摔伤,观察大鼠在网屏上的停留时间并作出评估,每训练 5 d 休息 1 d。

四、平衡木试验及网屏试验

各组在各个时间点分别采用平衡木试验及网屏试验进行神经功能的评定^[4],以大鼠在运动训练器材上停留时间为评分标准,见表 1。两项行为学测定分数相加为大鼠的神经功能评分,范围 0 ~ 6 分。

表 1 平衡木试验及网屏试验评分标准

分数	网屏试验(s)	平衡木试验(s)
0	0 ~ 5	不能维持平衡
1	6 ~ 10	< 10
2	11 ~ 14	11 ~ 20
3	≥ 15	21 ~ 30

五、大鼠脑组织 MMP-9 水平的测定

1. 标本及病理切片的制作:各组大鼠在相应的时间点用过量的水合氯醛麻醉,迅速打开胸腔,由心尖部的左心室灌注生理盐水,直至由剪开的右心耳流出的液体清亮为止;然后断头取脑,脑组织标本浸于 4% 的中性多聚甲醛液中固定 24 ~ 48 h;以针眼为中心取厚约 5 mm 的冠状切片,石蜡包埋,在切片机上连续切片;使用免疫组织化学法和原位杂交法分别测定 MMP-9 蛋白及 mRNA 的表达情况。

2. 免疫组织化学和原位杂交阳性结果的判定:免疫组织化学和原位杂交阳性细胞胞浆或胞核中可见棕黄色颗粒或团块状物质。阴性对照组未加入相应的 MMP-9 抗体和杂交液。

3. 数据分析:每张切片在 400 倍光学显微镜下随机选取血肿边缘不重复的 4 个视野,分别计数 MMP-9 免疫组织化学和原位杂交染色的阳性细胞数,计算平

均阳性细胞数。

六、统计学分析

所得阳性细胞的数据以($\bar{x} \pm s$)表示,所有数值均经方差齐性及正态性检验,应用 SPSS 11.0 版统计学软件,采用成组设计的 t 检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

结 果

一、脑出血后 2 组大鼠神经功能比较

各组大鼠平衡木试验评分结果见图 1。在平衡木行走试验中,运动组与对照组第 3 天的评分最低,第 21 天的评分最高。成组设计的 t 检验分析显示:2 组第 3 天和第 21 天比较,差异无统计学意义(均 $P > 0.05$);第 7 天和第 14 天比较,差异有统计学意义(均 $P < 0.05$)。

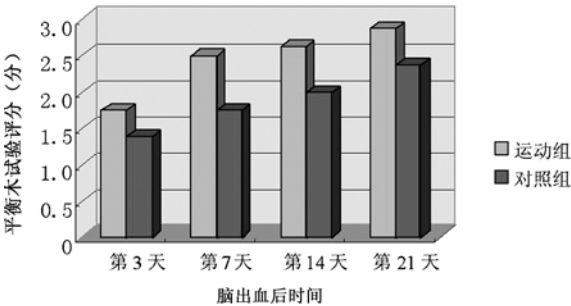


图 1 2 组不同观察时间点平衡木试验评分

各组大鼠网屏试验评分结果见图 2。在网屏抓握试验中,运动组与对照组第 3 天的评分最低,第 21 天的评分最高。成组设计的 t 检验分析显示:2 组第 3 天和第 21 天比较,差异无统计学意义(均 $P > 0.05$);第 7 天和第 14 天比较,差异有统计学意义(均 $P <$

0.05)。

2 组大鼠神经功能评分(平衡木和网屏试验评分之和)见表 2。运动组与对照组第 3 天评分最低,第 21 天评分最高。成组设计的 t 检验分析显示:2 组第 3 天比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);第 7 天、第 14 天和第 21 天比较,差异有统计学意义(均 $P < 0.05$)。

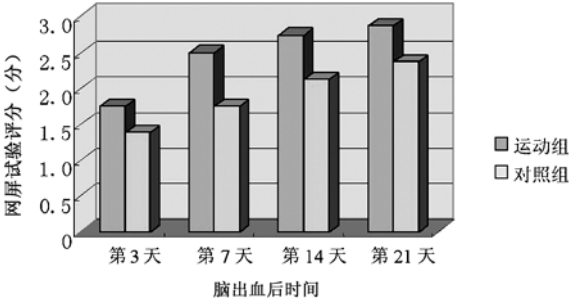


图 2 2 组不同观察时间点网屏试验评分

表 2 大鼠神经功能评分结果(分)

组 别	n	脑出血后时间			
		第 3 天	第 7 天	第 14 天	第 21 天
运动组	32	3.0000 ± 0.9258	5.0000 ± 0.7559 ^a	5.3750 ± 0.5176 ^a	5.7500 ± 0.4629 ^a
对照组	32	2.7500 ± 0.7071	3.5000 ± 1.0690 ^a	4.1250 ± 0.7071 ^a	4.3438 ± 1.2372 ^a

注:与运动组比较,^a $P < 0.05$

二、2 组大鼠脑组织 MMP-9 蛋白及 mRNA 的表达情况

对照组 MMP-9 蛋白表达情况见图 3。第 3 天可见大量的 MMP-9 表达;第 7 天 MMP-9 表达明显减少;第 14 和 21 天可见少量的 MMP-9 表达。阴性对照组未见 MMP-9 的表达。

运动组 MMP-9 mRNA 表达情况见图 4。第 3 天可

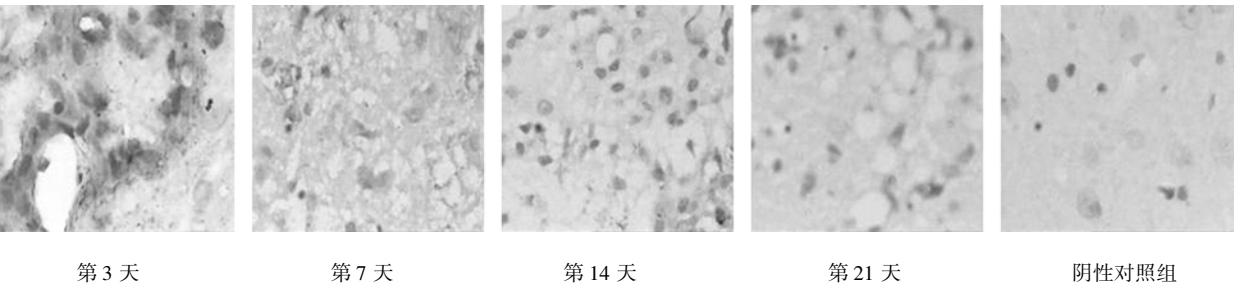


图 3 对照组脑出血后不同时间点 MMP-9 蛋白的表达(免疫组织化学法, ×400)

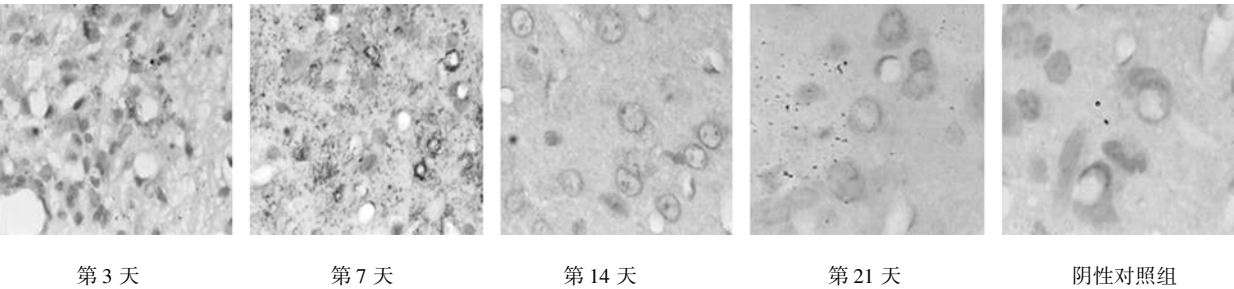


图 4 运动组脑出血后不同时间点 MMP-9 mRNA 的表达(原位杂交, ×400)

见有少量 MMP-9 的表达;第 7 天可见 MMP-9 表达增强,达高峰;第 14 及 21 天 MMP-9 的表达较第 7 天有所减少。阴性对照组未见 MMP-9 的表达。

运动组与对照组大鼠脑出血后血肿周围组织 MMP-9 mRNA 及蛋白的表达情况见表 3,图 5。运动组 MMP-9 蛋白及 mRNA 阳性细胞在第 3 天有少量的表达,在第 7 天达峰值,之后逐渐下降。而对照组 MMP-9 蛋白及 mRNA 阳性细胞在第 3 天到达最高值,第 7 天显著下降。

表 3 2 组脑出血大鼠血肿周围组织 MMP-9 mRNA 及蛋白的阳性细胞表达比较(个, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	MMP-9 mRNA	MMP-9 蛋白
运动组	32		
第 3 天		0.8750 $\pm$ 0.4579 ^a	1.0156 $\pm$ 0.4487 ^a
第 7 天		2.0625 $\pm$ 1.0832 ^a	2.3750 $\pm$ 1.1288 ^a
第 14 天		0.8594 $\pm$ 0.4792	0.7500 $\pm$ 0.4399
第 21 天		0.7187 $\pm$ 0.4200	0.7969 $\pm$ 0.4896
对照组	32		
第 3 天		2.0625 $\pm$ 2.5421	2.4844 $\pm$ 0.7349
第 7 天		0.7500 $\pm$ 2.0494	0.5000 $\pm$ 0.4399
第 14 天		0.3750 $\pm$ 1.2583	0.6250 $\pm$ 0.4353
第 21 天		0.4375 $\pm$ 1.5018	0.5156 $\pm$ 0.4304

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$

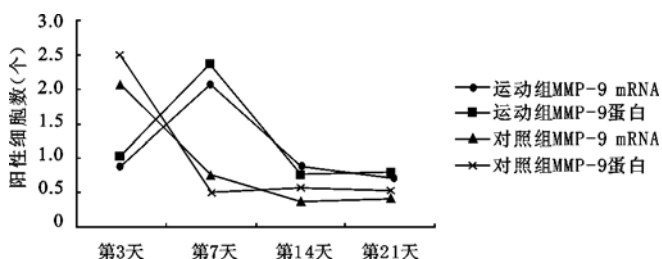


图 5 2 组大鼠在各个时间点 MMP-9 蛋白及 mRNA 阳性细胞表达

由以上结果可见:2 组 MMP-9 蛋白的表达与其 mRNA 表达大致相同。成组设计的 t 检验分析显示:2 组第 3 天、第 7 天比较,差异有统计学意义(均 $P < 0.05$);而第 14 天、第 21 天比较,差异无统计学意义(均 $P > 0.05$)。

讨 论

众所周知,脑出血后较高的死亡率和致残率严重地危害人类的健康,也大大降低了患者的生活质量。康复训练是得到循证医学肯定和支持的有效治疗措施,多数学者认为其作用机制与神经组织的可塑性及邻近神经组织功能的重塑和代偿密切相关,但迄今为止其具体机制未完全阐明。Biernaskie 等^[5]认为,康复训练能促进与神经功能恢复密切相关的未损害皮质运动区神经树突的生长,尤其是早期的康复训练(发病后第 5 天),能增加树突分支的数量,增强第 V 层神经元

功能的复杂性。徐莉等^[6]通过给予脑梗死大鼠平衡、抓握、旋转等功能训练,观察其感觉、运动及神经功能的改变,证实康复训练对偏瘫鼠神经功能恢复起着重要的作用。

脑出血刺激了多种 MMPs 成分的增加,而这些成分的增加参与许多病理活动的调节,包括神经毒性、脱髓鞘和血脑屏障的破坏^[7]。一些研究表明,MMP-9 可降解内皮基底膜和细胞外基质,损害内皮细胞,破坏血脑屏障,从而导致脑水肿的发生和发展^[8-10]。目前,MMP-9 是脑出血后研究的热点,而康复训练与脑出血后 MMP-9 的关系鲜见报道。

定期运动锻炼对体内炎症反应有一定的抑制作用:运动可使肌肉纤维产生具有抗炎效应的细胞因子白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6),而 IL-6 可促进血液循环中其它的抗炎因子如白介素受体-1 拮抗剂(IL-1 α)和白细胞介素-10(IL-10)的产生,从而抑制前炎症因子——肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)^[11]。有研究认为 TNF- α 可促进 MMP-9 的表达,其机制可能是通过转录因子核因子- κ B(nucleus factor- κ B, NF- κ B)和 p38 MAPK(促分裂原活化蛋白激酶)等通路来实现^[12,13]。本实验的神经功能评分表明:不管是对照组还是运动组,第 3 天的神经功能评分均为最低,说明此时神经损害最为严重。结合以往的研究资料,我们认为 MMP-9 在脑出血早期加重了血肿周围组织的损伤。而运动组第 3 天 MMP-9 阳性细胞的表达明显少于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),提示早期运动训练的干预可以明显降低 MMP-9 水平,也抑制了 MMP-9 在脑出血早期的损害作用,从而发挥积极的神经保护作用。我们推测其可能的机制是:早期的运动训练通过抑制脑出血后炎症反应来减少 MMP-9 的表达,从而减轻炎症因子(如 TNF- α 等)引起 MMP-9 表达增加所致的脑组织损伤。但因运动训练 3 d 时间较短,神经功能的改善不明显,所以 2 组神经功能评分比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

在第 7 天,运动组 MMP-9 的表达明显高于对照组,差异具有统计学意义($P < 0.05$);运动组神经功能的评分(包括平衡木及网屏训练结果)明显优于对照组,提示在运动训练的刺激下,MMP-9 水平增高与神经功能的恢复有一定关系,MMP-9 可能有助于神经功能的恢复。MMP-9 与维持血脑屏障基底膜稳定和血管结构完整的细胞外基质功能密切相关。Johnson 等^[14]认为,MMP-9 是缺血组织新血管再生所必需,它参与了毛细血管分支的形成。有资料表明,MMP-9 的激活可以促进血管内皮生长因子 A 分裂转换为可溶型,从而增加其生物利用度,诱导血管的生成^[15]。Davis 等^[16]的体外活体研究表明,在通过运动锻炼增强基底膜稳定

来对抗脑卒中后缺血再灌注损伤的过程中,MMP-9 起到了关键性的作用。故我们推测:脑出血后中期及后期(脑出血第 7,14 和 21 天),在运动训练的持续作用下,MMP-9 表达增加并发挥一定的积极作用。其作用机制可能在于:MMP-9 通过参与血脑屏障组织结构重建与修复、新生血管的生成、闭塞血管的再通等,来增加血肿周围缺血脑组织的氧供,增强脑组织的可塑性及功能代偿,从而促进神经功能的恢复。

综上,运动训练是帮助脑出血后神经功能恢复的有效手段,可通过多途径发挥其积极效应。运动训练不仅在早期能下调 MMP-9 水平,抑制其损害作用,而且在后期还能促使 MMP-9 表达,从而减轻损伤,促进神经功能的恢复。

参 考 文 献

- [1] Fujimura M, Watanabe M, Shimizu H, et al. Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) in cerebral cavernous malformations; immunohistochemical analysis of MMP-2, -9 and TIMP-2. *Acta Neurochirurgica*, 2007, 149: 179-183.
- [2] Hua Y, Schallert T, Keep RF, et al. Behavioral tests after intracerebral hemorrhage in the rat. *Stroke*, 2002, 33: 2478-2484.
- [3] Faure S, Chapot R, Talleld, et al. Cerebroprotective effect of angiotensin IV in experimental ischemic stroke in the rat mediated by AT(4) receptors. *J Physiol Pharmacol*, 2006, 57: 329-342.
- [4] 杜厚伟, 刘楠, 陈荣华, 等. 康复训练对脑缺血大鼠神经功能恢复和脑组织中白介素 10 含量变化的影响. *中华物理医学与康复杂志*, 2006, 28: 149-152.
- [5] Biernaskie J, Chernenko G, Corbett D. Efficacy of rehabilitative experience declines with time after focal ischemic brain injury. *J Neurosci*, 2004, 24: 1245-1254.
- [6] 徐莉, 李玲, 陈景藻, 等. 康复训练对大鼠脑梗死神经功能恢复的影响. *中华物理医学与康复杂志*, 2000, 22: 86-88.
- [7] Montaner J, Alvarez-sabin J, Molina CA, et al. Matrix metalloproteinase expression is related to hemorrhagic transformation after cardioembolic stroke. *Stroke*, 2001, 32: 2762-2767.
- [8] Shigemori Y, Katayama Y, Mori T, et al. Matrix metalloproteinase-9 is associated with blood-brain barrier opening and brain edema formation after cortical contusion in rats. *Acta Neurochir Suppl*, 2006, 96: 130-136.
- [9] Kim GW, Gasche Y, Grzeschik S, et al. Neurodegeneration in striatum induced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid: role of matrix metalloproteinase-9 in early blood-brain barrier disruption? *J Neurosci*, 2003, 23: 8733-8742.
- [10] Montaner J, Fernández-Cadenas I, Molina CA, et al. Safety profile of tissue plasminogen activator treatment among stroke patients carrying a common polymorphism (C-1562T) in the promoter region of the matrix metalloproteinase-9 gene. *Stroke*, 2003, 34: 2851-2855.
- [11] Pedersen BK. The anti-inflammatory effect of exercise; its role in diabetes and cardiovascular disease control. *Essays Biochem*, 2006, 42: 105-117.
- [12] Hosomi N, Ban CR, Naya T, et al. Tumor necrosis factor-alpha neutralization reduced cerebral edema through inhibition of matrix metalloproteinase production after transient focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2005, 25: 959-967.
- [13] Lee SJ, Park SS, Lee US, et al. Signaling pathway for TNF-alpha-induced MMP-9 expression; mediation through p38 MAP kinase, and inhibition by anti-cancer molecular magnolol in human urinary bladder cancer 5637 cells. *Int Immunopharmacol*, 2008, 8: 1821-1826.
- [14] Johnson C, Sung HJ, Lessner SM, et al. Matrix metalloproteinase-9 is required for adequate angiogenic revascularization of ischaemic tissues; potential role in capillary branching. *Circ Res*, 2004, 94: 262-268.
- [15] Hughes D, Fu AA, Puggioni A, et al. Adventitial transplantation of blood outgrowth endothelial cells in porcine haemodialysis grafts alleviates hypoxia and decreases neointimal proliferation through a matrix metalloproteinase-9-mediated pathway—a pilot study. *Nephrol Dial Transplant*, 2009, 24: 85-96.
- [16] Davis W, Mahale S, Carranza A, et al. Exercise pre-conditioning ameliorates blood-brain barrier dysfunction in stroke by enhancing basal lamina. *Neurol Res*, 2007, 29: 382-387.

(收稿日期: 2008-10-29)

(本文编辑: 吴倩)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

《中华物理医学与康复杂志》2010 年第一期起扩版

为进一步缩短论文发表周期及扩大本刊信息载容量,经本刊申请及中华医学会杂志社批复(医会期管发【2009】25 号),本刊每期页码将于 2010 年第一期起由原来的 72 页增加至 80 页。扩容后每册定价仍为 15.00 元,全年共计 180.00 元,出版日(每月 25 日)及刊期(月刊)保持不变。欢迎广大读者、作者继续踊跃投稿及订阅本刊。

《中华物理医学与康复杂志》编辑部