

· 基础研究 ·

运动对缺血性脑卒中大鼠血管生成素基因表达的影响

孙莉敏 郑庆平 胡永善 白玉龙 朱大年 崔晓 贾杰

【摘要】目的 研究运动能否促进大鼠局部脑缺血再灌注后的功能恢复,并观察运动对血管生成素及其受体基因表达的影响,从而探讨功能恢复的内在机制。**方法** 成年雄性 SD 大鼠 18 只,随机分成运动组、静止组、假手术组,每组 6 只。大脑中动脉阻塞(MCAO)法造模 24 h 后,运动组予以 2 周的电动跑台训练,每天 30 min。采用神经行为学评分、脑梗死体积评价神经功能恢复情况,实时定量聚合酶链反应(real-time PCR)法从分子水平观察血管生成素-1(Ang-1)、血管生成素-2(Ang-2)及内皮特异性酪氨酸激酶受体-2(Tie-2)的基因表达情况。**结果** 2 周后运动组的神经行为学评分高于静止组,脑梗死体积显著小于静止组,Ang-1、Tie-2 的 mRNA 表达均显著大于静止组与假手术组。**结论** 运动能够促进缺血性脑卒中大鼠神经功能的恢复,这种改变可能与 Ang/Tie-2 通路的上调有关。

【关键词】 缺血性脑卒中; 跑台; 血管生成素; 大鼠

Effects of exercise on expression of angiopoietin in rats with ischemic stroke SUN Li-min*, ZHENG Qing-ping, HU Yong-shan, BAI Yu-long, ZHU Da-nian, CUI Xiao, JIA Jie. *Department of Rehabilitation Medicine, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200040, China
Corresponding author: SUN Li-min, Email: tracy 611@sina.com

【Abstract】 Objective To determine if exercise could induce expression of angiopoietin / Tie pathway, in association with angiogenesis; and if angiogenic changes correlate with reduced brain injury in rats with ischemic stroke. **Methods** Eighteen adult male Sprague Dawley rats were randomly divided into an exercise group, a non-exercise group and a control group. Middle cerebral artery occlusion model were established by operation on the rats of the exercise and non-exercise groups, while sham operation was performed on those of the control group. The rats in the exercise group were subject to exercise on a treadmill for 30 minutes each day for 2 weeks, while those in the non-exercise and control groups were housed for 2 weeks. Scores of neurological deficits and infarct volume were evaluated. Real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction was employed to test the expression of angiopoietin-1, angiopoietin-2 and Tie-2. **Results** Exercise significantly ($P < 0.01$) improved the neurological function as revealed by the increased scores of neurological deficits, and increased mRNA expression of angiopoietin-1 and Tie-2 at the end of 2 weeks. Meanwhile, the infarct volume was significantly reduced by the 2-week exercise. **Conclusion** This study indicates that exercise reduces brain injury in rats with ischemic stroke. The reduced damage is associated with angiogenesis, possibly induced by angiogenic factors following exercise. Physical exercise up-regulates mRNA levels of the angiopoietin/Tie-2 pathway.

【Key words】 Ischemic stroke; Treadmill; Angiopoietin; Rats

缺血性脑卒中是临床上常见的脑血管病,占脑卒中患者的 70% ~ 85%,它以高发病率和致残率成为当前严重威胁人类健康的重要疾病。早期的康复训练可改善脑卒中患者的运动功能,提高其生活自理能力,这已通过大量的临床实践为人们所接受,并在我们科前期完成的国家科委“九五”攻关课题“脑血管意外的早期康复研究”^[1]和十五攻关课题“急性脑血管病三

级康复方案的研究”^[2]中被证实。但运动是通过何种机制促进脑卒中后脑实质细胞功能的恢复,进而改善患者的功能,至今尚不清楚。

有研究证实,梗死体积和神经行为学的改善与大脑中动脉供血区的血流量和速度密切相关^[3]。在新生血管形成调节途径中,血管生成素(angiotensin, Ang)及其内皮特异性酪氨酸激酶受体 Tie 通路是一种新发现的调节血管生成的重要信息途径。本研究试图观察运动对缺血性脑卒中大鼠梗塞区 Ang/Tie 基因表达的影响,从而探讨运动改善脑梗塞动物神经功能的可能机制,为临床脑卒中患者的康复治疗提供理论依据。

作者单位:200040 上海,复旦大学附属华山医院康复医学科(孙莉敏、郑庆平、胡永善、白玉龙、贾杰);复旦大学上海医学院生理和病理生理实验室(朱大年);上海天山中医院(崔晓)

通讯作者:孙莉敏,Email:tracy 611@sina.com

材料与方法

一、实验动物与分组

雄性成年 Sparque-Dawley 大鼠(复旦大学医学院动物实验中心提供,清洁级)18只,体重为220~250 g,2.5个月龄。在造模手术前随机分为运动组、静止组和假手术组,每组6只。笼内饲养,给予充足食物和饮水,每日12 h光照,室温(23±1)℃。

二、实验动物模型制作

大鼠大脑中动脉阻塞/再灌注模型(middle cerebral artery occlusion/reperfusion, MCAO/R)制备,采用 Longa 线栓法^[4]阻塞大鼠右侧大脑中动脉造成脑缺血。

三、实验动物跑台训练

运动组大鼠采用跑台训练法,用立泰生物科技有限公司制造 DSPT-202 型五跑道电动跑台,将大鼠置于不断向后传输的履带上,为避免履带尾部的电栅栏的电击,大鼠将不断地在电动履带上主动向前奔跑。各组大鼠在手术前均经过适应性跑步训练3 d,每天30 min。在大鼠缺血再灌注后24 h,运动组予以跑台训练,每天30 min,每周5 d,连续2周。跑台平板斜度为0°。履带传输速度:术前3 d适应性跑步训练为12 m/min;运动组跑台训练第1天为5 m/min,第2天为8 m/min,第3天及以后为12 m/min^[5]。剩余2组同样抓取,但不作跑台干预。

四、神经功能缺失体征评分

依照 Longa 等^[4]的方法,大鼠神经学评分分别在缺血再灌注1~7 d以及11 d和14 d时测量。使用6分法评价大鼠缺血后运动及行为学缺陷。5分——轻提大鼠尾将其悬至距地面1 m处,其双前肢伸向地面且无其它神经病学特征;4分——大鼠对侧前肢持续弯曲,程度由轻度手腕弯曲、肩关节内收到完全的手腕、肘弯曲及肩关节内旋,无其它异常;3分——将大鼠置于软塑封纸上,使其前爪可以牢牢抓住,拉住鼠尾,在其肩膀后轻轻侧推直至前肢侧划数英寸,重复数次,瘫痪侧抵抗侧推力的能力下降;2分——大鼠被放在地面上活动,拉其尾时向瘫痪侧旋转;1分——大鼠被放在地面上自由行动时向瘫痪侧旋转;0分——大鼠被放在地面上无自发活动。

五、脑组织冰冻切片及脑缺血梗塞程度测定

大鼠经水合氯醛麻醉后,自心脏灌注生理盐水并继之以4%多聚甲醛灌注固定。取出脑组织,经蔗糖梯度脱水后下沉。连续冠状冰冻切片(2.0~4.0 mm Bregma 平面),自视交叉出现开始,至腹侧海马出现为止,片厚30 μm。切片入脑保护液,-20℃保存。

进行脑梗死体积测定时,每8张(即隔240 μm)取一张脑片,1%甲苯胺蓝染色以鉴定存活细胞。然后采

用 Q500W 型图象分析仪得到鼠脑各 Bregma 平面的梗死面积后,用梯形公式计算每个动物的缺血灶梗死体积绝对值,然后进一步计算梗死体积的相对值。梗死体积计算公式: $V(\text{mm}^3) = 1/2 \times (S1 + S2 + S3 + \dots + Sn) \times 0.24$ 。得到缺血灶梗死体积绝对值后,为排除个体差异及水肿的影响,进一步将计算所得的绝对值除以对侧半球体积,得到一个相对值,即相对梗死体积^[6]。

六、实时定量聚合酶链反应(real-time PCR)法

大鼠经10%水合氯醛(300 mg/kg 体重)腹腔麻醉后,迅速用无菌器械断头取脑。在冰上用无菌刀片迅速取出右侧纹状体,称重后置于5 ml离心管,液氮速冻后保存在-70℃冰箱保存。Trizol 经典方法抽提总 RNA。经纯度检测和完整性分析后行逆转录,并在 iCycler iQ™ Real-Time PCR Detection System 上进行实时定量 PCR 扩增,检测 Ang-1、Ang-2 和 Tie-2 mRNA 的表达。

七、数据整理和统计学分析

数据采用 SPSS 10.0 版统计软件进行分析。所有定量数据进行正态性和方差齐性检验,多组均数间的比较采用单向方差分析(ANOVA),满足方差齐性要求的数据采用 LSD 法进行各组均数的多重比较,否则采用 Dunnett's T3 法比较多变量相关分析中的双变量相关分析。计量资料符合正态性分布者以($\bar{x} \pm s$)表示, $P < 0.05$ 为有统计学意义。计数资料以中位数表示,组间差异用 Kruskal-Wallis analysis 比较,两两比较的检验水准采用调整后的 $P < 0.01$ 为有统计学意义。

结 果

一、神经行为学评分

术后第1天起,运动组和静止组的神经行为学评分就显著小于假手术组,而运动组自术后第3天起神经行为学评分就显著高于静止组,且一直持续到2周末($P < 0.01$),见表1。

表1 各组大鼠术后神经行为学评分(分)

组别	只数	术后							
		第1天	第2天	第3天	第4天	第5天	第6天	第7天	第11天
运动组	6	2 ^a	2.5 ^a	3 ^{ac}	4 ^{ac}	4 ^{ac}	4 ^{ac}	4 ^{bc}	4 ^{bc}
静止组	6	2 ^a	2 ^a	2 ^a	2 ^a	2 ^a	2.5 ^a	2.5 ^a	3 ^a
假手术组	6	5	5	5	5	5	5	5	5

注:与假手术组相比,^a $P < 0.01$,^b $P < 0.01$;与静止组相比,^c $P < 0.01$

二、梗死体积测定

脑片经 Q500W 型图象分析仪和公式计处理后得出的相对梗死体积值,2周后运动组、静止组和假手术组的相对梗死体积分别为(4.00±2.00)%、(19.64±9.70)%和0%(见表2),可见静止组的相对梗死体积最大,经单向方差分析提示组间差异有统计学意义。

表 2 2 周后各组大鼠相对梗死体积(%, $\bar{x} \pm s$)

组 别	只数	相对梗死体积
运动组	6	4.00 $\pm$ 2.00 ^a
静止组	6	19.64 $\pm$ 9.70
假手术组	6	0

注:与静止组相比,^a $P < 0.05$

三、实时定量 PCR 结果

运动组的实时定量 PCR 结果显示 Ang-1、Ang-2 及 Tie-2 的 mRNA 表达均显著高于假手术组 ($P < 0.01$),其中 Ang-1 和 Tie-2 的 mRNA 表达还显著高于静止组 ($P < 0.01$)。静止组的 Ang-1 和 Tie-2 的 mRNA 表达均显著高于假手术组 ($P < 0.01$),见表 3。

表 3 各组 Ang-1、Ang-2 及 Tie-2 实时定量 PCR $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值 ($\bar{x} \pm s$)

组 别	只数	Ang-1	Ang-2	Tie-2
运动组	6	71.53 $\pm$ 24.86 ^a	4.69 $\pm$ 2.88 ^a	5.29 $\pm$ 1.77 ^a
静止组	6	18.02 $\pm$ 9.39	2.50 $\pm$ 0.99	2.38 $\pm$ 0.74 ^b
假手术组	6	5.58 $\pm$ 6.13	1.13 $\pm$ 0.57	1.06 $\pm$ 0.34

注:与静止组、假手术组相比,^a $P < 0.01$;与假手术组相比,^b $P < 0.01$

讨 论

大量动物实验和临床实践证实,早期康复训练能促进脑血管疾病的功能恢复。本研究结果显示,MCAO 大鼠经 2 周跑台训练,其梗死体积较静止组显著减少,神经行为学评分较静止组显著增高,这些都提示运动有助于促进缺血性脑卒中大鼠神经功能的恢复。

脑卒中后大鼠的运动训练国内文献报道多采用游泳、滚筒、网屏、平衡木训练等方法,而本研究采用了国际上通用的跑台训练作为缺血性脑卒中大鼠的康复训练手段,运动量采取循序渐进的适宜运动,跑台速度由第 1 天的 5 m/min,逐渐加至后来的 12 m/min,不仅可以克服其他训练手段在控制运动量上的不足,且能在运动速度、运动路程上给出更加客观的指标,使研究结果更具可靠性。

在啮齿类动物的胚胎发育过程中,脑血管的发育主要是通过血管发生,而在成年人类和啮齿类动物脑内,新生血管的生成则只在病理生理条件(如低氧、缺血^[7]、其他因素)下发生,原先存活的毛细血管经发芽或潜在吻合血管枝增大形成新血管,过程包括内皮细胞趋化移动、增殖,形成新管腔,周细胞、血管平滑肌细胞等血管周围细胞的移入、粘附至内皮层形成完整的血管壁;血管丛经重塑(修剪)形成成熟的血管系统等。最近的研究发现,Ang 及其受体 Tie 调节通路是一种新发现的调节血管生成的重要信息途径,它对促成血管形成后期的血管的成熟、稳定性及重建方面扮演着非常重要的角

色^[8]。血管生成素最早是从人结肠癌细胞中分离得到的,该蛋白质家族成员有 Ang-1 ~ Ang-4,目前研究较多的是 Ang-1 和 Ang-2,它们具有共同的结构,即由 3 个结构域组成的糖蛋白(N-端疏水性分泌信号肽、介导同源寡聚体形成的 α -螺旋样结构域和 C-端介导配体活性的纤维蛋白原样结构域),特异性作用于内皮细胞,具有很强的促血管生成活性。Tie 为 Ang 内皮特异性酪氨酸激酶受体,Tie-1 和 Tie-2 是酪氨酸激酶家族的 2 个主要成员,它们很早已被证实在血管发生的成熟阶段中发挥作用。Tie-2 由 8 个功能区的细胞外结构域和一个酪氨酸激酶结构域的胞内部分组成。

在实时定量 PCR 实验中,我们发现运动组大鼠的 Ang-1、Tie-2 的 mRNA 表达均较静止组和假手术组有显著增加,而 Ang-2 的增加虽未达到统计学意义,但是有着明显的上升趋势。这在分子水平验证了我们开始的设想,Ang/Tie 通路在康复训练后有所上调,这可能是康复训练改善缺血性脑卒中神经功能的机制之一。在缺血性脑卒中的恢复过程中,梗死灶脑组织内的血管再生(血管形成)是决定脑血流量、神经元的修复和再生以及患者功能恢复程度的重要决定因素,也是神经细胞间突触联系功能重建或重塑的基础。Ang-1/Tie-2 系统的上调和激活对脑梗死的血管再生起着重要作用。运动后脑梗死大鼠 Ang-1 水平增高,Ang-1 与受体 Tie-2 结合后,表达活化 Tie-2 的内皮细胞促进血管萌芽和分枝,募集内皮周围支持细胞,促进血管重塑和成熟,形成完整的血管壁,并通过调节内皮细胞和血管周围间质细胞的相互作用维持血管管腔的完整性和稳定性^[9],向梗死灶生长^[10],增加梗死灶区域的脑血流量;同时活化的内皮细胞磷脂酰肌醇激酶(PI₃),使凋亡抑制剂生成增多,对抗内皮细胞凋亡,减轻缺血性脑卒中后大鼠血脑屏障(blood brain barrier, BBB)通透性的增加,从而减轻缺血性脑卒中梗死灶脑组织的损害。Ang-2 则在血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的协同下,能促进血管增生^[11],表现出血管生成的协同效应。

最近的研究表明,Ang/Tie 通路在脑缺血性损伤后的药物治疗^[12]、细胞因子治疗^[6]等的作用已得到了证实,Ang/Tie 系统在脑梗死康复治疗中的作用国内外很少报道。本研究观察了 Ang/Tie 通路在康复训练前后的变化,发现脑缺血康复治疗后 Ang/Tie-2 水平上调,这可能与脑缺血边缘带新生血管形成密切相关,脑梗死区域新生血管和侧支循环不断形成,从而促进脑血流,改善脑梗死周边区脑代谢,使卒中后神经功能得到最终的恢复。Ang-1 和 Ang-2 都结合在受体 Tie-2 上,而 Tie-2 的细胞内结构域可结合多种蛋白分子行使功能,更多关于血管生成素及其受体在脑缺血后脑功能康复与重

塑过程中的作用,有待于进一步的研究。

参 考 文 献

- [1] 胡永善,朱玉连,杨培君,等. 早期康复治疗对急性脑卒中患者运动功能的影响. 中国康复医学杂志,2002,17: 145-147.
- [2] 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康复的临床研究. 中国康复医学杂志,2004,19: 418-421.
- [3] Treger I. The relationship between mean flow velocity and functional and neurologic parameters of ischemic stroke patients undergoing rehabilitation. Arch Phys Med Rehabil, 2005, 86:427-430.
- [4] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. Stroke,1989, 20: 84-91.
- [5] Stroemer RP, Kent TA, Hulsebosch CE. Neocortical neural sprouting, synaptogenesis, and behavioral recovery after neocortical infarction in rats. Stroke, 1995,26:2135-2144.
- [6] Swanson RA, Morton MT, Tsao-Wu G, et al. Asemiautomated method for measuring brain infarct volume. J Cereb Blood Flow Metab,1990, 10:290-293.
- [7] Lee ST, Chu K, Jung KH, et al. Granulocyte colony-stimulating factor

enhances angiogenesis after focal cerebral ischemia. Brain Res, 2005,1058:120-128.

- [8] Ardelt AA, McCullough LD, Korach KS, et al. Estradiol regulates angiotensin-1 mRNA expression through estrogen receptor-alpha in a rodent experimental stroke model. Stroke, 2005, 36: 337-341.
- [9] Yancopoulos GD, Klagsbrun M, Folkman J. Vasculogenesis, angiogenesis, and growth factors: ephrins enter the fray at the border. Cell, 1998, 93:661-664.
- [10] Valable S, Monlaner J, Bellail A, et al. VEGF-induced BBB permeability is associated with an MMP-9 activity increase in cerebral ischemia: both effects decreased by Ang-1. J Cereb Blood Flow Metab, 2005, 25: 1491-1504.
- [11] Zhu Y, Lee C, Shen F, et al. Angiotensin-2 facilitates vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis in the mature mouse brain. Stroke, 2005, 36: 1533-1537.
- [12] Chen J, Zhang C, Jiang H, et al. Atorvastatin induction of VEGF and BDNF promotes brain plasticity after stroke in mice. J Cereb Blood Flow Metab, 2005, 25: 281-290.

(收稿日期:2006-11-06)

(本文编辑:松 明)

· 研究简报 ·

红外热像测温在胶质瘤模型热疗研究中的应用

石键 张建民 吴群 赵洪洋

激光间质热疗(laser interstitial thermotherapy, LITT)是众多胶质瘤治疗方法之一,国内、外已开始脑肿瘤间质热疗的研究^[1,5]。作为一种微创神经外科治疗方法,激光热疗具有方向性好、能量集中、易控制等特点,已逐步应用于临床^[1,2,6],但是如何控制和测量热疗靶区的温度却较少见报道。在热疗中要做到既能杀灭癌细胞又不至损伤正常组织,精确的温度测量是十分必要的。目前临床上普遍使用的测温仪器有热电偶测温计、高阻导线热敏电阻测温计和光纤测温仪等。但是这三类测温仪器都属于有损测温,随着新型红外热像仪(infrared thermograph)技术的发展,有助于实现无损伤多点测温^[7,8]。本研究通过制作脑内胶质瘤动物模型,应用半导体激光实现不同条件下的 LITT,比较红外热像测温与热电偶测温方法,为 LITT 治疗颅内胶质瘤的临床应用提供测温技术依据。

材料与方法

一、材料

1. 实验动物及分组:SD 大鼠 40 只,由华中科技大学同济医学院动物实验中心提供,雄性,体重 150 ~ 180 g。随机分为 4 组,每组 10 只。A 组——治疗激光功率为 2 W,热作用时间为

15 min,使用红外热像测温;B 组——治疗激光功率为 10 W,热作用时间为 7 min,热电偶测温;C 组——输出激光功率为 2 ~ 5 W,热作用时间 10 min,同时使用红外热像和热电偶测温;D 组——仅插入光纤而不输出功率,采用红外热像和热电偶测温。

2. 实验材料:C6 大鼠胶质瘤细胞株购自中科院上海生物学研究所,常规 100 ml 培养瓶,含 10% 胎牛血清的 1640 培养液。其它包括简易手术器械包一个(含球状牙钻钻头一枚)、磷酸锌、空塑料笔芯、江湾 II 型大鼠脑立体定向仪、血球分类计数仪、25 μ l 微量加样器一只。

3. 实验仪器:L 半导体激光输出功率为 0 ~ 80 W,有两种输出波长可选择,1 060 nm 或 660 nm。ThermaCAM S65 型(美国 FLIR 公司)红外热像仪,可即时测量目标区域的最高温度,并记录红外热像图,带有配套的 ThermaCAM QuickView 软件。热电偶测温计,测温探头为镍铬-镍硅丝,直径约 0.8 mm。

二、方法

1. 移植瘤模型建立:C6 细胞置于适量含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液中,在温度 37℃、CO₂ 浓度 5% 的培养箱中培养。于细胞对数生长期,消化贴壁细胞,无血清的 DMEM 培养液吹打数次形成细胞悬液,调节细胞浓度为每 10 μ l 含 1×10^6 个 C6 细胞,将细胞悬液放入 37℃ 恒温摇床备用。大鼠固定在立体定向仪上,无菌操作下将细胞悬液 20 μ l 种植到尾状核。扩大骨孔至直径 3 mm,并在其上方安置内径 2.4 mm 的消毒塑料笔芯。生长 7 ~ 12 d, MRI 监测,瘤体直径可达 3.5 ~ 5.5 mm。

作者单位:310009 杭州,浙江大学医学院附属第二医院神经外科(石键、张建民、吴群);华中科技大学同济医学院附属协和医院神经外科(赵洪洋)

通讯作者:石键,Email:shishi74@sohu.com