

· 基础研究 ·

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

杜厚伟 刘楠 陈荣华 韩英 郑安 黄华品 张健

【摘要】目的 探讨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(interleukin-10, IL-10)含量变化的影响。**方法** 采用改良 Zea-Longa 线栓法将 36 只 SD 大鼠制作成大脑中动脉栓塞(MCAO)动物模型,并于 48 h 后将其随机分成康复组和对照组。康复组大鼠每天给予平衡、抓握、旋转、行走等运动功能训练,对照组则置于普通笼内饲养,期间可自由活动、进食。2 组大鼠分别于造模后 3、7 及 14 d 时进行神经功能评估,并断头取脑组织制成标本。采用酶联免疫吸附分析法(ELISA)测定脑组织中 IL-10 的水平。**结果** 康复组大鼠 MCAO 后 7 d 时和 14 d 时的神经功能评分均明显优于对照组;康复组大鼠 MCAO 后 7 d 时和 14 d 时脑组织中 IL-10 浓度亦均较对照组明显增高。**结论** 运动康复训练可刺激脑缺血大鼠脑组织中 IL-10 生成,这可能是运动康复训练促进脑缺血大鼠神经功能恢复的重要机制之一。

【关键词】 康复; 大脑中动脉栓塞; 神经功能; 白介素 10

Effects of rehabilitative training on the recovery of neural function and Interleukin-10 levels in the brain of rats with focal cerebral ischemia DU Hou-wei, LIU Nan, CHEN Rong-hua, HAN Ying, ZHENG An, HUANG Hua-pin, ZHANG Jian. Department of Neurology, Union Hospital, Fujian Medical University, Fuzhou 350001, China

【Abstract】Objective To study the effects of rehabilitation on the recovery of neurological functioning and interleukin-10 levels in the brain post focal cerebral ischemia in rats. **Methods** Permanent focal cerebral ischemia was induced by right middle cerebral artery occlusion (MCAO) in 36 male adult Sprague-Dawley rats using a modification of Longa's method. The rats were randomly divided into 2 groups 48 hours post-MCAO: a rehabilitation group, in which the rats received balancing, grasping, rotating and walking training every day; and a control group, in which the rats could move freely in standard cages. Their neurological functions were measured at days 3, 7 and 14 post-MCAO. They were then sacrificed, and the concentration of interleukin-10 in their brains was determined by the ELISA method. **Results** The rats in the rehabilitation group showed significantly better neurological functioning 7 d and 14 d post-MCAO ($P < 0.05$), and significantly higher interleukin-10 concentration ($P < 0.05$) in their brains, as compared with the control group. **Conclusion** Rehabilitation may promote recovery of neural function and interleukin-10 synthesis in the brains of rats with permanent MCAO.

【Key words】 Rehabilitation; MCAO; Neurological functions; Interleukin-10

目前脑卒中后的康复治疗正日益受到人们关注及重视,但康复治疗促进患者神经功能恢复的机制尚未完全清楚。免疫炎性反应在脑缺血病理损伤过程中发挥重要作用,白介素 10(interleukin-10, IL-10)作为一种抗炎性细胞因子,在缺血性脑损伤中能够减缓炎性细胞浸润,缩小梗死灶体积,减少神经细胞死亡等,具有一定程度的脑保护作用^[1,2]。关于康复治疗对脑缺血后免疫炎性反应的影响,国内、外研究较少涉及。本实验采用大鼠大脑中动脉栓塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型进行运动康复训练,于不同时间点评估大鼠神经功能并测定其脑组织中 IL-10 浓度,

以探讨运动康复训练对脑缺血后免疫炎性反应的影响。现报道如下。

材料与方法

一、实验动物模型建立与分组

本研究共有成年雄性 SD 大鼠 42 只,体重(250 ± 30)g,由福建医科大学实验动物中心提供,从中随机选取 36 只大鼠用 2% 戊巴比妥(35 mg/kg 体重)腹腔注射麻醉后,参考改良 Zea-Longa 线栓法^[3,4]制成大鼠 MCAO 动物模型。待造模成功 48 h 后,将上述大鼠按随机原则分为康复组与对照组,每组 18 只。康复组大鼠每天给予平衡、抓握、旋转及行走等训练,每周训练 6 d,随后休息 1 d;对照组则置于普通笼内饲养,期间可自由活动、进食,但不给予系统康复训练。上述 2 组大鼠又分别于 MCAO 后 3、7 和 14 d 时(每组各时间

基金项目:福建省教育厅三项费基金项目(No. K04058);福建省自然科学基金计划高校专项项目(No. c0440009)

作者单位:350001 福州,福建医科大学附属协和医院神经内科

通讯作者:刘楠

点均选取 6 只大鼠评定)进行神经功能评定,并断头取脑组织测定 IL-10 浓度。剩下的 6 只健康大鼠则归于正常对照组(正常组),期间不给予任何处理,并于实验开始 3 d 后断头取脑,测定其脑组织中 IL-10 浓度并将该数据作为正常对照值。

二、康复训练方法

对康复组大鼠进行运动训练,具体操作步骤参考文献[5]介绍的方法,其主要训练方法如下。

1. 滚笼训练:采用自制滚筒式网状训练器进行训练,该训练器长 1.0 m,直径 60 cm,中间被分为 4 格,可同时训练 4 只大鼠,底座有一固定架,一端有一手摇柄,按 5 转/min 进行滚笼训练,每天训练 10 min。

2. 平衡木训练:取 170 cm 长、2 cm 宽的方木棒作为平衡木,平放于距地面 7 cm 处,让大鼠在上面爬行,每天训练 10 min。

3. 转棒训练:采用长 150 cm、直径 4.5 cm 的木棒 1 根,将其中点处固定于 3 转/min 的转动器上,分别进行顺时针、逆时针交替转动,每天训练 10 min。

4. 网屏训练:网屏为 50 cm × 40 cm 网带,网眼规格为 1 cm × 1 cm,网板的左右和上方都有 25 cm 高的木板框边,网屏距地面高度为 80 cm,下方铺以 12 cm 厚的海绵,先将网屏水平放置并将老鼠置于其上,然后缓慢地将网屏一端抬高,在 2 s 内将其抬高至垂直位并保持 5 s,期间观察大鼠是否会用前爪抓住网屏或从网屏上掉下。

三、大鼠神经功能评定

本研究大鼠神经功能评定参考文献[5]介绍的方法进行。

1. 平衡木行走测评:该项目评分标准共分为 6 个等级。0 分:大鼠能跳上平衡木并在上面移动且不会掉下;1 分:能跳上平衡木并在上面移动,掉下机会 < 50%;2 分:能跳上平衡木并在上面移动,掉下机会 > 50%;3 分:大鼠在健侧肢体帮助下能跳上平衡木,但受累的瘫痪肢体不能帮助其向前移动;4 分:大鼠在平衡木上不能移动,但不会掉下;5 分:将大鼠放在平衡木上即会掉下。

2. 转棒上行走测评:该项目评分标准共分为 4 个等级。0 分:转动过程中,大鼠可在棒上移动;1 分:在转动过程中,大鼠不会从转棒上掉下且持续时间 ≥ 60 s;2 分:转动开始后,大鼠才从转棒上掉下;3 分:转动开始前,大鼠即从转棒上掉下。

3. 网屏抓握测评:该项目评分标准共分为 4 个等级。0 分:大鼠前爪能抓住网屏大约 5 s 之久,期间不会掉下;1 分:大鼠暂时抓住网屏并滑落一段距离,但没有从网屏上掉下;2 分:在 5 s 内从网屏上掉下;3 分:网屏转动时,大鼠即刻从网屏上掉下。

四、大鼠脑组织中 IL-10 水平测定

1. 标本处理:将对照组与康复组大鼠于 MCAO 术后 3、7 和 14 d 时经神经功能评定后行腹腔注射戊巴比妥(浓度为 2%,35 mg/kg 体重)麻醉,用 0.9% 氯化钠 200 ml 行心脏灌注,断头取右侧距额极 2.5 mm 处向后切取 2.5 mm 脑组织(相当于大脑中动脉供血区),称重后按 0.1 g:1 ml 的比例加 0.9% 氯化钠液制备脑组织匀浆,以 2 000 g/min 低温离心 15 min 后取上清液于 -20℃ 环境中冻存。正常对照组大鼠不进行神经功能评定,直接按上述步骤处理。

2. 大鼠标本 IL-10 浓度测定:采用 IL-10 ELISA kit (美国 rapidbio 公司产品)进行酶联免疫吸附分析(Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay, ELISA),具体操作步骤严格按照试剂盒说明书进行,待 ELISA 反应结束后在紫外线分光光度计 450 nm 处读取相应 OD 值(Optical Density, 光密度),以标准品浓度和其对应的 OD 值作标准回归曲线,并计算出各标本 OD 值对应的脑组织中 IL-10 浓度。

五、对重要非实验因素干扰的控制

本研究采取了以下措施保证实验顺利进行:①动物术前、术后均处于安静、温暖、避强光的环境内栖息;②大鼠所有运动训练均安排在晚间进行,符合其晚间活动性强的本性;③如实验动物在康复过程中发生感染、损伤则一律剔除,随机再进行补充;④在处死各组动物时,尽可能选择在同一时间点内进行;⑤各组大鼠于麻醉处死前,均接受相同的除实验刺激以外的其它刺激,如抓取、饲养环境或麻醉等,力求各组大鼠外部实验条件一致。

六、统计学分析

本研所得数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)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,组内比较选用 AVONA(单因素方差分析)和 LSD-t 检验,组间比较选用成组设计时的 t 检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

结 果

一、各组大鼠神经功能评定结果比较

在平衡木行走评定中,康复组与对照组大鼠在 MCAO 后 3 d 时的评分差异无统计学意义($P > 0.05$);MCAO 后 7 d 和 14 d 时 2 组间差异有统计学意义(均 $P < 0.05$)。在转棒行走评定中,康复组与对照组大鼠在 MCAO 后 3 d 时的差异无统计学意义($P > 0.05$);MCAO 后 7 d 和 14 d 时 2 组间差异有统计学意义(均 $P < 0.05$)。在网屏抓握评定中,康复组与对照组大鼠在 MCAO 后 3 d 时的差异无统计学意义($P > 0.05$),MCAO 后 7 d 和 14 d 时 2 组间差异有统计学意义(均 $P < 0.05$)。具体数据详见表 1。

表 1 各组大鼠神经功能评分结果比较(分, $\bar{x} \pm s$)

组别	只数	平衡木测试			转棒测试			网屏抓握测试		
		第 3 天	第 7 天	第 14 天	第 3 天	第 7 天	第 14 天	第 3 天	第 7 天	第 14 天
康复组	18	3.75 ± 0.52	3.17 ± 0.68 *	2.67 ± 0.41 *	2.42 ± 0.49	1.58 ± 0.38 *	0.92 ± 0.49 *	2.33 ± 0.41	0.92 ± 0.38 *	0.33 ± 0.41 *
对照组	18	4.17 ± 0.52	3.92 ± 0.38	3.58 ± 0.38	2.67 ± 0.41	2.17 ± 0.41	1.83 ± 0.52	2.67 ± 0.41	1.83 ± 0.26	1.25 ± 0.42

注:与对照组比较, * $P < 0.05$

二、各组大鼠脑组织 IL-10 浓度测定结果比较

对照组大鼠 MCAO 后 3, 7 和 14 d 时的脑组织 IL-10 浓度差异有统计学意义($P < 0.05$), 如第 3 天与第 7 天及第 14 天时比较, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$), 第 7 天与第 14 天时比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。康复组 MCAO 后 3, 7 及 14 d 时的脑组织 IL-10 浓度差异亦有统计学意义($P < 0.05$), 第 14 天与第 3 天及第 7 天时比较, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$), 第 7 天与第 3 天时比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。组间比较发现, 对照组与康复组大鼠在 MCAO 后 3 d 时, 其脑组织 IL-10 浓度差异无统计学意义($P > 0.05$), 而第 7 天及第 14 天时 2 组大鼠脑组织 IL-10 浓度差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。6 只正常组健康大鼠其脑组织 IL-10 浓度为 $(532.33 \pm 29.23) \text{ pg/ml}$; 对照组 3 d 时和康复组 3 d, 7 d 及 14 d 时与正常对照组比较, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$), 其余各时间点组间比较, 差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。具体数据详见表 2。

各组大鼠脑组织 IL-10 浓度变化情况详见图 1。表 2 数据显示, 对照组大鼠脑组织 IL-10 浓度在 MCAO 后第 3 天时处于较高水平, 于第 7 天时降至正常范围, 并保持稳定至 MCAO 后第 14 天; 康复组大鼠脑组织 IL-10 浓度在 MCAO 后第 3 天时处于较高水平, 于第 7 天时稍有降低, 于第 14 天时达到峰值。

表 2 各组大鼠脑组织 IL-10 浓度比较(pg/ml , $\bar{x} \pm s$)

组别	只数	第 3 天	第 7 天	第 14 天
对照组	18	671.63 ± 81.26	494.17 ± 92.41 *	517.75 ± 75.54 *
康复组	18	643.25 ± 109.74	599.00 ± 61.35	818.92 ± 177.63 * [#] △

注:与第 3 天时比较, * $P < 0.05$; 与第 7 天时比较, # $P < 0.05$; 与对照组比较, △ $P < 0.05$

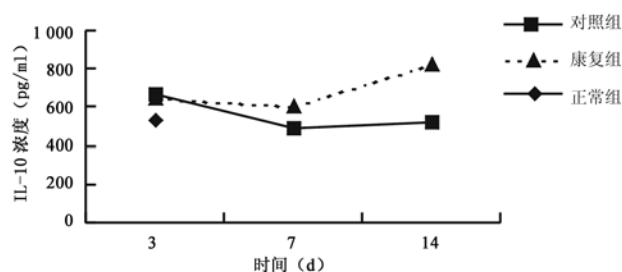


图 1 各组大鼠不同时间点脑组织 IL-10 浓度变化趋势图

讨 论

脑卒中后约有 80% 的患者会遗留各种不同程度的后遗症, 如偏瘫、感觉功能障碍等。这些功能障碍严重

影响了患者的生活自理功能, 使其难以重返家庭及社会, 降低了生存质量^[6], 因此对脑卒中患者的康复研究具有极其重要的意义。相关动物及临床研究均表明, 缺血性卒中患者如发病后能及时进行康复治疗训练, 可明显促进受损神经功能恢复, 但其具体机制目前尚未完全清楚^[7]。近年来多数学者赞同神经系统可塑论与功能重组学说是中枢神经系统损伤后神经功能康复的理论基础^[8]。脑损伤后的免疫应答在脑可塑性中可能发挥重要作用, 其主要的免疫细胞为巨噬细胞和胶质细胞, 它们释放的细胞因子(如 IL-1, IL-6, MCP-1 等)参与了中枢神经系统的修复与再生过程^[9]。免疫炎症反应在脑缺血损伤的病理生理过程中发挥重要作用, 而康复训练是否能够通过作用于脑缺血后的免疫炎症反应进而促进神经功能恢复, 目前国内、外研究较少涉及。

当机体脑组织发生缺血损伤后, 局部脑组织细胞(特别是小胶质细胞)能够生成 TNF- α 、IL-1 β 等炎性介质, 介导免疫炎症反应^[10,11]。IL-10 是一种多效抗炎性因子, 在脑组织中主要由小胶质细胞合成。IL-10 能够抑制 NF-KB 活性, 抑制 TNF- α , IL-1 β , IL-8, GM-CSF 等炎性介质生成^[12]。我们前期的研究表明^[1,2,13], 大鼠在发生 MCAO 后, 其 IL-10 水平短暂下降后随即增高, 在 48 h 时达到峰值; 于 MCAO 后 1 h 及 3 h 经侧脑室注射 IL-10 后, 可以减轻炎性细胞浸润, 缩小梗死灶体积, 减少神经细胞死亡、抑制自由基形成等, 提示 IL-10 具有一定程度的脑保护效用。此外, IL-10 还可以阻断 Caspase-3 活性, 抑制神经细胞凋亡^[14,15]。

在本研究中, 我们发现康复组大鼠 MCAO 后第 7 天及第 14 天时, 其神经功能评定均较对照组显著改善, 说明早期康复治疗确实能促进受损神经功能恢复, 其治疗机制可能与减轻脑水肿、缩小脑梗死体积、减轻局部脑组织炎症反应、改善局部脑血液循环等有关^[9,16,17]。在脑缺血损伤早期阶段, 脑组织中参与免疫炎症反应的细胞被激活, 在核转录因子 NF- κ B 的调节作用下, 合成释放 TNF- α 、IL-1 β 等炎性细胞因子; 同时内皮细胞黏附循环血白细胞, 从而产生 P 选择素及 ICAM-1 等黏附分子, 募集外周血白细胞透过血脑屏障进入脑缺血组织, 释放活性氧、白三烯等毒性物质, 加大炎症反应程度。机体中的炎症反应和抗炎反应相互作用、制约, 从而使机体达到动态平衡状态, 其中 IL-10 作为一种抗炎性细胞因子, 在脑缺血后 3 d 时处于高水平表达可能是一种应激代偿表现, 其原因可能与血液

中的 IL-10 透过破坏的血脑屏障进入脑组织有关,同时缺血应激也可能会促进脑组织中 IL-10 生成。脑缺血后 7 d 时脑组织中 IL-10 水平较脑缺血后 3 d 时明显下降,基本达到正常水平,而 7 d 到 14 d 这段时间内则保持相对稳定,我们分析可能是 IL-10 在发挥抗炎效应的同时,其内源性消耗量超过合成量所致。康复组大鼠在 MCAO 后 7 d 时,其 IL-10 浓度较 3 d 时有所降低,但是较对照组及正常对照组均明显增高,表明这段时间内在 IL-10 内源性消耗的基础上,康复训练已经开始促进脑组织中 IL-10 生成,并于 14 d 时达到峰值,进一步佐证了康复训练可促进脑组织中 IL-10 生成的观点。我们分析其原因是脑缺血后局部脑组织在 TNF- α 、IL-1 β 等前炎性细胞因子介导下发生免疫炎性反应,而康复训练可能激发了某些内源性的抗炎效应,平衡了炎性因子和抗炎性因子间的活性。而对照组与康复组在 MCAO 后 3 d 时,无论是神经功能评定,还是脑组织中 IL-10 浓度,其差异均无统计学意义,我们考虑其原因可能是康复时间短、其治疗作用尚未体现的缘故。

综上所述,康复训练能够加快脑缺血后受损神经功能的恢复,促进脑组织中 IL-10 生成。考虑到 IL-10 能够减轻脑缺血梗死灶体积,阻止神经细胞坏死,增加神经细胞存活,抑制中性粒细胞浸润进而抑制脑缺血后免疫炎性反应,故具有一定程度的脑保护效用^[1,2],而神经功能的预后可能与上述因素有关^[9,16,17],提示康复训练可促进脑组织中 IL-10 生成,对受损神经功能恢复具有重要意义,但康复训练促进脑组织中 IL-10 生成的具体机制还有待进一步研究。

参 考 文 献

- 1 刘楠,陈荣华,郑安,等. 白细胞介素-10 对大鼠脑缺血的保护作用. 中国脑血管病杂志,2004,11:178-181.
- 2 刘楠,陈荣华,郑安,等. IL-10 对大鼠脑缺血损伤的保护作用. 中国药理学杂志,2005,40:988-990.
- 3 Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*, 1989, 20:84-91.
- 4 王春霞,刘春风,包士尧. 大鼠局灶脑缺血再灌注模型改良后的实验研究. 苏州医学院学报,1999,19:124-125.
- 5 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.
- 6 饶明俐,林世和,主编. 脑血管疾病. 北京:人民卫生出版社,2002. 331-331.
- 7 Barbro B, Johansson BH. Brain plasticity and stroke rehabilitation, *Stroke*, 2003, 31:223-230.
- 8 朱鼎连,主编. 神经康复学. 北京:人民军医出版社,2001. 1-14.
- 9 李玲,徐莉,宴培松,等. 大鼠脑梗死康复训练脑的增殖细胞核抗原的表达及病理学改变. 中华物理医学与康复杂志,2000,22:339-342.
- 10 Yao ZD, Chen DM. Suppressor of cytokine signaling inhibits IL-10 mediated immune response. *J Immunol*, 2003, 170:1383-1391.
- 11 Barone FC, Feuerstein GZ. Inflammatory mediators and stroke: new opportunities for novel therapeutics. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1999, 19:819-834.
- 12 Hopkins SJ, Rothwell NJ. Cytokines and the nervous system: expression and recognition. *Trends Neurosci*, 1995, 18:83-88.
- 13 陈荣华,刘楠,郑安,等. 局灶性脑缺血大鼠白细胞介素-10 的变化. 中国动脉硬化杂志,2003,11:622-624.
- 14 Alessia BC, Anna M, Stefano VC, et al. Interleukin-10 prevents glutamate-mediated cerebellar granule cell death by blocking caspase-3-like activity. *J Neurosci*, 2001, 21:3104-3112.
- 15 Hiroaki OS, Setsuro ST, Takashi SC, et al. Postischemic gene transfer of interleukin-10 protects against both focal and global brain ischemia. *Circulation*, 2005, 111:913-919.
- 16 秦颖,唐强,倪金霞,等. 脑梗死大鼠康复训练后脑功能恢复及病理学改变. 中国康复理论与实践,2003,9:539-540.
- 17 Chen HI, Jin CJ, Chang WC. Effects of exercise training on the biosynthesis of prostacyclin and thromboxane in rats. *Acta Physiol Scand*, 1993, 147:109-115.

(修回日期:2005-12-29)

(本文编辑:易 浩)

· 消息 ·

全国首届骨肌系统体外冲击波疗法研讨会及学习班通知

由全国骨肌系统冲击波联合会(筹)和武警总医院骨科共同主办的首届骨肌系统体外冲击波疗法(ESWT)研讨会及学习班拟定于 2006 年 10 月 18~10 月 21 日在北京举行。

主要内容:ESWT 的物理学基础、适应证和禁忌证、操作要点、定位方法、与细胞生物工程的结合、促进成骨的机制研究进展以及其在医学领域的应用前景。

研讨会征文要求:(1)ESWT 的经验总结、问题与对策、机制研究进展和应用前景等相关文章;(2)临床资料真实可靠,且未在国内、外公开刊物发表;(3)论文全文字数为 3 000~5 000 字或提交 500 字左右摘要;(4)同时提交论文软盘或电子文档;(5)请注明作者的姓名、职称、学历、工作单位、通信地址,并附单位介绍信。优秀论文将推荐在《中华骨科杂志》上发表。

学习班:由国内著名专家做专题讲座和授课。结业可获国家级继续医学教育 I 类学分 8 分。学习班主要招收从事骨科冲击波和物理治疗的中级职称以上的临床医师和相关人员,拟收学员 100 名,学费 800 元,安排食宿,费用自理。报名者请于 2006 年 9 月 30 日前提交个人资料及注册表回执(来函索取)。

投稿及通信地址:100039 北京市永定路 69 号武警总医院骨科;联系人:邢更彦、姜川、白晓东、李冰;联系地址:100039 北京市永定路 69 号武警总医院骨科;电话:(010)88276606,88276608,86360991。