

· 基础研究 ·

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

谭来勋 孙圣刚 张双国 吴旭 管强

【摘要】目的 研究脑梗死大鼠运动训练后梗死周边区星形胶质细胞、突触和运动功能的变化及相关性。方法 将 120 只大脑中动脉闭塞脑梗死模型大鼠随机分为康复组、抑制组、盐水组 and 对照组,以横木行走试验评定运动功能,在 7,21,42 d 应用电镜和免疫组织化学方法,观察各组大鼠脑梗死周边区星形胶质细胞、突触、胶质纤维酸性蛋白和突触素等的变化。结果 康复组大鼠 3 周末的运动功能评分为 (3.2 ± 0.3) 分,6 周末为 (5.8 ± 0.9) 分,对照组 3 周末为 (1.8 ± 0.5) 分,6 周末为 (2.6 ± 0.8) 分;抑制组 3 周末为 (1.6 ± 0.9) 分,6 周末为 (2.1 ± 0.7) 分。康复组比对照组和抑制组高, $P < 0.01$ 。在 8 000 倍电镜视野下,康复组 3 周末脑梗死周边区星形胶质细胞为 (5.8 ± 0.3) 个,6 周末为 (8.5 ± 0.8) 个;3 周末突触数目为 (12.3 ± 1.3) 个,6 周末为 (16.3 ± 1.4) 个。星形胶质细胞和突触数目呈同步增多,两者均明显多于对照组和抑制组($P < 0.01$)。免疫组化染色观察显示,康复组脑梗死周边区胶质纤维酸性蛋白和突触素阳性信号密度值也在 3,6 周末高于对照组和抑制组($P < 0.01$)。结论 脑梗死大鼠运动训练可促使星形胶质细胞增殖,加强突触重建和功能修复,促进运动功能恢复;星形胶质细胞增殖可能在其中发挥关键性作用。

【关键词】星形胶质细胞; 突触可塑性; 康复; 脑梗死

Effect of mobility training on astrocyte, synapse and motor skill in rats with acute cerebral infarction TAN Lai-xun*, SUN Sheng-gang, ZHANG Shuang-guo, WU Xu, GUAN Qiang. * Department of Neurology, Renmin Hospital, Wuhan University, Wuhan 430060, China

【Abstract】Objective To investigate the change of and relationship between astrocytes and synapse structure in the region around the infarction area and the roles of the astrocytes on the recovery of motor skill in the experimental rats with acute cerebral infarction after mobility training. Methods A total of 120 rats were randomly divided into 4 groups: a rehabilitation group, an inhibition group, a saline group and a control group. The motor skill of the rats was examined by beam walking test. The changes of astrocytes, synapses, the glial fibrillary acidic protein (GFAP), synaptophysin and growth associated protein 43 (GAP-43) in the region around the infarction were observed using electron microscope and immunohistochemistry staining at 7, 21 and 42 d after the model was made. Results It was noted that the recovery of motor skill was more significant in the rehabilitation group than that in the control and the inhibition groups (scored in beam walking test at 3.2 ± 0.3 vs 1.8 ± 0.5 and 1.6 ± 0.9 at the third weekend; scored 5.8 ± 0.9 vs 2.6 ± 0.8 and 2.1 ± 0.7 scores at the sixth weekend. $P < 0.01$). It was observed under the electron microscope that the number of astrocyte increased gradually (from 5.8 ± 0.3 / visual field at the 3rd weekend to 8.5 ± 0.8 / visual field at the 6th weekend), accompanying the simultaneous increase of synapse number (12.3 ± 1.3 / visual field at the 3rd weekend to 16.3 ± 1.4 / visual field at the 6th weekend) over time, and the increase of the number of astrocyte was also more significant in the rehabilitation group than that in the control and the inhibition groups ($P < 0.01$). The immunohistochemistry staining showed that the optical density of GFAP and synaptophysin in the region around the infarction area of the rehabilitation group was significantly higher than those in the control and the inhibition groups at both the 3rd and the 6th weekend ($P < 0.01$). Conclusion The motor skill training could promote the increase of astrocyte number and the changes of synapse number and function in the region around the infarction area and finally the motor skill recovery in the experimental rats with acute cerebral infarction. The increase of astrocyte number might play an crucial role in motor skill recovery.

【Key words】Astrocyte; Synapse plasticity; Motor skill training; Cerebral infarction

基金项目:国家教育部高等学校博士点学科专项科研基金(No. 20020487065)

作者单位:430060 武汉,武汉大学人民医院神经科(谭来勋、张双国、吴旭);华中科技大学同济医学院附属协和医院神经科(孙圣刚、管强)

通讯作者:孙圣刚

神经系统的正常运转依赖于以突触为基础的信息物质的快速交流,突触连接是神经系统信息传递和加工的重要环节。研究发现,大鼠脑梗死 3 d 后病灶周围开始有星形胶质细胞增生。经运动训练后,星形胶质细胞增生速度显著提高,2 周时梗死灶边缘形成胶质瘢痕,3 周时梗死灶边缘星形胶质细胞增生明显,神经功能恢复进度也明显加快^[1]。脑梗死后随着星形胶质细胞的增殖生长,突触数目、结构和功能亦会发生变化(即突触可塑性)^[2]。而此变化对神经功能恢复至关重要。在脑梗死后突触可塑性变化过程中,运动训练促使星形胶质细胞增生的作用及机制尚未阐明^[3,4]。本研究用肾性高血压大鼠制成右侧大脑中动脉闭塞模型,用电镜和免疫组织化学方法研究运动训练后,运动功能恢复、星形胶质细胞增殖与突触可塑性的关系,以利临床制定更优化的康复治疗方

材料与方法

一、实验动物

雄性一级 SD 大鼠 130 只(武汉大学人民医院实验动物中心提供),2~3 月龄,体重(260 ± 20)g,喂普通颗粒饲料,饮自来水,室温控制在 15~24℃。按胡钢英等^[5]的方法制作大鼠肾性高血压模型,术后每周测血压 1 次。于形成肾性高血压第 16 周,用线栓法制作右侧大脑中动脉闭塞模型。动脉闭塞成功依据为麻醉苏醒后 24 h 内有:①左侧肢体疼痛刺激收缩现象消失;②向左倾倒或转圈;③提尾时左上肢不能向前伸直。具备其中 2 条为右侧大脑中动脉闭塞成功,130 只大鼠中共 120 只造模成功,另 10 只未造模成功的大鼠设为正常组。在右侧大脑中动脉闭塞后,随机各取 40 只大鼠,分为 1,3,6 周末时段组;每时段组又根据对大鼠给药方法的不同和是否进行运动训练,分为康复、抑制、盐水和对照组,每组各 10 只。观察其全身状态和反应能力,测体重和血压。

二、运动功能评分

参照大鼠横木行走试验 1~7 分评分法。横木由 120 cm × 2.5 cm 的木板制成,一端为强光及噪音刺激,对侧端为黑笼子。130 只大鼠均于术前 1 周每隔 1 d 进行 2 次测试训练。于右侧大脑中动脉闭塞后第 7,21,42 天测试、评分。过横木时瘫痪肢体起作用 0% 为 1 分,~10% 为 2 分,如此类推,~50% 为 6 分,正常为 7 分。结果由 2 人分别评价,其中 1 人不知分组情况。

三、给药方法

抑制组 30 只大鼠于右侧大脑中动脉闭塞 4 d 后,在立体定位仪下侧脑室内注射 25 mg/ml 的阿糖胞苷,每次 2 ml/kg 体重,每周 1 次。1,3,6 周末时段组注

射总次数分别为 1,3,6 次。注射部位为前囟后 0.8 mm,左旁开 1.5 mm,进针 4.0 mm。注射分 3 次推完,每次间隔 5 min,最后留针 5 min。盐水组用同样方法将等量生理盐水注入侧脑室。康复组和对照组侧脑室不注入任何药物。

四、运动训练方法

康复组、盐水组和抑制组每天给予行走、抓握力、旋转等训练,共 30 min,每周 5 次。行走训练采用长 170 cm、宽 2 cm 的方木棒,平放在距地面 7 cm 处,作为一个平衡木让鼠在其上行走。抓握力训练使用网屏,其网带为 50 cm × 40 cm,网眼为 1 cm × 1 cm,网板的左右和上方都用 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,将大鼠放在其上,然后缓缓地将其中一端抬高,在 2 s 内将此网屏变成垂直位,保持 5 s,观察大鼠是否会从网屏上掉下来或用前爪握住网屏。旋转训练采用自制滚筒式网状训练器,为长 1.0 m,直径 60 cm 的圆柱形网状仪器,中间被分为 4 个格,可同时训练 4 只鼠,底座有一固定架,一端有一手摇柄,可按 5 r/min 手摇开始训练。对照组置于普通笼内饲养,可自由活动。

五、电镜研究

康复组、盐水组、抑制组和对照组分别于 1,3,6 周末及正常组各取 5 只大鼠,麻醉后经左心室灌注电镜固定液(1% 多聚甲醛、2.5% 戊二醛),制作脑组织冠状切片,片厚 2 mm。在第 3 片脑片上分别从梗死病灶边缘区取皮质组织 1 mm³,于电镜固定液中固定 24 h,按常规方法锇酸固定、染色,在 CEM1200EX(日本)型投射电镜下观察水肿情况、神经元及神经纤维束的形态。选取 30 个 8 000 倍视野计算突触数目。

六、免疫组织化学研究

按上述方法,每组抽取 5 只大鼠检查胶质纤维酸性蛋白(glia fibrillary acidic protein,GFAP)、生长相关蛋白 43(growth associated protein,GAP-43)和突触素染色状况。依次向大鼠腹腔注射 1% 戊巴比妥钠(4 ml/kg 体重),升主动脉插管灌入 100 ml 生理盐水,再注入 4% 多聚甲醛(4℃,pH7.4),先快后慢。1.5 h 后取脑,常规用福尔马林固定,石蜡包埋,石蜡切片机切 5 μm 的贴胶连续切片 3 套。(1)GFAP:用抗 GFAP 单抗(美国 Sigma 公司)常规染色。在脑梗死病灶边缘区随机选取上、下、左、右、中 5 个视野,用自动图像分析系统测 GFAP 免疫反应产物阳性信号的密度值,即免疫色阳性信号的面积占当时视野面积的百分比。所有测量均用 Olympus 光学显微镜在相同光学条件下完成。(2)GAP-43:抗 GAP-43 单抗(美国 Sigma 公司),染色和观察同 GFAP。(3)突触素:使用兔抗人突触

素抗体(美国 Sigma 公司)作为一抗,单抗浓度为 1:50。染色过程中不使用胰蛋白酶消化,而用微波处理法,染色和观察同 GFAP。

七、统计学分析

用 SPSS 软件包进行方差分析、*t* 检验及秩和检验,用 2 组及多组比较的方法分析康复组、盐水组、抑制组、对照组间及其在不同时间的差异,以及它们与正常组间的差异。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

全部大鼠肾动脉狭窄术后 1 周血压升高,16 周达 (197 ± 5) mmHg, 随后稳定在 198.6 mmHg 左右。康复组、盐水组、抑制组、对照组和正常组血压间差异无统计学意义($P > 0.05$)。右侧大脑中动脉闭塞 1 周内,横木行走试验各组评分均为 1 分;电镜下,脑梗死病灶边缘区均有星形胶质细胞,且胞突严重水肿,神经元细胞器减少,轴突变性,突触解体,数目减少。3 及 6 周末,康复组和盐水组横木行走评分均高于对照组和抑制组(表 1, $P < 0.01$)。电镜下,该区星形胶质细胞增生,突触数目增加(图 1,表 2, $P < 0.01$)。用免疫组织化学方法,该区 GFAP、突触素阳性信号密度值也均高于对照组和抑制组(图 2,表 2, $P < 0.01$)。GAP-43 阳性信号在右侧大脑中动脉闭塞后 1 周末增高,第 3 周末降低至正常水平,康复组和盐水组与对照组和抑制组的差异无统计学意义。

表 1 右侧大脑中动脉闭塞后运动功能得分(分, $\bar{x} \pm s$)

组 别	只数	1 周末	3 周末	6 周末
康复组	30	1	$3.2 \pm 0.3^{**}$	$5.8 \pm 0.9^{**\Delta}$
盐水组	30	1	$3.3 \pm 0.2^{**}$	$5.7 \pm 0.7^{**\Delta}$
抑制组	30	1	$1.6 \pm 0.9^*$	$2.1 \pm 0.7^{**}$
对照组	30	1	$1.8 \pm 0.5^*$	$2.6 \pm 0.8^{**\Delta}$

注:与 1 周末比, $^* P < 0.01$;与同期抑制组或对照组比, $^{**} P < 0.01$;与 3 周末比, $^{\Delta} P < 0.01$, $^{**} P < 0.05$

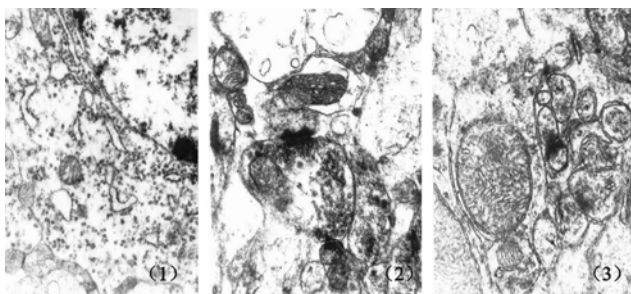
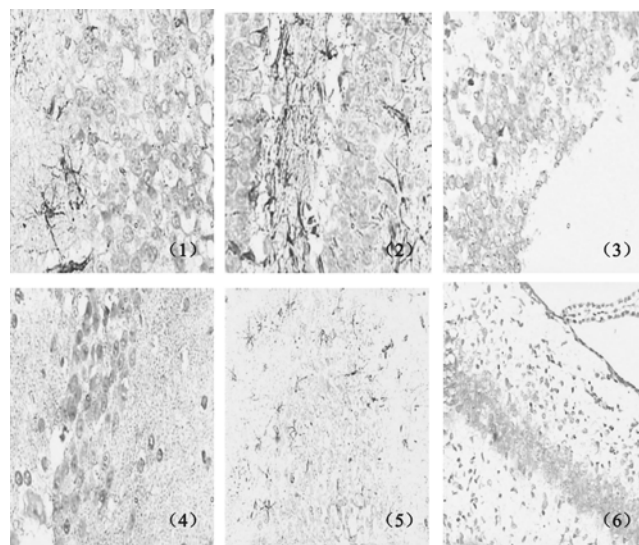


图 1 右侧大脑中动脉闭塞 1 周末脑梗死灶边缘区神经细胞和细胞器严重水肿,细胞器数量减少($\times 15\ 000$);(2)右侧大脑中动脉闭塞 1 周末脑梗死灶边缘区轴突变性,突触解体,数目减少($\times 30\ 000$);(3)右侧大脑中动脉闭塞 6 周末脑梗死灶边缘区星形胶质细胞和突触数目明显增加($\times 30\ 000$)

图 1 康复组右侧大脑中动脉闭塞 1,6 周末的脑梗死病灶边缘区



(1)康复组第 1 周末 GFAP 阳性信号密度值与对照组无显著差异,以后逐渐增高(GFAP $\times 400$);(2)康复组第 6 周末 GFAP 阳性信号密度值明显高于对照组(GFAP $\times 400$);(3)康复组第 1 周末突触素阳性信号密度值与对照组无显著差异,以后逐渐增高(突触素 $\times 400$);(4)康复组第 6 周末突触素阳性信号密度值明显高于对照组(突触素 $\times 400$);(5)康复组第 1 周末 GAP-43 阳性信号密度值明显增高(GAP-43 $\times 400$);(6)康复组第 3 周末 GAP-43 的阳性信号密度值降低至正常水平,与对照组无显著差异(GAP-43 $\times 400$)

图 2 右侧大脑中动脉闭塞后康复组不同时间的脑梗死灶边缘区

第 3 及 6 周末,抑制组脑梗死边缘区星形胶质细胞、突触数目和 GFAP、突触素阳性信号密度值均显著低于康复组、盐水组和对照组($P < 0.05$)。盐水组与康复组上述指标间的差异无统计学意义。

讨 论

脑梗死边缘区星形胶质细胞、神经细胞和神经传导通路仍相对完整,这是康复治疗有效的生理基础。本研究大鼠右侧大脑中动脉闭塞后左侧肢体瘫痪,横木行走试验评分仅 1 分。对照组 1 周后运动功能开始改善,3 周后恢复较明显,以后虽进展缓慢,但仍有显著的提高,提示急性脑梗死后运动功能可不同程度地自然恢复;康复组和盐水组脑梗死 24 h 后每天给予运动训练,其运动功能恢复较对照组明显($P < 0.01$),可见运动训练有益于脑梗死后神经功能的恢复^[3]。

本研究大鼠脑梗死 1 周末,各组间星形胶质细胞数和 GFAP 阳性信号密度值差异无统计学意义($P > 0.05$);3 及 6 周末,康复组和盐水组星形胶质细胞、GFAP 阳性信号密度值明显增加,显著多于对照组($P < 0.01$)。推测大鼠脑梗死早期运动训练有益于星形胶质细胞增殖。方燕南等^[6]和李玲等^[7]分别作了类似报道,并指出星形胶质细胞增殖程度和脑梗死病情可用 GFAP 表达值来评价,星形胶质细胞可促进运动功能恢复。本资料中突触数目和与其功能密切相关的

表 2 大鼠梗死区周边星形胶质细胞和突触数目、GFAP、突触素和 GAP-43 ($\bar{x} \pm s$)

组 别	只数	星形胶质细胞 (个/8 000 倍视野)	突触 (个/8 000 倍视野)	GFAP	突触素	GAP-43 (%)
康复组	30					
1 周末	10	2.5 ± 0.2	7.8 ± 1.7	10.0 ± 2.1	32.9 ± 1.9	20.1 ± 1.7*
3 周末	10	5.8 ± 0.3* [△]	12.3 ± 1.3* [△]	19.4 ± 3.2* [△]	43.2 ± 3.4* [△]	17.3 ± 1.3
6 周末	10	8.5 ± 0.8* ^{#△}	16.3 ± 1.4* ^{#△}	28.7 ± 2.3* ^{#△}	61.2 ± 2.4* ^{#△}	17.8 ± 0.7
盐水组	30					
1 周末	10	2.6 ± 0.3	7.8 ± 1.6	9.9 ± 1.9	33.1 ± 2.0	19.9 ± 1.8*
3 周末	10	5.7 ± 0.3* [△]	11.9 ± 1.1* [△]	19.5 ± 3.4* [△]	42.9 ± 3.4* [△]	17.4 ± 1.3
6 周末	10	8.4 ± 0.9* ^{#△}	15.9 ± 1.3* ^{#△}	29.0 ± 1.9* ^{#△}	60.9 ± 2.1* ^{#△}	17.7 ± 0.5
抑制组	30					
1 周末	10	2.4 ± 0.7	7.5 ± 1.8	9.5 ± 1.7	31.6 ± 1.4	17.2 ± 1.3
3 周末	10	3.0 ± 0.5	8.6 ± 1.5	10.3 ± 2.1	31.4 ± 1.2	17.1 ± 1.5
6 周末	10	3.1 ± 0.4	8.3 ± 0.4	12.3 ± 1.1	30.2 ± 2.1	16.5 ± 2.3
对照组	30					
1 周末	10	2.7 ± 0.5	7.6 ± 0.9	9.7 ± 2.2	30.1 ± 2.6	19.6 ± 1.5*
3 周末	10	3.7 ± 0.4* [☆]	10.5 ± 0.8* [☆]	14.7 ± 1.2* [☆]	35.6 ± 0.1* [☆]	16.8 ± 1.8
6 周末	10	5.4 ± 0.3* ^{#☆}	12.3 ± 0.7* ^{#☆}	22.3 ± 1.5* ^{#☆}	42.9 ± 1.5* ^{#☆}	17.1 ± 1.2
正常组	10	3.8 ± 0.5 [▲]	10.6 ± 1.2 [▲]	14.8 ± 1.0 [▲]	34.1 ± 2.3 [▲]	16.9 ± 1.1

注:与同组 1 周末比较,* $P < 0.01$;与同组 3 周末比,[#] $P < 0.01$;与同时期抑制组或对照组比较,[△] $P < 0.01$;与同时期抑制组比较,[☆] $P < 0.05$;与抑制组各时期或对照组 6 周末及各组 1 周末比较,[▲] $P < 0.05$;与同组 3 及 6 周末及抑制组各时期比较,* $P < 0.05$

突触素表达值由开始降低、恢复正常到 6 周末时超过正常,康复组和盐水组高于对照组($P < 0.01$),提示早期运动训练可使突触数目和功能恢复更快^[8-11]。本研究大鼠脑梗死后突触数目和功能完善与星形胶质细胞活跃增殖同步进行,但运动训练后星形胶质细胞增生是否影响突触可塑性?本研究抑制组在右侧大脑中动脉闭塞 3 及 6 周末时,病灶边缘区星形胶质细胞、突触数目和 GFAP、突触素阳性信号密度值以及横木行走得分均低于其它组($P < 0.01$)。阿糖胞苷可通过抑制 DNA 合成而抑制星形胶质细胞增殖,但不影响细胞蛋白质合成及其功能活动,即对突触数目和功能无直接影响。然而,抑制星形胶质细胞后,突触数目、功能和运动功能恢复显著较差($P < 0.01$)。这强烈提示星形胶质细胞对突触数目、功能和运动功能恢复起关键性作用。可见,脑梗死后星形胶质细胞的活跃反应可能在突触结构、运动功能恢复中起着关键作用。运动训练可能通过促进梗死灶周围的星形胶质细胞增殖,增加突触数目和增强突触传导功能,而促进运动功能恢复。阿糖胞苷也抑制其它增殖活跃的细胞如血管内皮细胞、小胶质细胞等,但尚无这些细胞与突触结构和功能修复紧密联系的证据^[12]。

GAP-43 是与神经细胞生长、发育和再生过程有关的特异蛋白质。在缺血最初几天其表达增高,第 3 及 6 周末则各组间差异无统计学意义。提示在急性脑梗死后对神经元缺失存在应激性反应,但神经生长和再生可能不起主要作用^[4]。本研究盐水组与康复组各指标间的差异无统计学意义,可排除侧脑室内注射药物过程中非阿糖胞苷因素对研究结果的影响。

我们推测,脑梗死大鼠运动训练可促使星形胶质细胞增殖,加强突触重建和功能修复,促进运动功能

恢复;星形胶质细胞增殖可能在其中发挥关键性作用。其具体机制有待进一步阐明。

参 考 文 献

- Ding Y, Li J, Clark J, et al. Synaptic plasticity in thalamic nuclei enhanced by motor skill training in rat with transient middle cerebral artery occlusion. *Neurol Res*, 2003, 25: 189-194.
- Briones TL, Suh E, Jozsa L, et al. Behaviorally-induced ultrastructural plasticity in the hippocampal region after cerebral ischemia. *Brain Res*, 2004, 997: 137-146.
- 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.
- 黄如训,张艳,方燕南,等. 大鼠脑梗死后运动功能可塑性物质基础及发生机制. *中华医学杂志*, 2000, 80: 769-772.
- 胡钢英,夏豪,王晋明,等. 肝细胞生长因子在左肾动脉狭窄大鼠心血管中的表达及干预研究. *中华实验外科杂志*, 2004, 21: 723-724.
- 方燕南,黄海威,林健雯,等. 星形细胞活性及 GFAP 在评价脑梗死中的作用及意义. *中国病理生理杂志*, 2002, 18: 643-645.
- 李玲,徐莉,晏培松,等. 脑梗死大鼠康复训练后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.
- Dienel GA, Cruz NF, Ball K, et al. Behavioral training increases local astrocytic metabolic activity but does not alter outcome of mild transient ischemia. *Brain Res*, 2003, 961: 201-212.
- 段淑荣,潘永惠,张璇,等. 康复训练对大鼠中动脉闭塞大鼠脑梗死灶周围突触素表达的影响. *中国康复医学杂志*, 2004, 19: 430-433.
- Dhandapani KM, Brann DW. Estrogen-astrocyte interactions: implications for neuroprotection. *BMC Neurosci*, 2002, 3: 6-15.
- 袁华,龙华,李玲. 康复训练对脑梗死大鼠皮质 S-100、GFAP 和 Nestin 表达的影响. *中华物理医学与康复杂志*, 2003, 25: 520-523.
- Pfrierer FW, Barres BA. Synaptic efficacy enhanced by glial cells. *Science*, 1997, 277: 1684-1687.

(修回日期:2005-06-22)

(本文编辑:熊芝兰)