

· 基础研究 ·

康复训练对脑梗死大鼠梗死灶周围微管蛋白表达的影响

段淑荣 张璇 王勋 王德生 张黎明

【摘要】目的 研究康复训练对大鼠脑梗死灶周围微管蛋白(tubulin)表达的影响。**方法** 40 只 Wistar 大鼠,采用 Longa 颈外动脉线栓法制备大鼠大脑中动脉闭塞模型,造模后将大鼠随机分为康复组和造模对照组,每组 20 只。康复组大鼠每天进行滚筒、平衡木、转棒及网屏训练,时间 1 h;造模对照组置于普通笼中饲养,不予以康复训练。每组分别于造模后 3,7,14 和 21 d 4 个时间点处死 5 只大鼠,并取脑组织,采用免疫组织化学方法观察每个时间点脑梗死灶周围 tubulin 的表达。**结果** 康复组神经功能评分明显低于造模对照组($P < 0.05$)。2 组 tubulin 阳性细胞于脑缺血 3 d 后即已出现,7~21 d 有大量表达,14 d 达高峰;康复组于脑缺血 7 d 和 21 d, tubulin 阳性细胞的表达水平明显高于造模对照组($P < 0.05$)。**结论** 康复训练能促使中枢神经系统表达较高水平的 tubulin。

【关键词】 康复; 脑梗死; 微管蛋白

Effects of rehabilitation training on the expression of tubulin in tissues around the cerebral infarcted area of rats DUAN Shu-rong, ZHANG Xuan, WANG Xun, WANG De-sheng, ZHANG Li-ming. Department of Neurology, the First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, China

【Abstract】 Objective To study the effects of rehabilitation training on the expression of tubulin around the cerebral infarcted area of rats. **Methods** Forty Wistar rats were randomly divided into a rehabilitation group and a control group after cerebral infarction. The animals in the rehabilitation group were given rotating bar, balance beam and rolling cage exercises for one hour every day, while those in the control group were bred in cages. The tubulin expression in the surrounding area of infarction was detected by use of histochemistry technique at the 3rd, 7th, 14th and 21st day after infarction, respectively. **Results** At the 3rd day after the infarction, the expression of tubulin appeared in tissues around the infarcted area in both groups. A large number of tubulin-positive neurons were found at 7th, 14th and 21st day, and at the 14th day tubulin expressed the most. There were significantly more expression of tubulin in the rehabilitation group than that of the control group ($P < 0.05$) except at the 3rd and 14th days, and the tubulin-positive neurons increased with time going. **Conclusion** Rehabilitation training may increase the expression of tubulin, which might play an important role in the functional recovery of the central nervous system.

【Key words】 Rehabilitation; Cerebral infarction; Tubulin

大量的临床研究和实验研究表明,康复训练对脑梗死患者的功能恢复具有促进作用^[1,2]。近年来,国内、外对其作用机制进行了较多的研究,并已有实验表明康复训练对热休克蛋白 70(heat shock protein 70, HSP70)、Fos、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、突触素(synaptophysin)等指标均有影响^[3-7]。本实验采用线栓法制作大鼠大脑中动脉闭塞(middle artery cerebral occlusion, MACO)模型后,对造模大鼠进行康复训练,采用免疫组织化学方法测定脑组织中微管蛋白(tubulin)的表达值,旨在研究康复训练对大鼠脑缺血损伤后梗死灶周围 tubulin 的表达及运动功能恢复的影响,以进一步探讨神经康复的

生物学基础。

材料和方法

一、实验动物

Wistar 大鼠 40 只,一级动物,雌、雄不限,体重(250 ± 20)g,鼠龄 3 个月,由哈尔滨医科大学动物实验中心提供。

二、大鼠 MACO 模型制备及动物分组

40 只大鼠随机分为康复组及造模对照组,每组 20 只。2 组均采用 Longa 颈外动脉线栓法制备 MACO 模型^[8]。手术成功的标志为:大鼠苏醒后右眼出现 Horner 氏征及左侧肢体偏瘫。剔除不合格大鼠,随时补充模型动物以保证每组 20 只。

造模对照组术后置普通笼中饲养,不予以任何康复训练。康复组大鼠术后每天置于滚筒式网状训练器

基金项目:黑龙江省自然科学基金资助项目(No. D01-25);哈尔滨市科技攻关计划项目(No. 0114211135-6)

作者单位:150001 哈尔滨,哈尔滨医科大学附属第一医院神经内科

内进行转动训练、平衡木上行走训练、转棒上转动训练及网屏抓握训练,共 1 h。2 组大鼠分别于造模后 3、7、14 和 21 d 进行神经功能评估,并断头取脑以观察脑组织形态学及进行免疫组织化学分析,每组每个时间点各随机取 5 只大鼠。

三、康复训练器材与方法

滚筒式网状训练器为长 100 cm、直径 60 cm 的圆形网状仪器,底座有一固定架,一端有一手摇柄,可通过手摇控制,以 5 转/min 的转速进行转动。大鼠于该仪器内可进行抓握、旋转等运动训练。

1. 平衡木训练:取一根长 170 cm、宽 2 cm 的方木棒,平放于距地面 7 cm 处,让大鼠在木棒上行走,训练其平衡能力。

2. 转棒训练:取一根长 150 cm、直径 4.5 cm 的圆木棒,中点固定于 3 转/min 的转动器上,以顺时针、逆时针方向交替转动,训练大鼠的动态平衡功能。

3. 网屏训练:网屏为 50 cm × 40 cm 的网带,距地面高度为 80 cm,下方铺以 12 cm 厚的海绵,网眼为 1 cm × 1 cm。先将网屏水平放置,将大鼠放于其上,然后缓缓地将网屏一端抬高,在 2 s 内转为垂直位并保持 5 s,以训练大鼠前爪抓握能力及肌力。

四、行为评估方法

1. 神经功能评定:参照 Bederson 等^[9]拟订的标准评分,未见行为缺陷为 0 级,计 0 分;前肢屈曲为 1 级,计 1 分;侧推抵抗力下降,伴前肢屈曲,无转圈行为为 2 级,计 2 分;侧推抵抗力下降,伴前肢屈曲和自发性旋转为 3 级,计 3 分。

2. 平衡木行走评分^[10]:大鼠能跳上横木,在横木上行走不跌倒为 0 分;大鼠能跳上横木,在横木上行走跌倒机会小于 50% 为 1 分;大鼠能跳上横木,在横木上行走跌倒机会大于 50% 为 2 分;大鼠在健侧后肢的帮助下能跳上横木,但患侧后肢不能帮助其向前移动为 3 分;大鼠在平衡木上不能行走,但可坐在横木上为 4 分;将大鼠放在平衡木上即会掉下为 5 分。

3. 转棒上行走评分^[10]:转动过程中大鼠可在转棒上行走为 0 分;转动过程中大鼠不会掉下,且持续时间达 60 s 以上为 1 分;转动开始后大鼠从转棒上掉下为 2 分;转动开始前大鼠就从转棒上掉下为 3 分。

4. 网屏试验评分^[10]:大鼠前爪抓住网屏可达 5 s,且不滑落为 0 分;大鼠暂时抓住网屏,滑落一段距离,但未掉下为 1 分;大鼠在 5 s 内掉下为 2 分;网屏转动时大鼠即掉下为 3 分。

计算每只大鼠各项评分之和的平均值,作为其综合评分。

五、病理学检查

取大鼠脑组织,分离右半球,在视交叉前 2 mm 至

视交叉后 2 mm 范围内冠状取材,经石蜡包埋、HE 染色后,光镜下观察细胞形态变化,并将有明显脑梗死灶者选出以备免疫组织化学分析。取左半球相应位置切片作为对照观察。

六、免疫组织化学分析

将石蜡包埋的脑组织切成 10 μm 厚的组织片(每只动物模型 1 张切片,共 40 张),裱于经多聚赖氨酸处理的清洁玻片上,60℃ 烤箱内烘烤 2 h 后放入 4℃ 冰箱内备用。石蜡切片经二甲苯脱蜡(40 min × 3 次)后,依次以 100%、95%、80% 乙醇脱水;3% 过氧化氢阻断内源性过氧化物酶 20 min;滴加一抗(1:50,博士德公司产),37℃ 下孵育 60 min;滴加二抗(PV6000,中山公司产),37℃ 下孵育 20 min;滴加 DAB 显色剂,显微镜下观察其显色较好时,置于自来水中终止显色;依次经苏木素复染,2% 盐酸乙醇分化,蓝化;经 80%、95%、100% 乙醇脱水,二甲苯透明,最后封片,贴标签备查。

七、图像及统计学分析

采用 SPSS 7.5 软件系统图像采集卡、IBM (CPU-P3-550) 和 Olympus BX60 显微镜组成的全自动图像分析系统,每张切片于 10 × 40 放大倍数下随机选 5 个视野(40 张切片,共计 200 个视野),统计每个视野内的 tubulin 阳性细胞数(不论染色程度,凡显色者为阳性)。采用 SAS 统计软件包对数据进行处理,计量资料用 ($\bar{x} \pm s$) 表示,两样本均数比较采用 *t* 检验或 Wilcoxon 2-sample Test(非参检验)方法。由哈尔滨医科大学公共卫生学院统计学教研室完成分析。

结 果

一、行为评估

康复组康复训练 14 d 及 21 d 后,大鼠行为评估综合评分较术后 3 d 及 7 d 时有较大改善,并且明显优于造模对照组($P < 0.05$)(表 1)。

表 1 2 组不同时间点行为评估综合评分比较(分, $\bar{x} \pm s$)

组 别	行为评估综合评分			
	3 d	7 d	14 d	21 d
康复组	2.50 ± 1.34	1.67 ± 0.72	1.30 ± 0.48 *	1.20 ± 0.45 *
造模对照组	4.07 ± 1.33	1.72 ± 0.75	3.44 ± 1.01	2.33 ± 0.58

注:与造模对照组比较, * $P < 0.05$

二、病理观察

康复组和造模对照组各时间点均显示:缺血侧半球梗死灶位于纹状体背外侧和/或附近的顶叶皮质,对侧半球相应区域未见梗死灶的形成。造模对照组大鼠脑缺血 7 d 后,缺血区神经细胞数量明显减少,脑组织明显水肿,神经细胞间隙扩大,部分有空泡形成,病灶侧皮质及海马可见不同程度的缺血、坏死,同时间点康复组缺血周围区神经细胞数目较造模对照组增多,组

织水肿减轻,胶质细胞增生明显。

三、各组大鼠脑梗死后 tubulin 的表达

大鼠脑缺血后第 3 天,康复组及造模对照组梗死灶周围均可见 tubulin 阳性细胞(图 1,2),2 组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。7 d 时梗死灶周围 tubulin 阳性细胞明显增多,康复组大鼠梗死灶周围 tubulin 的表达明显较造模对照组强(图 3,4),2 组比较差异具有统计学意义($P < 0.05$)。康复组康复训练 14 d 后,梗死灶周围 tubulin 表达达峰值,高于造模对照组,但差异无统计学意义($P > 0.05$)(图 5,6);康复训练 21 d 后康复组 tubulin 略有回落,但仍保持在较高水平,与造模对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)(图 7,8)。具体数据见表 2。

表 2 2 组不同时间点 tubulin 阳性细胞计数比较(个, $\bar{x} \pm s$)

组 别	tubulin 阳性细胞计数			
	3 d	7 d	14 d	21 d
康复组	17.36 $\pm$ 9.65	27.85 $\pm$ 4.16*	54.52 $\pm$ 13.63	47.34 $\pm$ 14.92*
造模对照组	16.31 $\pm$ 2.92	18.78 $\pm$ 3.87	37.39 $\pm$ 11.63	26.56 $\pm$ 5.57

注:与造模对照组比较,* $P < 0.05$

讨 论

Tubulin 是神经细胞发生的标志蛋白^[11,12],神经细胞突起中 70% 的蛋白质成分为 tubulin,其动力学特点具有不稳定性,在神经细胞的生长发育过程及成熟期决定神经结构的可塑性。神经系统回路在稳定性与可塑性之间保持着微妙的平衡。突触连接一方面要保持一定的稳定性,以维持信号的传递;另一方面应有足够的可塑性以适应突触连接发生的变化,而该变化是以感觉传入变化为基础;另外,神经突的生长又可促进神经元网络的建立^[13,14]。因此,缺少 tubulin 将导致脑的

结构和功能改变。

Tubulin 是微管的主要化学成分,是构成微管的基本单位。微管是细胞骨架的重要组成部分,对维持细胞形态、保持细胞内部结构的有序性具有重要作用,而且与细胞内的物质运输、细胞运动、细胞的分化发育以及细胞分裂、繁殖和凋亡等生命活动密切相关^[15],是反映细胞生理状态和功能状态最敏感的生物学指标之一^[16]。微管参与介导、支持轴突和树突的生长与分化,并可起到稳定新建突触的作用。

神经元的损伤是否可逆,与神经细胞骨架的变化密切相关。神经细胞骨架是维持轴突正常形态、结构及功能的重要亚细胞结构。超微结构研究显示^[17],MACO 大鼠病灶处神经元和神经轴突的细胞骨架崩解是脑组织创伤的主要特征之一。Tubulin 是钙蛋白酶的作用底物,钙蛋白酶被激活后会诱导其底物发生不可逆的改变。脑损伤后, Ca^{2+} 内流,钙蛋白酶激活,微管蛋白分解,使神经细胞骨架崩解,轴突快速运输系统中断,引起轴突肿胀,导致延迟性轴突断裂,并破坏细胞间的传递,造成神经元死亡,致使某些神经通路中断而不能再通。因此,维持细胞骨架的稳定是保护神经结构的关键环节。

神经组织虽可通过病灶处水肿的消退、部分侧支循环的建立以及病灶周围组织一定程度的代偿而自然恢复,但运动功能的自然恢复有限,其代偿一般不会自发进行,而有赖于学习和训练。本实验中康复组大鼠进行康复训练 7 d 后,梗死灶周围 tubulin 的表达明显较造模对照组强($P < 0.05$),且于康复训练 14 d 后梗死灶周围 tubulin 表达达高峰,21 d 后略有回落,但仍保持较高水平,明显高于造模对照组($P < 0.05$);同时,康复训练 14 d 及 21 d 后脑梗死大鼠行为评估综合

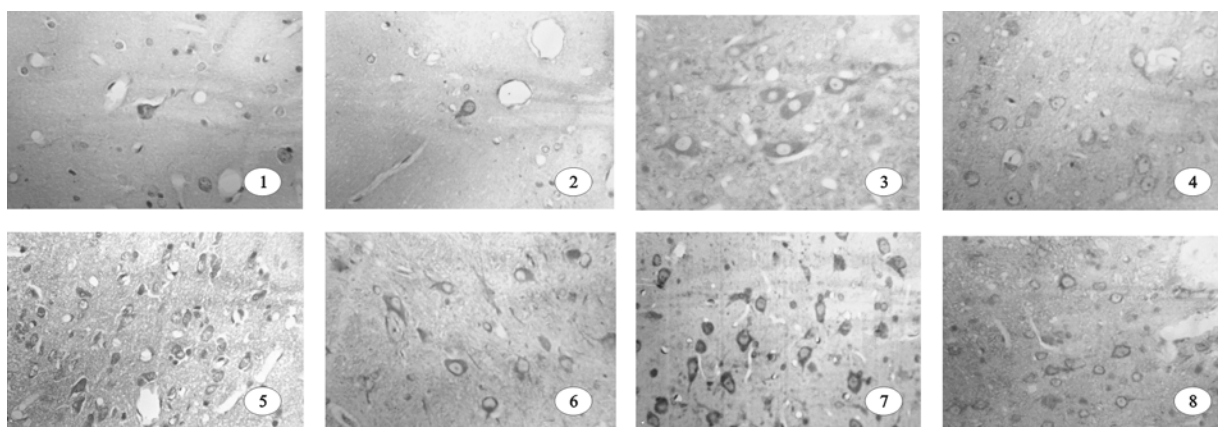


图 1 造模后 3 d 康复组梗死灶周围 tubulin 阳性细胞的表达($\times 40$); 图 2 造模后 3 d 造模对照组梗死灶周围 tubulin 阳性细胞的表达($\times 40$); 图 3 造模后 7 d 康复组梗死灶周围 tubulin 阳性细胞的表达($\times 40$); 图 4 造模后 7 d 造模对照组梗死灶周围 tubulin 阳性细胞的表达($\times 40$); 图 5 造模后 14 d 康复组梗死灶周围 tubulin 阳性细胞的表达($\times 40$); 图 6 造模后 14 d 造模对照组梗死灶周围 tubulin 阳性细胞的表达($\times 40$); 图 7 造模后 21 d 康复组梗死灶周围 tubulin 阳性细胞的表达($\times 40$); 图 8 造模后 21 d 造模对照组梗死灶周围 tubulin 阳性细胞的表达($\times 40$)

评分较康复训练 3 d 及 7 d 时有较大改善,并且明显低于造模对照组($P < 0.05$)。

综上所述,我们推测康复训练可促进脑梗死后梗死灶周围神经组织 tubulin 的表达,抑制脑损伤后 Ca^{2+} 内流、钙蛋白酶激活和微管蛋白的分解,从而减轻神经细胞骨架崩解,阻止延迟性轴突断裂的发生,减少神经元死亡,有助于神经功能的恢复。这可能是康复训练促进脑梗死后神经损伤修复和功能重塑的机理之一。

参 考 文 献

- 李志伟,吴剑飞,刘运兰. 早期康复治疗对脑梗死患者预后的影响. 第三军医大学学报,2004,26:274-275.
- 于群涛,王英,邵鹏,等. 急性脑梗死患者早期康复训练的临床观察. 中华物理医学与康复杂志,2004,26:426-427.
- 常燕群,刘勇,范华燕. 血管内皮生长因子 165 对局灶性脑梗死的影响. 中华物理医学与康复杂志,2004,26:16-19.
- 王亚男,石秉霞,郭云良,等. 运动训练对大鼠脑缺血再灌注后肢体功能恢复及微管相关蛋白含量的影响. 中华物理医学与康复杂志,2004,26:12-15.
- 袁华,牟翔,李玲,等. 康复训练对大鼠脑梗死后脊髓 Fos、CGPR 和 HSP70 表达的影响. 中华物理医学与康复杂志,2002,24:84-87.
- 袁华,龙华,李玲. 运动训练对脑梗死大鼠皮质 S-100、GFAB 和 Nestin 表达的影响. 中华物理医学与康复杂志,2003,25:520-523.
- 段淑荣,潘永慧,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,2004,19:430-432,439.
- Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. Stroke, 1989, 20:84-91.
- Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, et al. Rat middle cerebral artery occlusion; evaluation of the model and development of a neurological examination. Stroke, 1986, 17:472-476.
- 徐莉,李玲,晏培松,等. 康复训练后大鼠脑梗塞的组织形态学改变. 现代康复,2000,4:678-679.
- 方燕南,张艳,黄如训,等. 电刺激治疗对脑梗死后运动功能与星形胶质细胞活性的影响. 中国神经精神疾病杂志,2000,26:9-11.
- Alford S, Frenguelli BG, Schofield JG, et al. Characterization of Ca^{2+} signal induced in hippocampus CA1 neurons by the synaptic activation of NMDA receptors. J Physiol, 1993, 469:693-716.
- Reis DJ, Kobylarz K, Yamamoto S, et al. Brief electrical stimulation of cerebellar fastigial nucleus condition long-lasting salvage from focal cerebral ischemia: conditioned control neurogenic neuroprotection. Brain Res, 1998, 780:161-165.
- Bennett MR. The concept of long term potentiation of transmission at synapses. Prog Neurobiol, 2000, 60:109-137.
- Carre M, Andre N, Carles G, et al. Tubulin is an inherent component of mitochondrial membranes that interacts with the voltage-dependent anion channel. J Biol Chem, 2002, 277:33664-33669.
- Nunez J. Differential expression of microtubule components during brain development. Dev Neurosci, 1986, 8:125-141.
- Tomimoto H, Yanagihara T. Immunoelectron microscopic study of tubulin and microtubule-associated proteins after transient cerebral ischemia in gerbils. Acta Neuropathol (Berl), 1992, 84:394-399.

(收稿日期:2005-03-12)

(本文编辑:吴倩)

· 消息 ·

2005 国际脑瘫学术会议暨全国康复医学新技术论坛通知

由中国残疾人康复协会、清华大学玉泉医院和《中国康复理论与实践》杂志社联合主办的“2005 国际脑瘫学术会议暨全国康复医学新技术论坛”将于 2005 年 11 月 26 日至 29 日在北京举行,会期 4 天。参加会议者可获得国家级 I 类学分。优秀论文经专家评审后将以专题或择期发表在国家级核心期刊《中国康复理论与实践》杂志上。

会议分国际学术会议专场及现场技术培训。国际学术会议专场由国际知名专家进行学术报告,内容包括最新的研究进展、新技术等。现场技术培训由国内知名专家亲自进行现场操作,学员现场观摩,并对具体技术问题进行讨论。

会议投稿论文限 3 000 字,注明作者姓名、单位、通讯地址、固定电话、手机号码及邮政编码、E-mail 及关键词等,正文前请附 300 字的中文摘要。如通过 E-mail 投稿,请在主题上标明“国际脑瘫学术会议投稿”字样。投稿截止日期:2005 年 8 月 30 日。会议注册费:1 200 元/人,论文集发表费:300 元/篇。食宿由大会统一安排,费用自理。

论文投稿地址:100068 北京市丰台区角门北路 10 号《中国康复理论与实践》编辑部;电话:010-67567673,67563322-6310; E-mail: zamzhang@263.net, zamzhang@sohu.com。

本次会议备有交流平台,提供展位、宣传板,论文集可刊登广告或机构介绍等。欢迎相关厂家、公司或单位与会务组联系。

会务组地址:100007 北京市东城区东四六条 17 号北楼 209 室;电话:010-64006537;联系人:倪军。

· 消息 ·

全国康复治疗技术培训班通知

卫生部国家级继续教育项目全国康复治疗技术(PT、OT)培训班将于 2005 年 9 月 12 日至 9 月 23 日在北京举办,由中国康复医师协会及北京康复医学会康复治疗委员会承办,全国知名专家授课,并由有丰富实践经验的康复治疗师示范操作。具体内容包括 PT、OT 理论进展、操作技术、实践实用等,以学习实际操作技术为主。结业时可获得卫生部一等学分 18 分。学费 900 元。

联系人:李存中;地址:北京右外大街 199 号北京康复医学会;邮编:100054;电话:(010)63563147。或北京中国康复研究中心 胡春英;邮编:100068;电话:67563322 转 5118。