

· 基础研究 ·

意向运动疗法对大鼠脑缺血后 Nogo-A 和 Rho 激酶表达的影响

刘建锋 侯德仁 张杰文

【摘要】目的 探讨意向运动疗法对大鼠脑缺血周围区 Nogo-A 和 Rho 激酶表达的影响。**方法** 采用线栓法建立大鼠大脑中动脉栓塞 (MCAO) 模型, 再灌注 24 h 后根据 Longa 神经功能缺损评分选择模型。将 54 只造模成功的雄性 SD 大鼠按照随机数字表法分为 MCAO 模型组 (18 只)、环境改变组 (18 只)、意向运动组 (18 只), 每组再细分为 3 d、7 d、15 d 3 个亚组, 每组 6 只。MCAO 组大鼠饲养于常规饲养箱, 自由饮食、进水, 环境改变组及意向运动组大鼠均饲养于自制饲养箱中, 其中意向运动组大鼠所处饲养箱的饮水瓶及饲料均位于箱顶。大鼠处死前再进行 Longa 评分, 采用免疫组织化学染色法观察大鼠缺血周围区脑组织 Nogo-A 和 Rho 激酶的表达水平。**结果** 再灌注 15 d, 意向运动组大鼠神经功能缺损评分低于 MCAO 模型组及环境改变组 ($P < 0.05$)。再灌注 7 d 及 15 d, 意向运动组大鼠 Nogo-A 表达水平 [(28.92 ± 2.17) 个/高倍镜视野和 (24.38 ± 2.29) 个/高倍镜视野] 及 Rho 激酶 [(40.03 ± 2.14) 个/高倍镜视野和 (38.08 ± 2.07) 个/高倍镜视野] 表达水平均低于 MCAO 模型组及环境改变组 ($P < 0.05$)。MCAO 模型组与环境改变组所有时间点 Nogo-A 及 Rho 激酶表达水平之间比较, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。**结论** 意向运动疗法可改善 MCAO 大鼠的神经功能缺损症状, 其机制可能与抑制缺血周围区脑组织 Nogo-A 和 Rho 激酶的表达水平有关。

【关键词】 意向运动; 脑缺血; Nogo-A; Rho 激酶

Effect of willed movement therapy on the expression of Nogo-A and Rho-associated kinase in rats of cerebral ischemia

Liu Jianfeng*, Hou Deren, Zhang Jiewen. *Department of Neurology, People's Hospital of Zhengzhou University, Henan Provincial People's Hospital, Zhengzhou 450003, China

Corresponding author: Zhang Jiewen, Email: zhangjiewen9900@126.com

[Abstract] **Objective** To determine the effect of willed movement on the expression of Nogo-A and Rho-associated kinase (ROCK) in adult rats with cerebral ischemia. **Methods** Cerebral ischemia/reperfusion injury was established by middle cerebral artery occlusion (MCAO) for 2 h, followed by a 24 h reperfusion in 54 adult rats and the degree of their neurological deficit was evaluated using Longa scale. They were then divided randomly into 3 groups, namely the MCAO group, the environmental modification (EM) group, and the willed movement (WM) group. The rats of MCAO group were raised in a regular breeding box, where they could get food and water freely. Meanwhile, those of the other two groups were raised in a homemade box. For the WM group, the water bottle and food were located on the roof of the homemade box. In each group, six rats were killed on day 3, 7 and 15 after reperfusion and their neurological deficits were evaluated respectively. Immunohistochemistry assay was employed to examine the expression of Nogo-A and ROCK in the brain tissue around the ischemic foci. **Results** The rats of the WM group showed lessened neurological deficits on day 15 compared with the model and EM group. Their expression of Nogo-A decreases from (28.92 ± 2.17)/hpf on day 7 to (24.38 ± 2.29)/hpf on day 15 and that of ROCK did from (40.03 ± 2.14)/hpf to (38.08 ± 2.07)/hpf, lower than those of the model and EM group. However, no significant differences were found in the expression of Nogo-A and ROCK between the model group and EM group at any time points. **Conclusion** Willed movement could promote the functional recovery of neurological deficits in rats with ischemia after reperfusion, which is probably in relation to restrained expression of Nogo-A and Rho-associated in the tissue around the brain ischemic foci.

【Key words】 Willed movement; Cerebral ischemia; Nogo-A; Rho-associated kinase

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2015.06.001

基金项目:湖南省科技厅社会发展项目(2012SK3218)

作者单位:450003 郑州,郑州大学人民医院(河南省人民医院)神经内科(刘建锋、张杰文);中南大学湘雅三医院神经内科(侯德仁)

通信作者:张杰文,Email:zhangjiewen9900@126.com

意向运动是指某个体集中注意力、竭尽全力完成某一动作, 从而达到某一预期目标的运动方式^[1]。Tang 等^[2]研究发现, 缺血性脑卒中患者接受意向性运动疗法治疗后, 其瘫痪肢体的运动功能可得到显著改善。前期研究发现, 意向运动能够显著改善脑缺血再

灌注大鼠瘫痪侧的肢体功能，并增加其脑缺血区生长相关蛋白、胶质纤维酸性蛋白、突触素的表达水平，进而加速受损中枢神经修复及突触重塑^[3-5]。本研究采用免疫组织化学法观察意向运动疗法对大鼠脑缺血后 Nogo-A 和 Rho 激酶表达的影响，旨在探讨意向运动促进神经功能恢复的分子机制。

材料和方法

一、实验动物及材料

共选取清洁级成年健康雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 54 只，体重 230 ~ 260 g，大鼠均购于中南大学湘雅三医院动物实验中心。大鼠饲养条件：温度 22 ℃、湿度 60%、光暗周期 12 h/12 h，每日给予充足水分及食物。主要实验仪器及试剂包括：常规饲养箱(长 38 cm × 宽 28 cm × 高 18 cm)、自制饲养箱(长 38 cm × 宽 28 cm × 高 32 cm)、自制人字梯(长 8 cm × 宽 10 cm × 高 22 cm)、日本产 Nikon 普通光学显微镜、日本产 80i 型正置显微镜、日本产 DS-Ri1 型显微镜配套数码相机；免抗大鼠 Nogo-A 多克隆抗体(工作浓度 1:500)及免抗大鼠 Rho 激酶多克隆抗体(工作浓度 1:500)均购自 DAKO 公司，二氨基联苯胺 (diaminobenzidine, DAB) 显色试剂盒购自美国 Vector 公司。

二、制模及分组

参照 Longa 线栓法[6]，经右侧颈总动脉制备大脑中动脉栓塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型，栓塞 2 h 后拔出栓线，手术结束后将大鼠饲养于常规饲养箱中。再灌注 24 h 后采用 Longa 评分对大鼠左侧肢体进行神经功能评定，0 分表示大鼠正常，无神经功能缺损；1 分表示轻度神经功能缺损，大鼠对侧前爪不能完全伸展；2 分表示中度神经功能缺损，大鼠爬行时向偏瘫侧转圈；3 分表示重度神经功能缺损，大鼠爬行时身体向偏瘫侧倾倒；4 分表示大鼠有意识丧失，不能自发移动。大鼠 Longa 评分为 1 ~ 3 分表示制模成功，将评分为 1 分、2 分、3 分的大鼠纳入研究，评分为 0 分及 4 分的模型予以剔除，共纳入 54 只大鼠。采用随机数字表法将其分为 MCAO 模型组(18 只)、环境改变组(18 只)、意向运动组(18 只)，每组再细分为 3 d、7 d、15 d 3 个亚组，每组 6 只。

三、干预方法

通过食物诱导方法使意向运动组大鼠进行意向运动，将意向运动组大鼠置于自制饲养箱内，箱内放置自制人字形梯，饮水瓶和饲料置于箱顶，分组后即开始进行食物诱导，训练大鼠通过爬人字梯或饲养箱侧壁获取箱顶的水与饲料，待大鼠能主动攀爬获取水和饲料后停止诱导。MCAO 模型组和环境改变组大鼠不进行意向运动诱导训练，将 MCAO 模型组大鼠置于常规饲

养箱内，将环境改变组大鼠置于与意向运动组相同的自制饲养箱内，箱内放置相同人字形梯，但其饮水瓶和饲料均投放在箱底。

四、免疫组化染色

缺血再灌注后 3 d、7 d、15 d，分别将 MCAO 模型组、环境改变组、意向运动组内各亚组大鼠按 0.35 ml/100 g 水合氯醛(10%)麻醉处死，取脑组织，制成 5 μm 厚石蜡切片备用。免疫组织化学染色严格按照试剂盒说明书进行^[4]。以磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS)代替一抗，设置阴性对照。观察 Nogo-A 和 Rho 激酶表达水平均选取右侧额顶叶缺血周围区，镜下胞浆内出现棕黄色颗粒提示 DAB 染色阳性。在高倍镜下随机选取 4 个不重复视野，计数每个视野中的阳性细胞数，取算术平均值作为该标本的阳性表达数量。

五、统计学分析

采用 SPSS 16.0 版统计学软件进行数据处理，所得计量资料采用($\bar{x} \pm s$)形式表示，组间比较采用单因素方差分析，两两比较采用 *q* 检验，神经功能缺损评分采用非参数秩和 H 检验及 Nemenyi 法检验，*P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

结 果

一、3 组大鼠干预前、后神经功能缺损评分比较

干预前，各组大鼠神经功能缺损评分之间比较，差异无统计学意义(*P* > 0.05)。再灌注 15 d 时，意向运动组大鼠神经功能缺损评分与 MCAO 模型组、环境改变组之间比较，差异有统计学意义(*P* < 0.05)。MCAO 模型组再灌注 15 d 时神经功能缺损评分与环境改变组比较，差异无统计学意义(*P* > 0.05)。

二、3 组大鼠干预后不同时间点缺血脑组织周围区 Nogo-A 表达水平

干预后，各组大鼠额顶叶皮质缺血周围区均有 Nogo-A 表达。再灌注 3 d 时，MCAO 模型组、环境改变组、意向运动组 Nogo-A 表达水平之间比较，差异无统计学意义(*P* > 0.05)。与组内 3 d 时比较，各组大鼠再灌注 7 d 及 15 d 时的 Nogo-A 表达水平均增高(*P* < 0.05)。与组内 7 d 时比较，仅意向运动组再灌注 15 d 时的 Nogo-A 表达水平显著降低(*P* < 0.05)。再灌注 7 d 及 15 d 时，MCAO 模型组与环境改变组 Nogo-A 表达水平之间比较，差异无统计学意义(*P* > 0.05)。意向运动组再灌注 7 d 及 15 d 时的 Nogo-A 表达水平显著低于 MCAO 组及环境改变组，差异有统计学意义(*P* < 0.05)。详见表 1、图 1。

三、3 组大鼠干预后不同时间点缺血脑组织周围区 Rho 激酶表达水平

表 1 3 组大鼠干预后不同时间点缺血脑组织周围区 Nogo-A 表达水平(个/高倍镜视野, $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	3 d	7 d	15 d
MCAO 模型组	6	20.42 ± 5.28	33.33 ± 1.52 ^a	32.17 ± 1.94 ^a
环境改变组	6	21.06 ± 4.86	33.00 ± 3.13 ^a	33.71 ± 2.70 ^a
意向运动组	6	21.83 ± 4.44	28.92 ± 2.17 ^{acd}	24.38 ± 2.29 ^{abcd}

注:与组内 3 d 比较,^a $P < 0.05$;与组内 7 d 比较,^b $P < 0.05$;与 MCAO 模型组同时间点比较,^c $P < 0.05$;与环境改变组同时间点比较,^d $P < 0.05$

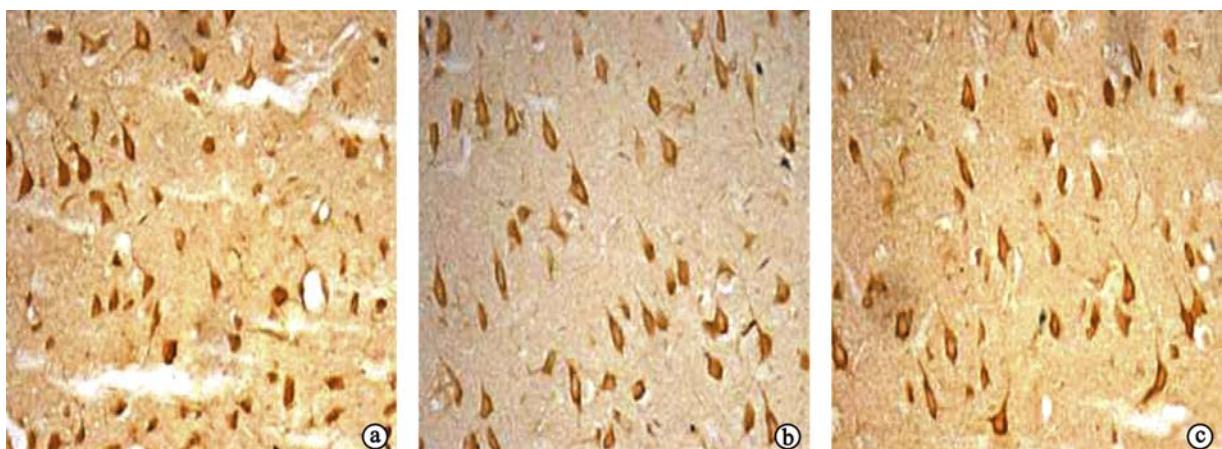
干预后,各组大鼠额顶叶皮质缺血周围区均有 Rho 激酶表达。再灌注 3 d 时,MCAO 模型组、环境改变组、意向运动组 Rho 激酶表达水平之间比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。与组内 3 d 时比较,各组大鼠再灌注 7 d 及 15 d 时的 Rho 激酶表达水平均增高($P < 0.05$)。与组内 7 d 时比较,仅意向运动组再灌注

15 d 时的 Rho 激酶表达水平显著降低($P < 0.05$)。再灌注 7 d 及 15 d 时,MCAO 模型组与环境改变组 Rho 激酶表达水平之间比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。意向运动组再灌注 7 d 及 15 d 时的 Rho 激酶表达水平显著低于 MCAO 组及环境改变组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。详见表 2、图 2。

表 2 3 组大鼠干预后不同时间点缺血脑组织周围区 Rho 激酶表达水平(个/高倍镜视野, $\bar{x} \pm s$)

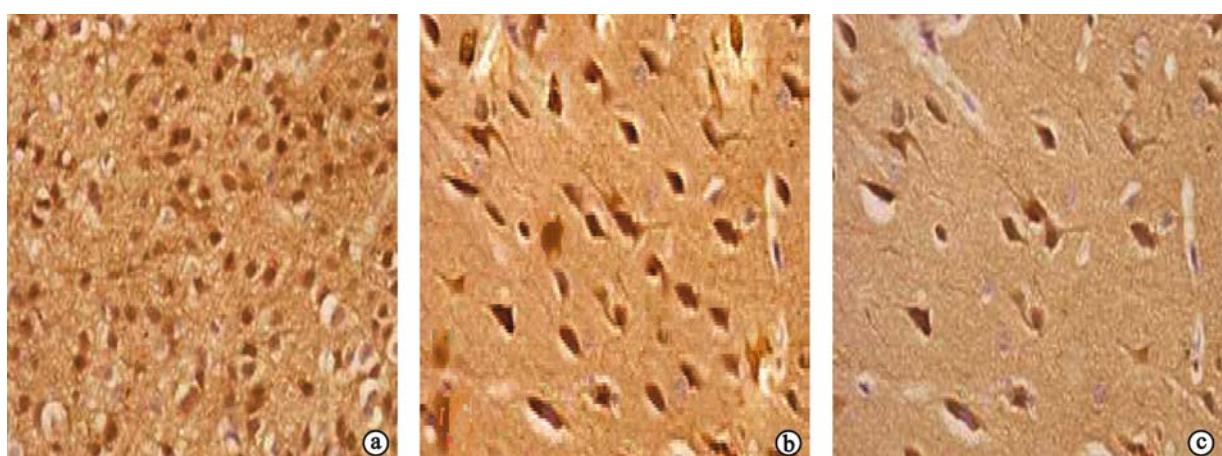
组别	例数	3 d	7 d	15 d
MCAO 模型组	6	35.03 ± 4.24	45.04 ± 1.25 ^a	45.32 ± 1.13 ^a
环境改变组	6	34.30 ± 2.74	45.75 ± 1.76 ^a	45.29 ± 1.40 ^a
意向运动组	6	35.16 ± 4.18	40.03 ± 2.14 ^{acd}	38.08 ± 2.07 ^{abcd}

注:与组内 3 d 比较,^a $P < 0.05$;与组内 7 d 比较,^b $P < 0.05$;与 MCAO 模型组同时间点比较,^c $P < 0.05$;与环境改变组同时间点比较,^d $P < 0.05$



注:a 为 MCAO 模型组大鼠再灌注 7 d 时脑缺血周围区 Nogo-A 的表达情况;b 为环境改变组大鼠再灌注 7 d 时脑缺血周围区 Nogo-A 的表达情况;c 为意向运动组大鼠再灌注 7 d 时脑缺血周围区 Nogo-A 的表达情况

图 1 再灌注 7 d 时各亚组大鼠脑缺血周围区 Nogo-A 的表达情况(免疫组化染色, $\times 400$)



注:a 为 MCAO 模型组大鼠再灌注 7 d 时脑缺血周围区 Rho 激酶的表达情况;b 为环境改变组大鼠再灌注 7 d 时脑缺血周围区 Rho 激酶的表达情况;c 为意向运动组大鼠再灌注 7 d 时脑缺血周围区 Rho 激酶的表达情况

图 2 再灌注 7 d 时各亚组大鼠脑缺血周围区 Rho 激酶的表达情况(免疫组化染色, $\times 400$)

讨 论

突触重塑是促进缺损神经功能改善的结构基础之一,其广泛存在于脑组织发育、成熟及损伤后修复等多种生理过程中,与功能恢复之间相互依赖、相互促进。突触重塑过程中,常伴随有促进神经元修复及轴突再生的相关蛋白数量增加。中枢神经系统内存在抑制神经元轴突再生的神经生长抑制因子,目前已知的有 Nogo 蛋白、髓磷脂相关糖蛋白 (myelin-associated glycoprotein, MAG)、少突胶质细胞髓磷脂糖蛋白 (oligodendrocyte-myelin glycoprotein, OMgp) 等。

Nogo 蛋白有 3 种异构体,其中 Nogo-A 可能是阻止中枢神经再生的关键因子之一。成年哺乳动物中,Nogo-A 主要分布于中枢神经系统少突胶质细胞的内质网上,仅有极少量位于少突胶质细胞表面,在施万细胞和星形胶质细胞中未见分布^[7]。Nogo-A 在生物体内及体外均表现出强烈的抑制轴突生长作用,其可通过 3 种方式抑制神经元轴突再生:细胞-细胞方式、细胞-膜方式、直接释放抑制因子。细胞-细胞方式及细胞-膜方式分别通过细胞表面的 Nogo-66 或脱落下来的含 Nogo-66 膜片段与受损神经元结合,从而发挥作用;直接释放抑制因子则是由少突胶质细胞直接释放 Nogo-A 可溶性蛋白水解片段^[8]。Nogo-A 受体与 p75 及 Lingo-1 形成复合物,然后与 Nogo 的抑制性区域结合,通过第二信使激活下游 Rho/Rock 信号通路,进而导致轴突生长受到抑制^[9]。

Rho/Rock 信号转导通路的关键分子包括 Rho 蛋白、Rho 激酶和肌球磷酸酶 (myosin phosphatase, MP)。Rho 激酶主要接受 Rho 传递的活化信号,进而引起多个氨基酸位点的磷酸化,并介导其下游的一系列磷酸化/脱磷酸化反应。肌球蛋白磷酸酶是活化 Rho 激酶的底物,活化的 Rho 激酶能使 MP 磷酸化,进而丧失活性,由于失活的 MP 不能将肌球蛋白轻链 (myosin light chain, MLC) 脱磷酸化,所以胞浆内磷酸化 MLC 水平不断增高,肌动-肌球蛋白交联增加;中枢神经系统内,其可导致肌动蛋白骨架解聚功能丧失,抑制轴突延伸,介导生长锥塌陷,从而抑制轴突生长^[10]。Lemmens 等^[11]研究发现,EphA4 表达水平下降的转基因小鼠的运动功能恢复程度较单纯性缺血性脑卒中小鼠优异,提示 EphA4 可能是激活 Rho 激酶的上游调控因子之一,使用 Rho 激酶抑制剂 Y-27632 和法舒地尔后,脑缺血小鼠的瘫痪侧肢体运动功能可得到显著改善。

一般情况下,神经功能恢复从卒中发生后就已经开始,但仍有约 73% 的卒中患者遗留有不同程度的神经功能缺损症状。对遗留有后遗症的脑卒中患者来说,积极的康复训练能够有效改善其远期预后。Seo

等^[12]研究发现,早期运动训练能够促进局灶性脑缺血大鼠的神经功能恢复,同时可改善缺血侧大脑半球皮质下结构的重塑功能。有关康复训练的最佳介入时间,目前尚缺乏统一的定论。Kollen 等^[13]研究报道,步态训练能够改善站立平衡、腿部力量及协调能力,其介入时间与功能改善间呈负相关,提示脑卒中后早期介入康复训练的效果较好。意向运动疗法是在食物的诱导下,尽可能多的调动局灶性脑缺血大鼠使用瘫痪侧肢体,强调患病个体在康复训练中的主体地位,因此具有较高的临床应用价值。

本研究在大鼠缺血再灌注 24 h 后立即开始进行意向运动,各组大鼠初期的神经功能缺损评分间比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。15 d 后,意向运动组大鼠偏瘫侧肢体神经功能缺损程度较 MCAO 模型组及环境改变组大鼠显著改善 ($P < 0.05$),MCAO 模型组与环境改变组大鼠神经功能缺损程度之间比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。免疫组织化学结果显示,缺血再灌注 3 d 时,各组 Nogo-A 和 Rho 激酶表达水平之间比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。缺血再灌注 7 d 及 15 d 时,意向运动组大鼠 Nogo-A 和 Rho 激酶表达水平较 MCAO 组及环境改变组下降 ($P < 0.05$),且意向运动组再灌注 15 d 时 Nogo-A 和 Rho 激酶的表达水平低于再灌注 7 d 时,这一变化趋势与神经功能缺损评分变化趋势基本吻合。Nogo-A 和 Rho 激酶作为抑制轴突生长的蛋白,其表达水平下降有助于脑缺血大鼠中枢神经系统的突触重塑。由此推测,意向运动疗法能够抑制缺血性脑卒中大鼠缺血脑组织中 Nogo-A 和 Rho 激酶的表达水平,从而有利于神经元间突触重塑或轴突再生,进而促进缺损神经功能修复。

参 考 文 献

- [1] Waterland JC. The supportive framework for willed movement [J]. Am J Phys Med, 1967, 46(1): 266-279.
- [2] Tang QP, Yang QD, Wu YH, et al. Effects of problem-oriented willed-movement therapy on motor abilities for people with post-stroke cognitive deficits [J]. Phys Ther, 2005, 85(10): 1020-1033.
- [3] 侯德仁,沙地克·沙吾提,邓锦凤,等. 意向运动疗法对大鼠脑缺血再灌注损伤后 NT-3 及 GAP-43 表达的影响 [J]. 南方医科大学学报, 2011, 31(8): 1401-1404.
- [4] 侯德仁,沙地克·沙吾提,刘建锋,等. 意向运动疗法对大鼠局灶性脑缺血后 GFAP 和 SYP 表达的影响 [J]. 南方医科大学学报, 2011, 31(8): 1543-1546.
- [5] Hou DR, Liu JF, Deng JF, et al. Neuroprotective mechanisms of willed movement therapy in rats with cerebral ischemia reperfusion [J]. Neural Regen Res, 2011, 6(35): 2756-2760.
- [6] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91.
- [7] Schmandke A, Mosberger AC, Schmandke A, et al. The neurite growth

- inhibitory protein Nogo-A has diverse roles in adhesion and migration [J]. Cell Adh Migr, 2013, 7(6): 451-454.
- [8] Schwab ME, Strittmatter SM. Nogo limits neural plasticity and recovery from injury[J]. Curr Opin Neurobiol, 2014, 27(8):53-60.
- [9] Kumar P, Moon LD. Therapeutics targeting Nogo-A hold promise for stroke restoration[J]. CNS Neurol Disord Drug Targets, 2013, 12(2): 200-208.
- [10] Zhang X, Li C, Gao H, et al. Rho kinase inhibitors stimulate the migration of human cultured osteoblastic cells by regulating actomyosin activity[J]. Cell Mol Biol Lett, 2011, 16(2): 279-295.
- [11] Lemmens R, Jaspers T, Robberecht W, et al. Modifying expression of EphA4 and its downstream targets improves functional recovery after stroke[J]. Hum Mol Genet, 2013, 22(11): 2214-2220.
- [12] Seo HG, Kim DY, Park HW, et al. Early motor balance and coordination training increased synaptophysin in subcortical regions of the ischemic rat brain[J]. J Korean Med Sci, 2010, 25(11): 1638-1645.
- [13] Kollen B, van de Port I, Lindeman E, et al. Predicting improvement in gait after stroke: a longitudinal prospective study [J]. Stroke, 2005, 36(12): 2676-2680.

(修回日期:2015-03-25)

(本文编辑:凌 琛)

· 特稿 ·

深切悼念卓大宏教授

中国现代康复医学事业的奠基人之一、世界卫生组织康复咨询团成员、世界卫生组织康复合作中心主任、中国康复医学会第一届至第四届理事会副会长、中国康复医学会专家委员会主任委员、《中国康复医学杂志》主编、原中山医科大学党委书记,中山大学附属第一医院康复科知名学者、享受国务院政府特殊津贴专家卓大宏教授,于 2015 年 5 月 27 日晚上 21 时 35 分因病在广州中山大学附属第一医院逝世,享年 83 岁。

卓大宏教授的去世,是我国康复医学事业的重大损失。我们将永远怀念他!

《中华物理医学与康复杂志》编辑部
《中华物理医学与康复杂志》编辑委员会