

· 基础研究 ·

强化运动训练对脑缺血再灌注大鼠神经功能恢复及 kalirin-7 表达的影响

高晶晶 王玉阳 石浩 王强

【摘要】目的 观察强化运动训练对脑缺血再灌注大鼠神经功能恢复和脑内 kalirin-7 表达的影响,并探讨强化运动训练改善脑缺血再灌注大鼠神经功能的可能机制。**方法** 取雄性 Wistar 大鼠 45 只,采用线栓法制成左侧大脑中动脉缺血再灌注(MCAO)动物模型,按随机数字表法将 45 只大鼠分为模型组、普通训练组、强化训练组(每组各 15 只),另取 15 只大鼠设为假手术组。模型组和假手术组大鼠不做运动训练;普通训练组大鼠和强化训练组分别进行普通运动训练和强化运动训练。于造模成功后第 3、7、14 天,普通训练组和强化训练组大鼠跑台训练结束后,采用 Zausinger 评分对 4 组大鼠进行神经功能缺损评定,然后采用 western blotting 法检测梗死灶及其周围皮质 kalirin-7 蛋白的表达,最后采用 RT-PCR 法检测梗死灶及其周围皮质 kalirin-7 mRNA 的表达。**结果** 3 组大鼠造模后各时间点的 Zausinger 评分均低于假手术组同时时间点,差异均有统计学意义($P < 0.01$);造模成功后第 7、14 天,强化训练组的 Zausinger 评分均高于普通训练组同时时间点,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。3 组大鼠造模后各时间点的梗死灶及其周围皮质 kalirin-7 蛋白表达量均低于假手术组同时时间点,差异均有统计学意义($P < 0.01$);造模成功后第 7、14 天,普通训练组和强化训练组的梗死灶及其周围皮质 kalirin-7 蛋白表达量明显高于模型组同时时间点($P < 0.05$),且强化训练组的梗死灶及其周围皮质 kalirin-7 蛋白表达量亦显著高于普通训练组同时时间点($P < 0.05$)。3 组大鼠造模后各时间点的梗死灶及其周围皮质 kalirin-7 mRNA 表达量均低于假手术组同时时间点,差异均有统计学意义($P < 0.01$);造模成功后第 14 天,普通训练组和强化训练组的梗死灶及其周围皮质 kalirin-7 mRNA 表达量均高于模型组同时时间点($P < 0.05$),且强化训练组的梗死灶及其周围皮质 kalirin-7 mRNA 表达量亦高于普通训练组同时时间点,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 强化运动训练可促进脑缺血再灌注大鼠神经功能恢复,增加脑缺血再灌注损伤大鼠 kalirin-7 的表达,且效果均优于普通运动训练。

【关键词】 脑缺血再灌注; 强化运动训练; 大鼠; 神经功能

The Effects of intensive treadmill training on neurological function and expression of kalirin-7 after cerebral ischemia-reperfusion in rats Gao Jingjing, Wang Yuyang, Shi Hao, Wang Qiang. Department of Rehabilitation, the Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266005, China

Corresponding author: Wang Qiang, Email: sakulawangqiang@hotmail.com

【Abstract】Objective To investigate the effects of treadmill training at different intensities on neurological function and expression of kalirin-7 in rats after cerebral ischemia-reperfusion, and the possible mechanism. **Methods** Sixty Wistar male rats were randomized into a model group, a routine training group, an intensive training group and a sham-operation group ($n = 15$ for each group). A middle cerebral artery occlusion/reperfusion (MCAO/R) model was established in all the rats of the first three groups. The model group and sham group did no motor training, while the routine training group did treadmill training once daily, and the intensive training group did treadmill training twice a day. On the 3rd, 7th and 14th day, Zausinger scores was used to evaluate the neurological deficit; reverse Transcription PCR (RT-PCR) and Western blot were adopted to detect the expression of kalirin-7 and kalirin-7 mRNA in the peri-ischemic brain tissues respectively. **Results** The average Zausinger scores of the model group and 2 training groups were significantly lower than that of the sham-operation group at all time points; on the 7th and 14th days, the average score of the intensive training group was significantly higher than that of the routine training group. Moreover, the expression of kalirin-7 and kalirin-7 mRNA in the MCAO rats were significantly lower than that in the sham-operation group. On days 7 and 14, the expression of kalirin-7 in the intensive training group was significantly higher than that of the routine training group, which was still significantly higher than the model

group. On day 14, the expression of kalirin-7 mRNA in the intensive training group was significantly higher than that of the routine training group, which was still significantly higher than the model group. **Conclusion** The intensive training is superior to routine training in promoting neural functional recovery and expression of kalirin-7 in rats with cerebral ischemia-reperfusion.

【Key words】 Cerebral ischemia-reperfusion; Intensive training; Rat; Neurological function

国内外的研究指出,脑卒中后运动训练的早期介入可加速患者运动功能的恢复,且以强化运动训练的疗效更为显著^[1-3]。而有研究也指出,脑卒中后强化运动训练的疗效与常规康复训练比较,差异无统计学意义($P>0.05$)^[4]。运动疗法中的运动量主要取决于运动强度和运动时间,而强化运动训练是指通过增加运动强度和(或)运动时间来增大运动量的训练方式^[5]。中枢神经的可塑性理论为康复训练的实施提供了理论支撑^[6]。有实验研究表明,运动训练在促进血管和神经生成的同时,还可抑制细胞凋亡和神经炎症,从而达到促进脑卒中患者功能恢复的作用^[7-9]。Kalirin 是 Rho 蛋白家族中小 GTP 酶的一种神经特异的鸟嘌呤核苷酸转化因子(guanine-nucleotide exchange factor, GEF)^[10-11]。在成年鼠中,kalirin 主要在中枢神经系统表达,而 kalirin-7 是表达量最高的 kalirin 同源物^[12]。有研究证明,kalirin-7 可影响细胞骨架重排,激发神经元突起生长,并调节内分泌^[13]。另外,kalirin-7 是维持树突棘的必须条件,树突棘结构和功能的改变将直接影响突触信息的传递,进而影响运动、学习记忆和认知能力^[14]。本研究旨在观察强化运动训练对脑缺血再灌注大鼠神经功能恢复和脑内 kalirin-7 表达的影响,并探讨强化运动训练改善脑缺血再灌注大鼠神经功能可能的机制。

材料和方法

一、实验动物

清洁级 Wistar 大鼠 60 只(由青岛市药品检验所实验动物中心提供),雄性,体重(300 ± 20)g,鼠龄 2~3 个月,饲养环境室温(21 ± 2)℃,自然光照,自由饮水、取食。所有大鼠均于实验前在实验室环境饲养一周。将 60 只大鼠按随机数字表法分为模型组、普通训练组、强化训练组和假手术组,每组各 15 只。

二、脑缺血再灌注动物模型制备

脑缺血再灌注采用 Longa 颈外动脉线栓法^[15],栓线购自北京沙东生物技术有限公司,栓塞时间为 90 min。具体操作方法:术前 12 h 禁食,手术采取 10% 水合氯醛($0.4 \text{ ml}/100 \text{ g}$ 体重)腹腔注射麻醉。术中分离左侧颈总动脉(common carotid artery, CCA)、颈外动脉(external carotid artery, ECA)和颈内动脉(internal carotid artery, ICA)。结扎左侧 CCA 和 ECA 近心

端,用动脉夹夹闭 ICA 远端,在结扎处和动脉夹之间的 CCA 剪一小口,将线栓沿 CCA 顺行插入 ICA。然后扎紧 CCA 插线处,松开动脉夹后将线栓继续向内推进,直到遇到轻微阻力为止。线栓插入深度为距颈总动脉分叉(18.0 ± 0.5)mm 处,以阻断左侧大脑中动脉血流,阻塞 90 min 后拔出线栓。按照 Zausinger 等^[16]的神经行为评分法,将麻醉清醒后评分 1~4 分的大鼠纳入研究。假手术组除不用栓线阻塞血管外,其余操作相同。

三、实验分组及康复训练

跑台训练采用淮北正华生物仪器设备有限公司 ZH-PT 型动物实验跑台,普通训练组和强化训练组大鼠均于造模前进行 3 d 的适应性跑台训练,跑台速度为 5 m/min,每日训练 1 次,每次训练 15 min。造模成功 24 h 后,开始进行正式跑台训练。普通训练组训练方式:第 1 天,跑台速度为 5 m/min,训练 15 min;第 2 天,跑台速度为 8 m/min,训练 20 min;第 3 天至第 14 天,跑台速度为 12 m/min,每日训练 1 次,每次训练 30 min。强化训练组[衡量运动强度的指标有心率、机体耗氧量和代谢当量(metabolic equivalent, MET)等,本研究拟采用的方式是单纯增加运动时间的方式]训练方式:每天进行跑台训练的速度、时间与普通训练组相同,训练次数增加至每日 2 次,间歇 8 h。模型组和假手术组大鼠不进行跑台训练。

四、神经行为学评定

于造模成功后第 3、7、14 天,普通训练组和强化训练组大鼠跑台训练结束后,对 4 组大鼠进行神经行为学评定,每个时间点取 5 只大鼠。评定方法参照 Zausinger 神经功能缺损评分^[16],0 分为不能自发行走;1 分为自由走动状态下向病变对侧旋转;2 分为提起鼠尾使双侧后爪离地,大鼠向病变对侧旋转;3 分为对于施向病变对侧的侧压力抵抗力下降;4 分为不能伸直病变对侧前爪,甚至全身向对侧屈曲;5 分为无神经功能缺损。该评定由 2 名对实验分组不知情的实验人员全程负责,评定人员经过培训确保掌握评定方法,每次对每只大鼠分别评定后取平均值。

五、Western blotting 法检测

(一)蛋白提取、浓度检测

采用 Western blotting 法检测 kalirin-7 蛋白的表达水平。于造模成功后第 3、7、14 天,将各组完成

Zausinger 神经功能缺损评分的大鼠进行麻醉,并迅速断头取脑, -80°C 冰箱保存。将冷冻鼠脑切成 1 mm 厚的脑片,提取梗死灶及其周围皮质,然后将提取好的脑组织中加入裂解液匀浆, -20°C 下离心 20 min (离心半径 8 cm, 12 000 r/min), 收集上清液。取适量上清用二喹啉甲酸 (bicinchoninic acid, BCA) 法测定蛋白浓度, 调整蛋白浓度为 $20\text{ }\mu\text{g}/10\text{ }\mu\text{l}$, 加入上样缓冲液, 煮沸 5 min, 冷却后置于 -20°C 冰箱保存。

(二) 免疫印迹分析

蛋白上样量为 $10\text{ }\mu\text{l}$, 8% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳 2 h, 转膜 3.5 h 将蛋白转移至 PVDF 膜上, 置于 5% 脱脂奶粉中封闭 1 h。加入一抗 (兔抗鼠 kalirin-7, 稀释度为 1:500; 兔抗鼠 tublin- β , 稀释度为 1:1000) 4°C 摇床孵育过夜, 0.1% TBS-T 震荡洗膜, 10 min/次 $\times$ 3 次; 二抗 (辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 抗体, 稀释度为 1:10 000) 37°C 摇床孵育 1 h, 0.1% TBS-T 震荡洗膜, 10 min/次 $\times$ 3 次。膜上滴加化学发光显色液, 以 UVP 凝胶成像系统显影, Image J 图像分析软件进行灰度分析。Kalirin-7 蛋白表达水平的表示方法: 由 Image J 图像分析软件分析得出 kalirin-7 和内参 tublin- β 蛋白条带的灰度值。分别计算 kalirin-7 和 tublin- β 的比值, 以假手术组的比值作为 1, 其余各组与假手术组相比, 得出各组 kalirin-7 蛋白相对表达量。

六、RT-PCR 法检测

采用 RT-PCR 法检测 kalirin-7 mRNA 的表达水平。将 Western blotting 法检测时提取的梗死灶及其周围皮质用 Trizol 核糖核酸 (ribonucleic acid, RNA) 提取试剂盒提取组织总 RNA, 测定 RNA 浓度, 反转录为互补脱氧核糖核苷酸 (complementary deoxyribonucleic acid, cDNA), 反应条件为: 37°C 15 min, 85°C 5 s, 4°C 终止反应。应用荧光定量逆转录-聚合酶链反应 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 检测脑组织 kalirin-7 mRNA 表达水平。kalirin-7 基因上游引物序列为: 5'-GTGCATGTGAGGGACCAACA-3', 下游引物序列为 5'-GTGCTGCAGGTTTTGATGTGA-3'。反应条件为: 95°C 5 min; 95°C 10 s, 60°C 30 s, 循环 30 次; 72°C 10 min 终止反应, 采用相对定量法采集数据。

七、统计学分析

采用 GraphPad prism 5.01 版软件对实验数据进行分析处理, 数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 各组间差异比较用方差分析 (ANOVA), 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、Zausinger 评分结果

假手术组无神经功能缺损, 其余 3 组大鼠造模后

各时间点的 Zausinger 评分均低于假手术组同时间点, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$); 普通训练组和强化训练组的 Zausinger 评分均高于模型组同时间点 ($P < 0.05$)。造模成功后第 3 天, 强化训练组的 Zausinger 评分与普通训练组同时间点比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 造模成功后第 7、14 天, 强化训练组的 Zausinger 评分均高于普通训练组同时间点, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 详见图 1。

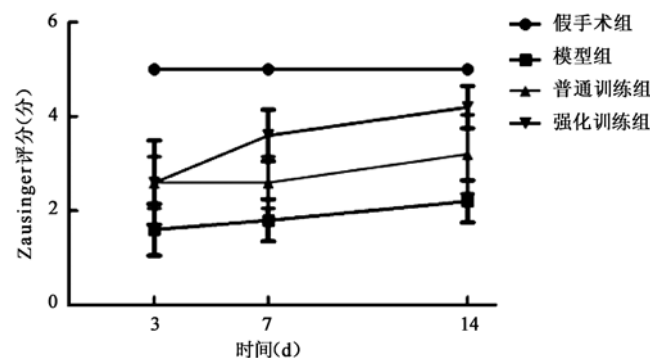


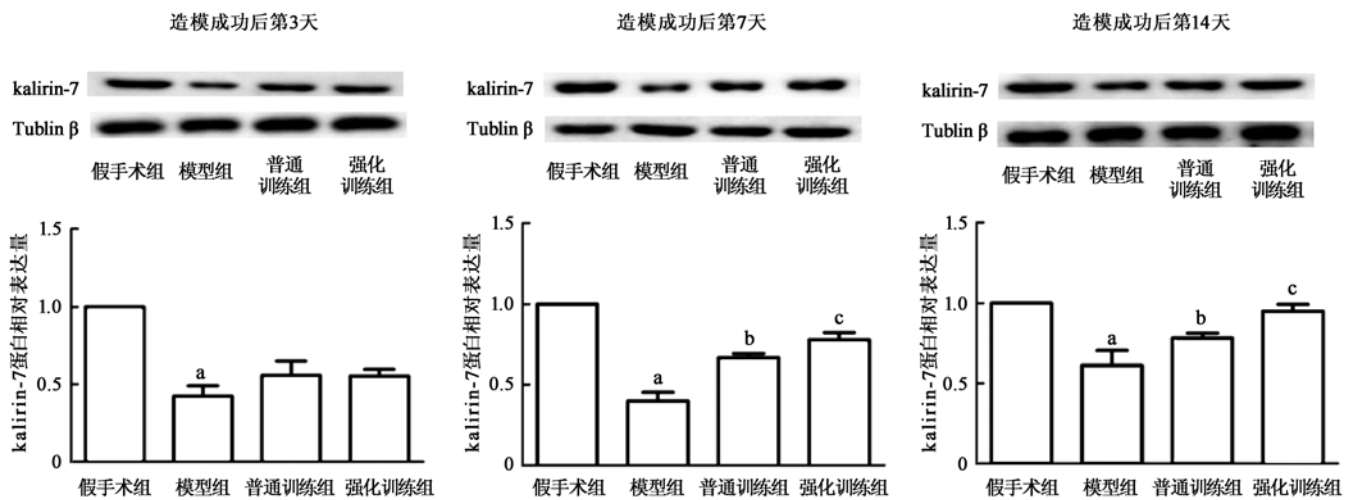
图 1 4 组大鼠 Zausinger 评分比较

二、梗死灶及其周围皮质 kalirin-7 蛋白表达量

3 组大鼠造模后各时间点的梗死灶及其周围皮质 kalirin-7 蛋白表达量均低于假手术组同时间点, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。造模成功后第 3 天, 普通训练组和强化训练组的梗死灶及其周围皮质 kalirin-7 蛋白表达量与模型组同时间点比较, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$); 造模成功后第 7、14 天, 普通训练组和强化训练组的梗死灶及其周围皮质 kalirin-7 蛋白表达量明显高于模型组同时间点 ($P < 0.05$), 且强化训练组的梗死灶及其周围皮质 kalirin-7 蛋白表达量亦高于普通训练组同时间点 ($P < 0.05$), 详见图 2。

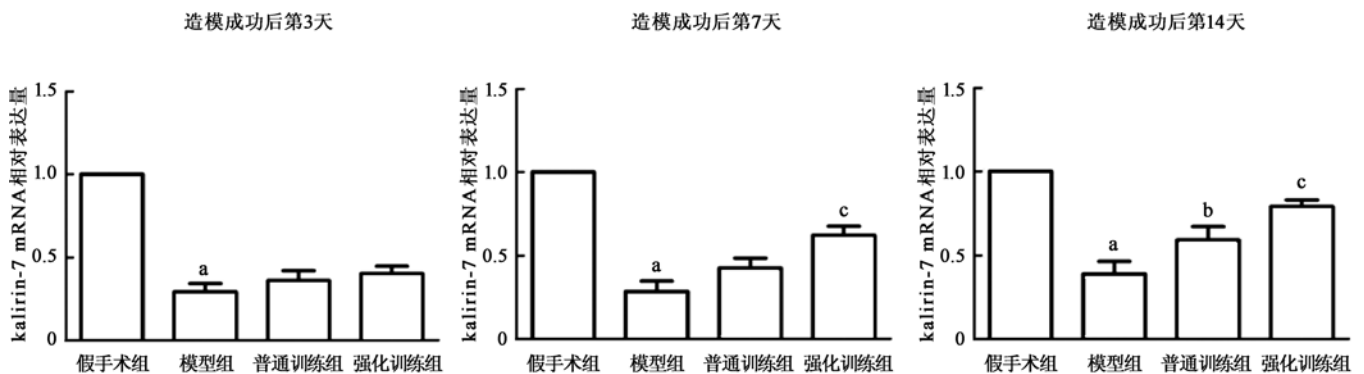
三、梗死灶及其周围皮质 kalirin-7 mRNA 表达量

3 组大鼠造模后各时间点的梗死灶及其周围皮质 kalirin-7 mRNA 表达量均低于假手术组同时间点, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。造模成功后第 3 天, 普通训练组和强化训练组的梗死灶及其周围皮质 kalirin-7 mRNA 表达量与模型组同时间点比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 造模成功后第 7 天, 强化训练组 kalirin-7 mRNA 表达量明显高于模型组和普通训练组同时间点, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$); 造模成功后第 14 天, 普通训练组和强化训练组的梗死灶及其周围皮质 kalirin-7 mRNA 表达量均高于模型组同时间点 ($P < 0.05$), 且强化训练组的梗死灶及其周围皮质 kalirin-7 mRNA 表达量亦高于普通训练组同时间点, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 详见图 3。



与假手术组同时时间点比较,^a $P < 0.01$;与模型组同时时间点比较,^b $P < 0.05$;与普通训练组同时时间点比较,^c $P < 0.05$

图2 4组大鼠不同时间点梗死灶及其周围皮质 kalirin-7 蛋白相对表达量比较



注:与假手术组同时时间点比较,^a $P < 0.01$;与模型组同时时间点比较,^b $P < 0.05$;与普通训练组同时时间点比较,^c $P < 0.05$

图3 4组大鼠不同时间点梗死区及其周围皮质 kalirin-7 mRNA 相对表达量比较

讨 论

本研究结果显示,普通训练组和强化训练组的神经功能评分均高于模型组同时时间点,表明跑台训练可以促进神经功能的恢复;造模成功后第7、14天,强化训练组神经功能评分均高于普通训练组,即强化运动训练对神经功能恢复的效果优于普通运动训练。此实验结果从行为学上证实了运动训练能够促进受损神经功能恢复,且强化训练的效果更好。许多研究均证实,运动训练可促进脑缺血梗死后受损神经功能的恢复^[7-9]。kwakkel等^[17]通过 meta 分析发现,强化运动训练可改善卒中后偏瘫患者的步行功能和日常生活活动能力。王佩佩等^[18]的研究表明,强化运动训练可促进脑缺血再灌注大鼠的神经修复和功能重组。而有研究却发现^[4,19],强化运动训练对脑卒中偏瘫患者上肢功能的疗效与普通运动训练比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

本实验结果还显示,造模成功后第7、14天,强化

训练组的梗死灶及其周围皮质 kalirin-7 表达量明显高于模型组和普通训练组同时时间点,提示强化运动训练可更为显著地促进大鼠脑梗死灶及其周围皮质中突触和突触分支的形成,从而促进神经功能的恢复。损伤后的中枢神经系统具有结构和功能上的重组能力,即中枢神经系统具有高度的可塑性(neuroplasticity)^[20]。在大脑重塑过程中,以突触重塑尤其关键,突触结构的完整性是神经元发挥正常功能的物质基础^[21]。有研究指出,Kalirin 含有两个 Dbl 家族鸟苷酸交换因子结构域,可激活与神经可塑性密切相关的因子^[14],抑制突触的发生^[22],且当其过度表达时还可诱导海马中间神经元树突及胞体棘状结构的形成^[23]。另外,Kalirin 还能抑制一氧化氮合酶活性,避免因中枢神经系统炎症而产生过量一氧化氮,起到保护神经的作用^[24]。

综上所述,强化运动训练较普通运动训练,可更为显著地促进脑缺血再灌注大鼠神经功能的恢复,增加脑缺血再灌注损伤大鼠 kalirin-7 的表达。

参 考 文 献

- [1] Outermans JC, vanPeppen RP, Wittink H, et al. Effects of a high-intensity task-oriented training on gait performance early after stroke: a pilot study[J]. Clin Rehabil, 2010, 24(11): 979-987.
- [2] Langhorne P, Coupar F, Pollock A. Motor recovery after stroke: a systematic review[J]. Lancet Neurol, 2009, 8(8): 741-754.
- [3] 韩超,王强,綦明珠. 强化运动治疗对脑卒中偏瘫患者上肢功能恢复的影响[J]. 中华物理医学与康复杂志, 2011, 33(5): 377-379.
- [4] Rodgers H, Mackintosh J, Price C, et al. Does an early increased-intensive interdisciplinary upper limb therapy programme following acute stroke improve outcome[J]. Clin Rehabil, 2003, 17(6): 579-589.
- [5] Gert K. Impact of intensity of practice after stroke: Issues for consideration[J]. Disabil Rehabil, 2006, 28(13-14): 823-830.
- [6] Stroemer RP, Kent TA, Hulsebosch CE. Neocortical neural sprouting, synaptogenesis, and behavioral recovery after neocortical infarction in rats [J]. Stroke, 1995, 26(11): 2135-2144.
- [7] Chae CH, Jung SL, An SH, et al. Treadmill exercise improves cognitive function and facilitates nerve growth factor signaling by activating mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase1/2 in the streptozotocin-induced diabetic rat hippocampus [J]. Neuroscience, 2009, 164(4): 1665-1673.
- [8] Chae CH, Kim HT. Forced, moderate-intensity treadmill exercise suppresses apoptosis by increasing the level of NGF and stimulating phosphatidylinositol 3-kinase signaling in the hippocampus of induced aging rats [J]. Neurochem Int, 2009, 55(4): 208-213.
- [9] Michelini LC, Stern JE. Exercise-induced neuronal plasticity in central autonomic networks: role in cardiovascular control [J]. Exp Physiol, 2009, 94(9): 947-960.
- [10] Johnson RC, Penzes P, Betty A, et al. Isoforms of kalirin, a neuronal Dbl family member, generated through use of different 5'- and 3'-ends along with an internal translational initiation site [J]. J Biol Chem, 2000, 275(25): 19324-19333.
- [11] Penzes P, Johnson RC, Alam MR, et al. An isoform of kalirin, a brain-specific GDP/GTP exchange factor, is enriched in the postsynaptic density fraction [J]. J Biol Chem, 2000, 275(9): 6395-6403.
- [12] McPherson CE, Eipper BA, Mains RE. Genomic organization and differential expression of Kalirin isoforms [J]. Genes, 2002, 284(1-2): 41-51.
- [13] Hansel DE, Quinones ME, Ronnett GV, et al. Kalirin, a GDP/GTP exchange factor of the Dbl family, is localized to nerve, muscle, and endocrine tissue during embryonic rat development [J]. J Histochem Cytochem, 2001, 49(7): 833-844.
- [14] Schiller MR, Blangy A, Huang J, et al. Induction of lamellipodia by Kalirin does not require its guanine nucleotide exchange factor activity [J]. Exp Cell Res, 2005, 307(2): 402-417.
- [15] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91.
- [16] Zausinger S, Hungerhuber E, Baethmann A, et al. Neurological impairment in rats after transient middle cerebral artery occlusion: a comparative study under various treatment paradigms [J]. Brain Res, 2000, 863(1-2): 94-105.
- [17] Kwakkel G, van Peppen R, Wagenaar RC, et al. Effects of augmented exercise therapy time after stroke: a meta-analysis [J]. Stroke, 2004, 35(11): 2529-2539.
- [18] 王佩佩,吴艺玲,王强. 不同游泳训练强度对脑缺血再灌注大鼠胶质纤维酸性蛋白及碱性成纤维细胞生长因子表达的影响 [J]. 中华物理医学与康复杂志, 2012, 34(5): 334-339.
- [19] Lincoln NB, Parry RH, Vass CD. Randomized controlled trial to evaluate increased intensity of physiotherapy treatment of arm function after stroke[J]. Stroke, 1999, 30(3): 573-579.
- [20] Kawahira K, Shimodono M, Ogata A, et al. Addition of intense repetition of facilitation exercise to multidisciplinary rehabilitation promotes motor functional recovery of the hemiplegic lower limb [J]. J Rehabil Med, 2004, 36(4): 159-164.
- [21] Klintsova AY, Greenough WT. Synaptic plasticity in cortical systems [J]. Curr Opin Neurobiol, 1999, 9(2): 203-208.
- [22] Xie Z, Srivastava DP, Photowala H, et al. Kalirin-7 controls activity-dependent structural and functional plasticity of dendritic spines [J]. Neuron, 2007, 56(4): 640-656.
- [23] Ma XM, Wang Y, Ferraro F, et al. Kalirin-7 is an essential component of both shaft and spine excitatory synapses in hippocampal interneurons [J]. J Neurosci, 2008, 28(3): 711-724.
- [24] Ratovitski EA, Alam MR, Quick RA, et al. Kalirin inhibition of inducible nitric-oxide synthase [J]. J Biol Chem, 1999, 274(2): 993-999.

(修回日期:2015-04-21)

(本文编辑:阮仕衡)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

本刊对医学名词使用的要求

为规范医学名词,本刊以 1989 年及其以后由全国科学技术名词审定委员会(原全国自然科学名词审定委员会)审定、公布、科学出版社出版的《医学名词》和相关学科的名词为准,暂未公布的名词仍以人民卫生出版社出版的《英汉医学词汇》为准。中文药物名称应使用最新版药典(法定药物)或卫生部药典委员会编辑的《药名词汇》(非法定药物)中的名称,英文药物名称采用国际非专利药名,不用商品名。