

· 基础研究 ·

康复训练对脑出血大鼠神经细胞再生的影响

刘珍 武衡 谢明

【摘要】目的 探讨康复训练对大鼠脑出血后神经细胞再生的影响。**方法** 将 75 只 SD 大鼠分为康复组、制动组和假手术组,每组 25 只。康复组和制动组应用胶原酶Ⅶ注射入苍白球诱导脑出血模型,假手术组用生理盐水替代胶原酶。康复组每天予以抓握、平衡、旋转等训练,制动组置于网状笼内固定。各组分脑出血后第 1,4,7,14,28 天共 5 个时间点,每个时间点 5 只。对不同组大鼠进行神经功能评分,用 5-溴脱氧尿核苷(BrdU)标记 S 期增殖细胞;BrdU 免疫组化单标、BrdU/微管相关蛋白(MAP)和 BrdU/神经元特异性核蛋白(NeuN)免疫荧光双标法检测大鼠侧脑室下区(SVZ)和齿状回颗粒下区(SGZ)细胞的增殖、迁移与分化。**结果** 康复组神经功能评分明显低于制动组($P < 0.05$);制动组大鼠 SVZ 的 BrdU⁺细胞在各时间点上少于康复组大鼠;脑出血后第 7 天,康复组 SVZ 区 BrdU⁺细胞表达显著增加且高于制动组($P < 0.05$),14 d 时 SVZ 区 BrdU⁺细胞表达减少,同时在出血侧纹状体发现 BrdU⁺/MAP⁺细胞,是制动组的 1.8 倍($P < 0.05$);脑出血后第 28 天,康复组出血侧纹状体神经元分化比率是制动组的 2.3 倍($P < 0.05$)。**结论** 康复训练可促进脑出血后神经细胞再生。

【关键词】 康复训练; 脑出血; 5-溴脱氧尿核苷; 微管相关蛋白; 神经元特异性核蛋白

Effects of rehabilitation on the regeneration of nerve cells after experimental cerebral hemorrhage in rats

LIU Zhen, WU Heng, XIE Ming. Department of Neurology, The First Hospital of University of South China, Hengyang 421001, China

Corresponding author: WU Heng, Email: wh720108@sina.com; XIE Ming, Email: xieming1212@sohu.com

【Abstract】Objective To study the effects of rehabilitation training on the regeneration of nerve cells in rats after intracerebral hemorrhage (ICH). **Methods** A total of 75 male SD rats were randomized into a training group, a control group and a sham operated group, 25 rats/group. The ICH models were induced by stereotactical injection of collagenase type VII into the globus pallidus. The training group was trained with grasp, balancing and rotating exercise every day, the control group was restricted to their cages, and the sham operated group received normal saline injections. Each group was further subdivided into 1, 4, 7, 14 and 28 day subgroups. Neurological function was measured in each group. Bromodeoxyuridine (BrdU) was used to label S phase cells, immunohistochemical single and double staining with antibodies against BrdU, microtubul-associated protein (MAP) and neuronal nuclei (NeuN) were used to determine neuronal proliferation, migration and differentiation in the subventricular zone (SVZ) and subgranular zone (SGZ) in the training and control groups. **Results** The motor function scores of the animals in the rehabilitation group were significantly lower than those of the control group. Proliferative BrdU⁺ cells of the SVZ and SGZ in the control group rats were clearly less than those in the rehabilitation training rats at all time points. The results of the immunohistochemical double staining indicated that one week after ICH BrdU⁺/MAP⁺ cells in the SVZ had increased significantly in the training group compared to the control group, and then decreased two weeks later. At the same time, BrdU⁺/MAP cells were found in the striatal boundary on the hemorrhage side, in numbers up to 8 times that in the control group. In the rehabilitation group striatal neuron differentiation on the hemorrhage side was 2 to 3 times that in the control group. **Conclusion** Rehabilitative training can enhance nerve cell proliferation, regeneration and neuron migration after ICH.

【Key words】 Rehabilitation training; Cerebral hemorrhage; Bromodeoxyuridine; Microtubul-associated protein; Neuronal nuclei

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2011.010.003

基金项目:湖南省教育厅基金(06C702)

作者单位:421001 衡阳,南华大学附属第一医院神经内科

通信作者:武衡,Email:wh720108@sina.com;谢明,Email:xieming1212@sohu.com

脑出血患者的死亡率高,即使有幸存活下来,也约有 60%~80% 的患者遗留有不同程度的神经功能障碍。在临床上,对脑出血患者发病早期进行及时、有效的康复训练是提高其生活质量、减少残疾、最大

限度回归社会的一个重要措施。动物实验表明,功能活动对脑的可塑性具有重要的意义,康复训练可以抑制脑出血大鼠颅内血肿体积增大,促进细胞增殖,并最终改善大鼠脑出血后神经功能评分^[1]。本研究采用胶原酶诱导大鼠脑出血模型,并在大鼠脑出血后第 1 天开始对其进行康复训练,然后通过观察不同时间点神经功能缺损评分变化、神经细胞增殖及分化等指标,探讨康复训练对大鼠脑出血后神经细胞再生的影响。

材料与方法

一、实验动物与试剂

1. 动物:SD 雄性大鼠(由南华大学实验动物中心提供)75 只,体重 250~300 g。

2. 试剂:Ⅶ型胶原酶,5-溴脱氧尿核苷(bromo-deoxyuridine, BrdU)原料试剂(sigma),多克隆羊抗 BrdU(abcam),单克隆鼠抗神经元特异性核蛋白(neuronal nuclei, NeuN)(北京中衫金桥),多克隆兔抗微管相关蛋白(doublecortin, DCX),即用型试剂盒,荧光二抗,均购于博奥森公司。

二、分组及动物模型建立

1. 分组:将 75 只大鼠分为康复组、制动组和假手术组,每组 25 只,每组又分为脑出血后第 1, 4, 7, 14, 28 天 5 个时间点,每个时间点 5 只。

2. 动物模型建立^[2]:康复组和制动组大鼠用 10% 水合氯醛(300 mg/kg 体重)腹腔注射麻醉,固定在鼠脑立体定位仪上,切开头部正中皮肤,分离骨膜,暴露颅骨。以前囟为原点,向后 1.4 mm,向右 3.2 mm,在颅骨表面钻一小孔,微量进样器进入颅内 5.6 mm,将 2 μ l 无菌生理盐水稀释的Ⅶ型胶原酶(含Ⅶ型胶原酶 0.4 U)缓慢注入苍白球内,留针 5 min。Bederson 评分^[3]为 1~3 分为建模成功。假手术组用生理盐水代替Ⅶ型胶原酶,过程同前。

三、康复训练方法

1. 康复组:大鼠脑出血后第 1 天开始进行运动功能训练。①滚筒训练,采用自制滚筒式网状训练器材训练,训练器长 100.0 cm,直径 60.0 cm,中间分成 2 格,同时训练 2 只老鼠,底座有一固定架,一端有一手摇柄,5 转/min,10 min/次,2 次/d。②转棒训练,转棒一根,长 150.0 cm,直径 4.5 cm;中点固定于 3 转/min 转动器上顺、逆时针交替转动,10 min/次,2 次/d。③平衡木训练,平衡木长 170.0 cm,宽 2.0 cm,下有支架 7.0 cm 高,平放于地面让老鼠在上面爬行;10 min/次,2 次/d。

2. 制动组:置于长 40 cm,直径 6 cm 的网状笼内固定,在头端有一容器给予食物和水,四肢和身体处

于固定状态。

3. 假手术组:正常饲养,自由饮水,在笼内自由活动。

四、动物行为学评分

所有大鼠脑出血后第 1, 4, 7, 14, 28 天分别进行 Bederson 评分:0 分——无任何神经功能缺失;1 分——提尾倒立时损伤对侧前肢屈曲;2 分——在提尾倒立时前肢屈曲基础上,损伤对侧肢体对外侧推力的抵抗力下降;3 分——体征如 2 分,伴行走时明显向对侧转圈。

五、BrdU 标记

所有动物在处死前 1 d 腹腔注射 BrdU (50 mg/kg 体重),每 2 h 1 次,共 4 次,最后 1 次注射后 24 h 处死。

六、组织切片制备

大鼠经腹腔以 10% 水合氯醛(300 mg/kg 体重)深度麻醉后,剑突下横切口,依此剪开胸部皮肤和肋骨,暴露心脏,在心尖左缘,以 45~60°向上进针,插入升主动脉(同时钳夹腹主动脉),迅速灌入 37℃ 生理盐水 100 ml,再用 4% 多聚甲醛 250 ml 灌入,先在 5 min 内灌入约 100 ml,余液在 25 min 内灌完。取含嗅球的全脑、去小脑,放入 4% 多聚甲醛 4℃ 后固定 1 h。继以 10%~20%~30% 蔗糖溶液(0.1 MPB PH7.4 4℃)至沉底。入恒冷切片机行连续冠状切片,片厚 30 μ m,按每隔 3 片取 1 片的原则收集脑组织切片裱于用明胶处理后的载玻片上,风干后置于玻片盒中冻存于 -70℃ 冰箱中备用。

七、免疫组化染色

按试剂盒使用说明书进行免疫组化染色。

八、免疫荧光双标记法

将培养的脑片放入 2 mol/L HCL 中 30 min (37℃),0.1 mol/L 硼酸液中和 10 min,浸入含 0.03% Triton X-100 的 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲生理盐水 30 min 后,每种一抗在 4℃ 下培养 24 h 以进行免疫荧光双重染色。1:100 的二抗与切片一起在室温下孵育 2 h,通过激光共聚焦显微镜(Zeiss LSM510)观察。

九、统计学分析

实验数据均用($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 13.0 版软件进行统计分析。组间比较采用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、大鼠神经功能缺损评分

脑出血后第 1 天康复组和制动组功能缺损评分比较差异无统计学意义($P > 0.05$),康复组和制动组

在脑出血后第 4 天和第 7 天,功能缺损评分比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。之后康复组和制动组的神经功能逐渐恢复,直至脑出血后第 28 天 2 组均完全恢复正常。虽然康复组比制动组有较好的恢复趋势,但第 28 天的比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

二、脑出血后 BrdU 免疫阳性细胞数目的变化

脑出血后第 1 天,康复组、制动组大鼠的 SVZ 区均可见 BrdU 阳性细胞,主要分布在侧脑室外侧,圆形或椭圆形胞核,大小不一。新生的神经前体细胞由 SVZ 向纹状体受损区呈链状延伸且少量 BrdU 阳性细胞出现在纹状体。脑出血后,康复组和制动组大鼠血肿侧 SVZ 区 BrdU 阳性细胞都明显增加,第 7 天时数量最多,之后渐渐减少,至第 28 天时仍比正常高。虽然康复组与制动组大鼠 BrdU 阳性细胞数量变化的规律是一样的,但在各时间点上康复组大鼠 BrdU 阳性细胞数均较制动组大鼠要多,脑出血后第 4、7、14 天康复组与制动组比较差异有统计学意义;2 组大鼠血肿对侧 SVZ 区也有 BrdU 阳性细胞增多,数量最多时也是出血后第 7 天;但 BrdU 阳性细胞数的增多明显少于各自血肿侧的相应时间组;而且康复组大鼠各时间组的 BrdU 阳性细胞也明显多于制动组大鼠。见表 2,图 1。

三、免疫荧光双标结果

脑出血后第 7 天,SVZ 和邻近区域可发现大量的 BrdU⁺/DCX⁺细胞,康复组 BrdU⁺/DCX⁺细胞数[(47 ± 7.6)个/mm²]是制动组[(26 ± 1.2)个/mm²]的 1.8 倍。在制动组,BrdU⁺聚集成团,核不规则,胞质中很少有 DCX 表达,表明大多数细胞经历凋亡过程;与之对照,康复组 BrdU⁺细胞核椭圆形,胞质中表达 DCX。脑出血后第 14 天,BrdU⁺细胞从 SVZ 迁移到受损纹状体区并广泛分布。因此,我们计算了出血侧纹状体边

缘的 BrdU⁺/DCX⁺细胞。在制动组大多数 BrdU⁺细胞没有 DCX 的表达,康复组 BrdU⁺/DCX⁺是制动组的 2.2 倍。见图 2 和图 3。脑出血后 28 d,康复组出血侧纹状体的 BrdU⁺/NeuN⁺阳性细胞[(7 ± 1.4)%]是制动组[(3 ± 1.2)%]的 2.3 倍,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 4、5。

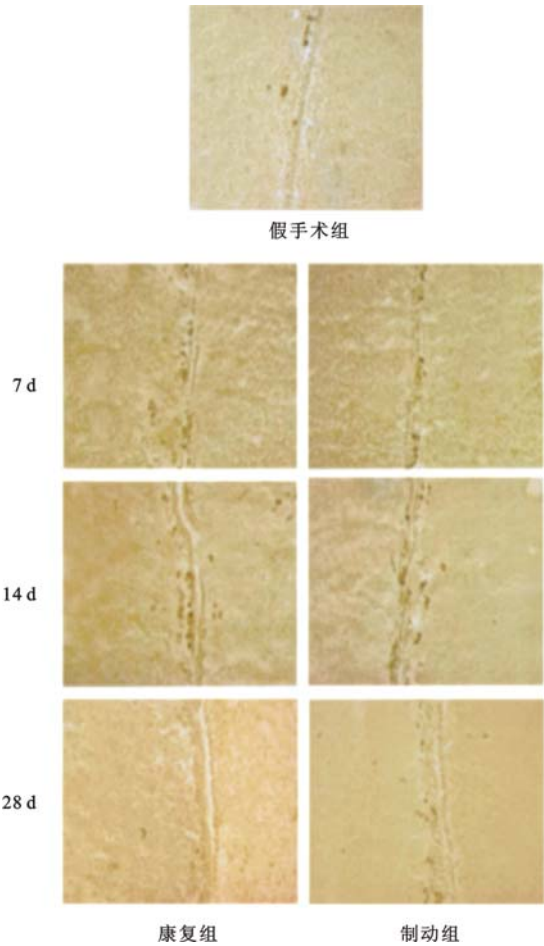


图 1 大鼠脑出血后 SVZ 区 BrdU 阳性细胞(免疫组化染色, ×100)

表 1 3 组大鼠 Bederson 神经功能缺损评分比较(分, $\bar{x} \pm s$)

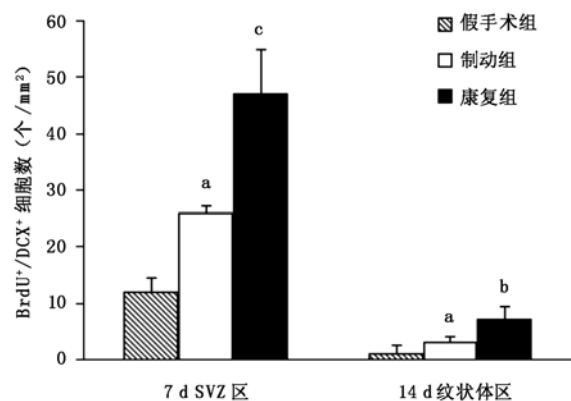
组 别	只数	脑出血后				
		第 1 天	第 4 天	第 7 天	第 14 天	第 28 天
假手术组	25	0	0	0	0	0
制动组	25	2.80 ± 0.45 ^b	2.60 ± 0.55 ^b	1.60 ± 0.55 ^{ab}	0.40 ± 0.55 ^{ab}	0 ^a
康复组	25	2.60 ± 0.65	1.40 ± 0.55 ^{ac}	0.40 ± 0.55 ^{ac}	0.20 ± 0.45 ^a	0 ^a

注:与组内 1 d 比较,^a $P < 0.05$;与假手术组比较,^b $P < 0.05$;与制动组同期比较,^c $P < 0.05$

表 2 3 组大鼠脑出血后出血侧 SVZ 区 BrdU⁺细胞数变化(个/mm², $\bar{x} \pm s$)

组 别	只数	脑出血后				
		第 1 天	第 4 天	第 7 天	第 14 天	第 28 天
假手术组	25	54.6 ± 7.5	56.7 ± 5.9	64.2 ± 6.3	57.3 ± 6.0	52.2 ± 5.7
制动组	25	102.2 ± 3.3 ^a	143.0 ± 5.4 ^b	257.6 ± 35.5 ^b	169.0 ± 39.3 ^b	124.5 ± 14.1 ^b
康复组	25	104.2 ± 4.3	321.0 ± 35.0 ^c	627.0 ± 25.9 ^c	293.3 ± 32.1 ^c	178.0 ± 14.4

注:与假手术组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$;与制动组比较,^c $P < 0.01$



注:与假手术组比较,^a $P < 0.05$;与制动组比较,^b $P < 0.05$;与制动组比较,^c $P < 0.01$

图2 大鼠脑出血后 7 d SVZ 区和 14 d 纹状体区 BrdU⁺/DCX⁺ 细胞柱形图

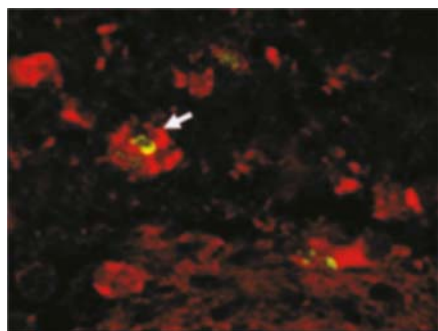
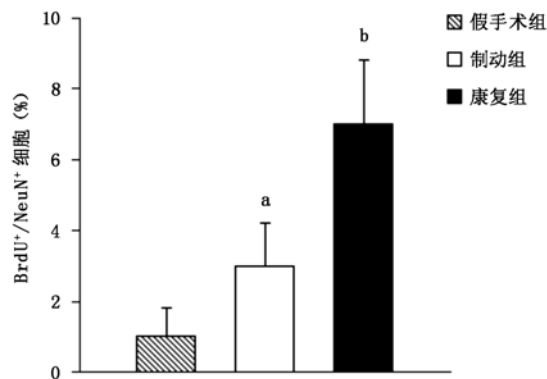


图3 脑出血后 14 d,应用免疫荧光双重染色法检测康复组出血侧 SVZ 区 BrdU⁺/DCX⁺ 细胞(绿色为 BrdU 染色,红色为 DCX 染色,×400)



注:与假手术组比较,^a $P < 0.05$;与制动组比较,^b $P < 0.05$

图4 大鼠脑出血后 28 d 纹状体区 BrdU⁺/NeuN⁺ 细胞

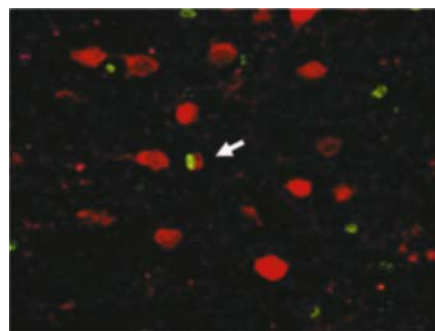


图5 脑出血后 28 d,应用免疫荧光双重染色法检测康复组纹状体区出血侧 BrdU⁺/NeuN⁺ 细胞(绿色为 BrdU 染色,红色为 NeuN 染色,×200)

讨 论

脑出血后会导致大量神经细胞死亡而出现神经功能的缺失。神经再生是指脑内 SVZ/SGZ 等区域的神经干细胞(neural stem cells, NSCs)在适当条件下增殖、分化成神经元和胶质细胞,并迁移到脑损伤区而参与神经功能修复的过程。

BrdU 是目前检测细胞增殖的较理想方法^[4]。DCX 是一种微管结合蛋白,主要在神经元前体细胞迁移过程中表达,是迁移的未成熟神经元或神经元前体细胞的标记物^[5]。NeuN 是一种核周的神经元特异性蛋白,作为一种稳定而敏感的成熟神经元的特异抗原。本研究结果表明,脑出血后,康复组和制动组大鼠血肿侧 SVZ 区 BrdU 阳性细胞都明显增加,与假手术组比较差异有统计学意义,脑出血后第 4, 7, 14 天康复组与制动组比较差异有统计学意义。由此,可以推测,脑出血损伤能激活成年大鼠内源性 NSCs,与以往对局灶性脑缺血损伤的研究结果相似^[6],而康复训练可以促进脑出血大鼠脑内内源性 NSCs 的增殖。但是从理论上来说,仅仅有 NSCs 的增殖并不能解决脑出血后神经功能

恢复的根本问题,因为这种增殖的 NSCs 是否能向病灶区迁移且定向分化为成熟的有功能的神经元,并能与宿主神经细胞整合成完整的神经网络,是关键中的关键。也解释了为什么脑出血损伤后虽然都发现自发的 NSCs 的增殖、分化,但仍存在因脑神经元缺失而出现的不同程度神经功能障碍的表现^[7]。为此,我们研究了康复训练对脑出血后 NSCs 分化方向的影响。我们应用 BrdU/DCX 双标法来标记新生成的迁移的未成熟神经元^[8-9]。发现脑出血后第 14 天,SVZ 区 BrdU 阳性细胞减少,此时在纹状体出现 BrdU⁺/DCX⁺ 阳性细胞,且康复组 BrdU⁺/DCX⁺ 阳性细胞高于制动组,表明脑出血后即开始在 SVZ 增殖的 NSCs 于脑出血后第 14 天已经向脑出血损伤的纹状体部位迁移,且在脑损伤部位向神经元分化,并占 BrdU⁺ 阳性细胞的很大部分比例,表明有相当部分 BrdU⁺ 阳性细胞分化成了神经元。我们还推测,这种迁移而来的 BrdU⁺/DCX⁺ 阳性细胞多来源于 SVZ 区^[10-12]。以上结果表明,脑出血后再生的神经元来源于 SVZ 增殖的 NSCs,而康复训练可促进 SVZ 增殖的 NSCs 向脑损伤区迁移并分化为未成熟的神经元。

最后,这些迁移分化而来的未成熟的神经元是否可以最终成为成熟的有功能的神经元呢?在本实验中,我们应用 BrdU/NeuU 双标法来标记新生成的成熟神经元。研究发现:脑出血后第 28 天康复组纹状体 BrdU⁺/DCX⁺ 细胞减少, BrdU⁺/NeuU⁺ 阳性细胞明显增多,与制动组与假手术组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),表明出血后从 SVZ 迁移分化的未成熟神经元(BrdU⁺/DCX⁺ 细胞),在出血晚期(28 d)已分化为成熟的神经元(BrdU⁺/NeuU⁺ 细胞),康复训练可促进这一过程,当然,这些新生的成熟神经元是否可以与宿主细胞整合,形成有功能的突触联系,构建完整的神经网络,尚需进一步验证,也是下一步研究的重点与难点。

本研究表明,脑出血后存在神经再生,康复训练可促进神经再生,并促进新生神经细胞向脑出血受损区域迁移、分化为未成熟神经元,进而分化为成熟神经元。本研究也进一步解释了临床康复训练的作用机制问题。按照大鼠-食肉动物-灵长类-人的顺序,皮质脊髓束逐渐变大,进而控制了红核脊髓束。所以,实验中选择性损毁一条运动通路时,其功能可由另一条运动通路代偿,在人类,损伤皮质脊髓束也不可避免地损伤红核脊髓束,这就说明了脑卒中患者为什么恢复缓慢而不完全,但大鼠的恢复明显快于人类^[13]。

参 考 文 献

- [1] Park JW, Bang MS, Kwon BS, et al. Early treadmill training promotes motor function after hemorrhagic stroke in rats. *Neurosci Lett*, 2010, 471:104-108.
- [2] 李花先, 黎杏群, 梁清华, 等. 采用 VII 型胶原酶建立出血性中风中经络大鼠模型. *湖南中医学院学报*, 2004, 24:1-3.
- [3] Machado LS, Sazonova IY, Kozak A, et al. Minocycline and tissue-type plasminogen activator for stroke: assessment of interaction potential. *Stroke*, 2009, 40:3028-3033.
- [4] Yu F, Keinan A, Chen H, et al. Detecting natural selection by empirical comparison to random regions of the genome. *Hum Mol Genet*, 2009, 18:4853-4867.
- [5] Zhang C, Chopp M, Cui Y, et al. Cerebrolysin enhances neurogenesis in the ischemic brain and improves functional outcome after stroke. *J Neurosci Res*, 2010, 88:3275-3281.
- [6] Ninomiya M, Yamashita T, Araki N, et al. Enhanced neurogenesis in the ischemic striatum following EGF-induced expansion of transit-amplifying cells in the subventricular zone. *Neurosci Lett*, 2006, 403:63-67.
- [7] Miller RH. The promise of stem cells for neural repair. *Brain Res*, 2006, 1091:258-264.
- [8] Jin J, Kang HM, Park C. Voluntary exercise enhances survival and migration of neural progenitor cells after intracerebral haemorrhage in mice. *Brain Inj*, 2010, 24:533-540.
- [9] Kadam SD, Mulholland JD, McDonald JW, et al. Poststroke subgranular and rostral subventricular zone proliferation in a mouse model of neonatal stroke. *J Neurosci Res*, 2009, 87:2653-2666.
- [10] Hooshmand MJ, Sontag CJ, Uchida N, et al. Analysis of host-mediated repair mechanisms after human CNS-stem cell transplantation for spinal cord injury: correlation of engraftment with recovery. *PLoS One*, 2009, 4:e5871.
- [11] Young T, Deschamps J. Hox, Cdx, and anteroposterior patterning in the mouse embryo. *Curr Top Dev Biol*, 2009, 88:235-255.
- [12] Zhang Z, Yang R, Cai W, et al. Treatment with progesterone after focal cerebral ischemia suppresses proliferation of progenitor cells but enhances survival of newborn neurons in adult male mice. *Neuropharmacology*, 2010, 58:930-939.
- [13] 茹立强, 殷光甫, 王才源. 神经科学基础. 北京: 清华大学出版社, 2004:203.

(修回日期:2011-07-11)

(本文编辑:松 明)

· 消息 ·

《中华物理医学与康复杂志》2012 年征订启事

《中华物理医学与康复杂志》是中华医学会主办的物理医学与康复(康复医学)专业的高水平学术期刊,本刊为月刊,大 16 开,内芯 80 页码,中国标准刊号:ISSN 0254-1424 CN 42-1666/R,邮发代号:38-391,每月 25 日出版;每册定价 15 元,全年 180 元整。热忱欢迎国内外物理治疗、物理医学与康复、康复医学领域以及神经内科、神经外科、骨科等相关科室的各级医务工作者踊跃订阅、投稿。订购办法:①邮局订阅:按照邮发代号 38-391,到全国各地邮局办理订阅手续。②直接订阅:通过邮局汇款至本刊编辑部订购,各类订户汇款时务请注明所需的杂志名称及年、卷、期、册数等。

编辑部地址:430030 武汉市解放大道 1095 号同济医院内《中华物理医学与康复杂志》编辑部;电话:(027)83662874;传真:(027)83663264;E-mail:cjpmr@tjh.tjmu.edu.cn;杂志投稿网址:www.cjpmr.cn。