

· 基础研究 ·

康复训练对脑缺血大鼠脑皮质突触超微结构的影响

王慧娟 钱金泽 张金平 李莉 李航 赵春芳 李陈莉

【摘要】目的 观察康复训练对脑缺血大鼠脑皮质突触密度及突触超微结构的影响。**方法** 采用随机数字表法将 60 只 SD 大鼠分为假手术组、脑缺血组及康复训练组。根据 Zea-longa 等介绍的方法加以改进将脑缺血组及康复训练组大鼠制成脑缺血模型,假手术组大鼠制模方法同前,但术中不阻断大脑中动脉血流。脑缺血组及假手术组大鼠于制模后均置于普通笼内饲养,期间自由活动、进食;康复训练组大鼠于制模后给予运动训练,包括平衡木、转棒及网屏训练等。各组大鼠于制模后第 1 天、第 7 天、第 14 天及第 21 天时透射电镜下观察其突触密度和突触超微结构变化情况。**结果** 假手术组大鼠脑皮质神经毡内突触数量较多,突触前后成分境界清楚、轮廓完整,突触前终末内突触小泡数量较多,分布密集而均匀、大小均等。脑缺血组大鼠随着缺血时间延长,其神经毡内突触数量逐渐减少,突触结构也发生异常改变,如突触前、后膜模糊不清,突触前终末内突触小泡数量减少、破裂甚至融合;到制模后第 21 天时,可见突触小泡显著减少甚至消失,突触前、后膜被破坏,突触典型结构已不存在。康复训练组从制模后第 7 天开始,其突触损伤程度均明显轻于脑缺血组,可见该组大鼠神经毡内突触及突触小泡数量均显著多于脑缺血组。**结论** 脑缺血大鼠可见脑皮质内突触数量明显减少,突触结构也遭到一定程度破坏;康复训练有助于脑缺血大鼠神经突触恢复正常,从而加速其神经及运动功能恢复。

【关键词】 脑缺血; 康复训练; 突触超微结构; 大鼠

Effects of rehabilitation training on brain cortex synaptic ultrastructure after cerebral ischemia WANG Hui-juan, QIAN Jin-ze, ZHANG Jin-ping, LI Li, LI Hang, ZHAO Chun-fang, LI Chen-li. Department of Histology and Embryology, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China

【Abstract】 Objective To study the effects of rehabilitation training on the synaptic ultrastructure of the brain cortex after cerebral ischemia. **Methods** Sixty rats were randomly divided into a sham operation group, a cerebral ischemia group and a rehabilitation training group. A model of focal cerebral ischemia was created in the rats of the cerebral ischemia and rehabilitation training groups. The rehabilitation training group was given balancing, grasping, rotation and walking training every day. The sham operation group and cerebral ischemia group were kept in normal cages, taking food and moving freely. Electron microscopy was used to observe the density and ultrastructure of the cortical synapses at days 1, 7, 14 and 21 after the operation. **Results** In the sham operation group there were numerous synaptic terminals in the cortical neuropil. The majority of synapses were Gray type II, containing spherical synaptic vesicles in presynaptic elements. After cerebral ischemia, the number of synaptic terminals had decreased and the synaptic structure was damaged. The synaptic vesicles lessened and dissolved. The presynaptic and postsynaptic membranes became unclear. At 21d after ischemia, the synaptic vesicles had disappeared and the presynaptic and postsynaptic membranes were damaged so seriously that the typical synaptic structure disappeared. After rehabilitation training, the damaged synaptic terminals recovered. **Conclusions** The synaptic structure was damaged after cerebral ischemia, and the damaged synaptic terminals recovered after rehabilitation training. Rehabilitation training can enhance synaptogenesis in the brain's cortex after cerebral ischemia and promote the recovery of motor function, at least in rats.

【Key words】 Cerebral ischemia; Rehabilitation training; Synaptic ultrastructure; Rats

脑梗死是一类发病率、致残率和死亡率都很高的疾病。相关临床研究表明,康复干预对改善脑梗死患者感觉、运动及行为功能等均具有显著疗效^[1-3];但康复治疗是通过何种机制促进脑梗死后脑功能恢复,进

而改善患者感觉、运动及行为功能至今尚未完全明确。传统观念认为,神经元损伤后不能再生,但近年来相关研究显示,中枢神经损伤后神经元可以再生,突触具有重建可塑性^[4]。本研究通过对脑缺血大鼠模型给予康复训练,并观察康复训练对脑缺血大鼠脑皮质突触密度及突触超微结构的影响,从而探讨康复训练治疗脑梗死的相关机制,为临床康复治疗提供理论依据。现报道如下。

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2011.011.002

基金项目:河北省科技厅资助项目(072761660)

作者单位:050017 石家庄,河北医科大学组织学与胚胎学教研室

材料与方法

一、实验动物及分组

共选取健康 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 60 只, 雌雄各半, 体重 280 ~ 300 g, 由河北医科大学实验动物中心提供。采用随机数字表法将其分为假手术组、脑缺血组及康复训练组, 每组 20 只。

二、脑缺血动物模型制作

采用 Zea-Longa 等介绍的线栓法并加以改进^[5], 将脑缺血组及康复训练组大鼠制成脑缺血动物模型, 具体制模方法如下: 将实验大鼠仰卧位固定于手术台上, 采用 10% 水合氯醛按 4 ml/kg 体重进行腹腔注射麻醉, 颈部正中切开, 分离左侧颈总动脉、颈外动脉、颈内动脉, 结扎颈外动脉下端, 用动脉夹分别夹住颈外动脉、颈内动脉远端以暂时止血。在颈总动脉近颈内、颈外动脉分叉处剪一小口, 将预先制好的尼龙线 (长约 40 mm, 直径 0.2 mm, 尼龙线一端加热呈光滑球形) 插入颈内动脉, 结扎颈总动脉分叉插线处, 然后撤掉颈外动脉、颈内动脉动脉夹, 将尼龙线缓慢送至大脑前动脉, 尼龙线平均插入深度为 18 ~ 20 mm, 以阻断该侧大脑中动脉血流, 最后缝合颈部切口^[5]。制模成功标志为: 大鼠左眼虹膜颜色变浅, 脑缺血 1.5 ~ 2.0 h 后大鼠出现左侧 Horner's 综合征, 左侧眼裂变小、瞳孔缩小, 出现右侧偏瘫, 以右前肢功能障碍较显著, 提尾悬拉时出现右前肢蜷缩、屈曲或被动性过度伸展, 同时出现向右侧转圈、跌倒等^[5]。制模过程中剔除不合格或死亡大鼠, 随时补充模型大鼠以保证每组 20 只。假手术组大鼠手术方法同上, 但尼龙线插入深度 < 10 mm, 未阻断大脑中动脉血流。

三、术后康复干预

康复训练组大鼠于制模后给予康复训练, 包括: ①平衡木训练, 选用 170 cm 长、2 cm 宽方木棒, 将其平放于距地面 7 cm 高处, 让大鼠在平衡木上爬行; ②转棒训练, 取 150 cm 长、直径 4.5 cm 木棒, 将其中点固定在转速为 10 r/min 转动器上, 分别按顺时针、逆时针交替转动; ③网屏训练, 网屏尺寸为 50 cm × 40 cm, 网眼大小为 1 cm × 1 cm, 网屏距地面高度为 80 cm, 下方铺 12 cm 厚海绵, 先将网屏水平放置, 将大鼠置于其上, 然后将网屏一端缓慢抬高, 于 2 s 内将网屏变成垂直位并保持 5 s, 观察大鼠是否会从网屏上掉下^[5]。上述训练每天持续 30 min, 每周训练 5 d。假手术组及脑缺血组大鼠术后均置于普通笼内饲养, 期间可自由活动、进食, 未给予特殊处理。

四、大鼠神经及运动功能评定

于制模后第 1 天、第 7 天、第 14 天及第 21 天时各组分分别取 5 只大鼠进行神经、运动功能评定, 各组大鼠

神经及运动功能综合评分 = (神经功能评分 + 平衡木训练评分 + 转棒训练评分 + 网屏训练评分) / 4, 具体操作步骤如下。

1. 神经功能评分: 未发现大鼠行为缺陷为 0 级, 计 0 分; 大鼠前肢屈曲为 1 级, 计 1 分; 侧推时大鼠抵抗力下降, 伴前肢屈曲, 无转圈行为为 2 级, 计 2 分; 侧推时抵抗力下降, 伴前肢屈曲和自发性旋转为 3 级, 计 3 分^[5]。

2. 运动功能评分: ①平衡木训练评分, 大鼠能跳上横木并在横木上爬行不摔下计 0 分; 大鼠能跳上横木并在上爬行, 横木上摔下机会 < 50% 计 1 分; 大鼠能跳上横木并在上爬行, 横木上摔下机会 > 50% 计 2 分; 大鼠在健侧后肢帮助下跳上横木, 但患侧后肢不能帮助其向前移动计 3 分; 大鼠在平衡木上不能爬行计 4 分; 将大鼠放在平衡木上即掉下计 5 分。②转棒训练评分, 大鼠能在转棒上爬行计 0 分; 转动过程中大鼠不会掉下, 且持续时间达 60 s 以上计 1 分; 转动开始后大鼠从转棒上掉下计 2 分; 转动开始前大鼠即从转棒上掉下计 3 分。③网屏训练评分, 将大鼠置于水平位网屏上, 然后将网屏一端缓慢抬高, 于 2 s 内将网屏变成垂直位并保持 5 s, 如大鼠前爪抓住网屏达 5 s 且不滑落计 0 分; 大鼠暂时抓住网屏滑落一段距离, 但未掉下计 1 分; 大鼠于 5 s 内掉下计 2 分; 网屏转动时大鼠即掉下计 3 分^[5]。

五、大鼠脑皮质突触超微结构观察

于上述时间点各组大鼠经神经、运动功能评定后处死, 选用透射电镜观察各组大鼠突触密度及超微结构变化情况。具体操作步骤如下: 首先用乙醚麻醉大鼠, 然后快速断头、开颅取大鼠顶叶皮质, 将所取脑组织切成 1 mm³ 小块, 浸入 2.5% 戊二醛磷酸缓冲液中固定 48 h, 经 1% 四氧化锇后固定 1 h; 然后采用 50%、70%、80%、90%、100% I、100% II 丙酮逐级脱水后包埋。选用 LKB-5 型超薄切片机切片, 厚度为 50 nm, 进行醋酸铀和柠檬酸铅双重染色。选用日立 H7500 型透射电子显微镜 (加速电压 80 kV) 观察各组大鼠突触结构损伤情况并摄片, 每个标本平均拍摄 10 张照片, 通过电镜照片 (×8000) 辨认并计数突触数量, 比较不同时间点各组大鼠神经毡内突触数量变化情况。

六、统计学分析

本研究所得计量数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 SPSS 13.0 版统计学软件包进行数据分析, 组间比较采用 *t* 检验, *P* < 0.05 表示差异具有统计学意义。

结 果

一、各组大鼠神经及运动功能综合评分比较
假手术组在制模后不同时间点其神经及运动功能

综合评分均无显著变化($P > 0.05$);随着实验进展,康复训练组、脑缺血组大鼠神经及运动功能综合评分均逐渐改善,其中康复训练组从制模后第 7 天开始,其神经及运动功能综合评分均显著优于脑缺血组($P < 0.05$),具体数据详见表 1。

表 1 制模后不同时间点各组大鼠神经及运动功能综合评分比较(分, $\bar{x} \pm s$)

组别	只数	制模后第 1 天	制模后第 7 天	制模后第 14 天	制模后第 21 天
假手术组	5	0.26 ± 0.33	0.30 ± 0.26	0.22 ± 0.15	0.29 ± 0.31
脑缺血组	5	3.37 ± 1.11 ^a	3.01 ± 1.54 ^a	2.31 ± 1.87 ^a	2.04 ± 1.06 ^a
康复训练组	5	3.40 ± 1.17 ^a	2.29 ± 1.03 ^{ab}	1.23 ± 0.98 ^{ab}	1.02 ± 0.43 ^{ab}

注:与假手术组同时段比较,^a $P < 0.05$;与脑缺血组同时段比较,^b $P < 0.05$

二、各组大鼠脑皮质突触数量比较

假手术组神经毡内突触数量较多,制模后不同时间点均无显著变化($P > 0.05$);脑缺血组随着时间延长,其神经毡内突触数量逐渐减少;康复训练组随着实验进展,其神经毡内突触数量虽然也在逐渐减少,但减少幅度相对较缓,从制模后第 7 天开始,其神经毡内突触数量均显著多于脑缺血组($P < 0.05$),具体数据详见表 2。

三、各组大鼠脑皮质突触超微结构比较

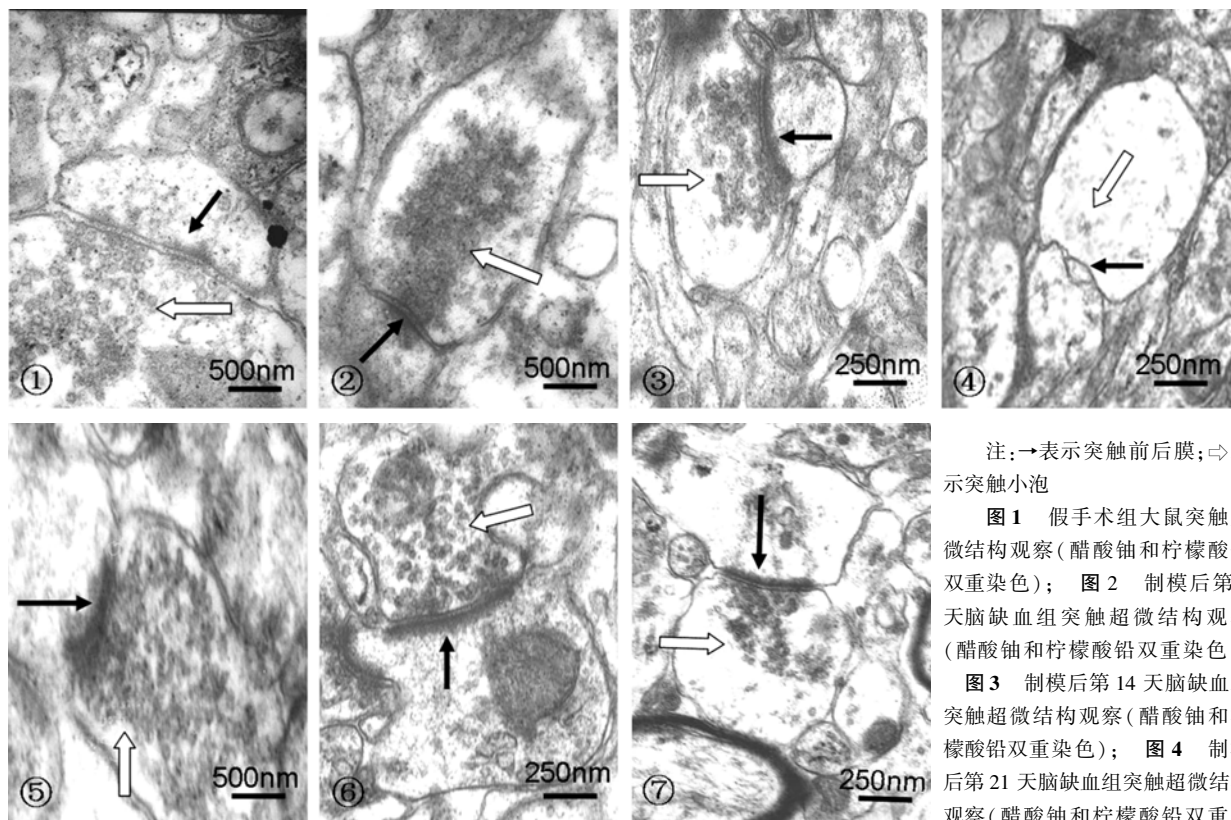
假手术组大鼠神经毡内可见大量突触,多为

表 2 各组大鼠脑皮质突触数量比较(个/每电镜视野, $\bar{x} \pm s$)

组别	只数	制模后第 1 天	制模后第 7 天	制模后第 14 天	制模后第 21 天
假手术组	20	20.36 ± 3.78	21.19 ± 4.01	20.92 ± 3.05	19.72 ± 3.21
脑缺血组	20	19.21 ± 2.79	12.69 ± 2.28 ^a	9.35 ± 3.26 ^a	5.54 ± 1.92 ^a
康复训练组	20	19.32 ± 1.73	16.12 ± 2.11 ^{ab}	13.53 ± 2.24 ^{ab}	10.87 ± 2.27 ^{ab}

注:与假手术组比较,^a $P < 0.05$;与脑缺血组比较,^b $P < 0.05$

GrayII 型,其突触前、后膜致密物质较少、厚度对称,突触前后成分境界清楚、轮廓完整;突触前终末内突触小泡数量较多,分布密集而均匀、大小均等,多为圆形清亮小泡(图 1)。脑缺血组随着缺血时间延长,其突触结构也发生相应改变,如制模后第 1 天时与假手术组无明显差异;制模后第 7 天时其突触前成分突触小泡分布不均,成聚集状态,突触前、后膜仍较清楚(图 2);制模后第 14 天时,可见突触前、后膜轮廓模糊不清,突触小泡数量明显减少(图 3);制模后第 21 天时,可见轴浆呈电子透明状,电子密度降低,呈空化状态,突触小泡数量明显减少、甚至消失,突触前、后膜被破坏,神经突触典型结构已不存在(图 4)。康复训练组突触结构在制模后第 1 天时与脑缺血组无明显差异,在制模后第 7、14 及 21 天时,发现该组大鼠脑皮质突触损伤程度均较相同时间点脑缺血组轻微,其突触小泡数量均显著多于脑缺血组,并且分布也相对均匀,具体情况详见图 5-7。



注:→表示突触前后膜;⇨表示突触小泡

色); 图 5 制模后第 7 天康复训练组突触超微结构观察(醋酸铀和柠檬酸铅双重染色); 图 6 制模后第 14 天康复训练组突触超微结构观察(醋酸铀和柠檬酸铅双重染色); 图 7 制模后第 21 天康复训练组突触超微结构观察(醋酸铀和柠檬酸铅双重染色)

讨 论

近年来大量基础及临床研究显示,康复训练可改善脑缺血动物模型及患者的功能预后,促其神经及运动功能恢复^[6-8]。本研究采用线栓法制作大鼠脑缺血动物模型,发现模型大鼠神经及运动功能均较假手术组显著降低,经康复训练后大鼠神经及运动功能均逐渐改善,其改善幅度显著优于脑缺血组,究其原因可能包括以下方面:模型大鼠肌肉及关节在运动过程中,可向中枢神经系统提供大量本体感觉冲动信息,促使病灶及周围尚未完全坏死的神经细胞兴奋性增加,从而有利于激活神经通路、加速脑功能重组。

目前,关于康复训练治疗脑缺血的作用机制尚未明确。大脑在重塑过程中,突触重塑具有关键作用,这也是本研究选择突触作为观察对象的重要原因之一。突触是神经元进行信息传递的特殊结构,并且对缺血敏感,突触的数量及其结构完整性对维持大脑功能正常发挥具有至关重要的作用^[9-11]。本研究结果发现,随着脑缺血时间延长,大鼠脑皮质神经毡内突触数量逐渐减少,突触结构也遭到明显破坏;而康复训练组于制模后给予平衡、抓握、旋转、爬行等运动训练,发现随着时间进展,其神经毡内突触数量虽然也有减少趋势,但下降幅度明显减缓,其神经毡内突触数量除制模后第 1 天变化不大外,其他各时间点均显著多于脑缺血组相应水平,并且康复训练组那些因缺血而受损的突触结构也逐渐恢复正常。上述结果与康复训练组神经及运动功能综合评分显著优于脑缺血组具有一致性,进一步表明机体功能恢复必然有其相应的形态学变化作为基础,提示突触重塑是康复训练促进缺血性脑梗死大鼠神经及运动功能恢复的重要生物学基础。

关于康复训练促进神经突触重塑的相关机制目前尚未明确。相关研究发现,康复训练可促使受损神经元轴突侧枝重新芽生,或是加速周围未受损神经轴突发芽,增加靶区投射密度,从而提供更多突触表面与靶细胞重建突触联系^[12-13];同时康复训练还可促进脑梗死灶边缘毛细血管扩张,诱导新生血管形成,促进脑梗死灶内肉芽组织增生及血管支架重建,对改善脑循环、促进细胞代谢均具有重要意义^[14-16];另外康复训练还可诱导脑缺血周边区多种神经营养因子(如神经生长因子、脑源性神经营养因子等)表达,这些因子不仅对神经元生存、分化、生长具有调控作用,而且在脑损伤时对神经细胞还具有保护作用,能促进神经细胞功能恢复^[17]。以上研究结果均可能是康复训练抑制突触进行性减少、促进突触结构恢复的相关机制之一。

综上所述,本研究结果表明,康复训练能加速缺血性脑梗死大鼠神经及运动功能恢复,同时还能促进大

鼠脑皮质突触在数量、结构及效能上发生适应性改变,建立新的突触联系,加速受损功能恢复;关于康复训练促进神经突触结构及功能恢复的确切机制,将是我们下一步研究的重点。

参 考 文 献

- [1] Langhammer B, Lindmark B, Stanghelle JK. Stroke patients and long-term training: is it worthwhile? A randomized comparison of two different training strategies after rehabilitation. Clin Rehabil, 2007, 21: 495-510.
- [2] Ploughman M, Attwood Z, White N, et al. Endurance exercise facilitates relearning of forelimb motor skill after focal ischemia. Eur J Neurosci, 2007, 25: 3453-3460.
- [3] Pyoria O, Talvitie U, Nyrkko H, et al. The effect of two physiotherapy approaches on physical and cognitive functions and independent coping at home in stroke rehabilitation. A preliminary follow up study. Disabil Rehabil, 2007, 29: 503-511.
- [4] Ernst E. A review of stroke rehabilitation and physiotherapy. Stroke, 1990, 21: 1081-1085.
- [5] 王慧娟, 李陈莉, 张金平, 等. 康复训练对脑缺血大鼠突触体素表达的影响. 中华物理医学与康复杂志, 2009, 31: 730-733.
- [6] 杨丽霞, 陈正红, 刘芳. 经颅电刺激加速康复训练对脑梗死大鼠功能恢复和生长相关蛋白-43 的影响. 中国康复理论与实践, 2010, 16: 1136-1139.
- [7] 胡永善, 白玉龙, 陈文华, 等. 规范三级康复治疗对缺血性脑卒中患者运动功能的影响. 中国康复医学杂志, 2007, 22: 605-608.
- [8] 徐丽丽, 白玉龙, 胡永善, 等. 运动训练改善脑缺血大鼠梗死体积与神经行为能力的实验研究. 中国康复医学杂志, 2008, 23: 100-102.
- [9] 万赛英, 谭峰, 吴海科. 电针干预高血压大鼠脑缺血凝血酶敏感蛋白-1mRN 的表达及超微结构的研究. 时珍国医国药, 2011, 22: 488-490.
- [10] Williams JA, Imamura M, Fregni F. Updates on the use of non-invasive brain stimulation in physical and rehabilitation medicine. Rehabil Med, 2009, 41: 305-311.
- [11] Hummel F, Celnik P, Giroux P, et al. Effects of non-invasive cortical stimulation on skilled motor function in chronic stroke. Brain, 2005, 128: 490-499.
- [12] Stroemer RP, Kent TA, Hulsebosch CE. Neocortical neural sprouting, synaptogenesis, and behavioral recovery after neocortical infarction in rats. Stroke, 1995, 26: 2135-2144.
- [13] Biernaskie J, Corbett D. Enriched rehabilitative training proved forelimb motor function and enhanced dendritic growth after focal ischemic injury. J Neurosci, 2001, 21: 5272-5280.
- [14] Black JE, Isaacs KR, Anderson BJ, et al. Learning causes synaptogenesis, whereas motor activity causes angiogenesis in cerebellar of adult rats. Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87: 5560-5572.
- [15] London NR, Whitehead KJ. Endogenous endothelial cell signaling systems maintain vascular stability. Angiogenesis, 2009, 27: 1-6.
- [16] Swain RA, Harris AB, Wiener EC, et al. Prolonged exercise induces angiogenesis and increases cerebral blood volume in primary motor cortex of the rat. Neuroscience, 2003, 117: 1037-1046.
- [17] Kleim JA, Jones TA, Schallert T. Motor enrichment and the induction of plasticity before or after brain injury. Neurochem Res, 2003, 28: 1757-1769.

(修回日期: 2011-07-16)

(本文编辑: 易 浩)