

· 基础研究 ·

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

王亚男 石秉霞 郭云良 裴海涛 纪晓军

【摘要】目的 研究运动训练对局部脑缺血再灌注大鼠的肢体功能恢复是否具有促进作用,并同时从分子角度探讨其相关机制。**方法** 将大鼠随机分为运动组、对照组、假手术组及正常对照组,采用线栓法制作 Wistar 大鼠大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)再灌注模型。运动组大鼠术后每天进行游泳训练,采用前肢放置实验及平衡实验观察各组大鼠肢体功能恢复情况,并同时采用免疫组化法观察脑缺血周边区微管相关蛋白-2(MAP-2)的免疫活性强度。**结果** 大鼠局部脑缺血再灌注后,运动组大鼠前肢放置实验评分及平衡实验评分均优于对照组,运动组大鼠前肢放置实验评分在术后第 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23 及 25 天时,较对照组差异均有极显著性意义(P 均 <0.01);平衡实验评分在第 7, 9, 11, 13, 17 及 19 天时较对照组差异均有显著性意义($P <0.01$ 或 0.05);运动组大鼠皮层缺血周边区 MAP-2 表达水平亦高于对照组,在术后第 14, 28 天时较对照组差异具有显著性意义(P 均 <0.05)。**结论** 运动训练能促进缺血再灌注大鼠的肢体功能恢复,其相关机制可能与上调缺血周边区 MAP-2 的表达有关。

【关键词】 脑缺血; 大鼠; 运动; 康复; MAP-2

Effects of exercise training on the functional recovery of extremities and the concentration of microtubule associated protein 2 in rats with focal cerebral ischemia-reperfusion WANG Ya-nan*, SHI Bing-xia, GUO Yun-liang, PEI Hai-tao, JI Xiao-jun. * Institute of Cerebrovascular Diseases, Medical College of Qingdao University, Qingdao 266003, China

【Abstract】 Objective To study if exercise training can promote the functional recovery of extremities in rats with focal cerebral ischemia-reperfusion, and explore the relevant mechanism with a molecular perspective. **Methods** Fifty-two rats were recruited in this study and randomly divided into 4 groups: an exercise group, a control group, a sham operation group and a healthy control group. The middle cerebral artery occlusion-reperfusion (MCAO-R) model was established by use of Zea-Longas method in rats. The rats of the exercise group were administered with swimming training daily after the operation. The sensorimotor functional recovery was evaluated by behavioral test involving the forelimb movement of the rat and the balance test. Meanwhile, immunoreaction activity of microtubule associated protein 2 (MAP 2) in the surrounding area of cerebral ischemia tissue in each group were measured by use of immunohistochemical method. **Results** After focal cerebral ischemia-reperfusion in rats, the scores of behavioral test and the balance test in the exercise group are higher than those in the control group. Significant difference was revealed between the scores of the behavioral test in two groups at 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25 days after operation ($P <0.01$), as well as those of the balance test in two groups at 7, 9, 11, 13, 17, 19 days ($P <0.01$). Concentration of MAP 2 in surrounding area of ischemic cerebral tissue in the exercise group was higher than that in the control group, significant difference was revealed at 14, 28 days after operations ($P <0.05$). **Conclusion** Exercise training may improve the functional recovery of extremities in rats with cerebral ischemia-reperfusion, and the mechanism was related to the upregulative expression of MAP-2 in the surrounding area of the ischemic brain tissue.

【Key words】 Cerebral ischemia; Rat; Exercise training; Rehabilitation; MAP-2

近年来已有大量的研究证实脑组织具有自我修复功能,促进神经组织再生已成为治疗脑缺血性损伤的重要手段之一。本研究旨在探讨早期运动训练对局部脑缺血再灌注后大鼠肢体功能恢复的影响,并采用免

疫组化法检测大鼠脑组织中神经元标志物微管相关蛋白-2(microtubule associated protein-2, MAP-2)免疫活性的变化,试图从中枢神经可塑性角度探索运动训练与功能恢复间的相关性。

基金项目:青岛市科技局资助课题(No. SG99-403),山东省卫生厅资助课题(No. JZ05)

作者单位:266003 青岛,青岛大学医学院附属医院急诊神经科(王亚男、裴海涛、纪晓军),脑血管病研究所(石秉霞、郭云良)

材料与方法

一、动物分组及模型制备

共选取成年 Wistar 大鼠 52 只,体重 200 ~ 250 g,

平均(223 ± 12) g, 雌雄不限, 鼠龄 2~3 个月, 平均 2.4 ± 0.2 个月, 室温(19 ± 2) $^{\circ}\text{C}$; 所有大鼠均于自然光照下饲养, 饲养期间大鼠自由摄食、饮水。将大鼠分为 4 组, 其中运动组 24 只; 对照组 24 只; 假手术组 2 只; 正常对照组 2 只。将运动组及对照组大鼠按每千克体重给予 400 mg 浓度为 8% 的水合氯醛腹腔注射麻醉, 采用 Longa 等^[1]介绍的颈外动脉线栓法制作左侧大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)再灌注模型, 自大鼠左侧颈外动脉处插入钝头尼龙线, 经颈总动脉分叉处及颈内动脉颅外段进入颈内动脉颅内段并到达大脑中动脉分支处, 用尼龙线阻塞大脑中动脉起始部约 120 min 后拔出尼龙线, 此时模型制备完成。假手术组大鼠在模型制备过程中, 除尼龙线不阻塞大脑中动脉外, 其余操作均与运动组及对照组相同。正常对照组的 2 只大鼠则不进行任何特殊处理。

二、实验方法

运动组大鼠于 MCAO 再灌注满 24 h 后即开始游泳训练, 将大鼠置于一水深 0.6 m、直径 0.8 m 的圆形容器内, 水温 29~31 $^{\circ}\text{C}$, 水面距离容器顶端约 0.3 m, 大鼠在游泳过程中不能触及容器顶端, 每天游泳 1 次, 第 1 次游 5 min, 以后每次增加 1 min, 直到增加至 10 min 为止, 游泳结束后用热风将大鼠皮毛烘干; 对照组大鼠于 MCAO 再灌注完成后不进行任何特殊处理。2 组大鼠均于术前及术后隔日进行 1 次行为测试评分, 并分别于术后 1, 3, 7, 14, 21 及 28 d 各处死 4 只大鼠, 取其脑组织检测 MAP-2 含量; 假手术组则分别于术前、术后第 1 天各进行 1 次行为测试评分, 并于术后第 2 天取脑组织以观察手术对行为测试评分及 MAP-2 免疫组化结果有无影响。另取 2 只正常对照组大鼠脑组织进行 MAP-2 免疫组化检测并与其它各组对照。

三、动物行为检测方法

1. 动物前肢测试: 参照 Kawamata 等^[2]采用的动物行为测试评分方法。具体实验有: (1) 前肢放置实验, 包括①视觉亚实验, 即前方刺激——实验者将动物握于手中, 使其前爪悬空, 自桌面上方 10 cm 处向桌面缓慢斜线靠近(此时桌子位于大鼠前方), 大鼠正常反应为前肢即刻抓向桌面, 损伤大鼠则表现为肢体反应延迟。0 分——动物肢体放置反应正常; 1 分——反应延迟但不超过 2 s; 2 分——反应延迟且超过 2 s。②侧方刺激, 此时桌子位于动物侧方, 其余实验方法及评分标准同前方刺激。(2) 触觉亚实验, 将动物置于桶状凹陷实验器内, 使其前爪悬空, 此时大鼠应该既看不见, 也不能用胡须触及桌面, 用其前爪背侧轻触桌面, 刺激深度仅达皮肤和毛发, 动物反应及评分同视觉亚实验, 触觉刺激同样分前方及侧方刺激。(3) 本体觉亚实验, 操作及评分同触觉亚实验, 仅刺激深度不同,

本体觉亚实验给予前爪较大压力, 刺激深达肌肉及关节。该亚实验只有前方刺激。动物前肢放置实验总分为 0~10 分, 功能损伤越重, 得分越高。

2. 平衡实验测试: 将大鼠持续置于 30.0 cm $\times$ 1.3 cm 的窄木条上达 60 s, 在此期间观察大鼠平衡功能并评分。1 分——大鼠能够保持平衡且 4 只爪子均位于木条表面; 2 分——大鼠爪子抓于木条侧面或大鼠在木条上摇晃; 3 分——大鼠有一侧或双侧肢体滑下木条; 4 分——大鼠有 3 侧肢体滑下木条; 5 分——大鼠在平衡木上试图保持平衡但跌下; 6 分——大鼠试图保持平衡失败后, 先悬吊于木条上然后跌下; 7 分——大鼠直接从木条上跌下且未观察到试图保持平衡的动作。

四、取材及免疫组化检测

运动组及对照组分别于术后 1, 3, 7, 14, 21 及 28 d 各取 4 只大鼠以 4% 多聚甲醛行心脏灌注后处死, 取其脑组织置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 灌注液中后固定 24 h, 常规石蜡包埋, 以每片厚约 6 μm 行连续冠状切片。一抗采用小鼠 IgG1 抗 MAP-2 单克隆抗体(Sigma 公司出品)。切片脱蜡后经 0.3% 的 H_2O_2 处理, 并采用 ABC 法染色。所有配对切片均同时在相同条件下完成免疫组化反应。应用 VIDAS-21 显微图像处理系统测定皮质缺血周边区免疫反应产物光密度值(optical density, OD), 并以同一张切片上未受累胼胝体为背景, 减去背景 OD 值, 得到校正后的光密度值(corrected optical density, COD)。每个标本共测 10 张切片, 每张切片随机选取 3 个视野, 取其平均值。所有标本的 OD 值测量均在相同光学、光源条件下完成。

五、统计学分析

实验数据采用($\bar{x} \pm s$)表示, 统计学方法采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异具有显著性意义。

结 果

一、行为测试结果比较

运动组及对照组的行为测试结果见表 1、表 2, 我们可以看到, 在大部分观察时间点上运动组的评分均明显低于对照组。而且我们在实验中还发现, 假手术组大鼠手术前、后前肢放置实验及平衡实验得分分别为(0 ± 0)分和(1 ± 0)分, 提示该组大鼠行为功能无缺陷, 表明手术操作本身并不影响行为测试评分结果。

二、各组大鼠 MAP-2 免疫组化染色结果比较

正常对照组大鼠额叶 MAP-2 免疫组化染色可见自皮质下向皮层方向呈放射状排列的树突树(图 1), MCAO 模型制成后, 运动组及对照组缺血中心区的 MAP-2 免疫阳性物质减少或缺失, 缺血周边区免疫阳性物质增高(图 2)。假手术组大鼠 MAP-2 的免疫染

色特点与正常对照组类似,两组大鼠切片分别经图像系统分析后,测得 MAP-2 的 COD 值分别为 0.150 ± 0.007 和 0.158 ± 0.006 ,两组间差异无显著性意义($t = 1.227, P > 0.05$),提示模型手术操作本身并不引起 MAP-2 含量的变化。我们同时还发现运动组大鼠在制

成 MCAO 模型后,额叶缺血周边区 MAP-2 免疫活性 COD 值水平明显高于对照组,在第 14 天及第 28 天时差异具有显著性意义($t = 2.57, 2.50, P$ 均 < 0.05)。运动组及对照组大鼠分别在制成 MCAO 模型后,运动训练对各组大鼠缺血周边区 MAP-2 含量的影响见表 3。

表 1 运动训练对制成 MCAO 后的各组大鼠其前肢放置实验评分的影响($\bar{x} \pm s$, 括号内为 n 值)

组 别	前肢放置实验评分(分)						
	术后 1 d	术后 3 d	术后 5 d	术后 7 d	术后 9 d	术后 11 d	术后 13 d
运动组	$9.00 \pm 0.60(24)$	$5.80 \pm 2.56(20)$	$4.70 \pm 2.56(20)$	$4.40 \pm 2.80(16)$	$3.20 \pm 1.34(16)^*$	$3.26 \pm 1.75(16)^*$	$2.20 \pm 1.20(16)^*$
对照组	$8.54 \pm 2.00(24)$	$7.50 \pm 2.20(20)$	$6.00 \pm 1.78(20)$	$5.80 \pm 1.92(16)$	$5.91 \pm 1.46(16)$	$5.22 \pm 2.06(16)$	$5.58 \pm 1.25(16)$
组 别	前肢放置实验评分(分)						
	术后 15 d	术后 17 d	术后 19 d	术后 21 d	术后 23 d	术后 25 d	术后 27 d
运动组	$2.04 \pm 1.18(12)^*$	$2.10 \pm 1.56(12)^*$	$1.40 \pm 1.60(12)^*$	$1.66 \pm 1.14(8)^*$	$1.20 \pm 1.08(8)^*$	$1.60 \pm 0.72(8)^*$	$1.48 \pm 1.70(8)$
对照组	$5.50 \pm 1.55(12)$	$4.84 \pm 2.00(12)$	$4.76 \pm 1.54(12)$	$4.60 \pm 1.24(8)$	$4.00 \pm 1.14(8)$	$4.06 \pm 1.18(8)$	$3.02 \pm 1.40(8)$

注:与对照组比较, * $P < 0.01$

表 2 运动训练对制成 MCAO 后的各组大鼠平衡实验评分的影响($\bar{x} \pm s$, 括号内为 n 值)

组 别	平衡实验评分(分)						
	术后 1 d	术后 3 d	术后 5 d	术后 7 d	术后 9 d	术后 11 d	术后 13 d
运动组	$5.10 \pm 0.56(24)$	$3.95 \pm 0.47(20)$	$3.54 \pm 0.56(20)$	$2.98 \pm 0.41(16)^{**}$	$2.84 \pm 0.40(16)^{**}$	$2.77 \pm 0.43(16)^{**}$	$2.78 \pm 0.32(16)^{**}$
对照组	$4.89 \pm 0.51(24)$	$4.10 \pm 0.73(20)$	$3.80 \pm 0.70(20)$	$3.81 \pm 0.78(16)$	$3.72 \pm 0.48(16)$	$3.54 \pm 0.34(16)$	$3.49 \pm 0.63(16)$
组 别	平衡实验评分(分)						
	术后 15 d	术后 17 d	术后 19 d	术后 21 d	术后 23 d	术后 25 d	术后 27 d
运动组	$2.86 \pm 0.33(12)$	$2.98 \pm 0.21(12)^{**}$	$2.84 \pm 0.34(12)^*$	$2.80 \pm 0.34(8)$	$2.68 \pm 0.33(8)$	$2.81 \pm 0.23(8)$	$2.75 \pm 0.35(8)$
对照组	$3.31 \pm 0.69(12)$	$3.64 \pm 0.46(12)$	$3.23 \pm 0.48(12)$	$3.06 \pm 0.50(8)$	$3.06 \pm 0.54(8)$	$3.23 \pm 0.63(8)$	$3.10 \pm 0.42(8)$

注:与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

表 3 运动训练对各组大鼠额叶缺血周边区 MAP-2 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$, 括号内为 n 值)

组 别	缺血周边区 MAP-2 蛋白表达 OD 值						
	术后 1 d	术后 3 d	术后 7 d	术后 14 d	术后 21 d	术后 28 d	
运动组	$0.156 \pm 0.046(4)$	$0.169 \pm 0.039(4)$	$0.285 \pm 0.080(4)$	$0.377 \pm 0.037(4)^*$	$0.349 \pm 0.041(4)$	$0.352 \pm 0.033(4)^*$	
对照组	$0.148 \pm 0.036(4)$	$0.155 \pm 0.065(4)$	$0.226 \pm 0.064(4)$	$0.301 \pm 0.049(4)$	$0.289 \pm 0.079(4)$	$0.275 \pm 0.082(4)$	

注:与对照组比较, $P < 0.05$

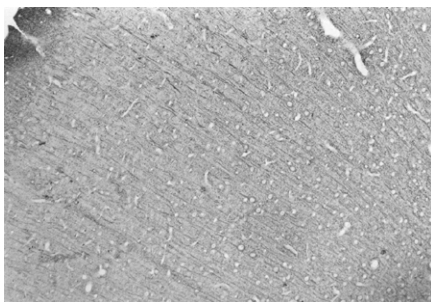


图 1 正常对照组大鼠额叶皮质 MAP-2 免疫组化染色 (SABC $\times 10$)

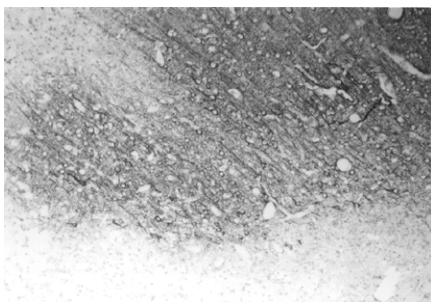


图 2 额叶缺血中心周边区 MAP-2 免疫组化染色 (MCAO 后 14 d, SABC $\times 10$)

讨 论

目前针对脑卒中患者的康复治疗主要是以各种综合促进技术为主。近年来学者们在动物实验中多采用转笼、滚筒、网屏、平衡木等方法对动物进行运动训练^[3,4]。而本文采用游泳训练是因为大鼠先天具有该运动技能,游泳训练还减小了大鼠两侧肢体的肌力差异,增强了平衡功能。本研究中所采用的运动量循序渐进,训练时间每次递增 1 min(增至 10 min 时不再增加),大鼠经过一定时间的游泳训练后,我们发现其毛发顺滑有光泽,目光明亮,神态安详。在运动组大鼠制成 MCAO 模型后第 3 天及以后时间里,其前肢功能评分及平衡功能评分均优于对照组,提示运动训练能够促进大鼠脑缺血再灌注后肢体功能的恢复;免疫组化检查也发现运动组大鼠在术后第 14 天、第 28 天时其 MAP-2 免疫活性水平显著高于对照组,从分子水平提示大鼠肢体功能恢复可能与神经再生有关。

本研究检测了与神经重塑有关的因子 MAP-2 在脑缺血再灌注后缺血周边区的表达。微管在维持神经细胞骨架及有丝分裂等方面具有重要作用,微管组装及

其动态稳定均依赖一些与之有关的蛋白因子调控,其中 MAP-2 就是一种非常重要的调节因子^[5]。MAP-2 是微管组装过程的启动子,在神经元极性获得及神经元树突生长过程中发挥重要作用。一些研究提示,所有 MAP-2 亚型因子在体外均能诱导微管蛋白组装,并可能通过提高微管的生长速率及修复频率等促进微管生长^[6]。在成熟脑组织中,MAP-2 高浓度集中于树突组织中,而轴突部位稀少或缺失^[7-9];MAP-2 对树突的延伸及分支起重要作用,如 MAP-2 缺失可导致脑区树突崩溃,MAP-2 增高可促进脑区树突出芽^[10];另外 MAP-2 可被 Ca^{2+} 介导的钙激活中性蛋白酶(calpain)水解^[11],从而引起神经细胞骨架的破坏。本实验显示 MAP-2 水平在缺血再灌注 3~7 d 后升高,在 2 周左右时达到峰值,此后虽有所下降,但直至 28 d 时仍持续在较高水平上,提示这个时期大鼠脑组织处于可塑性活跃状态。而行为测试评分表明,制成 MCAO 模型后的最初 5 d 左右是感觉、运动功能恢复的第 1 个高峰期,与 MAP-2 的变化并不一致,其原因可能是早期功能恢复主要以水肿及坏死组织吸收、侧枝循环建立为主;而此后大鼠的功能恢复仍然呈持续上升趋势,我们在实验中也发现大鼠在功能恢复后期 MAP-2 含量持续高于基线水平,提示神经重塑机制可能是后期功能恢复的重要原因之一。

有学者报道运动训练能减小脑梗死体积,对脑组织具有保护作用,它可增加内源性阿片类物质的释放,后者是 NMDA 受体拮抗剂,故而减轻了脑缺血性兴奋毒刺激^[12]。由于兴奋性氨基酸受体可以使 Ca^{2+} 介导通道开放,而 Ca^{2+} 介导的钙激活中性蛋白酶 calpain 能够使 MAP-2 蛋白水解,从而破坏神经细胞骨架,所以运动训练可以缓解 Ca^{2+} 超载引发的一系列损伤,这也是运动组 MAP-2 水平高于对照组的原因之一。陈运才等^[13]曾报道,持续时间为 8 个月和 19 个月的运动能够提高小鼠小脑和脊髓内突触素(synaptophysin, p38)的含量, p38 水平增高反映了突触数目的增加,说明有突触再生。余茜等^[4]的研究也提示运动训练能使突触发生形态学的可塑性改变,从而提高突触功能。上述实验与本研究观点一致,都提示运动训练促进功能恢复可能源于对中枢神经可塑性的促进作用。

有学者发现,中枢神经系统损伤 1~2 h 后就有早期即刻神经重塑机制的启动^[14,15]。从理论上讲,如果此时抓住治疗时机,强化这些即刻重塑机制,将对治疗具有非常重要的意义。然而在临床实践中,针对脑卒中患者,医生需要一定的时间以确保患者生命体征稳定及作出明确诊断。目前国内早期康复治疗开始的时间一般在确认患者生命体征稳定、神经学症状不再发展 48 h 以后,此时患者 Glasgow 评分 > 8 分^[16]。本实

验将开始康复训练的时间定在制成 MCAO 模型后 24 h,实验期间各组动物均能适应,无症状加重现象发生,无 1 只大鼠死亡,且疗效满意,并得到了支持运动促进中枢神经再生的分子依据。该结果亦证实了大鼠在发生脑血管意外后 24 h 开始康复训练的有效性。

综上所述,运动训练能促进 MCAO 大鼠的肢体功能恢复,其机制可能与缺血周边区 MAP-2 的表达上调有关。这一结论可为临床对脑卒中患者实施早期康复训练提供实验依据,但其确切机制还需更进一步的研究。

参 考 文 献

- Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*, 1989, 20:84-91.
- Kawamata T, Alexis NE, Dietrich WD, et al. Intracisternal basic fibroblast growth factor(bFGF) enhances behavioral recovery following focal cerebral infarction in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1996, 16:542-547.
- 高谦, 吴宗耀, 姚志彬, 等. 运动训练促进小鼠局灶脑缺血后功能恢复. *中华物理医学与康复杂志*, 2000, 22:273-275.
- 余茜, 李晓红, 吴士明, 等. 运动训练后脑缺血大鼠学习记忆与健侧脑内突触结构变化的关系. *中华物理医学与康复杂志*, 2002, 24:399-401.
- Maccioni RB, Cambiazo V. Role of microtubule-associated proteins in the control of microtubule assembly. *Physiol Rev*, 1995, 75:835-864.
- Kowalski RJ, Williams RC. Microtubule-associated protein 2 alters the dynamic properties of microtubule assembly and disassembly. *J Biol Chem*, 1993, 268:9847-9855.
- Bernhardt R, Matus A. Light and electron microscopic studies of the distribution of microtubule-associated protein 2 in rat brain; a difference between the dendritic and axonal cytoskeletons. *J Comp Neurol*, 1984, 226:203-221.
- De Camilli P, Miller PE, Navone F, et al. Distribution of microtubule-associated protein 2 in the nervous system of the rat studied by immunofluorescence. *Neuroscience*, 1984, 11:819-846.
- Kosik KS, Drecchio LD, Bakalis S, et al. Partial sequence of MAP-2 in the region of a shared epitope with Alzheimer neurofibrillary tangles. *J Neurochem*, 1988, 51:587-598.
- Johnson GV, Jope RS. The role of microtubule-associated protein-2 (MAP-2) in neuronal growth, plasticity, and degeneration. *J Neurosci Res*, 1992, 33:505-512.
- Blomgren K, McRae A, Elmered A, et al. The calpain proteolytic system in neonatal hypoxia-ischemia. *Ann NY Acad Sci*, 1997, 825:104-119.
- 高谦, 姚志彬, 袁群芳, 等. 缺血前运动训练对小鼠脑局灶缺血后功能恢复的影响. *中国康复医学杂志*, 1999, 14:109-111.
- 陈运才, 姚志彬, 陈以慈, 等. 运动对小鼠小脑皮质和脊髓内突触素年龄变化的影响. *解剖学报*, 1994, 25:263-267.
- Donoghue JP, Suner S, Sanes JN. Dynamic organization of primary motor cortex output to target muscles in adult rats. II. Rapid reorganization following motor nerve lesions. *Exp Brain Res*, 1990, 79:492-503.
- Recanzone GH, Allard TT, Jenkins WM, et al. Receptive-field changes induced by peripheral nerve stimulation in SCI of adult cats. *J Neurophysiol*, 1990, 63:1213-1225.
- 缪鸿石, 朱镛连, 主编. 脑卒中的康复评定和治疗. 北京:华夏出版社, 1996. 162.

(收稿日期:2003-06-15)

(本文编辑:易 浩)