

康复训练对大鼠脑梗死后脊髓 Fos、CGRP 和 HSP70 表达的影响

袁华 牟翔 李玲 徐莉

【摘要】 目的 研究康复功能训练后,脑梗死大鼠脊髓中 Fos、降钙素基因相关肽(calcitonin gene-related peptide, CGRP)、热休克蛋白(heat shock protein 70, HSP70)蛋白表达的变化。**方法** 采用 60 只 SD 大鼠制作脑梗死模型,24 h 后随机分为康复组和制动组。康复组每天给予平衡、抓握、旋转、行走等功能训练,制动组置于网状笼内固定。各组在 24 h 及 1、2、3、4 周检测脊髓 Fos、CGRP 和 HSP70 蛋白表达情况。**结果** 康复组和制动组大鼠脊髓背角出现 Fos 免疫阳性物质,前角出现 CGRP 和 HSP70 阳性反应神经元;康复组反应明显较制动组强,瘫痪侧较对侧少。**结论** 康复功能训练可增加感觉刺激和运动输出,促进运动功能的恢复。

【关键词】 脑梗死; 脊髓; Fos; CGRP; HSP70

The effects of rehabilitation training on the expression of Fos, CGRP and HSP70 in spinal cord of rats with cerebral infarction YUAN Hua*, MOU Xiang, LI Ling, XU Li. * Department of Physiotherapy and Rehabilitation, Xijing Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China

【Abstract】 Objective To evaluate the effects of rehabilitation training on the expression of Fos, CGRP and HSP70 in the spinal cord of rats with cerebral infarction. **Methods** Cerebral infarction models were established in 60 SD rats who were then divided randomly into 2 groups at 24 hours later: the rehabilitation group in which the rats were given daily balancing, grasping, rotating and walking exercises, and the immobilization group in which the rats were immobilized in cages. Immunohistochemical technique was used to detect the Fos, CGRP and HSP70 expression, respectively, at the points of 24 hours, 1, 2, 3 and 4 weeks after the onset of infarction. **Results** Fos immunologic reaction could be observed in the dorsal horn of spinal cord in both groups while the CGRP- and HSP70-active neurons were mainly found in the ventral horn. The rehabilitation group responded to the rehabilitation training much stronger than the immobilization group. **Conclusion** Rehabilitation training is helpful for increasing the sensory and motor conduction, thus promoting the recovery of motor functions in rats with cerebral infarction.

【Key words】 Cerebral infarction; Spinal cord; Fos; CGRP; HSP70

我们采用光化学诱导的大鼠脑梗死模型,给予运动功能训练,曾观察到脑梗死大鼠神经功能的恢复及大脑皮质组织形态学的一些改变^[1-3],本实验拟在脊髓水平,通过检测 Fos、降钙素基因相关肽(calcitonin gene-related peptide, CGRP)和热休克蛋白(heat shock protein 70, HSP70)的表达变化,来观察康复训练对感觉和运动功能调控的影响。

资料与方法

一、实验材料

1. 动物:成年雄性 SD 大鼠 66 只,由第四军医大学实验动物中心提供,体重 240 ± 50 g,周龄 12 周左右,二级动物。

2. 光敏剂 CPD₄ 粉剂:由杭州民生药厂提供,在 0

~4℃ 条件下避光保存,使用前用生理盐水稀释成 3% 的溶液。

3. 光源:采用西安激光仪器厂生产的 B 型氦-氖激光双管治疗机,输出波长 632.8 nm,输出功率 8 mW,原光束双管照射。

4. 康复评估及训练材料:(1)网屏训练:网屏 50 cm × 40 cm,网眼为 1 cm × 1 cm,网板的左右和上方都用 25 cm 高的木板框边,网屏距地面高度为 80 cm,下方铺以 12 cm 厚的海绵。先将网屏水平放置,将大鼠放在其上,然后缓缓地将其一端抬高,在 2 s 内将此屏风变成垂直位,保持 5 s,观察大鼠是否会从网屏上掉下来或用前爪抓握住网屏,评估前爪抓握能力及肌力。(2)平衡木训练:用长 170 cm、直径 2 cm 的木棒,平放在距地面 7 cm 高处,让大鼠在其上行走,用以评估及训练平衡功能。(3)转棒训练:长 150 cm、直径 4.5 cm 的木棒 1 根,其中点固定在 3 转/min 的转动器上,分别向左右交替转动,可评估及训练动态平衡功能。(4)自制滚筒式网状训练器:长 100 cm、直径

基金项目:军队留学人员回国启动基金(No. 97 卫科训字 116 号回国基金)

作者单位:710032 西安,第四军医大学西京医院康复与理疗科

60 cm 的圆形网状仪器,中间被分为 4 个格,可同时训练 4 只鼠;底座有一固定架,一端有一手摇柄,手摇可按 5 转/min 的速度进行转动训练。该器材可训练大鼠的抓握、旋转、行走等功能。

二、方法

1. 动物分组:66 只大鼠随机分为康复训练 24 h 及 1、2、3、4 周组,制动 24 h 及 1、2、3、4 周组和对照组,每组各 6 只。康复组和制动组大鼠均接受手术。康复训练组大鼠每天给予平衡、抓握、旋转、行走等训练;制动组大鼠置于长 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。两组分别于造模后 24 h 及 1、2、3、4 周后处死,进行免疫组织化学反应。

2. 模型制作方法:将大鼠用 10g/L 的戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,股静脉按每公斤体重注射 40 mg 的 CPD₄ (叶绿素光敏剂) 10 min 后,在俯卧位于大鼠脑定位仪上,沿头颅正中偏右切开头皮暴露颅骨前沿部位,在前囟后 1.8 mm、正中线向右旁开约 2 mm 处,用黑色避光纸(中央有一 8 mm × 5 mm 的小孔)遮避周围组织,用氩-氟激光照射 20 min,术后缝合头皮,避光 24 h。

三、康复训练方法

康复训练组每天给予平衡、抓握、旋转、行走等训练共 30 min,每周 5 次。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。两组分别于造模后 24 h 及 1、2、3、4 周处死。

四、行为学评估^[3,4]

1. Bederson 神经功能评定:评分分为 4 级。0 级,未见行为缺陷;1 级,前肢屈曲(即提尾悬空试验阳性);2 级,侧推抵抗力下降(即侧向推力试验阳性),伴前肢屈曲,无转圈行为;3 级,同 2 级行为,且伴自发性旋转。

2. 网屏实验:评分标准分为 4 个等级。0 分,前爪握住网屏大于 5 s,不会掉下来;1 分,暂时握住网屏,滑落一段距离,但没有掉下来;2 分,在 5 s 内掉下来;3 分,网屏转动即刻掉下来。

3. 平衡木行走测评:评分标准共分 6 个等级。0 分,能跳上横木,在上面行走不会跌倒;1 分,能跳上横木,在上面行走,跌倒机会少于 50%;2 分,能跳上横木,在上面行走,跌倒机会大于 50%;3 分,在健侧后肢帮助下能跳上横木,但受累的瘫侧后肢不能帮助向前移动;4 分,在平衡木上不能行走,但可坐在上面;5 分,将大鼠放在平衡木上会掉下来。

4. 转棒上行走测评:评分标准分为 4 个等级。0 分,转动过程中,可在棒上行走;1 分,转动过程中不掉

下来,时间 60 s 以上;2 分,转动开始后从棒上掉下来;3 分,转动开始前就从棒上掉下来。

行为学评估结果采用第四军医大学统计教研室设计的 SPLM 统计软件进行方差分析。

五、免疫组织化学反应

1. 组织材料的处理:大鼠在戊巴比妥钠深麻醉下,经主动脉灌注生理盐水 100 ml,再灌注 40 g/L 多聚甲醛 400 ml,取脊髓颈、腰段置于 300 g/L 蔗糖的 0.1 mol/L 磷酸缓冲液(PB)中,4℃ 过夜,冰冻切片机连续切片,片厚 30 μm,隔 5 取 1 收集于 0.01 mol/L 的含钾的磷酸盐缓冲液(KPBS)中。

2. 免疫组织化学反应:三套切片经漂洗 3 × 10 min 后入含 Triton X-100 的 KPBS 30 min(室温);三套切片分别入兔抗鼠 Fos 抗体(1:1000, Santa Cruz)、兔抗鼠 CGRP 抗体(1:5000, Sigma)和兔抗鼠 HSP70 抗体(1:3000, Sigma),各孵育 48 h(4℃);再各经生物素化二抗(1:500, Sigma)室温孵育 2 h,再入 ABC 复合物(1:500, Sigma)分别孵育 2 h,而后葡萄糖氧化酶 3,3'-二氨基苯联胺(DAB)硫酸镍铵加强法呈色,常规贴片、干燥、脱水透明、封片。每步间均用 0.01 mol/L 的 KPBS 漂洗。

取实验组大鼠的脊髓切片,用正常血清(1:100)代替 Fos 抗体,其余步骤同上。

六、结果观察

Olympus 光学显微镜下观察实验结果。

结 果

一、行为学评估

Bederson 神经功能、平衡木、转棒行走评估结果(本课题组所有动物功能评估)显示,网屏实验 1~2 周康复组(A 组)较制动组(B 组)评分低($P < 0.01$),提示其抓握功能和肌力强于制动组;3 周和 4 周组间的差异无显著性意义($P > 0.05$),其余评分在 1~4 周中康复组评分均较制动组低($P < 0.01$),提示康复组静、动态平衡功能较制动组好。另外可见,随着康复时间延长,各组分值都有降低趋势,提示大鼠的功能逐渐恢复(表 1)。

二、免疫组化染色结果

正常血清替代 Fos 抗体后染色的切片中未见 Fos 免疫阳性神经元。

1. 对照组:两侧脊髓背角有少量散在的 Fos 反应阳性物质,神经核着色,呈蓝黑色,两侧对称,量较少;前角有少量 CGRP 阳性神经元,无 HSP70 阳性神经元。

2. 康复组:康复组脑梗死 24 h 后脊髓背角 Fos 样免疫阳性反应物质增多,第 1~2 周脊髓颈、腰段 Fos

样免疫反应物质主要出现在脊髓背角 I ~ V 层,其中 I ~ IV 层基本上两侧对称,第 V 层阳性反应出现在瘫痪侧,随时间延长阳性反应增强,到第 3 周开始减弱。

表 1 感觉、运动及神经功能评估($n=30, \bar{x} \pm s$)

组别	24 h	1 周	2 周	3 周	4 周
Berdson 评分					
A	2.48 ± 0.49	1.67 ± 0.48 [▲]	1.03 ± 0.37 [▲]	0.86 ± 0.34 [▲]	0.56 ± 0.50 [▲]
B	2.52 ± 0.50	1.89 ± 0.40	1.65 ± 0.48	1.20 ± 0.40	1.03 ± 0.30
转棒实验					
A	2.79 ± 0.53	1.40 ± 0.49 [▲]	0.83 ± 0.37 [▲]	0.83 ± 0.37 [▲]	0.41 ± 0.49 [▲]
B	2.77 ± 0.43	2.17 ± 0.60	1.59 ± 0.56	1.60 ± 0.49	1.76 ± 0.43
平衡木实验					
A	4.79 ± 0.56	3.03 ± 0.81 [*]	1.90 ± 0.98 [▲]	1.41 ± 0.74 [▲]	0.70 ± 0.74 [▲]
B	4.82 ± 0.48	3.79 ± 0.55	3.72 ± 0.53	3.52 ± 0.50	2.93 ± 0.25
网屏实验					
A	2.48 ± 0.73	0.80 ± 0.76 [▲]	0.23 ± 0.43 [▲]	0.06 ± 0.25	0.06 ± 0.25
B	2.51 ± 0.82	1.43 ± 0.63	0.79 ± 0.72	0.21 ± 0.40	0.13 ± 0.34

注: A 为康复组, B 为实验组; A 组与 B 组比较, [▲] $P < 0.01$,

^{*} $P < 0.05$

脊髓前角运动神经元在梗死 24 h 后,出现较多 CGRP 和 HSP70 阳性神经元胞体呈蓝黑色,胞核未着色。24 h 和第 1 周时,瘫痪侧阳性比对照侧多,第 2 周开始出现对侧较瘫痪侧脊髓前角阳性神经元数目多,且随时间延长,阳性反应增强。

3、制动组:制动组脊髓颈腰段脊髓背角第 I 层和三叉神经脊束出现少量 Fos 免疫阳性物质,脊髓颈腰段前角运动神经元出现 CGRP、HSP70 阳性神经元,但明显少于康复组,且随时间增加变化不大。

讨 论

脑血管意外患者的幸存者至少有 50% 活到 7.5 年或更长一段时间。在大型康复中心采用综合方法进行康复可在较短时间内使病人的功能从低级到高级,并阻止功能衰退^[6]。而关于康复训练促进功能恢复的机理研究尚未充分展开。有学者^[7]研究发现,脑梗死致运动皮质损伤后,康复训练能使邻近的非损伤区发生功能重组,非损伤区在运动功能恢复上发挥重要作用。以往研究显示^[8],脑损伤数周或数月后,康复训练使一些运动能力逐渐恢复;主要是使传入神经不断受到刺激,引起大脑产生功能重组。本实验室也观察到康复训练后梗死灶周围和对侧皮质出现的一些有利于功能恢复的改变。

脊髓背角是行使感觉整合的部位,其接受来自外周的冲动信息,再传向脑干和脑。Fos 蛋白是即刻早期基因家族中一类 c-fos^[9]。c-fos 表达法应用于神经科学研究,检测受到刺激后激活的神经元,具有敏感性高的优点,但对不同刺激的选择性差,易受其他非实验因素的影响,因此排除无关因素是非常重要的。本

实验采取了以下措施:(1)动物于术前、术后均置于安静、温暖、避强光的环境内;(2)处死动物时,尽可能选择在同一时间点内,避免昼夜节律等的影响;(3)各组动物在麻醉处死前,均接受相同的除实验刺激以外的其他刺激,如抓取、针刺或麻醉,力求条件相同。因此,本实验中 Fos 阳性神经元在康复训练组脊髓后角大量增加,提示康复训练可保持和增加后角的感觉传入,这对维持皮质的感觉运动功能非常重要。为了对运动进行正确的调控,中枢神经系统需要不断接受感觉信息,并在发起运动前,根据这些感觉信息为运动编程^[10]。

HSP70 是一类进化上高度保守的应激蛋白,在多种刺激作用下表达增加^[11]。HSP70 可促进某些变性蛋白的降解和清除,激活某些酶的活性,保护细胞功能,并增强对应激因子作用的抵抗力^[12]。CGRP 是由 37 个氨基酸残基组成的神经多肽,起着递质或细胞外调节物样作用,主要分布在神经系统中。外周轴突损伤后,可导致 CGRP 在运动神经元中含量增高,而中枢神经系统损伤后胶质细胞上存在 CGRP 受体。CGRP 可能是神经元与神经胶质细胞间作用的一种调质。CGRP 首先与胶质细胞上的受体结合,刺激膜上 cAMP 合成增多,进而激活 c-fos 基因的表达,进一步促进胶质细胞胶质原显微酸性蛋白(GFAP)的合成;胶质细胞还能形成或分泌神经生长因子促轴突因子等多种神经营养因子。这些因子在神经修复中起重要作用^[13]。正常情况下在脊髓下行传导通路中含有少量 CGRP 阳性神经元,无 HSP70 阳性神经元。康复训练后 CGRP、HSP70 的大量增加可能是康复训练提供的一种保护作用。尽管脊髓并没有直接受损,但脑梗死造成上位神经元控制的中断,脊髓运动神经元正常活动状态发生改变,康复训练可保持和增加后角的感觉输入,通过皮质功能重建和重组,重新建立瘫痪侧下行传导束,使原有突触连接性重组,能通过运动的重复加强和重建正常运动模式。

本实验中发现,脑梗死后康复组大鼠脊髓两侧的阳性反应不对称。我们考虑在康复训练过程中,未瘫痪侧肢体担任了较多的运动功能,也有较多的感觉输入,这可能是未瘫痪侧脊髓后角 Fos 表达比瘫痪侧强的原因之一,可能也是康复早期未瘫痪侧脊髓前角 CGRP、HSP70 表达比瘫痪侧强的原因之一。康复训练可能通过皮质功能重建和重组,使瘫痪侧接收来自皮层的调控信息增多,其 CGRP、HSP70 表达反而比未梗死侧多。而制动组由于感觉输入和运动都很少,Fos、CGRP、HSP70 的表达很少,其功能恢复也较差。

总之,本实验结果提示,脑梗死后康复训练可以在脊髓水平中增加感觉输入和运动输出,明显改善运动功能。康复训练究竟是通过促进原来运动神经元的功

能恢复还是建立另外的神经通路,我们尚在进一步研究之中。

参 考 文 献

- 1 徐莉,李玲,陈景藻,等. 康复训练对大鼠脑梗死神经功能恢复的影响. 中华物理医学与康复杂志, 2000, 22: 86-88.
- 2 李玲,徐莉,晏培松,等. 大鼠脑梗死康复训练脑的增殖细胞核抗原的表达及病理学改变. 中华物理医学与康复杂志, 2000, 22: 339-342.
- 3 李玲,徐莉,饶志仁,等. 康复训练对大鼠脑梗死后血管构筑的改变. 现代康复, 2000, 4: 842-843.
- 4 Bederson JB, Pitts LH, Tsui M. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of neurologic examination. Stroke, 1986, 17: 472-476.
- 5 窦祖林. 中风对感觉运动功能影响的实验性研究进展(综述). 国外医学物理医学与康复学分册, 1998, 18: 5-8.
- 6 南登崑,刘燧,黄彬鉴,等. 克氏康复医学. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1990. 343-345.
- 7 高谦. 康复训练促进缺血性脑梗死后运动恢复的神经基础研究新

进展. 现代康复, 1998, 2: 544-545.

- 8 Johansson BB. Environment, social interaction and physical activity as determinants of functional outcome after cerebral infarction in the rats. Exp Neurol, 1996, 139: 322-327.
- 9 万选才,杨天祝,徐承焘. 现代神经生物学. 北京: 北京医科大学和中国协和医科大学联合出版社, 1999. 246-250.
- 10 燕铁斌,窦祖林. 实用偏瘫康复. 北京: 人民卫生出版社, 1999. 64-83.
- 11 袁华,陈景藻,李玲,等. 次声作用后大鼠大脑热休克蛋白 70 的表达与分布. 第四军医大学学报, 1998, 19: 606-609.
- 12 Lau SS, Griffin TM, Mestral R. Protection against endotoxemia by HSP70 in rodent cardiomyocytes. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2000, 31: 1460-1465.
- 13 Lazar P, Reddington M, Streit WJ. The action of calcitonin gene-related peptide on astrocyte morphology and cyclic AMP accumulation in astrocyte cultures from neonatal rat brain. Neurosci Lett, 1991, 130: 99.

(收稿日期: 2001-10-09)

(本文编辑: 熊芝兰)

· 短篇报道 ·

超短波并氦-氖激光治疗外耳道疖肿 50 例

任杰

外耳道疖肿是临床儿科常见疾病,发病快,疼痛剧烈。目前临床多采用抗生素或切开减压治疗,其疗程长,痛苦大,患儿不易接受。我科采用超短波并氦-氖激光治疗外耳道疖肿 50 例,取得满意效果,报道如下。

50 例患者均经五官科临床确诊为外耳道疖肿:男 37 例,女 13 例;年龄 3 个月~10 岁;病程 1~3 d。临床分型:轻型 39 例,患侧外耳道软骨部半球形隆起,局部充血,触痛,牵拉耳廓、压迫耳屏疼痛加剧,患儿哭闹不安;重型 11 例,患侧外耳道软骨部红肿隆起,耳道闭塞,耳屏前后皮肤红肿,耳廓后沟消失,耳廓向后移位,体温 37.5~38℃ 之间,患儿哭闹不安。

治疗方法:采用上海医用电子仪器厂生产的五官科超短波治疗机,输出功率 150 W,频率 40.68 MHz,波长 7.37 m,小号圆形电极 2 块,一极置于患侧耳前,一极置于耳后乳突部,无热量,每日 1 次,每次 10 min,5 次为一疗程。氦-氖激光治疗采用西安产 795-B 型照射器,波长 10 nm,输出功率 8 mW,导光纤末端输出功率 4.5 mW,直接照射疖肿部,每日 1 次,每次 10 min,5 次为一疗程。

疗效标准:①治愈:红肿疼痛消失,耳道通畅清洁,无分泌物;②显效:牵拉触摸患侧耳廓疼痛消失,耳道内有轻度充血;③好转:耳道红肿基本消失,疼痛明显减轻,耳道内仍有少量分泌物;④无效:与治疗前比较症状无改变。

治疗情况:经 1 次治疗后疼痛明显减轻者 46 例;经 3~5 次治愈者 41 例,显效 5 例,好转 2 例,无效 2 例。

讨论 外耳道疖肿系外耳道软骨部毛囊感染所致。常因耳道湿疹、抓伤、儿童游泳、药物和分泌物刺激所诱发^[1]。通过对 50 例患儿外耳道疖肿治疗的观察,我们认为在耳道疖肿发病早期,在应用抗生素的同时,及早配合超短波和氦-氖激光治疗,不但可缩短治疗时间,同时也可迅速减轻患儿的疼痛之苦。超短波合并氦-氖激光的治疗,可促使局部血液循环加快,血管通透性增加,促进病灶局部炎性渗出物的吸收和排出^[2];可改善病菌对抗生素的敏感性,有利于消炎;还可使局部组织中 5-羟色胺的含量下降,使吗啡样物质释放,起到镇痛作用^[3]。所以,对外耳道疖肿急性期,及早采用超短波和氦-氖激光治疗,其疗效优于单纯依靠药物治疗的效果,是目前配合临床治疗该病的有效方法。

参 考 文 献

- 1 黄家驷,主编. 外科学. 第 2 版. 北京:人民卫生出版社,1972. 112-113.
- 2 邹贤华,史永明,主编. 物理医学与康复. 北京:华夏出版社,1992. 140-141.
- 3 于淑芬,主编. 小儿理疗学. 北京:人民卫生出版社,1987. 208-218.

(收稿日期: 2001-10-23)

(本文编辑: 刘雅丽)

作者单位: 710003 陕西,西安市儿童医院理疗科