

康复训练对脑梗死大鼠功能恢复及皮质梗死边缘区神经细胞超微结构的影响*

郑海清¹ 胡昔权^{1,3} 潘三强² 马尚峰²

摘要 目的:研究康复训练对脑梗死大鼠功能恢复及皮质梗死边缘区神经细胞超微结构的影响。**方法:**采用线栓法制作大鼠大脑中动脉闭塞(MCAO)模型,将大鼠随机分成假手术组(n=8)、卒中训练组(n=20)、卒中对照组(n=20)。卒中训练组每天予以转棒、平衡木、滚筒等训练,假手术组与卒中对照组则置于普通笼内饲养,不予以任何针对性训练。脑梗死大鼠于造模后第3天、7天、21天及35天时进行运动功能评分,随后灌注固定取材,用普通光镜、透射电镜观察脑皮质梗死边缘区神经细胞的变化。**结果:**在造模后第7天、21天、35天时卒中训练组大鼠的平衡木及网屏测试评分分值均优于卒中对照组($P<0.05$);且于光镜、电镜观察下脑皮质梗死边缘区神经细胞的核膜较卒中对照组完整、核下凝集的染色质较为稀少,线粒体结构较为清晰,粗面内质网表面核糖体更为丰富。**结论:**康复训练能提高脑梗死大鼠的运动功能,促进皮质梗死边缘区神经细胞超微结构的恢复。

关键词 脑梗死;康复训练;电镜;神经细胞;大鼠

中图分类号:R743,R493 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2008)-07-0605-04

Effects of rehabilitative training on function recovery and ultrastructure of nerve-cells of cortical infarct marginal zone in rats after cerebral infarction/ZHENG Haiqing, HU Xiquan, PAN Sanqiang, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2008, 23(7): 605—608

Abstract Objective:To study the effects of rehabilitative training on function recovery and ultrastructure of nerve cells of cortical infarct marginal zone after cerebral infarction in rats. **Method:**The mode of left middle cerebral artery occlusion (MCAO) was established on Sprague-Dawley rats. Rats were randomly divided into three groups: rehabilitative training group (n=20), which were given bar rotating, balancing and rolling exercises everyday; sham surgery group (n=8) and control group (n=20), which were fed in cages without any special training exercises. Post-MCAO, their motor functions were measured on the 3rd, 7th, 21st and 35th. Changes of nerve-cells in cortical infarct marginal zone were observed with microscope and electronic microscope. **Result:** The scores of motor functions in rehabilitative training group were significantly better than those in control group on the 7th d, 21st d and 35th d ($P<0.05$). Under microscope and electron microscope the nerve-cells of cortical infarct marginal zone in rehabilitative training group showed more integrity nuclear membranes, less agglutinative chromatin, clearer structures of mitochondria and more plentiful ribosomes on rough endoplasmic reticulum compared with that in control group. **Conclusion:** Rehabilitative training may promote the motor function recovery as well as the ultrastructure recovery of nerve cells of cortical infarct marginal zone after cerebral infarction in rats.

Author's address Department of Rehabilitation Medicine, the Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou, 510630, China

Key words cerebral infarction; rehabilitative training; electron microscope; nerve-cell; rats

脑卒中后早期开展康复治疗对患者神经功能的恢复可取得良好的疗效^[1],这可能与神经可塑性及大脑功能重组有关^[2-3],以运动治疗为主要内容的康复训练也日益受到人们的关注与重视。目前国内一些实验研究在对脑梗死大鼠神经功能恢复机制的研究中发现梗死灶边缘区星形胶质细胞增生明显,突触的数目、结构及功能也发生了变化^[4-5],而对脑皮质梗死灶边缘区神经细胞及其超微结构改变的研究报道甚少^[6],因此本实验旨在通过建立大鼠大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型进行运动功能训练,于不同时间点评估

运动功能并通过普通光镜及透射电镜观察脑皮质梗死灶边缘区神经细胞的超微结构变化,以探讨康复训练对梗死灶边缘区神经细胞的影响。

1 材料与方法

* 基金项目:广东省自然科学基金(NO:31751)

1 中山大学附属第三医院康复科,广州,510630

2 暨南大学医学院解剖学教研室

3 通讯作者:胡昔权(中山大学附属第三医院康复科,广州,510630;

E-mail: xiquhu@hotmail.com)

作者简介:郑海清,男,在读硕士研究生

收稿日期:2008-01-22

1.1 实验动物模型的建立与分组

1.1.1 实验采用清洁级成年 Sprague-Dawley (SD) 雄性大鼠 58 只, 体重(250±30)g (广东省医学实验动物中心)。随机选取 50 只术前禁食, 自由饮水, 以 3.5% 水合氯醛(350mg/kg 体重)行腹腔注射麻醉, 参照 Zea-Longa 线栓法^[7]制作大鼠左侧 MCAO 动物模型。

1.1.2 MCAO 6h 后采用改良的 Bederson's 评分方法^[8]进行神经功能评分, 即 0 分: 无神经功能缺失体征; 1 分: 提尾时损伤对侧前肢屈曲; 2 分: 前肢屈曲及对侧抵抗力下降; 3 分: 向对侧转圈; 4 分: 向对侧转圈及意识障碍。入模型标准: 动物苏醒后出现左眼 Horner 征、右侧肢体偏瘫并向右侧转圈即追尾现象, 神经功能评分 1—3 分的大鼠。

1.1.3 剔除麻醉及手术意外死亡的 10 只, 将符合入模的 MCAO 大鼠 40 只, 按随机原则分为卒中训练组和卒中对照组, 每组 20 只, 术后 48h 卒中训练组大鼠开始给予平衡、抓握、旋转及行走等系统训练, 训练强度按循序渐进的原则进行。通常情况下, 上述各项训练 2 次/d, 10min/次, 6d/周。大鼠造模后初始一周训练时强度减半, 训练过程中大鼠肢体瘫痪明显, 实验人员可给予必要的辅助; 卒中对照组大鼠则置于普通笼内饲养, 除自由饮水、进食、活动外, 不予以任何针对性训练。上述两组大鼠又分别于 MCAO 后第 3 天、第 7 天、第 21 天、第 35 天(各组每个时间点各取 5 只)进行运动功能评分, 并灌注固定断头取脑; 余下 8 只大鼠作假手术组, 只暴露分离血管、神经, 缝合皮肤后置于普通笼内饲养, 并与各组相应时间点进行灌注固定取材。

1.2 功能训练方法

对卒中训练组的大鼠每天予于平衡木、转棒及滚筒进行运动功能训练, 具体方法步骤参考文献^[9-10]介绍:

平衡木训练: 平衡木长 170cm, 宽 2cm, 下有支架 7cm 高, 平放于地面, 让老鼠在上面爬行; 转棒训练: 转棒长 150cm, 直径 4.5cm; 中点固定于转动器上, 顺、逆时针交替转动, 3r/min; 滚筒训练: 采用自制滚筒式网状训练器材训练, 训练器长 50cm, 直径 60cm, 中间不分格, 底座有一固定架, 一端有一手摇柄, 5r/min, 各项训练上下午各进行 1 次, 10min/次。

1.3 大鼠运动功能评定

1.3.1 平衡木试验测评: 将老鼠放置于 30cm×1.3cm 的窄条上使其保持平衡并根据以下标准给分(1—7分): 1 分, 能保持平衡且四肢均置木条表面; 2 分, 有一侧爪子握住木条或在木条上摇晃; 3 分, 有一或两个肢体滑下木条; 4 分, 三个肢体滑下木条; 5 分, 在

平衡木上试图保持平衡但滑下; 6 分, 试图保持平衡失败悬吊在木条上然后跌落; 7 分, 直接从木条上跌落而无试图保持平衡。

1.3.2 网屏试验测评: 网屏为 50cm×40cm, 网眼规格 1cm×1cm, 左右及上方有 25cm 木板框边, 网屏距地面高度约 80cm, 并铺有海绵, 先将网屏平放并置大鼠于其上, 然后从一端快速抬高, 2s 内恢复至垂直位, 并保持 5s, 期间观察大鼠是否会握住网屏或掉下。

评分标准分为: 0 分, 前抓握住网屏大约 5s, 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 5s 内掉下来; 3 分, 网屏翻动直立时, 鼠即刻掉下来。

1.4 大鼠脑组织取材与观察

1.4.1 取材: 各组大鼠在相应时间点进行神经功能评分后, 以 3.5% 水合氯醛(350mg/kg 体重)行腹腔注射麻醉, 开胸暴露心脏, 0.2ml 肝素抗凝, 用 4℃生理盐水 150ml 及 4% 多聚甲醛溶液 (0.1MPB 配置, pH7.4) 200—250ml 心脏灌注, 然后断头取脑, 将脑组织放入 4% 多聚甲醛溶液中固定, 经梯度蔗糖脱水、包埋后采用 LEICA 切片机连续冠状冷冻切片, 厚 20μm, 4℃冰箱存储备用。

1.4.2 Nissl 染色: 冷冻切片于 PBS 水化 10min, 0.1% 焦油紫染色 (37℃) 6—8min, 双蒸水冲洗 3min, 盐酸酒精分色 10s, 常规梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片, 烘干后采用 LEICA 显微镜镜下观察拍片。

1.4.3 透射电镜技术: 标本经生理盐水快速冲洗, 2.5% 戊二醛/4% 多聚甲醛固定液先快后慢灌注固定 30min, 每个脑组织于额叶皮质梗死边缘区取约 1.5mm×1.5mm×1.5mm 大小的组织块, 于 2.5% 磷酸缓冲戊二醛固定液后固定, 0.1M 磷酸缓冲液冲洗, 1% 锇酸固定 2h, 梯度乙醇脱水, 丙酮置换, 浸透后 EPON812 包埋、聚合, 修块, 半薄切片, 甲苯胺蓝染色光镜下定位, 超薄切片, 醋酸双氧铀和铅双重染色, PHILIPS TECNAI 10 透射电镜放大 14000 倍下观察神经元超微结构变化。

1.5 统计学分析

数据采用均数±标准差表示, 所有数值均经方差齐性及正态性检验, 应用 SPSS13.0 统计软件进行统计学处理, 组间比较采用成组 *t* 检验, *P*<0.05 表示差异有显著性意义。

2 结果

2.1 大鼠运动功能评定结果

缺血第3天时, 卒中训练组与卒中对照组的运动功能评分差异均无显著性意义($P>0.05$); 而缺血第7天、21天和35天时, 卒中训练组与卒中对照组

在平衡木测试评分及网屏测试评分中差异均有显著性意义($P<0.05$)见表1。

2.2 Nissl 染色变化

表1 各组大鼠运动功能评分结果比较

($\bar{x}\pm s$, 分)

组别	例数	平衡木试验				网屏试验			
		第3天	第7天	第21天	第35天	第3天	第7天	第21天	第35天
卒中训练组	20	5.00±1.07	2.50±0.93 ^①	1.63±0.52 ^①	1.13±0.35 ^①	2.50±0.53	1.25±0.46 ^①	0.63±0.52 ^①	0.50±0.54 ^①
卒中对照组	20	4.88±0.99	3.00±0.54	2.13±0.35	1.50±0.54	2.63±0.52	1.75±0.46	1.13±0.35	0.88±0.35

①与卒中对照组比较 $P<0.05$

见图1(前置彩色插页7)。假手术组 Nissl 染色可见神经细胞形态正常、分布均一, 胞核居中, 尼氏小体染色清晰可见(图1 B); 缺血第3天时, 卒中训练组与卒中对照组均可见典型缺血性改变, 神经细胞肿胀或消失、形态分布不规则, 神经元细胞数明显减少, 尼氏小体溶解消失, 核仁偏位, 固缩或碎裂, 梗死灶与周边组织界限清楚(图1 A); 缺血第7天时, 卒中训练组可见梗死灶边缘区神经细胞的形态开始出现恢复, 水肿减轻, 胞核、尼氏小体淡染(图1 C); 至第21天时卒中训练组绝大多数神经元形态逐步恢复正常形态, 尼氏小体深染, 但仍可见少量变性的神经细胞聚集在一起(图1 E); 至第35天时卒中训练组可见神经元细胞形态规则, 细胞之间分布均一, 胞核位于中央, 尼氏小体清晰可见; 而卒中对照组各组间神经细胞修复缓慢, 至第21天时仍可见部分变性神经细胞聚集、胞体形态不一, 核移位(图1 F)。

2.3 透射电镜变化

假手术组: 神经元的细胞核呈卵圆形, 两层膜结构清晰, 核内染色质均匀分布; 胞质内线粒体、高尔基体、粗面内质网等细胞器结构完整(图2 A)。缺血第3天时, 卒中训练组与卒中对照组均可见梗死边缘区神经细胞水肿明显, 染色质凝集成块, 位于核膜下; 细胞核明显变形, 呈气球状; 线粒体肿胀, 内嵴大部分溶解消失, 空泡化; 高尔基体肿胀; 粗面内质网扩张, 表面核糖体脱落; 局部有水肿空白区(图2 B)。缺血第7天时, 卒中对照组可见梗死边缘区神经细胞水肿, 胞核固缩、碎裂, 线粒体、高尔基体和粗面内质网部分溶解, 出现空泡; 而卒中训练组: 神经细胞轻度水肿, 少量染色质凝集成块, 线粒体结构完整, 但内嵴减少, 胞浆粗面内质网及高尔基体轻度肿胀(图2 C、D)。缺血第21天, 卒中对照组可见大部分神经细胞固缩, 染色质疏松部分溶解, 粗面内质网扩张, 线粒体内嵴断裂溶解消失, 核糖体脱落; 卒中训练组则神经细胞核膜模糊, 可见线粒体结构清晰, 嵴模糊, 有少部分线粒体空泡样化尚未恢复(图2 E、F); 缺血第35天时, 卒中对照组可见水肿的神经细胞自然恢复, 核下仍有少量染色质凝集, 可见线粒体、高尔基体和粗面内质网, 形态小而不规则; 而卒

中训练组神经细胞核膜完整, 核下凝集的染色质稀少, 胞浆内细胞器丰富, 线粒体结构清晰, 但嵴还稍模糊, 粗面内质网表面核糖体丰富, 细胞水肿消失(图2 G、H)。

3 讨论

本研究在采用“线栓法”建立大鼠 MCAO 模型的基础上, 并选择 Bederson 神经功能 1—3 分的大鼠进入研究, 从而研究探讨康复训练在中枢神经系统损伤恢复过程中的影响及作用。本研究发现脑梗死的大鼠经使用自制滚筒、平衡木、转棒等方法强化训练其抓握、平衡与爬行等能力后, 训练组较对照组更能改善脑梗死大鼠的平衡试验与网屏试验的得分, 且随着训练时间的延长, 其得分逐步好转。造模术后第3天时, 卒中训练组与对照组之间平衡木试验、网屏试验的得分均无显著性差异, 于普通光镜及透射电镜下观察脑梗死边缘区发现神经细胞形态分布不规则, 数量减少, 且胞内细胞器严重水肿或消失, 胞核染色质凝集成块, 位于核膜下。这可能与缺血后造成梗死区域神经细胞大量坏死, 神经运动功能严重受损有关, 而且当时卒中训练组大鼠仅训练1天, 运动训练时间太短, 未能体现出康复训练的作用。至造模术后第7天时, 卒中训练组其抓握、行走及平衡能力较未训练组恢复明显, 在第21天与第35天组中尤为显著, 对应其在光镜及透射电镜超微结构的观察, 可见损伤的神经细胞形态已逐步恢复、核膜完整, 核下凝集的染色质稀少, 胞浆内细胞器丰富, 线粒体、粗面内质网结构清晰, 这提示康复训练有助于缺血性脑损伤后神经细胞的修复, 但需要一定的时间。至于对照组, 尽管未予强化的康复训练, 但其平衡木试验、网屏试验得分也在好转, 分析其原因, 一方面可能与脑梗死急性期的自然恢复有关, 其机制包括病灶周围脑水肿的消退、侧支循环的开放等; 另一方面对照组大鼠并未完全限制其活动, 它可以饮水、进食与自由活动, 尤其是大鼠生性好动, 这可能有利于其功能的恢复。Meythaler^[12]等学者认为, 在局灶性脑梗死研究实验中对脑组织形态学的观察在反映神经细胞的形态及功能上有重要意义, 脑卒

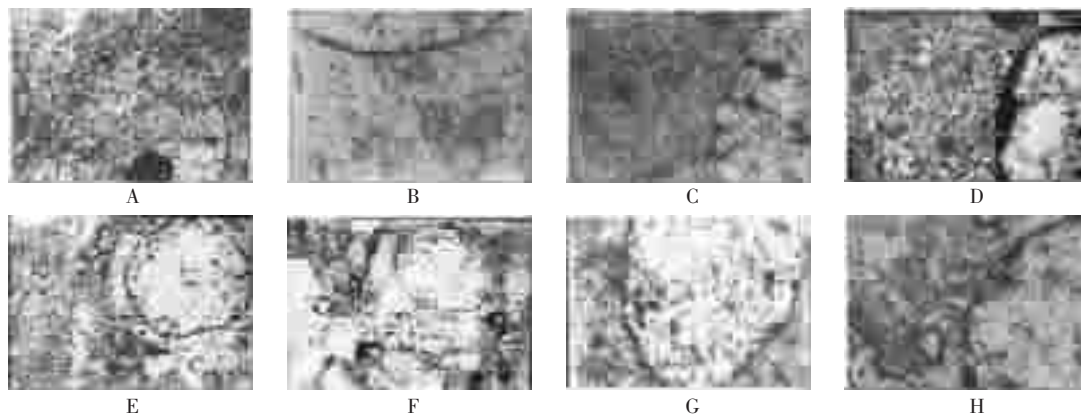


图2 皮质梗死灶边缘区不同时间点电镜观察

($\times 14000$)

A 假手术对照组神经细胞形态规则,细胞器丰富,结构清晰、完整;B 卒中第3天训练组与卒中第3天未训练组均可见梗死灶边缘神经细胞和线粒体严重水肿,细胞器数量减少;C 卒中第7天训练组可见梗死灶边缘神经细胞和细胞器轻度水肿,而D 卒中第7天未训练组的神经细胞及细胞器仍明显水肿;E 卒中第21天训练组梗死灶边缘神经细胞水肿减轻,胞浆细胞器结构清晰;F 卒中第21天未训练组则神经细胞及细胞器肿胀、结构模糊不清;G 卒中第35天训练组梗死灶边缘神经细胞水肿消失,胞浆细胞丰富、结构清晰,而H 卒中第35天未训练组的神经细胞水肿虽自然恢复,但胞浆内细胞器形态小而不规则。

中后神经运动功能的恢复取决于脑水肿的消退、坏死组织的吸收,以及远隔功能抑制或神经能联系不能的消失。Binenaskie^[11]等研究证实局灶性脑梗死大鼠进行丰富的运动训练后,神经功能恢复良好,脑梗死体积明显缩小;而贾子善等^[13-15]的研究也表明丰富的环境与功能训练可使皮质的突触数量增加。以上的实验结果都证明了康复训练能促使皮质梗死灶边缘区神经细胞功能的恢复,其机制一方面可能是促进了梗死灶周围某些保护性神经因子的分泌,较好地对抗兴奋性氨基酸毒性及氧自由基的损伤,抑制 Ca^{2+} 细胞内流、钙蛋白激酶的激活,稳定细胞内环境及促进树突中某种蛋白的合成,保护了缺血缺氧神经元,刺激和促进神经细胞树突分支、轴突再生,从而引起突触重塑、神经细胞功能的恢复与代偿^[11]。另一方面可能与康复训练能上调内皮细胞氧化亚氮合成酶的表达,改善血管内皮组织功能,促使血管发生,而新生形成的微血管能有效地改善脑组织缺血半影区的灌注,提高了局部脑血流循环,从而促使神经运动功能恢复。这已被 Karen Gertz 等^[16]的实验研究所证实:他们发现脑梗死大鼠经四周的自由跑步训练后梗死边缘区血管内新生的细胞增多,血流灌注的微血管密度增加;当用氧化亚氮合成酶抑制剂或抗血管生成药物处理后,运动训练刺激诱导血管生成的作用消失。

我们将进一步地探讨脑梗死后功能训练促进神经功能恢复的分子生物学机制,包括与神经可塑性密切相关的生长关联蛋白-43、突触囊泡蛋白,以及对缺血性脑损伤后神经细胞迟发性死亡的影响。

参考文献

[1] Komitova M, Johansson BB, Eriksson PS. On neural plasticity, new neurons and the postischemic milieu: an integrated view

- on experimental rehabilitation[J].Exp Neurol,2006,199:42—55.
- [2] Kreisel SH, Hennerici MG, Bazner H. Pathophysiology of stroke rehabilitation: the natural course of clinical recovery, use-dependent plasticity and rehabilitative outcome [J]. Cerebrovasc Dis, 2007,23:243—255.
- [3] Johansson BB. Brain plasticity and stroke rehabilitation [J]. Stroke, 2000,31:223—230.
- [4] Ding Y, Li J, Clark J, et al. Synaptic plasticity in thalamic nuclei enhanced by motor skill training in rat with transient middle cerebral artery occlusion [J]. Neurol Res,2003,25:189—194.
- [5] 谭来勋,孙圣刚,张双国,等.脑梗死大鼠运动训练后星形胶质细胞与突触和运动功能的变化[J].中华物理医学与康复杂志,2005,27(10):581—584.
- [6] 黄如训,张艳,方燕南,等.大鼠脑梗死后运动功能可塑性物质基础及发生机制[J].中华医学杂志,2000,80(10):769—772.
- [7] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J].Stroke, 1989,20:84—91.
- [8] Wang CX, Yang Y, Yang T, et al. A focal embolic model of cerebral ischemia in rats: Introduction and evaluation[J].Brain Research Protocols,2001,7:115—120.
- [9] Adela M, Jakub Otahal, Grygoriy T Senov, et al. Intrahippocampal injection of endothelin-1 in immature rats results in neuronal death, development of epilepsy and behavioral abnormalities later in life,European [J]. Journal of Neuroscience, 2006,24:351—360.
- [10] 徐莉,李玲,陈景藻,等.功能训练对大鼠脑梗死神经功能恢复的影响[J].中华物理医学与康复杂志,2000,22(2):86—88.
- [11] Binenaskie J, Corbert D. Enriched rehabilitative training promotes improved forelimb motor function and enhanced dendritic growth after focal ischemic injury [J]. J Neurosci, 2001,21:5272—5280.
- [12] Meythaler JM, Peduzzi JD, Eleftheriou E, et al. Current concepts:diffuse axonal injury associated traumatic brain injury [J]. Arch Phys Rehabil, 2001, 82 :1461—1471.
- [13] 贾子善,李阔,槐雅萍,等.不同环境干预对局灶性脑梗死大鼠行为学恢复的影响[J].中国康复医学杂志,2007,22(7):578—580.
- [14] 贾子善.努力探索脑卒中康复的最佳环境[J].中国康复医学杂志,2007,22(7):577.
- [15] 高俊淑,李阔,李娜,等.探索学习对局灶性脑梗死大鼠梗死灶周围皮质 BDNF 表达的影响 [J]. 中国康复医学杂志,2007,22(7):554—560.
- [16] Kanre G, Josef P,Golo K,et al. Physical activity improves long-term stroke outcome via endothelial nitric oxide synthase-dependent augmentation of neovascularization and cerebral flow[J].Circ.Res,2006,99:1132—1140.