

· 基础研究 ·

# 跑台训练对脑缺血大鼠脑组织超微结构及突触素表达的影响\*

刘 罡<sup>1</sup> 吴 毅<sup>1,2</sup> 胡永善<sup>1</sup> 贾 杰<sup>1</sup>

**摘要** 目的:研究运动训练对局灶性脑缺血大鼠脑组织超微结构及突触素表达的影响。方法:选取健康雄性 SD 大鼠 37 只,随机分为假手术组、缺血对照组和缺血加跑台训练组。线栓法阻断动物大脑中动脉血流 2h 制备局灶性脑缺血模型。术后 2 周,采用 Western blot 测定脑组织中突触素的表达;术后 4 周,透射电镜观察各组实验动物脑组织超微结构改变情况。结果:①与假手术组相比,缺血组和缺血加跑台训练组大鼠脑额顶叶皮质半暗区突触素含量显著升高( $P<0.01$ );其中跑台训练组升高明显,两组差异有显著性意义( $P<0.05$ )。②电镜观察显示缺血加跑台训练组大鼠脑组织超微结构损伤较轻,突触数目较多,突触形态基本正常。结论:运动训练可以减轻脑缺血性损伤程度,并可能通过增加脑组织突触素的表达,促进脑缺血性损伤后新生突触的形成。

**关键词** 跑台训练;超微结构;突触素;脑卒中

中图分类号:R743.3 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2008)-10-0872-03

**Influences of treadmill training on ultrastructure and synaptophysin expression in rats with focal cerebral ischemia/LIU Gang, WU Yi, HU Yongshan, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2008, 23(10): 872—874**

**Abstract Objective:**To evaluate the influences of treadmill training on cerebral ultrastructure and expression of synaptophysin in rats with focal cerebral ischemia. **Method:** Thirty-seven healthy male Sprague-Dawley rats were randomly divided into 3 groups: sham operation group, ischemic control group and treadmill training group. Temporary focal cerebral ischemia model was established by 2 hours middle cerebral artery occlusion. Western blot technique was used 2 weeks after operation to detect the expression of synaptophysin protein and transmission electron microscope was used 4 weeks after operation to observe the changes of cellular ultrastructure in ischemic penumbra. **Result:** ①The expression of synaptophysin in ischemic penumbra of frontal-parietal lobe increased remarkably in both ischemic control group and treadmill training group compared with that in sham operation group ( $P<0.01$ ) and there was statistical difference ( $P<0.05$ ) between two groups. ②The observation under electron microscope demonstrated that the severity of ischemic damage in treadmill training group was lighter than that in ischemic control group and there were more normal synapsis in treadmill training group. **Conclusion:** Treadmill training can alleviate the severity of cerebral ischemia and probably, promote the formation of new synapses after ischemia by increasing the expression of synaptophysin.

**Author's address** Dept. of Rehabilitation Medicine, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai, 200040

**Key words** treadmill training; ultrastructure; synaptophysin; stroke

缺血性脑卒中是目前严重危害人民健康的主要疾病,降低患者的生存质量,给家庭和社会带来了沉重的负担。研究表明,运动训练可以显著改善缺血性脑卒中所引起的功能障碍,提高患者的生存质量。功能的恢复必然有相应的形态变化作为基础,然而目前有关运动训练对缺血性脑损伤后脑组织超微结构改变的影响还鲜有报道。本研究建立大鼠局灶性脑缺血模型,通过透射电镜观察运动训练后大鼠脑组织超微结构的变化,并通过测定脑组织中突触素(synaptophysin, Syn)的含量,初步探讨运动训练影响缺血性损伤大脑超微结构变化的可能机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物及分组

健康 SD 雄性大鼠 37 只,体重 250—300g(由中国科学院上海实验动物研究所提供),随机分为 3 组:假手术组 10 只,缺血对照组 13 只,缺血加跑台

\* 基金项目:国家高新技术计划(863 计划)资助项目(编号:2007AA02Z482)

1 复旦大学附属华山医院康复医学科,复旦大学上海医学院康复与运动医学系,上海市乌鲁木齐中路 12 号,200040

### 2 通讯作者

作者简介:刘罡,男,在读研究生

收稿日期:2008-05-14

训练组 14 只。每组动物各有 6 只分别于术后 2 周取材测脑组织中 Syn 含量, 其余用于 4 周后透射电镜观察脑组织超微结构。

## 1.2 主要实验试剂

SDS(生工进口分装), TEMED(Promega), Syn 一抗 (SANT CRUZE), HRP 标记山羊抗兔二抗 (SANT CRUZE), Actin(SANT CRUZE)PVDF 膜 (Milipoler), 蛋白 Mark(中科院上海生物化学研究所监制)。

## 1.3 实验方法

**1.3.1 脑缺血动物模型的制备:** 用 10%水合氯醛 (0.3ml/100g 体重, 腹腔注射)麻醉大鼠后固定, 采用 Longa<sup>[1]</sup>颈动脉栓线法制备局灶性脑缺血再灌注模型。假手术组也插入线栓, 但深度小于 1cm, 不阻断大脑中动脉血流。术后 24h 对实验动物进行神经行为学评分, 将得分分为 2—4 分的动物纳入实验。

**1.3.2 运动训练:** 术后各组动物在标准大鼠饲养笼内饲养, 正常光照/黑夜节律, 自由进食、饮水。缺血加运动训练组大鼠每天跑台训练 60min, 20m/min, 早晚各 1 次, 30min/次。

**1.3.3 Syn 表达量检测:** 分别在各组样品中加入 PBS 溶液 100 $\mu$ l, 同时加入适当浓度的蛋白抑制剂 PMSF, 冰上超声波处理至组织完全分散, 然后采用 Bradford 比色法测定蛋白含量。将样品稀释至相同总蛋白含量, 取 100ml 样品加入 5 $\times$ SDS 上样缓冲液, 95 $^{\circ}$ C 处理 10min。每个样孔加样 30ml。接通电源, 以电压 120V、电流 60mA 电泳, 等到溴酚蓝跑出分离胶即停止电泳。小心将胶放入 100 ml 阴极缓冲液, 平衡 15min 用尺子量作胶的大小, 剪同样大小的一片 PVDF 膜, 用甲醇 (100%) 浸泡 15s, 再用双蒸水浸泡 2min, 取出用阳极缓冲液 II 平衡 10min 后用半干法转膜。转膜完成后, 小心将膜与胶及滤纸剥离, 将膜放入甲醇中 10s, 用镊子取出置于滤纸上, 待甲醇蒸干。用丽春红溶液检测转膜效率, 再用去离子水洗去丽春红。将膜在一抗中孵育 2h 后用 TTBS 洗 3 次, 继而在二抗中孵育 1h, 再用 TTBS 洗 3 次, 用 DBA 溶液显色。膜用 TANON GIS-2008 凝胶成像仪拍照并用天能 GIS 凝胶图像处理系统进行数据分析。

**1.3.4 透射电镜观察:** 大鼠麻醉后, 迅速断头取脑, 在梗死周边区取 1cm $\times$ 1cm $\times$ 1cm 大小的脑组织块 5 块; 用 2.5%磷酸缓冲戊二醛固定液固定 48h 及 1%锇酸固定 2h; 乙醇脱水, 丙酮置换, 环氧树脂包埋; 体视显微镜下修块, 甲苯胺蓝染色定位, 再修块并行超薄切片; 捞片于 200 目铜网上, 用醋酸双氧钨和铅染色完毕后蒸馏水洗涤, 自然干燥, 电镜下观察。

## 1.4 统计学分析

各组实验数据采用 SPSS13.0 软件进行统计学分析, 实验所得数据用均数 $\pm$ 标准差表示。

## 2 结果

### 2.1 额顶叶皮质缺血半暗区 Syn 的表达

单因素方差分析整体比较结果:  $F=18.128, P<0.01$ 。

组间两两比较。单纯缺血组 (3541.48 $\pm$ 766.52) 和缺血加跑台训练组 (4988.86 $\pm$ 999.2) Syn 的含量均高于假手术组 (2132.11 $\pm$ 391.44), 差异具有极显著性意义 ( $P<0.01$ ); 单纯缺血组和缺血加跑台训练组 Syn 含量差异具有显著性意义 ( $P<0.05$ )。见图 1。

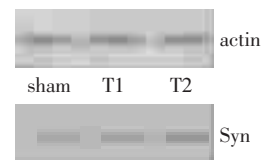


图 1 缺血 2 周, 额顶叶皮质缺血半暗区 Syn 的表达

### 2.2 透射电镜观察结果

假手术组大鼠 (图 2, 见前置彩色插页): 神经细胞胞体形态正常, 胞核较大, 呈圆形或椭圆形, 胞浆内细胞器丰富。线粒体呈长条形或椭圆形, 嵴排列规则; 粗面内质网丰富, 其上可见大量核糖体附着。轴突内细胞器丰富, 微丝、微管清晰可见。突触数目多, 前膜内可见大量囊泡聚集。

缺血对照组大鼠 (图 3, 见前置彩色插页): 神经细胞胞体及轴突水肿明显, 染色质凝集成块或溶解。细胞器稀少, 线粒体肿胀, 嵴变形扭曲, 甚至断裂; 粗面内质网扩张, 核糖体稀少或缺如, 高尔基体肿胀。突触数目减少, 突触间隙增宽, 突触囊泡减少甚至消失。

缺血加跑台训练组大鼠 (图 4, 见前置彩色插页): 电镜下观察到神经细胞轻度水肿, 但结构完整, 核膜清晰, 染色质较均匀; 细胞器丰富且形态较完整, 可见大量游离核糖体; 仍可以见到线粒体轻度水肿, 呈球状或梭形, 少数嵴断裂或消失; 轴突内可见较多微肿胀线粒体和少量微丝、微管; 轴突末梢可见大量囊泡, 突触数目多, 间隙正常, 突触后膜可见高电子致密物聚集。

## 3 讨论

近年来的基础和临床研究显示, 脑卒中后的各种功能训练可以改善脑卒中的功能预后<sup>[2-4]</sup>。功能的恢复必然有其相应的形态变化作为基础, 神经轴突的再生, 以及新生神经突触的形成即是脑损伤后功

能障碍恢复的基础之一<sup>[5]</sup>。在神经组织抗损伤的过程中,神经轴突的再生就已经开始。损伤后胞体增加了轴突再生所必需的结构和功能蛋白的合成,并加速这些新合成蛋白的轴浆转运。损伤性刺激在30—60min内就可以激活神经细胞核内c-fos、c-jun等即早反应基因(IEGs),它们表达的Fos与Jun能结合靶蛋白基因中启动子的相应位点,从而触发靶蛋白基因的表达,导致新的蛋白质合成和结构、功能的长时程变化<sup>[6-7]</sup>。成人神经组织受损后主要以侧支再生为主,即损伤区临近的正常神经元侧支发芽,向靶组织或其他神经元延伸,形成新的突触。利用现代神经组织化学染色方法观察不同时间运动训练对单侧大脑中动脉闭塞致偏瘫小鼠双侧大脑感觉运动皮质胆碱能阳性纤维数目变化的影响时发现:急性期短时间的运动训练(15d)未引起皮质胆碱能阳性纤维数的显著变化;但长时间持续训练组健侧胆碱能阳性纤维数目明显高于间断训练组和对照组;两运动组在训练结束后(90d后)患侧皮质胆碱能阳性纤维数显著增多,训练组皮质胆碱能纤维密度增高。本研究表明,长期的运动训练促进了胆碱能纤维的侧支发芽且健侧早于患侧。这些纤维数目的增加为损伤后功能的重组提供了有力的形态学支持<sup>[8]</sup>。脑缺血会导致损伤区微环境的变化,从而刺激神经的再生,但是中枢神经系统相对于外周神经而言再生能力低下也是必须要面对的事实。因此,寻找可以促进脑缺血性损伤后轴突再生的干预手段就显得尤为重要。有研究发现<sup>[9]</sup>,脑缺血后进行多种功能训练的大鼠运动及学习记忆能力有明显改善。本研究也表明,经过跑台运动训练的脑缺血大鼠与自然恢复对照组相比其缺血性损伤程度较轻,神经细胞胞器丰富,轴突形态更加完整,神经突触数目较多,突触间隙正常,提示运动训练可作为一种有效的干预手段减轻脑缺血所导致的神经组织损伤、促进缺血性损伤后的神经轴突再生和新突触的形成,从而促进脑缺血后功能障碍的恢复。

Syn(分子量38000)作为突触囊泡主要的跨膜蛋白之一,与突触结构和功能密切相关<sup>[10]</sup>。很多文献表明突触素对突触末梢神经递质的摄入和排出具有调控作用<sup>[11]</sup>,且其同时还参与突触囊泡的形成和再循环过程<sup>[12]</sup>。另外,Syn还被认为与突触的形成及维持突触的稳定有关<sup>[13]</sup>,其数量和分布密度可间接反映突触的密度<sup>[14]</sup>。Syn在成熟脑组织中高度集中在突触前轴突末梢内,突触重建时其表达明显增多,因此该蛋白被用于标记轴突末梢,作为突触重建的重要标志从而与神经可塑性密切相关。有研究表明机体

在缺血缺氧时<sup>[15]</sup>,能反映神经细胞代偿及重塑的Syn的表达和生成增加。本实验发现,与假手术组相比,脑缺血后2周单纯缺血组和缺血加跑台训练组大鼠额顶叶皮质缺血半暗区Syn的表达量皆显著增加,表明缺血性损伤本身作为一种强烈的刺激促进了缺血灶周围皮质Syn的表达,体现了机体对缺血性损伤的病理性保护反应;而与单纯缺血组相比,脑缺血后进行跑台训练的实验动物额顶叶皮质缺血半暗区Syn的表达量也有明显增多,结合运动训练组动物脑组织超微结构的改变,提示运动训练可能是通过增加Syn的表达促进了脑缺血后的神经轴突的芽生及新的突触的形成,从而使神经组织超微结构发生了相应的形态学变化。这一形态改变作为功能重塑的基础,促进了脑缺血后神经功能障碍的恢复。

### 参考文献

- [1] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989,20(1):84—91.
- [2] 马尚峰,胡昔权,宿宝贵.运动训练对局灶性脑梗死大鼠神经功能、细胞超微结构及突触小泡蛋白表达的影响[J].暨南大学学报,2007,28(6):566—571.
- [3] 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[J].中国康复医学杂志,2008,23(2):100—102.
- [4] 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[J].中国康复医学杂志,2007,22(7):605—608.
- [5] 缪鸿石.中枢神经系统(CNS)损伤后功能恢复的理论(二)[J].中国康复理论与实践,1996,1—5.
- [6] Mitchell PJ, Tjian R. Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins [J]. *Science*, 1989,245(4916):371—378.
- [7] Gonzalez GA, Montminy MR. Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133[J]. *Cell*, 1989,59(4):675—680.
- [8] 王茂斌,主编.脑卒中的康复医疗[M].北京:中国科学技术出版社,2006,22—29.
- [9] 杨敏,李涛,余茜.运动训练对脑梗死大鼠行为学及突触形态结构参数的影响[J].中国康复医学杂志,2007,(1):24—27.
- [10] Wiedenmann B, Franke WW. Identification and localization of synaptophysin, an integral membrane glycoprotein of Mr 38,000 characteristic of presynaptic vesicles [J]. *Cell*, 1985,41(3):1017—1028.
- [11] Valtorta F, Pennuto M, Bonanomi D, et al. Synaptophysin: leading actor or walk-on role in synaptic vesicle exocytosis[J]? *Bioessays*, 2004,26(4):445—453.
- [12] Daly C, Sugimori M, Moreira JE, et al. Synaptophysin regulates clathrin-independent endocytosis of synaptic vesicles [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000,97(11):6120—6125.
- [13] Tarsa L, Goda Y. Synaptophysin regulates activity-dependent synapse formation in cultured hippocampal neurons [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002,99(2):1012—1016.
- [14] Saito S, Kobayashi S, Ohashi Y, et al. Decreased synaptic density in aged brains and its prevention by rearing under enriched environment as revealed by synaptophysin in contents [J]. *Neuroscience Res*, 1994,39(1):57—62.
- [15] Martinez G, Di Giacomo C, Carnazza ML, et al. MAP2, synaptophysin in immunostaining in rat brain and behavioral modifications after cerebral postischemic reperfusion [J]. *Dev Neurosci*, 1997,19(6):457—464.