

康复训练对脑梗死大鼠微血管超微结构及 CD31 表达的影响

胡昔权 郑海清 燕铁斌 潘三强 马尚峰

【摘要】 目的 研究康复训练对脑梗死大鼠梗死边缘区微血管生成及其超微结构以及血小板内皮细胞黏附分子-1 (CD31) 表达的影响。方法 采用线栓法制作大鼠左侧大脑中动脉闭塞 (MCAO) 模型。60 只成年 SD 大鼠随机分成康复训练组 ($n=30$) 和对照组 ($n=30$)。另选 6 只大鼠作为假手术组。康复训练组从术后 48 h 开始每天予以转棒、平衡木、滚筒等训练; 对照组和假手术组则置于普通笼内饲养, 不予以任何针对性训练。3 组大鼠在造模术后第 3, 7, 14 天灌注、固定并取材, 以透射电子显微镜观察脑梗死边缘区微血管的形态学改变; 同时采用 CD31 标记微血管, 以免疫组织化学法及免疫印迹法检测梗死边缘区 CD31 蛋白的表达。**结果** ①透射电镜观察下, 康复训练组大鼠随着训练时间的延长其梗死边缘区的毛细血管内皮细胞水肿情况减轻, 细胞核及核仁的形态逐渐恢复, 基底膜层的吞饮小泡明显减少, 优于对照组。②康复训练组与对照组大鼠脑梗死边缘区标记微血管的 CD31 于造模术后第 3 天均有表达, 第 7 天达峰值, 第 14 天 CD31 的表达明显回落; 康复训练组各时间点 CD31 表达均高于对照组, 统计学分析显示, 于造模后第 7 天时 2 组差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** 康复训练能促进脑梗死边缘区微血管超微结构的恢复及新生血管的生成, 这可能是康复训练促进受损神经功能恢复的机制之一。

【关键词】 脑梗死; 康复训练; 血管生成; 大鼠

The effects of rehabilitation training on microvessel ultrastructure and expression of CD31 in rats with focal cerebral infarction HU Xi-quan*, ZHENG Hai-qing, YAN Tie-bin, PAN San-qiang, MA Shang-feng. * Department of Rehabilitation Medicine, the Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China
Corresponding author: YAN Tie-bin, Email: dr.yan@126.com

【Abstract】 Objective To study the effects of rehabilitation training on angiogenesis and its ultrastructure and expression of CD32 in the peri-infarction region of rats with focal cerebral infarction. **Methods** Sixty-six Sprague-Dawley rats with experimental left middle cerebral artery occlusion (MCAO) were used as subjects in this study. All the rats were randomly divided into three groups: a rehabilitation training group ($n=30$), which was given bar rotating, balancing and rolling exercises everyday after 48 hours post MCAO; a control group ($n=30$) and a sham-operated group ($n=6$), which were fed in cages with no special training exercises. Then brain tissues were fixed on the 3rd d, 7th d, 14th d after MCAO, for observing the morphological alterations of microvessels in peri-infarction region using transmission electron microscope, immunohistochemistry and Western blotting were used to measure the expression of CD31, which acted as the marker of the neogenetic microvessels. **Results** (1) It showed that the capillary endothelial cells were less edematous in the rehabilitation training group, and there were less pinocytosis bullae in basal membrane more integral nucleus of endothelial cells in rehabilitation training group when compared with those in the control group. (2) Expression of CD31 can be observed in peri-infarction region in both groups from the 3rd d onwards, and peaked on the 7th d, and then gradually went down after the 14th d. Comparison between the 2 groups showed that the expression of CD31 in rehabilitation training group was higher than that in the control group at every time point, but statistical difference between the 2 groups in this regard could be revealed only on the 7th d ($P < 0.05$). **Conclusion** Rehabilitation training could promote ultrastructural recovery of microvessels and induce angiogenesis in peri-infarction region, and it might be one of the mechanisms of neural functional recovery in rats after MCAO.

【Key words】 Cerebral infarction; Rehabilitation training; Angiogenesis; Rat

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2009.02.001

基金项目:广东省自然科学基金(31751)

作者单位:510630 广州,中山大学附属第三医院康复医学科(胡昔权、郑海清);中山大学附属第二医院康复医学科(燕铁斌);暨南大学医学院解剖学教研室(潘三强、马尚峰)

通信作者:燕铁斌, Email: dr.yan@126.com

脑卒中因其高致残率及高死亡率而被认为是严重威胁现代人类健康的重大疾病^[1]。研究证明,早期康复训练可以改善脑卒中患者的感觉运动功能和行为能力,有助于提高患者的生活质量,但其具体机制仍不清楚。有关康复训练促进功能恢复的机制探讨,目前国内外的实验研究大多侧重于神经可塑性及功能重组方面,而对脑梗死边缘区微血管方面的研究甚少。事实上,机体为了代偿缺血性脑损伤,相应的组织器官常自发地提高氧和能量物质的输送,其中一个潜在的机制就是通过诱导血管生成从而提高局部脑组织的血液供应^[2]。血管生成(angiogenesis)是指通过先前存在于血管的内皮细胞出芽、迁移、增殖而最终形成新生血管的过程^[3]。本实验在建立大鼠局灶性脑梗死模型的基础上进行康复训练,通过对梗死边缘区微血管超微结构的动态观察及血小板内皮细胞黏附分子-1(platelet endothelial cell adhesion molecule-1, PECAM-1, 又称 CD31) 表达的检测,探讨康复训练对脑梗死边缘区微血管超微结构及微血管生成的影响,试图为康复训练促进神经功能恢复的机制提供依据。

材料与方法

一、实验动物模型建立与分组

实验采用清洁级成年 Sprague-Dawley (SD) 雄性大鼠 90 只,体重(180 ± 20) g,由广东省医学实验动物中心提供,合格证号 SCXK(粤)2003-0002。选取 80 只,以 3.5% 水合氯醛(350 mg/kg 体重)行腹腔注射麻醉,参照 Zea-Longa 线栓法^[4]制作大鼠永久性左侧大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型。于 MCAO 术后 6h 采用 Bederson 等^[5]制定的标准进行神经功能评分,选取分值为 1~3 分的大鼠纳入本研究。将符合要求的 MCAO 大鼠 60 只,随机分为康复训练组和对照组,每组 30 只,分别于术后第 3 天、第 7 天和第 14 天进行观察;各组根据观察时间点再随机分为 3 个亚组,每个亚组 10 只。另选 6 只大鼠作为假手术组,只暴露、分离血管与神经,缝合皮肤后置于普通笼内饲养,于上述相应时间点固定、取材,进行匹配观察。

二、康复训练方法

各组大鼠手术或假手术后均置于普通笼内饲养(每笼 3~4 只)。康复训练组于造模术后 48 h 开始按照以下方法进行康复训练^[6,7]。

1. 平衡木训练:取一长 170 cm、宽 2 cm 的方木棒,平放于距地面 7 cm 高的支架上,让大鼠在上面爬行。主要训练大鼠的爬行及平衡功能。

2. 转棒训练:取一长 150 cm、直径 4.5 cm 的圆木棒,按 3 r/min 的速度顺、逆时针交替转动,让大鼠在

上面爬行。主要训练大鼠的动态平衡能力。

3. 自制滚筒训练:训练器长 100 cm,直径 60 cm,中间分成 4 格,底座有一固定架,一端有一手摇柄,按 5 r/min 的速度转动,大鼠在其中爬行。主要训练大鼠的抓握、旋转等运动功能。

上述各项训练的强度按循序渐进的原则进行。通常情况下,各项训练每次 10 min,每日 2 次,每周 6 d。大鼠造模后第 1 周训练强度减半,此时大鼠肢体瘫痪明显,实验人员可给予必要的辅助。

对照组和假手术组大鼠不予上述任何针对性强化训练,但可以在笼内饮水、进食、自由活动。

三、取材与微血管超微结构观察

具体步骤方法参照文献^[7],大鼠以 3.5% 水合氯醛(350 mg/kg 体重)行腹腔注射麻醉,开胸暴露心脏,0.2 ml 肝素抗凝,用 4℃ 生理盐水 150 ml 快速冲洗,2.5% 戊二醛和 4% 多聚甲醛固定液先快后慢灌注固定 30 min。于脑组织梗死边缘区(包括顶叶皮质、海马、纹状体)取约 1.5 mm × 1.5 mm × 1.5 mm 大小的组织块,用 2.5% 磷酸缓冲戊二醛固定液后固定,0.1 mol/L 磷酸缓冲液冲洗,1% 锇酸固定 2 h,梯度乙醇脱水,丙酮置换,浸透后用 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 透射电镜下观察微血管超微结构的变化。

四、CD31 免疫组化染色及微血管计数

1. 免疫组化步骤:连续冠状冰冻切片(厚 20 μm),裱片后用 PBS 冲洗 3 次,每次 5 min;室温下滴加 0.3% Tritonx-100,作用 20 min 后用 PBS 冲洗 3 次,每次 5 min;采用福州迈新试剂公司提供的 SP 试剂盒,按试剂盒操作说明书进行染色,一抗(CD31, 1:100, Abcam 公司);二甲苯联苯胺显色,镜下控制显色时间;梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。

2. 微血管计数方法:显微镜下,呈棕黄色的阳性血管内皮细胞或内皮细胞簇与临近的微血管、神经细胞或其它结缔组织分开,就视为一个能计数的微血管。按 Weidner 等^[8]介绍的计数方法,每张切片在梗死边缘区周边随机选取 5 个高倍镜(×200)视野进行微血管计数,计算出每 mm² 面积内的微血管数,即微血管密度(microvessel density, MVD),然后取其平均值。

五、免疫印迹方法检测 CD31 蛋白表达

1. 脑组织蛋白提取:取大鼠梗死灶边缘区组织,称量湿重;按 100 mg/ml 添加蛋白抽提液,用匀浆器反复匀浆组织块,至成匀浆液,迅速用超声组织破碎仪破碎组织,置冰浴中静置 30 min;再置于低温离心机中,于 4℃ 下,以 12 000 r/min 离心 15 min,吸取上清液,于 -80℃ 超低温冰箱保存备用。

2. 检测方法:通过聚丙烯酰胺凝胶电泳方法进行蛋白电泳、转膜、免疫反应(一抗为 CD31, 1:500, Abcam 公司),化学发光法显色,并以 β -actin 蛋白为内参对照。采用 ultr-lum8.0 凝胶成像分析系统拍照并扫描图像,对其光密度值(optical density, OD)进行分析比较。

六、统计学分析

数值用($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 11.0 版软件进行数据统计分析,行单因素方差分析比较造模术后不同时间点各组之间微血管密度值及 CD31 蛋白光密度值, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

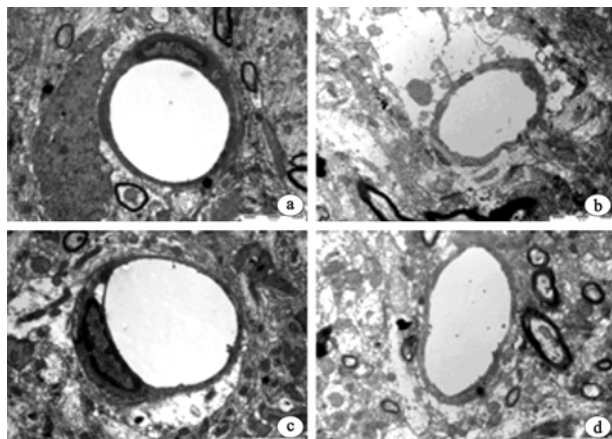
结 果

一、大鼠脑梗死边缘区微血管透射电镜观察结果

假手术组大鼠的毛细血管管腔规则,内皮细胞、细胞核正常,核仁丰富,基底膜结构清晰(图 1a)。

在造模术后第 3 天时,康复训练组与对照组均可见梗死边缘区的毛细血管内皮细胞明显水肿,核缩小变性,核仁不清,基底膜层出现大量吞饮小泡;血管外周可见水肿空白区(图 1b)。

造模术后第 7 天和 14 天,康复训练组大鼠梗死边缘区的毛细血管内皮细胞水肿均较对照组有所减轻,内皮细胞胞核的形态逐渐恢复,但基底膜层结构仍模糊不清(图 1c 和图 1d)。



注:a 假手术组可见少量的毛细血管,其内皮细胞及基底膜层结构清晰;b 对照组第 3 天可见毛细血管大小不一,内皮细胞明显水肿,细胞间紧密连接严重破坏,基底膜层出现大量吞饮小泡;c 康复训练组第 7 天可见毛细血管的内皮细胞水肿较对照组轻,基底膜层结构逐渐恢复;d 对照组第 7 天可见毛细血管的内皮细胞仍明显水肿,基底膜层结构模糊不清

图 1 脑梗死边缘区微血管透射电子显微镜观察($\times 12\ 500$)

康复训练组与对照组在造模术后各时间点进行比较发现,康复训练组大鼠梗死灶边缘区的微血管较对照组恢复好,内皮细胞的水肿明显减轻,内皮细胞、胞核及核仁的形态逐渐恢复正常。

二、大鼠脑梗死边缘区 CD31 免疫组化结果

1. 大鼠梗死边缘区 CD31 表达情况:标记微血管的 CD31 阳性产物主要位于梗死边缘区,为浅棕色至深棕色或棕黄色颗粒,或呈条索状。梗死灶对侧大脑半球及假手术组大鼠免疫组化染色的切片背景清晰,未见阳性表达或仅见弱阳性表达(图 2a)。

康复训练组大鼠在造模术后第 3 天,梗死边缘区 CD31 阳性标记的微血管已经形成,组织切片中微血管清晰可见,染色深,血管密集、迂曲、不规则;造模术后第 7 天最明显,第 14 天梗死边缘区微血管的生成较造模术后第 7 天明显减少,但仍较对照组多(图 2b ~ d)。

对照组大鼠造模术后第 3 天,虽也可见梗死边缘区微血管形成,但部分切片仅见血管呈条索状,或内皮细胞深染成团;于造模术后第 7 天进一步增多,而第 14 天梗死边缘区微血管的生成较造模术后第 7 天明显减少(图 2e ~ g)。

2. 大鼠脑梗死边缘区 MVD 情况:大鼠脑梗死后第 3 天时,康复训练组与对照组均可见梗死灶边缘区微血管生成,并于造模术后第 7 天达到高峰,第 14 天微血管的生成较前明显减少。对 2 组大鼠梗死边缘区 MVD 值进行比较,可见康复训练组均较对照组高,统计学分析显示,造模术后第 7 天两者间的差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

表 1 康复训练组和对照组脑梗死边缘区 MVD 值比较(个/ mm^2 , $\bar{x} \pm s$)

组 别	n	第 3 天	第 7 天	第 14 天
康复训练组	30	30.25 \pm 1.70	44.50 \pm 1.67 ^a	25.38 \pm 1.69
对照组	30	26.50 \pm 1.89	35.63 \pm 2.08	22.13 \pm 1.53

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$

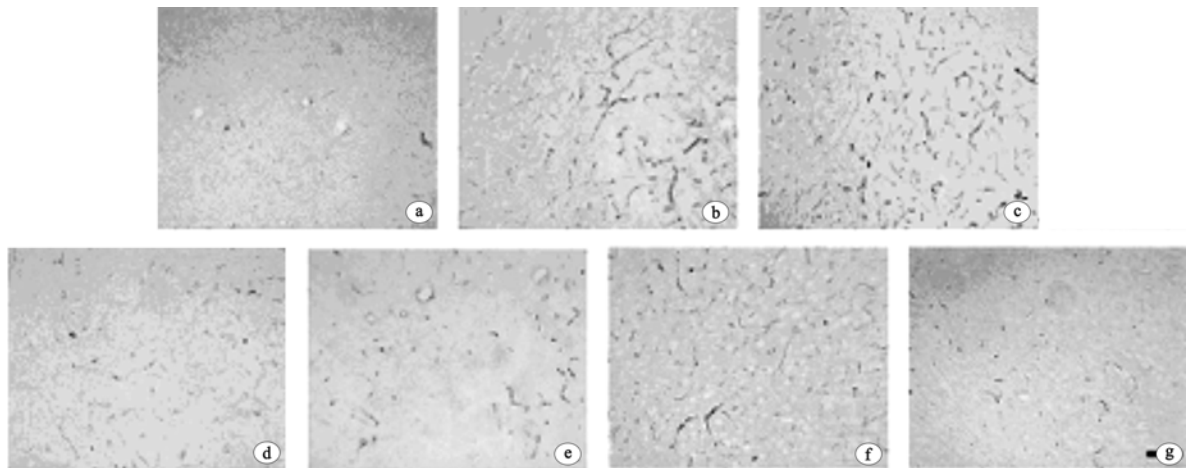
三、大鼠脑梗死边缘区 CD31 蛋白免疫印迹结果

假手术组大鼠 CD31 的蛋白仅微弱表达。康复训练组大鼠在造模术后第 3 天,CD31 蛋白表达增高,并高于假手术组;第 7 天蛋白水平达到高峰,第 14 天蛋白水平明显回落(图 3)。对照组大鼠的 CD31 蛋白水平也于造模术后第 3 天上调,第 7 天进一步增高,第 14 天明显下降(图 3)。对 2 组大鼠梗死边缘区 CD31 蛋白的 OD 值进行比较发现,康复训练组均较对照组高,造模术后第 7 天两者间的差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 2。

表 2 康复训练组和对照组大鼠脑梗死边缘区 CD31 蛋白水平 OD 值比较($\bar{x} \pm s$)

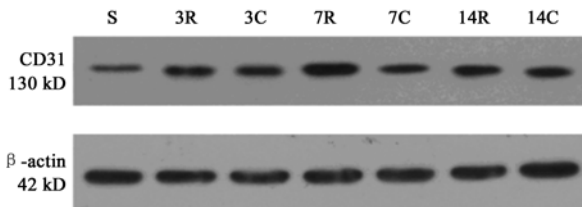
组 别	n	第 3 天	第 7 天	第 14 天
康复训练组	30	3.44 \pm 0.63	5.62 \pm 0.48 ^a	3.89 \pm 0.75
对照组	30	2.28 \pm 0.50	3.36 \pm 0.51	2.61 \pm 0.82

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$



注:a 假手术组免疫组化染色切片未见阳性微血管表达;b 康复训练组第 3 天可见梗死边缘区的微血管已大量生成;c 康复训练组第 7 天可见微血管的生成最明显;d 康复训练组第 14 天微血管的形成较前明显减少;e 对照组第 3 天可见梗死边缘区微血管已生成;f 对照组第 7 天可见微血管的生成有所增多,但明显少于康复训练组;g 对照组第 14 天微血管的生成明显减少

图 2 脑梗死边缘区 CD31 的微血管检测结果(免疫组化染色, ×200)



注:S 表示假手术组,R 表示康复训练组,C 表示对照组;康复训练组大鼠第 3 天 CD31 蛋白的水平已明显上调表达,且高于假手术组水平;第 7 天 CD31 的表达水平进一步增高,第 14 天蛋白的表达水平明显回落;以 β -actin 蛋白为内参对照,对康复训练组与对照组 CD31 蛋白水平的光密度值进行比较,仅于第 7 天 2 组间的差异有统计学意义

图 3 脑梗死边缘区 CD31 蛋白免疫印迹结果

讨 论

脑梗死发生后,由于受损区域脑血流循环供应阻断,氧和能量物质输送缺乏,最终导致神经细胞的缺氧和坏死。理论上,通过诱导梗死边缘区的血管生成而提高脑血管的密度,以及促进梗死边缘区血管结构的修复,均有助于恢复缺血脑组织的血液供应,有利于梗死边缘区神经细胞的存活。

本研究通过透射电子显微镜观察发现,康复训练组大鼠脑梗死边缘区的毛细血管内皮细胞水肿较对照组明显减轻,且随着训练时间的延长,毛细血管的内皮细胞、胞核及基底膜层结构也逐步恢复,这提示康复训练能促进梗死边缘区微血管结构的恢复,从而起到一定的微血管保护作用。

本研究用来标记微血管的 CD31,又名血小板内皮细胞黏附分子-1(PECAM-1),其分子质量为 130 kD,属于免疫球蛋白超家族成员,在发育中和成熟个体的所有血管内皮细胞中都有高度表达,因此 CD31 常被用作

血管内皮细胞的可靠标志物^[9]。本研究中,用免疫组化和免疫印迹(western blotting)方法同时检测 CD31 蛋白水平,结果基本相同,从而保证了实验结果的可靠性。大鼠脑梗死边缘区的 CD31 及其蛋白表达水平显示:康复训练组与对照组大鼠脑梗死边缘区的 CD31 于造模术后第 3 天已有大量表达,并于第 7 天达到高峰,至第 14 天时明显回落。Hayashi 等^[10]的研究表明,脑缺血后血管生成于 3~7 d 内达到高峰,并持续至 21 d 或更长时间,与本研究的结果相似。虽然上述两组大鼠 CD31 表达规律相似,但康复训练组各时间点 CD31 的表达均高于对照组,而且第 7 天差异有统计学意义。对照组出现 CD31 的表达是由于缺血作为一种刺激本身也能诱导血管生成,在此基础上,随着康复训练的介入,康复训练组大鼠梗死边缘区的微血管大量增生、形成,这提示康复训练对脑梗死后新生血管的生成有一定的促进作用。

至于脑梗死后康复训练促使血管生成的机制,目前仍不甚清楚。Gertz 等^[11]的实验发现,脑梗死大鼠经 4 周自由跑步训练可通过激活内皮细胞一氧化氮合成酶信号通路,诱导内皮前体细胞增殖,改善内皮组织及脉管系统功能,从而促使新生血管形成;当他们使用一氧化氮合成酶抑制剂或抗血管生成的药物处理后,或采用内皮细胞一氧化氮合成酶表达缺陷的大鼠进行此研究时,运动训练诱导血管生成的作用消失了。另一些研究发现,脑梗死后血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)大量表达,并通过 VEGF 及其受体系统促进血管的发生^[12,13],而 VEGF 是一种能促使血管生成的有丝分裂原,在血管生成中起到关键的作用^[14-16]。Hayashi 等^[10]进一步证实,VEGF 在缺血再灌注 1 h 后开始大量表达,3 h 达到高峰;与此同

