

# 康复训练对脑梗死大鼠梗死灶周围 Nogo-A 表达的影响

段淑荣 孙林琳 杨昆鹏 王春燕 沈月娥 王德生 张黎明

**【摘要】** 目的 研究康复训练对大鼠脑梗死灶周围白质 Nogo-A 表达的影响。方法 采用完全随机化方法将 60 只 Wistar 大鼠分成康复训练组和造模对照组, 每组 30 只, 应用 Longa 颈外动脉线栓法制备大鼠大脑中动脉闭塞模型。康复训练组大鼠每天进行滚筒、平衡木、转棒及网屏训练, 时间共 1 h; 造模对照组置于普通笼中自由活动。每组分别于造模后 3, 7, 14, 21 和 28 d 5 个时间点随机选取 6 只大鼠进行行为学评估后处死, 取脑组织采用免疫组织化学方法观察每个时间点脑梗死灶周围白质 Nogo-A 的表达。结果 ① 康复训练组术后 14, 21 和 28 d 行为学评分明显低于造模对照组, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。② 2 组大鼠 Nogo-A 阳性细胞于脑缺血 7 d 后开始增加, 21 d 达高峰; 脑缺血 14 d, 21 d 和 28 d 时间点, 康复训练组 Nogo-A 阳性细胞的表达水平明显低于造模对照组, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。结论 康复训练能通过减少脑梗死大鼠梗死灶周围 Nogo-A 的表达, 减低其对神经轴突生长抑制作用, 从而促进脑梗死后神经功能的恢复。

**【关键词】** 脑梗死; 康复训练; Nogo-A; 神经再生

**The effects of rehabilitation training on the expression of Nogo-A in the area surrounding cerebral infarction** DUAN Shu-rong\*, SUN Lin-lin, YANG Kun-peng, WANG Chun-yan, SHEN Yue-e, WANG De-sheng, ZHANG Li-ming. \*Department of Neurology, the First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, China

**【Abstract】 Objective** To study the effects of rehabilitation training on the expression of Nogo-A around the area of cerebral infarction using rats. **Methods** A total of 60 Wistar rats were randomly divided into a rehabilitation group and a control group after an experimental cerebral infarction had been established in them. The animals in the rehabilitation group were given exercise with a rotating bar, a balance beam and a rolling cage for one hour daily, while those in the control group were caged without any abnormal exercise. Nogo-A expression in the area surrounding the infarcts was detected by immunohistochemical techniques at the 3rd, 7th, 14th, 21st and 28th day after infarction. Meanwhile, neurobehavioral evaluations were also conducted. **Results** The animals in the rehabilitation group scored much lower than the controls in the behavioral evaluations at the 14th, 21st and 28th day. The expression of Nogo-A in tissues around the infarcted area increased by the 7th day and peaked at the 21st day in both groups, but the expression of Nogo-A was significantly stronger in the rehabilitation group at the 14th, 21st and 28th days. **Conclusion** Rehabilitation training decreased the expression of Nogo-A in the brain of rats after infarction. This may have important implications for the functional recovery of the central nervous system.

**【Key words】** Cerebral infarction; Rehabilitation; Nogo-A; Neural regeneration

近年来有关康复治疗的大量行为学研究证实, 康复训练有利于脑卒中后患肢运动功能的恢复, 其机制可能与轴突联系的重塑相关<sup>[1, 2]</sup>。Nogo-A 是近年发现的一种中枢神经系统 (central nervous system, CNS) 髓鞘相关的轴突生长抑制蛋白。多项体内外实验证实<sup>[3-7]</sup>, 抑制 Nogo-A 活性可以明显促进 CNS 损伤后轴突的再生及肢体功能的恢复, 因此 Nogo-A 被

认为是抑制 CNS 结构重塑与再生的主要因子。脑梗死后梗死灶周围 Nogo-A 阳性细胞明显增多, 且从形态及免疫学特征上多表现为少突胶质细胞。本实验通过对大脑中动脉闭塞 (middle cerebral artery occlusion, MCAO) 大鼠进行早期强制性康复训练, 用免疫组化的方法研究大鼠梗死灶周围白质 Nogo-A 表达的变化, 依此探讨康复训练对 MCAO 大鼠患肢功能恢复的有效机制。

## 材料和方法

### 一、实验动物和材料

基金项目: 黑龙江省自然科学基金资助项目 (D2004-07)

作者单位: 150001 哈尔滨, 哈尔滨医科大学附属第一医院神经科 (段淑荣、孙林琳、王春燕、沈月娥、王德生、张黎明), 血液内科 (杨昆鹏)

一级 Wistar 大鼠 60 只, 雄性, 体重 (250 ± 30) g, 鼠龄 3 个月, 由哈尔滨医科大学动物试验中心提供。

一抗为 Nogo-A (1:300), Santa Cruz 生物技术公司; 二抗为 PV6000, 北京中杉金桥生物技术公司。

## 二、大鼠 MCAO 模型制备及动物分组

60 只大鼠随机分为康复训练组及造模对照组, 每组 30 只。2 组均采用改良的 Longa 颈外动脉线栓法<sup>[8]</sup>制备 MCAO 模型。造模成功的标志为: 动物苏醒后右眼出现 Horner's 征及左侧肢体偏瘫。剔除不合格大鼠, 随时补充模型动物以保证每组 30 只。

## 三、康复训练器材与方法

造模对照组大鼠术后置普通笼中饲养, 不予以任何康复训练。康复训练组大鼠术后每天置于滚筒式网状训练器内进行转动训练、平衡木上行走训练、转棒上转动训练及网屏抓握训练, 每项 15 min, 共 1 h。

1. 滚筒式网状训练器: 长 100 cm、直径 60 cm 的圆形网状仪器, 底座有一固定架, 一端有一手摇柄, 可手摇按 5 r/min 进行转动训练。大鼠于该仪器内可进行抓握、旋转、行走等运动训练。

2. 平衡木训练: 采用长 170 cm、宽 2 cm 的方木棒, 平放在距地面 7 cm 处, 让鼠在木棒上行走, 训练其平衡功能。

3. 转棒训练: 取长 150 cm、直径 4.5 cm 的圆木棒一根, 中点固定在 3 r/min 的转动器上, 以顺时针、逆时针方向交替转动, 训练大鼠的动态平衡功能。

4. 网屏训练: 网屏为 50 cm × 40 cm 网带, 网眼为 1 cm × 1 cm, 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, 然后缓缓地将一端抬高, 在 2 s 内转为垂直位并保持 5 s, 以训练大鼠前爪抓握能力及肌力。

## 四、行为评估方法

2 组大鼠分别于造模后 3, 7, 14, 21 和 28 d 5 个时间点 (每个时间点随机选出 6 只大鼠) 进行下列行为评估, 同时计算每只大鼠各项评分之和的平均值, 作为其综合评分。

1. 神经功能评定: 神经功能评估参照 Strittmatter<sup>[7]</sup>等制定的标准进行评分。未见行为缺陷为 0 级, 计 0 分; 前肢屈曲 (即提尾悬空试验阳性) 为 1 级, 计 1 分; 侧推抵抗力下降 (即侧向推力试验阳性), 伴前肢屈曲, 无转圈行为为 2 级, 计 2 分; 侧推抵抗力下降, 伴前肢屈曲, 和自发性旋转为 3 级, 计 3 分。

2. 平衡木行走评分<sup>[8]</sup>: 大鼠能跳上横木, 在上面行走不跌倒为 0 分; 大鼠能跳上横木, 在上面行走跌倒机会小于 50% 为 1 分; 大鼠能跳上横木, 在上面行走跌倒机会大于 50% 为 2 分; 大鼠在健侧后肢帮助下能

跳上横木, 但患侧后肢不能帮助其向前移动为 3 分; 大鼠在平衡木上不能行走, 但可坐在上面为 4 分; 将鼠放在平衡木上即会掉下为 5 分。

3. 转棒上行走评分<sup>[8]</sup>: 转动过程中鼠可在转棒上行走为 0 分; 转动过程中鼠不会掉下, 且持续时间达 60 s 以上为 1 分; 转动开始后鼠从转棒上掉下为 2 分; 转动开始前大鼠就从棒上掉下为 3 分。

4. 网屏试验<sup>[8]</sup>: 大鼠前爪抓住网屏可达 5 s, 且不滑落为 0 分; 大鼠暂时握住网屏, 滑落一段距离, 但未掉下为 1 分; 大鼠在 5 s 内掉下为 2 分; 网屏转动时大鼠即掉下为 3 分。

## 五、免疫组织化学分析

2 组大鼠于各时间点的行为评定结束后, 经 10% 水合氯醛 (3.5 ml/kg 体重) 腹腔注射麻醉, 经升主动脉插管, 灌注 0.85% 生理盐水 200 ml, 再灌注 50 ml 4% 多聚甲醛固定液 (pH 值 = 7.4, 0.1 mol/L PBS 配制), 最后滴注 150 ml 上述固定液, 断头取脑, 在视交叉前后 2 mm 范围内冠状取材, 经石蜡包埋、HE 染色后, 光镜下到明显梗死灶者选出, 以备免疫组化分析使用。

将石蜡包埋的脑组织切成 5 μm 厚组织片 (每只动物模型 1 张切片, 共 60 张), 裱于经多聚赖氨酸处理的清洁玻片上, 60℃ 烤箱内烘烤 2 h 后放于 4℃ 冰箱内备用。石蜡切片经二甲苯脱蜡 (40 min × 3 次) 后, 依次经过 100%、95%、80% 乙醇脱水; 3% 过氧化氢 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 阻断内源性过氧化物酶 10 min; 抗原热修复后, 滴加一抗, 37℃ 孵育 60 min; 滴加二抗, 37℃ 孵育 15 min; 滴加 DAB 显色剂, 显微镜下观察至显色较好时, 置于自来水中终止显色; 依次经苏木素复染, 2% 盐酸乙醇分色, 蓝化; 经 80%、95%、100% 乙醇脱水, 二甲苯透明, 最后封片, 贴标签备查。

## 六、图像及统计学分析

每张切片于 10 × 40 放大倍数下, 从每组各标本的每张切片随机选 5 个视野 (避开白质区神经核团), 统计出每个视野内呈现少突胶质细胞形态的 Nogo-A 阳性细胞数, 不论染色程度, 凡显色者为阳性, 故每个时间点有 30 个视野。应用 SPASS 10.0 统计软件包对数据进行处理, 所有计量资料数据用 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 两样本间的均数比较采用 *t* 检验。

## 结 果

### 一、行为评估

康复训练组与造模对照组大鼠随时间推移行为学评分均逐渐减小, 康复训练组于术后 14, 21, 28 d 行为学评分明显优于造模对照组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 详见表 1。

二、免疫组织化学指标试验结果

2 组大鼠脑梗死后各时间点梗死灶周围白质均可见少突胶质细胞形态的 Nogo-A 阳性细胞,3 d 及 7 d 时梗死灶周围 Nogo-A 阳性细胞 2 组差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),详见表 1 和图 1~4;14,21 和 28 d 时梗死灶周围 Nogo-A 阳性细胞明显增多,其中康复训练组大鼠梗死灶周围 Nogo-A 的表达较造模对照组明显减少,2 组比较差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ),详见表 1 和图 5~10。

表 1 2 组大鼠各时间点行为评估综合评分及 Nogo-A 阳性细胞计数的比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	行为评估(分)	Nogo-A 阳性细胞数(个)
康复训练组	30		
3 d	6	7.17 ± 0.75	32.50 ± 10.42
7 d	6	5.83 ± 1.72	55.80 ± 33.33
14 d	6	2.17 ± 1.94 <sup>a</sup>	84.25 ± 29.72 <sup>a</sup>
21 d	6	0.83 ± 0.75 <sup>a</sup>	87.25 ± 11.35 <sup>a</sup>
28 d	6	0.33 ± 0.52 <sup>a</sup>	67.63 ± 17.73 <sup>a</sup>
造模对照组	30		
3 d	6	8.00 ± 1.79	38.42 ± 22.42
7 d	6	5.67 ± 1.51	79.32 ± 20.23
14 d	6	5.00 ± 2.00	122.28 ± 22.60
21 d	6	2.17 ± 1.17	130.00 ± 29.5
28 d	6	1.17 ± 0.75	92.48 ± 16.31

注:与造模对照组同时点比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$

讨 论

Nogo-A 是一种神经轴突生长相关蛋白,在大鼠发育阶段的前脑表达明显,神经系统发育成熟后,Nogo-A 在 CNS 仅有低水平的表达,当神经组织受损发生重建

时,Nogo-A 的表达可再次增强<sup>[9-12]</sup>。Irving 等<sup>[6]</sup>报道,脑缺血可诱发 Nogo-A mRNA 的表达,提示 Nogo-A 涉及缺血反应事件,包括纤维发芽和突触重建。Strittmatter 等<sup>[7,13]</sup>发现,阻断脑梗死大鼠 Nogo-A 的作用后,与对照组相比,梗死灶周围可见明显的神经再生及重建,行为学评分也明显优于对照组。本实验结果显示,康复训练组术后 14,21,28 d 行为学评分明显优于造模对照组,同时康复训练组大鼠脑梗死灶周围 Nogo-A 表达较造模对照组明显减少,总体峰值减低,建立了康复训练对神经功能的恢复和脑组织 Nogo-A 表达的关系。

Nogo-A 通过与其位于轴膜上的受体 NgR 及辅助蛋白 p75、Lingo-1 或 TROY 形成复合体发挥生物学作用。该复合体可影响下游信号分子 RhoA 的表达,调节神经纤维的生长方向,发挥抑制轴突再生及突触重塑的功能<sup>[14-16]</sup>。脑梗死急性期后,具有良好胞膜通透性的活性少突胶质细胞比例增多,Nogo-A 的表达升高,释放增多,对神经纤维生长的抑制也随之加强,这可能是脑梗死后神经功能恢复减慢的一个重要原因。

康复训练可能通过影响 Nogo-A 作用的某些环节,发挥促进神经突触重建和功能恢复的作用。参与 Nogo-A/NgR 作用通路的化学物质同样参与胞内其它生物过程的信息传递,如 p75 在中枢神经系统中具有协同 BDNF 的营养作用和促进凋亡作用,康复训练可提高神经元的兴奋性,增加脑组织中 BDNF 的表达<sup>[8]</sup>,干扰 Nogo-A 与下游分子间信息的传递。除此之外,脑组织内还可能存在某种反馈机制,使得 Nogo-A 作用被抑制后,表达水平也随之降低。

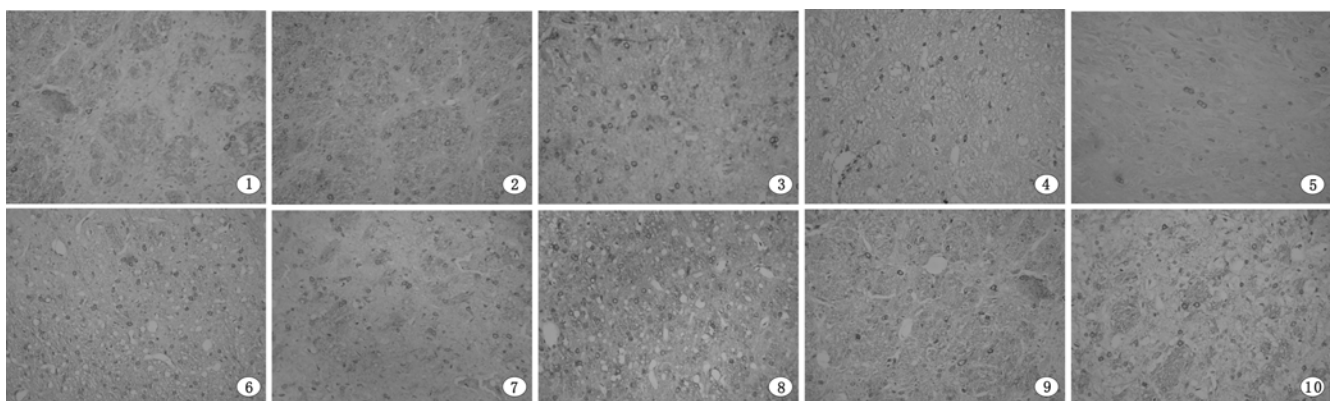


图 1 康复训练组 3 d 梗死灶周围免疫组化染色 Nogo-A 阳性细胞(HE 染色, ×400); 图 2 造模对照组 3 d 梗死灶周围免疫组化染色 Nogo-A 阳性细胞(HE 染色, ×400); 图 3 康复训练组 7 d 梗死灶周围免疫组化染色 Nogo-A 阳性细胞(HE 染色, ×400); 图 4 造模对照组 7 d 梗死灶周围免疫组化染色 Nogo-A 阳性细胞(HE 染色, ×400); 图 5 康复训练组 14 d 梗死灶周围免疫组化染色 Nogo-A 阳性细胞(HE 染色, ×400); 图 6 造模对照组 14 d 梗死灶周围免疫组化染色 Nogo-A 阳性细胞(HE 染色, ×400); 图 7 康复训练组 21 d 梗死灶周围免疫组化染色 Nogo-A 阳性细胞(HE 染色, ×400); 图 8 造模对照组 21 d 梗死灶周围免疫组化染色 Nogo-A 阳性细胞(HE 染色, ×400); 图 9 康复训练组 28 d 梗死灶周围免疫组化染色 Nogo-A 阳性细胞(HE 染色, ×400); 图 10 造模对照组 28 d 梗死灶周围免疫组化染色 Nogo-A 阳性细胞(HE 染色, ×400)

综上所述,脑梗死大鼠经康复训练后,梗死灶周边区表现为少突胶质细胞形态的 Nogo-A 阳性细胞较对照组减少,提示康复训练可促使轴突发芽及突触重建,并可能通过梗死灶周围的修复、代偿作用促进运动功能的恢复。

### 参 考 文 献

- [1] Heaton EB, Nichols D, Conroy B, et al. Opening the black box of post-stroke rehabilitation: stroke rehabilitation patients, processes, and outcomes. *Arch Phys Med Rehabil*, 2005, 86:1-7.
- [2] Hennerici MG, Bazner H, Kreisel SH. Pathophysiology of stroke rehabilitation: temporal aspects of neuro-functional recovery. *Cerebrovasc Dis*, 2006, 21:6-17.
- [3] Jurewicz A, Matysiak M, Raine CS, et al. Soluble Nogo-A, an inhibitor of axonal regeneration, as a biomarker for multiple sclerosis. *Neurology*, 2007, 68:283-287.
- [4] Wang F, Liang Z, Hou Q, et al. Nogo-A is involved in secondary axonal degeneration of thalamus in hypertensive rats with focal cortical infarction. *Neurosci Lett*, 2007, 417:255-260.
- [5] Seymour AB, Andrews EM, Tsai SY, et al. Delayed treatment with monoclonal antibody IN-1 1 week after stroke results in recovery of function and corticorubral plasticity in adult rats. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2005, 25:1366-1375.
- [6] Irving EA, Grundy RI, Eslamboli A. Time-dependent increase in Nogo-A expression after focal cerebral ischemia in marmoset monkeys. *Neurosci Lett*, 2006, 408:89-93.
- [7] Strittmatter SM, Chun SJ, Vartanian T, et al. Localization of Nogo-A and Nogo-66 receptor proteins at sites of axon-myelin and synaptic contact. *J Neurosci*, 2002, 22:5505-5515.
- [8] 段淑荣,杨昆鹏,孙琳琳,等. 康复训练对脑梗死大鼠血管内皮生长因子的表达及血管生成的影响. *中华物理医学与康复杂志*, 2007, 29:80-84.
- [9] Mingorance-Le Meur A, Zheng B, Soriano E, et al. Involvement of the myelin-associated inhibitor Nogo-A in early cortical development and neuronal maturation. *Cereb Cortex*, 2007, 17:2375-2386.
- [10] Tsai SY, Markus TM, Andrews EM, et al. Intrathecal treatment with anti-Nogo-A antibody improves functional recovery in adult rats after stroke. *Exp Brain Res*, 2007, 182:261-266.
- [11] Schwab ME, Mir A, Rouiller E, et al. Intrathecally infused antibodies against Nogo-A penetrate the CNS and downregulate the endogenous neurite growth inhibitor Nogo-A. *Mol Cell Neurosci*, 2006, 32:161-173.
- [12] 包映晖,罗其中,江基尧,等. 不同发育阶段大鼠 CNS 的 Nogo mRNA 的表达. *中华神经医学杂志*, 2005, 4:442-444.
- [13] Lee JK, Kim JE, Sivula M, et al. Nogo Receptor antagonism promotes stroke recovery by enhancing axonal plasticity. *J Neurosci*, 2004, 24:6209-6217.
- [14] Hennerici MG, Bazner H, Kreisel SH. Pathophysiology of stroke rehabilitation: temporal aspects of neuro-functional recovery. *Cerebrovasc Dis*, 2006, 21:6-17.
- [15] Schweigreiter R, Walmsley AR, Niederröst B, et al. Versican V2 and the central inhibitory domain of Nogo-A inhibit neurite growth via p75NTR/NgR-independent pathways that converge at RhoA. *Mol Cell Neurosci*, 2004, 27:163-174.
- [16] Domeniconi M, Filbin MT. Overcoming inhibitors in myelin to promote axonal regeneration. *J Neurol Sci*, 2005, 233:43-47.

(修回日期:2008-05-11)

(本文编辑:阮仕衡)

## 沉痛悼念本刊顾问裘法祖院士

中国科学院资深院士、我国著名医学家、《中华物理医学与康复杂志》顾问裘法祖教授因病抢救无效,于 2008 年 6 月 14 日在武汉逝世,享年 94 岁。

裘法祖院士在近一个世纪的人生岁月里,以崇高的思想境界、高尚的人格魅力、渊博的学识、精湛的医术、仁厚的爱心和博大的胸怀,毕生奉献医学,致力于祖国的医疗卫生、医学教育和医学科研事业,硕果累累,建树极丰。尤其是在中国现代外科学的创立和发展中所做出的贡献令人高山仰止。

裘教授一生注重医学知识传播与普及、注重医学交流。他曾担任全国高等医学院校临床医学专业教材评审委员会主任委员 20 余年,组织编写了 50 余种医学教材;他主张“医学归于大众”,早在 1949 年即创办我国第一本医学科普刊物《大众医学》,并担任主编达 10 年之久。裘教授十分重视医学期刊建设,生前担任本刊顾问多年,倾心关怀、指导和支持本刊各项工作,为我们杂志的发展起到了不可替代的作用。

裘法祖院士与世长辞,是我国医药卫生事业和医学教育事业的重大损失,是《中华物理医学与康复杂志》的巨大损失。为此,我们深感哀恸!

让我们深切缅怀裘法祖院士的科学态度、精湛技术、崇高品德和人格风范,永远铭记他为我国医学乃至我国科学技术事业做出的卓越贡献,化悲痛为力量,倾心工作,无私奉献,把《中华物理医学与康复杂志》打造成一流的精品期刊,为我国康复医学事业的发展做出应有的贡献,并以此告慰长眠的裘法祖院士。

裘法祖院士永垂不朽!

《中华物理医学与康复杂志》编辑委员会

《中华物理医学与康复杂志》编辑部