

· 基础研究 ·

运动训练对实验性脑出血大鼠血肿周围组织细胞凋亡及海马 CA1 区超微结构的影响

李红玲 郭艳芬 吴冬霞 吴淑玉 杨成 李春岩

【摘要】目的 观察运动训练后血肿周围组织细胞凋亡情况和组织学改变,以及海马 CA1 区超微结构方面的表现,以研究运动对出血性脑损伤细胞凋亡的影响及其改善神经功能的机制。**方法** 88 只 SD 大鼠被随机分为 3 组,实验组(40 只,出血并运动)、对照组(40 只,出血不运动)和假手术组(8 只,无出血,不运动),前两组又分为术后 24 h、7 d、14 d、21 d、28 d 等 5 个时相点,每个时相点取 5 只用于 TUNEL 检测及光镜观察,3 只用于电镜观察。**结果** 实验组和对照组血肿周围、大脑皮质、海马等脑组织在 ICH 后 24h 出现典型的细胞凋亡特征(电镜及 TUNEL 染色),实验组不同时相点凋亡细胞数明显较对照组和假手术组减少($P < 0.05$),而血管增生却较对照组和假手术组更明显(光镜)。**结论** 运动训练可以通过抑制脑出血后血肿周围及海马区的神经细胞凋亡,增加血管再生,从而改善神经功能。

【关键词】 运动训练; 脑出血; 细胞凋亡; 组织学改变; 大鼠

The effect of exercise on apoptosis of neuronal cells surrounding brain tissue and hippocampus histological changes in rats with intracranial hematoma Li Hong-ling*, GUO Yan-su, WU Dong-xia, WU Shu-yu, YANG Cheng, LI Chun-yan. * Department of Rehabilitation, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China

【Abstract】 Objective To investigate the effects of cage-running exercise (EX) on apoptosis of neuronal cells surrounding the hematoma and histological changes of hippocampus in rats with experimental intracranial hematoma (ICH). **Methods** A total of 120 male SD rats weighted 270 to 300 g were randomly divided into a trial group (ICH with EX, $n = 40$), a control group (ICH with no EX, $n = 40$) and a sham operated group (no ICH and EX, $n = 40$). The brains of the rats were removed at 24 h, 7, 14, 21 and 28 days after ICH. Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate-biotin in situ nick end-labeling (TUNEL) was used to detect deoxyribonucleic acid (DNA) fragmentation. Light and electron microscopy were used to observe histological changes of the hippocampus and the tissues surrounding the hematoma. **Results** (1) Under light microscope, typical histological changes of ICH were seen at 24 hours after operation in the trial and control groups. After exercise, a lot of new capillary were seen in perimeter of hematoma and hippocampus of rats, in contrast, the control group and sham group had little. (2) Under electron microscope, shrunken neuron and glial cell with pre-apoptotic signs of intensely stained cytoplasm and abnormally dense nucleus, swollen mitochondria, blood vessel, Golgi apparatus and rough endoplasmic reticulum were seen in the control group. In trial group rats, the main alterations were dim pre-and post-synaptic membranes. (3) TUNEL-positive cells appeared in the periphery of the hematoma and hippocampus. The number of TUNEL-positive cells in trial group was less than that in control group, with a significant difference existed between the two groups ($P < 0.05$). **Conclusion** Exercise training (cage-running) can suppress the number of apoptotic cells, and increase regeneration of capillary after ICH in rats.

【Key words】 Exercise training; Intracerebral hemorrhage; Apoptosis of cells; Histological changes; Rats

脑出血(intracerebral hemorrhage, ICH)是神经系统常见病和多发病,死亡率和致残率均较高。国内外临床研究显示,运动训练能促进脑出血患者的神经功能恢复,但实验研究报道很少,国外有作者认为,康复也有益于脑出血大鼠^[1,2]。我们的前期研究也显示跑笼运动训练可改善出血性脑损伤的功能障碍^[3]。但

有关运动促进 ICH 模型后功能恢复的机制尚不清楚,因此,本研究旨在通过大鼠尾状核脑出血模型,应用跑笼对大鼠进行运动训练,观察不同时间点血肿周围组织细胞凋亡情况和组织学改变,以及海马 CA1 区超微结构方面的表现,以判断运动对出血性脑损伤细胞凋亡的影响,并进一步探讨运动改善神经功能的机制。

材料与方法

一、实验动物与分组

作者单位:050000 石家庄,河北医科大学第二医院康复科(李红玲),神经内科实验室(郭艳芬、吴冬霞、吴淑玉、杨成),神经内科(李春岩)

实验动物用健康雄性 SD 大鼠 120 只, 体重 280 ~ 300 g, 由河北医科大学基础医学院实验动物中心提供, 以标准饲料和纯净水喂养, 饲养环境为我院动物室多层层流架(河北省石家庄市长风净化设备厂, 河北省实验动物研究中心监制), 恒温(20 ~ 25℃)。随机分为实验组(40 只)、对照组(40 只)和假手术组(40 只), 前两组又分为术后 24 h、7 d、14 d、21 d、28 d 等 5 个时相点, 每个时相点分别取 5 只用于 TUNEL 及光镜检测, 3 只用于电镜检测。

二、材料与试剂

数码相机(日本 Nikon Coolpix 950 型); Olympus 光学显微镜(日本 Nikon 公司); 电子显微镜(日本电子公司 JEM-1230 型); 恒温干燥箱(北京市朝阳区来广营医疗器械厂); 石蜡切片机(德国 Leica, RM2135); HH-42 快速恒温数显箱(常州国华电器); -20℃ 冰箱(日本 Novum); 麻醉药速眠新 II(长春军需大学兽医研究所生产); VII 型胶原酶(美国 Sigma 公司), 用生理盐水配制成 0.2 U 胶原酶/ μl 的溶液。TUNEL 试剂(美国 Sigma 公司生产); 多聚甲醛-戊二醛灌流固定液(自配); 其余试剂由河北医科大学二院神经内科实验室提供。

三、动物模型建立与标本采集

参照 Rosenberg 等^[4]介绍的方法, 实验组采用 0.5 U 胶原酶/2.5 μl 生理盐水诱导大鼠(尾状核位置)脑出血模型, 然后于术后 24 h 开始对其进行运动训练, 具体训练用具及方法参见文献^[3]; 对照组操作方法同实验组, 即制作脑出血模型但不进行运动训练。假手术组, 操作方法同实验组, 但不注射胶原酶, 只注射同等剂量的生理盐水, 而且不进行运动训练。各组 5 只大鼠于不同时间点处死后, 取出大脑, 去除额极 2 mm 前部脑组织, 经脑表面穿刺点冠状切开标本, 取穿刺点后约 4 mm 的脑组织, 放入 4% 多聚甲醛液固定, 经脱水、透明、石蜡包埋, 用于 TUNEL 及光镜检测。剩余大鼠(各组 3 只)用速眠新注射液(0.1 ml/kg 体重)麻醉后, 迅速开胸, 经心脏至主动脉插管, 先用 0.1 mol/L PBS(pH7.4) 约 100 ml 冲洗血液, 然后以多聚甲醛-戊二醛混合液约 400 ml 先快后慢进行灌流固定 1.5 ~ 2 h。迅速解剖切取海马 CA1 区(约小米粒大)脑组织, 投入相同固定液中继续浸泡固定, 用于电镜检测。

四、检测方法

1. TUNEL 检测: 细胞凋亡采用 TUNEL 法。具体步骤按试剂盒说明书进行, 工作浓度 1:100。凋亡细胞以细胞核呈棕黄色着色为阳性细胞。随机选择 5 个视野, 然后算出每高倍($\times 400$)镜下阳性细胞数。

2. 光镜检测: 用于光镜检测的脑组织经系列酒精脱水, 二甲苯透明, 浸蜡, 包埋。切片厚度 5 μm 。常规

HE 染色, 用于组织学观察。

3. 电镜检测: 用于电镜检测的海马区组织用 4% 戊二醛浸泡固定 24 h; 磷酸缓冲液冲洗 2 遍; 1% 四氧化钨(OsO_4) 后固定 1 h; 50%、70%、80%、90%、100% (2 次) 丙酮系列脱水, 每级 15 min; 100% 丙酮-环氧树脂(1:1), 浸透 1 h; 100% 丙酮-环氧树脂(1:3), 浸透 37℃ 过夜; 纯包埋剂浸透 4 h; Epon812 环氧树脂包埋; 聚合: 37℃ 24 h, 60℃ 48 h, Leica UCT 超薄切片机 70 nm, 醋酸铀、硝酸铅电子染色, JEM-1230 透射电镜观察。

五、统计学分析

应用 State 8.0 版软件进行分析。数据以($\bar{x} \pm s$) 表示, 各组均数的比较用单因素方差分析(one way analysis of variance) 进行两两比较。以 $P < 0.05$ 有统计学意义。

结 果

一、光镜下观察

ICH 后 24 h 实验组与对照组均有典型的 ICH 病理改变。如出血早期神经细胞水肿, 核固缩, 结构消失空泡样改变, 红细胞渗出, 白细胞浸润等。7 d 后可见红细胞部分溶解, 大量含铁血黄素沉积, 血肿边缘散在多数吞噬含铁血黄素的小胶质细胞(即格子细胞, 图 1), 14 d 时可见血肿周围及血肿内胶质细胞增生, 新生血管长入(图 2)。假手术组表现基本正常(图 3)。运动干预后, 实验组大鼠除血肿周围、皮质、海马等脑组织血管增生较对照组和假手术组更明显(图 4~6) 外, 未见其他病理差异。

二、细胞凋亡检测结果

TUNEL 阳性细胞数在 ICH 24 h 时实验组和对照组无区别, 分别为(88.0 ± 15.7) 和(91.0 ± 16.9), 但与假手术组相比差异有统计学意义($P < 0.01$), 两组在 ICH 后 7~14 d 凋亡一度表达下降, 21 d 后开始回升, 28 d 又出现下降趋势, 但实验组表达明显低于对照组, 14~28 d 差异有统计学意义($P < 0.01$, $P < 0.05$) (表 1, 图 7~9)。凋亡不仅存在于血肿周围组织和皮质, 海马区也可见明显凋亡现象(图 10)。

三、电镜下观察

ICH 后 24 h 实验组和对照组血肿周围均可见明显的凋亡现象(图 11), 对照组各时间点改变都相对明显, 如神经元、胶质细胞的胞浆及线粒体、高尔基体、内质网的扩张, 血管周围及神经毡有不同程度的水肿, ICH 后 7~14 d 可见个别神经元、神经胶质细胞固缩, 胞浆及核深染(图 12~15)。运动干预后实验组海马区各时间点除突触前后膜模糊不清(图 16), 少数细胞器轻度水肿外, 未见明显凋亡及其他病理改变。假手术组电镜下超微结构正常(图 17~18)。

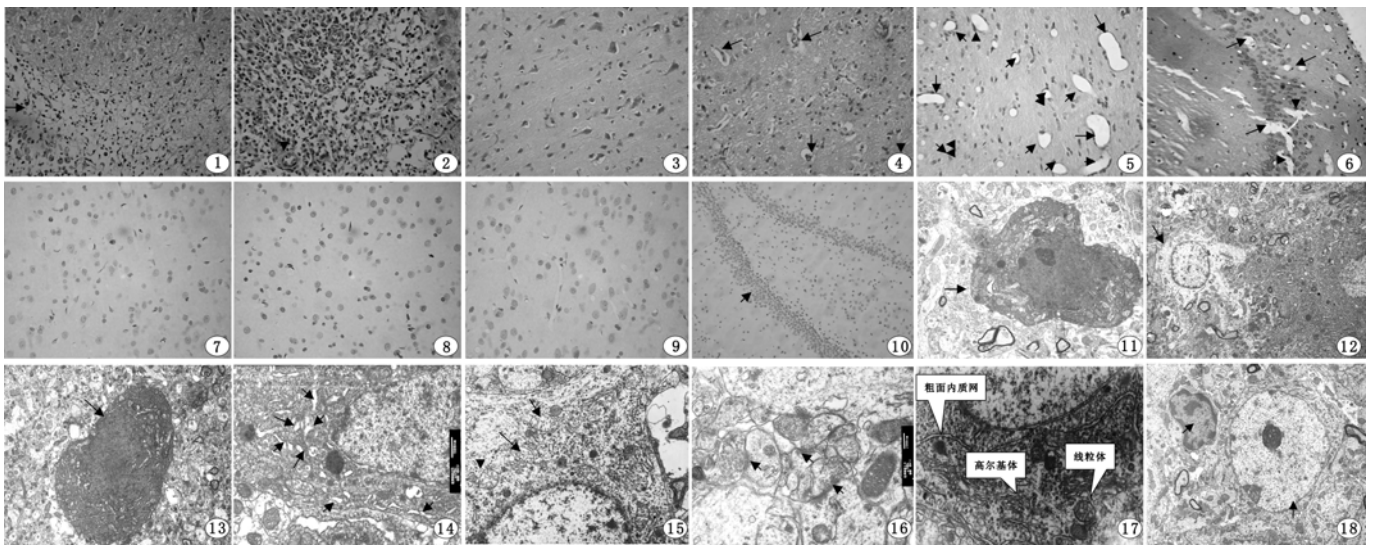


图 1 对照组(ICH 后 7 d)散在的格子细胞(箭头处;HE, × 200); 图 2 对照组(ICH 后 14 d)血肿周围增生的胶质细胞和小血管(箭头处; HE, × 400); 图 3 假手术组(ICH 后 14 d)正常的神经细胞(HE, × 400); 图 4 实验组(ICH 后 14 d)血肿周围增生的小血管(箭头处; HE, × 200); 图 5 实验组灌注后(ICH 后 14 d)血肿周围增生的小血管(箭头处; HE, × 200); 图 6 实验组灌注后(ICH 后 14 d)海马区增生的小血管(箭头处; HE, × 200); 图 7 实验组(ICH 后 21 d)血肿周围脑组织 TUNEL 阳性细胞表达(HE, × 200); 图 8 对照组(ICH 后 21 d)血肿周围脑组织 TUNEL 阳性细胞表达(HE, × 200); 图 9 假手术组(ICH 后 21 d)血肿周围脑组织 TUNEL 阳性细胞表达(HE, × 200); 图 10 海马区(ICH 后 7 d)脑组织 TUNEL 阳性细胞表达(箭头处; HE, × 100); 图 11 ICH 后 24 h 海马 CA1 区凋亡的运动神经元(箭头处; TEM, × 6 000); 图 12 对照组 ICH 后 7 d 海马 CA1 区水肿的神经细胞(箭头处; TEM, × 4 000); 图 13 对照组 ICH 后 14 d 海马 CA1 区具有凋亡特征的胶质细胞(箭头处; TEM, × 4 000); 图 14 对照组 ICH 后 21 d 海马 CA1 区扩张的粗面内质网(箭头处; TEM, × 10 000); 图 15 对照组 ICH 后 28 d 海马 CA1 区胞浆内扩张的线粒体(箭头处; TEM, × 10 000); 图 16 实验组模糊的突触前后膜结构(ICH 21 d, 箭头处; TME, × 30 000); 图 17 假手术组正常的高尔基体,粗面内质网和线粒体(TEM, × 15 000); 图 18 假手术组正常的神经元和神经胶质细胞(箭头处; TEM, × 5 000)

表 1 不同时间运动训练对血肿周围组织 TUNEL 阳性细胞表达的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	24 h	7 d	14 d	21 d	28 d
实验组	25	78.36 ± 5.38 ^d	39.04 ± 2.55 ^d	11.01 ± 1.58 ^{bd}	41.28 ± 5.80 ^{ad}	13.64 ± 4.67 ^{ad}
对照组	25	82.17 ± 6.27 ^f	40.44 ± 2.07 ^f	17.27 ± 1.30 ^f	55.45 ± 11.78 ^f	21.42 ± 4.45 ^f
假手术组	25	2.50 ± 2.38	2.20 ± 1.48	2.43 ± 1.35	3.03 ± 1.10	3.78 ± 1.45

注:实验组与对照组比较, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$; 实验组与假手术组比较, ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$; 对照组与假手术组比较, ^e $P < 0.05$, ^f $P < 0.01$

讨 论

细胞凋亡是一个遗传性的程序化细胞死亡(programmed cell death, PCD)过程,是细胞在基因调控下有序死亡的形式^[5]。它与细胞坏死这种被动过程在形态特征和生化方面都有本质的区别。凋亡的形态特征包括细胞浆固缩、体积缩小、细胞皱缩以及细胞核致密等^[6]。生化特征是凋亡细胞核内 DNA 被核酸内切酶降解为 180 ~ 220 bp 整数倍大小的片段,在琼脂糖凝胶电泳上可呈现 DNA 梯形带。

研究认为,血肿周围脑组织改变类似于缺血性卒中,即低密度缺血灶,坏死区域周围低灌注^[7]。ICH 后脑损伤继发于血肿引起的缺血,水肿,炎症反应,最终导致神经细胞死亡^[8]。本研究结果显示,对照组的病理改变主要是 ICH 的表现,如早期神经细胞消失,白细胞浸润,恢复期胶质细胞和小血管增生,后期血液及受损组织逐渐被清除后,缺损部分由增生的胶质细胞、胶质纤

维等替代,形成瘢痕。以往研究^[9-11]认为,运动训练可以促进血管增殖,改善缺血状态。本研究显示,实验组除上述改变外,在血肿周围、脑皮质及海马区均可见明显多于对照组和假手术组的毛细血管增殖,因本研究未对其进行统计学分析,此现象是否说明运动可以促进上述部分的血管再生,改善缺血状态,从而促进 ICH 后功能恢复,还有待于进一步研究。一般认为形态学变化是判断有无细胞凋亡的基础,但本研究在光镜下并未看到凋亡小体。有学者认为^[12],虽然光学显微镜下有时可以看见胞膜起泡现象和凋亡小体,但凋亡细胞的形态学变化大多发生在超微结构,因此用光镜观察难以令人满意,而透射电镜可清楚地观察到细胞结构在凋亡不同时期的变化。电镜形态学观察是迄今为止判断凋亡最经典、最可靠的方法,被认为是确定细胞凋亡的金标准。

人们发现,中枢神经系统神经元对缺血性损害不敏感,一些脑区的神经元虽经短暂缺血即可出现死亡,而另一些脑区的神经元则无明显变化,于是提出了“选择性

敏感”的概念。海马 CA1 区神经元与人类、哺乳动物的学习、记忆功能密切相关,且该区神经元对缺血具有选择性敏感,因此观察海马 CA1 区有意义^[13]。近年来随着研究的深入,人们发现短暂脑缺血后海马 CA1 区出现神经元的死亡与细胞凋亡密切相关,有学者认为短暂脑缺血后海马 CA1 区神经元出现的迟发性死亡是细胞凋亡的过程^[14]。脑出血后细胞凋亡的启动机制尚不清楚。推测血肿周围继发性缺血是机制之一^[15]。因此,本研究选取对缺血敏感的海马 CA1 区作为电镜观察部分。而本研究 TUNEL 检测结果也证明,ICH 后海马区确实存在凋亡(图 10),且运动训练可明显减轻血肿周围细胞凋亡现象,ICH 后 7~14 d 凋亡表达一度下降,考虑可能与这段时间大鼠遭受手术创伤和运动导致的体重下降有关^[3]。

电镜下,ICH 早期(24 h)海马区可见到凋亡超微结构的特征性改变。对照组于 ICH 7~14 d 时仍可见个别细胞胞体缩小,胞浆固缩,同时在不同时间点还可见到细胞、细胞器及血管等轻度水肿表现,21 d 后未见明显凋亡特征及其他病理改变。而实验组除 24 h 有较为典型的凋亡表现外,运动干预后海马 CA1 区不同时间点只见少数突触前后膜结构模糊,个别细胞及细胞器轻度水肿,海马区大部分结构基本正常。假手术组大鼠各时间点超微结构正常。从海马超微结构的变化,结合血肿周围组织细胞凋亡情况,以及作者前期所作研究^[3]可以得出这样一个结论,即运动训练可减轻 ICH 后海马区神经细胞凋亡,继而改善 ICH 后神经功能的恢复。

总之,本研究表明:运动训练可以通过抑制脑出血后血肿周围及海马区的神经细胞凋亡,增加血管再生,从而改善神经功能。

参 考 文 献

[1] Lee HH, Shin MS, Kim YS, et al. Early treadmill exercise decreases

- intraatrial hemorrhage-induced neuronal cell death and increases cell proliferation in the dentate gyrus of streptozotocin-induced hyperglycemic rats. *J Diabetes Complications*, 2005, 19:339-346.
- [2] Lee HH, Kim H, Lee MH, et al. Treadmill exercise decreases intraatrial hemorrhage-induced neuronal cell death via suppression on caspase-3 expression in rats. *Neurosci Lett*, 2003, 352:33-36.
- [3] 李红玲,刘春辉,葛艳萍,等. 运动训练对脑出血大鼠神经功能恢复的影响. *中华物理医学与康复杂志*, 2006, 28: 649-652.
- [4] Rosenberg GA, Mun-Bryce BS, Wesley M, et al. Collagenase-induced intracerebral hemorrhage in rats. *Stroke*, 1990, 21:801-807.
- [5] Savill J, Fadok V, Hensen P, et al. Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. *Immunol Today*, 1993, 14:131.
- [6] Peter ME, Heuffider AE, Hengartner MO. Advances in apoptosis research. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94:12736-12737.
- [7] Mendelow A. Mechanisms of ischemic brain damage with intracerebral hemorrhage. *Stroke*, 1993, 24:1115-1117.
- [8] Kingman TA, Mendelow AD, Graham DI, et al. Experimental intracerebral mass: description of model, intracranial pressure changes and neuropathology. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1988, 47:128-137.
- [9] Black JE, Isaacs KR, Anderson BJ, et al. Learning causes synaptogenesis, whereas motor activity causes angiogenesis, in cerebellar cortex of adult rats. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87:5568-5572.
- [10] Kleim JA, Cooper NR, Vandenberg PM. Exercise induces angiogenesis but does not alter movement representations within rat motor cortex. *Brain Res*, 2002, 934:1-6.
- [11] Swain RA, Harris AB, Wiener EC, et al. Prolonged exercise induces angiogenesis and increases cerebral blood volume in primary motor cortex of the rat. *Neuroscience*, 2003, 117:1037-1046.
- [12] Sgong R, Wick G. Methods for the detection of apoptosis. *Arch Alerg Immunol*, 1994, 105:327-332.
- [13] White BC, Grossman LT, O'Neil BJ, et al. Global brain ischemia and reperfusion. *Ann Emerg Med*, 1996, 27:588-594.
- [14] Graham SH, Chen JUN. Programmed cell death in cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2001, 21:99-109.
- [15] Chiarugi V, Maguelli L, Cinelli M. Complex interplay among apoptosis factors: RB, p53, E2F, TGF- β , cell cycle inhibitors and the bcl-2 gene family. *Pharmacol Res*, 1997, 35:257.

(修回日期:2007-10-20)

(本文编辑:阮仕衡)

· 消息 ·

中华医学会第十次全国物理医学与康复学学术会议征文通知

中华医学会第十次全国物理医学与康复学学术会议定于 2008 年 11 月 7 至 11 日在广州珠江宾馆召开。本次会议的主题是“继往开来,共创物理医学与康复学新时代”,将邀请国内外著名专家就康复医学领域的热点问题作专题演讲;评选优秀论文;搭建学术平台,交流学科发展思路;举办先进设备展览。本次会议由中华医学会物理医学与康复学分会主办,广东省医学会物理医学与康复学分会承办,诚挚邀请物理医学与康复科、康复医学科、理疗科、骨科、神经内科、神经外科、老年医学科及其它相关学科的医生、治疗师、护士参加。

征文范围:神经系统疾病康复、骨与关节疾病康复、心肺疾病的康复、儿童脑瘫的康复、语言、吞咽与认知障碍的康复;针灸、按摩、各种自然及人工物理因子的应用;疼痛、痉挛的评估与治疗;矫形器的制作与应用等康复实践方面的成功经验;社区康复的理论与实践;学科建设和建设、康复医学教育及康复护理;康复理疗仪器设备的研制与应用等。**征文要求:**论文摘要 1 份,800~1000 字。要求科学性强,数据真实可靠,文字表达准确精炼,稿件请注明单位名称、作者姓名及通讯地址、邮编、E-mail 地址。**文稿格式:**Word 文档格式,文件名以文章题目命名。第 1 行文题,字号为宋体小三加粗,第 2 行作者及工作单位,通讯地址,联系电话及 E-mail 地址,第 3 行论文摘要(包括目的、方法、结果和结论),字号为宋体小 4 号字,“目的”、“方法”、“结果”和“结论”等字加粗。**投稿方式:**请以网上在线方式投稿,投稿网址为 www.capmr.org,或电子邮件投稿,电子邮箱为:zjhong@fimmu.com。邮件主题为“广州全国年会投稿”。非电子邮件投稿恕不接收。**优秀论文:**本次大会将分别设中英文优秀论文一、二、三等奖若干名。参加优秀论文评选的作者报送 4000 字以内中文或英文全文 2 份和电子邮件文稿,来稿注明“优秀论文征文”。**截稿时间:**2008 年 9 月 15 日。**联系人:**广东省医学会物理医学与康复学分会 兰月(医师)13711161667;张建宏(医师)13380092979

中华医学会学术会部