

· 基础研究 ·

不同强度康复训练对脑缺血再灌注大鼠运动功能和胶质纤维酸性蛋白表达的影响

陆敏 张苏明 常立英 王义辉 陈晨 朱舟

【摘要】 目的 探讨应用不同强度康复训练对脑缺血再灌注大鼠运动功能以及海马区和梗死灶周围胶质纤维酸性蛋白(GFAP)表达的影响。方法 采用大鼠局灶性脑缺血再灌注模型,大脑中动脉阻塞 1 h,再灌注 7 d 和 14 d,36 只造模成功的大鼠随机分为造模对照组、常规康复训练组和强化康复训练组,分别采用姿势反射试验、肢体不对称应用试验和角落试验观察各组大鼠的运动功能,应用免疫组织化学方法分别检测各组大鼠缺血侧海马区和梗死灶周围 GFAP 的表达情况。结果 缺血再灌注 7 d 和 14 d 时,两个康复训练组大鼠行为学评分优于造模对照组,其 GFAP 表达的光密度值高于造模对照组;缺血再灌注 14 d 时,强化康复训练组大鼠行为学评分优于常规康复训练组,其 GFAP 表达的光密度值高于常规康复训练组。结论 康复训练可促进脑缺血再灌注大鼠运动功能的恢复和星形胶质细胞的活化,强化康复训练的效果更明显。

【关键词】 缺血再灌注; 康复训练; 胶质纤维酸性蛋白

The effects of rehabilitation intensity on motor function and GFAP expression in rats after cerebral ischemia-reperfusion LU Min*, ZHANG Su-ming, CHANG Li-ying, WANG Yi-hui, CHEN Chen, ZHU Zhou. * Department of Rehabilitation Medicine, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

Corresponding author: ZHANG Su-ming, Email: suming_zhang@163.com

【Abstract】 Objective To explore the effects of rehabilitation training (RT) at different intensities on motor function (MF) and glial fibrillary acidic protein (GFAP) expression after cerebral ischemia and reperfusion (CIR). **Methods** The middle cerebral arteries (MCA) of 36 rats were occluded for 1h and then reperfused for 7 or 14 days. They were then divided randomly into a control group, a conventional rehabilitation group (CR group) and an intensive rehabilitation group (IR group). Their motor function was measured by means of a postural reflex test, an asymmetrical limb use test and a corner test, and the expression of GFAP in the hippocampus and the peri-cerebral infarcted area was detected using immunohistochemistry. **Results** Compared with those in the control group, the neurological function scores and the GFAP expression in the CR and IR groups were significantly increased at both day 7 and day 14 after CIR, while these parameters in the IR group were increased in comparison with those in the CR group at day 14. **Conclusion** RT, especially intensive rehabilitation, can improve the recovery of motor function and activate astrocytes in rats after CIR.

【Key words】 Cerebral ischemia reperfusion; Rehabilitation training; Glial fibrillary acidic protein

缺血性脑血管病作为脑血管疾病中的重要组成部分已成为现代社会中严重危害人类健康的常见病和多发病,由于患者常遗有不同程度的运动功能障碍,因此对缺血性脑血管病患者在发病早期进行及时、有效的康复训练是提高其生活质量、减少残疾、最大限度回归社会的一项重要措施。

脑缺血后星形胶质细胞(astrocyte, AST)异常活跃,可通过摄取和释放谷氨酸、清除自由基、转运水、释

放细胞因子和一氧化氮等方式影响神经元的存活,促进轴突再生及诱导再生神经元的迁移^[1]。胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)是星形胶质细胞的一种标志蛋白,星形细胞增殖程度和脑梗死后脑组织病变程度可用 GFAP 的表达值来评价。对于局灶脑缺血区星形胶质细胞的形态、数量和分布等方面的变化以及康复训练对其影响的研究已有报道^[2-4],但鲜见不同强度的康复训练对海马区和梗死灶周围 GFAP 表达的影响的研究。我们用线栓法制作大鼠大脑中动脉闭塞后再灌注模型,分别采取不同强度的康复训练方法,然后通过行为学评估及运用免疫组织化学方法测定海马 CA1 区和梗死灶周围 GFAP

作者单位:430030 武汉,华中科技大学同济医学院附属同济医院康复医学科(陆敏),神经内科(张苏明、王义辉、陈晨、朱舟);湖北省襄樊市中心医院神经内科(常立英)

通讯作者:张苏明,Email:suming_zhang@163.com

的表达值,探讨不同强度康复训练对脑缺血再灌注大鼠运动功能和上述区域星形胶质细胞的影响。

材料和方法

一、实验动物

成年雄性 Wistar 大鼠 50 只,由华中科技大学同济医学院动物试验中心提供,体重 200 ~ 250 g。

二、脑缺血再灌注实验动物模型制作

参照 Longa 线栓法^[5]制作大脑中动脉梗死(middle cerebral artery occlusion, MCAO)再灌注实验动物模型,大鼠用 6% 水合氯醛(0.5 ml/100 g 体重)行腹腔注射麻醉,仰卧位固定,常规备皮消毒。取颈正中切口,游离右侧颈总动脉(CCA)、颈内动脉(ICA)、颈外动脉(ECA),结扎 ECA、CCA 近心端,血管夹夹闭 ICA 远端,在 CCA 的分叉处下方剪一小口,插入直径为 0.23 mm、末端涂以硅酮的尼龙鱼线,沿 ICA 走行轻轻推进尼龙线,直到遇到轻微阻力为止,由分叉处计算平均插入深度约(18.0 ± 0.5)mm,以阻断右大脑中动脉入口,造成右侧大脑中动脉供血区的缺血;1 h 后拔出线栓恢复再灌注,并缝扎切口。模型成功的标志是动物苏醒后左侧前肢屈曲、行走左转或左侧跌倒,不合格的动物剔除。

三、动物分组

有 36 只大鼠造模成功,随机分为 3 组:造模对照组、常规康复训练组(常规康复组)和强化康复训练组(强化康复组),每组各 12 只。常规康复组和强化康复组大鼠均从造模 24 h 后开始接受康复训练,3 组大鼠饲养条件相同。各组大鼠在组内又随机分为 7 d 组和 14 d 组,每组 6 只。

四、康复训练

常规康复组和强化康复组康复训练项目相同,包括平衡木上行走训练、转棒上转动训练及网屏抓握训练。常规康复组每日上午训练 1 次,训练时间为 1 h;强化康复组前 3 日的训练强度与常规康复组相同,但从造模后第 4 天开始,每日训练次数增加为 2 次,上午和下午各 1 次,每次训练时间仍为 1 h。

1. 平衡木上行走训练:采用长 170 cm、宽 2 cm 的方木棒,置于距地面 50 cm 处,用食物诱导大鼠在方木棒上行走,下方置海绵垫保护,训练其平衡能力。

2. 转棒上转动训练:将大鼠置于长 150 cm、直径 4.5 cm、距离地面 50 cm 高的圆木棒上,圆木棒中点固定在 5 r/min 的转动器上,以 5 r/min 的速度转动,棒下方置海绵垫保护,训练大鼠的抓握和动态平衡能力。

3. 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,下方铺海绵垫保护,先将网屏水平放置,将老鼠放在其上,再缓缓将

网屏竖直,然后在网屏竖直位状态下用手转动网屏,训练大鼠的抓握能力。

五、动物行为学评价

所有行为学评价由对实验分组不知情的同一研究人员完成,在造模后 24 h、7 d 和 14 d 进行行为学评价。

1. 姿势反射试验(postural reflex test)^[6,7]:距地面 1 m 提起鼠尾,观察其前肢屈曲情况,每次每只鼠记录 20 次活动,评分标准如下,0 分(正常):双前肢完全伸展;1 分(轻度异常):左前肢贴向前胸,右前肢伸展;2 分(重度异常):左前肢贴向前胸,上半身卷曲。每只鼠每次的最后得分为 20 次评分的平均分。

2. 肢体不对称应用试验(limb use asymmetry test)^[7,8]:用于测试的器械是一直径 18 cm、高 30 cm 透明的玻璃圆桶,正常大鼠在圆桶中会不时站立,用双侧前肢交替或同时触及桶壁,应用双侧前肢的频率应该相等,有缺血性脑损伤的大鼠偏瘫侧肢体应用较少,观察并记录双侧前肢的应用情况,对每只大鼠每次记录 20 次活动,以肢体应用的百分率计算最后得分,得分 = $(R - L) / (R + L + B) \times 100\%$ [R:右侧前肢(健侧)独立应用次数;L:左侧前肢(患侧)独立应用次数;B:双前肢同时应用次数]。

3. 角落试验(corner test)^[7,8]:将被测的大鼠置于两块 20 cm × 30 cm × 15 cm 大小的硬板中间,两硬板前端夹角 30°,从大鼠身体两侧由尾部向头部缓慢移动硬板。正常情况下,来自双侧刺激信号强度相等,故向右或左侧转身的次数应基本相等,缺血性脑损伤的大鼠由于偏瘫的影响,向健侧(右侧)转身的次数明显增多,每次每只鼠观察 10 次,按公式计算得分:得分 = 向健侧转身次数 / 试验的总次数 × 100%。

六、取材切片

造模后第 7 天和第 14 天分别将各组大鼠断头取脑,并快速置于 -80℃ 冰箱冷冻并保存,于 -20℃ 恒冷箱切片(Leica1850)中取背侧海马最大面积处冠状位连续切片(厚 10 μm),裱于经多聚赖氨酸处理的清洁玻片上,置于 -80℃ 冰箱中备用。

七、免疫组织化学方法

冰冻切片置于 4% 多聚甲醛磷酸盐缓冲液中(4℃)固定 15 min 后,0.01 mol/L PBS 洗涤 3 次,每次 5 min,室温封闭 2 h,滴加北京中山公司兔抗胶质纤维酸性蛋白抗体(1:200),4℃ 孵育过夜,0.01 mol/L PBS 洗涤 3 次,每次 5 min,滴加北京中山公司 TRITC 标记的羊抗兔 IgG(1:100),室温避光孵育 45 min,清水冲洗 30 min,晾干后常规封片。Olympus BX 51 荧光显微镜摄像(激发波长 490 nm,发射波长 520 nm)。

八、图像分析

采用 Olympus Micro Image 4.0 图像处理系统进行

图像分析。每只大鼠取 3 张切片,400 倍视野下,从每张切片随机选取缺血侧海马 CA1 区和梗死灶周围各 3 个不重叠视野,统计出每个视野内 GFAP 的免疫反应强度,免疫反应强度用平均光密度(OD 值)表示。各组所有标本检测均在相同光学条件下完成。

九、统计学分析

采用 SPSS for Windows 统计软件处理,实验数据以($\bar{x} \pm s$)表示,两样本均数比较用配对 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、动物行为学评分

在造模后 24 h,3 组实验大鼠行为学评分无明显差异;在造模后第 7 天,常规康复组和强化康复组大鼠行为学评分与造模对照组间差异有统计学意义,但常规康复组、强化康复组大鼠间差异无统计学意义;在造模后第 14 天,3 组大鼠行为学评分间差异均有统计学意义,详见表 1。

表 1 3 组大鼠在各时间点行为学评定比较(分, $\bar{x} \pm s$)

组 别	时 间	姿势反射试验	肢体不对称应用试验	角落试验
造模对照组	24 h	1.75 ± 0.45	0.77 ± 0.10	0.92 ± 0.07
	7 d	1.42 ± 0.51	0.70 ± 0.12	0.85 ± 0.11
	14 d	1.17 ± 0.57	0.58 ± 0.12	0.75 ± 0.11
常规康复组	24 h	1.67 ± 0.49	0.78 ± 0.12	0.92 ± 0.08
	7 d	1.08 ± 0.67 ^a	0.55 ± 0.12 ^a	0.75 ± 0.11 ^a
	14 d	0.75 ± 0.62 ^b	0.38 ± 0.11 ^b	0.68 ± 0.11 ^a
强化康复组	24 h	1.75 ± 0.45	0.75 ± 0.12	0.92 ± 0.07
	7 d	1.00 ± 0.60 ^a	0.56 ± 0.11 ^a	0.76 ± 0.11 ^a
	14 d	0.42 ± 0.51 ^{bc}	0.25 ± 0.10 ^{bd}	0.61 ± 0.12 ^{bc}

注:与造模对照组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$;与常规康复组比较,^c $P < 0.05$,^d $P < 0.01$

二、免疫组织化学染色

脑缺血 7 d 时,各组在脑梗死同侧海马 CA1 区及梗死灶边缘均可见星形胶质细胞活化,表现为胞体肥大,突起增多,而且常规康复组和强化康复组的 GFAP 的表达明显高于造模对照组,但常规康复组、强化康复组间差异无统计学意义;脑缺血 14 d 时,脑梗死同侧海马及梗死灶周围 GFAP 阳性细胞进一步增多,且染色加深,突起变长、增粗和增多,增粗和变长的 GFAP 阳性纤维相互交织成密集的网状,常规康复组和强化康复组的 GFAP 的表达仍明显高于造模对照组,而且常规康复组和强化康复组间差异亦有统计学意义(图 1、图 2)。详见表 2。

讨 论

AST 是中枢神经系统内数量最多的细胞,约占正常成人中枢神经系统细胞总数的 40%,近几年,AST

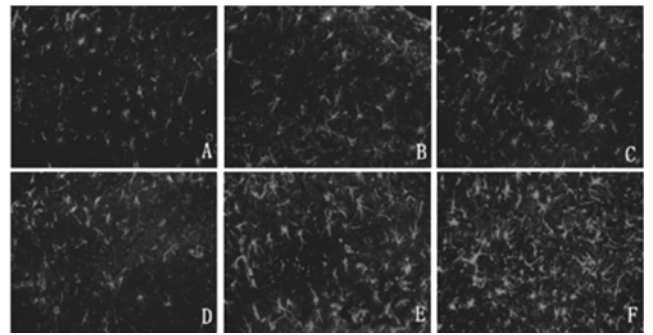


图 1 3 组大鼠缺血侧海马 CA1 区 GFAP(荧光免疫组织化学染色, ×400)

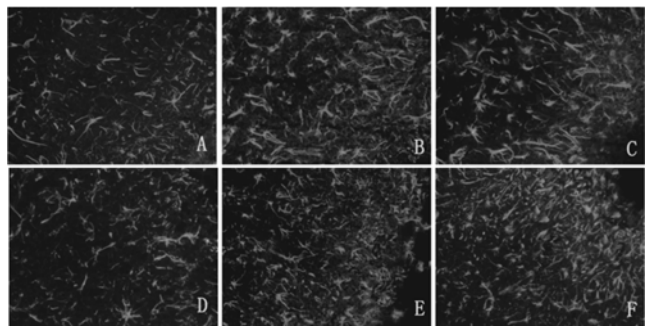


图 2 3 组大鼠梗死灶周围区 GFAP(荧光免疫组织化学染色, ×400)

表 2 3 组大鼠造模后 7 d、14 d 在缺血侧海马 CA1 区和梗死灶周围 GFAP 的表达(OD, $\bar{x} \pm s$)

组 别	时 间	海马 CA1 区	梗死灶周围区
造模对照组	7 d	0.76 ± 0.03	0.86 ± 0.08
	14 d	0.81 ± 0.04	0.92 ± 0.06
常规康复组	7 d	0.95 ± 0.05 ^a	1.12 ± 0.07 ^a
	14 d	1.01 ± 0.06 ^a	1.17 ± 0.07 ^a
强化康复组	7 d	0.96 ± 0.06 ^a	1.13 ± 0.03 ^a
	14 d	1.14 ± 0.02 ^{bc}	1.29 ± 0.02 ^{bc}

注:与造模对照组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$;与常规康复组比较,^c $P < 0.05$

在脑缺血中的作用日益受到重视。GFAP 是 AST 的特异蛋白和骨架成分之一,由于它主要存在于脑的星形胶质细胞中,在缺血后的反应性胶质细胞中尤为明显,因此,常作为分化和反应性胶质细胞的标记物^[9]。AST 的活化,又称反应性胶质增生(reactive gliosis),是中枢神经系统在许多病理生理情况下常见的反应,表现为星形胶质细胞胞体肥大、肿胀、突起增多延长、免疫组织化学染色 GFAP 表达增强等,其功能意义及其与中枢神经系统损伤修复的关系,多年来一直是人们研究的热点问题。国外许多实验研究表明^[10-12],AST 在脑梗死中具有重要的作用,其代谢特性表现为可在

脑梗死早期吞噬细胞外有害的神经介质,以维持脑内环境的稳定,AST 功能下降,可引起脑内环境紊乱,最终造成神经细胞死亡,体外培养表明,AST 可以分泌神经营养活性物质,AST 条件培养液具有促进神经细胞存活的作用。GFAP 作为 AST 活化的一个重要特征,其合成的多少对脑损伤程度有直接影响。Nawashiro 等^[13]用 GFAP 缺失的野生型小鼠制作脑缺血模型,结果发现其皮质梗死体积较对照组有明显增大,表明 AST 及 GFAP 在脑损伤的神经保护方面有重要作用。尽管一般认为活化 AST 引发胶质化而形成瘢痕,影响神经的再生与修复,不过近年来研究发现,活化的 AST 能释放胶质细胞源性神经营养因子(GDNF)、神经生长因子(NGF)、睫状神经营养因子(CNTF)和肝素结合生长相关因子(HB2GAM)、白细胞介素(IL-6)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)等大量的活性物质,可预防神经元的迟发性死亡,促进神经生长及神经修复^[4,14]。

康复训练的早期介入,可明显提高脑卒中患者的功能恢复率和生活质量,其神经机制受到广泛关注。既往研究已显示康复训练可影响脑缺血后的神经元生长及结构重组,包括引起皮质和海马区的神经元生长、突触形成和多形性改变等变化,但神经康复机制并不十分清楚,AST 的活化被认为是引起缺血后神经元结构重组的一种可能机制^[4]。本实验结果显示,大鼠康复训练组脑缺血后 7 d 和 14 d 后行为学评分明显好于造模对照组,缺血侧海马区和梗死灶周围的 GFAP 免疫活性也明显高于对照组,此实验结果与近年来国内外文献报道一致^[2-4],提示脑梗死康复训练可促进梗死灶周围活性细胞增生,从而对梗死后脑组织起到保护作用。

康复训练的强度问题也日益受到关注,已有大量临床研究证明高强度的康复治疗可改善脑卒中患者的功能预后,有学者将脑卒中患者分为每周 5 d 治疗组和每周 7 d 治疗组,两组在入院时 FIM 评分无明显差异,但每周 7 d 治疗组的住院天数明显缩短,而且出院时的 FIM 评分明显好于每周 5 d 治疗组^[15]。还有文献报道,强化语言训练明显改善语言功能,而且与损伤周围皮质重组和可塑性相关^[16],但是有关康复治疗强度对神经可塑性影响的实验研究目前见到的文献报道较少,不同强度的康复训练是否能引起脑缺血后相关区域神经胶质细胞发生不同的变化呢?本研究将接受康复训练的大鼠设计为常规康复训练组和强化康复训练组,强化训练组每次训练内容与常规康复训练组相同,但训练次数每日增加 1 次,研究结果表明强化训练组大鼠在造模后 7 d 时行为学评分和 GFAP 免疫活性与常规康复训练组无明显差异,但在造模后 14 d 时行为学评分明显好于常规康复训练组,缺血海马区和梗

死灶周围的 GFAP 表达的免疫活性也明显高于常规康复训练组,这为我们进一步探讨临床高强度康复治疗的效果奠定了初步的实验基础。

本实验由于条件的限制,仅研究了康复训练对脑缺血再灌注 2 周内的 AST 的变化,未涉及到较长时间段以及神经元再生、分化迁移等其他神经可塑性问题,今后还需在这些方面作进一步深入的研究。

参 考 文 献

- [1] Chen Y, Swanson RA. Astrocytes and brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2003,23:137-149.
- [2] 段淑荣,王德生,王勋,等. 康复训练对大鼠中动脉闭塞大鼠脑梗死灶周围 GFAP 表达的影响. *中风与神经疾病杂志*, 2004, 21: 133-135.
- [3] 袁华,龙华,李玲. 康复训练对脑梗死大鼠皮质 S-100、GFAP 和 Nestin 表达的影响. *中华物理医学与康复杂志*, 2003, 25: 520-523.
- [4] Teresita LB, Julie W, Magdalena W, et al. Astrocytic changes in the hippocampus and functional recovery after cerebral ischemia are facilitated by rehabilitation training. *Behav Brain Res*, 2006, 171: 17-25.
- [5] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniotomy in rats. *Stroke*, 1989, 20: 84-91.
- [6] Hua Y, Schallert T. Behavioral test after intracerebral hemorrhage in the rat. *Stroke*, 2002, 33: 2478-2484.
- [7] Zhang L, Schallert T. A test for detecting longterm sensorimotor dysfunction in the mouse after focal cerebral ischemia. *J Neurosci Meth*, 2002, 117: 207-214.
- [8] Hunter AJ, Hatcher J, Virley D, et al. Functional assessments in mice and rats after focal stroke. *Neuropharmacology*, 2000, 39: 806-816.
- [9] Hansson E, Ronnback L. Glial neuronal signaling in the central nervous system. *FASEB J*, 2003, 17: 341-348.
- [10] Bidmon HJ, Jancsik V, Schleicher A, et al. Structural alteration and changes in cytoskeletal proteins and proteoglycans after focal cortical ischemia. *Neuroscience*, 1998, 82: 397.
- [11] Gabryel B, Trzeciak HI. Role of astrocytes in pathogenesis of ischemic brain injury. *Neurotox Res*, 2001, 3: 205-221.
- [12] Dietrich WD, Truettner J, Prado R, et al. Thromboembolic events lead to cortical spreading depression and expression of c-fos, brain-derived neuron trophic factor, glial fibrillary acidic protein, and heat shock protein 70 mRNA in rats. *Cereb Blood Flow Metab*, 2000, 20: 103.
- [13] Nawashiro H, Brenner M, Fukui S, et al. High susceptibility to ischemia in GFAP-null mice. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2000, 20: 1040-1044.
- [14] Redet JL, Malhotro SK, Privat A. Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. *Trends Neurosci*, 1997, 20: 570-577.
- [15] Sonoda S, Saitoh E, Nagai S, et al. Full-time integrated treatment program, a new system for stroke rehabilitation with conventional rehabilitation. *Am J Phys Med Rehabil*, 2004, 83: 88-93.
- [16] Meinzer M, Elbert T, Wienbruch C, et al. Intensive language training enhances brain plasticity in chronic aphasia. *BMC Biol*, 2004, 2: 20.

(修回日期: 2006-12-15)

(本文编辑: 熊芝兰)