

运动训练对大鼠脑梗死灶周突触素 mRNA 及生长相关蛋白 mRNA 水平的影响

谭来勋 叶心国 刘志超 孙圣刚

【摘要】目的 研究运动训练对大鼠脑梗死灶周突触素 mRNA 和生长相关蛋白(GAP-43)mRNA 的表达水平和大鼠运动功能的影响。**方法** 将肾性高血压后的大脑中动脉闭塞脑梗死模型大鼠 100 只分成训练组和对照组($n=50$),训练组大鼠进行运动训练,对照组大鼠常规饲养。2 组大鼠均于制模成功后第 3,7,14 天采用横木行走实验评定各亚组大鼠运动功能,在制模成功后第 1,3,7,14,28 天用半定量逆转录-多聚酶链式反应法检测各组大鼠脑梗死灶周边区突触素 mRNA、GAP-43 mRNA 水平。**结果** 造模后第 7,14 天,2 组大鼠运动功能得分与本组造模后第 3 天比较,差异有统计学意义($P<0.01$);制模后第 7,14 天时,训练组运动功能得分[分别为(3.2±0.3)分和(5.8±0.9)分]显著高于对照组[分别为(1.6±0.4)分和(2.6±0.8)分],差异有统计学意义($P<0.01$)。2 组大鼠脑梗死灶周突触素 mRNA 和 GAP-43 mRNA 水平均在造模后第 1,3,7 天时逐渐增高,差异有统计学意义($P<0.01$)。训练组突触素 mRNA 水平在造模后第 3,7,14 和 28 天时均高于对照组,差异有统计学意义($P<0.01$);训练组 GAP-43 mRNA 水平仅在造模后第 3 和第 7 天时(0.295±0.03,0.512±0.045)高于对照组,差异有统计学意义($P<0.01$)。**结论** 运动训练可使大鼠脑梗死灶周突触素 mRNA 和 GAP-43 mRNA 水平增高,促进运动功能恢复。

【关键词】 突触素; 生长相关蛋白; 运动功能; 脑梗死

Changes in synaptophysin and growth associated protein-43 mRNA around a cerebral infarction after mobility training TAN Lai-xun*, YE Xin-guo, LIU Zhi-chao, SUN Sheng-gang. * Department of Neurology, Renmin Hospital, Wuhan University, Wuhan 430060, China

【Abstract】Objective To investigate the effects of mobility training on mobility and the mRNA levels of both synaptophysin and growth associated protein 43(GAP-43) in the region around an infarction in rats with acute cerebral infarction. **Methods** Models of cerebral infarction were created in 100 rats through middle cerebral artery occlusion. They were then randomly divided into training and control groups. The motor skill of the rats was examined using a beam walking test. The mRNA levels of both synaptophysin and GAP-43 in the region around the infarction were observed at the 1st, 3rd, 7th, 14th and 28th days after model-creation using a semi-quantitative reverse transcription polymerase chain reaction. **Results** The rats' mobility scores increased with training, and significant differences were observed between the average scores of the two groups at the 3rd, 7th and 14th days. The scores were higher in the training group. The mRNA levels of both synaptophysin and GAP-43 in the region around the infarction increased significantly from the 1st to the 3rd and 7th days. Synaptophysin mRNA levels were significantly higher in the trained group at each time point, but the levels of GAP-43 mRNA were significantly higher in the trained group only on the 3rd and 7th days. **Conclusions** Motor skill and the mRNA levels of synaptophysin and GAP-43 in the region around an infarction can be increased by motor skill training, at least in rats with model acute cerebral infarction.

【Key words】 Synaptophysin; Growth associated protein-43; Motor skill; Cerebral infarction

突触是神经元间信息传递和加工的重要结构,大鼠脑梗死后运动功能恢复与突触数目、结构和功能的增多、增强有重要关系,而运动训练可促使脑梗死后运动功能恢复^[1,2]。运动训练对脑梗死后运动功能恢复的作用机制尚未阐明。本资料于 2008 年 1

至 12 月用肾性高血压大鼠制成右侧大脑中动脉闭塞模型,用半定量的逆转录-多聚酶链式反应(reverse transfer- polymerase chain reaction, RT-PCR)等方法研究运动训练对脑梗死灶周突触素 mRNA、生长相关蛋白(growth associated protein, GAP-43) mRNA 水平和大鼠运动功能的影响。

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2010.03.002

作者单位:430060 武汉,武汉大学人民医院神经内科(谭来勋、叶心国、刘志超);华中科技大学同济医学院附属协和医院神经内科(孙圣刚)

材料与方法

一、实验动物制模与分组

共选取雄性一级 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 (武汉大学人民医院实验动物中心提供) 100 只, 2 ~ 3 月龄, 体重 (260 ± 20) g, 喂普通颗粒饲料, 饮自来水, 室温控制在 15 ~ 24 °C。按常规方法复制大鼠肾性高血压模型^[3], 术后每周测血压 1 次。于形成肾性高血压后第 16 周用线栓法制作右侧大脑中动脉闭塞脑梗死模型, 麻醉苏醒后 24 h 内具备下述之 2 条即为制模成功: ①左侧肢体疼痛刺激收缩现象消失; ②向左倾倒或转圈; ③提尾时左上肢不能向前伸直。将 100 只脑梗死大鼠分成训练组和对照组, 每组大鼠 50 只。

二、运动训练方法

训练组大鼠给予行走、抓握力、旋转等训练, 30 min/d。行走训练以平放在距地面 7 cm 的 170 × 2 cm² 的方木棒为平衡木让大鼠行走。抓握力训练使用网带为 50 cm × 40 cm, 网眼为 1 cm × 1 cm、距地面 80 cm 的网屏, 网板的左右和上方都用 25 cm 高的木板框边, 网屏下铺 12 cm 厚的海绵; 将大鼠置于水平网屏上, 然后缓缓抬高一端, 在 2 s 内将网屏变成垂直位, 保持 5 s, 观察大鼠状况。旋转训练: 用自制滚筒式网状训练器, 其中长 100 cm、直径 60 cm 的圆形网状仪器被分为 4 个格, 可同时训练 4 只大鼠, 其底座固定架的一端有手摇柄, 按 5 转/min 进行手摇旋转。对照组置于普通笼内常规饲养, 可自由活动。

三、运动功能训练和评分

采用大鼠横木行走试验 1 ~ 7 分评分法^[1]。横木由 120 cm × 2.5 cm 的木板制成, 一端为强光及噪音刺激, 对侧端为黑笼子。2 组大鼠于造模成功后第 3、7 和 14 天进行测试并评分。过横木时瘫痪肢体起作用 0% 为 1 分, 1% ~ 10% 为 2 分, 11% ~ 20% 为 3 分, 21% ~ 30% 为 4 分, 31% ~ 40% 为 5 分, 41% ~ 50% 为 6 分, 正常为 7 分。

四、突触素 mRNA 和 GAP-43 mRNA 检测

2 组大鼠均于造模成功后第 1, 3, 7, 14 和 28 天时采用随机数字表法随机抽取 10 只大鼠断头取脑。用半定量 RT-PCR 法分别检测其突触素 mRNA 和 GAP-43 mRNA 相关基因的表达水平^[4]。取大鼠缺血周边区脑组织 (液氮冻存) 100 mg, 加入 Trizol 总 RNA 提取液后将其匀浆、一步法提取总 RNA; 取各组大鼠脑组织总 RNA 5 μg 分别用 M-MLV 逆转录酶行 mRNA 逆转录反应; 然后分别从样品总 cDNA 中扩增突触素和 GAP-43 基因。以 β-actin 基因作为内参平行 RT-PCR 操作, 产物经琼脂糖凝胶电泳后在凝胶成像系统中扫描。各基因的上、下游引物序列分别为: β-actin (211 bp) CCTAAGCCAACCGTAAAG 3' 和 TCTTCATGGTCTAGGAGCCT 3'; 突触素

(363 bp) CCCTACATTCACCCACTTCTCC 3' 和 TTATCTCTCTCTGCCCCGTTTC 3'; GAP-43 (242 bp) CCTCTATGCCAACACAGTGC 3' 和 GTACTCCTGCTTGCTGATCC 3'。

五、统计学分析

数据用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 用 SPSS 软件包对数据进行方差分析、*t* 检验, 用 2 组及多组比较的方法分析训练组和对照组间在不同时间的差异。P < 0.05 表示差异有统计学意义。

结 果

一、肾性高血压模型的血压观察

2 组大鼠肾动脉狭窄术后 1 周血压开始升高, 16 周达 (197 ± 5) mmHg, 随后稳定在 198.6 mmHg 左右。2 组大鼠的血压间差异无统计学意义 (P > 0.05), 具有可比性。

二、运动功能测试得分

造模成功后第 3 天, 横木行走实验各组得分均为 1 分; 在第 7 和 14 天, 训练组得分均高于对照组, 差异有统计学意义 (P < 0.01)。训练组和对照组得分均随训练时间的延长而增高, 与组内各时间点比较差异均有统计学意义 (P < 0.01)。见表 1。

表 1 右侧大脑中动脉闭塞后运动功能得分 (分, $\bar{x} \pm s$)

组 别	只数	第 3 天	第 7 天	第 14 天
训练组	10	1.0 ± 0.0	3.2 ± 0.2 ^{ab}	5.8 ± 0.4 ^{abc}
对照组	10	1.0 ± 0.0	1.6 ± 0.4 ^b	2.6 ± 0.8 ^{bc}

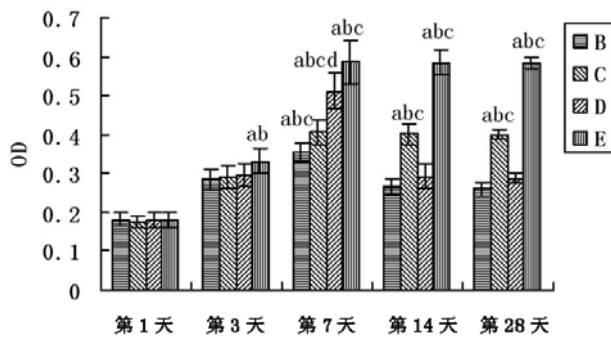
注: 与对照组同时点比较, ^aP < 0.01; 与第 3 天比较, ^bP < 0.01; 与第 7 天比较, ^cP < 0.01

三、突触素和 GAP-43 两者的 mRNA 水平

造模成功后大鼠脑梗死灶周突触素 mRNA 和 GAP-43 mRNA 水平均逐渐增高, 但 GAP-43 mRNA 的表达在第 7 天后迅速下降。训练组的突触素 mRNA 水平在第 3, 7, 14 和 28 天时均高于对照组, 差异有统计学意义 (P < 0.01), 而 GAP-43 mRNA 水平仅在第 3 和 7 天时高于对照组, 差异均有统计学意义 (P < 0.01), 详见图 1。

讨 论

脑梗死后, 病灶周围神经元凋亡增多, 轴突终末蜕变、突触结构解体、突触素表达水平下降, 而未受损神经元则通过出芽、突触素基因表达活化等机制以建立新突触^[5]。基因表达指生物基因组中结构基因的遗传信息经转录、翻译等过程, 合成蛋白质进而发挥其特定生物学功能和效应的全过程; 转录过程是基因表达调控的最重要环节^[6]。突触素是特异地分布于突触



注:单位为吸光度, B、D 分别为对照组和训练组的 GAP-43 mRNA, C、E 分别为对照组和训练组的突触素 mRNA 水平。与对照组同时点比较, ^a $P < 0.01$; 与第 1 天比较, ^b $P < 0.01$; 与第 3 天比较, ^c $P < 0.01$; 与第 14 天和第 28 天比较, ^d $P < 0.01$

图 1 训练组运动训练后不同时间点脑梗死周边区突触素和 GAP-43 mRNA 的表达

前囊泡膜上的钙结合蛋白,是研究突触的量化指标;它合成于神经元胞体后被转运至轴突终末参与调节钙依赖性神经递质的释放。文献报道,急性脑梗死后大鼠运动功能有自然恢复趋势,而运动训练有利于突触重建和运动功能恢复;但罕见有关运动训练对脑梗死灶周突触素基因转录影响的报道^[1]。

与报道相符,本研究中脑梗死模型大鼠运动功能的恢复均较明显,而运动训练使运动功能恢复显著加快。本研究中还表明,运动训练可促进大鼠梗死灶周突触素基因转录,但其突触素 mRNA 水平增高与运动功能恢复并非完全同步:突触素 mRNA 水平在脑梗死第 3 天即显著增高、第 7 天达峰值并稳定于此水平,而运动功能得分至脑梗死第 7 天才开始显著地持续增高(表 1、图 1)。关于运动训练后大鼠梗死灶周突触素基因转录的机制及其与运动功能的关系,目前罕见报道。作者推测,运动训练可促使突触素基因的反式作用因子结合顺式作用元件和 RNA 聚合酶后形成转录起始复合物、启动突触素基因转录,从而显著增高突触素 mRNA 水平,但基因表达还需经过翻译及其调控等一系列复杂的过程才能合成特定蛋白质^[7];再加上其它相关基因的表达过程而建立新突触,最终促使运动功能恢复^[1,8]。

GAP-43 是一种位于轴突生长锥质膜面的快速转运磷酸蛋白;在成熟脑中,它存在于边缘系统、皮质联合区、海马、嗅球及脑损伤部位等轴突生长和突触形成活跃之处,是神经生长及再生的量化指标^[9-10]。本资料表明,缺血 7 d 内大鼠脑梗死灶周 GAP-43 mRNA 水

平均增高,但随后迅速下降;第 3 和 7 天时训练组 GAP-43 mRNA 水平显著高于对照组(图 1)。提示在脑梗死早期因神经元缺失而存在应激反应,运动训练虽可强化此反应,但此应激反应对运动功能恢复可能不占主导地位^[1,7]。

综上所述,大鼠脑梗死早期的运动训练可促进突触素基因转录,最终加速运动功能恢复;神经再生对此可能不起主要作用。运动训练促进突触素基因转录和运动功能恢复的机制问题有待继续研究。

参 考 文 献

- [1] 谭来勋, 孙圣刚, 张双国. 运动训练诱发大鼠脑梗死周边区域神经突触可塑性变化的机制. 中华物理医学与康复杂志, 2006, 28: 433-436.
- [2] Dunsky A, Dickstein R, Marcovitz E, et al. Home-based motor imagery training for gait rehabilitation of people with chronic poststroke hemiparesis. Arch Phys Med Rehabil, 2008, 89:1580-1588.
- [3] Liao SJ, Lin JW, Pei Z, et al. Enhanced angiogenesis with dl-3n-butylphthalide treatment after focal cerebral ischemia in RHRSP. Brain Res, 2009, 1289: 69-78.
- [4] Bai L, Spiwoкс-Becker I, Leube RE. Transcriptome comparison of murine wild-type and synaptophysin-deficient retina reveals complete identity. Brain Res, 2006, 1081:53-58.
- [5] Giral-di-Guimarães A, Rezende-Lima M, Bruno FP, et al. Treatment with bone marrow mononuclear cells induces functional recovery and decreases neurodegeneration after sensorimotor cortical ischemia in rats. Brain Res, 2009 Feb 9. [Epub ahead of print]
- [6] Kumral A, Tuzun F, Yesilirmak D, et al. Role of epigenetic regulatory mechanisms in neonatal hypoxic-ischemic brain injury. Med Hypotheses, 2009, 72: 692-693.
- [7] Ekici M, Schmitz F, Hohl M, et al. Chromatin structure and expression of synapsin I and synaptophysin in retinal precursor cells. Neurochem Int, 2008, 53: 165-172.
- [8] 谭来勋, 孙圣刚, 张双国, 等. 脑梗死大鼠运动训练后星形胶质细胞与突触和运动功能的变化. 中华物理医学与康复杂志, 2005, 27: 475-480.
- [9] 刘广义. 大鼠脑缺血再灌注损伤后 GAP-43 及 IGF-1 在神经系统中的表达. 中华神经外科疾病研究杂志, 2008, 7:223-226.
- [10] 樊振勇, 陈丽娜, 徐标峰, 等. 运动训练对血管性痴呆大鼠学习记忆力及 GAP-43 表达的影响. 中华物理医学与康复杂志, 2009, 31: 433-436.

(修回日期:2009-09-29)

(本文编辑:阮仕衡)