

## · 基础研究 ·

# 游泳训练对脑梗死大鼠大脑皮质中神经生长因子及神经营养因子-3 表达的影响

孙国剑 马军廷 李占标 王强

**【摘要】目的** 观察游泳训练对脑梗死大鼠神经生长因子(NGF)及神经营养因子-3(NT-3)表达的影响,并初步探讨运动训练对脑梗死大鼠的神经保护机制。**方法** 共选取健康雄性 SD 大鼠 45 只,采用随机数字表法将其分为假手术组、对照组及训练组。采用线栓法将对照组及训练组大鼠制成左侧大脑中动脉阻塞(MCAO)2 h 再灌注模型,假手术组大鼠制模期间不阻塞大脑中动脉血流。训练组大鼠制模后给予游泳训练,每日 1 次,每次持续 10 min,对照组及假手术组大鼠制模后不给予任何特殊处理。于制模后 3 d、7 d 及 14 d 时采用 Bederson 评分法评定各组大鼠神经功能缺损情况;采用 RT-PCR 法检测各组大鼠缺血侧脑皮质 NGF 及 NT-3 mRNA 表达量。**结果** 假手术组大鼠术后无神经行为缺陷,制模后 3 d、7 d 及 14 d 时训练组大鼠 Bederson 评分均显著低于同时相点对照组水平( $P < 0.05$ ),高于同时相点假手术组水平( $P < 0.05$ ),并且制模后 14 d 时训练组 Bederson 评分 $[(1.20 \pm 0.45)]$ 亦显著低于制模后 3 d 及 7 d 时水平( $P < 0.05$ )。训练组各时相点缺血侧脑皮质 NGF 及 NT-3 mRNA 表达量均较对照组、假手术明显增强( $P < 0.05$ );随着时间进展,制模后 14 d 时训练组 NGF 及 NT-3 mRNA 含量[分别为 $(0.66 \pm 0.07)$ 、 $(0.79 \pm 0.06)$ ]均较制模后 3 d 及 7 d 时明显提高( $P < 0.05$ )。**结论** 游泳训练能上调脑梗死大鼠缺血侧脑皮质 NGF 及 NT-3 mRNA 表达,这可能是运动训练促进脑梗死大鼠受损神经功能恢复的重要机制之一。

**【关键词】** 运动训练; 脑缺血再灌注; 神经再生; 神经生长因子; 神经营养因子-3

**Influence of swimming training on the expression of nerve growth factor and neurotrophins-3 in rats with cerebral infarction** Sun Guojian, Ma Junting, Li Zhanbiao, Wang Qiang. Department of Rehabilitation Medicine, The People's Hospital of Liaocheng, Liaocheng 262000, China

Corresponding author: Wang Qiang, Email: sakulawangqiang@hotmail.com

**【Abstract】Objective** To observe the influence of swimming training on the expression of nerve growth factor (NGF) and neurotrophins-3 (NT-3) in rats with cerebral infarction, and to explore the underlying neuroprotection mechanism of exercise training on cerebral infarction. **Methods** Forty-five healthy male Sprague-Dawley rats were randomly divided into a sham-operation group, a control group and a training group, with 15 rats in each group. Each group was further divided into a 3-day, 7-day and 14-day subgroups, which amounts to 9 groups. To establish animal model of cerebral ischemia-reperfusion in rats, the intraluminal thread method was applied to cause left middle cerebral artery occlusion (MCAO) for 2 h before reperfusion. The rats of the training group were given swimming training for 10 min, once daily, while those of the sham-operation and control groups were not given any training. Neurological deficits were assessed using Bederson scores. The expression of NGF mRNA and NT-3 mRNA in the ischemia-reperfusion pallium was examined using reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** The rats of the sham-operation group showed no neurological deficits. At the same time points, the average Bederson scores of the training group were significantly lower than the control group, but significantly higher than the sham group. Moreover, the 14 d training group had the lowest Bederson score ( $1.20 \pm 0.45$ ), compared to the value 3 and 7 days after modeling. The expression of NGF mRNA and NT-3 mRNA of ischemic cerebral cortex in the training group was significantly improved when compared to the sham-operation group or the control group. On day 14, the expression of the NGF mRNA ( $0.66 \pm 0.07$ ), and the NT-3 mRNA ( $0.79 \pm 0.06$ ), were significantly higher than those on day 3 and 7. **Conclusions** Swimming training could increase the expressions of NGF mRNA and NT-3 mRNA in the ischemic cerebral cortex. It might be one of the key mechanisms that exercise training could promote the recovery of damaged neurological function in rats with cerebral infarction.

**【Key words】** Exercise training; Cerebral ischemia-reperfusion; Neural regeneration; Nerve growth factor; Neurotrophins-3

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2015.08.001

作者单位:252000 聊城,山东省聊城市人民医院康复医学科

通信作者:王强,Email:sakulawangqiang@hotmail.com

脑卒中具有高致残率、高发病率及高死亡率等特点,其高致残性使患者不同程度丧失运动、感觉功能,严重影响其生活质量<sup>[1-3]</sup>。大量研究发现,运动训练能促进脑卒中患者受损神经功能恢复<sup>[4-7]</sup>,但其确切神经生物学机制尚未完全明确。神经生长因子(nerve growth factor, NGF)与神经营养因子-3(neurotrophins-3, NT-3)均是神经营养因子家族中重要成员,不仅能促进神经元与神经胶质细胞存活、生长与分化,而且还可以促进轴突髓鞘化及再生,对脑梗死大鼠受损神经功能恢复具有重要作用<sup>[8-9]</sup>。本实验应用线栓法建立左侧大脑中动脉缺血再灌注大鼠模型,并观察游泳训练对其大脑皮质 NGF 及 NT-3 mRNA 表达的影响,以探讨运动训练对脑缺血再灌注大鼠的神经保护机制,为运动训练应用于脑卒中后遗症治疗提供理论依据。

## 材料与方法

### 一、脑缺血再灌注模型制作

共选取成年健康雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 45 只,体重 240 ~ 260 g,清洁级,由山东济宁鲁抗大鼠饲养中心提供(动物合格证号 SLXK2008002),参照 Longa 法采用颈外动脉线栓法制作左侧大脑中动脉阻塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)2 h 再灌注动物模型<sup>[10]</sup>。造模成功标准如下:大鼠苏醒后出现左侧 Honer 征,提尾悬空时右前肢屈曲、内收,爬行时向右侧转圈。根据 Bederson 等<sup>[11]</sup>推荐的神经行为评分法,将麻醉清醒后评分为 1 ~ 3 分的大鼠纳入研究。假手术组大鼠造模方法同上,但手术期间不阻塞大脑中动脉血流。

### 二、分组与干预

采用随机数字表法将纳入研究的 45 只大鼠分为训练组、对照组及假手术组,每组 15 只。训练组大鼠于脑缺血再灌注 24 h 后开始游泳训练,将大鼠单独置于注满水的长方形(长 0.8 m、宽 0.8 m)透明玻璃容器内,容器内水深 0.6 m,水温 29 ~ 31 °C,水面距容器顶部边缘 0.4 m,大鼠每天游泳 1 次,每次持续 10 min。对照组、假手术组大鼠则不给予任何特殊训练。

### 三、Bederson 评分

于制模后 3 d、7 d 及 14 d 时分别采用 Bederson 等<sup>[11]</sup>推荐的评分法对各组大鼠神经功能缺损情况进行评定,0 分表示大鼠未见明显行为缺陷;1 分表示大鼠左前肢屈曲(提尾悬空实验阳性);2 分表示大鼠侧推抵抗力下降(侧向推力实验阳性);3 分表示大鼠侧推抵抗力下降并伴有自发性转圈。

### 四、NGF 及 NT-3 mRNA 检测

于制模后 3 d、7 d 及 14 d 时各组分别取 5 只大鼠采用过量水合氯醛(浓度为 10%)深度麻醉,并于冰盘

上快速断头取脑,严格按照无菌条件分离左侧大脑皮质并置于 -80 °C 冰箱中保存。取各组大鼠脑皮质采用 Trizol RNA 试剂盒提取组织总 RNA,采用 K5500 测定总 RNA 纯度和浓度,并于 -80 °C 环境下保存总 RNA。cDNA 第一链合成后于 42 °C 条件下反转录 30 min,95 °C 反应 5 min 灭活反转录酶,4 °C 反应 5 min 后冷却降温,于 -20 °C 环境下保存 cDNA。以反转录的 cDNA 作为 PCR 模板扩增,其中 NGF 上游引物序列为 5'-TC-GAGGCACACAAAGAAGA-3',下游引物序列为 5'-TCACCGCATGGGTAAAG-3'; NT-3 上游引物序列为 5'-CGGTGCTAGCCAATAGAA-3',下游引物序列为 5'-AGTCAGTGCTCGGACATAG-3'; 3-磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)上游引物序列为 5'-CACCCGCGAGTACAACCTTC-3',下游引物序列为 5'-CCCATACCCACCATCACACC-3'。制备 2% 琼脂糖凝胶,取各组大鼠 RT-PCR 产物 4 μl,加入上样缓冲液后于 120 V 电压下电泳 30 min,采用 UVP 凝胶图像处理系统拍摄并储存图像,选用 Image J 图像系统分析图像并记录结果。

### 五、统计学分析

本研究所得计量数据以( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用 SPSS 17.0 版统计学软件包进行数据分析,计量数据比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

## 结 果

### 一、各组大鼠 Bederson 评分比较

制模后不同时间点假手术组大鼠均未发现明显神经功能缺损,训练组大鼠 Bederson 评分均显著低于相同时间点对照组水平( $P < 0.05$ ),高于相同时间点假手术组水平( $P < 0.05$ );并且制模后 14 d 时训练组 Bederson 评分均显著低于制模后 3 d 及制模后 7 d 时 Bederson 评分( $P < 0.05$ ),具体数据见表 1。

表 1 制模后不同时间点各组大鼠 Bederson 评分比较 (分,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	只数	制模后 3 d	制模后 7 d	制模后 14 d
假手术组	15	0	0	0
对照组	15	3.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	2.80 ± 0.45 <sup>a</sup>	2.60 ± 0.55 <sup>a</sup>
训练组	15	2.20 ± 0.45 <sup>ab</sup>	1.60 ± 0.55 <sup>abc</sup>	1.20 ± 0.45 <sup>abcd</sup>

注:与同时相点假手术组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与同时相点对照组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与组内制模后 3 d 时比较,<sup>c</sup> $P < 0.05$ ;与组内制模后 7 d 时比较,<sup>d</sup> $P < 0.05$

### 二、制模后不同时间点各组大鼠 NGF mRNA 表达比较

制模后不同时间点训练组 NGF mRNA 表达量均显著高于对照组及假手术组水平,组间差异均具有统计学意义( $P < 0.05$ );进一步分析发现,随着实验进行,训练

组 NFG mRNA 表达量逐渐增高,如制模后 14 d 时训练组 NFG mRNA 表达量均显著高于制模后 3 d 及制模后 7 d 时水平 ( $P < 0.05$ ),具体情况见表 2、图 1。

表 2 制模后不同时间点各组大鼠 NGF mRNA 表达水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	只数	制模后 3 d	制模后 7 d	制模后 14 d
假手术组	5	0.22 ± 0.04	0.25 ± 0.05	0.27 ± 0.06
对照组	5	0.33 ± 0.08 <sup>a</sup>	0.44 ± 0.09 <sup>a</sup>	0.49 ± 0.09 <sup>a</sup>
训练组	5	0.46 ± 0.08 <sup>ab</sup>	0.57 ± 0.07 <sup>abc</sup>	0.66 ± 0.07 <sup>abcd</sup>

注:与同时相点假手术组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与同时相点对照组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与组内制模后 3 d 时比较,<sup>c</sup> $P < 0.05$ ;与组内制模后 7 d 时比较,<sup>d</sup> $P < 0.05$

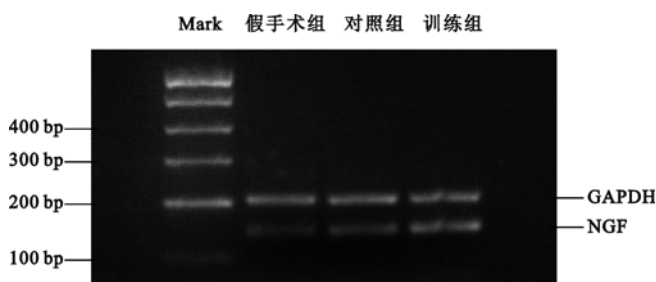


图 1 制模后 14 d 时各组大鼠 NGF mRNA 电泳结果分析

### 三、制模后不同时间点各组大鼠 NT-3 mRNA 表达比较

制模后不同时间点训练组 NT-3 mRNA 表达量均显著高于对照组及假手术组水平,组间差异均具有统计学意义 ( $P < 0.05$ );进一步分析发现,随着实验进行,训练组 NT-3 mRNA 表达量逐渐增高,如制模后 14 d 时训练组 NT-3 mRNA 表达量均显著高于制模后 3 d 及制模后 7 d 时水平 ( $P < 0.05$ ),具体情况见表 3、图 2。

表 3 制模后不同时间点各组大鼠 NT-3 mRNA 表达水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	只数	制模后 3 d	制模后 7 d	制模后 14 d
假手术组	5	0.17 ± 0.04	0.22 ± 0.06	0.24 ± 0.06
对照组	5	0.24 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.34 ± 0.07 <sup>a</sup>	0.46 ± 0.06 <sup>a</sup>
训练组	5	0.58 ± 0.05 <sup>ab</sup>	0.66 ± 0.06 <sup>abc</sup>	0.79 ± 0.06 <sup>abcd</sup>

注:与同时相点假手术组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与同时相点对照组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与组内制模后 3 d 时比较,<sup>c</sup> $P < 0.05$ ;与组内制模后 7 d 时比较,<sup>d</sup> $P < 0.05$

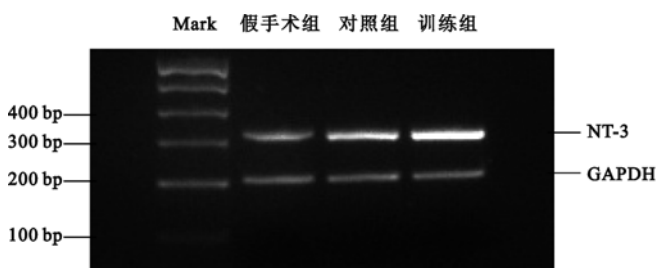


图 2 制模后 14 d 时各组大鼠 NT-3 mRNA 电泳结果分析

## 讨 论

本实验应用线栓法建立 MCAO 大鼠模型,采用 Bederson 评分对大鼠进行动态神经行为学测定,以观察运动训练对脑梗死大鼠受损神经功能的影响。本研究结果显示:假手术组大鼠术后无神经功能缺损,对照组及训练组大鼠 Bederson 评分均较假手术组相同时相点明显提高 ( $P < 0.05$ ),提示制模后大鼠运动功能明显减退。训练组大鼠于制模后每天给予游泳训练,连续动态观察训练 3 d、7 d 及 14 d 后大鼠 Bederson 评分改善情况,发现训练组 Bederson 评分均明显低于相同时相点对照组水平 ( $P < 0.05$ ),并且以制模后 14 d 时训练组大鼠 Bederson 评分改善幅度最显著。上述结果表明,游泳训练能有效改善脑梗死大鼠受损神经功能,随着训练次数增多,大鼠受损神经功能持续改善。

目前关于运动训练促进脑梗死大鼠受损神经功能恢复的神经生物学机制尚未明确。随着相关研究深入,神经营养因子在神经损伤修复中的作用日益受到重视。NGF 与 NT-3 均是神经营养因子家族中重要成员,对于神经细胞存活、分化、递质合成以及轴突髓鞘化等均具有调控作用<sup>[8-9,12]</sup>。NGF 是 Levi-Montalcini 等学者<sup>[13]</sup>于 1951 年首先发现,也是迄今为止研究最清楚的神经生长因子之一,兼有营养神经及促进神经轴突生长的双重功效;该细胞因子主要分布于神经靶细胞内,如中枢神经胶质细胞、外周施万细胞、骨骼肌及一些腺体内。NGF 通过与反应性神经元表面特异性受体 TrkA 或 p75 结合而发挥作用<sup>[14-16]</sup>。相关研究报告,NGF 含量及脑缺血后病理改变与脑缺血区神经元变性、坏死密切相关,提高 NGF 含量有助于修复受损神经元及促进脑功能恢复<sup>[17]</sup>。NT-3 是 Ernfors 等<sup>[18]</sup>学者于 1990 年发现的一种小分子量碱性蛋白质,与 NGF 具有高度同源性,且功能上相互关联;该细胞因子主要分布于大脑皮质、脊髓、海马等部位。TrkC 是 NT-3 的主要受体,与其结合后通过 Akt/促分裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinases, MAPK) 信号通路促进神经细胞增殖、分化,同时还对神经组织具有营养作用<sup>[19-20]</sup>。

本研究中训练组大鼠经 3 d、7 d、14 d 游泳训练后,发现其缺血侧脑皮质 NGF、NT-3 mRNA 表达量均较同时相点对照组、假手术组明显增高 ( $P < 0.05$ ),并且上述指标均在大鼠持续训练 14 d 后达到峰值,与 Bederson 评分结果相吻合。上述结果提示,游泳训练能改善脑梗死大鼠受损神经功能,其作用机制可能与上调脑梗死部位 NGF、NT-3 表达有关。需要指出的是,本研究观察时间偏短,其结果具有一定局限性,随着持续训练时间增加,运动干预对受损神经组织的治

疗作用是否与脑缺血组织内 NGF、NT-3 变化具有对应关系还有待继续深入探讨。

### 参 考 文 献

- [1] Sakamoto K, Nakamura T, Uenishi H, et al. Immediate effects of unaffected arm exercise in post-stroke patients with spastic upper limb hemiparesis[J]. *Cerebrovasc Dis*, 2014, 37(2):123-127.
- [2] Feng WW, Bowden MG, Kautz S. Review of transcranial direct current stimulation in poststroke recovery[J]. *Top Stroke Rehabil*, 2013, 20(1):68-77.
- [3] 唐朝正, 丁政, 李春燕, 等. 运动想象结合任务导向训练对慢性期脑卒中患者上肢功能影响的随机对照研究[J]. *中华物理医学与康复杂志*, 2014, 36(11):833-837.
- [4] Straube DD, Holleran CL, Kinnaird CR, et al. Effects of dynamic stepping training on nonlocomotor tasks in individuals poststroke[J]. *Phys Ther*, 2014, 94(7):921-933.
- [5] Lee KH, Kim JH, Choi DH, et al. Effect of task-specific training on functional recovery and corticospinal tract plasticity after stroke[J]. *Restor Neurol Neurosci*, 2013, 31(6):773-785.
- [6] Wu M, Landry JM, Kim J, et al. Robotic resistance/assistance training improves locomotor function in individual poststroke: a randomized controlled study[J]. *Arch Phys Med Rehabil*, 2014, 95(5):799-806.
- [7] 刘德山, 刘楠, 张逸仙. 跑台运动训练对脑缺血损伤大鼠热休克蛋白 70 及 C-MYC 表达的影响[J]. *中华物理医学与康复杂志*, 2014, 32(5):333-337.
- [8] Bothwell M. NGF, BDNF, NT3, and NT-4[J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2014, 220(1):3-15.
- [9] Ichim G, Tauszig-Delamasure S, Mehlen P. Neurotrophins and cell death[J]. *Exp Cell Res*, 2012, 318(11):1221-1228.
- [10] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. *Stroke*, 1989, 20(1):84-91.
- [11] Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, et al. Rat middle cerebral artery occlusion; evaluation of the model and development of a neurologic examination[J]. *Stroke*, 1986, 17(3):472-476.
- [12] Kamei N, Tanaka N, Oishi Y, et al. BDNF, NT-3, and NGF released from transplanted neural progenitor cells promote corticospinal axon growth in organotypic cocultures[J]. *Spine*, 2007, 32(12):1272-1278.
- [13] Levi-Montalcini R. The nerve growth factor[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 1964, 118(10):149-170.
- [14] Manca A, Capsoni S, Di Luzio A, et al. Nerve growth factor regulates axial rotation during early stages of chick embryo development[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(6):2009-2014.
- [15] 田德虎, 张英泽, 赵峰, 等. 分米波对大鼠再生神经 NGF mRNA 表达的影响[J]. *中华物理医学与康复杂志*, 2005, 27(3):141-144.
- [16] Bradshaw RA, Pundavela J, Biarc J, et al. NGF and ProNGF; regulation of neuronal and neoplastic responses through receptor signaling[J]. *Adv Biol Regul*, 2015, 58(1):16-27.
- [17] Ding Y, Li J, Luan X, et al. Exercise pre-conditioning reduces brain damage in ischemic rats that may be associated with regional angiogenesis and cellular over-expression of neurotrophin[J]. *Neuroscience*, 2004, 124(3):583-591.
- [18] Erfors P, Ebendal T, Olson L, et al. Molecular cloning and neurotrophic activities of a protein with structural similarities to nerve growth factor; development and topographical expression in the brain[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990, 87(14):5454-5458.
- [19] Liu S, Blanchard S, Bigou S, et al. Neurotrophin 3 improves delayed reconstruction of sensory pathways after cervical dorsal root injury[J]. *Neurosurgery*, 2011, 68(2):450-461.
- [20] Zhang ZH, Wang R, Wang RZ, et al. Transplantation of neural stem cells modified by human neurotrophin-3 promotes functional recovery after transient focal cerebral ischemia in rats[J]. *Neurosci Lett*, 2008, 444(3):227-230.

(修回日期:2015-04-17)

(本文编辑:易浩)

· 消息 ·

## 第十二届神经康复——优化运动技能(运动学习)学习班通知

北京大学第一医院康复医学科自 1999 年将澳大利亚悉尼大学教授 J. H. Carr 和 R. Shepherd 的《中风病人的运动再学习方案》一书翻译并发行后,已举办十一届有关“运动学习”的全国学习班。其间于 2007 年 Carr 和 Shepherd 教授的升级版《脑卒中康复:优化运动技能的练习与训练指南》一书也被翻译成中文出版,成为学习班新教材。2015 年两位教授的《Neurological Rehabilitation-Optimising Motor Performance》第二版又将被翻译成中文《神经康复——优化运动技能》出版,该书不仅增添了近年国际研究新成果,还将应用范围从脑卒中扩展至小脑损伤、躯体感觉与感知觉障碍、脑外伤、帕金森病和多发性硬化等多种常见中枢神经系统损伤所导致的功能障碍,同时突出了日常生活活动中生物力学特点。因此,今年的学习班[国家级继续教育项目 2015-16-00-088(国)]将以此新书为教材,将“运动学习”理念的诠释不断深入、应用不断扩展。授课教师由我科该书的部分译者承担,由经验丰富的治疗师进行技术演示,采用理论解析与操作示范相结合的方式,授课内容强调机制循证性和临床实用性。时间为 2015 年 10 月 18—23 日(18 日报到)。学费 3000 元(包含书和讲义)。食宿统一安排,费用自理。考试合格者授予国家级继续教育 I 类学分 10 学分。北京学员上课期间均需携带学分校。报名请在开班前 1 个月内,登录北医继教管理系统。具体操作:①登录网址 <http://jgl.bjmu.edu.cn> 点击“项目报名”进入网站报名项目列表;②找到““运动学习(Motor Learning)”理论和技术在康复治疗中的应用”项目名称点击右侧“报名入口”;③逐项填写完个人信息(带\*为必填项),点击“保存”,系统左上角会提示保存成功;即表示网上报名成功。即日起可先将个人信息发送至 [luochun226@sina.com](mailto:luochun226@sina.com),或电话联系 010-83575162 或 83572455 罗春。名额为 50 人。若无第二轮通知,请按时报到,地点:北京市西城区西什库大街 7 号北京大学第一医院第二住院部 A 区一层康复医学科。(之前刊登的消息有误,请以此为准,甚感抱歉!)

北京大学第一医院 教育处继续教育办公室