

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.07.007

跑台训练与强制性运动对脑梗死大鼠神经功能恢复的对比性研究*

张璇¹ 张卓然² 段淑荣³ 蒋莱¹ 范志新⁴

(1 哈尔滨医科大学附属第四医院神经内科 黑龙江 哈尔滨 150001; 2 哈尔滨医科大学附属第四医院药学部 黑龙江 哈尔滨 150001; 3 哈尔滨医科大学附属第一医院神经内科 黑龙江 哈尔滨 150001; 4 哈尔滨医科大学附属第一医院心内科 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘要 目的:探讨跑台训练与强制性运动康复训练对脑梗死大鼠神经功能恢复的差异。**方法:**将 50 只 SD 雄性大鼠随机分为正常组、假手术组、模型组、跑台训练组(T 组)、强制性运动训练组(C 组),每组 10 只,T 组及 C 组于造模后 24 h 分别进行跑台训练及强制性运动训练,其他各组正常饲养。术后 14 天、21 天及 28 天分别进行神经功能缺损评分(NSS 评分),随后取脑采用免疫组织化学方法观察脑梗死灶周围巢蛋白(Nestin)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)、神经胶质酸性蛋白(GFAP)的表达。**结果:**各亚组同一时间 NSS 评分组间比较:C 组、T 组评分高于正常组及假手术组,但明显低于模型组($P<0.05$);C 组评分明显低于 T 组($P<0.05$);各组内比较差异无统计学意义($P>0.05$)。C 组、T 组 Caspase-3 的表达明显低于正常组、假手术组及模型组($P<0.05$),而 Nestin、GFAP 的表达高于正常组、假手术组及模型组($P<0.05$)。T 组 Caspase-3 的表达明显高于 C 组($P<0.05$),Nestin、GFAP 的表达低于 C 组($P<0.05$)。**结论:**跑台训练与强制性运动康复训练 2 种方法对脑梗死大鼠神经功能恢复均有效;强制性运动的效果优于跑台训练。

关键词:强制性运动;跑台训练;康复训练;脑梗死;神经功能缺损

中图分类号:Q95-3;R743.32 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2015)07-1226-04

Comparative Study of Treadmill Training and Constraint-induced Movement Therapy on the Recovery of Neural Function in Rats with Cerebral Infarction*

ZHANG Xuan¹, ZHANG Zhuo-ran², DUAN Shu-rong³, JIANG Lai¹, FAN Zhi-xin⁴

(1 Department of Neurology, Fourth Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150001, China;

2 Pharmaceutical department, Fourth Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150001, China;

3 Department of Neurology, First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150001, China;

4 Department of cardiology, Fourth Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150001, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the difference between treadmill training and constraint-induced movement therapy on the neural function after middle cerebral artery occlusion in rats. **Methods:** 50 healthy female SD rats were randomly divided into 5 groups: normal group, sham operation group, model group, treadmill training group (T group) and constraint-induced movement therapy group(C group), with 10 rats in each group. Treadmill training and constraint-induced movement therapy were used respectively for T group and C group after modeling, while rats in the other groups were given normal feeding. The neurologic impairment scores(NSS) were analyzed at 14 days, 21 days and 28 days respectively after operation. And immuno-histochemical technique was used to observe the expression levels of Nestin, Caspase-3 and GFAP in cortical ischaemic lesions of the rats in each group after 28 days. **Results:** Comparison of each sub group at the same time: the scores of NSS in C group and T group were significantly higher than that in normal group and sham operation group, but lower than that in the model group ($P<0.05$); the scores of NSS in C group were significantly lower than that in the T group ($P<0.05$). There was no significant difference at the different time points in the same group ($P>0.05$). The expression levels of Caspase-3 in C group and T group were significantly lower than that in normal group, sham operation group and model group($P<0.05$), while the expression levels of Nestin and GFAP were just the opposite($P<0.05$); the expression levels of Caspase-3 in T group significantly were lower than that in C group ($P<0.05$), but the expression levels of Nestin and GFAP were just the opposite ($P<0.05$). **Conclusions:** The two methods of treadmill training and constraint-induced movement therapy were effective on neural functional recovery in rats with cerebral infarction; constraint-induced movement therapy was better than treadmill training.

Key words: Constraint-induced movement therapy; Treadmill training; Rehabilitation training; Cerebral infarction; Nerve function defect

Chinese Library Classification (CLC): Q95-3; R743.32 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2015)07-1226-04

* 基金项目:黑龙江省青年科学基金项目(QC2013C104)

作者简介:张璇(1977-),女,主治医师,研究方向:脑血管疾病,E-mail:hydsyzx@126.com

(收稿日期:2014-08-08 接受日期:2014-08-30)

前言

康复治疗是脑梗死的主要治疗方法之一^[1,2]。通过康复治疗能有效地减少神经元损伤,促进受损神经的功能恢复,目前的康复治疗方式包括康复训练及物理辅助治疗。运动功能训练主要包括跑台训练、跑笼训练、踏车训练、游泳、平衡木等,通过这些康复训练,神经功能可得到恢复。跑台训练是目前国际通行的卒中后运动模式,而强制性运动康复训练是康复训练的新形式^[3-5]。强制性康复训练的实施是限制健侧肢体的活动,被动的使用患侧肢体,在生活环境中不断的强化训练促进康复的方法^[6-8]。跑台训练则是通过定时及周期性练习,刺激神经系统,以恢复受损神经,其运动强度往往高于强制性运动,而频率则相对较弱。Nestin、Caspase-3、GFAP 是评价神经功能受损及恢复的可靠指标。本次研究旨在通过测定神经功能及其相关因子,比较 2 种运动方式的治疗效果,为临床确定脑梗死康复训练的强度、频率等具体方案提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

雄性 SD 大鼠 50 只(哈尔滨医科大学实验动物中心提供,大鼠质量合格证号 SCXK(黑)2010-2013),清洁级,体重 250-280 g。

1.2 试剂和仪器

试剂:10%水合氯醛(哈尔滨医科大学附属第四医院药剂科提供),Nestin、Caspase-3、GFAP 多克隆抗体(上海科兴生物科技有限公司);二步法免疫组化试剂盒(深圳芬德生物技术有限公司),其他试剂均为国产分析纯。仪器:MA752 型脑组织切片机(英国 Campden 公司);JPLY UC08 显微摄影成像系统(广州市精谱徕电子科技有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 实验分组 将 50 只 SD 雄性大鼠随机分为正常组、假手术组、模型组、跑台训练组(T 组)、强制性运动训练组(C 组),每组各 10 只。

1.3.2 实验方法 采用改良 zeaLonga 线栓法将 C 组、T 组及模型组大鼠制成左侧大脑中动脉栓塞/再灌注动物模型^[9]:将大鼠置于动物手术台上,按 3 mL/kg 10%水合氯醛腹腔注射,麻醉生效后改用仰卧位,取颈部正中切口 2 cm,逐层分离暴露左侧颈总动脉(CCA)与颈内动脉(ICA),分离迷走神经,结扎 CCA,分离 ICA,置 4-0 丝线于近心端,钳夹远端,在 CCA 分叉处用眼科剪刀剪一“V”形切口,将 4-0 尼龙线沿 CCA 插至 ICA 分叉处,用近心端丝线固定栓线,逐层缝合并消毒。栓塞 90

min 后再次进行腹腔注射麻醉,将线栓拔出约 10 mm 并剪除。假手术组大鼠仅分离 CCA、迷走神经、ICA。正常组不进行任何处置。

动物清醒后按 zeaLonga 法评定大鼠神经功能缺损情况^[10]:0 分:无任何神经功能缺失体征;1 分:右侧前肢不能伸展(轻度);2 分:右侧肢体屈曲外推力下降(中度);3 分:中度体征+行走时右侧转圈;4 分:意识障碍,不能自发行走。造模成功指征:zeaLonga 评分 1-3 分。剔除 1 分及 4 分大鼠,空缺数量予以补充。

1.3.3 强制性运动模型制备 麻醉方法同上,将左侧肢体自然屈曲后石膏、绷带固定,放回笼中,固定健侧肢体以强制运动患肢,于术后 24 h 进行。

1.3.4 跑台运动模型制备 跑台训练组于手术后 24 h 进行,第 1、2 天速度 10 m/min,每天 20 min,然后提升速度为 15 m/min,每天 30 min。

1.3.5 神经功能缺损评分 Bederson 评分方法同前,于 14 天、21 天、28 天进行评分。

1.3.6 标本采集及指标检测 (1)标本采集:28 天后将大鼠置于手术台,深度麻醉后固定。暴露心脏,置管于右心耳,100 mL 生理盐水冲洗,然后用 4%多聚甲醛溶液 200 mL 灌注固定,断头取脑,将脑组织存置于 4%多聚甲醛溶液固定过夜,石蜡包埋。(2)免疫组化法:经脱蜡-水化-封闭,PBS 冲洗 2 min×3 次,柠檬酸法抗原修复,滴加一抗(Nestin、Caspase-3、GFAP 多克隆抗体),PBS 冲洗 2 min×3 次。滴加相应二抗,室温下孵育 10 min,PBS 冲洗 2 min×3 次。DAB 显色,常规脱水,透明,中性树胶封片,显微镜下观察。

1.3.7 图像处理 采用 JPLY UC08 显微摄影成像系统,每张切片取梗死侧不重复的 5 个视野照相,观察 Nestin、Caspase-3、GFAP 阳性细胞数目。采用 Image pro-plus 4.5 图像软件,测定免疫反应阳性产物的平均密度。

1.4 统计学分析

应用 SPSS 17.0 统计软件进行数据分析,组内及组间比较单因素方差分析及 Newman-Keuls 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠不同时间点的 NSS 评分

各亚组同一时间组间比较:正常组与假手术组评分为 0,组内组间比较均无差异($P > 0.05$)。C 组、T 组 NSS 评分高于正常组及假手术组,但明显低于模型组($P < 0.05$);C 组评分明显低于 T 组($P < 0.05$);各组内比较差异亦无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 各组大鼠神经功能缺损情况($\bar{x} \pm s$)

Table 1 The neurological impairment of rats in each group ($\bar{x} \pm s$)

Time	Normal group	Sham operation group	Model group	C group	T group
14 days after operation	0	0	2.89± 0.36	2.09± 0.28*	2.49± 0.32
21 days after operation	0	0	2.78± 0.34	2.03± 0.30*	2.51± 0.31
28 days after operation	0	0	2.91± 0.34	2.05± 0.39*	2.48± 0.31

注:* 组间比较, $P < 0.05$ 。

Note: *: comparison among groups, $P < 0.05$.

2.2 各组大鼠脑梗死后 Nestin、Caspase-3、GFAP 的表达

C 组、T 组 Caspase-3 的表达明显低于正常组、假手术组及模型组($P<0.05$),而 Nestin、GFAP 的表达高于正常组、假手术组

及模型组($P<0.05$)。T 组 Caspase-3 的表达明显高于 C 组($P<0.05$),Nestin、GFAP 的表达低于 C 组($P<0.05$)。见表 2。

表 2 各组大鼠脑梗死灶周围 Nestin、Caspase-3、GFAP 的表达($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Expression of Nestin, Caspase-3 and GFAP around the focal brain ischemia in rats of groups($\bar{x} \pm s$)

Item	Normal group	Sham operation group	Model group	C group	T group
Nestin	5.36 $\pm$ 1.31	5.96 $\pm$ 1.27	11.41 $\pm$ 1.55	27.17 $\pm$ 5.09*	21.42 $\pm$ 4.29
Caspase-3	45.84 $\pm$ 2.45	44.77 $\pm$ 2.39	22.75 $\pm$ 1.08	6.07 $\pm$ 0.80*	12.52 $\pm$ 1.01
GFAP	129.42 $\pm$ 1.82	126.43 $\pm$ 1.55	122.91 $\pm$ 2.34	192.51 $\pm$ 0.86*	152.47 $\pm$ 0.34

注: *: 组间比较, $P<0.05$ 。

Note: *: comparison among groups, $P<0.05$.

3 讨论

随着我国人口老龄化趋势, 脑血管疾病发病率逐年增加, 脑梗死在脑血管疾病中占大多数。当前脑梗死治疗的方式仍以药物控制为主, 包括活血、抗凝、增强脑循环。对于急性期患者, 溶栓治疗及介入治疗虽有一定的临床疗效, 但有一定数量的患者会因错过治疗时间窗而遗留不同的神经功能受损症状, 如肢体障碍、语言障碍等, 故受损后的神经细胞功能恢复成为治疗脑梗死的关键环节, 不论是对急性神经受损或是慢性神经受损。康复治疗是脑梗死的主要治疗方法之一。目前的康复治疗方式包括康复训练及物理辅助治疗。Taub 等^[12]训练猴子的单侧受损肢体, 结果显示, 通过练习有利于受损肢体的康复, 从而验证了神经系统可塑性理论。Kim 等^[9]采用康复训练治疗慢性脑卒中患者, 显示通过训练明显的改善了上肢功能。跑台训练是目前国际通行的卒中后运动模式, 强制性运动康复训练是康复训练的新形式。强制性康复训练的实施是限制健侧肢体的活动, 被动的使用患侧肢体, 在生活环境中不断的强化训练促进康复的方法^[13,14]。本次研究对 2 种运动方式的效果进行比较, 结果 C 组、T 组 NSS 评分高于正常组及假手术组, 但明显低于模型组 ($P<0.05$); C 组评分明显低于 T 组 ($P<0.05$); 各组内比较差异亦无统计学意义($P>0.05$)。提示, 相对于传统的跑台训练, 强制性运动更能有效地促进患者的康复。

Nestin 是最早由 Lendahl 等^[15]发现并鉴定的一种胚胎性中间丝蛋白。Nestin 广泛表达于哺乳动物中枢神经系统, 尤其是神经干细胞或和前体细胞。Nestin 能被巢蛋白抗体特异识别, 是神经干细胞的标志性蛋白之一。当脑组织出现病变后, 其修复过程为神经干细胞 $\rightarrow$ 神经前体细胞 $\rightarrow$ 成熟神经元、胶质细胞。神经干细胞在哺乳动物中多数处于静止状态^[14]。当脑组织缺血时, 神经干细胞出现增殖并定向迁移及分化, 脑组织结构在神经干细胞的作用下进行修复和重塑^[15]。Tonchev 等^[16]应用猕猴造脑缺血模型, 结果发现 Nestin 广泛表达于海马齿状回、侧脑室下角的室下区以及颞叶的新大脑皮质。Schabitz 等^[17]对脑梗死后大鼠进行康复训练, 结果显示 Nestin 的表达明显高于对照组, 继而大量星形胶质细胞被激活。GFAP 由星形胶质细胞产生, 是星形胶质细胞特征性标记物, 其具有合成、分泌多种细胞营养因子的功能, 从而促进细胞外基质的合成, 利于神经细胞功能的修复, 在细胞骨架形成、细胞黏附、信号传导等细

胞活动中发挥重要作用^[18]。当机体神经系统受到刺激或损伤后, GFAP 表达量可反映星形胶质细胞功能活化程度^[19]。神经元细胞死亡的方式是凋亡, Caspase-3 是细胞凋亡的特征性指标。当脑组织缺血时, Caspase-3 表达明显增加^[20]。并随着缺血时间的延长, 神经元凋亡亦不断增多。本次研究在干预治疗后检测了脑组织中 Nestin、GFAP、Caspase-3 的表达, 得出了与以往报道一致结果, 结果显示, C 组、T 组 Caspase-3 的表达明显低于正常组、假手术组及模型组($P<0.05$), 而 Nestin、GFAP 的表达高于正常组、假手术组及模型组($P<0.05$)。T 组 Caspase-3 的表达明显高于 C 组($P<0.05$), Nestin、GFAP 的表达低于 C 组($P<0.05$)。提示强制性运动能提高神经干细胞增殖及分化, 促进神经胶质细胞的合成, 为神经元细胞提供良好的内环境, 减少神经细胞的凋亡, 有利于神经系统的修复, 继而使脑梗死症状得到缓解, 甚至恢复到正常状态。

强制性运动康复训练优于跑台训练, 其原因可能与刺激的程度及时间有关。强制性运动使大鼠在生活环境下随时锻炼患侧肢体, 通过长时间的反射刺激, 使神经系统快速得以修复。其结果我们临床工作中制定康复锻炼的时间及强度提供了理论依据。

参考文献(References)

- [1] Pearn J, O'Connor RJ. Community stroke rehabilitation helps patients return to work[J]. Practitioner, 2013, 257(1764): 23-27, 2-3
- [2] Boyne P, Dunning K, Carl D, et al. High-intensity interval training in stroke rehabilitation[J]. Top Stroke Rehabil, 2013, 20(4): 317-330
- [3] Okamoto H, Fukushima M, Teismann H, et al. Constraint-induced sound therapy for sudden sensorineural hearing loss--behavioral and neurophysiological outcomes[J]. Sci Rep, 2014, 4: 3927
- [4] Taub E, Uswatte G, Bowman MH, et al. Constraint-induced movement therapy combined with conventional neurorehabilitation techniques in chronic stroke patients with plegic hands: a case series [J]. Arch Phys Med Rehabil, 2013, 94(1): 86-94
- [5] Shi YX, Tian JH, Yang KH, et al. Modified constraint-induced movement therapy versus traditional rehabilitation in patients with upper-extremity dysfunction after stroke: a systematic review and meta-analysis[J]. Arch Phys Med Rehabil, 2011, 92(6): 972-982
- [6] Kim YH, Park JW, Ko MH, et al. Plastic changes of motor network after constraint-induced movement therapy [J]. Yonsei Med J, 2004, 45 (2): 241-246

- [7] Taub E. The behavior-analytic origins of constraint-induced movement therapy: an example of behavioral neurorehabilitation[J]. *Behav Anal*, 2012, 35(2): 155-178
- [8] Uswatte G1, Taub E. Constraint-induced movement therapy: a method for harnessing neuroplasticity to treat motor disorders [J]. *Prog Brain Res*, 2013, 207(2): 379-401
- [9] 廖维靖, 杨万同, 刘淑红, 等. 线栓阻断大鼠大脑中动脉制作缺血性脑损伤模型的改良 [J]. *中华物理医学与康复杂志*, 2002, 24(6): 28-31
- Liao Wei-jing, Yang Wan-tong, Liu Shu-hong, et al. Modification of the preparation of models of focal ischemic brain injury with suture occlusion in rats[J]. *Chinese Journal of Physical Medicine and Rehabilitation*, 2002, 24(6): 28-31
- [10] Longa EZ, Weinstein PR, Carlsom S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91
- [11] Mang CS, Campbell KL, Ross CJ, et al. Promoting neuroplasticity for motor rehabilitation after stroke: considering the effects of aerobic exercise and genetic variation on brain-derived neurotrophic factor[J]. *Phys Ther*, 2013, 93(12): 1707-1716
- [12] Tonchev AB, Yamashima T, Zhao L, et al. Proliferation of neural and neuronal progenitors after global brain ischemia in young adult macaque monkeys[J]. *Mol Cell Neurosci*, 2003, 23(2): 292-301
- [13] Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RDG. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein[J]. *Cell*, 1990, 60(4): 585-595
- [14] Gage FH. Mammalian neural stem cells [J]. *Science*, 2000, 287(5457): 1433-1438
- [15] Mackowiak M, Chocyk A, Markowicz-Kula K, et al. Neurogenesis in the adult[J]. *Pol J Pharmacol*, 2004, 56(6): 673-687
- [16] Tonchev AB, Yamashima T, Zhao L, et al. Proliferation of neural and neuronal progenitors after global brain ischemia in young adult macaque monkeys[J]. *Mol Cell Neurosci*, 2003, 23(2): 292-301
- [17] Schabitz WR, Schwab S, Spranger M, et al. Intraventricular brain-derived neurotrophic factor reduces infarct size after focal cerebral ischemia in rats[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1997, 17(5): 500-506
- [18] Turner RC, Lucke-Wold B, Lucke-Wold N, et al. Neuroprotection for ischemic stroke: moving past shortcomings and identifying promising directions[J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(1): 1890-1917
- [19] Lin B, Xu Y, Zhang B, et al. MEK inhibition reduces glial scar formation and promotes the recovery of sensorimotor function in rats following spinal cord injury[J]. *Exp Ther Med*, 2014, 7(1): 66-72
- [20] Ni B, Wu X, Su Y, et al. Transient global forebrain ischemia induces a prolonged expression of the caspase-3 mRNA in rat hippocampal CA1 pyramidal neurons [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1998, 18(3): 248-256

(上接第 1216 页)

- [12] Bonnet MS, Djelloul M, Tillement V, et al. Central NUCB2/Nesfatin-1-expressing neurones belong to the hypothalamic-brainstem circuitry activated by hypoglycaemia [J]. *Neuroendocrinol*, 2013, 25(1):1-13
- [13] Levin BE, Routh VH, KANG L, et al. Neuronal glucosensing: what do we know after 50 years?[J]. *Diabetes*, 2004, 53(10):2521-2528
- [14] Shi M, Jones AR, Ferreira Jr M, et al. Glucose does not activate non-adrenergic, noncholinergic inhibitory neurons in the rat stomach[J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2005, 288:R742-R750
- [15] Mimeo A, Ferguson AV. Cellular actions of nesfatin-1 on hypothalamic and medullary neurons [J]. *Curr Pharm Des*, 2013, 19(39):6949-6954
- [16] Foo KS, Brismar H, Broberger C, et al. Distribution and neuropeptide coexistence of nucleobindin-2 mRNA/nesfatin-like immunoreactivity in the rat CNS[J]. *Neuroscience*, 2008, 156(3):563-579
- [17] Osaki A, Shimizu H, Ishizuka N, et al. Enhanced expression of nesfatin/nucleobindin-2 in white adipose tissue of ventromedial hypothalamus-lesioned rats[J]. *Neurosci Lett*, 2012, 521(1):46-51
- [18] Gaigé S, Bonnet MS, Tardivel C, et al. c-Fos immunoreactivity in the pig brain following deoxynivalenol intoxication: focus on NUCB2/nesfatin-1-expressing neurons[J]. *Neurotoxicology*, 2013, 34: 135-149
- [19] Shimizu H, Oh-I S, Hashimoto K, et al. Peripheral administration of nesfatin-1 reduces food intake in mice: the leptin-independent mechanism[J]. *Endocrinology*, 2009, 150(2):662-671
- [20] Stengel A, Goebel M, Yakubov I, et al. Identification and characterization of nesfatin-1 immunoreactivity in endocrine cell types of the rat gastric oxyntic mucosa [J]. *Endocrinology*, 2009, 150(1):232-238