

· 基础研究 ·

运动训练对脑出血大鼠出血灶周围组织突触素表达的影响

李红玲 赵巧艳 李玉敏 王红莲 李春岩

【摘要】目的 观察运动训练对脑出血大鼠出血灶周围组织突触素(SYP)表达的影响。方法 健康雄性SD大鼠95只,其中60只随机分为实验组(出血后运动)、对照组(出血后不运动)、假手术组(无出血、不运动),每组20只,各组又分为术后7,14,21,28 d共4个时相点。实验组大鼠于术后72 h开始跑笼训练,其余大鼠在标准笼内自由活动。剩余35只随机分为脑出血后6,12,24,48,72 h组、无出血组和正常组,每组5只,用于免疫组化检测。结果 突触素阳性细胞主要分布于血肿周围和大脑皮质的神经元。突触素阳性物表达为细胞胞浆着棕黄色,在神经细胞表面排列呈环状或半弧形,在神经纤维间排列成大小不一、不规则团块状,少数神经纤维两侧排列成线状。出血灶中心无明显突触素阳性染色。对照组6~24 h表达减少,48 h后回升,7 d后表达增加,28 d时达高峰。实验组突触素阳性细胞表达更加显著,与对照组相比,差异有统计学意义($P < 0.05$);实验组、对照组突触素阳性细胞表达与假手术组相比,差异有统计学意义($P < 0.01$)。结论 突触素参与了脑出血后神经可塑性的发生,运动训练可促进突触素蛋白表达,从而改善神经功能。

【关键词】 运动训练; 脑出血; 突触素; 免疫组化

The effects of exercise on the expression of synaptophysin around hematomas in rats with intracerebral hemorrhage Li Hong-ling*, ZHAO Qiao-yan, LI Yu-min, WANG Hong-lian, LI Chun-yan. * Department of Rehabilitation, The Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China

Corresponding author: LI Chun-yan, Email: lchy@163.com

【Abstract】 **Objective** To investigate the effects of exercise on the expression of synaptophysin around hematomas after intracerebral hemorrhage (ICH). **Methods** Ninety-five male Sprague-Dawley rats weighing 270 to 300 g were divided into 3 groups: a trial group (ICH-induction and exercise, $n = 20$), a control group (ICH-induction only, $n = 20$) and a sham-operation group (no ICH and no exercise, $n = 20$). The rats' brains were removed at 7, 14, 21, and 28 days after the operation. The other 35 rats were divided into 7 groups (6 h, 12 h, 24 h, 48 h, 72 h after ICH, no ICH and normal). The activation of synaptophysin was measured by immunohistochemical techniques. The rats in the trial group begin cage-running exercise at 72 h after the operation. The others lived in standard cages. **Results** Synaptophysin-positive cells were seen in the tissues around the hematomas and in the cortex. There was no synaptophysin expression in the centres of the hematomas. The number of synaptophysin-positive cells in ICH group was significantly less than in the sham-operation and normal groups from 6 h to 24 h after the operation. There was then a gradual increase again from 48 h onwards until the 28th day after the operation. The trial group had the largest increases in expression. There was a significant difference compared with the control group. Compared with the sham operated group, the trial and control groups showed very significant differences. **Conclusion** The results suggest that synaptophysin is involved in neuron plasticity after ICH, but exercise training (cage-running) can accelerate the expression of synaptophysin, thereby improving functional recovery.

【Key words】 Exercise; Intracerebral hemorrhage; Synaptophysin; Immunohistochemistry

脑的可塑性和功能重组是脑卒中康复的主要机制,突触可塑性是脑可塑性的主要表现。有关运动与突触可塑性的研究多集中在脑梗死方面^[1-3],而关于运动对脑出血(intracerebral hemorrhage, ICH)后突触素

(synaptophysin, SYP)的影响,国内至今鲜见报道。本研究旨在观察运动训练对脑出血大鼠出血灶周围组织SYP表达的影响,从而探讨运动训练对出血性脑损伤后大脑可塑性的作用。

材料与方法

一、材料

作者单位:050000 石家庄,河北医科大学第二医院康复科(李红玲、赵巧艳、李玉敏、王红莲),神经内科(李春岩)
通讯作者:李春岩,Email: lchy@163.com

1. 主要仪器:脑立体定位仪(江湾 I 型 C);数码相机(日本 NIKONCOOLPIX950 型);Olympus 光学显微镜(日本 Nikon 公司);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)。

2. 主要试剂: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);鼠抗 SYP 单克隆抗体(武汉博士德生物工程公司);多聚甲醛-戊二醛灌流固定液(自配)。

二、方法

1. 实验动物与分组:健康雄性 SD 大鼠 95 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,清洁级,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,恒温(20~25℃)。其中 60 只随机分为实验组(出血后运动)、对照组(出血后不运动)、假手术组(无出血、不运动),每组 20 只。各组又分为术后 7,14,21,28 d 共 4 个时相点,每个时相点 5 只,用于免疫组化检测。实验组大鼠于术后 72 h 开始跑笼训练(具体方法见参考文献 4),其余大鼠在标准笼内自由活动。剩余的 35 只随机分为脑出血后 6,12,24,48,72 h 组、无出血组和正常组,每组 5 只,用于免疫组化检测。

2. 动物模型建立:参照李红玲等^[4]的方法,采用胶原酶 0.5 U(胶原酶稀释浓度为 0.2 U/μl 生理盐水)诱导大鼠右侧尾状核脑出血模型,假手术组和无出血组操作方法同脑出血组,但不注射胶原酶,只注射同等剂量的生理盐水,正常组大鼠不作任何处理。

3. 免疫组化标本采集:于相应时间点将动物用速眠新注射液(1.0 ml/kg 体重)麻醉后,迅速开胸,经心脏至主动脉插管,先用生理盐水约 100 ml 冲洗血液,然后以多聚甲醛约 400 ml 先快后慢进行灌流固定 1.5~2 h。迅速解剖取出大脑,去除额极 4 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,免疫组化备用。

4. SYP 检测:SYP 蛋白检测采用免疫组化 SP 法。具体步骤按试剂盒说明书进行,SYP 单克隆抗体,工作浓度 1:50。SYP 蛋白以细胞胞浆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(×400)镜下阳性细胞数。

三、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,各组均数的比较行单因素方差分析,进行两两比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

SYP 阳性细胞主要分布于血肿周围和大脑皮质的神经元。SYP 阳性物表达为细胞胞浆着棕黄色,在神经细胞表面排列呈环状或半弧形,在神经纤维间排列成大小不一的不规则团块状,少数神经纤维两侧排列成线状。出血灶中心无明显 SYP 阳性染色(图 1)。脑出血组 6~24 h 表达有降低趋势,但与无出血组和正常组相比,差异无统计学意义($P > 0.05$),48 h 后回升(表 1)。7 d 后表达增加,28 d 时达高峰,其中 14~28 d 与假手术组比,差异有统计学意义($P < 0.01$)。实验组表达更加显著,与对照组相比(14~28 d),差异有统计学意义($P < 0.05$),与假手术组相比,差异有统计学意义($P < 0.01$),见图 2,表 2。

表 1 脑出血不同时相点与无出血组及正常组大鼠脑组织 SYP 阳性细胞表达(个, $\bar{x} \pm s$)

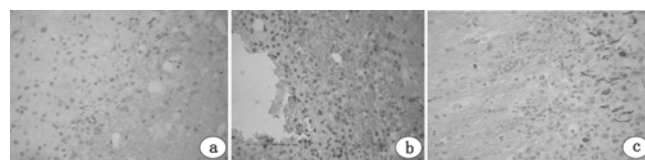
组 别	只数	SYP 阳性细胞表达
脑出血组		
出血后 6 h	5	4.60 ± 2.12 ^{ab}
出血后 12 h	5	3.90 ± 2.01 ^{ab}
出血后 24 h	5	4.78 ± 3.31 ^{ab}
出血后 48 h	5	7.34 ± 3.15
出血后 72 h	5	9.96 ± 3.14
无出血组	5	7.12 ± 2.35
正常组	5	6.30 ± 2.12

注:与无出血组比较,^a $P < 0.05$;与正常组比较,^b $P < 0.05$

表 2 3 组不同时间点血肿周围组织 SYP 阳性细胞的表达(个, $\bar{x} \pm s$)

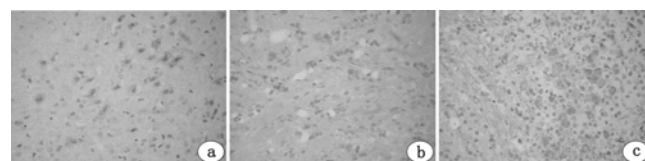
组 别	只数	7 d	14 d	21 d	28 d
实验组	20	17.36 ± 2.5	23.25 ± 2.89 ^{ac}	31.25 ± 5.68 ^{ac}	49.12 ± 4.30 ^{ac}
对照组	20	13.13 ± 3.01	15.06 ± 4.54 ^d	22.25 ± 6.08 ^d	32.00 ± 3.82 ^d
假手术组	20	7.90 ± 2.08	7.00 ± 3.76 ^b	6.75 ± 3.56 ^b	7.31 ± 3.03 ^b

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$;与假手术组比较,^c $P < 0.05$



注:a. 正常脑组织 SYP 阳性蛋白表达;b. 血肿周围组织细胞胞浆 SYP 阳性蛋白表达;c. 血肿周围细胞表面和神经纤维 SYP 阳性蛋白表达

图 1 不同部位 SYP 阳性蛋白表达(SP 法, ×400)



注:a 为假手术组,b 为对照组,c 为实验组

图 2 不同组别 SYP 阳性蛋白表达(ICH 后 28 d, SP 法, ×400)

讨 论

中枢神经系统具有可塑性,这是脑损伤后神经功能恢复的重要生物学基础,而在大脑重塑过程中突触重塑是关键。SYP 是突触小泡膜上的一种含糖的膜结构蛋白,它的分子量是 38 kD,所以又叫 P38^[5,6]。SYP 存在于中枢和周围神经系统的几乎所有神经终末^[7],特异性地分布在突触前囊泡膜上,95% 以上的新皮质突触前终末均含有这种小突触囊泡。SYP 免疫活性在成熟的脑组织中高度集中在突触前轴突末梢内,围绕着神经元和其树突分布。在突触生长过程中 SYP 的量随生长而增加^[8,9]。该蛋白在研究领域被广泛用于标记轴突终末,是突触重建的重要标志之一,也是监测神经发育和突触密度的一种重要标志物。

脑缺血损伤后,损伤灶周围组织和对侧同位区 SYP 表达广泛增加。研究发现,SYP 阳性染色于梗死后 6,24 h 表达减少,3 d 达最低值,7 d 开始增高^[10]。病灶对侧 6 h 开始表达增加,而针刺治疗组增加明显。还有研究报道,SYP 阳性表达于梗死后 1 周减少,3 周末接近正常,功能恢复显著,6 周末明显强于对照组^[11-13]。梗死后 SYP 的逐渐增加,证实了突触的可塑性变化,提示其可能具有自我修复能力^[1,10,14]。本研究针对的虽是出血性脑损伤,但有类似结果出现,SYP 于脑出血后 6~24 h 与对照组相比,差异虽无统计学意义,但处于低表达状态,3 d 后回升,7 d 开始升高,28 d 达高峰。

脑损伤后 SYP 表达先下降是神经细胞变性死亡的结果。而 SYP 免疫活性增高的机制目前仍不清楚,Carmichael 等^[15]认为,缺血性卒中可引起细胞死亡和损伤,但也是一个修复和部分恢复的过程。生理学上,卒中后皮质连接变得更加活跃,对长时程增强(long-time potentiation, LTP)感应更加敏感,从而产生与功能恢复相关的脑内代表言语、运动、感觉功能的区域分布失衡变化。在解剖学上,缺血病灶可诱导局部皮质内辐射、长距离轴突发芽、皮质间辐射,这种梗死后轴突发芽可建立起充分的新皮质与传入神经阻滞或部分损伤的脑部区域的联系。脑梗死后与之相连的皮质区域网络中会同时发生短暂的、低频率神经元活动,这种神经元活性可诱发生成年动物脑缺血后轴突发芽,类似于轴突延长和突触再生的脑发育过程。因此,卒中诱发的成年动物大脑内再连接和轴突重塑是通过改变神经元的活性来完成,并且与梗死连接区域的再激活和发生有关。另外,SYP 免疫活性的增强可能与轴突在失去靶器官后,出现轴突出芽并形成许多侧枝,突触前囊泡的数

量随之增加有关。也可能与突触前膜功能代偿性增加有关。

有关运动与 SYP 关系研究显示,运动可以促进 SYP 表达增加^[1-3]。杨敏等^[3]用线栓法制作大鼠大脑中动脉脑闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型,32 只大鼠随机分为 2 组,康复组于术后第 5 天开始进行滚筒、转棒、走平衡木、网屏训练,对大鼠进行运动能力和学习记忆能力测评。电镜观察缺血侧感觉运动区和 CA3 区突触形态结构的变化。结果显示第 5 周时康复组上述能力和模型组差异有统计学意义,且患侧感觉运动皮质和海马 CA3 区突触界面曲率、突触活性区长度增加,与模型组比较差异有统计学意义。PSD(突触后致密物)和穿孔性突触百分率增加。结论认为,运动训练促进脑梗死大鼠运动能力和学习记忆能力的恢复,其机制可能与脑梗死大鼠缺血侧感觉运动皮质和海马 CA3 区突触结构参数改变有关。贾子善等^[1]研究显示,脑梗死大鼠于运动(跑笼)后 14 d SYP 阳性产物开始增强,28 d 最强。Ding 等^[16]应用 35 只 SD 大鼠制作成 MCAO 模型,随机分为 3 组,运动技巧训练组、简单踏车训练组和非训练对照组。结果,在梗死后运动技巧组于术后 14~28 d 病灶侧丘脑出现明显的 SYP 活性增强,而对侧丘脑未见表达。而简单踏车训练组两侧丘脑核的 SYP 活性同样增加,但只发生在术后 28 d。在病灶的临近和远离区也可见 SYP 表达增强。得出的结论是,运动训练尤其是涉及平衡和协调功能的运动技巧训练可以特异性促进病灶侧丘脑突触的可塑性。Huang 等^[17]认为,随着急性脑血管损伤后凋亡细胞数量的减少,突触的数量、结构和功能改变形成了脑梗死后运动技巧可塑性的物质基础,而神经元的数量增加在其中并不起什么作用。

我们以前的研究结果显示,跑笼运动可以改善出血性脑损伤大鼠的神经功能状态^[4]。研究虽然观察的是出血性损伤,而且运动方法较单一(只有跑笼),但同样出现上述类似结果。说明运动不仅可以上调缺血性脑损伤灶周围组织的 SYP 表达,而且还可以增加出血性脑损伤血肿周围组织的 SYP 表达,而 SYP 的高表达可能与运动改善脑出血后功能障碍有关。

总之,我们认为 SYP 参与了脑出血后神经可塑性的发生,运动训练可促进 SYP 蛋白表达,从而改善神经功能。

参 考 文 献

- [1] 贾子善,槐雅萍,翟金萍,等. 运动训练对局灶性大鼠梗死灶周围皮质 P38 表达的影响. 中国康复理论与实践,2005,11:915-

- 916.
- [2] 段淑荣, 潘永惠, 张璇, 等. 康复训练对大脑中动脉闭塞大鼠脑梗死灶周围突触素表达的影响. 中国康复医学杂志, 2004, 19: 430-432.
- [3] 杨敏, 李涛, 余茜. 运动训练对脑梗死大鼠行为学及突触形态结构参数的影响. 中国康复医学杂志, 2007, 22: 24-27.
- [4] 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.
- [5] Jahn R, Schiebler W, Ouimet C, et al. A 38000-dalton membrane protein (p38) present in synaptic vesicles. Proc Natl Acad Sci USA, 1985, 82: 4137-4141.
- [6] Wiedenmann B, Franke WW. Identification and localization of synaptophysin, an integral membrane glycoprotein of Mr 38000 characteristic of presynaptic vesicles. Cell, 1985, 41: 1017-1028.
- [7] Navone F, Jahn R, Di Gioia G, et al. Protein p38: an integral membrane protein specific for small vesicles of neurons and neuroendocrine cells. J Cell Biol, 1986, 103: 2511-2527.
- [8] Deveto SH, Bamstable CJ. SVP₃₈: a synaptic vesicle protein whose appearance correlates closely with synaptogenesis in the rat nervous system. Ann NY Acad Sci, 1987, 493: 493-496.
- [9] Grabs D, Bergmann M, Subuster T, et al. Differential expression of synaptophysin and synaptotagmin during pre- and postnatal development of the rat hippocampal network. Eur J Neurosci, 1994, 6: 1765-1771.
- [10] 陈加俊, 石岩殊, 韩雪梅, 等. 大鼠脑梗死后突触素的变化及针刺的影响. 中华老年学杂志, 2004, 24: 333-335.
- [11] Dienel GA, Gruz NF, Ball K, et al. Behavioral training increases local astrocytic metabolic activity but does not alter outcome of mild transient ischemia. Brain Res, 2003, 961: 201-212.
- [12] Pandapani KM, Brann DW. Estrogen-astrocyte interactions: implications for neuroprotection. BMC Neurosci, 2002, 3: 6-15.
- [13] 谭来勋, 孙圣刚, 段申汉, 等. 脑梗死大鼠星形胶质细胞、突触和运动功能的研究. 卒中和神经疾病, 2007, 14: 6-9.
- [14] Stroemer RP, Kent TA, Hulsebosch CE. Increase in synaptophysin immunoreactivity following cortical infarction. Neurosci Lett, 1992, 147: 21-24.
- [15] Carmichael ST. Plasticity of cortical projections after stroke. Neuroscientist, 2003, 9: 64-75.
- [16] Ding Y, Li J, Clark J, et al. Synaptic plasticity in thalamic nuclei enhanced by motor skill training in rat with transient middle cerebral artery occlusion. Neurol Res, 2003, 25: 189-194.
- [17] Huang R, Zhang Y, Fang Y. The experimental study on material basis of motor skill plasticity after acute cerebral infarction. Zhonghua Yi Xue Za Zhi, 2000, 80: 769-772.

(修回日期: 2008-06-02)

(本文编辑: 松 明)

《中华物理医学与康复杂志》2008 年第 9 期 “继续教育园地”测试题

读杂志、获学分, 本刊继续教育园地栏目每期推出, 只要您每期阅读该栏目文章, 正确填写答题卡寄回本刊编辑部, 您就可获得国家 II 类继续教育学分, 全年可获得 5 分。

测试题(文章见本期 646-647 页, 答题卡见本期 621 页):

1、胫骨平台骨折康复治疗的原则包括:

- A. 康复治疗一定要在骨折复位及固定牢靠后进行
- B. 康复治疗要依据骨折愈合的过程来制定, 并要适时调整
- C. 康复治疗要因人而异
- D. 要与手术医师密切合作, 了解手术过程及内固定物的应用

2、早期运动治疗对关节面软骨的影响有:

- A. 改善软骨的营养
- B. 促进软骨的代谢
- C. 可能导致骨折延迟愈合
- D. 防止关节僵直、肌肉萎缩、骨质疏松

3、术后的制动可能导致:

- A. 肌肉产生萎缩
- B. 关节囊、韧带短缩、关节周围肌肉肌腱缩短造成关

节挛缩

- C. 关节粘连
- D. 骨折延迟愈合

4、持续被动运动(continuous passive motion, CPM)的治疗作用包括:

- A. 减轻疼痛、肿胀
- B. 不利于骨折愈合
- C. 促进关节软骨的再生和修复
- D. 防止关节粘连

5、胫骨平台骨折术后早期肌力训练的主要方法是:

- A. 等速运动
- B. 等张运动
- C. 等长运动
- D. 抗阻运动