

· 基础研究 ·

跑台运动训练对脑缺血大鼠轴突导向因子 Netrin-4 及其受体 DCC 蛋白表达的影响

黄欢 刘楠

【摘要】目的 观察跑台运动训练对脑缺血大鼠脑组织中轴突导向因子 Netrin-4 及其受体结直肠癌缺失 (DCC) 蛋白表达的影响,旨在探讨运动训练促进脑缺血后神经功能恢复的相关机制。**方法** 取成年雄性 SD 大鼠 63 只,按随机数字表法分为假手术组 ($n=9$)、模型组 ($n=27$) 和运动组 ($n=27$)。模型组和运动组大鼠采用改良的 Longa 线栓法制备大脑中动脉闭塞 (MCAO) 脑缺血模型,假手术组大鼠手术方法同模型组和运动组,但是不插入线栓。运动组于造模成功后 24 h 采用跑台训练器进行运动训练,其余 2 组则不进行运动训练。采用修正的神经行为学评分方法 (mNSS) 评价模型组和运动组大鼠造模后第 3、7、14 天的神经功能,并断头取脑,采用 Western blot 法以及免疫荧光法检测脑缺血区组织中 Netrin-4、DCC 蛋白的表达情况。**结果** 造模后第 3、7、14 天,运动组和模型组的 mNSS 评分与假手术组比较,差异均有统计学意义 ($P<0.01$);造模后第 7、14 天,运动组的 mNSS 评分分别为 (6.89 ± 1.27) 分和 (5.22 ± 1.09) 分,低于模型组同时时间点,差异均有统计学意义 ($P<0.05$);造模后第 7、14 天,运动组的 Netrin-4、DCC 蛋白表达均较模型组增强 ($P<0.05$);造模后第 14 天,经免疫荧光法检测发现,Netrin-4 主要在脑缺血区的血管和星形胶质细胞中表达,而 DCC 蛋白主要在脑缺血区的神经元轴突和星形胶质细胞中表达。**结论** 跑台运动训练可促进脑缺血大鼠神经功能恢复,其机制可能与上调脑缺血区组织中 Netrin-4、DCC 蛋白的表达,进而增强了神经、血管的再生和重建有关。

【关键词】 脑缺血; 运动训练; 轴突导向因子; 结直肠癌缺失蛋白

Effects of treadmill training after cerebral ischemia on expression in the brain of axonal guidance factor Netrin-4 and its receptor protein Huang Huan*, Liu Nan. * First Department of Senior Cadres, Fujian Provincial Hospital, Fuzhou 350001, China

Corresponding author: Liu Nan, Email: xieheliunan1984@sina.com

【Abstract】 Objective To observe the effects of treadmill training on the expression of axonal guidance factor Netrin-4 and its receptor deleted in colorectal cancer (DCC) protein in the brains of rats with cerebral ischemia. Also to explore how training promotes the recovery of neurological function after cerebral ischemia. **Methods** Sixty-three adult, male Sprague-Dawley rats were randomly divided into a sham group ($n=9$), a model group ($n=27$) and an exercise group ($n=27$). A modified version of Longa's method was used to establish an animal model of cerebral ischemia by occluding the right middle cerebral artery (MCAO) in the rats of the model and exercise groups while the rats of the sham group were subjected to the same surgical procedure except that no thread was inserted. The rats of the exercise group were given treadmill training beginning 24 h after the modeling, while those of the other two groups were left on the treadmill without training. The rats' neurological functioning was tested by assigning modified neurological severity scores (mNSS) on the 3rd, 7th and 14th day after modeling. Then the ischemic brain tissue was dissected to detect the expression of Netrin-4 and DCC protein using western blotting and immunofluorescent staining and analysis. **Results** On the 3rd, 7th and 14th day after modeling, the model and exercise groups had significant differences in their average mNSS scores when compared to the sham group. The average mNSS scores of the exercise group on the 7th and the 14th day were significantly lower than those of the model group at the same time point. The average expression level of Netrin-4 and DCC protein in the exercise group was significantly higher in than the model group on the 7th and 14 th days. Immunofluorescent staining showed that Ne-

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2015.011.002

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81472161)

作者单位:350001 福州,福建省立医院干部特诊一科,福建省临床老年病研究所,福建医科大学省立临床医学院(黄欢);福建医科大学附属协和医院神经内科,福建省脑血管病研究所(刘楠)

通信作者:刘楠,Email:xieheliunan1984@sina.com

trn-4 was mainly observed in the blood vessels and astrocytes in the ischemic brain area. DCC protein was found mainly in neural processes and astrocytes in the same area. **Conclusions** Treadmill training can improve the recovery of neurological function after cerebral ischemia. Its mechanisms may be partly attributed to up-regulating the expression of Netrin-4 and DCC protein in the ischemic brain area, which strengthens the regeneration and reconstruction of nerves and blood vessels.

【Key words】 Cerebral ischemia; Exercise; Axonal guidance factor; Deleted in colorectal cancer protein

神经和血管网络正确有效的重建是脑缺血后神经功能恢复的重要因素之一,运动训练可促进这一重塑性过程,但其中的分子机制尚未完全明确^[1,2]。研究表明,轴突导向因子 Netrin 家族分子(Netrin-1、Netrin-3、Netrin-4、Netrin-G1 和 Netrin-G2)不仅能引导轴突的正确生长,还可促进轴突及其分支形成和生长,引导和辅助血管生成,并维持细胞存活的作用^[3]。本研究采用运动训练对大鼠中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)脑缺血模型大鼠进行干预,旨在观察运动训练对脑缺血大鼠神经功能恢复和脑缺血区组织中轴突导向因子 Netrin-4 及其受体结直肠癌缺失(deleted in colorectal cancer, DCC)蛋白表达的影响。

材料与方法

一、实验动物及分组

选取清洁级、健康、雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 63 只(购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,许可证号为 SCXK 沪 2007-0005),体重 250 ~ 280 g。按随机数字表法将 63 只大鼠分为假手术组(9 只)、模型组(27 只)和运动组(27 只)。3 组大鼠均置于相同的日常环境中,常规饲养。

二、大鼠 MCAO 模型的建立

模型组和运动组参考改良 Longa 线栓法^[4]制备大鼠 MCAO 模型,大鼠造模成功的分级标准参考 Longa 等^[4]的方法。造模后神经功能评分为 1 ~ 3 分的大鼠入选本次研究。假手术组大鼠手术方法同模型组和运动组,但是不插入线栓。

三、跑台运动训练

造模前,将 3 组大鼠置于电动跑台仪上进行 3 d 的适应性训练,剔除无法学会跑台运动的大鼠,并予以补充。造模成功 24 h 后,运动组大鼠即开始进行跑台运动训练,第 1 天运动速度为 4 m/min,第 2 天增加至 8 m/min,第 3 天增加至 12 m/min,然后保持该速度至第 14 天,每天训练 30 min。假手术组及模型组每日亦置于跑台上 30 min,但不进行跑步运动。

四、大鼠神经功能检测

于造模后第 3、7、14 天分别对 3 组大鼠(模型组和运动组于造模后第 3、7、14 天按随机数字表法分别取 9 只大鼠)采用修订的神经功能评分(modified neurological severity scores, mNSS)^[5]进行神经功能评估, mNSS 评分包

括运动、感觉、反射和平衡 4 部分,总分为 0 ~ 18 分,分值越大,则神经功能缺损越严重,正常大鼠为 0 分。

五、Western blot 法检测

3 组大鼠均于对应的时间点(假手术组于造模后第 14 天,神经功能检测结束后;模型组和运动组于造模后第 3、7、14 天,神经功能检测结束后)断头取脑缺血区组织约 100 mg,置于玻璃匀浆器中,加入免疫沉淀实验(radio immuno precipitation assay, RIPA)裂解液(购自碧云天公司)1 ml 进行蛋白的提取,然后采用二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)法测定蛋白浓度。取 30 μ g 蛋白,变性后于 10% 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)中垂直电泳,然后电转移至聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜,10% 脱脂奶粉封闭后,先后加入一抗(抗 Netrin-4 和 DCC 蛋白抗体, 1:800, 购自美国 Santa Cruz 公司;抗 β -actin 抗体, 1:1000, 购自武汉博士德公司)及二抗,孵育并洗膜后,采用电化学发光(electrochemical luminescence, ECL)液显色, X 片显影、定影。采用 Image J 图像分析测定 Western blot 条带灰度值,并与内参照 β -actin 的测定比较,计算其比值作为目的蛋白表达的相对水平,比较各组间差异。

六、免疫荧光法检测

造模后第 14 天(Western blot 检测结束后),3 组均取剩余脑组织用于制备冰冻切片。冰冻切片于 4% 多聚甲醛固定 15 min 后,采用磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)冲洗 3 次,每次 5 min;封闭血清室温封闭 60 min,倾去血清;加 0.25% 聚乙二醇辛基苯基醚(Triton-X100)破膜 20 min 后,倾去 Triton-X100。分别滴加抗 Netrin-4 和 DCC 蛋白抗体(1:150),同时滴加血管性血友病因子(von Willebrand Factor, vWF)抗体(1:100, 购自 Santa Cruz 公司)以标记血管,神经胶质原纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)抗体(1:100, 购自碧云天公司)以标记星形胶质细胞,神经丝蛋白-200(neurofilament-200, NF-200)抗体(1:100, 购自武汉博士德公司)以标记神经轴突;4 $^{\circ}$ C 环境孵育过夜后,采用 PBS 冲洗 3 次,每次 5 min;然后以不同颜色荧光素标记的二抗(1:400, 购自美国 Jackson 公司)室温孵育 1 h;再采用 PBS 冲洗 3 次,每次 5 min;封片后激光共聚焦显微镜下观察。

七、统计学方法

本研究数据以($\bar{x} \pm s$)表示,采用 IBM SPSS Statistics 21.0 版统计学软件进行数据分析,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用独立样本 t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、大鼠神经功能缺损评分

造模后第 3、7、14 天,运动组和模型组的 mNSS 评分与假手术组比较,差异均有统计学意义($P < 0.01$);造模后第 7、14 天,运动组的 mNSS 评分与模型组同时时间点比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$),详见表 1。

表 1 3 组大鼠不同时间点 mNSS 评分比较(分, $\bar{x} \pm s$)

组别	只数	造模后第 3 天	造模后第 7 天	造模后第 14 天
假手术组	9	0	0	0
模型组	9	8.89 ± 0.78^a	8.00 ± 0.87^a	7.11 ± 0.78^a
运动组	9	8.56 ± 0.88^a	6.89 ± 1.27^{ab}	5.22 ± 1.09^{ac}

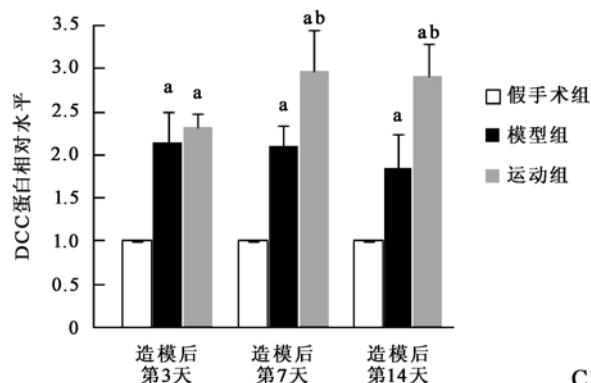
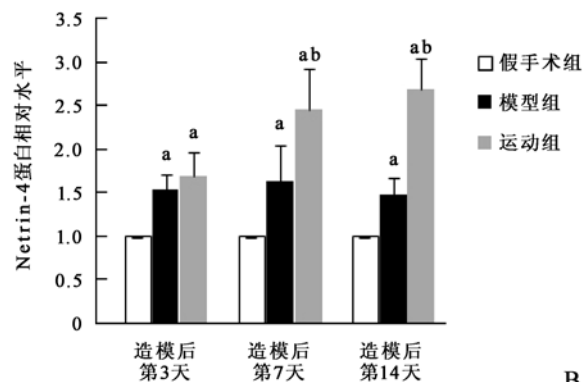
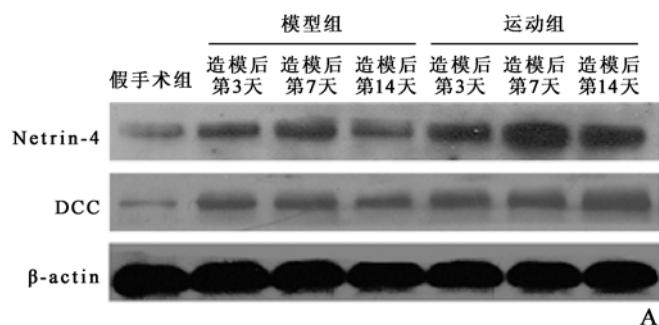
注:与假手术组同时时间点比较,^a $P < 0.01$;与模型组同时时间点比较,^b $P < 0.05$,^c $P < 0.01$

二、脑缺血区组织中 Netrin-4、DCC 蛋白表达水平的变化

造模后第 3、7、14 天,假手术组大鼠的 Netrin-4 和 DCC 蛋白表达均呈低水平表达,与假手术组和模型组大鼠同时时间点比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$);造模后第 7、14 天,运动组的 Netrin-4、DCC 蛋白表达均较模型组增强,差异均有统计学意义($P < 0.05$),详见图 1。

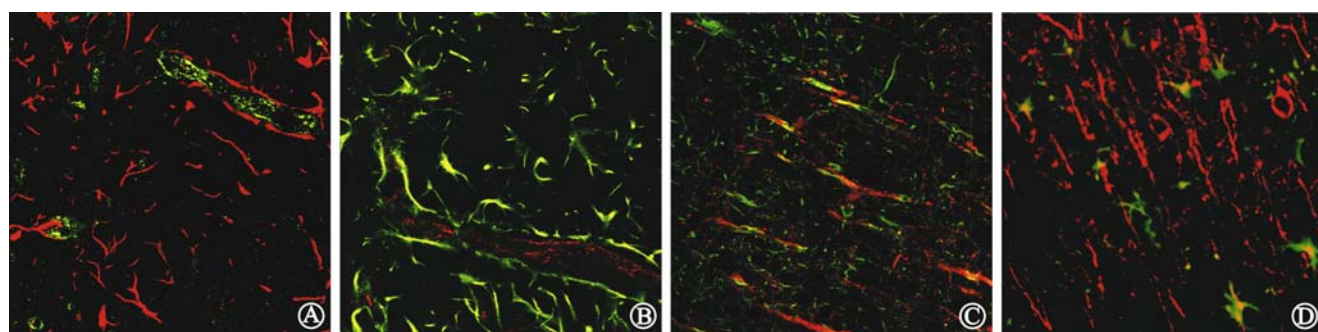
三、脑缺血区组织 Netrin-4 和 DCC 蛋白表达的部位

造模后第 14 天,免疫荧光法显示,Netrin-4、DCC 蛋白主要在缺血区的脑组织中表达;Netrin-4、DCC 蛋白与 vWF、GFAP、NF-200 的共表达实验表明,Netrin-4 主要在脑缺血区的血管和星形胶质细胞中表达,而 DCC 蛋白主要在脑缺血区的神经元轴突和星形胶质细胞中表达,详见图 2。



注:与假手术组比较,^a $P < 0.05$;与模型组比较,^b $P < 0.05$;图 A 为 3 组大鼠不同时间点 Netrin-4 和 DCC 蛋白电泳图;图 B 为 3 组大鼠不同时间点 Netrin-4 蛋白表达情况;图 C 为 3 组大鼠不同时间点 DCC 蛋白表达情况

图 1 3 组大鼠不同时间点 Netrin-4 和 DCC 蛋白的表达



注:A 为 Netrin-4 与 vWF 的共表达,其中红色为 Netrin-4,绿色为 vWF,黄色为共表达;B 为 Netrin-4 与 GFAP 的共表达,其中红色为 Netrin-4,绿色为 GFAP,黄色为共表达;C 为 DCC 与 NF-200 的共表达,其中红色为 DCC,绿色为 NF-200,黄色为共表达;D 为 DCC 与 GFAP 的共表达,其中红色为 DCC,绿色为 GFAP,黄色为共表达

图 2 造模后第 14 天脑缺血区组织中 Netrin-4、DCC 蛋白表达的情况(免疫荧光染色, $\times 40$)

讨 论

动物及临床研究表明,运动训练可促进缺血性脑卒中后神经功能的恢复^[2,6-7];也有研究表明,早期过度的运动训练可能不利于神经功能的恢复^[1]。本研究采用逐渐增加运动量的运动方式,大鼠的适应性较好,避免了过度运动对神经功能的损伤,结果显示,造模后第 7、14 天,运动组的 mNSS 评分与模型组同时时间点比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$),表明适当的运动训练可促进脑缺血大鼠神经功能的恢复。

脑缺血后的神经重建是功能恢复的决定因素之一,然而这一修复过程相当困难,不仅依靠轴突的萌芽和再生能力,同时还有赖于轴突向其正确的靶目标生长并建立合适的神经回路联系^[8]。另外,神经与血管总是伴行生长的,轴突导向和血管新生是紧密联系、相互缠绕的过程,2 者间不仅有共同的调节机制,血管的再生还在神经重建中起到重要的支持作用^[2,9]。有研究证实,轴突导向因子 Netrin 家族成员与其受体之一 DCC 蛋白结合时,可起到引导促进轴突生长、血管再生和抑制凋亡等作用^[3]。Liu 等^[10]的研究表明,Netrin-1 参与了运动训练促进脑缺血后神经功能恢复过程,但关于其他轴突导向因子在运动训练促进脑缺血后神经功能恢复过程中的作用,国内外研究目前仍显见报道。因此,在本研究中,课题组检测了造模后脑缺血区的 Netrin-4 及其受体 DCC 蛋白的表达情况,Western blot 检测结果表明,Netrin-4 和 DCC 蛋白的表达在脑缺血后即开始升高,且运动训练可以进一步上调 Netrin-4 和 DCC 蛋白的表达,该研究结果提示,Netrin-4 和 DCC 蛋白可能参与了脑缺血急性期损伤的修复过程。

本研究采用双重免疫荧光法检测了 Netrin-4 和 DCC 蛋白与血管标志物 vWF、星形胶质细胞标志物 GFAP、神经元标志物 NF-200 的共表达情况,结果表明,Netrin-4 主要表达于脑缺血区的血管和星形胶质细胞中,而 DCC 蛋白主要表达于脑缺血区的神经元轴突和星形胶质细胞中。Hoang 等^[11]研究发现,小鼠脑梗死后通过侧脑室注射 Netrin-4,可促进小鼠梗死周边区皮质的血管再生及神经功能的恢复。还有研究表明,脑损伤后星形胶质细胞开始增殖以修复受损的血脑屏障,防止细胞的进一步受损^[12]。因此本课题组推测,脑缺血后血管的再生及血脑屏障的修复,是 Netrin-4 及

其受体 DCC 蛋白参与脑缺血后血管回路重建的可能机制之一。

综上所述,运动训练可促进脑缺血大鼠的神经功能恢复,其机制可能与上调脑缺血区组织中 Netrin-4 及其受体 DCC 蛋白表达,进而增强了神经、血管的再生和重建有关。然而,Netrin-4 等轴突导向因子在脑缺血后神经血管结构重塑和功能重建过程中更确切可靠的作用机制及其所引起的形态变化,有待于后期进一步的研究。

参 考 文 献

- [1] Nudo RJ. Mechanisms for recovery of motor function following cortical damage[J]. Curr Opin Neurobiol, 2006, 16(6): 638-644.
- [2] Starkey ML, Schwab ME. How plastic is the brain after a stroke [J]? Neuroscientist, 2014, 20(4): 359-371.
- [3] Rajasekharan S, Kennedy TE. The netrin protein family [J]. Genome Biol, 2009, 10(9): p. 239.
- [4] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91.
- [5] Chen J, Li Y, Wang L, et al. Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats [J]. Stroke, 2001, 32(4): 1005-1011.
- [6] 刘德山, 刘楠, 张逸仙, 等. 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, 2010, 32(5): 333-337.
- [7] 程林, 刘楠, 张逸仙, 等. 跑台运动训练对脑缺血大鼠神经功能恢复的影响 [J]. 心血管康复医学杂志, 2012, 21(3): 237-239.
- [8] Di Giovanni S. Molecular targets for axon regeneration; focus on the intrinsic pathways [J]. Expert Opin Ther Targets, 2009, 13(12): 1387-1398.
- [9] Ergul A, Alhusban A, Fagan SC. Angiogenesis: a harmonized target for recovery after stroke [J]. Stroke, 2012, 43(8): 2270-2274.
- [10] Liu N, Huang H, Lin F, et al. Effects of treadmill exercise on the expression of netrin-1 and its receptors in rat brain after cerebral ischemia [J]. Neuroscience, 2011, 194: 349-358.
- [11] Hoang S, Liauw J, Choi M, et al. Netrin-4 enhances angiogenesis and neurologic outcome after cerebral ischemia [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2009, 29(2): 385-397.
- [12] Abbott NJ, Ronnback L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier [J]. Nat Rev Neuroscience, 2006, 7(1): 41-53.

(修回日期: 2015-10-15)

(本文编辑: 阮仕衡)