

·基础研究·

运动训练对脑梗死大鼠运动功能及Nogo-A/NgR1/Rho-A表达的影响*

李超¹ 温红梅^{1,3} 窦祖林¹ 张婵娟¹ 曾进胜²

摘要

目的:明确运动训练对脑梗死大鼠运动功能的改善及神经修复的影响,探讨轴突生长有关因子Nogo-A/NgR1/Rho-A通路在其中的作用机制。

方法:采用电凝法建立肾血管性高血压大鼠的右侧大脑中动脉闭塞(MCAO)模型,随机分为3组:假手术组、运动训练组、对照组;各组分别在造模后7d、14d、28d和52d进行大鼠前肢抓握力评定,并取材进行尼氏染色观察形态学变化,Western blot检测Nogo-A、NgR、Rho-A蛋白表达。

结果:梗死后7d、14d、28d及52d四个时间点,训练组较对照组大鼠抓握力改善($P<0.05$);梗死后7d开始,梗死周围皮质神经元逐渐减少,各时间点训练组较对照组存活神经元增多($P<0.05$);通过Western blot检测,运动训练7d和14d可降低Nogo-A的表达,运动训练7d、14d和28d可降低受体NgR的表达,运动训练14d和28d使下游信号分子Rho-A蛋白的表达减少,和对照组相比,差异均有显著性意义($P<0.05$)。

结论:运动训练可促进脑梗死大鼠肢体运动功能的改善,对受损的神经系统具有一定的保护作用,并通过下调Nogo-A/NgR/Rho-A蛋白水平减少其对神经轴突的抑制。

关键词 运动训练;脑梗死;Nogo-A;NgR;Rho-A

中图分类号:R493,R743.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2013)-10-0894-05

Effects of exercise training on motor function and expressions of Nogo-A/NgR/Rho-A protein following cerebral infarction in rats/LI Chao,WEN Hongmei,DOU Zulin, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2013, 28(10): 894—898

Abstract

Objective: To study the effects of exercise training on recovery of motor function and neurons following cerebral infarction, and to explore the involvement of axon growth related factor Nogo-A/NgR1/Rho-A pathway.

Method: Right middle cerebral artery occlusion(MCAO) model was replicated by electric coagulation on stroke-prone renovascular hypertensive Sprague-Dawley rats. The rats were randomly divided into three groups: sham group, exercise training group and control group; Each group was assessed for forelimb grip strength. The morphological changes by Nissl staining was observed. The expressions of Nogo-A, NgR, Rho-A proteins were detected by Western blot at 7d, 14d, 28d, and 52 days after modeling.

Result: The grip strength was higher in training group than that in control group at 7d, 14d, 28d and 52d after cerebral infarction ($P<0.05$); The neurons in the peripheries region of infarct focus gradually reduced from 7d after cerebral infarction, and compared with control group, the training group had more neurons survived at each time point ($P<0.05$); Exercise training (7d, 14d) can reduce the expressions of Nogo-A, exercise training (7d, 14d and 28d) can reduce the expressions of receptor NgR, exercise training (14d, 28d) can down-regulate

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2013.10.003

*基金项目:国家自然科学基金项目青年基金项目(81101461)

1 中山大学附属第三医院康复科,广州,510630; 2 中山大学附属第一医院神经内科; 3 通讯作者

作者简介:李超,女,硕士研究生; 收稿日期:2012-12-09

the expressions of Rho-A protein. The differences between exercise training group and control group were statistically significant ($P<0.05$).

Conclusion: Exercise training could promote the recovery of limb function after cerebral infarction, and showed protective effect on the damaged nervous system. Through down-regulation of Nogo-A/NgR/Rho-A protein levels, exercise training might reduce inhibition on axons and improve axonal regeneration microenvironment.

Author's address Dept. of Rehabilitation Medicine, The Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou, 510630

Key word exercise training; cerebral infarction; Nogo-A; NgR; Rho-A

脑卒中是一种具有高发病率、死亡率和致残率特点的疾病。成年哺乳动物脑缺血后神经再生困难,其主要原因之一是神经轴突的再生受到抑制。Nogo-A作为主要的轴突生长抑制因子,具有最强的抑制神经生长的作用,而NgR介导了Nogo-A的作用,Rho-A则是Nogo-A发挥作用下游通路的重要因子^[1-3]。研究显示^[4-5],抑制脑缺血后轴突抑制因子的表达,可改善肢体运动功能的恢复,促进神经的再生。运动训练能促进脑缺血后神经功能的恢复,可能与抑制轴突生长抑制因子有关。以往实验侧重于运动训练对Nogo-A/NgR1/Rho-A通路的单个指标的分析,目前还没有运动训练对Nogo-A/NgR1/Rho-A三者整体影响的研究。本实验旨在阐明运动训练对脑缺血大鼠运动功能恢复的影响,探讨运动训练是否通过调控Nogo-A/NgR1以及介导下游通路的RhoA发挥作用,为脑梗死的治疗提供新的靶点。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物: SPF级雄性SD大鼠135只,体重60—90g,鼠龄25—30d,由广东省医学动物实验中心提供,合格证号:SYXK(粤)2012-0081。所有大鼠均饲养于中山大学北校区动物实验中心SPF级实验环境中,许可证号:SCXK(粤)2009-0011。采用已消毒颗粒型的大鼠饲料喂养,饮用消毒水,环境温度控制在20—25℃左右。

1.1.2 主要试剂: 单克隆小鼠抗大鼠Nogo-A抗体(美国BD Biosciences公司),多克隆兔抗大鼠NgR抗体(美国Millipore公司),多克隆兔抗大鼠Rho-A抗体(美国Cell Signaling公司),抗 β -Actin单克隆抗体(广州昂科生物公司),小鼠抗IgG和兔抗IgG(武汉博士德有限公司),尼氏染色液(上海碧云天生物有

限公司)。

1.1.3 主要仪器: YLS-13 A 大小鼠抓力测试仪(上海嘉适科学仪器有限公司),SDP-I型大鼠心率血压计(北京中日友好医院研制),CM1900型冰冻切片机(德国Leica公司),BX51系统生物显微镜(日本Olympus公司),MiniProteanIII型垂直电泳槽(美国Bio-Rad公司),MiniTrans-Blot型电转设备(美国Bio-Rad公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 RHRSP模型制备和血压测量: 选用体重60—90g的SD大鼠135只,采用双肾双夹法,复制成易卒中型肾血管性高血压(stroke-prone renovascular hypertension, RHRSP)模型。使用SDP-I型大鼠心率血压计测量血压,测量清醒状态下大鼠尾动脉收缩压。每只大鼠每次测量3个值,取其平均值作为该大鼠的血压值。

1.2.2 大鼠右侧大脑中动脉缺血模型(middle cerebral artery occlusion, MCAO)的制备: RHRSP术后12周,剔除自发性卒中表现的大鼠,选取体重350—450g,鼠龄15—16周,血压值稳定在180mmHg以上的大鼠,制备右侧大脑中动脉缺血模型:10%水合氯醛腹腔注射麻醉,在右耳根与右眼裂外侧连线中点切开皮肤2cm,显微镜下用牙科钻在右侧颧弓根前方开一直径为0.50cm的骨窗,暴露右侧大脑中动脉,将大脑中动脉在跨越嗅束、发出纹状体动脉之后的远端用双极电凝器凝闭。假手术组大鼠麻醉同上,但只暴露、分离血管与神经,而不凝闭。

1.2.3 模型评价—神经功能缺失体征评分: MCAO术后24h采用改良的Bederson评分方法^[6]进行神经功能评分:0分:无神经功能缺失体征;1分:提尾时损伤对侧前肢屈曲;2分:前肢屈曲及对侧抵抗力下降;3分:向对侧转圈;4分:向对侧转圈及意识障

碍。神经功能评分1—3分的大鼠纳入本研究。

1.2.4 运动训练方案:训练组大鼠造模后48h开始运动训练。运动训练采用国际上常用的跑笼训练方法:将大鼠放置在一个直径21cm、长26cm的滚笼中,由马达带动滚笼旋转,方向和转速均可自行调节。转速分为低(7m/min)、中(10m/min)、高(13m/min)三个等级。每日上、下午各训练1次,每次训练由低速、中速至高速各10min。对照组的大鼠不予以上述针对性的强化训练,但可在笼内饮水、进食及自由活动。

1.2.5 脑梗死鼠行为学评价:采用YLS-13A大小鼠抓力测定仪测试大鼠的抓力,将大鼠放置在抓力板上,抓住鼠尾轻轻向后牵拉,待大鼠抓牢抓力板后,均匀用力后拉,致使动物松爪,仪器自动记录大鼠的最大抓力,将仪器与PC机联机读取数据进行处理。评价左侧瘫痪前肢抓力的强度时,要用胶带包裹右侧未瘫痪前肢。每次测试抓力5次,取平均值。

1.2.6 实验动物脑部取材及尼氏染色检测神经元:以水合氯醛(400mg/kg体重)腹腔注射麻醉大鼠,开胸暴露心脏,在心尖偏左处的左心室插管至升主动脉,止血钳将心脏与针头固定,剪开右心耳,快速滴注4℃生理盐水50—100ml冲洗血管,再用4℃的4%多聚甲醛200—250ml心脏灌注,先快后慢,40min灌注完后断头取脑,经4%多聚甲醛溶液后固定和20%、30%梯度蔗糖磷酸盐缓冲液脱水后,置于Leica冷冻切片机由额叶至枕部前后顺序连续冠状冰冻切片,片厚10 μ m。切片行尼氏染色,在光学显微镜下观察各组切片病理形态学改变,在每张切片缺血侧(右侧)梗死灶周围(梗死灶中心以外长宽各700 μ m的区域^[7])采集相互不重叠的4个视野,利用图像采集系统进行存活神经元计数,并对神经元尼氏体进行图像分析。

1.2.7 Western blot法检测Nogo-A, NgR和RhoA的

蛋白水平:每组随机取5只大鼠,麻醉后冰浴取脑组织,取新鲜梗死侧周围皮质组织,采用组织裂解法提取蛋白,用BCA法进行蛋白定量测定。蛋白样品每孔(40—60 μ l),进行SDS-PAGE100V垂直电泳,转移至PVDF(聚偏二氟乙烯)膜,5%脱脂奶粉室温封闭1h,分别加入单克隆小鼠抗大鼠Nogo-A(1:4000),多克隆兔抗大鼠NgR(1:1000),多克隆兔抗大鼠Rho-A(1:1000)抗体,4℃孵育过夜,次日TBST洗膜3次,加入偶联辣根过氧化物的山羊抗小鼠(1:4000),山羊抗兔抗体(1:4000),室温孵育1h, TBST洗膜3次, Millipore发光剂发光,显影。采用imagej系统进行图像分析,目的蛋白条带与 β -Actin的吸光度比值即为目的蛋白的相对值。

1.3 统计学分析

SPSS17.0进行数据统计分析,两组样本采用 t 检验,两组以上样本采用单因素方差分析, $P<0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 运动训练对脑缺血大鼠前肢抓握力的影响

造模后24h训练组大鼠与对照组大鼠患肢及健肢的抓握力处于相同水平,无明显差异($P>0.05$)。两组大鼠患侧和健侧前肢抓握力均在7d时开始恢复,随着时间的延长逐渐改善。但在梗死后7d、14d、28d及52d四个时间点,训练组大鼠抓握力均比对照组大鼠改善显著($P<0.01$),说明运动训练可增强大鼠前肢抓握力量(表1)。

2.2 运动训练对脑缺血大鼠梗死周围皮质神经元损伤的影响

在假手术组,神经元的胞体呈现出大的锥体形和椭圆形,胞核淡染,可见明显的核仁,胞浆可见大量的尼氏小体(图1)。梗死后7d开始,梗死周围皮质神经元数量随着时间进行性减少,胞质自溶,颗粒

表1 脑梗死大鼠前肢抓握力量

($\bar{x}\pm s, g$)

缺血时间	训练组		对照组	
	患肢	健肢	患肢	健肢
24h	140.97 $\pm$ 8.80	328.16 $\pm$ 15.25	131.13 $\pm$ 9.51	336.82 $\pm$ 13.48
7d	394.92 $\pm$ 17.06 ^①	570.74 $\pm$ 11.45 ^①	281.88 $\pm$ 8.47	442.99 $\pm$ 21.99
14d	510.49 $\pm$ 13.55 ^①	652.27 $\pm$ 16.40 ^①	421.48 $\pm$ 12.08	576.00 $\pm$ 15.05
28d	568.57 $\pm$ 10.17 ^①	648.19 $\pm$ 12.29 ^②	489.58 $\pm$ 9.51	608.80 $\pm$ 10.12
52d	623.96 $\pm$ 10.45 ^②	719.45 $\pm$ 11.75 ^②	544.25 $\pm$ 10.88	615.80 $\pm$ 11.32

注:与对照组比较:① $P<0.01$;② $P<0.05$

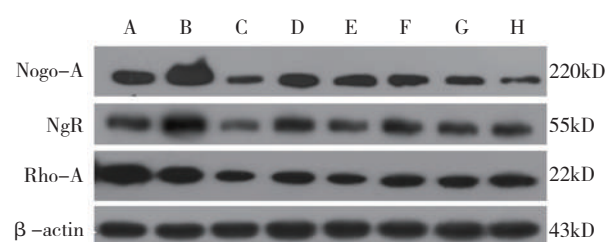
脱失,胞核碎裂消失,尼氏小体含量明显减少。运动训练干预后,各组大鼠脑组织病理损伤程度均有不同程度减轻,损伤区正常与坏死细胞相间存在,梗死灶周围皮质中结构完整可辨的神经元数量较模型不干预组大鼠明显增多,尼氏体脱失程度减轻,尼氏小体着色较深($P<0.01$),见图2—3。

2.3 运动训练对脑缺血大鼠梗死灶周边 Nogo-A/ NgR/Rho-A 蛋白表达的影响

运动训练干预后,各组大鼠梗死灶周边 Nogo-A/ NgR/Rho-A 蛋白表达均有不同程度降低。运动训练7d和14d可明显降低 Nogo-A 的表达,和对照

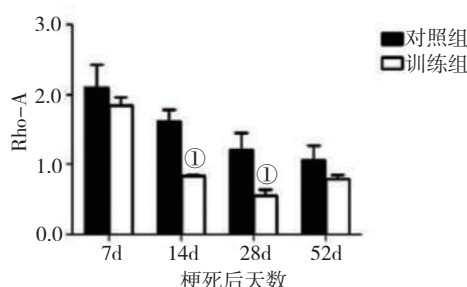
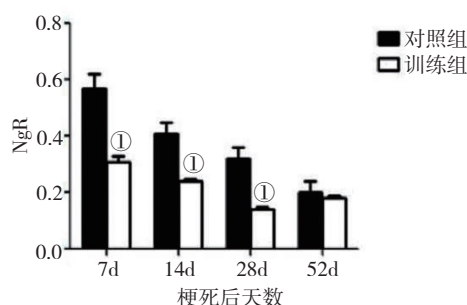
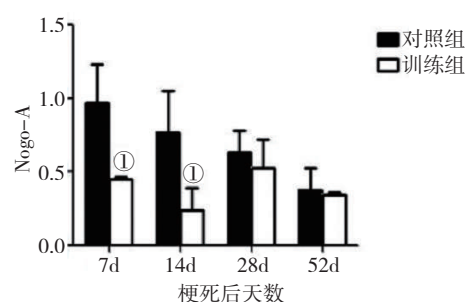
组相比,有显著性差异($P<0.01$);运动训练7d、14d和28d可明显降低受体 NgR 的表达,和对照组相比,有显著性差异($P<0.01$);运动训练14d和28d可明显降低下游信号分子 Rho-A 蛋白的表达,和对照组相比,有显著性差异($P<0.01$)。如图4—5。

图4 脑梗死周边皮质 Nogo-A/ NgR/Rho-A 蛋白表达情况



注:图中A—H分别代表:7d训练,7d对照,14d训练,14d对照,28d训练,28d对照,52d训练,52d对照。

图5 脑梗死周边皮质 Nogo-A/ NgR/Rho-A 蛋白表达情况



注:与对照组相比:① $P<0.01$

图1 假手术组右侧大脑皮质尼氏染色

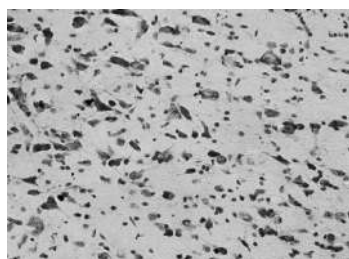
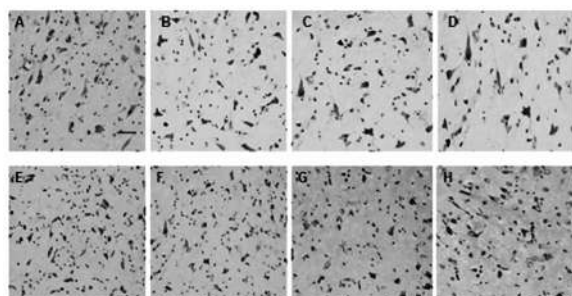
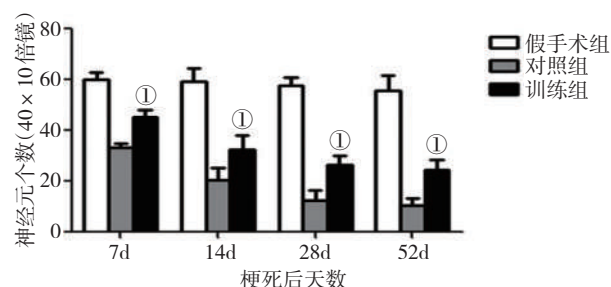


图2 梗死灶周边的尼氏染色变化趋势



注:A,B,C,D分别为缺血后7d,14d,28d,52d;E,F,G,H分别为运动训练后7d,14d,28d,52d。标尺:50 μ m

图3 各组大鼠缺血后梗死周围皮质神经元损伤比较



注:①与对照组比较 $P<0.01$

3 讨论

运动训练是脑卒中临床康复治疗的主要手段之一,能有效改善卒中后受损的神经功能,一般认为与促进皮质代表区重塑、突触再生、树突分支等有关,对于轴突再生影响的研究较少。研究提示^[8],运动训练可促进脑缺血大鼠梗死灶周轴突出芽。但是,由于受到不利微环境的影响,特别是受多种轴突和髓鞘形成抑制因子的影响,轴突再生在很大程度上受到限制,影响功能的恢复^[9]。本研究采用易卒中中型肾血管性高血压大鼠建立脑梗死模型,从轴突生长抑制因子角度探讨运动训练改善神经功能的机制。该模型具有与人类脑卒中类似的高血压基础,研究结果更接近临床实际。

本实验证实运动训练可促进脑梗死大鼠抓握力的恢复,运动训练组的梗死灶周围神经元数量明显多于对照组,与以往研究结果相一致^[8,10]。研究^[11]显示,运动训练可能参与了中枢神经再生环境的调节,加速脑侧支循环的建立,使神经生长因子及其受体表达上调,增强内在神经再生能力,诱导再生环境产生“允许”作用;此外,运动训练还可以抑制脑梗死后神经元的坏死及凋亡,促进中枢神经功能重塑^[12]。

Nogo-A作为重要的轴突抑制因子,结合其Nogo受体(Nogo receptor, NgR)后激活下游RhoA蛋白的细胞内信号,最终引起生长锥塌陷和少突胶质细胞分化受抑制^[1-3]。我们发现,运动训练可下调Nogo-A/NgR/Rho-A蛋白水平的表达,改善轴突生长的微环境。既往研究^[13]显示,转笼康复训练组和造模对照组大鼠脑梗死后各时间点梗死灶周围白质均可见Nogo-A阳性细胞,术后7d,两组梗死灶周围阳性细胞无明显差异,术后14d、21d和28d康复训练组大鼠梗死灶周围的Nogo-A表达较造模对照组明显减少。强制性运动疗法可以促进脑缺血再灌注后肢体运动平衡能力及记忆功能恢复,可能与下调大脑皮质缺血区Rho激酶的表达有关,强制性运动疗组14d和21d Rho-A的表达明显下降^[10]。

本研究首次在脑梗死后一个较长的时间范围(52d)内,动态观察Nogo-A/NgR/Rho-A三者的变化,发现与对照组相比,训练组7d时Nogo-A和NgR降低明显,提示早期进行康复训练对降低Nogo-A/NgR和改善运动功能有重要意义;NgR在训练28d

天仍然较对照组差异显著,推测原因为:NgR不仅是Nogo-A的跨膜片段Nogo-66的受体,还是髓鞘相关糖蛋白和少突胶质细胞髓鞘糖蛋白两种重要的轴突生长抑制蛋白的受体,脑缺血同时也会激活这两种抑制蛋白^[14],使运动训练对三者共同通路的受体NgR的抑制作用更持久。Rho-A处于下游通路,运动训练对其的抑制效应有所延迟,因此在14d和28d才表现出明显效果。52d训练组大鼠梗死灶周边Nogo-A/NgR/Rho-A表达均与对照组无差异,考虑为梗死后时间较长,大鼠自发性恢复作用的累积效应,使Nogo-A/NgR/Rho-A三种指标值降低并稳定在一个水平。

目前脑梗死的康复治疗仍是临床上的一大难点,抑制轴突生长抑制因子是新的治疗方向^[15]。已有研究显示,Nogo受体基因敲除鼠在脑缺血后的轴突再生及功能康复方面要明显优于野生型鼠^[16],Nogo受体的拮抗剂NEP1-40和NgR(310)Ecto-Fc能逆转Nogo-A的抑制作用^[17-18]。抑制Nogo-A促进神经功能恢复的临床试验目前已进行到第II期,主要针对脊髓损伤的患者^[15]。本研究证实运动训练可抑制Nogo-A/NgR/Rho-A通路,诱导适于神经轴突修复的微环境,改善脑梗死大鼠运动功能,促进神经修复,为脑梗死的康复治疗提供一个新思路 and 靶点。

我们将进一步探讨脑梗死后,运动训练调控Nogo-A/NgR1通路与轴突再生之间的联系,以及健侧大脑半球轴突再生的代偿作用的机制。

参考文献

- [1] Pernet V, Schwab ME. The role of Nogo-A in axonal plasticity, regrowth and repair[J]. Cell Tissue Res, 2012, 349(1): 97-104.
- [2] Schwab ME. Functions of Nogo proteins and their receptors in the nervous system[J]. Nat Rev Neurosci, 2010, 11(12): 799-811.
- [3] Wang T, Xiong JQ, Ren XB, et al. The role of Nogo-A in neuroregeneration: a review[J]. Brain Res Bull, 2012, 87(6): 499-503.
- [4] 戚其学, 李玉芬, 赵珊珊, 等. 强制性运动疗法对脑缺血后神经元轴突再生及Nogo-A蛋白水平影响的研究[J]. 中国血液流变学杂志, 2008, 03: 317-320.
- [5] 廖杨平, 赵伟佳. 运动训练对脑缺血后轴突生长及抑制因子表

(下转第903页)