

基础研究

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2013.02.006

运动训练对大鼠局灶脑梗死后脑内 LINGO-1 的表达及其对神经功能的影响

黄浩然, 李光勤, 付敏, 赖智勇

(重庆医科大学附属第一医院神经内科, 重庆 400016)

【摘要】目的:观察大鼠运动训练后脑内 LINGO-1 表达的变化,从而揭示运动训练促进脑卒中后神经功能恢复的可能分子机制。**方法:**采用线栓法制备大鼠中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型,随机将大鼠分为假手术组、模型组及运动训练组,选取 3、7、14 d 3 个时间点观察,运动训练采用跑台跑步方法。运用 Longa 评分进行神经功能评价,RT-PCR 进行 LINGO-1 mRNA 检测,免疫组织化学观察 LINGO-1 蛋白水平变化。**结果:**假手术组无明显神经功能缺损,Longa 评分 0 分,其 LINGO-1 mRNA 及蛋白水平有少量阳性表达。模型组 LINGO-1 表达 3 d 为高峰,后逐渐降低($P < 0.05$)。运动训练组与模型组相比,在 3 d 及 7 d 时间点 Longa 评分、mRNA 及蛋白水平表达无明显差异($P > 0.05$),在 14 d 时间点 Longa 评分、LINGO-1 mRNA 及蛋白水平均有下降($P < 0.05$)。**结论:**局灶性脑梗死后大鼠脑内 LINGO-1 水平明显上调,适当时间的运动训练可降低 LINGO-1 的表达水平及神经功能评分,这可能是运动训练促进脑梗死后神经功能恢复的分子机制之一。

【关键词】脑梗死; LINGO-1; 运动训练

【中国图书分类法分类号】R743.3

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-03-01

Effects of exercise training on expressions of LINGO-1 in the brain of rats and neural function after focal cerebral infarction

HUANG Haoran, LI Guangqin, FU Min, LAI Zhiyong

(Department of Neurology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To observe the expressions of LINGO-1 in the brain of rats after exercise training and to explore the possible molecular mechanism of exercise training promoting neurological functional recovery after stroke. **Methods:** Middle cerebral artery occlusion (MCAO) model was made and rats were randomly divided into sham operation group, model group and exercise training group. Observation was made at 3, 7, 14 d after MCAO. Training method was treadmill exercise. Neurological functional recovery was evaluated by Longa's score; expressions of LINGO-1 mRNA and protein were detected by immunohistochemistry and RT-PCR. **Results:** Sham group had no obvious neurological deficiency (Longa score was 0) but small amount of mRNA and protein expressions of LINGO-1. mRNA and protein expressions of LINGO-1 in model group were reached the peak at 3 d after MCAO and decreased gradually later ($P < 0.05$). There was no difference in mRNA and protein expressions of LINGO-1 between exercise training group and model group at 3, 7 d after MCAO ($P > 0.05$). Longa score and mRNA and protein expressions of LINGO-1 were decreased at 14 d after MCAO in exercise training group compared with those in model group ($P < 0.05$). **Conclusions:** Expressions of LINGO-1 in the ischemic brain are increased significantly. Decreased neurological score and LINGO-1 mRNA and protein expressions induced by proper exercise training might be one of the molecular mechanisms of neural function recovery after acute cerebral infarction.

【Key words】 cerebral infarction; LINGO-1; exercise training

脑卒中是一种高发病率、高死亡率、高致残率和高复发率疾病,卒中发生后往往给患者留下不同程度的后遗症。国内外研究表明适当的运动训练可以引起脑损伤后的运动皮质的重建,从而改善运动功能缺损。研究也证明,对偏瘫肢体的运动训练有

利于卒中后神经功能的恢复。但运动训练促进脑卒中后神经功能恢复的分子机制仍不清楚。LINGO-1 是最近发现的一种富含亮氨酸重复片段结构域的蛋白,在抑制轴突再生、少突胶质细胞分化及髓鞘形成、神经元存活等信号通路中有着重要作用。目前国内外对 LINGO-1 的研究大多集中在脊髓损伤 (spinal cord injury, SCI) 及帕金森氏病 (Parkinson's disease, PD) 的研究上面^[1-2],运动训练对 LINGO-1 的

作者介绍:黄浩然, Email: ut2009@163.com,

研究方向:脑血管病。

通信作者:李光勤, Email: liguangqin@tom.com。

影响未见报道,本研究观察运动训练对大鼠大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型后 LINGO-1 的表达影响,初步探讨运动训练对卒中后神经功能恢复的可能分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 清洁级健康雄性 SD 大鼠 72 只,体质量 200~280 g,由重庆医科大学动物中心提供。

1.1.2 主要仪器与试剂 SLY-RTML 六道动物跑台(北京硕林苑科技有限公司)兔抗 LINGO-1 单克隆抗体、链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶(SP)免疫组化试剂盒、DAB 显色试剂盒(博奥森公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 MCAO 模型制备 使用改良的 Zea Longa 方法制备模型。用 10%水合氯醛(0.35 ml/100 g 体质量)腹腔注射麻醉大鼠。行颈部正中切口,从右叶甲状腺外缘入路分离肌肉筋膜,分离右侧颈总动脉(common carotid artery, CCA)、颈外动脉(external carotid artery, ECA)、颈内动脉(internal carotid artery, ICA),烧断 ECA 的 2 个小分支。将 ECA 近头端结扎,近心端紧贴 CCA 分叉处穿线打松结,于 CCA 和 ICA 上各置一动脉夹,然后剪断 ECA,将栓线从 ECA 插入 ICA,去 ICA 处动脉夹,轻轻推送栓线入内至有阻力感为止,线栓插入深度 18~20 mm。将松结结扎,去 CCA 处动脉夹,缝皮。假手术组除不插入线栓外,其余步骤同模型组。待大鼠清醒后进行 Longa 评分。

1.2.2 神经功能评分 参考 Longa 的 5 分制评分标准,在手术结束,大鼠麻醉清醒后及在 3、7、14 d 分别进行神经功能评价。0 分:无神经损伤症状;1 分:不能完全伸展对侧前爪;2 分:向外侧转圈;3 分:向对侧倾倒;4 分:不能自行行走,意识丧失。评分在 0 分或 4 分的大鼠不纳入实验。

1.2.3 动物分组 随机分为假手术组、模型组和运动组,每组再分为 3、7、14 d 3 个亚组,每个时间点 8 只,其中模型组及运动组在同一时间点选取 Longa 评分相同的大鼠。

1.2.4 运动训练 运动训练在造模成功 24 h 后进行,采用跑台跑步运动方法;30 min/d,传送带速度:11 m/min。跑台平板斜度:0°。

1.3 指标检测

1.3.1 免疫组织化学染色 LINGO-1 抗体、SABC 免疫组化试剂盒和 DAB 显色试剂购于博奥森公司。在所需各时间点用 10%水合氯醛(0.35 ml/100 g 体质量)将大鼠深麻醉,经左心室先后灌注 PBS 和 4%多聚甲醛磷酸盐缓冲液各 200 ml 对脑组织进行内固定。断头后,在视交叉后 2~4 mm 处取脑组织进行石蜡包埋并做连续冠状切片。标本切片经脱蜡、水化,按试剂盒说明书进行操作,DAB 显色,光镜下观察。最后结果用图像信号采集分析系统测量计数每个视野(10×40)下阳性细胞数(部位选取为大脑皮质),每个部位随机测 3 个

视野,取其平均值。

1.3.2 RT-PCR 检测 按 Trizol 说明书提示提取组织总 RNA,组织来源取自手术侧大脑中动脉供血区域皮质。所得 RNA 用紫外线分光光度计定量测量 RNA 浓度。逆转录采用反转录试剂盒将总 RNA 逆转录为 cDNA 第 1 链,反应体积 10 μl,37 °C 孵育 15 min,85 °C 5 s 终止反应,灭活反转录酶。各引物均由武汉谷歌生物有限公司设计合成。引物序列如下:LINGO-1 引物序列为上游 5'-GCCACCTGGTCTATCTC-CGTTTC-3',下游 5'-GCAGGTAATTGAGCCCACGAAAG-3' (162 bp)。内参采用 ACTIN 上游 5'-CGTTGACATCCGTAAGACATC-3',下游 5'-TAGGAGCCAGGGCAGTAATCT-3' (110 bp)。反应条件:94 °C 预变性 3 min,进入循环 94 °C 变性 0.5 min,58 °C 退火 0.5 min,72 °C 延伸 0.5 min,35 个循环,72 °C 延伸 3 min。反应结束后 RT-PCR 产物在琼脂糖凝胶上进行电泳,电泳条带用美国 Bio-Rad 凝胶图像处理系统做吸光度测定,计算目的条带和内参照吸光度比值。

1.4 统计学分析

用 SPSS 17.0 软件包对数据进行统计分析,所有计量资料用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。统计方法用单因素方差分析,两两比较方差齐者用 LSD 法。在相同时间点模型组对 Longa 评分与 LINGO-1 表达水平进行 Pearson 相关性分析,相关系数用 r 值表示。检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P \leq 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 行为学评价

假手术组无神经功能缺损。模型组与运动训练组相比,在 3 d 及 7 d 时间点,Longa 评分差异无统计学意义($P=0.776$ 、 0.758)。在 14 d 时间点,Longa 评分出现较明显差异,提示运动训练较模型组神经功能恢复程度好,差异有统计学意义($P=0.001$)(图 1)。

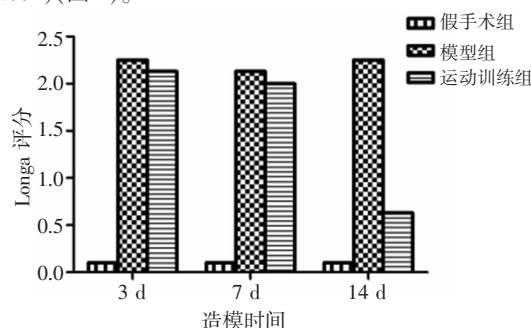


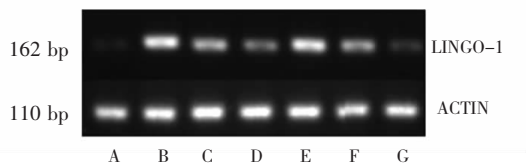
图 1 各组大鼠神经功能评分 (Longa) 比较 ($\bar{x} \pm s$)

Fig.1 Comparison of neurological functional scores (Longa score) of different groups ($\bar{x} \pm s$)

2.2 LINGO-1 mRNA 表达变化

假手术组 LINGO-1 mRNA 少量表达。在模型组,LINGO-1 mRNA 表达明显升高,3 d 时间点表达量最高,3~14 d 表达呈逐渐下降趋势。运动训练在 3 d 及 7 d 时间点对 LINGO-1 mRNA 表达较模型组无明显差异。在 14 d 时间点

表达较模型组降低,差异有统计学意义(图 2、表 1)。在相同时间点,对 LINGO-1 mRNA 表达结果与行为学 Longa 评分进行 Pearson 相关性分析,结果示 $0 < r < 1$,表明 LINGO-1 mRNA 表达水平与 Longa 评分成正相关($P < 0.05$)。



A. 假手术组;B. 模型组 3 d;C. 模型组 7 d;D. 模型组 14 d;
E. 运动组 3 d;F. 运动组 7 d;G. 运动组 14 d

图 2 各组大鼠 LINGO-1 mRNA 表达情况

Fig.2 Expressions of LINGO-1 mRNA in different groups

表 1 各组大鼠 LINGO-1 mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.1 Expressions of LINGO-1 mRNA in different groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	3 d	7 d	14 d
假手术组	0.089 ± 0.002	0.090 ± 0.002	0.089 ± 0.002
模型组	0.636 ± 0.053	0.424 ± 0.032	0.341 ± 0.029
运动组	0.626 ± 0.033	0.429 ± 0.027	0.168 ± 0.044
r 值	0.897	0.929	0.975
P 值	0.659	0.743	0.000

2.3 LINGO-1 免疫阳性细胞表达的变化

LINGO-1 在假手术组切片上可见于海马及皮质有少量阳性细胞表达。在模型组,表达明显上调,阳性细胞主要集中在皮质及海马,显示为棕黄色颗粒。在不同时间点上,3 d 为表达高峰,后 7、14 d 表达逐渐下降。运动训练组与模型组比较,3 d 及 7 d 时间点无明显差异,14 d 时间点较模型组,表达降低,差异有统计学意义(图 3、表 2)。在相同时间点,对 LINGO-1 蛋白表达结果与行为学 Longa 评分进行 Pearson 相关性分析,结果示 $0 < r < 1$,表明 LINGO-1 蛋白表达水平与 Longa 评分成正相关($P < 0.05$)。

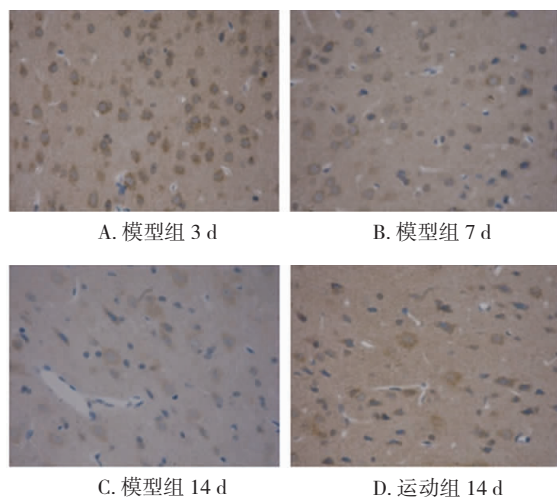


图 3 各组大鼠皮质 LINGO-1 蛋白表达情况 (SABC, 400 ×)

Fig.3 Expressions of LINGO-1 protein in cortex in different groups (SABC, 400 ×)

表 2 各组大鼠 LINGO-1 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.2 Expressions of LINGO-1 protein in different groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	3 d	7 d	14 d
假手术组	21.75 ± 2.60	23.38 ± 2.00	23.13 ± 1.89
模型组	51.00 ± 2.51	42.88 ± 2.64	39.38 ± 2.20
运动组	51.25 ± 2.12	42.15 ± 2.70	30.88 ± 2.17
r 值	0.964	0.980	0.850
P 值	0.833	0.583	0.000

3 讨论

LINGO-1 是最近发现的一种富含亮氨酸重复片段结构域的蛋白。正常大鼠主要在皮质、海马及纹状体中有少量表达^[3]。目前研究已证实,LINGO-1 主要是以 NgR/LINGO-1/P75 或 TROY (TAJ) 这种 NgR 三元复合物的形式存在^[4-6],其主要功能主要为以下几个方面:(1)抑制轴突再生:中枢神经系统损伤后,NgR 复合体便与勿动蛋白 A、髓鞘磷脂相关糖蛋白、少突胶质细胞髓鞘相关糖蛋白等髓鞘源性轴突相关抑制因子结合,后可将抑制轴突生长的信号跨膜传导至保内,激活下游 RhoA 激酶,最终抑制轴突再生^[5,7-8]。(2)抑制少突胶质细胞分化和髓鞘形成:大量实验表明,通过 LINGO-1 拮抗剂及基因敲除等办法可促进少突胶质细胞分化及髓鞘形成。少突胶质细胞分化受 Fyn 激酶与 RhoA 激酶信号通路双重调控,RhoA 信号通路阻碍少突胶质细胞分化,而 Fyn 激酶通路则对抗 RhoA 对细胞分化的抑制作用,阻断 LINGO-1 功能可见 Fyn 激酶水平增高^[8]。另一些研究表明 LINGO-1 可与神经生长因子(nerve growth factor,NGF)受体 TrkA 形成受体复合物,LINGO-1 表达与 NGF 呈剂量依赖性,NGF 可通过激活 TrkA 上调 LINGO-1 表达从而抑制髓鞘形成^[9-10]。(3)抑制神经元存活:目前研究表明 LINGO-1 抑制神经元存活主要是通过降低表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor,EGFR)而产生效应的,LINGO-1 抑制 EGFR 表达进而抑制 PI3K/AKT 通路活性,而 PI3K/AKT 通路可阻断多种刺激因子所诱导的细胞凋亡,促进细胞存活^[7-8]。

目前对 LINGO-1 的研究大多集中在 SCI 模型、PD 模型及脱髓鞘疾病等方面,主要是通过 LINGO-1 基因敲除或拮抗剂等办法对上述疾病进行治疗,但对 LINGO-1 和运动训练的相互关系及其分子机制等方面研究较少,因此本实验就这一方面进行了探索。结果显示运动训练在 14 d 时间点时,运

运动组 LINGO-1 在 mRNA 及蛋白表达水平均较模型组明显降低,且相应的神经行为学 Longa 评分也有所改善,因此推测运动训练后下调 LINGO-1 的表达可能是运动训练促进神经功能恢复的机制之一。那么运动训练究竟是通过什么分子机制来下调 LINGO-1 的表达的呢?其信号通路是否是前面提到的 *RhoA* 激酶及 PI3K/AKT 等信号通路呢?徐丽丽等^[11]对大鼠 MCAO 后采取跑台训练的方法,2 周后运动组 PI3K/Akt 通路中 p-PI3K 及 p-Akt 磷酸化水平明显高于对照组。瞿志永等^[12]通过强制运动的方法观察 MCAO 后大鼠脑内 *RhoA* 激酶表达变化,发现在缺血侧大脑皮质中 *RhoA* 激酶的表达,在 14 d 及 21 d 时间点,强制运动训练组较对照组明显降低。戚其学等^[13]用强制运动方法观察脑缺血后神经元轴突再生及 NogoA 蛋白表达变化,结果显示 2 周后缺血侧脑组织 NogoA 蛋白表达水平降低且患肢运动功能较前康复。推测运动训练促进神经功能恢复的可能通路为:①通过下调 NogoA 蛋白表达,减少其与 NgR1/LINGO-1/P75 或 TROY (TAJ)三元复合物结合,进而减少其下游 *RhoA* 激酶通路的激活。②通过下调 LINGO-1 表达,减少对 EGFR 表达的抑制,进一步促进下游 PI3K/AKT 通路的激活。但上述两个可能通路均需在未来进一步实验中加以证实。

本实验在运动训练的运动量上选择的是低运动量,因为查阅文献发现过高的运动量会影响脑内葡萄糖的吸收及增加乳酸等代谢产物,且因为大运动量可通过改变脑内能量代谢影响下丘脑-垂体-肾上腺轴的功能,使糖皮质激素水平升高,进而影响神经再生^[14]。

综上所述,局灶性脑梗死后大鼠脑内 LINGO-1 水平明显上调,适量运动训练可下调 LINGO-1 蛋白的表达,促进神经功能恢复,运动训练对 LINGO-1 表达的影响需较长时间,短期内效果不明显。下调 LINGO-1 蛋白的表达可能是运动训练后促进神经功能恢复的分子机制之一。

参 考 文 献

- [1] Lv J, Xu R X, Jiang X D, et al. Passive immunization with LINGO-1 polyclonal antiserum afforded neuroprotection and promoted functional recovery in a rat model of spinal cord injury[J]. *Neuroimmunomodulation*, 2010, 17(4): 270-278.
- [2] Vilariño-Gutiérrez C, Ross O A, Wider C, et al. LINGO1 rs9652490 is associated with essential tremor and Parkinson disease[J]. *Parkinsonism Relat Disord*, 2010, 16(2): 109-111.
- [3] Llorens F, Gil V, Iraola S, et al. Developmental analysis of Lingo-1/Lern1 protein expression in the mouse brain; interaction of its intracellular domain with Myt1[J]. *Dev Neurobiol*, 2007, 68(4): 521-541.
- [4] 范有明, 蔡明春. Nogo-66 受体 RNA 干扰质粒的构建及其干扰效率鉴定[J]. *第三军医大学学报*, 2007, 29(13): 1285-1288.
- [5] Fan Y M, Cai M C. Construction and identification of plasmid RNA interference targeting Nogo-66 receptor[J]. *Journal of Third Military Medical University*, 2007, 29(13): 1285-1288.
- [6] Giger R J, Hollis E R 2nd, Tuszynski M H. Guidance molecules in axon regeneration[J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2010, 2(7): 1-21.
- [7] Schwab J M, Tuli S K, Failli V. The Nogo receptor complex: confining molecules to molecular mechanisms[J]. *Trends Mol Med*, 2006, 12(7): 293-297.
- [8] Mi S, Sandrock A, Miller R H. LINGO-1 and its role in CNS repair[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2008, 40(10): 1971-1978.
- [9] 戚韵雯, 张 圆, 郭庆山. LINGO-1 对 CNS 损伤神经元和髓鞘再生的影响[J]. *检验医学与临床*, 2010, 7(21): 2412-2413.
- [10] Qi Y W, Zhang Y, Guo Q S. Effects of LINGO-1 on damaged neurons and remyelination of CNS[J]. *Lab Med Clin*, 2010, 7(21): 2412-2413.
- [11] Chan J R, Watkins T A, Cosgaya J M, et al. NGF controls axonal receptivity to myelination by Schwann cells or oligodendrocytes[J]. *Neuron*, 2004, 43(2): 183-191.
- [12] Lee X, Yang Z, Shao Z, et al. NGF Regulates the expression of axonal LINGO-1 to inhibit oligodendrocyte differentiation and myelination[J]. *J Neurosci*, 2007, 27(1): 220-225.
- [13] 徐丽丽, 胡永善, 吴 毅, 等. 运动训练对脑缺血大鼠 PI3K/Akt 抗凋亡信号转导通路的影响[J]. *中华物理医学与康复杂志*, 2008, 30(10): 649-652.
- [14] Xu L L, Hu Y S, Wu Y, et al. The effect of physical training on the PI3K/Akt signal transduction pathway after focal brain ischemia in rats[J]. *Chin J Phys Med Rehabil*, 2008, 30(10): 649-652.
- [15] 瞿志永, 聂莹雪, 赵传胜, 等. 强制性运动疗法对大鼠脑缺血再灌注后神经修复及 *Rho* 激酶表达的影响[J]. *中国医科大学学报*, 2008, 37(3): 295-298.
- [16] Zhai Z Y, Nie Y X, Zhao C S, et al. Effects of constraint-induced movement therapy on neural repair and *Rho* kinase expression after cerebral ischemia-reperfusion in rats[J]. *Journal of China Medical University*, 2008, 37(3): 295-298.
- [17] 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, 18(3): 317-320.
- [18] Qi Q X, Li Y F, Zhao S S, et al. The effects of constraint-induced movement therapy on the axonal regeneration and the expression of Nogo-A protein[J]. *Chin J Hemorrh*, 2008, 18(3): 317-320.
- [19] Lou S J, Liu J Y, Chang H, et al. Hippocampal neurogenesis and gene expression depend on exercise intensity in juvenile rats[J]. *Brain Res*, 2008, 1210: 48-55.

(责任编辑:冉明会)