

神经疾病

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.2014.02.012

跑台训练对脑缺血大鼠脑组织 Reelin、PI3KCA
及突触素表达的影响

杨 婉, 李光勤, 蓝晓芳, 曾 倩, 刘 可

(重庆医科大学附属第一医院神经内科, 重庆 400016)

【摘要】目的:观察脑缺血大鼠跑台运动训练后神经功能恢复情况及磷脂酰肌醇-3-激酶 α 亚单位(phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit α isoform, PI3KCA)、Reelin 及突触素表达的变化。**方法:**选取健康雄性 SD 大鼠 54 只, 随机分为假手术组、缺血对照组及运动训练组。采用线栓法大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)方法造成局灶性脑缺血模型。运动训练组于造模后第 3 天进行 16 d 的跑台训练(15 m/min, 每日 30 min)。运用改良神经功能缺损评分(modified neurological severity scores, mNSS)对 3 组动物进行神经功能评分。采用 HE 染色观察各组海马神经细胞形态; 运用免疫组化方法检测各组 Reelin 及 PI3KCA 阳性细胞数; Western blot 检测各组缺血皮质 Reelin 及突触素蛋白水平。**结果:**MCAO 术后 19 d, 运动训练组 mNSS 评分较缺血对照组明显降低($P<0.05$)。HE 染色显示, 假手术组海马神经细胞结构完整; 缺血对照组海马神经细胞出现异常变化, 细胞体积缩小, 核不规则, 细胞排列散乱, 大量变性; 运动训练组海马神经细胞结构基本正常, 细胞排列尚整齐。免疫组化显示, 运动训练组大鼠缺血侧脑组织 Reelin 及 PI3KCA 阳性细胞数均高于缺血对照组, 差异有统计学意义(18.27 ± 4.03 vs. 7.53 ± 2.03 , $P<0.01$; 10.27 ± 1.62 vs. 5.40 ± 1.84 , $P<0.01$)。Western blot 检测运动训练组 Reelin 及突触素蛋白表达明显高于缺血组和假手术组, 差异有统计学意义($P<0.05$); 而缺血组较假手术组 Reelin 及突触素蛋白的表达水平虽增加, 但差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论:**跑台运动训练可改善局灶性脑缺血大鼠神经功能评分, 上调脑组织 Reelin、PI3KCA 及突触素的表达, 促进脑缺血后的神经功能恢复。

【关键词】脑缺血; 跑台训练; Reelin; 磷脂酰肌醇-3-激酶 α 亚单位; 突触素

【中图分类号】R743.3

【文献标志码】A

【收稿日期】2013-08-27

作者介绍: 杨 婉, Email: 365218410@qq.com,

研究方向: 脑血管病。

通信作者: 李光勤, Email: liguangqin@tom.com。

基金项目: 重庆市教委资助项目(编号: KJ130306)。

Neurol, 2004, 17(2): 155-159.

[7] Bernard C, Anderson A, Becker A, et al. Acquired dendritic channelopathy in temporal lobe epilepsy[J]. Science, 2004, 305(5683): 532-535.

[8] Dudek FE, Rogawski MA. The epileptic neuron redux[J]. Epilepsy Curr, 2002, 2(5): 151-152.

[9] Solger J, Heinemann U, Behr J. Electrical and chemical long-term depression do not attenuate low- Mg^{2+} -induced epileptiform activity in the entorhinal cortex[J]. Epilepsia, 2005, 46(4): 509-516.

[10] Blair RE, Sombati S, Lawrence DC, et al. Epileptogenesis causes acute and chronic increases in GABAA receptor endocytosis that contributes to the induction and maintenance of seizures in the hippocampal culture model of acquired epilepsy[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2004, 310(3): 871-880.

[11] 徐祖才, 刘 华, 陈阳美. 海马神经元癫痫样放电后 ERK1/2 信号通路与 C-fos 的相关性[J]. 中华医学杂志, 2008, 88(23): 1639-1642.

[12] 娄 燕, 王维平, 李 攀, 等. CREB 和 NMDA 受体在致痫大鼠学习记忆功能改变中的变化及意义[J]. 四川大学学报(医学版), 2007,

38(6): 949-953.

[13] Lonze BE, Ginty DD. Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system[J]. Neuron, 2002, 35(4): 605-623.

[14] Pittenger C, Huang YY, Paletzki RF, et al. Reversible inhibition of CREB/ATF transcription factors in region CA1 of the dorsal hippocampus disrupts hippocampus dependent spatial memory[J]. Neuron, 2002, 34(3): 447-462.

[15] DeLorenzo RJ, Pal S, Sombati S. Prolonged activation of the N-methyl-D-aspartate receptor- Ca^{2+} transduction pathway causes spontaneous recurrent epileptiform discharges in hippocampal neurons in culture[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(24): 14482-14487.

[16] Huang YH, Lin Y, Brown TE, et al. CREB modulates the functional output of nucleus accumbens neurons: a critical role of N-methyl-D-aspartate glutamate receptor(NMDAR) receptors[J]. J Biol Chem, 2008, 283(5): 2751-2760.

(责任编辑: 关蕴良)

Effect of treadmill training on Reelin, PI3KCA and synaptophysin in rats with focal cerebral ischemia

Yang Wan, Li Guangqin, Lan Xiaofang, Zeng Qian, Liu Ke

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

[Abstract] **Objective:** To observe the changes in nerve function recovery and the expression of Reelin, PI3KCA and synaptophysin in ischemic brain tissues of cerebral ischemic rats after treadmill training. **Methods:** A total of 54 rats were randomly divided into three groups: sham-operated group, ischemic control group and treadmill training group. Middle cerebral artery occlusion (MCAO) was used to create focal cerebral ischemic model in rats. Rats in E group underwent treadmill training for 16 d (15 m/min, 30 min/d). Modified neurological severity scores (mNSS) was used to evaluate the neurological function of rats in three groups. HE staining was used to observe nerve cell morphology in hippocampus of rats in three groups. Immunohistochemistry was used to detect the number of Reelin-positive and PI3KCA-positive cells. Western blot was used to detect the level of Reelin and synaptophysin in ischemic cortex of rats in three groups. **Results:** The mNSS of E group was lower than that of I group on the 19th d post-MCAO ($P < 0.05$). The morphology of the hippocampal neurons in S group was normal, irregular and damaged in I group, while alleviated after treadmill training. Both the expression of Reelin-positive and PI3KCA-positive cells in E group were higher than that in I group (18.27 ± 4.03 vs. 7.53 ± 2.03 , $P < 0.01$; 10.27 ± 1.62 vs. 5.40 ± 1.84 , $P < 0.01$). The expression of Reelin and synaptophysin in ischemic cortex of rats in E group was remarkably upregulated than that in S and I group with statistical differences ($P < 0.05$). The expression of Reelin and synaptophysin in ischemic cortex of rats in I group was upregulated than that in S group without statistical differences ($P > 0.05$). **Conclusions:** Treadmill training can improve neurological function and upregulate the expression of Reelin, PI3KCA and synaptophysin after cerebral ischemia.

[Key words] cerebral ischemia; treadmill training; Reelin; phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha isoform; synaptophysin

缺血性脑卒中是一种发病率、死亡率及致残率均较高的急性疾病,降低患者的生存质量,给社会和家庭带来沉重的负担。目前临床上尚无十分有效的治疗措施。因此,对于脑缺血的脑保护及康复治疗是近年来研究的重点和难点之一。研究表明,运动训练可显著改善缺血性脑卒中所引起的功能障碍,但学界至今尚不能具体阐明这一过程所涉及的分子机制。因此,本实验研究运动训练对脑缺血大鼠脑组织 Reelin、磷脂酰肌醇-3-激酶 α 亚单位 (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha isoform, PI3KCA) 及突触素表达的影响,以期探讨此过程的相关机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

健康成年雄性 SD 大鼠 54 只,体质量 250~320 g,月龄 2~3 个月(由重庆医科大学实验动物中心提供)。随机分为 3 组:假手术组 13 只、缺血组 19 只和运动训练组 22 只。

1.2 主要实验设备及试剂

SLY-RTML 6 通道动物跑台(北京硕林苑),Reelin 一抗(鼠单克隆抗体, millipore), PI3KCA 一抗(鼠多克隆抗体, pro-

teintech), 突触素一抗(兔多克隆抗体, proteintech), SABC 免疫组化试剂盒(北京中杉金桥), DAB 显色剂(北京中杉金桥)。

1.3 实验方法

1.3.1 脑缺血动物模型的制备 用 10% 水合氯醛 (0.3 ml/100 g 体质量, 腹腔注射) 麻醉 SD 大鼠后将其固定, 参照 Longa 颈外动脉线栓法^[1]制备大脑中动脉闭塞 (middle cerebral artery occlusion, MCAO) 模型。假手术组也插入线栓, 但深度小于 1 cm, 不阻断大脑中动脉血流。大鼠自然清醒后对其进行神经行为学 Longa 评分^[1], 得分为 1~3 分表示造模成功, 纳入后续实验。

1.3.2 运动训练 术后各组大鼠在标准大鼠饲养笼内饲养, 正常昼夜节律, 自由进食、饮水。运动训练组于手术后第 3 天进行跑台训练, 第 1、2 天为适应性训练, 速度 10 m/min, 每天 20 min, 第 3 天开始进行为期 14 d 的正式训练, 速度 15 m/min, 每天 30 min。假手术组及缺血组除不进行运动训练外其余均同运动训练组。

1.3.3 神经功能评分 3 组大鼠于术后 24 h、3 d、8 d、12 d 及 19 d 采用改良神经功能缺损评分 (modified neurological severity scores, mNSS) 评估其神经功能缺损程度。mNSS 包括运动 (肌肉状态、异常运动)、感觉 (视觉、触觉、本体感觉) 和反射检查, 通过运动实验、感觉实验、平衡木实验及反射丧失和不正常运动, 综合评价神经系统损伤的严重程度, 4 个项目的总和为最终评分 (严重损伤评分为 18~13 分, 中度损伤评分为 12~7 分, 轻度损伤评分为 6~1 分)^[2]。

1.3.4 病理学检查 于术后第 19 天,各实验组大鼠行最后 1 次神经功能缺损评分后,用 10% 水合氯醛深麻醉,每组取 8 只大鼠经左心室灌注磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS) (1 mmol/L) 200 ml,再灌注 4% 多聚甲醛 200 ml,然后断头取脑,分离缺血侧半球,在视交叉前 2 mm 至视交叉后 2 mm 范围内冠状取材,用 4% 的多聚甲醛 4 ℃ 固定 24 h,常规石蜡包埋,制成 4 μm 连续冠状切片,裱于经多聚赖氨酸处理的清洁玻片上,65 ℃ 烤箱内烘烤 2 h 后放于 4 ℃ 冰箱内备用。余下各组大鼠经水合氯醛深麻醉后断头取脑,分离缺血侧半球残存的大脑皮质及海马,迅速置于液氮罐中,2 d 后转移至 -80 ℃ 冰箱中保存备用。

1.3.5 HE 染色 石蜡切片经二甲苯脱蜡(20 min × 2 次)、梯度酒精(100%、95%、80%、70%)脱水后,水洗 3 min,苏木精液染色 5 min,水洗 3 min,1% 盐酸酒精分化,0.5% 伊红液复染 3~5 min,梯度酒精(95%、100%)脱水、二甲苯透明(10 min × 2 次),中性树胶封片。

1.3.6 免疫组织化学染色 石蜡切片经 65 ℃ 烤箱过夜,经二甲苯脱蜡(20 min × 2 次)、梯度酒精(100%、95%、80%、70%)脱水(各 5 min),最后 PBS 溶液充分水洗。枸橼酸钠溶液热修复 25 min 后切片自然冷却 1.5 h。PBS 溶液充分冲洗(5 min × 3 次)。3% H₂O₂ 阻断内源性过氧化物酶 20 min, PBS 溶液冲洗(5 min × 3 次)。加入山羊血清封闭,孵育 20 min。滴加一抗 Reelin(1:100)、PI3KCA(1:100),4 ℃ 过夜。37 ℃ 复温 1 h, PBS 溶液冲洗(5 min × 3 次)。滴加二抗,孵育 30 min, PBS 溶液冲洗(5 min × 3 次)。滴加辣根酶标记的链霉卵白素工作液,孵育 30 min, PBS 溶液冲洗(5 min × 3 次)。DAB 显色,显微镜下观察至黄染合适即可将切片置于自来水中中止显色。依次经苏木精复染、Li₂CO₃ 返蓝、梯度酒精脱水(70%、80%、95%、100%,各 3 min)、二甲苯透明(10 min × 2 次),最后中性树胶封片。

1.3.7 蛋白印迹 分别在各组样品中加入适当浓度的蛋白裂解液及蛋白酶抑制剂,冰上研磨至组织完全分散。然后采用 BCA 法测定蛋白浓度,配平后加入上样缓冲液煮沸变性。配 10 % 胶上样 40 μg,接通电源,以电压 120 V、电源 80 mA 电泳,等到溴酚蓝跑出分离胶即停止电泳。小心将胶放入适量电转液中,剪同样大小的 0.45 μm 孔径的硝酸纤维素膜,用甲醇(100%)活化 30 s,转移至电转槽中,250 mA 转膜。转膜完成后,小心将膜与胶及滤纸分离,将膜置于 5% 脱脂奶粉中封闭 2 h,孵一抗 4 ℃ 过夜。复温 2 h 后用 TBST 洗膜 10 min × 3 次,孵二抗 2 h,洗膜后显影。Reelin 一抗浓度 1:500,突触素

一抗浓度 1:2 000,内参浓度 1:4 000,抗鼠二抗浓度 1:4 000,抗兔二抗浓度 1:8 000。

1.4 图像分析

光镜下观察,胞浆或胞膜出现棕色颗粒,不论染色程度,均视为阳性细胞。从每组各标本的每张切片随机选取 5 张切片,每张切片在 10 × 20 放大倍数下选取缺血区及周围 5 个互不重叠的视野,每组各有 25 个视野,统计每个视野的单位面积阳性细胞数,将所得均数作为各组阳性细胞数的统计学资料进行分析。

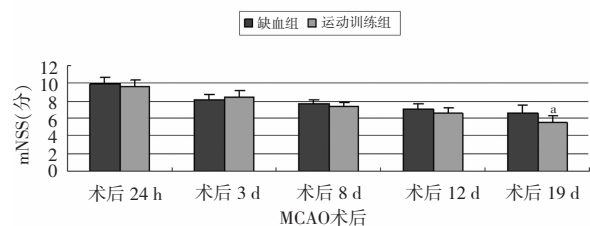
1.5 统计学分析

所有计量资料采用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,用 SPSS 17.0 统计分析软件对数据进行统计分析。不同时间点 mNSS 总体采用重复测量方差分析,两样本均数比较用 *t* 检验,多组间差异采用单因素方差分析,组间两两比较方差齐者用 LSD-*t* 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 神经功能缺损综合评定

假手术组无神经功能缺损症状。术后 19 d,即运动训练 14 d 后,运动训练组与缺血组神经功能恢复明显,前者恢复明显优于后者,差异有统计学意义 ($P<0.05$) (表 1)。2 组术后 24 h、3 d、8 d、12 d 比较差异无统计学意义 ($P>0.05$) (图 1)。



a. 与缺血组同期相比, $P<0.05$

图 1 脑缺血后 mNSS 比较

Fig.1 Comparison of mNSS after cerebral ischemia

2.2 HE 染色结果

假手术组:大鼠海马神经细胞结构完整,神经元排列整齐,核仁清晰,细胞核大而圆,胞浆无红染(图 2A);缺血组:海马神经细胞出现异常变化,细胞体积缩小,核不规则,细胞排列散乱,大量变性,变性的神经细胞核固缩深染,胞浆嗜伊红(图 2B);运动训练组:海马神经细胞结构基本正常,细胞排列尚整齐,少量神经细胞核变性(图 2C)。

表 1 脑缺血后 mNSS 比较 (分, $\bar{x} \pm s$)

Tab.1 Comparison of mNSS after cerebral ischemia (min, $\bar{x} \pm s$)

分组	术后 24 h	术后 3 d	术后 8 d	术后 12 d	术后 19 d
假手术组	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
缺血组	9.89 ± 0.83 ^a	8.06 ± 0.64 ^a	7.61 ± 0.50 ^a	7.06 ± 0.64 ^a	6.56 ± 0.92 ^a
运动训练组	9.61 ± 0.78	8.39 ± 0.70	7.33 ± 0.49	6.61 ± 0.61	5.57 ± 0.69 ^b

注:a,与假手术组同期相比, $P<0.01$;b,与缺血组同期相比, $P<0.05$

2.3 Reelin、PI3KCA 免疫组织化学结果

Reelin 蛋白定位于胞膜,阳性细胞为棕色或棕褐色。假手术组未见明显阳性细胞,缺血组 Reelin 阳性细胞数较假手术组有所增加,差异有统计学意义 ($P<0.01$);运动训练组 Reelin 阳性细胞数较缺血组增多明显,差异有统计学意义 ($P<0.01$)(表 2,图 3)。

表 2 各组大鼠运动训练 14 d 后脑内 Reelin、PI3KCA 阳性细胞数比较 (个/HP, $\bar{x} \pm s$)

Tab.2 Number of Reelin-positive and PI3KCA-positive cells in different groups on the 14th d after the training ($\bar{x} \pm s$)

分组	Reelin	PI3KCA
假手术组	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00
缺血组	7.53 $\pm$ 2.03 ^a	5.40 $\pm$ 1.84 ^a
运动训练组	18.27 $\pm$ 4.03 ^b	10.27 $\pm$ 1.62 ^b

注:a,与假手术组相比, $P<0.01$;b,与缺血组相比, $P<0.01$

PI3KCA 表达定位于胞浆,阳性细胞为棕色或棕褐色。假手术组未见明显阳性细胞,缺血组 PI3KCA 阳性细胞数较假手术组有所增加,差异有统计学意义 ($P<0.01$);运动训练组 PI3KCA 阳性细胞数较缺血组增多明显,差异有统计学意义 ($P<0.01$)(表 2,图 4)。

2.4 Reelin、突触素蛋白表达

3 组大鼠脑缺血周边皮质均可检测到 Reelin 蛋白和突触素蛋白的特异性条带(图 5)。术后 19 d(即运动训练 14 d)运动训练组 Reelin 蛋白的表达水平明显高于缺血组和假手术组,差异有统计学意义 ($P<0.05$),而缺血组与假手术组 Reelin 蛋白的表达水平差异无统计学意义 ($P>0.05$)(图 6);术后 3 d,大鼠突触素蛋白表达明显低于假手术组,差异有统计学意义 ($P<0.01$)(图 6);术后 19 d(即运动训练 14 d)运动训练组突触素蛋白的表达水平显著高于缺血组和假手术组,差异有统计学意义 ($P<0.05$),缺血组与假手术组突触素蛋白的表达水平差异无统计学意义 ($P>0.05$)(图 6)。

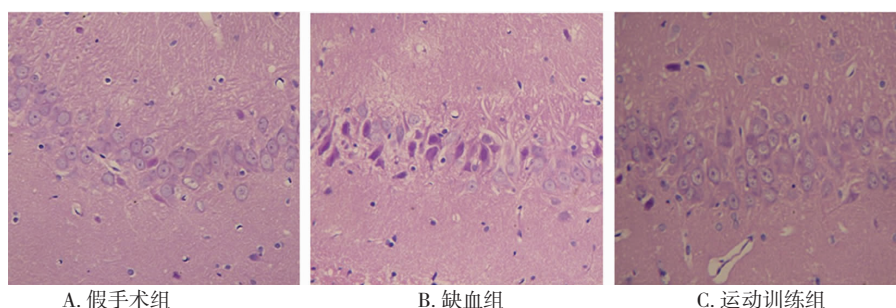


图 2 大鼠海马 HE 染色结果(200 $\times$)

Fig.2 HE staining of the hippocampus in different groups(200 $\times$)

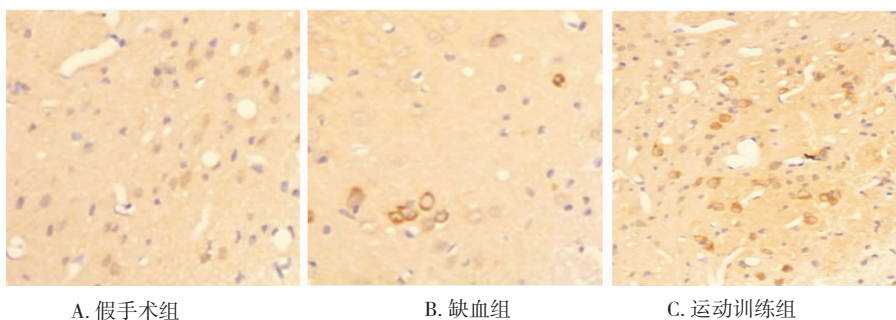


图 3 大鼠 Reelin 蛋白免疫组化结果(200 $\times$)

Fig.3 Immunohistochemistry of Reelin in different groups(200 $\times$)

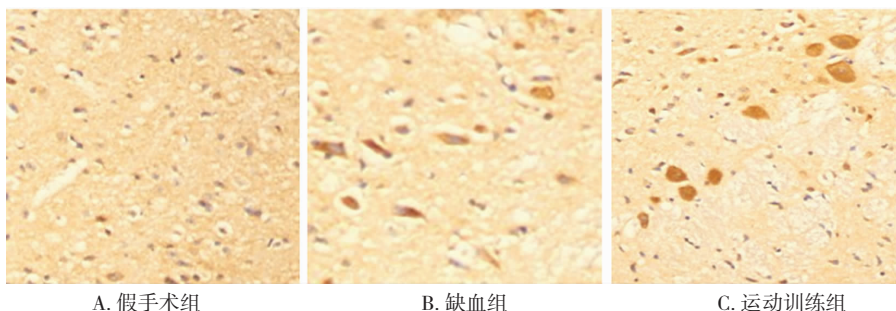


图 4 大鼠 PI3KCA 蛋白免疫组化结果(200 $\times$)

Fig.4 Immunohistochemistry of PI3KCA in different groups (200 $\times$)

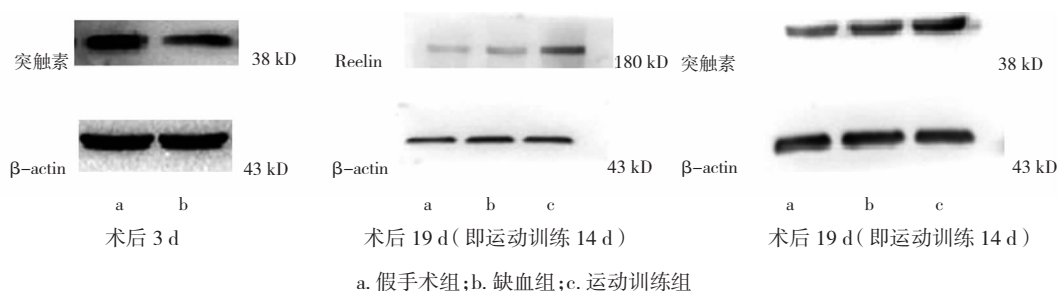


图 5 术后 3、19 d 大鼠 Reelin、突触素蛋白印迹结果

Fig.5 Expression of Reelin and synaptophysin in different groups on the 3rd d and 19th d after the operation

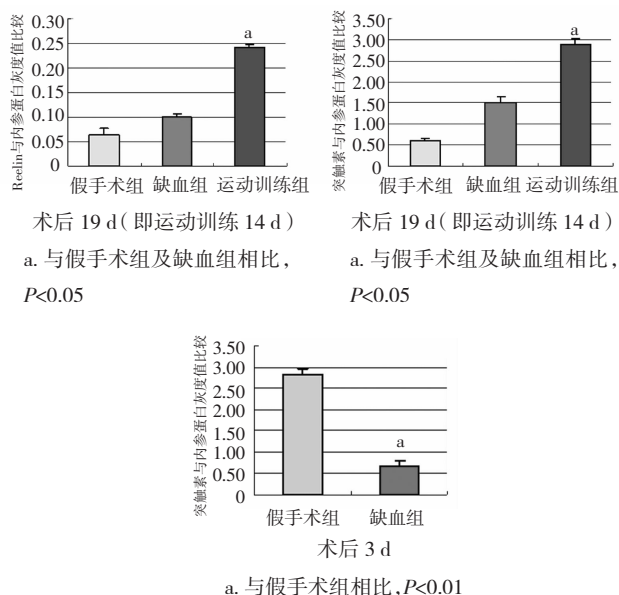


图 6 Reelin 及突触素与内参灰度值比较

Fig.6 Relative expression of Reelin and synaptophysin in different groups

3 讨论

近年来的基础和临床研究显示,脑卒中后早期康复训练能显著改善患者偏瘫肢体的运动能力与整体功能^[3]。成人神经组织受损后主要以侧支再生为主,即损伤区临近的正常神经元侧支发芽,向靶组织或其他神经元延伸,形成新的突触^[4-5]。脑缺血会导致损伤区微环境的变化,从而刺激神经的再生,但是中枢神经系统相对于外周神经而言再生能力十分低下。因此,寻求促进脑缺血后轴突再生的干预手段一直是神经病学研究的重点和难点。多项研究发现^[6-8],脑缺血后进行多种功能训练的大鼠,运动及学习、记忆能力有明显改善。本研究也表明,经过 2 周运动训练的脑缺血大鼠,与自然恢复缺血组相比,其缺血性损伤程度较轻,海马神经细胞结构较为正常,提示运动训练可以作为一种有效的干预

手段减轻脑缺血所造成的神经组织损伤,促进脑缺血后的神经功能恢复。

Reelin 是一种分泌型细胞外基质蛋白,几乎存在于所有的脊椎动物。在胚胎期,Reelin 主要由大脑皮质形成过程中短暂存在的 Cajal-Retzius (C-R) 细胞合成和分泌,激活原始神经元迁移,维持皮质由内层向外层的正常发育^[9];在成体,Reelin 调节神经元发生和迁移,调节突触的结构和功能,帮助干细胞在成熟神经组织中迁移^[10-12]。与此同时,有文献也指出^[13],Reelin 基因敲除的小鼠在脑卒中后表现出神经再生方面的缺损,并且梗死面积也有所增加,提示 Reelin 可能在脑缺血的病理变化过程中也具有重要作用。本研究发现,与假手术组相比,缺血组和运动训练组大鼠皮质 Reelin 表达均明显增加,表明缺血损伤作为一种剧烈的刺激促进机体对此产生了病理性保护反应;而在此基础上,运动训练组的 Reelin 表达又明显高于缺血组,提示运动训练可能通过上调 Reelin 的表达而促进脑缺血后神经功能障碍的恢复。

Reelin 蛋白的这一系列病理生理学作用是通过与极低密度脂蛋白受体、载脂蛋白 E 受体 2 以及整合素 $\alpha\beta 1$ 的结合来实现的。Reelin 与上述受体结合后可激活下游蛋白 Dab1^[14],激活的 Dab1 又可作为信号分子刺激下游磷脂酰肌醇-3-激酶/丝氨酸/苏氨酸激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase/serine threonine kinases, PI3-K/Akt) 信号通路开放,从而在胚胎期和成体内均发挥重要的作用^[15]。PI3-K/Akt 是调节细胞功能的重要信号途径,与细胞增殖和存活、细胞活动和黏附、细胞分化、细胞支架结构的重排和胞内运输都有密切联系^[16]。既往研究发现,PI3-K/Akt 信号通路参与了脑缺血的病理过程。该信号的激活促进了机体的自身病理性保护,刺激神经再生^[17]。PI3KCA 是 PI3K 的催化亚单位,对维持 PI3K 的结构与功能具有重大作用^[18]。目前,众多研究发现 PI3KCA 的表达异常与脑癌存在关系^[18],对于脑缺血模型中 PI3KCA 的表达情况则研究较少。本研究

发现,与假手术组相比,缺血组和运动训练组大鼠缺血脑组织中 PI3KCA 的阳性细胞数有所增加,而在此基础上,运动训练组大鼠缺血脑组织中的 PI3KCA 阳性细胞数又高于缺血组,提示运动训练可能通过上调 PI3KCA 的表达而实现其神经恢复作用。

突触素是突触囊泡的主要跨膜蛋白之一,与突触的结构和功能密切相关。突触素在成熟脑组织中高度集中在突触前轴突末梢内,突触重建时其表达明显增多,因此,该蛋白作为轴突重建的重要标志与神经可塑性密切相关^[19]。Martinez 等^[20]研究发现,在缺血缺氧时,能反映神经细胞代偿及重塑的突触素的表达和生成增加。Seo 等^[21]研究发现,早期运动训练能够促进脑缺血大鼠皮质下区突触素的表达,而国内刘罡等^[22]也发现,跑台训练能够促进脑缺血后周围皮质突触素的表达,导致了脑组织超微结构的改变。本研究也发现,与假手术组相比,运动训练组的突触素表达明显高于缺血组,提示运动训练上调了突触素的表达,增强了突触功能,从而促进了脑缺血后神经功能的恢复。

综上所述,随时间进展,缺血组大鼠 mNSS 逐渐下降,神经功能逐渐恢复,表明机体对缺血性损伤有自身的病理性保护反应。但运动训练 2 周后的大鼠其 mNSS 明显低于缺血组,提示运动训练可以改善脑缺血后的神经功能恢复。在此基础上,与假手术组相比,缺血组和运动训练组大鼠皮质 Reelin、PI3KCA 及突触素表达均增加,而运动训练组的 Reelin、PI3KCA 及突触素表达又明显高于缺血组,表明缺血损伤作为一种剧烈的刺激促进机体对此产生了病理性保护反应,而运动训练又明显加强了此种保护作用,促进了脑缺血后神经功能障碍的恢复。因此,本研究可以推测,运动训练促进了 Reelin 的表达,上调的 Reelin 与相应受体结合后可能激活了下游的 PI3-K/Akt 信号通路,促进下游突触素的表达,从而增强了突触功能,为改善脑缺血后动物行为学提供了分子基础。

参 考 文 献

- [1] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91.
- [2] 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.
- [3] 胡永善,白玉龙,陈文华,等.规范三级康复治疗对缺血性脑卒中患者运动功能的影响[J].中国康复医学杂志,2007,22(7):605-608.
- [4] Van Velthoven CT, Kavelaars A, Van Bel F, et al. Regeneration of the ischemic brain by engineered stem cells: fuelling endogenous repair processes[J]. Brain Res Rev, 2009, 61(1): 1-13.
- [5] 缪鸿行.中枢神经系统(CNS)损伤后功能恢复的理论(二)[J].中国康复理论与实践,1996(1):1-5.
- [6] Matsuda F, Sakakima H, Yoshida Y. The effects of early exercise on brain damage and recovery after focal cerebral infarction in rats[J]. Acta Physiol(Oxf), 2011, 201(2): 275-287.
- [7] Ferreira AF, Real CC, Rodrigues AC, et al. Moderate exercise changes synaptic and cytoskeletal proteins in motor regions of the rat brain[J]. Brain Res, 2010, 1361: 31-42.
- [8] Ploughman M, Granter-Button S, Chernenko G, et al. Exercise intensity influences the temporal profile of growth factors involved in neuronal plasticity following focal ischemia[J]. Brain Res, 2007, 1150: 207-216.
- [9] Feng L, Allen NS, Simo S, et al. Cullin 5 regulates Dab1 protein levels and neuron positioning during cortical development[J]. Genes Dev, 2007, 21(21): 2717-2730.
- [10] Pujadas L, Gruart A, Bosch C, et al. Reelin regulates postnatal neurogenesis and enhances spine hypertrophy and long-term potentiation[J]. J Neurosci, 2010, 30(13): 4636-4349.
- [11] Niu S, Yabut O, D'Arcangelo G. The Reelin signaling pathway promotes dendritic spine development in hippocampal neurons[J]. J Neurosci, 2008, 28(41): 10339-10348.
- [12] Pulido JS, Sugaya I, Comstock J, et al. Reelin expression is upregulated following ocular tissue injury[J]. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2007, 245(6): 889-893.
- [13] Won SJ, Kim SH, Xie L, et al. Reelin-deficient mice show impaired neurogenesis and increased stroke size[J]. Exp Neurol, 2006, 198(1): 250-259.
- [14] Benhayon D, Magdaleno S, Curran T. Binding of purified Reelin to ApoER2 and VLDLR mediates tyrosine phosphorylation of Disabled-1[J]. Brain Res Mol, 2003, 112(1-2): 33-45.
- [15] Fatemi SH. Reelin glycoprotein: structure, biology and roles in health and disease[J]. Mol Psychiatry, 2005, 10(3): 251-257.
- [16] Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway[J]. Science, 2002, 296(5573): 1655-1657.
- [17] Kitagawa H, Warita H, Sasaki C, et al. Immunoreactive Akt, PI3-K and ERK protein kinase expression in ischemic rat brain[J]. Neurosci Lett, 1999, 274(1): 45-48.
- [18] Broderick DK, Di C, Parrett TJ, et al. Mutations of PI3KCA in anaplastic oligodendrogliomas, high-grade astrocytomas, and medulloblastomas[J]. Cancer Res, 2004, 64(15): 5048-5050.
- [19] Wiedenmann B, Franke WW. Identification and localization of synaptophysin, an integral membrane glycoprotein of Mr38 000 characteristic of presynaptic vesicles[J]. Cell, 1985, 41(3): 1017-1028.
- [20] Martinez G, Di Giacomo C, Carnazza ML, et al. MAP2, synaptophysin in immunostaining in rat brain and behavioral modifications after cerebral postischemic reperfusion[J]. Dev Neurosci, 1997, 19(6): 457-464.
- [21] Seo HG, Kim DY, Park HW, et al. Early motor balance and coordination training increased synaptophysin in subcortical regions of the ischemic rat brain[J]. J Korean Med Sci, 2010, 25(11): 1638-1645.
- [22] 刘罡,吴毅,胡永善,等.跑台训练对脑缺血大鼠脑组织超微结构及突触素表达的影响[J].中国康复医学杂志,2008,23(10): 872-874.

(责任编辑:关蕴良)