

• 基础研究 •

丰富康复训练对大鼠脑缺血再灌注后功能恢复及神经元树突生长的影响

程明高, 廖维靖, 杨万同, 江城, 周琴, 蒙兰青, 闻万顺

[摘要] 目的 观察丰富康复训练对大鼠缺血再灌注脑损伤功能恢复的影响, 以及损伤对侧大脑皮层前肢运动代表区第 V 层锥体神经元树突的可塑性变化。方法 雄性 Wistar 大鼠 32 只, 体重 180 ~ 200 g, 预训练后随机分成两组, 缺血组和假手术组, 每组 16 只。线栓法制作右大脑中动脉阻断 (MCAO) 2 h 再灌注模型。造模后缺血组随机分成丰富训练组 (IE 组) 和独居组 (IS 组), 假手术组随机分成丰富训练组 (SE 组) 和独居组 (SS 组), 每组 8 只。术后 24 h, IE 组和 SE 组置于丰富环境笼饲养, 按计划给予跑笼、转棒和杂技等训练, IS 组和 SS 组置于独居笼饲养, 不给予任何训练。4 组大鼠在造模后 24 h、1 周、2 周、3 周、4 周进行神经功能评估, 观察其恢复状况。用 Golgi-Cox 染色方法, 观察损伤对侧大脑皮层前肢运动代表区第 V 层锥体神经元树突的变化。结果 IE 组在各项功能评估中均优于 IS 组。3 周时, 肢体放置测试 IE 组与假手术组已无显著性差异 ($P > 0.05$); 4 周时, 足失误测试 IE 组与假手术组已无显著性差异 ($P > 0.05$)。Golgi-Cox 染色, IE 组比 IS 组和假手术组的树突分支点数有明显增加 ($P < 0.01$)。结论 丰富康复训练能有效促进缺血再灌注脑损伤大鼠的功能恢复, 并促进缺血对侧与功能恢复相关的大脑皮层神经元发生可塑性变化。

[关键词] 脑缺血再灌注; 丰富康复训练; 康复; 神经可塑性; 锥体神经元; 树突; 大鼠

Effects of Enriched Rehabilitative Training on the Functional Recovery and Neuronal Dendritic Growth Following Cerebral Ischemia/Reperfusion in Rats CHENG Ming-gao, LIAO Wei-jing, YANG Wan-tong, et al. Department of Rehabilitation Medicine, Zhongnan Hospital, Wuhan University, Wuhan 430071, Hubei, China

[Abstract] Objective To study the effect of enriched rehabilitative training on the functional recovery and neuronal dendritic growth following cerebral ischemia/reperfusion. Methods 32 male Wistar rats, weighting 180 ~ 200 g, were randomly divided into a ischemic group ($n=16$) and a sham-operation group ($n=16$) after beforehand trainings. Rats were subjected to 2 h of right middle cerebral artery occlusion before reperfusion. After surgery, the ischemic group were randomly divided into a ischemia + enrichment (IE) group and a ischemia + standard housing (IS) group; the sham-operation group were randomly divided into a sham + enrichment (SE) group and a sham + standard housing (SS) group. After 24 h reperfusion, IE and SE groups were housed in enriched cages, and given enriched rehabilitative training according to the scheme. At the same time, IS and SS groups were housed in standard cages without any training. The functions of 4 groups were evaluated at 24 h, 1 week, 2 weeks, 3 weeks and 4 week after operation. Dendritic growth of layer V pyramidal cells of the undamaged forelimb motor cortex was examined using Golgi-Cox procedure. Results IE group showed better function than IS group in all behavioral test. There was no significant difference in limb placement test at 3 weeks ($P > 0.05$) and in footfault test at 4 weeks ($P > 0.05$) after operation between IE and SE group. The mean of basilar dentrite branching points in IE group was significantly greater than that of other groups ($P < 0.01$). Conclusion Enriched rehabilitative training can promote functional recovery and enhance neural plasticity after cerebral ischemia/reperfusion in rats.

[Key words] cerebral ischemia/reperfusion; enriched rehabilitative training; rehabilitation; neural plasticity; pyramidal neurons; dentrite; rat

中图分类号: R743.3 文献标识码: A 文章编号: 1006-9771(2006)03-0203-04

[本文著录格式] 程明高, 廖维靖, 杨万同, 等. 丰富康复训练对大鼠脑缺血再灌注后功能恢复及神经元树突生长的影响[J]. 中国康复理论与实践, 2006, 12(3): 203—206.

近年来, 脑血管疾病的康复日益受到重视, 寻找有效的康复手段正成为研究的热点。有研究表明, 康复训练是促进功能恢复有效的方法, 其对缺血性脑梗死大鼠的感觉、运动、行为能力方面的改善有明显疗效^[1-2]; 缺血后丰富的生活环境也对脑缺血大鼠功能的改善有着积极的影响^[3]。在康复治疗时机的选择上, 有研究表明, 早期适量的康复训练对脑卒中患者各项功能的改善有益^[4], 而完全制动患肢阻碍了脑缺血大鼠与运动功能恢复相关皮层代表区的可塑性变化^[5]。

为了寻求更有效的康复训练方法及观察其长期疗效, 我们对大脑中动脉阻断的脑缺血大鼠损伤后早期进行丰富康复训练和丰富生活环境相结合的康复训练, 在不同时期进行感觉、运动及神经功能评估, 观察其恢复状况, 并在治疗结束后对其大脑皮层前肢运动代表区第 V 层锥体神经元树突可塑性进行观察。

1 材料和方法

1.1 实验动物及造模前预处理 雄性 Wistar 大鼠 32 只, 清洁级, 体重 180 ~ 200 g, 购自湖北省实验动物研究中心, 合格证号: 0037834。为使各组大鼠初始状态一致并具备一定的运动能力, 在造模前先对所有大鼠进行预处理: 造模前 1 周, 大鼠 3 ~ 4 只/笼群居于群居笼^[3] (550 × 350 × 200 mm), 造模前 4 d 开始进行转笼 (10 min/d) 和杂技 (2 次/d) 预训练。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30370357)。

作者单位: 武汉大学中南医院康复医学科, 武汉大学医学院脑血管病研究中心, 湖北武汉市 430071。作者简介: 程明高 (1980-), 男, 湖北应城市人, 硕士生, 医师, 主要研究方向: 神经康复。通讯作者: 廖维靖。

1.2 造模与分组 应用随机数字法,将大鼠随机分成缺血组和假手术组各 16 只,参照廖维靖等^[6]的造模方法,制作大脑中动脉阻断(MCAO)2 h 再灌注模型。造模后,缺血组随机分为训练组(IE 组)和独居组(IS 组),假手术组也随机分为训练组(SE 组)和独居组(SS 组),每组各 8 只。大鼠置于室温下饲养,自由饮水进食。饲养房以 12 h 为周期进行明暗交替,所有行为测试均在暗周期进行。

1.3 神经功能评分 采用 Bederson 方法^[7]进行肢体功能的神经缺损评分:0 分,无任何神经功能缺失;1 分,左前肢屈曲(即提尾悬空实验阳性);2 分,侧推抵抗力下降(即侧向推力实验阳性),伴前肢屈曲,无转圈行为;3 分,同 2 级行为,伴自发性旋转。评分 1~3 的动物列入缺血组。

1.4 丰富康复训练 丰富康复训练包括丰富环境和各种运动训练。丰富环境笼设备参照文献描述^[3,8]设置,笼内不同形状、颜色、材料的物品定时进行更换,并重新摆放物品位置,改变升降板的高度,2 次/周,术后 24 h 到 4 周,IE 和 SE 组大鼠始终居于丰富环境笼,IS 和 SS 组大鼠则居于标准独居笼。

运动训练分简单运动和复杂运动,包括转笼、转棒、杂技训练,设备制参照文献描述^[1,8-10]。转笼为简单运动,术后 2 d 开始到 2 周,10 min/d,5 次/周。转棒和杂技训练为复杂运动。转棒于术后 2 d 开始,10 min/d,5 次/周。杂技任务训练,术后 2~4 d 在实验者的帮助下让大鼠适应此训练过程,然后按训练计划,4/d(第 5~13 天),后改为 2/d(第 14~28 天)。

1.5 神经行为功能测试 分别于术后 24 h、1 周、2 周、3 周、4 周进行。测试项目如下。

1.5.1 Bederson 神经功能评分 进行,方法同上。

1.5.2 肢体放置测试 按照文献^[6,11]所述方法进行肢体放置测试,评分标准:0 分,无放置;1 分,放置不完全或延迟(>2 s);2 分,立即正确放置。以损伤侧(左侧)肢体表现记分,所有各项测试评分之和最大值为 16 分。

1.5.3 足失误测试 设备为杂技训练所用之网格平台,设备参照文献^[6,8-9]所述,将大鼠放在平台上 2 min,使其在平台上活动,记录肢体踏空次数。

1.6 神经元树突染色 使用 Glaser 等^[12]的 Golgi-Cox 液配制方法,溶液现配现用。各组动物于最后一次行为测试完成后,用生理盐水及 4%冰多聚甲醛磷酸盐缓冲液经心脏灌注固定,断头取脑,置于 20 ml

Golgi-Cox 溶液中,37℃避光保存。14 d 后置于 30%蔗糖溶液,浸泡 2~5 d 以增加其韧性。每组大鼠随机挑选出 6 个脑标本切片染色。根据包新民^[13]的方法定义前囟位置,并以前囟为起点向前作冠状切片,片厚 2.0 mm,在振动切片机上行 200 μm 厚连续切片,每个脑标本挑选位于中间的 6 张,根据 Gibb 等^[14]所述方法进行 Golgi-Cox 染色。封片、干燥。

1.7 图像分析 以缺血对侧大脑皮层前肢运动代表区(约从前囟到距前囟+2.0 mm 皮层)^[12]第 V 层锥体细胞为观察对象。用高清晰度彩色病理图文分析仪选定要观察的锥体细胞。被选择观察的细胞须要满足以下标准^[15]:①锥体细胞需被充分染色,且不被染色沉淀物、血管、胶质细胞或其他细胞的突起遮挡;②锥体细胞必须接近位于切片厚度的中部,以使其突起在切片平面上清晰可见。采用画线法画出其胞体形态及基树突(250×),每例动物画出 10 个锥体细胞的基树突,计数单个锥体细胞基树突分支点数。

1.8 统计学方法 所得数据以($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 11.5,两两比较进行 *t* 检验,组间比较用方差分析, $P < 0.05$ 表示有显著性差异。

2 结果

2.1 神经行为学评价

2.1.1 Bederson 神经功能评定 IE 组与 IS 组在 2~4 周始终有非常显著性差异($P < 0.01$);SE 组和 SS 组在 24 h、1~4 周评分均为 0 分。见图 1。

2.1.2 肢体放置测试 术后 2 周,IE 组评分高于 IS 组($P < 0.05$);术后 3、4 周均明显高于 IS 组($P < 0.01$),在这 2 个时间点,IE 组与 SS 组和 SE 组无显著性差异。IS 组在各时间点的评分均明显低于 SS 组和 SE 组($P < 0.01$),IE 组在 24 h、1 周、2 周也低于 SS 组和 SE 组($P < 0.01$)。见图 2。

2.1.3 足失误测试 自术后 1 周起,IE 组足失误得分明显低于 IS 组($P < 0.01$),IE 组得分在术后 24 h、1 周、2 周、3 周明显高于 SS 组和 SE 组($P < 0.01$),到术后 4 周时无显著性差异。IS 组在各时间点均高于 SS 组和 SE 组($P < 0.01$)。见图 3。

2.2 Golgi-Cox 染色图像分析 观察指标为树突分支点数,即除胞体外,树突发出分支的点。图像分析结果提示,IE 组树突分支点数比其他 3 个组有明显增加($P < 0.01$);IS 组树突分支点数比 SS 组有明显增加($P < 0.01$)。见图 4 封三彩图 1.1~1.4。

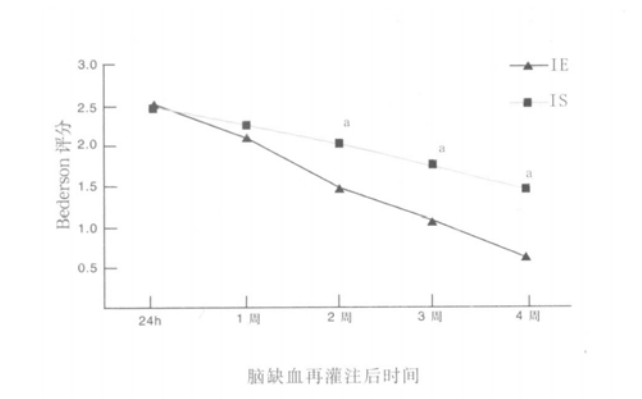


图 1 IE 组和 IS 组各时间点 Bederson 分数的比较。

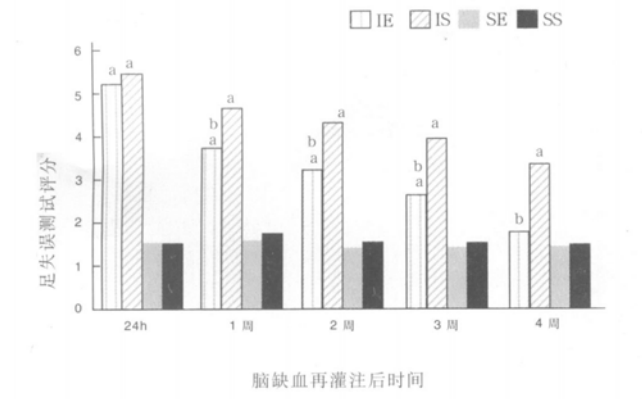
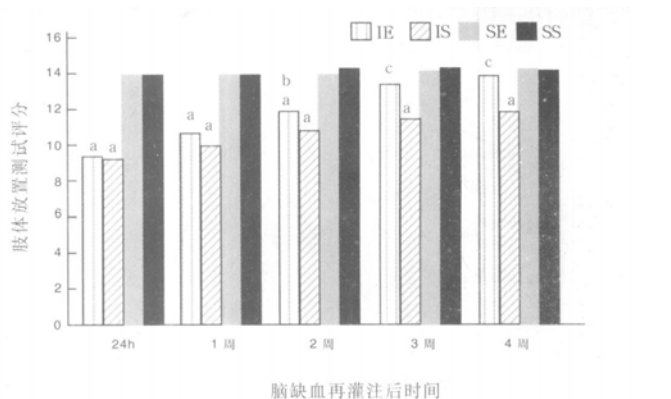


图 3 各组各时间点足失误测试的比较

3 讨论

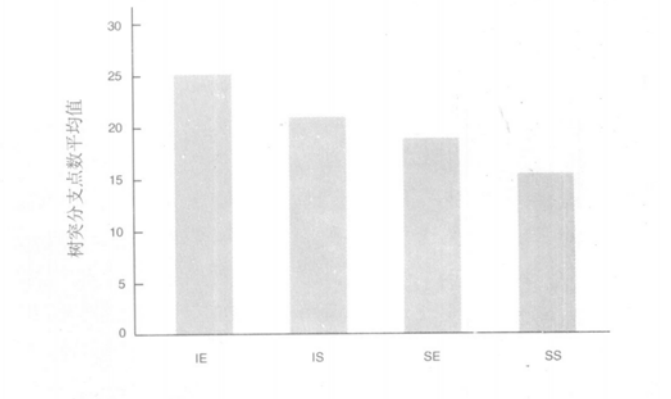
近年来,康复训练在脑损伤恢复机制研究中有了
一定进展,康复训练的时机、方式、环境等与康复功能
恢复的关系已得到较多研究。寻求各种促进脑损伤后
功能恢复的有利因素,是目前研究的重点。多项研究
显示,丰富环境^[3,16]、运动训练^[1-2]、适当的康复治疗时
机都是促进恢复的积极因素^[4,17-18]。丰富康复训练正
是将以上几种积极因素结合了起来。本实验主要观察
大鼠脑缺血 24 h 后,IE 组和 SE 组饲养于丰富环境笼,
给予跑笼、转棒、杂技等运动训练,并与 IS 组和 SS 组
在不同时期比较感觉、运动及神经功能的变化。丰富
训练组在第 1 周的训练安排上以适应性为主,从小的
运动量逐渐过渡到正常的运动量。从第 2 周开始按实
验安排以计划运动量进行训练,训练的原则是以不使
动物疲劳为度。有研究显示,如果在损伤早期患肢承
担了过多的运动负荷,则反而会加重损伤^[18]。

我们采用 Bederson 神经功能缺损评分标准,肢体



a:与 SS 组和 SE 组比较, $P < 0.01$; b:与 IS 组比较, $P < 0.05$; c:与 IS 组比较, $P < 0.01$ 。

图 2 各组各时间点肢体放置测试的比较



IE 组比其他 3 组有明显增加($P < 0.01$); IS 组比 SS 组有明显增加($P < 0.01$)。

图 4 各组树突分支数比较

放置测试和足失误测试评分方法,对术后 24 h 各组动
物行为功能进行评分,发现假手术组 Bederson 评分均
为 0 分,说明假手术对本实验所研究的大鼠神经行为
功能没有影响;IE 组与 IS 组 Bederson 评分、肢体放置
测试和足失误测试无显著性差异($P > 0.05$),提示缺血
受损程度一致。本实验采用 Bederson 神经功能评估
和肢体放置测试来反映大鼠脑缺血康复训练后神经行
为方面的改变,发现 Bederson 评分 IE 组与 IS 组在术
后 2 ~ 4 周相比均有非常显著性差异($P < 0.01$),肢体
放置测试 IE 组与 IS 组在 2 周时有显著性差异($P <$
0.05),在 3 ~ 4 周时有非常显著性差异($P < 0.01$),且
IE 组与假手术组相比,肢体放置测试评分 3 周时无显
著性差异。说明经过丰富康复训练,IE 组比 IS 组神经
行为方面恢复更明显。足失误测试能反映脑缺血大鼠
协调与综合运动能力的改变,IE 组在 1 ~ 4 周与 IS 相
比均有非常显著性差异($P < 0.01$),与假手术组相比在
第 4 周时无显著性差异,说明训练后大鼠的协调、综合

运动能力已有显著改善。从以上测试结果可以看出,丰富康复训练促进了缺血再灌注脑损伤大鼠各项功能的恢复。

脑结构可塑性改变是脑损伤后功能恢复的基础。作为神经可塑性的一个重要方面,神经发生(neurogenesis)在脑损伤患者的功能恢复中发挥着重要作用。神经发生包括轴突再生和树突分支生长。由于树突分支的增加可以提供更多表面进行突触发生,重建轴-树连接,因此树突分支的增加是神经发生的重要组成部分^[19]。本研究中,训练 28 d 后对大鼠损伤对侧大脑皮层前肢运动代表区第 V 层锥体神经元树突生长情况进行观察,发现树突分支数各组比较 IE 组比 IS 组增加($P < 0.01$),IS 组与 SS 组相比有非常显著性差异($P < 0.01$),SE 组与 SS 组相比也有明显增加($P < 0.01$)。IE 组与 IS 组相比树突分支的增多,说明丰富康复训练明显地促进了缺血再灌注脑损伤大鼠的树突生长;IS 组与 SS 组相比树突分支的增多,说明缺血也是促进树突生长的一个刺激因素;SE 组与 SS 组相比树突分支明显增加,说明丰富康复训练也是促进正常大鼠树突生长的一个积极因素。

在本研究中,丰富康复训练促进了大鼠缺血再灌注脑损伤后功能的恢复,并加强了损伤对侧大脑皮层神经元的可塑性改变,以上作用可能是多种积极因素综合作用的结果。大脑皮层缺血或局灶性、创伤性损伤可作为一种刺激引起大量神经元及胶质细胞的结构和功能发生变化,引起一定的自发性功能恢复;运动训练可加强这种可塑性改变和功能的恢复^[8]。研究显示,简单运动方式如跑笼仅可促进脑血管生成^[20],而复杂技巧训练如转棒和杂技(acrobatic task)可增加脑皮层突触数量^[21]。丰富生存环境能使缺血损伤大鼠有更多机会参与各种活动以及与其他大鼠接触,并且促进一些神经营养因子^[3,22]的表达,从而改善缺血大鼠的结局。缺血损伤大鼠神经可塑性的敏感期是损伤后的早期阶段,本研究中康复训练正是选择了在可塑性较强的缺血早期开始。

综上所述,丰富康复训练确实能促进缺血再灌注脑损伤大鼠功能的恢复,并加强大脑皮层功能相关皮层的可塑性改变。丰富康复训练的作用可能是多种积极因素综合作用的结果,关于这几种因素相互间的影响,及各种因素对大鼠功能改善贡献的大小还需要进一步的研究。

[参考文献]

- [1]徐莉,李玲,陈景藻,等.康复训练对大鼠脑梗死神经功能恢复的影响[J].中华物理医学与康复杂志,2000,22(2):86-88.
- [2]Biernaskie J, Corbett D. Enriched rehabilitative training promotes improved forelimb motor function and enhanced dendritic growth after focal ischemic injury[J]. J Neurosci, 2001, 21(14): 5272 -

5280.

- [3]Dahlqvist P, Ronnback A, Risedal A, et al. Effects of postischemic environment on transcription factor and serotonin receptor expression after permanent focal cortical ischemia in rats[J]. Neurosci, 2003, 119(3): 643 - 652.
- [4]袁涛,陈眉,洪雪琴,等.早期康复训练对脑卒中患者各项功能恢复的影响[J].浙江实用医学,2004,9(6):414-415.
- [5]Taub E, Uswatte G, Elbert T. New treatments in neurorehabilitation founded on basic research[J]. Nature Reviews Neuroscience, 2002,3(3):228-236.
- [6]廖维靖,刘淑红,范明,等.线栓阻断大鼠大脑中动脉制作缺血性脑损伤模型的改良[J].中华物理医学与康复杂志,2002,24(6):349-352.
- [7]Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, et al. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination[J]. Stroke, 1986, 17(3): 472 - 476.
- [8]江城,廖维靖,杨万同,等.丰富康复训练对脑缺血大鼠行为功能表现影响的实验研究[J].中国康复医学杂志,2006,21(3):200-204.
- [9]蒙兰青,廖维靖,杨万同,等.运动训练对大鼠脑缺血损伤后功能恢复及 VEGF 表达影响的实验研究[J].中国康复医学杂志,2006,21(3):197-199.
- [10]Jones TA, Chu CJ, Grande LA, et al. Motor skills training enhances lesion-induced structural plasticity in the motor cortex of adult rats[J]. J Neurosci, 1999, 19(22): 10153 - 10163.
- [11]Ohlsson AL, Johansson BB. Environment influences functional outcome of cerebral infarction in rats[J]. Stroke, 1995, 26(4): 644 - 649.
- [12]Glaser EM, van der Loos H. Analysis of thick brain sections by obverse computer microscopy: application of a new, high clarity Golgi-Nissl stain[J]. J Neurosci Methods, 1981, 4: 117 - 125.
- [13]包新民,舒斯云.大鼠脑立体定位图谱[M].北京:人民卫生出版社,1991.
- [14]Gibb R, Kolb B. A method for vibratome sectioning of Golgi-Cox stained whole rat brain[J]. J Neurosci Methods, 1998, 79(1): 1 - 4.
- [15]Kolb B, Ladowski R, Gibb R, et al. Does dendritic growth underly recovery from neonatal occipital lesions in rats[J]. Behav Brain Res, 1996, 77: 125 - 133.
- [16]Briones TL, Suh E, Jozsa L, et al. Behaviorally-induced ultrastructural plasticity in the hippocampal region after cerebral ischemia[J]. Brain Res, 2004, 997(2): 137 - 146.
- [17]Jones TA, Schallert T. Use-dependent growth of pyramidal neurons after neocortical damage[J]. J Neurosci, 1994, 14(4): 2140 - 2152.
- [18]Kozlowski DA, James DC, Schallert T. Use-dependent exaggeration of neuronal injury after unilateral sensorimotor cortex lesions[J]. J Neurosci, 1996, 16(5): 4776 - 4786.
- [19]Stroemer RP, Kent TA, Hulsebosch CE. Neocortical neural sprouting, synaptogenesis, and behavioral recovery after neocortical infarction in rats[J]. Stroke, 1995, 26(11): 2135 - 2144.
- [20]Black JE, Isaacs KR, Anderson BJ, et al. Learning causes synaptogenesis, whereas motor activity causes angiogenesis in cerebral cortex of adult rat[J]. Proc Natl Acad Sci, 1990, 87: 5568 - 5572.
- [21]Greenough WT, Anderson BJ. Cerebellar synaptic plasticity relation to learning versus neural activity[J]. Ann NY Acad Sci, 1991, 627(3): 231 - 247.
- [22]Rowntree S, Kolb B. Blockade of basic fibroblast growth factor retards recovery from motor cortex injury in rats[J]. Eur J Neurosci, 1997, 9: 2432 - 2441.

(收稿日期:2006-02-06)

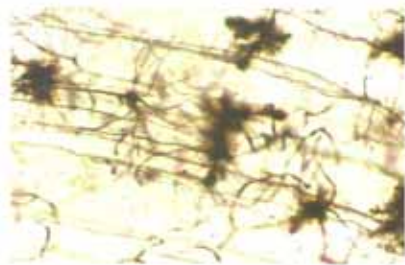


图 1.1 IE 锥体神经元(Golgi-cox 染色)

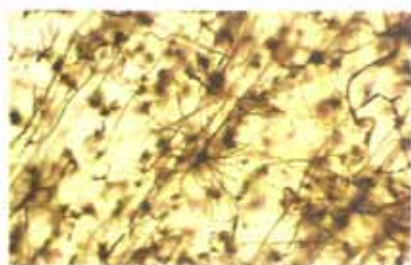


图 1.2 IS 锥体神经元(Golgi-cox 染色)

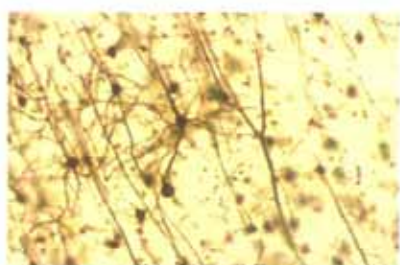


图 1.3 SE 锥体神经元(Golgi-cox 染色)

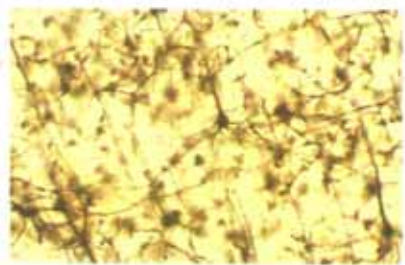


图 1.4 SS 锥体神经元(Golgi-cox 染色)

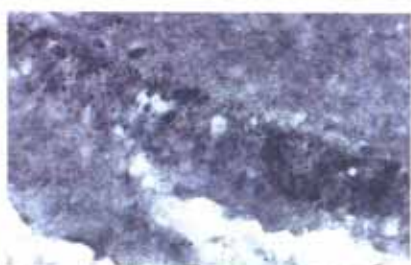


图 2.1 正常大鼠海马 DG 区 NGF 的表达
(ABC, 400 ×)



图 2.2 康复 7d 梗死侧 DG 区 NGF 的表达
(ABC, 400 ×)