

运动疗法对缺血脑组织大鼠 BDNF 的影响

李婧^{1,2}, 邹东华², 徐丙超³, 陈莉⁴, 季兴², 董万利¹

1. 苏州大学附属第一医院, 江苏 苏州 215006
2. 中国人民解放军第 303 医院, 广西 南宁 530021
3. 连云港市第一人民医院, 江苏 连云港 222000
4. 广西医科大学第一附属医院, 广西 南宁 530022

[摘要] 目的: 探讨运动疗法对大鼠缺血脑组织的脑源性神经营养因子 (BDNF) 的影响。方法: 采取 Zea-Longa 线栓法复制大鼠中动脉缺血模型 (MCAO), 成功造模 48 只大鼠, 采取随机数字表法将入组的大鼠分为运动组和对照组, 各 24 只。运动组给予水迷宫训练和滚笼训练, 对照组限制行动。2 组大鼠分别进行再分组, 分为第 1 天、第 7 天、第 14 天三个亚组, 每个亚组 8 只, 分别于造模后第 1 天、第 7 天、第 14 天每组取 3 只测量脑组织梗死面积百分率, 取 5 只测量 BDNF 的阳性表达。结果: 在第 7 天和第 14 天, 运动组脑梗死面积百分率均低于对照组, BDNF 的表达明显高于对照组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。运动组中, 第 14 天的脑梗死面积百分率明显低于第 7 天, 第 14 天 BDNF 的表达高于第 7 天, 第 7 天 BDNF 的表达高于第 1 天, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。对照组中, 第 7 天 BDNF 的表达高于第 1 天, 第 14 天 BDNF 的表达高于第 7 天, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论: 运动疗法可以通过上调 BDNF, 起到控制脑缺血面积以及神经保护和修复作用, 对脑组织有一定保护作用。

[关键词] 运动疗法; 脑梗死; 脑源性神经营养因子 (BDNF); 大鼠; 动物实验

[中图分类号] R285.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2016) 12-0211-03

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2016.12.089

Effect of Exercise Therapy on BDNF of Rats with Cerebral Ischemia

LI Jing, ZOU Donghua, XU Bingchao, CHEN Li, JI Xing, DONG Wanli

Abstract: Objective: To discuss the effect of exercise therapy on brain-derived neurotrophic factor (BDNF) of rats with cerebral ischemia. Methods: Adopted suture-occluded method to duplicate middle cerebral artery occlusion (MCAO) model and successfully established 48 rat models. Divided rats into the exercise group and the control group, 24 rats in each group by applying the method of random number form. Rats in the exercise group were given water-maze training and rolling cage training while actions of rats in the control group were restricted. Divided rats in these two groups again into the first-day subgroup, the seventh-day subgroup and the fourteenth-day subgroup, three subgroups in total with 8 rats in each. On the first day, the seventh day and the fourteenth day after the establishment of rat model, selected three rats in each subgroup and determined their percentages of infarcted cerebral constitution area; selected three rats and determined their expression of BDNF. Results: On the seventh day and the fourteenth day, percentage of infarcted cerebral constitution area in the exercise group was lower than that in the control group, while its expression of BDNF was obviously higher than that of the control group ($P < 0.05$). In the exercise group, percentage of infarcted cerebral constitution area on the fourteenth day was significantly lower than that on the seventh day ($P < 0.05$). The expression of BDNF on the fourteenth day was higher than that on the seventh day, and the expression of BDNF on the seventh day was higher than that on the first day, the differences being significant ($P < 0.05$). In the control group, expression of BDNF on the seventh day was higher than that on the first day, and expression of BDNF on the fourteenth day was higher than that on the seventh day, showing significance of the differences ($P < 0.05$). Conclusion: Exercise therapy have an effect on controlling the infarcted cerebral constitution area as well as protecting and recovering nerves, which protects cerebral constitution.

Keywords: Exercise therapy; Cerebral infarction; Brain-derived neurotrophic factor (BDNF); Rats; Animal experiment

[收稿日期] 2016-07-12

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (81560205); 广西卫生厅医药卫生计划科研项目 (Z2012470, Z2012473); 广西自然科学基金项目 (2012GXNSFAA276028)

[作者简介] 李婧 (1981-), 女, 主治医师, 研究方向: 神经系统脱髓鞘、脑血管病。

[通讯作者] 董万利, E-mail: dwlsz8@163.com。

脑卒中(stroke)是由于脑血管梗死所引起的脑构造缺血缺氧,从而导致部分脑神经功能异常的一类疾病,临床主要表现为恶心吐逆、头痛、头晕、失语、肢体偏瘫、意识障碍等症状。缺血性脑损伤的病理机制是由细胞内外多因素、多物质介导的炎性细胞参与的神经元的坏死或凋亡。其中脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)在脑卒中的神经元修复中有重要作用,其作用机制是与特异性卵白受体激酶 B(TrkB)结合发挥高亲和营养作用。BDNF 主要分布于大脑皮质、基底节、海马、纹状体等胆碱能神经元中^[1]。脑源性神经营养因子(BDNF)可以保护缺血后神经元,改善神经元病理状态,促进受损神经再生及分化成熟^[2]。Sarrelainen 研究表明缺乏 BDNF 基因的大鼠较对照组脑梗死面积大,而提高内源性 BDNF 水平可减轻脑缺血后神经元的损伤程度,提示 BDNF 对神经元有一定保护作用^[3]。本研究探讨的是运动疗法后大鼠脑组织 BDNF 的表达,探讨其在大鼠缺血性脑损伤中的神经保护作用机制,为临床治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物 优选雄性 Wistar 大鼠 60 只,鼠龄 12~16 周,体重 280±20 g,由广西医科大学实验动物中心提供(合格证号:scxk 桂 2009 0002),室温控制在 25℃~28℃,适应性喂养 1 周,给普通饲料和自由饮水。实验过程中对动物的饲养、训练、手术及取材均遵循动物科学与管理的有关规定。

1.2 实验方法 模型参照 Zea-Longa 线栓法^[4],从而复制大脑中动脉缺血模型(MCAO)。大鼠用 10%的水合氯醛麻醉,暴露出左边颈总动脉和分叉部,分离动脉分叉处的颈内动脉和颈外动脉,并分别穿线备用。将渔线前端加热成直径为 235 mm,长度约为 5 cm 的圆形,用肝素浸泡后从剪口处插入,使渔线经颈总动脉分叉处进入颈内动脉,向头端深入至有阻力时,即阻断大脑中动脉入口处,结扎颈总动脉及剪口处,干净缝合伤口。术中大鼠呈现呼吸困难,屡次出现弃之。

1.3 实验分组 MCAO 造模成功,动物清醒后,进行行为学 5 分制评分^[5],1~3 分入组,入组成功 48 只。将造模成功的 48 只大鼠,采取随机数字表法分为运动组(24 只)和对照组(24 只)。运动组采用水迷宫和滚笼练习,对照组限制行动。2 组大鼠分别进行再分组,分为第 1 天、第 7 天、第 14 天三个亚组,每个亚组 8 只。分别于造模后第 1 天、第 7 天、第 14 天每组取 3 只测量脑组织梗死面积百分率,取 5 只测量 BDNF 的阳性表达率。

1.4 运动治疗 ①水迷宫练习:水迷宫为直径 150 cm、高 70 cm 的圆形水槽,内盛无毒乳白色溶液,液面距池壁上缘 24 cm。将一个高 44.5 cm、直径 8 cm 的白色站台随机放入池中某一象限内的固定位置,站台平面没于液面下 2~3 cm。训练时,将大鼠从另外 3 个象限随机放入池中,如果 3 min 后仍找不到站台,则人为将其放在站台上持续 15 s。每天练习 3

次,每次间歇 10 min。②滚笼练习:滚笼长 100 cm,直径 60 cm,内分 4 格,同时可以练习 4 只大鼠,按 5 r/min 转动,每天练习 10 min。

1.5 脑梗死面积百分率的测定 将每个亚组 3 只大鼠分别于第 1 天、第 7 天、第 14 天断头取大脑,并放入 -20℃冰箱速冻 30 min,将取出后的大脑切除嗅球以及小脑部分,将大脑平均切成 6 片,每片厚 2 mm,置于 0.4%的 2,4,5-三苯四氮唑(TTC)溶液中,37℃恒温 15~20 min。取出脑片后,在相同情况下拍照,用图像分析软件分析计算梗死面积的百分率。

1.6 免疫组化检测脑组织中的 BDNF 分别于造模后第 1 天、第 7 天、第 14 天每组取 5 只大鼠,用 10%水合氯醛麻醉,4%多聚甲醛进行心脏灌注固定,断头取脑,于梗死灶处冠状切去脑组织,常规脱水、石蜡包埋、切片。采取通例 SP 法(链霉素抗生素-过氧化物酶连接法)组织化学染色。①脱蜡:水化组织切片;②内源性过氧化物酶阻断剂 10 min;③滴加 BDNF 多克隆抗体(1:200),4℃过夜,0.01 mol/L PBS 冲洗 2 min,3 次;④滴加聚合物辅助剂,37℃孵育 20 min,0.01 mol/L PBS 冲洗 2 min,3 次;⑤滴加辣根酶标记羊抗兔/大鼠 IgG(1:500),37℃孵育 20~30 min,0.01 mol/L PBS 冲洗 2 min,3 次;⑥DBA 染色,光镜下观察监控染色反应 5~15 min;⑦予以蒸馏水重复冲洗,复染,脱水,封片。光镜下细胞质或者核膜上有棕色颗粒者为阳性细胞,于阳性细胞分布区随机选取 5 个不重复的高倍镜视野(400×),计算 BDNF 阳性细胞数。

1.7 统计学方法 所有结果采取 SPSS 17.0 统计软件进行处理,梗死面积采取 Mann-Whitney 法检测,BDNF 阳性细胞的比较采取单因素方差分析,计量资料均以($\bar{x} \pm s$)表示。

2 结果

2.1 各组大鼠脑梗死面积百分率结果比较 在第 7 天和第 14 天,运动组脑梗死面积百分率均低于对照组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。运动组中,第 14 天的脑梗死面积百分率明显低于第 7 天,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 1 各组大鼠脑梗死面积百分率结果比较 %

组别	n	1 d	7 d	14 d
对照组	3	8.87±3.12	9.12±4.22	8.15±2.34
运动组	3	8.98±3.01	7.21±2.14 ^①	6.13±3.01 ^{①②}

相同时间点,与对照组比较,① $P < 0.05$;同组内,与前一个时间点比较,② $P < 0.05$

2.2 各组大鼠免疫组化结果比较 在第 7 天和第 14 天,运动组 BDNF 的表达明显高于对照组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。对照组中,第 7 天 BDNF 的表达高于第 1 天,第 14 天 BDNF 的表达高于第 7 天,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。运动组中,第 7 天 BDNF 的表达高于第 1 天,第 14 天 BDNF 的

表达高于第 7 天, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

表 2 各组大鼠 BDNF 阳性细胞数结果比较 个/cm²

组别	n	1 d	7 d	14 d
对照组	5	26.87±9.34	56.87±14.32 ^②	88.15±12.29 ^②
运动组	5	24.67±8.21	78.91±12.24 ^{①②}	116.13±13.34 ^{①②}

相同时间点, 与对照组比较, ① $P < 0.05$; 同组内, 与前一时间点比较, ② $P < 0.05$

3 讨论

康复医学需要解决的问题主要是运动功能障碍, 目前运动疗法已成为康复治疗的主要治疗方法。康复训练增进受损神经功能恢复的研究日趋受到重视。运动疗法是指在专业医生的指导下通过特定的运动方式(主动或被动运动等), 使用器械、徒手或患者自身力量, 使全身或局部运动功能、感觉功能恢复的训练方法。运动疗法主要分为良肢体位摆放、被动运动、移动训练三类。良肢体位摆放和被动运动在发病当时即可进行, 移动训练应在患者神志清楚, 病情稳定时进行^[6]。Ding Y 等^[7]研究发现, 大脑中动脉栓塞再灌注的大鼠动物模型通过进行运动训练后, 可以明显减少纹状体神经元缺失和梗死范围, 同时, 大鼠大脑皮质以及纹状体的 BDNF 表达也有所增加。同时也有研究表明神经营养因子在运动训练后表达增强^[8]。本研究也证实运动训练可以促进大脑恢复、减少脑梗死面积, 促进 BDNF 的表达, 修复损伤脑组织, 与上述研究一致。

BDNF 在脑卒中可能的保护机制: ①可以稳定细胞内钙浓度; ②具有抗氧自由基的作用, 有研究表明 BDNF 可调节氧化物歧化酶(SOD)以及谷胱甘肽过氧化物酶(GSR-Px)在神经元细胞中的含量, 达到抗氧自由基, 保护神经元细胞的作用^[9]; ③有抗细胞凋亡作用。Han 等研究表明, 缺血缺氧导致新生鼠脑组织损伤, 激活 caspase-3 从而引发神经元凋亡, 而 BDNF 可以阻断 caspase-3 的激活, 抑制细胞凋亡^[10]; ④有神经元保护作用。BDNF 在中枢神经元中可能通过激活特定的信号传递途径或者通过逆转录因子结合 DNA 的活性, 来保护神经元细胞^[11]。本研究也表明通过运动训练, 可以使 BDNF 表达增加, 对脑组织有一定保护作用。BDNF 为蛋白类物质, 无法通过消化道给药, 也无法通过血脑屏障, 因此将 BDNF 直接应用到临床有一定困难性。运动疗法可以通过上调 BDNF, 起到控制脑缺血面积以及神经保护和修复作用, 对脑组织有一定保护作用。

[参考文献]

- [1] 宛丰, 吕衍文. 早期康复治疗对脑卒中后抑郁的疗效研究[J]. 卒中与神经疾病, 2012, 19(1): 53-54.
- [2] Michalsen AI, König G, Thimme W. Preventable

causative factor leading to hospital admission with decompensated heart failure [J]. Heart, 1998, 80(5): 437-441.

- [3] Sarrelainen T, Lukkarinen JA, Koponen S, et al. Transgenic mice overexpressing truncated trkb neurotrophin receptors in neurons show increased susceptibility to cortical injury after focal cerebral ischemia[J]. Mol Cell Neurosci, 2000, 16(2): 87-96.
- [4] 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.
- [5] 贾慧霞, 贾会荣. 谈心力衰竭患者的护理[J]. 中华医学写作杂志, 2000, 7(17): 64-65.
- [6] 中华医学会. 临床诊疗指南: 核医学分册[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006.
- [7] Ding Y, Li J, Luan X, et al. Exercise pre-conditioning reduces brain damage in ischemic rats that may be associated with regional angiogenesis and cellular overexpression of neurotrophin [J]. Neuroscience, 2004, 124(3): 583-591.
- [8] Ickes BR, Pham TM, Sanders LA, et al. Long-term environmental enrichment leads to regional increase in neurotrophin levels in rat brain[J]. Exp Neurol, 2000, 164(1): 45-52.
- [9] Ikeda O, Murakami M, Ino H, et al. Effects of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) on compression-induced spinal cord injury: BDNF attenuates down-regulation of superoxide dismutase expression and promotes up-regulation of myelin basic protein expression[J]. J Neuropathol Exp Neurol, 2002, 61(2): 142-153.
- [10] Han BH, D Costa A, Back SA, et al. BDNF blocks caspase-3 activation in neonatal hypoxia-ischemia[J]. Neurobiol Dis, 2000, 7(1): 38-53.
- [11] Skaper SD, Floreani M, Negro A, et al. Neurotrophins rescue cerebellar granule neurons from oxidative stress-mediated apoptotic death: selective involvement of phosphatidylinositol 3-kinase and the mitogen-activated protein kinase pathway [J]. J Neurochem, 1998, 70(5): 1859-1868.

(责任编辑: 冯天保, 郑锋玲)