文章编号:2095 - 1116(2012)04 - 0340 - 05

·基础医学·

康复训练对脑出血大鼠室管膜下区 NSCs 增殖与分化的影响

谢 明, 邬力祥, 黄福胜
(中南大学基础医学院生理学教研室,湖南 长沙 410001)

摘 要: 目的 探讨康复训练对大鼠脑出血后室管膜下区(SVZ)神经干细胞(NSCs)增殖和分化的影响。 **方法** 75 只 SD 大鼠随机分为康复组、制动组和假手术组(每组 25 只),康复组和制动组用胶原酶诱导脑出血模型,假手术组用生理盐水替代胶原酶。康复组每天予以抓握、平衡、旋转等训练,制动组置于网状笼内固定,假手术组在笼内自由活动。每组大鼠康复前后进行神经功能评分,分别于康复训练后 1、4、7、14 和 28 天处死动物。应用免疫组织化学方法检测大鼠 SVZ 神经细胞巢蛋白(Nestin)和 5-溴脱氧尿核苷(BrdU)表达的变化。 **结果** 康复组神经功能缺损评分低于制动组($P < 0.05$)。康复组大鼠 SVZ BrdU 阳性、Nestin 阳性细胞在不同时间点均多于制动组大鼠($P < 0.05$),第 7 天康复组 SVZ BrdU 阳性、Nestin 阳性细胞表达达到高峰,14 天时表达逐渐减少($P < 0.05$, $P < 0.01$)。 **结论** 康复训练可促进脑出血后大鼠 NSCs 增殖,并向神经元分化。

关键词: 康复训练; 脑出血; 神经干细胞; 5-溴脱氧尿核苷; 巢蛋白
中图分类号:R338.2 **文献标识码:**A

Effects of Rehabilitationtraining on the Neural Stem Cells Proliferation and Differentiation in SVZ of Rats With Intracerebral Hemorrhage Stroke

XIE Ming, WU Lixiang, HUANG Fusheng
(*Department of Physiology, Basic Medical College, Central South University, Changsha, Hunan* 410001, *China*)

Abstract: Objective To investigate the influence on the neural stem cell proliferation and differentiation by rehabilitation training after the rat suffering cerebral hemorrhage. **Methods** 75 SD rats were randomly divided into rehabilitation group, braking group and sham-operation group (25 in each group), the rehabilitation group and the braking group had collagenase-induced intracerebral hemorrhage, the sham-operation group had normal saline instead of collagenase. The rats of rehabilitation group had the daily training of grasping, balance, rotation and so on, the braking group rats were arranged in the mesh cage, then the neurological function was scored before and after the rats of each group making their recovery, later the animals were sacrificed respectively after the rehabilitation training of 1 day, 4 days, 7 days, 14 days, and 28 days. Immunohistochemistry is used to detect it and then the result is expressed by Nestin, BrdU. **Results** The neural function defect score of the rehabilitation group is lower than the braking group, the two groups have significant difference ($P < 0.05$); at different time the SVZ BrdU and Nestin cells of rehabilitation group are more than the braking group($P < 0.05$), at the first 7 days, in the rehabilitation group SVZ area BrdU, Nestin cells expression reached the peak, at 14d the expression gradually decreased. **Conclusions** Rehabilitation training can promote the proliferation of neural stem cells after cerebral hemorrhage, and the differentiation into neurons.

Key words: rehabilitation training; cerebralhemorrhage; neural stem cells; 5-bromodeoxyuridine; nestin

脑出血是临床常见疾病,通常会造成患者肢体功能障碍而影响日常生活能力,脑出血患者的死亡率非常高,大部分患者会遗留不同程度肢体功能障碍,临床上对脑出血患者早期进行康复训练治疗,对

收稿日期:2011 - 12 - 28
基金项目:湖南省教育厅基金(06C702).
通讯作者:邬力祥,电话:0731 - 88837567, E-mail: xieming1212@sohu.com.

促进其肢体功能障碍康复、提高生活质量、减少残疾具有非常重要的价值。动物试验表明功能活动康复训练对脑神经干细胞(neural stem cells,NSCs)增殖与分化具有重要的实际意义;早期(发病24 h后)进行康复训练可以抑制脑出血大鼠血肿体积增大及脑水肿增加,促进神经细胞增殖,并最终促进脑出血后大鼠的运动功能康复[1]。本研究采用胶原酶诱导大鼠脑出血模型,术后24 h开始对其进行康复训练,通过观察不同时间点神经功能缺损评分变化、神经干细胞增殖及分化等指标,探讨早期康复训练对大鼠脑出血后NSCs增殖及分化的影响。

1 材料与方法

1.1 动物与试剂

SD雄性大鼠(南华大学实验动物中心提供)75只,体重250~300 g。Ⅶ型胶原酶、5-溴脱氧尿核苷(5-bromodeoxyuridine, BrdU)原料试剂(Sigma公司),多克隆羊抗BrdU(Abcam公司),单克隆鼠抗神经细胞巢蛋白(Nestin公司)、免疫组织化学试剂盒(北京中衫金桥公司)。

1.2 动物模型的建立及分组

将75只大鼠分为康复组、制动组和假手术组,每组25只,根据观察时间每组又分为康复训练后1、4、7、14和28天5个时间点,每个时间点5只。

参照文献[2]方法建立动物模型,康复组和制动组大鼠用10%水合氯醛(300 mg/kg体重)腹腔注射麻醉,固定在鼠脑立体定位仪上,切开头部正中皮肤,分离骨膜,暴露颅骨。以前囟为原点,向后1.4 mm,向右3.2 mm,在颅骨表面钻一小孔,微量进样器进入脑内5.6 mm,将无菌生理盐水稀释的2 μL Ⅶ型胶原酶(含Ⅶ型胶原酶0.4 U)缓慢注入苍白球内,并留针5 min。Bederson评分[3]1~3分为建模成功。假手术组用生理盐水代替Ⅶ型胶原酶,过程同前。

1.3 康复训练方法

康复组大鼠脑出血后24 h即开始进行运动功能训练。①滚筒训练:采用自制滚筒式网状训练器材训练,训练器长100.0 cm,直径60.0 cm,中间分成2格,同时训练2只老鼠,底座有一固定架,一端有一手摇柄,5 r/min,10 min/次,2次/天。②转棒训练:转棒一根,长150.0 cm,直径4.5 cm;中点固定于3 r/min转动器上顺、逆时针交替转动,10 min/次,2次/天。③平衡木训练:平衡木长170.0 cm,宽2.0 cm,下有支架7.0 cm高,平放于地面让老鼠在上面爬行10 min/次,2次/天。

制动组大鼠置于长40 cm、直径6cm的网状笼内固定,在头端有一容器给予食物和水,四肢和身体处于固定状态。

假手术组大鼠正常饲养,自由饮水,在笼内自由活动。

1.4 动物行为学评分

所有大鼠康复训练后1、4、7、14和28天分别进行Bederson评分[3]。0分:无任何神经功能缺失;1分:提尾倒立时损伤对侧前肢屈曲;2分:在提尾倒立时前肢屈曲基础上,损伤对侧肢体对外侧推力的抵抗力下降;3分:2分基础上伴行走时明显向对侧转圈。

1.5 BrdU标记

所有动物在处死前1天腹腔注射BrdU,按50 mg/kg体重,1次/2 h,共4次,最后1次注射后24 h处死。

1.6 组织切片制备

经大鼠腹腔以10%水合氯醛(300 mg/kg体重)深度麻醉后,取剑突下横切口,依次剪开胸部皮肤和肋骨,暴露心脏,在心尖左缘以45°~60°向上进针,插入升主动脉(同时钳夹腹主动脉),迅速灌入37℃生理盐水100 mL,再用4%多聚甲醛250 mL灌入,先在5 min内灌入约100 mL,余液在25 min内灌完。取含嗅球的全脑、去小脑,放入4%多聚甲醛4℃后固定1 h。陆续加入10%、20%、30%蔗糖溶液(0.1 mol/L PB,pH7.4,4℃)至沉底。入恒冷切片机行连续冠状切片,片厚30 μm,按每隔3片取1片的原则收集脑组织切片,裱于经明胶处理后的载玻片上,风干后置于玻片盒中冻存于-70℃冰箱中备用。

1.7 免疫组织化学染色

按试剂盒使用说明书进行免疫组织化学染色。

1.8 统计学分析

实验数据均用$\bar{x} \pm s$表示,采用SPSS13.0版软件进行统计分析。组间比较采用方差分析,$P < 0.05$为差异有显著性。

2 结 果

2.1 各组大鼠神经功能缺损评分的比较

从表1可见,脑出血后1天,康复组Bederson评

分与制动组比较,差异无显著性($P>0.05$);脑出血后4天和7天,康复组Bederson评分与制动组比较明显下降($P<0.05$)。脑出血后14天和28天,康复组Bederson评分与制动组比较,差异无显著性($P>0.05$)。

表1 各组大鼠Bederson神经功能评分比较(分)

Table 1 Comparing Bederson neurological score of every groups rats(score)

组 别	n	1天	4天	7天	14天	28天
假手术组	25	0	0	0	0	0
制动组	25	2.80±0.45	2.60±0.55	1.60±0.55[a]	0.40±0.55[a]	0[a]
康复组	25	2.60±0.65	1.40±0.55[ab]	0.40±0.55[ab]	0.20±0.45[a]	0[a]

a:与同组1天时比较,$P<0.05$,b:与制动组同期比较,$P<0.05$

2.2 各组BrdU、Nestin免疫阳性细胞数目的比较

从图1、图2和表2可见,脑出血后1天,康复组、制动组大鼠SVZ区均可见BrdU阳性细胞和Nestin阳性细胞,主要为圆形或椭圆形胞核的细胞,大小不一。新生的神经前体细胞由SVZ向纹状体受损区呈链状延伸,且少量BrdU阳性细胞和Nestin阳性细胞出现在纹状体。脑出血后,康复组和制动组大鼠血肿侧SVZ区BrdU阳性细胞、Nestin阳性细胞都明显增加,7天时数量达到高峰,14天时表达较前逐渐减少,至28天时仍比假手术组高($P<0.05$)。虽然康复组与制动组大鼠各阳性细胞数量变化的规律是一样的,但在各时间点上康复组大鼠阳性细胞数均比制动组大鼠要高($P<0.05$)。两组大鼠血肿对侧SVZ区也有BrdU阳性细胞和Nestin阳性细胞增多,数量最多时也是在出血后7天,但相应时间组BrdU阳性细胞、Nestin阳性细胞的数量明显少于血肿侧;而且康复组大鼠各时间点BrdU阳性细胞、Nestin阳性细胞也明显多于制动组大鼠。

表2 各组大鼠脑出血后出血侧SVZ区BrdU阳性细胞、Nestin阳性细胞数(个/mm²)的比较($n=25$)

Table 2 SVZ BrdU positive cells and nestin positive cells(/mm²) change in bleeding side after intracerebral hemorrhage in each group($n=25$)

组 别	细胞	1天	4天	7天	14天	28天
假手术组	BrdU	54.6±7.5	56.7±5.9	64.2±6.3	57.3±6.0	52.2±5.7
	Nestin	24.4±2.1	23.8±2.4	51.5±4.8	48.2±5.2	45.3±4.3
制动组	BrdU	102.2±3.3[a]	143.0±5.4	257.6±35.5	169.0±39.3	124.5±14.1
	Nestin	32.3±3.2[a]	42.6±5.1	56.5±4.8	43.8±4.6	34.4±3.3
康复组	BrdU	104.2±4.3	321.0±35.0[cb]	627.0±25.9[cb]	293.3±32.1[cb]	178.0±14.4[b]
	Nestin	33.1±2.9	65.6±6.4[cb]	112.3±13.6[cb]	60.3±6.8[cb]	50.4±4.9[cb]

a:与假手术组比较,$P<0.05$,b:与假手术组比较,$P<0.01$;c:与制动组比较,$P<0.01$

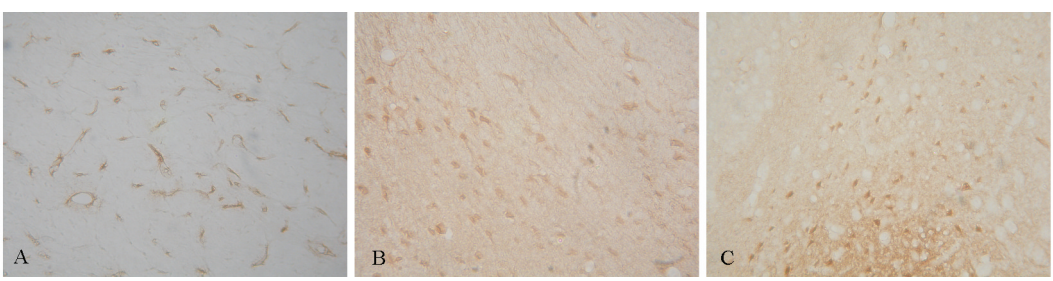

图1 大鼠脑出血后SVZ区BrdU阳性细胞(×200) A:假手术组;B:制动组第7天;C:康复组第7天

Figure 1 SVZ BrdU positive cells after intracerebral hemorrhage in each group (×200)

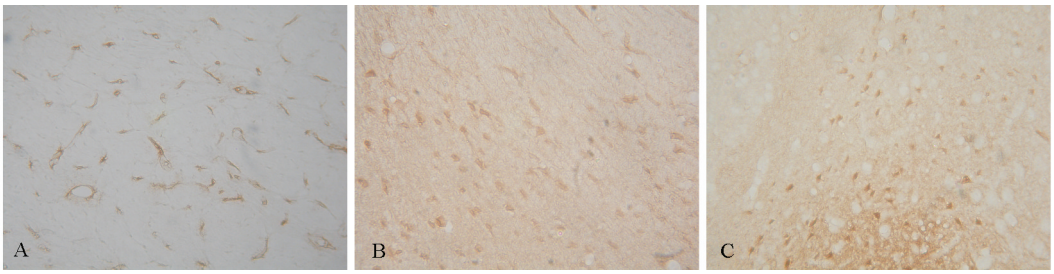

图 2 大鼠脑出血后 SVZ 区 Nestin 阳性细胞(×200) A:假手术组;B:制动组第 7 天;C:康复组第 7 天

Figure 2 SVZ Nestin positive cells after intracerebral hemorrhage in each group(×200)

3 讨 论

脑出血会导致大量神经细胞死亡而出现神经功能的缺失。神经再生是指脑内 SVZ/海马颗粒下层(subgranularlayerzone,SGZ)等区域的 NSCs 在适当条件下增殖、分化成神经元和胶质细胞,并迁移到脑损伤区而参与神经功能修复的过程。

NSCs 的增殖、迁移和活化是目前关于 NSCs 的研究热点。在哺乳动物胚胎期,NSCs 主要分布于大脑的皮层、纹状体、海马、室管膜下层和中脑等区域。在正常哺乳动物成年后,仍有 NSCs 存在于中枢神经系统内,只不过一般处于静止状态。成年脑区 NSCs 主要局限在海马齿状回、纹状体和环绕侧脑室的室脑膜下层部位[4]。

至今 NSCs 的特异性标志物还未被发现。1990 年有研究发现,NSCs 的标志蛋白是神经上皮干细胞蛋白(Nestin)[5]。Nestin 在神经胚形成时开始表达,随着神经细胞分化的完成,Nestin 的表达量逐渐下降甚至完全停止。目前,Nestin 已被广泛用于 NSCs 的鉴定。

脑出血大鼠中枢神经系内 Nestin 阳性细胞的空间分布主要分布于 3 个部位:一个为血肿周围的基底节区,阳性细胞围绕血肿,勾勒出其大致轮廓,细胞片状分布,向周围呈辐射状展开;另一个为患侧的室管膜及相邻的 SVZ 区域,其中室管膜的细胞染色最深,SVZ 的染色较浅;第三个部位是大脑腹侧的弓状核附近;患侧扣带皮质偶有分布。本研究表明,脑出血后的康复训练可提高脑内相关区域 nestin 阳性细胞的表达水平,说明康复训练可促进 NSCs 的生成,从而促进脑出血后神经功能的恢复,从理论上揭示了康复训练的作用机制。

BrdU 也是目前检测细胞增殖的较理想方法之一[6],主要在神经元前体细胞迁移过程中表达,是迁移的未成熟神经元或神经元前体细胞的标记物[7],NeuN 是一种核周的神经元特异性蛋白,作为一种稳定而敏感的成熟神经元的特异抗原。本研究显示,脑出血后,康复组和制动组大鼠血肿侧 SVZ 区 BrdU 阳性性细胞都明显增加,康复训练后 4、7、14 天康复组与制动组比较明显降低。由此推测,脑出血损伤能激活成年大鼠内源性 NSCs,与以往局灶性脑缺血损伤相似[8],而康复训练可以促进脑出血大鼠脑内内源性 NSCs 的增殖。但是从理论上来说,仅仅有 NSCs 的增殖并不能解决脑出血后神经功能恢复的根本问题,因为这种增殖的 NSCs 是否能向病灶区迁移且定向分化为成熟的有功能的神经元,并能与宿主神经细胞整合成完整的神经网络,是关键中的关键。这也解释了为什么脑出血损伤后虽然都发现自发的 NSCs 的增殖、分化,但仍存在因脑神经元缺失而出现的不同程度神经功能障碍的表现[9]。所以,下一步的研究重点将是康复训练对脑出血后 NSCs 分化方向的影响以及是否成为与宿主细胞整合的成熟的功能神经元。

本研究表明,脑出血后存在神经元再生,康复训练可促进神经再生及促进新生 NSCs 向脑出血受损区域迁移、并分化为神经元细胞。该研究也进一步解释了临床康复治疗的作用机制,按照大鼠 - 食肉动物 - 灵长类 - 人的顺序,皮质脊髓束逐渐变大,进而控制了红核脊髓束,所以,实验中当选择性损毁一条运动通路时,其功能可由另一条运动通路代偿,在人类,损伤皮质脊髓束时也不可避免地损伤红核脊髓束,这就说明了脑卒中的病人为什么恢复缓慢而不完全,但大鼠的恢复明显快于人类[10]。

参考文献:

[1] Park JW, Bang MS, Kwon BS, et al. Early treadmill

training promotes motor function after hemorrhagic stroke in rats [J]. Neurosci Lett, 2010, 471(2):104-108.

[2] 张花先,黎杏群,梁清华,等. 采用 VII 型胶原酶建立出血性中风中经络大鼠模型[J]. 湖南中医学院学报, 2004, 24(3):1-3.

[3] Machado LS, Sazonova IY, Kozak A, et al. Minocycline and tissue-type plasminogen activator for stroke: assessment of interaction potential[J]. Stroke, 2009, 40(9): 3028-3033.

[4] Hsieh J, Gage FH. Epigenetic control of neural stem cell fate[J]. Curr Opin Genet Dev, 2004(14):461-469.

[5] Holmin S, Almqvist P, Lendahl U, et al. Adult Nestin expressing subependymal cells differentiate to astroeytes in response to brain injury[J]. Eur J Neurosci, 1997, 9(1):65-75.

[6] Yu F, Keinan A, Chen H, et al. Detecting natural selection by empirical comparison to random regions of the genome[J]. Hum Mol Genet, 2009, 18(24): 4853-4867.

[7] Zhang C, Chopp M, Cui Y, et al. Cerebrolysin enhances neurogenesis in the ischemic brain and improves functional outcome after stroke[J]. Neurosci Res J, 2010, 88(15):3275-3281.

[8] Ninomiya M, Yamashita T, Araki N, et al. Enhanced neurogenesis in the ischemic striatum following EGF-induced expansion of transit-amplifying cells in the subventricular zone[J]. Neurosci Lett, 2006, 403(1-2): 63-67.

[9] Miller RH. The promise of stem cells for neural repair [J]. Brain Res, 2006, 1091(1): 258-264.

[10] 茹立强,殷光甫,王才源. 神经科学基础[M]. 北京:清华大学出版社, 2004. 203-204.

2012′全国支原体、衣原体及其它特殊病原体学术研讨会征文通知

支原体、衣原体、螺旋体、立克次体、动物源性细菌(布鲁菌、耶尔森菌、炭疽杆菌、柯克斯体、巴尔通体、弗朗西斯菌、巴斯德菌)、L 型细菌、放线菌与诺卡菌及其他病原菌等简称“特殊病原体”。近年来,由于特殊病原体相关毒力的变迁和耐药性的增加,以及社会人口老龄化等原因,支原体、衣原体等特殊病原体的防控研究面临着许多新的课题和挑战。为了交流本领域国内外最新研究进展,促进我国相关学科建设和发展与国际接轨,中华医学会微生物学与免疫学分会定于 2012 年 11 月 16 ~ 18 日在湖南衡阳召开《2012′全国支原体、衣原体及其它特殊病原体学术研讨会》。届时将邀请国内外知名专家作专题报告,同时欢迎从事相关科研、医疗、疾病预防与控制、临床检验等工作的同行踊跃投稿参会交流。现将征文相关事宜通知如下:

一、会议主题:支原体、衣原体及其它特殊病原体研究现状与展望。

二、征文内容:相关病原体研究论著、实验报告、技术与方法、文献综述等。

1. 相关病原体的功能基因组学与蛋白组学;
2. 相关病原体的致病性、致病机制与宿主的相互作用;
3. 相关病原体的病原学、分子流行病学;
4. 相关病原体诊断检验新技术、新方法及耐药监测与对策等。

三、征文要求:

1. 应征文稿应尚未在有关杂志上公开发表,也未在其他会议上交流,文责自负;
2. 应征摘要或全文均采用 WORD 文本,并参照“中华微生物学和免疫学杂志”出版格式编辑;
3. 应征稿件请务必于 2012 年 10 月 20 日前传至 tshbyt@126.com 电子信箱;
4. 为方便联系,来稿请注明作者单位和联系电话。

四、咨询电话:南华大学病原生物学研究所,李忠玉 13875688472。

五、其他事宜:本通知复印有效,有关会议的具体时间和地点等待后另行通知。

中华医学会学微生物学与免疫学分会

二〇一二年四月一日