

文章编号 1006-8147(2020)04-0324-05

论著

8周不同时间点有氧运动干预对脑卒中大鼠神经功能的影响

姜俐洋^{1,2}, 史昱¹, 黄传¹, 苏悦¹, 万春晓¹

(1. 天津医科大学总医院康复医学科, 天津 300052; 2. 天津市海河医院康复医学科, 天津 300350)

摘要 目的:探究脑卒中后不同时间点有氧运动干预对神经功能的影响及其分子机制。方法:将24只大鼠随机分为假手术组(SHAM)、静息组(SED)、术后1d开始运动组(EX-1D)、术后1周开始运动组(EX-1W),分别于术后进行8周干预,观察术后1周及8周干预结束后的改良神经功能评分(mNSS),脑部相对各向异性分数(rFA),及8周干预结束时脑组织梗死区周围血管内皮生长因子(VEGF)的表达。结果:干预8周后,与SED组相比,(1)EX-1D组大鼠mNSS(2.67±0.817)显著降低($P=0.002$),且明显低于EX-1W组(3.83±1.169, $P=0.049$);(2)EX-1D组(0.72±0.071)和EX-1W组(0.62±0.076)大鼠脑部rFA值均明显升高(均 $P<0.001$),且EX-1D组优于EX-1W组($P=0.005$);(3)EX-1D组($P=0.000$)和EX-1W组($P=0.005$)脑组织VEGF表达明显升高,且EX-1D组表达量高于EX-1W组($P=0.060$);(4)在EX-1D、EX-1W组中,VEGF与mNSS评分呈负相关($r=-0.816$, $P_{EX-1D}=0.048$; $r=-0.829$, $P_{EX-1W}=0.041$)。在SED、EX-1D、EX-1W组中,VEGF与rFA值呈正相关($r=0.872$, $P_{SED}=0.024$; $r=0.831$, $P_{EX-1D}=0.04$; $r=0.857$, $P_{EX-1W}=0.029$)。在EX-1W组中,rFA值与mNSS评分呈负相关($r=-0.854$, $P=0.03$)。结论:卒中后1d和卒中后1周进行8周的运动干预,可以通过上调大鼠脑组织VEGF的表达,促进神经纤维生长、发挥神经保护和改善作用,且卒中后1d开始干预的效果更佳。

关键词 脑缺血;有氧运动干预;血管内皮生长因子;神经功能

中图分类号 R493+R743.3

文献标志码 A

Effects of 8 weeks aerobic exercise intervention on neurological function in rats with cerebral infarction at different time points

JIANG Li-yang^{1,2}, SHI Yu¹, HUANG Chuan¹, SU Yue¹, WAN Chun-xiao¹

(1. Department of Rehabilitation Medicine, General Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China; 2. Department of Rehabilitation Medicine, Tianjin Haihe Hospital, Tianjin 300350, China)

Abstract Objective: To investigate the effects of aerobic exercise intervention on neurological function at different time points after stroke and its molecular mechanism. **Methods:** Twenty-four rats were randomly divided into sham operation group (SHAM), sedentary group (SED), exercise group 1 day after surgery (EX-1D), and exercise group 1 week after surgery (EX-1W). The intervention was performed for 8 weeks after surgery, and the modified neurological severity score (mNSS), the relative fractional anisotropy (rFA) and the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) around the infarcted area of brain tissue were observed at 1 week and 8 weeks after the intervention. **Results:** After 8 weeks of intervention, compared with the SED group, (1) the mNSS (2.67±0.817) in the EX-1D group was significantly lower than the SED group ($P=0.002$) and the EX-1W group [(3.83±1.169), $P=0.049$], respectively; (2) The rFA values in the brain of EX-1D group (0.72±0.071) and EX-1W group (0.62±0.076) were significantly increased ($P<0.001$), and the EX-1D group was superior to EX-1W group ($P=0.005$); (3) VEGF expression of brain tissue in EX-1D group ($P=0.000$) and EX-1W group ($P=0.005$) was significantly increased, and EX-1D group expression was higher than EX-1W group ($P=0.060$); (4) VEGF was negatively correlated with mNSS score, and positively correlated with rFA value. **Conclusion:** 8 weeks after stroke and 1 week after stroke, 8 weeks of exercise intervention, started at 1 d or 1 week after operation, can up-regulate the expression of VEGF in rat brain tissue, promote nerve fiber, exert neuroprotection and improve the effect, and the effect of intervention on the 1st day after operation is more effective.

Key words cerebral ischemia; aerobic exercise intervention; vascular endothelial growth factor; neurological function

脑卒中是全球第二大死亡原因和长期残疾的首要原因,具有很大的社会和经济负担^[1]。在美国,基金项目 国家博士后面上基金(2013M532196);天津市自然科学基金重点项目(18JCZDJC98900);天津市卫生局重点发展项目(16KJ122);“十三五”综合投资“双一流学科”建设项目(11601502-XK0122) 作者简介 姜俐洋(1989-),男,硕士在读,研究方向:康复医学与理疗学;通信作者:万春晓, E-mail: wcx2226@163.com。

每年大约有 795 000 人患脑卒中或复发性卒中,其中 40%的人导致终身残疾^[1]。脑卒中后的有氧运动可以促进神经功能的恢复,提高患者的日常生活活动能力^[2]。但脑卒中后的早期康复介入时间点仍然存在争议。Li 等^[3]发现卒中后 6 h 开始运动会加剧细胞凋亡,而 24 h 后运动并不会导致这种现象。相反,

Humm 等^[4]发现卒中后 24 h 开始运动会导致皮质组织进一步损伤。其他动物实验发现大鼠卒中后 7 d 开始运动会加剧大鼠运动皮质内前肢区域的损伤^[5]。此外,早期运动中,只有轻度至中度运动可以促进卒中后大鼠恢复,而剧烈运动并不能改善卒中后功能^[6]。这些研究共同强调了卒中后运动开始时间对损伤和身体残疾康复的重要性。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)参与调节缺血卒中后的一系列分子过程,如神经血管的重塑和修复、神经保护、神经发生等,使组织适应卒中后的状态^[7]。但早期不同时间介入的运动训练是否可以调节 VEGF 的表达,发挥保护神经的作用,目前少有研究证明。磁共振扩散张量成像(diffusion tensor image, DTI)是磁共振成像(magnetic resonance imaging, MRI)的特殊形式,而各向异性分数(fractional anisotropy, FA)是 DTI 的衍生参数,其量化了脑白质中水扩散的方向性程度,是局部微结构完整性的替代度量^[8]。在单侧大脑半球病变的疾病中,大多数研究都集中于患侧 FA/对侧 FA 的比值,即相对 FA(relative FA, rFA)在预测神经恢复和运动恢复的作用^[9]。本研究通过对大鼠进行脑卒中后 1 d、1 周开始运动干预及静息干预,观察 8 周干预对大鼠脑组织 VEGF 蛋白表达、FA 值和神经功能评分的影响,探究脑卒中后不同时间点运动干预对神经功能的影响及其分子机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组 选取 SPF 级雄性 8~9 周 Sprague-Dawley (SD) 大鼠(北京华阜康生物科技股份有限公司,许可证号:SCXK 京 2014-0004)24 只,体重 280~310 g。将大鼠随机分为假手术组(SHAM 组)、静息组(SED 组)、术后 1 d 开始运动组(EX-1D 组)、术后 1 周开始运动组(EX-1W 组),每组 6 只。

1.2 大脑中动脉栓塞(middle cerebral ischemia occlusion, MCAO)再灌注模型制备 采用改良 Longa 线栓法制备左侧 MCAO 模型^[10]。大鼠经 10%水合氯醛(300 mg/kg 体重)腹腔注射麻醉后,钝性分离和结扎左侧颈总动脉和颈外动脉,向颈内动脉插入线栓(型号:2838-A4 北京西浓科技有限公司),深度 1.8~2.0 cm。60 min 后取出线栓,建立 MCAO 模型,手术总时长<90 min,保持大鼠肛温(37±0.5)℃。假手术组暴露动脉,但不插入线栓,其余损伤同上。24 h 进行 Longa 评分,1~3 分者纳入本实验^[10]。

1.3 跑台训练及实验设计 运动组大鼠分别于造模后 1 d 或 1 周开始进行 8 周运动,使用 ZS-PT 小动物实验跑台(北京众实迪创科技发展有限公司),角度 0°,速度 12 m/min,30 min/d。大鼠停留至跑台末端时用软毛刷刺激促使继续运动,直至完成干预(图 1)。

所有动物入组前均行 3 d 的行为学评分预适应和跑台预适应,运动强度同前。排除标准:(1)预适应期间不能配合完成跑台运动。(2)造模后死亡。(3)造模 24 h 后 Longa 分不满足要求。

1.4 改良神经功能评分(modified neurological severity score, mNSS)测定 如前所述,采用 mNSS 评分,分值为 0~18 分,分值越大神经功能缺损越严重^[11]。由同一实验人员分别于造模后 1 周及干预 8 周后进行评定。

1.5 FA 值的测定 造模后 1 周及干预 8 周后对各组进行 DTI 和 T2WI 扫描(SIEMENS Magnetom Verio 3.0T MR)。大鼠麻醉后仰卧位固定。T2-SPACE 序列,层厚=0.4 mm,扫描层数 72 层,TR=1 000 ms,TE=155 ms,采集次数 2 次,FA=120°,FOV=60 mm×60 mm,矩阵=192×192;同一实验人员在 MRI 工作站采集和处理数据。根据大鼠脑图谱选取同一层面

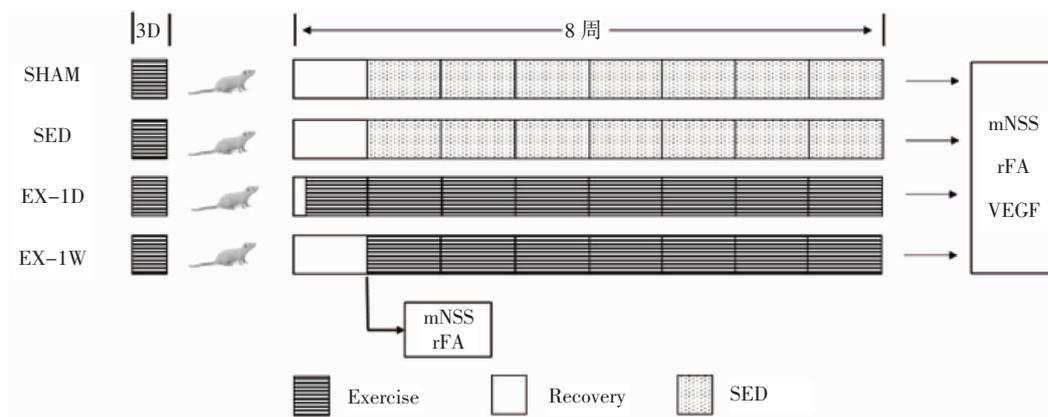


图1 实验流程图

Fig 1 Experimental flow chart

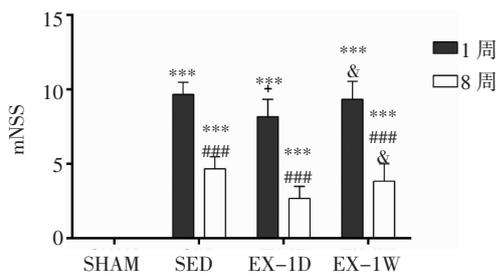
(Bregma-1.08~4.20 mm)患侧受累内囊区域以及健侧对应等面积区域为感兴趣区测量FA值,rFA=患侧FA/健侧FA。

1.6 VEGF蛋白印迹检测 提取距离脑梗区3~4 mm的围梗死区脑组织总蛋白,采用BCA试剂盒定量蛋白浓度。以 β -Actin作为等量蛋白质上样对照,取60 μ g蛋白/泳道进行SDS-PAGE凝胶电泳分离总蛋白,随后100 V恒压将蛋白转至硝酸纤维膜上,室温下5%脱脂牛奶封闭1 h,分别加入VEGF(1:1 000, Abcam, UK)、内参 β -Actin抗体(1:1 000, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA),4 $^{\circ}$ C孵育过夜,加入辣根过氧化物酶标记的二抗(1:2 000, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)室温孵育1 h,ECL化学发光法通过凝胶电泳成像仪显影。

1.7 统计学处理 数据用统计软件SPSS22.0和Graphpad Prism6.0处理,本研究中定量资料经Shapiro-Wilks检验后,数据均满足正态性,以 $\bar{x}\pm s$ 表示。组间比较用方差分析,各组之间两两比较用LSD方法。各组VEGF与mNSS,rFA值采用Pearson相关性分析。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

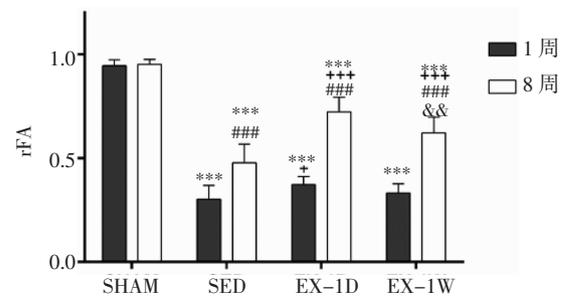
2.1 各组大鼠造模后1周及干预结束后mNSS评分的比较 在造模后1周以及干预8周后,对每组大鼠进行mNSS评分。组内比较,SED组、EX-1D组、EX-1W组在8周干预结束时的mNSS评分均明显降低(均 $P<0.001$)。各组组长间比较中,在造模后1周时,EX-1D组大鼠mNSS评分(8.17 \pm 1.169)分别明显低于SED组(9.67 \pm 0.817, $P=0.023$)、EX-1W组(9.33 \pm 1.211, $P=0.039$)。干预8周后,与SED组(4.67 \pm 0.817)相比,EX-1D组大鼠mNSS评分明显降低(2.67 \pm 0.817, $P=0.002$),而EX-1W组没有出现显著变化(3.83 \pm 1.169, $P=0.149$);与EX-1D组比较,EX-1W组大鼠mNSS评分明显升高($P=0.049$,图2)。



注:与SHAM组相比,*** $P<0.001$;与对应时间的SED组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与对应时间的EX-1D组相比, $^{\&}$ $P<0.05$;与造模后1周相比,### $P<0.001$

图2 各组大鼠造模后1周及各组分别干预8周后mNSS评分变化
Fig 2 Variance in mNSS scores after one week of modeling and after 8 weeks of intervention in each group

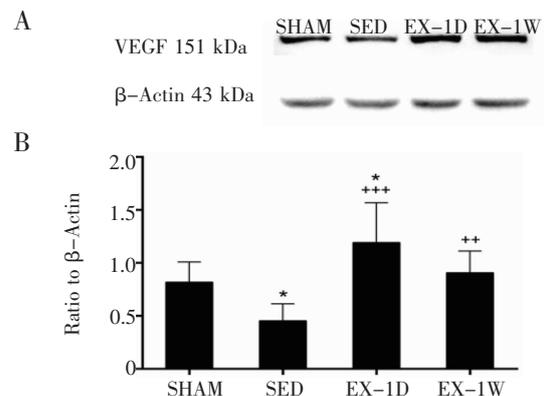
2.2 各组大鼠造模后1周及干预结束后rFA值的比较 组内比较,各组与造模后1周相比,SED组、EX-1D组、EX-1W组干预8周后的rFA值均明显升高(均 $P<0.001$)。组间比较,在造模后1周,EX-1D组大鼠的rFA值(0.37 \pm 0.039)较SED组(0.30 \pm 0.656)明显升高($P=0.049$),而EX-1W组与SED组无明显变化($P=0.408$)。干预8周后,与SED组(0.48 \pm 0.090)相比,EX-1D组(0.72 \pm 0.071)、EX-1W组(0.62 \pm 0.076)大鼠rFA值均显著提高(均 $P<0.001$),且EX-1D组rFA值明显高于EX-1W组($P=0.005$,图3)。



注:与对应时间的SHAM组相比,*** $P<0.001$;与对应时间的SED组相比,* $P<0.05$,** $P<0.001$;与对应时间的EX-1D组相比, $^{\&}$ $P<0.01$;与造模后1周相比,### $P<0.001$

图3 各组大鼠造模后1周及干预8周后rFA值变化
Fig 3 Variance in rFA values after one week of modeling and 8 weeks after intervention in each group

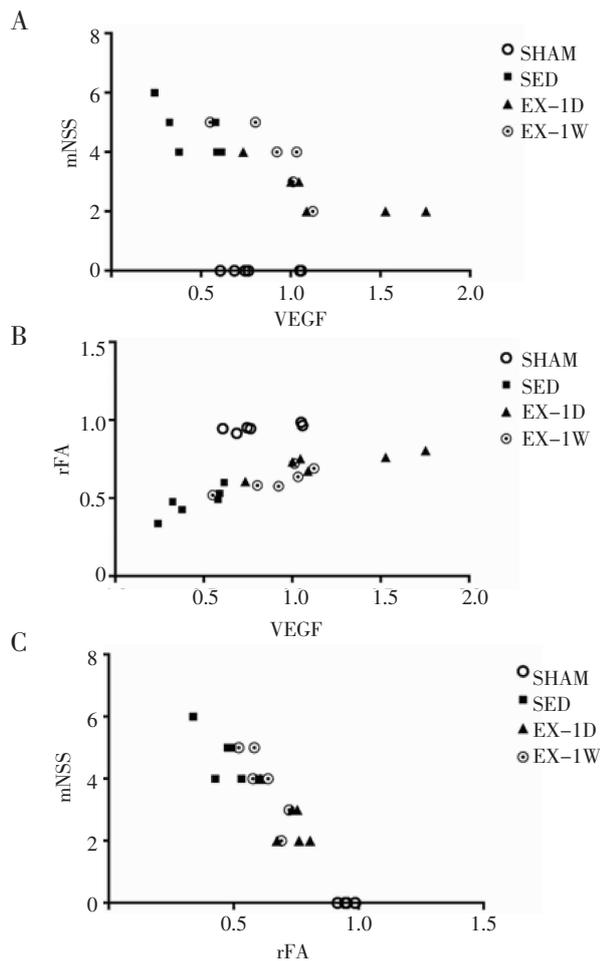
2.3 各组大鼠干预结束后脑组织VEGF蛋白表达的比较 干预8周后,与SHAM组(0.82 \pm 0.191)相比,SED组大鼠VEGF蛋白表达量(0.45 \pm 0.160)明显降低($P=0.019$),EX-1D组(1.19 \pm 0.376)蛋白表达显著升高($P=0.017$),而EX-1W组(0.91 \pm 0.206)蛋白未出现统计学差异($P=0.543$)。与SED组相比,EX-1D组、EX-1W组VEGF蛋白表达量均明显升高($P_{EX-1D}=0.000$, $P_{EX-1W}=0.005$)。EX-1D组的VEGF表达略高于EX-1W组,但无统计学差异($P=0.060$,图4)。



注:A:VEGF蛋白印迹条带图;B:各组VEGF蛋白表达的变化;与SHAM组相比,* $P<0.05$;与SED组相比,** $P<0.01$,*** $P<0.001$

图4 干预8周后各组大鼠脑组织VEGF蛋白表达
Fig 4 VEGF protein expression in brain tissue of rats in each group after 8 weeks of intervention

2.4 各组大鼠 VEGF 与 mNSS、rFA 值的相关性分析 干预 8 周后,将 VEGF 蛋白表达与 mNSS 评分、rFA 值进行相关性分析。在 EX-1D 组、EX-1W 组中,VEGF 的增加与 mNSS 评分的增加呈负相关 ($r=-0.816, P_{EX-1D}=0.048; r=-0.829, P_{EX-1W}=0.041$)。在 SED 组、EX-1D 组、EX-1W 组中,VEGF 的增加与 rFA 值的增加呈正相关 ($r=0.872, P_{SED}=0.024; r=0.831, P_{EX-1D}=0.04; r=0.857, P_{EX-1W}=0.029$)。在 EX-1W 组中,rFA 值与 mNSS 评分呈负相关($r=-0.854, P=0.03$)(图 5)。



注:A: 干预 8 周后,EX-1D 组、EX-1W 组 VEGF 与 mNSS 呈负相关, $r=-0.816, P_{EX-1D}=0.048; r=-0.829, P_{EX-1W}=0.041$;B: 干预 8 周后,SED、EX-1D、EX-1W 组 VEGF 与 rFA 值呈正相关, $r=0.872, P_{SED}=0.024; r=0.831, P_{EX-1D}=0.04; r=0.857, P_{EX-1W}=0.029$;C: 干预 8 周后,EX-1W 组 rFA 与 mNSS 呈负相关, $r=-0.854, P=0.03$

图 5 各组大鼠 VEGF 与 mNSS、rFA 值的相关性分析
Fig 5 Correlation analysis of VEGF with mNSS and rFA in rats of each group

3 讨论

越来越多的证据支持卒中后的体育锻炼可以通过诱导神经可塑性来改善神经功能。美国心脏协会已经将有氧运动作为卒中康复中的基本组成部

分^[12]。由于医疗系统的巨大负担,大量研究重点关注卒中后的运动康复方案策略,通过减少卒中后认知和运动损伤促进患者恢复^[13]。但对卒中后运动开始时间仍然有待深入研究,且多项相互矛盾的结果更突出了卒中后运动开始时间的重要性^[3,12]。本研究通过对大鼠卒中后 1 d、1 周开始运动组研究发现:与 SED 组比较,造模后 1 周时 EX-1D 组 mNSS 评分明显降低,rFA 明显升高 ($P=0.049$),而 EX-1W 组 mNSS 和 rFA 值无统计学差异。各组分别 8 周干预后,EX-1D 组比 EX-1W 组大鼠的 mNSS 评分明显降低 ($P=0.049$),rFA 值明显增高 ($P=0.005$),EX-1D 组的 VEGF 表达略高于 EX-1W 组,但尚未出现统计学差异 ($P=0.060$)。VEGF 表达水平与 mNSS 评分呈负相关,而与 rFA 值呈正相关。这些结果表明,脑梗死后的运动干预对大鼠脑组织神经功能的恢复效果优于 SED 干预,且 EX-1D 组的干预效果更佳。这可能是由于运动促进了卒中后脑组织的 VEGF 表达,改善大鼠的 FA 值,促进神经功能的恢复。

FA 值是 MRI 的一个参数,其变化可以反映几种生物学基础状态,比如轴突填充密度、轴突直径、髓鞘、神经突密度和取向分布^[14]。研究验证了 FA 值对卒中后运动恢复的影响^[15]。一项荟萃分析的结果显示,多数卒中后运动研究中,FA 值与运动恢复结果显著相关^[14]。Sidaros 等^[16]发现,FA 值与神经纤维一致性及髓鞘数量呈正相关,FA 值较低可能是由于神经纤维的损害或者神经纤维一致性降低导致。笔者的研究发现 EX-1D 组大鼠在脑卒中后干预 8 周后的 rFA 值明显高于 EX-1W 组,且 mNSS 评分出现了相反的结果,表明脑卒中后 1 d 开始干预,可以有效保护神经,改善大鼠的神经功能,促进运动恢复。

VEGF 涉及到血管生长的所有阶段,包括神经血管的发育,由缺氧驱动的现有血管中的新毛细血管生成,动脉生成及相应血压梯度的吻合小动脉通道的扩张^[17-19]。VEGF 在卒中期间可以保护缺血性脑梗塞并促进闭塞的脑动脉再通^[20]。此外,VEGF 可以促进多种神经元功能的恢复,包括神经元发生、神经元迁移、神经元生长等^[21]。笔者的研究发现 8 周干预结束后 EX-1D 组大鼠的 VEGF 表达水平高于 EX-1W 组和 SED 组,表明卒中后 1 d 开始运动更能上调 VEGF 的表达。

通过相关性分析,笔者发现 VEGF 与 mNSS 评分呈负相关,而与 rFA 值呈正相关,表明运动通过促进 VEGF 的表达,发挥神经保护作用,促进血管再通和神经发生,从而改善卒中后的病理状态。此外,EX-1D 组大鼠在干预结束时更高的 VEGF 表达

水平、rFA 值和更低的 mNSS 评分, 证明卒中后 1 d 开始的早期运动干预效果更佳。

本研究揭示了脑卒中后 8 周运动干预对受损神经功能的保护和改善作用及其内在分子机制, 并发现卒中后 1 d 开始运动拥有更佳的治疗效果。但本实验样本例数较少, 且早期不同干预时间点划分较为粗放, 是否卒中后 24 h 内或 3 d 开始运动干预会有更好的治疗效果, 今后的研究将进一步论证。

综上所述, 笔者的研究证明, 卒中后 1 d 和卒中后 1 周进行 8 周的运动干预, 可以通过上调大鼠 VEGF 的表达, 发挥神经保护和改善作用, 促进神经功能的恢复, 且卒中后 1 d 开始干预的效果更佳。

参考文献:

- [1] Katan M, Luft A. Global burden of stroke[J]. *Semin Neurol*, 2018, 38(2): 208
- [2] Tatemoto T, Tanaka S, Maeda K, et al. Skillful cycling training induces cortical plasticity in the lower extremity motor cortex area in healthy persons[J]. *Front Neurosci*, 2019, 13(9): 927
- [3] Li F, Shi W, Zhao E Y, et al. Enhanced apoptosis from early physical exercise rehabilitation following ischemic stroke[J]. *J Neurosci Res*, 2017, 95(4): 1017
- [4] Humm J L, Kozlowski D A, James D C, et al. Use-dependent exacerbation of brain damage occurs during an early post-lesion vulnerable period[J]. *Brain Res*, 1998, 783(2): 286
- [5] Kozlowski D A, James D C, Schallert T. Use-dependent exaggeration of neuronal injury after unilateral sensorimotor cortex lesions[J]. *J Neurosci*, 1996, 16(15): 4776
- [6] Lee S U, Kim D Y, Park S H, et al. Mild to moderate early exercise promotes recovery from cerebral ischemia in rats[J]. *Can J Neurol Sci*, 2009, 36(4): 443
- [7] Greenberg D A, Jin K. Vascular endothelial growth factors (vegfs) and stroke[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2013, 70(10): 1753
- [8] Oey N E, Samuel G S, Lim J K W, et al. Whole brain white matter microstructure and upper limb function: longitudinal changes in fractional anisotropy and axial diffusivity in post-stroke patients [J]. *J Cent Nerv Syst Dis*, 2019, 11(7): 1179573519863428
- [9] Puig J, Blasco G, Daunis I E J, et al. Decreased corticospinal tract fractional anisotropy predicts long-term motor outcome after stroke[J]. *Stroke*, 2013, 44(7): 2016
- [10] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84
- [11] 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
- [12] Billinger S A, Arena R, Bernhardt J, et al. Physical activity and exercise recommendations for stroke survivors: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association[J]. *Stroke*, 2014, 45(8): 2532
- [13] Winstein C J, Stein J, Arena R, et al. Guidelines for adult stroke rehabilitation and recovery: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association [J]. *Stroke*, 2016, 47(6): e98
- [14] Moura L M, Luccas R, de Paiva J P Q, et al. Diffusion tensor imaging biomarkers to predict motor outcomes in stroke: a narrative review[J]. *Front Neurol*, 2019, 10: 445
- [15] Puig J, Blasco G, Schlaug G, et al. Diffusion tensor imaging as a prognostic biomarker for motor recovery and rehabilitation after stroke[J]. *Neuroradiology*, 2017, 59(4): 343
- [16] Sidaros A, Engberg A W, Sidaros K, et al. Diffusion tensor imaging during recovery from severe traumatic brain injury and relation to clinical outcome: a longitudinal study[J]. *Brain*, 2008, 131(Pt 2): 559
- [17] Hirashima M. Regulation of endothelial cell differentiation and arterial specification by vegf and notch signaling[J]. *Anat Sci Int*, 2009, 84(3): 95
- [18] Shibuya M. Brain angiogenesis in developmental and pathological processes: therapeutic aspects of vascular endothelial growth factor[J]. *FEBS J*, 2009, 276(17): 4636
- [19] Schaper W. Collateral circulation: past and present[J]. *Basic Res Cardiol*, 2009, 104(1): 5
- [20] Greenberg D A, Jin K. Vascular endothelial growth factors (VEGFs) and stroke[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2013, 70(10): 1753
- [21] Mackenzie F, Ruhrberg C. Diverse roles for VEGF-a in the nervous system[J]. *Development*, 2012, 139(8): 1371

(2019-11-12 收稿)