

跑台训练通过bFGF/Caveolin-1/VEGF信号通路 促进大鼠缺血半暗区神经血管再生

黄婷婷 庞琼怡 项炳武 刘美霞 赵芸 陈翔*

(温州医科大学附属第二医院康复科, 温州 325027)

摘要 该文探讨跑台训练经bFGF/Caveolin-1/VEGF通路促进大鼠缺血半暗区神经血管再生的作用机制, 为跑台训练在脑卒中类疾病中的应用提供实验依据及理论基础。动物分为假手术组(sham-operated, S)、模型组(model, M)、运动模型组(exercise model, EM)、bFGF模型组(bFGF model, bM)及bFGF运动模型组(bFGF exercise model, bEM)。大鼠局灶性脑缺血再灌损伤模型(MCAO)参照Belayev报道的线栓法复制。选取脑缺血半暗区组织, 免疫荧光观察VEGFR-2/CD34、BrdU/Nestin双标阳性细胞数; Western blot检测Caveolin-1、VEGF和bFGF的表达。神经行为学评分显示, bEM组较同期EM、bM、M组为低($P<0.05$); 免疫结果显示, 缺血半暗区VEGFR-2/CD34、BrdU/Nestin双标阳性细胞数组内28 d组较7 d组阳性细胞数为低($P<0.05$), bEM7d组阳性细胞数较EM7d、bM7d、M7d组明显增高($P<0.05$); Western blot检测结果显示, 缺血半暗区EM组较M组bFGF表达增多($P<0.05$), 其中bEM7d组Caveolin-1、VEGF的Western blot图像灰度比值较EM7d、bM7d、M7d组明显增高($P<0.05$)。结果证明, 外源性bFGF可上调脑缺血半暗区Caveolin-1和VEGF的表达; 跑台训练经bFGF/Caveolin-1/VEGF通路促进脑缺血半暗区神经血管再生。

关键词 跑台训练; bFGF; Caveolin-1; 缺血半暗区; 神经血管再生; 大鼠

Treadmill Exercise Promotes Nerve Vascular Regeneration in the Ischemia Penumbra by bFGF/Caveolin-1/VEGF Pathway

Huang Tingting, Pang Qiongyi, Xiang Bingwu, Liu Meixia, Zhao Yun, Chen Xiang*

(Department of Rehabilitation, the Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325027, China)

Abstract This article investigated the effect of bFGF/Caveolin-1/VEGF signal pathway in treadmill training on promoting nerve vascular regeneration in the ischemia penumbra of rat brain. Rats were randomized into sham-operated group (S), model group (M), exercise model group (EM), bFGF model group (bM), bFGF and exercise model group (bEM). The protein levels of Caveolin-1, VEGF and bFGF in the ischemia penumbra of rats after MCAO were analyzed by Western blot. The positive cells number of CD34/VEGFR-2 and BrdU/Nestin were detected by double-staining immunofluorescence in the ischemia penumbra. The neurological behavior scores of each model group compared to S were all significant ($P<0.05$); There were no white infarcts in group S, while in other Model group there were visible different sizes of white infarcts by TTC; The number of VEGFR-2/CD34 and BrdU/Nestin double standard positive cells reached to peak at group bEM7d ($P<0.05$); Group EM bFGF

收稿日期: 2015-05-20 接受日期: 2015-08-07

浙江省自然科学基金(批准号: Y12H170002)和温州市科技局项目(批准号: Y20140677)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0577-88002053, E-mail: chenxiangnj2005@aliyun.com

Received: May 20, 2015 Accepted: August 7, 2015

This work was supported by the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (Grant No. Y12H170002) and Wenzhou Municipal Science and Technology Bureau (Grant No. Y20140677)

*Corresponding author. Tel: +86-577-88002053, E-mail: chenxiangnj2005@aliyun.com

网络出版时间: 2015-09-16 17:22:34 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20150916.1722.008.html>

intensity value was higher than the group M ($P<0.05$); Caveolin-1, VEGF intensity value reached to peak at group bE-M7d ($P<0.05$). Lateral ventricle injection of bFGF could raise expression of Caveolin-1 and VEGF in the ischemia penumbra of rat brain. It is proved that the effect of treadmill exercise induced nerve vascular regeneration through bFGF/Caveolin-1/VEGF signaling pathway in the ischemia penumbra of rat brain.

Keywords treadmill; Caveolin-1; bFGF; ischemic penumbra; nerve vascular regeneration; rat

在心脑血管病死亡中, 脑卒中位居第二, 它具有高发病率、死亡率和致残率三大特点。早期的运动训练能促进脑卒中后神经血管再生, 缓解功能障碍, 是非常有效的一种康复手段^[1-3], 其机制可能与上调血管生成素-1(angiotensin-1, Ang-1)、血管生成素-2(Ang-2)及血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的表达相关^[4]。VEGF作为血管内皮细胞最具有特异性的有丝分裂原, 具有很强的促血管内皮细胞分裂、增生、迁移以及增强血管通透性的作用, 并且能促进碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)成熟。bFGF是一种促有丝分裂的小分子蛋白, 它可以促使微血管的生长分化, 使局部毛细血管数目增加^[5]。多项研究均指出, bFGF能直接或间接地促进VEGF表达, 更能调控血管内皮细胞生长因子受体2(vascular endothelial growth factor receptor 2, VEGFR2)的表达来增强VEGF的作用。在体外培养内皮细胞时, 运用抑制剂阻断VEGF的表达, 增加培养基的bFGF浓度不能诱导血管新生, 说明bFGF通过VEGF达到促血管生长的作用。此外, 可见bFGF与VEGF在脑缺血中有较多共同的通路。本课题组前期动物实验证明, 缺血性脑卒中后皮层小凹蛋白-1(Caveolin-1, Cav-1)表达明显上调, 也证明跑台训练能上调Caveolin-1的表达, 促进VEGF表达增多, 从而提高脑缺血半暗区血管再生, 减小梗死面积, 有助于大鼠异常的神经行为学恢复, 并利用Caveolin-1抑制剂提出Caveolin-1是VEGF的上游^[6-8], 由此提出bFGF/Caveolin-1/VEGF这条信号通路是有据可循的。Campuzano等^[9]研究发现, 冠状动脉缺血和运动训练均能上调bFGF的表达, 且极限运动后健康人群和冠状动脉缺血患者bFGF血清水平均升高, 跑台训练是常见的一种运动方式。由此可见, 跑台训练可通过bFGF/Caveolin-1/VEGF信号通路促进缺血半暗区神经血管新生。综上所述, 本实验通过制作MCAO模型、跑台训练及侧脑室注射bFGF后观察大鼠神经行为学症状、脑梗死灶体积、细胞形态等, 检测缺血半

暗区Caveolin-1、bFGF、VEGF、VEGFR-2/CD34、BrdU/Nestin等指标变化, 探讨注射外源性bFGF能否上调缺血半暗区Caveolin-1/VEGF的表达, 验证bFGF/Caveolin-1/VEGF通路在脑缺血模型中的作用, 探索跑台训练是否上调缺血半暗区bFGF的表达, 从而为缺血性脑卒中的治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 清洁级成年雄性SD大鼠(体重 250 ± 20 g, 3月龄)162只, 由温州医科大学动物实验中心提供及饲养。大鼠饲养于SPF实验室, 室温 25°C , 房间灯光日夜控制各12 h, 大鼠自由饮食及活动。SD大鼠(3月龄)随机分为: 假手术组(sham-operated, S)、模型组(model, M)、运动模型组(exercise model, EM)、bFGF模型组(bFGF model, bM)及bFGF运动模型组(bFGF exercise model, bEM), 共五组。其中, S组18只, M、bM、EM、bEM又分为7 d组和28 d组, 每组各18只。

1.1.2 药物与试剂 2,3,5-氯化三苯基四氮唑(2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride, TTC)、5-溴脱氧尿嘧啶核苷(5-bromodeoxyuridine, BrdU)、4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)购于Sigma-Aldrich中国公司; 小鼠抗VEGF抗体、小鼠抗BrdU抗体、兔抗bFGF抗体、兔抗巢蛋白(Nestin)抗体、内参 β 微管蛋白(β -tubulin)购于英国Abcam公司; 兔抗Caveolin-1抗体、小鼠抗Flk-1(VEGFR-2)抗体、兔抗CD34抗体购于美国Santa Cruz公司。

1.1.3 仪器 所用仪器有: 德国LEICA公司CM 1900冰冻切片机、日本Olympus BX51显微镜、美国Media Cybernetics公司Image Pro Plus 6.0(IPP6.0)软件、上海复日科技有限公司FR-980A生物电泳图像分析系统及北京沙东生物技术公司尼龙栓线。

1.2 实验方法

1.2.1 bFGF侧脑室注射 bFGF蛋白原液由温州医科大学药学院提供(货号: 20130601), 1.69 mg/mL,

150 μg /支。蛋白原液用生理盐水稀释成169 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。bM、bEM组SD大鼠在缺血再灌注后立即置于脑立体定向仪上,以前囟为标致点,取前囟后0.8 mm,向左旁开1.8 mm,硬膜下3.7 mm为注射点,用10 μL 微量注射器向左侧侧脑室注射10 μL 含bFGF稀释液,注射后留针15 min拔出。S、EM、M组同一方法同一位置注射10 μL 生理盐水。侧脑室的注射位置与大鼠种类和体重密切相关。在前期实验中,结合文献摸索注射位置,确定位置注射溴化乙锭(ethidium bromide, EB)溶液后,立即断头取脑切片,观察EB染色位置及溶液是否注入侧脑室内。经实验证明,前囟后0.8 mm,向左旁开1.8 mm,硬膜下3.7 mm为最佳注射点。

1.2.2 BrdU腹腔注射 BrdU溶于生理盐水配制成1%溶液(10 mg/mL),在处死大鼠前32 h进行腹腔注射(100 mg/kg),隔4 h注射1次,共3次,最后一次给药后24 h处死大鼠。

1.2.3 动物模型的制备 采用改良Belayev法制作大鼠MCAO模型。抓取大鼠称重后腹腔注射10%水合氯醛(350 mg/kg),然后将大鼠仰卧固定在手术台上,颈部剃毛,常规消毒,沿中线切开颈部皮肤、浅筋膜,用弯镊钝性分离皮下腺体和肌肉,寻找左侧颈总动脉(external carotid artery, CCA),充分暴露视野,剥离血管,小心分离颈总动脉(CCA)、颈内动脉(internal carotid artery, ICA)、颈外动脉(common carotid artery, ECA)等,术中小心分离紧贴CCA的迷走神经,避免损伤。结扎左侧CCA下端、ECA远端,用血管夹夹住ICA,在ECA近端挂线,用血管剪在ECA远端结扎处前剪一小口,将栓线插入后结扎ECA近端挂线,松开ICA处动脉夹,使栓线进入大鼠前动脉,阻断大脑中动脉(MCA),轻轻推进栓线,遇到阻力后停止,栓线进入长度大约为18 mm,固定插入的栓线,缝合切口,缺血2 h后拔出栓线,结扎ECA近端血管,实现脑缺血再灌注。假手术组前期手术准备一致,但仅在剥离颈动脉后立即缝合创口。bM、bEM组再灌后立即予侧脑室注射bFGF,完毕后放入清洁的鼠笼内,正常饲养。

1.2.4 运动训练 EM组、bEM组SD大鼠在造模前,进行试验性跑台训练(5~8 m/min, 30 min/d)。MCAO造模后24 h,运动组SD大鼠予以跑台训练(0°斜度, 20 m/min的履带传输速度)分别训练至7 d和28 d(每周累积训练5 d, 30 min/d)。7 d和28 d后检测相应实

验指标。S组、M组和bM组同样抓取,但不进行跑台训练。

1.2.5 神经行为学评分 大鼠术后清醒后既有神经行为学症状,按照各组的时间观察点,术后24 h、7 d和28 d进行行为学评分和平衡试验评分。(1)参照Zea Longa等5分制评分标准。0分:无神经缺损症状(右侧),肢体运动正常;1分:不能彻底伸展(右侧)前肢,较轻微神经缺损症状;2分:行走时自发向右侧转圈;3分:行走时向右侧倾倒;4分:意识抑制,不能行走;5分:死亡。选取评分为1~3分SD大鼠纳入实验,用同一批次的SD大鼠补足数量。(2)各组大鼠均进行平衡试验。制作30 cm \times 1.3 cm的窄木条,将大鼠置于窄木条上60 s,评分1~7分。评分标准:1分:大鼠四爪均置于木条表面,能保持平衡;2分:大鼠在木条上摇晃或者爪子握于窄木条侧面;3分:大鼠有1或2个肢体滑下木条;4分:大鼠有3个肢体滑下木条;5分:大鼠试图在窄木条上维持平衡但仍旧滑落;6分:大鼠悬挂在木条上,后跌落;7分:大鼠直接跌落,无维持平衡的能力。

1.2.6 脑组织切片TTC染色 观察至规定的时间,10%水合氯醛麻醉后开胸,迅速灌注4 $^{\circ}\text{C}$ 生理盐水(150 mL),见两肝肺发白,快速取脑,放入切片模具中,冠状切片(间隔2 mm切片,共取6片)置避光器皿,放入现配的TTC缓存液(2%),缓冲液要漫过组织,置于37 $^{\circ}\text{C}$ 的水浴箱中30 min,吸去TTC缓冲液,倒入4%多聚甲醛固定过夜后照相观察。

1.2.7 标本处理 (1)脑缺血半暗区:根据改良Ashwal^[10]分离出缺血半暗区组织,在距额叶前端4 mm和9 mm处行冠状切片,取中间脑组织块(弃去矢状缝至1.5~2 mm侧脑组织),在10点钟方向斜切脑组织。(2)Wb的标本制作:脑组织灌注的步骤同TTC,快速断头取脑后,置于冰上小心分离出缺血半暗区,放入无菌去酶的冻存管,予液氮速冻后转移到-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中备用。(3)HE染色、倪氏染色、免疫组化、免疫荧光大脑切片标本制作:脑组织灌注步骤基本如TTC制作,但经生理盐水灌注至肝肺发白后,改输入冷4%多聚甲醛,据改良Ashwal分离出缺血半暗区组织,投入冷4%多聚甲醛固定,蔗糖溶液梯度脱水至沉底,加入OCT包埋,经液氮速冻后置于-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存(切忌直接投入液氮中,防止脑组织裂开),或直接在-20 $^{\circ}\text{C}$ 恒温冰冻切片机上,开始做连续冠状冰冻切片,片厚8 μm 。所有组织每隔4张取1张片子,共取

10张, 其中, 各区3张做VEGFR-2/CD34、BrdU/Nestin免疫荧光双染色, 2张分别做HE染色、Nissl染色。

1.2.8 HE染色和Nissl染色 按照说明书步骤, 先将切片置0.01 mol/L磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)中冲洗5 min×3次, 加入苏木素-伊红(HE)或者Nissl染色液, 再PBS冲洗5 min×3次, 常规梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片, 置于光学显微镜下观察拍照。

1.2.9 VEGFR-2/CD34免疫荧光染色 (1)室温下风干切片; 复水5~10 min; (2)切片置于0.01 mol/L PBS中, 摇床上漂洗5 min×3次; (3)切片置入耐高温器皿, 注入0.01 mol/L柠檬酸盐缓冲液作为抗原修复液, 放入高压锅, 沸腾5 min后置于室温, 冷却后PBS冲洗5 min×3次; (4)0.2%聚乙二醇辛基苯基醚(Triton)处理10 min; (5)同2; (6)滴加正常山羊血清封闭液(PBS稀释)室温20 min, 甩去液体, 无需再洗; (7)滴加一抗: 直接加入PBS稀释后的VEGFR-2/CD34(均为1:100)两种一抗混合稀释液, 4 °C过夜, 之后于37 °C复温30 min; (8)同2; (9)暗室下加入异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)结合标记和四甲基异硫氰酸罗丹(tetramethyl rhodamin isothiocyanate, TRITC)结合标记的两种二抗混合物, 室温孵育1 h; (10)同2(避光); (11)DAPI染核10 min; (12)同2(避光); (13)滴荧光淬灭剂后封片, 立即置于显微镜下观察。

1.2.10 BrdU/Nestin免疫双标染色 (1)室温下风干切片; 复水5~10 min; (2)切片置于0.01 mol/L PBS中, 摇床上漂洗5 min×3次; (3)切片置于50%去离子甲酰胺/2×柠檬酸钠缓冲液(sodium citrate solution, SSC)1:1溶液中, 放入65 °C水浴箱中2 h; (4)同2; (5)2mol/L HCl覆盖切片, 置于37 °C水浴箱1 h; (6)pH8.4硼酸盐缓冲液中和盐酸20 min; (7)同2; (8)10%山羊血清封闭1 h; (9)弃去血清, 加入小鼠抗大鼠BrdU抗体(1:50), 4 °C过夜; (10)同2; (11)山羊抗小鼠IgG:TRITC(1:200)(避光环境); (12)同2(避光); (13)同8(避光); (14)加兔抗大鼠Nestin抗体(1:250)(避光); (15)同2(避光); (16)加山羊抗兔IgG:FITC(1:200); (17)同2(避光); (18)荧光淬灭剂封片, 显微镜下观察。

显微镜下观察、摄片及半定量分析: 用荧光显微镜观察脑缺血半暗区标本切片, 于40×10倍显微镜下随机选取缺血半暗区5个非重叠视野摄片, 采用Image-Pro Plus 6.0版软件进行图像处理, 计算每个视野中阳性细胞数量, 求平均值。

1.2.11 Western blot检测 根据Western blot检测步骤, 先制备蛋白上样样品, 经灌胶、SDS-PAGE电泳、转膜、封闭、加一抗, 再加入对应二抗, 最后发光显影。

1.3 统计学分析

采用SPSS 21.0统计软件进行分析。数据以均值±标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 组间比较用 t 检验, 多组间比较用方差(analysis of variance, ANOVA)分析。方差齐者两两比较用LSD检验, 方差不齐者两两比较用Dunnett' T3检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

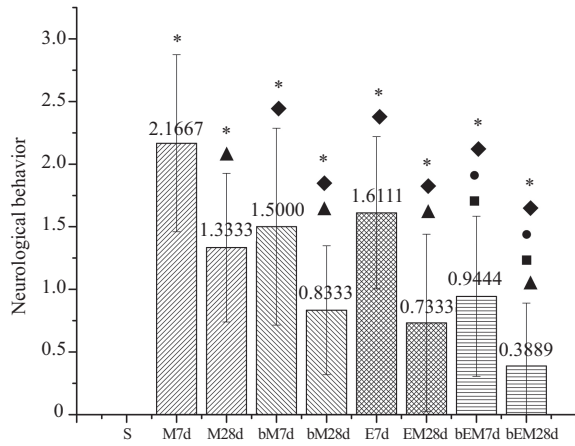
2.1 大鼠MCAO模型制作

清洁级SD大鼠共193只, 其中假手术组18只全部存活, MCAO模型制作成功并存活至规定观察时间点144只, 至规定时间点模型成功率为82.3%, 死亡或造模24 h后经神经行为学测试(Zea Longa 5分制评分标准)剔除共31只。其中死亡23只, 多数发生在模型制作后24 h内, 死检发现主要为蛛网膜下腔出血(SAH)、脑水肿和梗死灶过大(甚至累计整个缺血半球); 另8只为模型制作24 h后Zea Longa评分得分为0或4分, 不符合实验入选标准, 予以剔除。

2.2 神经行为学评分

2.2.1 Zea Longa等5分制评分标准 MCAO模型制作后2 h大鼠清醒, 清醒后即有神经功能障碍表现, 表现出不同程度的缺血对侧肢体偏瘫, 如不能完全伸展对侧肢体、行走时转圈、向对侧倾倒及不能行走等症状。根据评分选取得分1~3分大鼠入组, 予缺血再灌注后7, 28 d给予再次评分, 其中S组均为0分, 各手术组较S组均有统计学意义($P<0.05$); bEM组较同期EM、bM和M组神经行为学评分有降低($P<0.05$); EM、bM较同期M组比较神经行为学评分有降低($P<0.05$); 组内28 d组较7 d组神经行为学评分有降低($P<0.05$); 其余各组相应时间点比较无显著性差异(图1)。

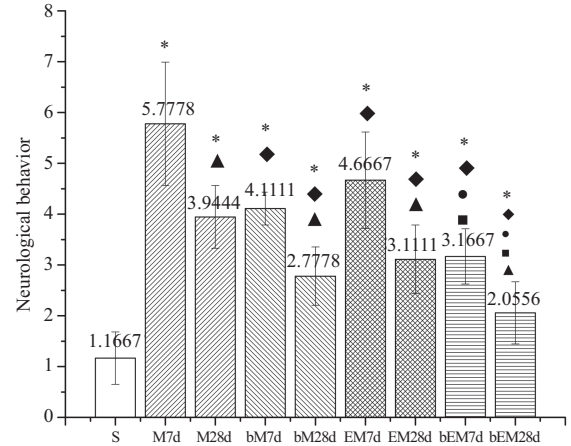
2.2.2 平衡试验评分标准 实验大鼠均进行平衡试验, S组评分为 1.1667 ± 0.5145 , 个别有平衡功能障碍, 但S组较各手术组差异均有意义($P<0.05$)。手术组缺血再灌注后7, 28 d给予评分, 表现出不同程度的平衡障碍, bEM组较同期EM、bM、M组评分有降低($P<0.05$); EM、bM较同期M组比较评分有降低($P<0.05$); 组内28 d较7 d评分有降低($P<0.05$)。其余



▲ $P < 0.05$, 与组内7 d组比较; * $P < 0.05$, 与S组比较; ◆ $P < 0.05$, 与同期M组比较; ● $P < 0.05$, 与同期bM组比较; ■ $P < 0.05$, 与同期EM组比较。
▲ $P < 0.05$ vs the 7 d in each group; * $P < 0.05$ vs S group; ◆ $P < 0.05$ vs the same time point of M group; ● $P < 0.05$ vs the same time point of bM group; ■ $P < 0.05$ vs the same time point of EM group.

图1 跑台训练、侧脑室注射bFGF对大鼠MCAO后神经行为学评分的影响($\bar{x} \pm s, n=18$)

Fig.1 The effect of treadmill and bFGF on the changes of neurological behavior scores in rats after MCAO ($\bar{x} \pm s, n=18$)



▲ $P < 0.05$, 与组内7 d组比较; * $P < 0.05$, 与S组比较; ◆ $P < 0.05$, 与同期M组比较; ● $P < 0.05$, 与同期bM组比较; ■ $P < 0.05$, 与同期EM组比较。
▲ $P < 0.05$ vs the 7 d in each group; * $P < 0.05$ vs S group; ◆ $P < 0.05$ vs the same time point of M group; ● $P < 0.05$ vs the same time point of bM group; ■ $P < 0.05$ vs the same time point of EM group.

图2 跑台训练、侧脑室注射bFGF对大鼠MCAO后平衡试验评分的影响($\bar{x} \pm s, n=18$)

Fig.2 The effect of treadmill and bFGF on the changes of balance test scores in rats after MCAO ($\bar{x} \pm s, n=18$)

各组相应时间点比较无显著性差异(图2)。

2.3 脑组织切片TTC染色

假手术组脑组织均染成深红色, 未见白色梗死灶, 各手术组均可见大小不等的白色梗死灶, 其中bEM组与同期M、EM、bM组比较梗死灶有不同程度减小, 白色减淡; EM、bM组与同期M组梗死灶较小, 组内28 d较7 d组梗死灶有减小(图3)。

2.4 大鼠脑组织病理光镜观察结果

2.4.1 HE染色结果 S组未见明显组织病理学改

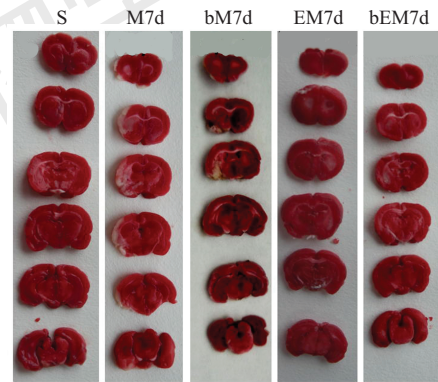


图3 脑组织切片TTC染色结果

Fig.3 TTC staining of brain slices in each group

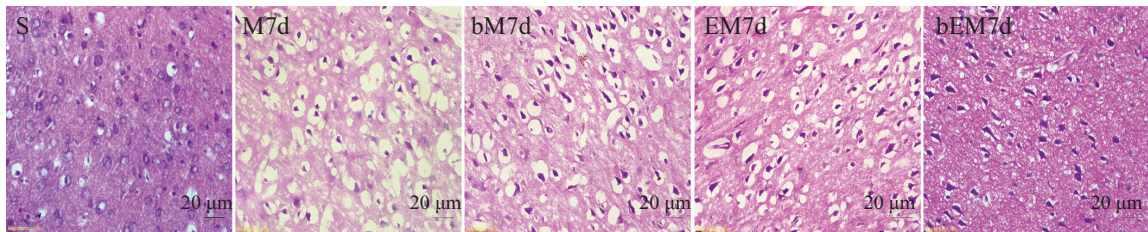


图4 脑组织缺血半暗区切片HE染色

Fig.4 HE staining of ischemic penumbra of rat brain tissue in each group

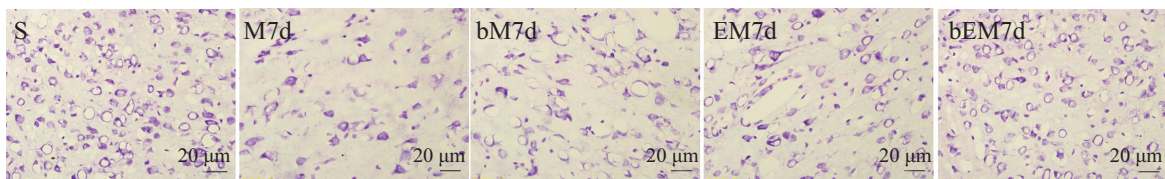
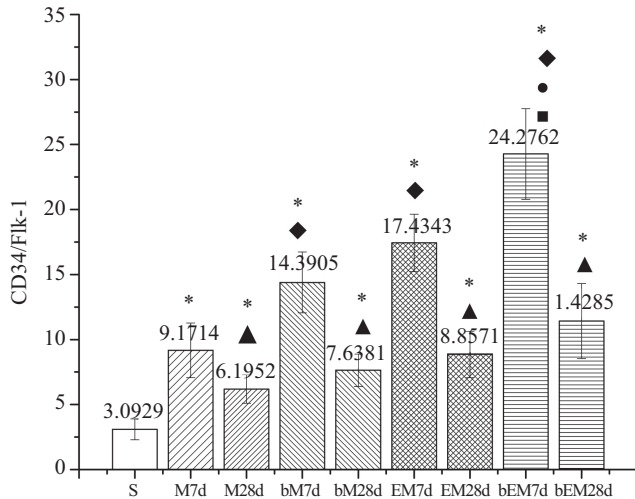


图5 脑组织缺血半暗区切片Nissl染色

Fig.5 Nissl staining of ischemic penumbra of rat brain tissue in each group



▲ $P < 0.05$, 与组内7 d组比较; * $P < 0.05$, 与S组比较; ◆ $P < 0.05$, 与同期M组比较; ● $P < 0.05$, 与同期bM组比较; ■ $P < 0.05$, 与同期EM组比较。
▲ $P < 0.05$ vs the 7 d in each group; * $P < 0.05$ vs S group; ◆ $P < 0.05$ vs the same time point of M group; ● $P < 0.05$ vs the same time point of bM group; ■ $P < 0.05$ vs the same time point of EM group.

图6 跑台训练、侧脑室注射bFGF对大鼠缺血半暗区 VEGFR-2/CD34表达的影响($\bar{x} \pm s, n=7$)

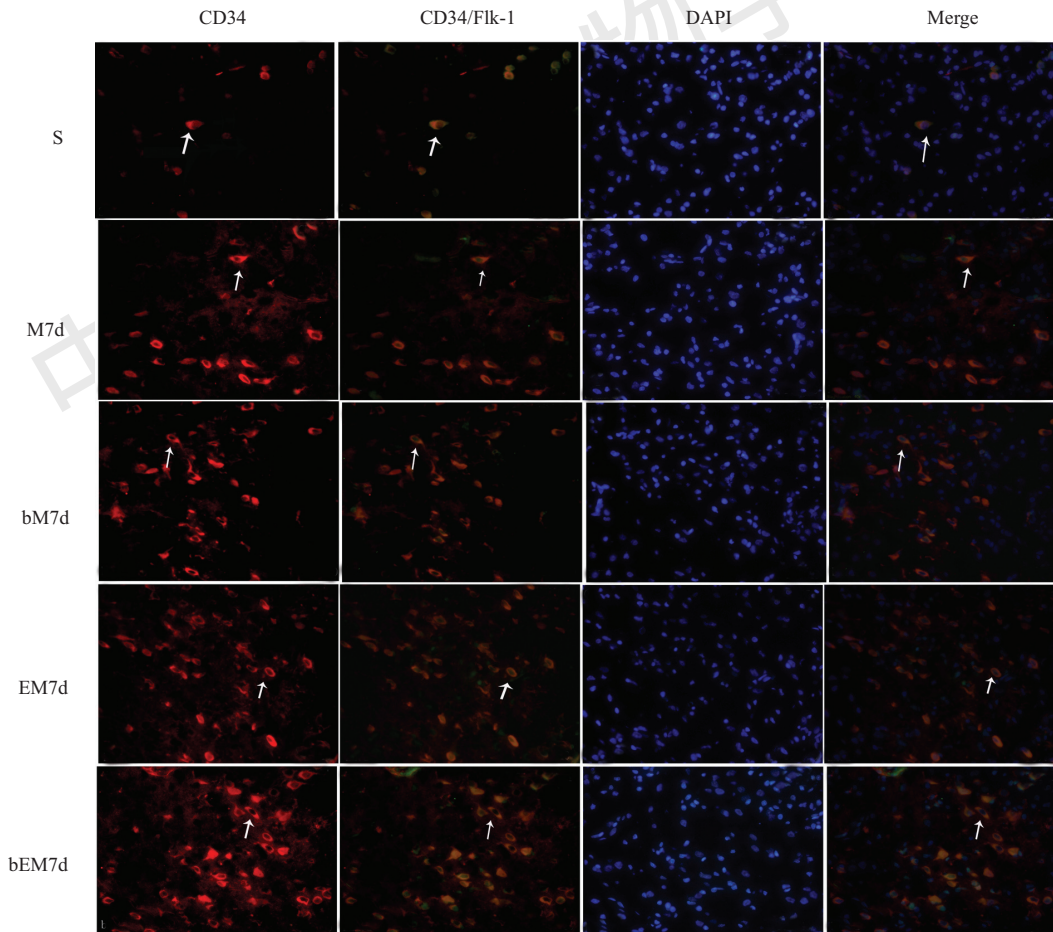
Fig.6 The effect of treadmill and bFGF on the changes of VEGFR-2/CD34 expression in rats after MCAO ($\bar{x} \pm s, n=7$)

变, M组缺血半暗区可见细胞肿胀、间隙增大, 细胞数量较少, 排列紊乱, 胞质浓缩, 胞核固缩深染, 部分细胞呈三角形, 组织坏死溶解后留下空洞(图4)。

2.4.2 Nissl染色结果 S组未见明显组织病理学改变, M组缺血半暗区可见突起明显, 胞体变形, 倪氏小体溶解、数目减少, 出现空洞(图5)。

2.5 VEGFR-2/CD34、BrdU/Nestin免疫荧光双标结果

2.5.1 跑台训练、侧脑室注射bFGF对缺血半暗区 VEGFR-2/CD34表达的检测结果 VEGFR-2/CD34双标可作为缺血半暗区微血管密度的指标^[1], 主要表达在细胞膜和细胞质上。其中, bEM7d组阳性细胞数最多, 差异有意义($P < 0.05$); EM7d、bM7d较M7d组比较阳性细胞数有增高($P < 0.05$); 组内28 d组较7 d组阳性细胞数较低($P < 0.05$)。bEM28d、EM28d、bM28d、M28d之间无统计学差异($P > 0.05$); 各手术组较S组阳性细胞数有增高($P < 0.05$, 图6和图

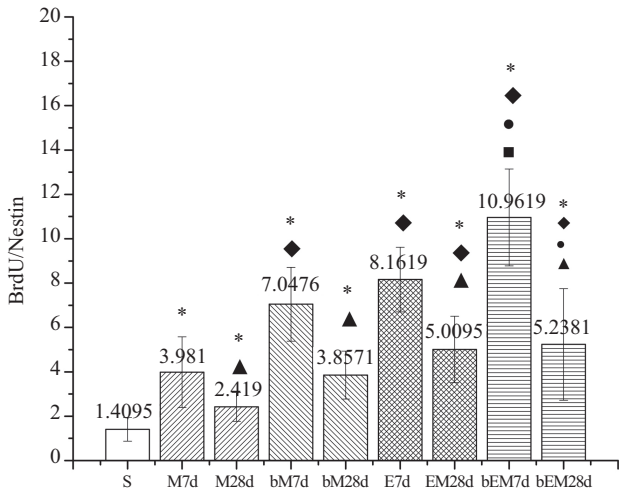


箭头表示免疫荧光染色阳性细胞。

Arrows showed postive cells of immunofluorescence staining.

图7 脑组织缺血半暗区切片VEGFR-2/CD34染色(400×)

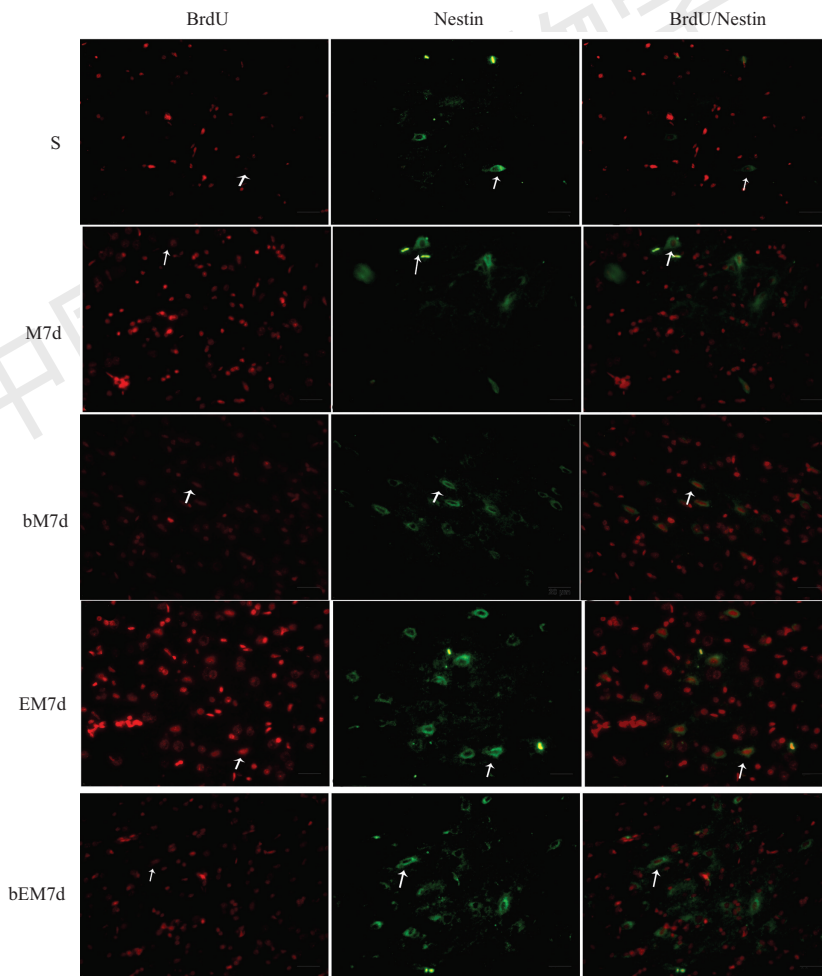
Fig.7 Immunofluorescence staining of VEGFR-2/CD34 of ischemic penumbra of rat brain tissue in each group (400×)



▲ $P < 0.05$, 与组内7 d组比较; * $P < 0.05$, 与S组比较; ◆ $P < 0.05$, 与同期M组比较; ● $P < 0.05$, 与同期bM组比较; ■ $P < 0.05$, 与同期EM组比较。
▲ $P < 0.05$ vs the 7 d in each group; * $P < 0.05$ vs S group; ◆ $P < 0.05$ vs the same time point of M group; ● $P < 0.05$ vs the same time point of bM group; ■ $P < 0.05$ vs the same time point of EM group.

图8 跑台训练、侧脑室注射bFGF对大鼠缺血半暗区BrdU/Nestin表达的影响($\bar{x} \pm s, n=7$)

Fig.8 The effect of treadmill and bFGF on the changes of BrdU/Nestin expression in rats after MCAO ($\bar{x} \pm s, n=7$)



箭头表示免疫荧光染色阳性细胞。

Arrows showed positive cells of immunofluorescence staining.

图9 脑组织缺血半暗区切片BrdU/Nestin染色(400×)

Fig.9 Immunofluorescence staining of BrdU/Nestin of ischemic penumbra of rat brain tissue in each group (400×)

7)。

2.5.2 跑台训练、侧脑室注射bFGF对脑缺血半暗区BrdU/Nestin的表达的检测结果 BrdU/Nestin双标可作为新生神经干细胞的指标, BrdU主要在细胞核表达, Nestin主要表达于细胞质, 阳性细胞指双染色细胞。其中, bEM7d阳性细胞数最多, 差异有意义($P < 0.05$); EM7d、bM7d较M7d组比较阳性细胞数有增高($P < 0.05$); EM28d、bEM28d较M28d阳性细胞数有增高, bEM28d组较bM28d组阳性细胞数有增高($P < 0.05$); 在组内, 28 d组较7 d组细胞数较低($P < 0.05$); 各组较S组阳性细胞数有增高($P < 0.05$, 图8和图9)。

2.6 Western blot检测结果

2.6.1 跑台训练对脑缺血半暗区bFGF的表达的检测结果 M组、EM组各时间点都有bFGF的表达增加, Western blot图像灰度比值较S组增高, 差异有意义($P < 0.05$); EM组Western blot图像灰度比值较M组高, 有显著性差异($P < 0.05$); 组内, 28 d组较7 d组Western

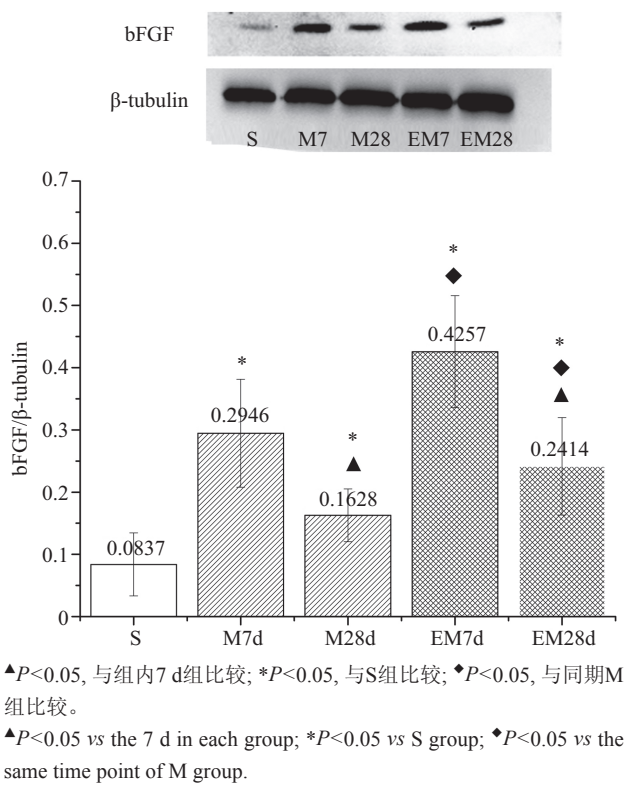


图10 跑台训练对脑缺血半暗区bFGF表达的Western blot检测结果($\bar{x}\pm s, n=7$)

Fig.10 The effect of treadmill on the changes of bFGF protein expression in rats after MCAO ($\bar{x}\pm s, n=7$)

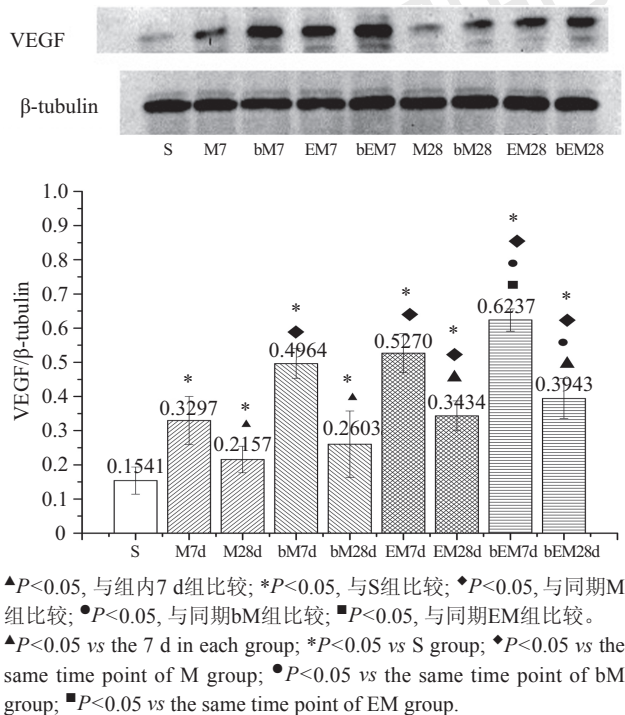


图12 跑台训练、侧脑室注射bFGF对大鼠缺血半暗区VEGF表达的影响($\bar{x}\pm s, n=7$)

Fig.12 The effect of treadmill and bFGF on the changes of VEGF protein expression in rats after MCAO ($\bar{x}\pm s, n=7$)

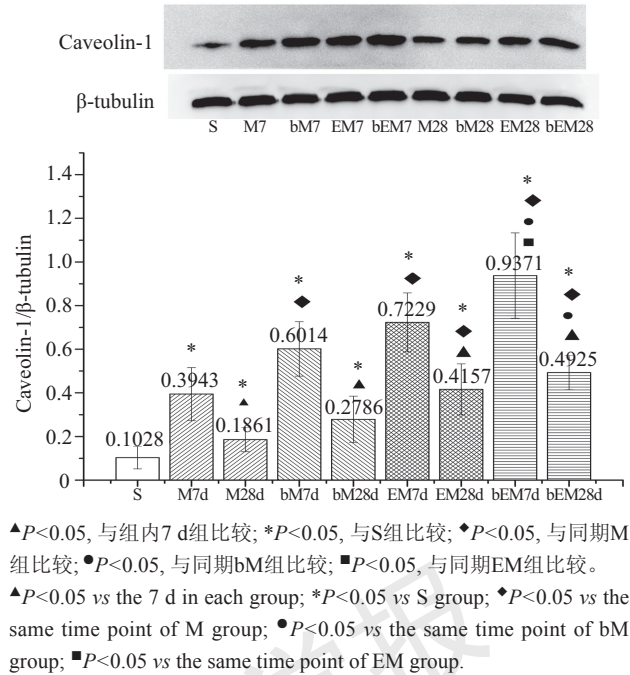


图11 跑台训练、侧脑室注射bFGF对大鼠缺血半暗区Caveolin-1表达的影响($\bar{x}\pm s, n=7$)

Fig.11 The effect of treadmill and bFGF on the changes of Caveolin-1 protein expression in rats after MCAO ($\bar{x}\pm s, n=7$)

blot图像灰度比值降低, 有显著性差异(*P*<0.05, 图10)。

2.6.2 跑台训练、侧脑室注射bFGF对脑缺血半暗区Caveolin-1的表达的检测结果 bEM7d组Caveolin-1的Western blot图像灰度比值较EM7d、bM7d、M7d明显增高, 差异有意义(*P*<0.05); EM7d、bM7d较M7d组图像灰度比值有增高(*P*<0.05); EM28d、bEM28d较M28d图像灰度比值有增高, bEM 28 d较bM28d图像灰度比值有增高(*P*<0.05); 但bM28d较M28d组、bEM28d较EM28d图像灰度比值无统计学差异; 在组内, 28 d组较7 d组Western blot图像灰度比值低(*P*<0.05); 各组较S组图像灰度比值高(*P*<0.05, 图11)。

2.6.3 跑台训练、侧脑室注射bFGF对脑缺血半暗区VEGF的表达的检测结果 bEM7d组VEGF的Western blot图像灰度比值较EM7d、bM7d、M7d明显增高, 差异有意义(*P*<0.05); EM7d、bM7d较M7d组图像灰度比值有增高(*P*<0.05); EM28d、bEM28d较M28d图像灰度比值有增高, bEM28d较bM28d图像灰度比值有增高(*P*<0.05); 但bM28d较M28d组、bEM28d较EM28d Western blot图像灰度比值无统计学差异; 在组内, 28 d组较7 d组Western blot图像灰度比值低

($P < 0.05$); 各组较S组图像灰度比值高, 有显著性差异($P < 0.05$, 图12)。

3 讨论

脑卒中是全球第三大死亡和残疾的病因, 其中缺血性脑卒中占总脑卒中的80%, 溶栓治疗是急性缺血性脑卒中的最有效方法。大约有80%缺血性脑卒中梗塞位于大脑中动脉(MCA)支配处, 且MCAO模型栓线拔出后血流恢复过程模拟人脑卒中后的溶栓治疗, 故本实验选用改良Belayev法复制MCAO模型, 基本符合缺血性脑卒中生理病理变化及溶栓治疗^[12-13]。Morancho等^[14]研究发现, 动脉闭塞45 min, TTC染色未见梗死灶, 动脉闭塞延长至60 min可见梗死灶; 且国外多数研究证明, 脑缺血90~180 min后再灌注模型稳定性较高, 故本实验选择缺血2 h后实行再灌注。

本实验采用Zea Longa 5分评分标准结合平衡试验对大鼠脑缺血后的运动功能、平衡功能进行综合评分, 规范化模型建立及实验入组标准。造模清醒后, 大鼠即出现神经功能失调, 表现为缺血对侧偏瘫、追尾征等神经功能障碍。Zea Longa 5分制评分虽被广泛应用于MCAO模型的成功评判, 但评分标准内容较少, 影响因素较多, 故本实验结合平衡试验进行综合评分, 互相弥补^[15-16]。

国内外研究发现, 任何形式的运动都可以促进缺血性脑卒中恢复, 这可能与激活内源性保护机制、促进多种生长因子的分泌(如VEGF、bFGF、Angiopoietin等)、抑制谷氨酸释放、炎症因子改变、减少细胞凋亡及促进神经血管再生等机制密切相关^[17]。动物的跑台训练作为一种经典的运动训练方式, 能很好地模拟人类肢体主动运动训练。Lan等^[18]研究表明, 跑台训练能上调五羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)及其受体(5-hydroxytryptamine/serotonin receptor 1A, 5-HT1A)、脑源性神经生长因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)和突触素(synaptophysin)的表达, 从而改善神经功能, 提高神经元可塑性。bFGF可以促进有丝分裂, 促进微血管的生长及分化, 增加局部毛细血管数, 促血管生成, 在神经损伤中保护神经元细胞, 促进神经胶质细胞分裂增殖。它在缺血性脑卒中保护作用已被广泛研究。多项研究均指出, bFGF能直接或间接地促进VEGF的表达, 更能通过调控VEGFR2的表达来增强VEGF的作

用。在体外培养内皮细胞时, 应用抑制剂阻断VEGF的表达, 增加bFGF不能诱导血管新生, 表明bFGF通过VEGF达到促血管的作用。bFGF可上调VEGF转录因子SP-1的表达, 在查阅文献中也发现, bFGF与VEGF在脑缺血中有很多的共同作用机制, 如都能激活磷脂酰肌醇3-激酶(phosphatidylinositol3-kinase, PI3K)/蛋白激酶B(protein kinase B, Akt)-谷氨酸转运体-1(glial glutamate transporter-1, GLT-1)-谷氨酸盐(glutamate)信号通路, 因此, 本实验认为, 脑缺血中bFGF与VEGF之间存在特殊的信号传导通路, bFGF在某一病理生理通路中可能是VEGF的上游。本实验发现, 侧脑室注射外源性bFGF后, 脑缺血半暗区Caveolin-1、VEGF表达明显增多, 神经血管再生能力增强, 证明bFGF确实能促进Caveolin-1、VEGF的表达, 且课题组前期实验根据Caveolin-1抑制剂所得结果已提出Caveolin-1是VEGF的上游, 可证明bFGF/Caveolin-1/VEGF这条通路在脑缺血中合理存在, bFGF可通过上调Caveolin-1进而促进VEGF表达。本实验还发现, 跑台训练后缺血半暗区bFGF表达明显增强, 可以推出跑台训练可通过bFGF/Caveolin-1/VEGF信号通路促进脑缺血半暗区神经血管新生的作用。在本实验中, M28d组与bM28d、EM28d组与bEM28d组Caveolin-1、VEGF、及BrdU/Nestin表达统计学上没有差异, 考虑与bFGF的给药方式及浓度相关, 本实验仅在再灌注后注射1次bFGF, 没有检测注射后的bFGF浓度, 且28 d后bFGF浓度下调无法保证持续有效浓度。在进一步的实验中, 可考虑采取更有效的给药方式, 如侧脑室注射携带bFGF的慢病毒, 持续稳定的释放bFGF。上述指标28 d组较相对应7 d组, 表达明显下调, 证明缺血性脑卒中早期治疗至关重要。外源性bFGF和跑台训练共同作用组较其他组Caveolin-1/VEGF表达明显增高, 神经血管再生能力最强, 提示外源性bFGF可增强跑台训练促进脑缺血半暗区神经血管再生能力, 但本实验没有检测侧脑室注射bFGF大鼠缺血半暗区bFGF的表达, 无法直接验证侧脑室注射bFGF与跑台训练Caveolin-1/VEGF表达最强是不是具有bFGF依赖性。同样, 本实验没有利用bFGF抑制剂研究bFGF与Caveolin-1的上下游关系, 无法直接观察bFGF抑制后跑台训练对神经血管的再生作用。在进一步的实验中可完成这一步骤, 体内通过siRNA沉默bFGF, 体外通过基

因沉默共同论证跑台训练介导bFGF/Caveolin-1/VEGF信号转导通路对大鼠缺血半暗区神经血管再生的调理,也更直观证明bFGF与Caveolin-1之间上下游关系。本实验验证了外源性bFGF上调脑缺血半暗区Caveolin-1和VEGF的表达以及跑台训练可通过bFGF/Caveolin-1/VEGF信号通路促进脑缺血半暗区神经血管再生。

参考文献 (References)

- 1 Dobkin BH. Strategies for stroke rehabilitation. *Lancet Neurol* 2004; 3(9): 528-36.
- 2 Wolf SL, Winstein CJ, Miller JP, Taub E, Uswatte G, Morris D, *et al.* Effect of constraint-induced movement therapy on upper extremity function 3 to 9 months after stroke: the EXCITE randomized clinical trial. *JAMA* 2006; 296(17): 2095-104.
- 3 Kang KA, Seong H, Jin HB, Park J, Lee J, Jeon JY, *et al.* The effect of treadmill exercise on ischemic neuronal injury in the stroke animal model: Potentiation of cerebral vascular integrity. *J Korean Acad Nurs* 2011; 41(2): 197-203.
- 4 Ding Y, Li J, Luan X, Ding YH, Lai Q, Rafols JA, *et al.* Exercise pre-conditioning reduces brain damage in ischemic rats that may be associated with regional angiogenesis and cellular over expression of neurotrophin. *J Neuroscience* 2004; 24(3): 583-91.
- 5 Hansen TM, Moss AJ, Brindle NP. Vascular endothelial growth factor and angiopoietins in neurovascular regeneration and protection following stroke. *Curr Neurovasc Res* 2008; 5(4): 236-45.
- 6 李雪梅, 牛文泽, 陈翔. 芹菜素对大鼠脑缺血再灌注后VEGF表达的影响及意义. *中国病理生理杂志* (Li Xuemei, Niu Wenze, Chen Xiang. Effect of apigenin on expression of VEGF in cerebral ischemia and reperfusion rats. *Chinese Journal of Pathophysiology*) 2010; 26(12): 2473-7.
- 7 牛文泽, 李雪梅, 王果, 汉旭, 陈翔. 芹菜素对局灶性脑缺血再灌注大鼠脑内caveolin-1表达的影响. *中草药* (Niu Wenze, Li Xuemei, Wang Guo, Han Xu, Chen Xiang. Effects of apigenin on caveolin-1 of focal cerebral ischemia reperfusion in rats. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*) 2010; 41(10): 1658-62.
- 8 Gao Y, Zhao Y, Pan J, Yang L, Huang T, Feng X, *et al.* Treadmill exercise promotes angiogenesis in the ischemic penumbra of rat brains through caveolin-1/VEGF signaling pathways. *Brain Res* 2014; 1585(10): 83-90.
- 9 Campuzano R, Barrios V, Cuevas B, Asin-Cardiel E, Muela A, Castro JM, *et al.* Serum basic fibroblast growth factor levels in exercise-induced myocardial ischemia more likely a marker of endothelial dysfunction than a marker of ischemia? *Eur J Med Res* 2002; 7(3): 93-7.
- 10 Park S, Jung Y. Combined actions of Na/K-ATPase, NCX1 and glutamate dependent NMDA receptors in ischemic rat brain penumbra. *Anat Cell Biol* 2010; 43(3): 201-10.
- 11 Jung SY, Choi JH, Kwon SM, Masuda H, Asahara T, Lee YM. Decursin inhibits vasculogenesis in early tumor progression by suppression of endothelial progenitor cell differentiation and function. *J Cell Biochem* 2012; 113(5): 1478-87.
- 12 Ruiz-Crespo S, Trejo-Gabriel-Galán JM, Coma-del-Corral MJ. Localizing coordinates of cerebral ischemic tissue without the need of staining in a rat model of focal cerebral infarct. *Metab Brain Dis* 2013; 28(1): 21-4.
- 13 Chiang T, Messing RO, Chou WH. Mouse model of middle cerebral artery occlusion. *J Vis Exp* 2011; 13(2): 48.
- 14 Morancho A, García-Bonilla L, Barceló V, Giralt D, Campos-Martorell M, García S, *et al.* A new method for focal transient cerebral ischaemia by distal compression of the middle cerebral artery. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2012; 38(6): 617-27.
- 15 Kawamata T, Alexis NE, Dietrich WD, Finklestein SP. Intracisternal basic fibroblast growth factor (bFGF) enhances behavioral recovery following focal cerebral infarction in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 1996; 16(4): 542-7.
- 16 Altumbabic M, Peeling J, del Bigio MR. Intracerebral hemorrhage in the rat: Effects of hematoma aspiration. *Stroke* 1998; 29(9): 1917-23.
- 17 Mourão FA, Leite HR, de Carvalho LE, Ferreira E, Vieira TH, Pinto MC, de Castro Medeiros D, *et al.* Neuroprotective effect of exercise in rat hippocampal slices submitted to *in vitro* ischemia is promoted by decrease of glutamate release and pro-apoptotic markers. *J Neurochem* 2014; 131(1): 65-73.
- 18 Lan X, Zhang M, Yang W, Zheng Z, Wu Y, Zeng Q, *et al.* Effect of treadmill exercise on 5-HT, 5-HT1A receptor and brain derived neurotrophic factor in rats after permanent middle cerebral artery occlusion. *Neurol Sci* 2014; 35(5): 761-6.