

· 基础研究 ·

意向性运动对局灶性脑缺血大鼠 ERK-CREB 通路表达的影响

沈琴 汤清平 聂晶晶 李思敏 殷俊 杨晓苏

【摘要】目的 探讨意向性运动对局灶性脑缺血大鼠行为学及缺血周围脑组织细胞外信号调节激酶(ERK)-环磷酸腺苷反应元件结合蛋白(CREB)通路表达的影响。**方法** 选取清洁级健康雄性SD大鼠,采用线栓法制备大鼠中动脉栓塞(MCAO)模型144只,按随机数字表法分为模型组、游泳运动组、饲养环境改变组和意向性运动组,每组36只大鼠;各组大鼠按术后时间分为脑缺血7d、15d和30d三个观察时间点,每个观察时间点各12只大鼠,动态观察各组大鼠每个观察时间点的行为学变化,并采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)和免疫荧光染色检测缺血周围脑组织ERK-CREB通路的表达水平。**结果** 意向性运动组各时间点爬梯频率明显高于环境改变组($P < 0.05$);各组大鼠神经功能缺损评分于缺血再灌注3d后随时间呈下降趋势,意向性运动组的神经功能缺损评分(1.33 ± 0.49 、 0.50 ± 0.52 、 0.08 ± 0.29)较模型组(2.00 ± 0.60 、 1.58 ± 0.67 、 1.00 ± 0.60)、游泳运动组(2.50 ± 0.52 、 1.00 ± 0.60 、 0.50 ± 0.52)及环境改变组(1.92 ± 0.52 、 1.00 ± 0.43 、 0.58 ± 0.52)均明显降低($P < 0.05$);再灌注7、15和30d,意向性运动组缺血周围脑组织ERK、CREB mRNA及pERK、pCREB蛋白的表达与其他三组比较均明显增加($P < 0.05$)。**结论** 意向性运动能改善局灶性脑缺血后的神经功能,可能与其上调并激活缺血周围脑组织ERK-CREB通路有关。

【关键词】 脑缺血; 运动疗法; 意向性运动; 信号通路

The effects of willed movement on the extracellular signal-regulated kinase and cAMP response element binding protein pathway following focal cerebral ischemia Shen Qin^{*}, Tang Qingping, Nie Jingjing, Li Simin, Yin Jun, Yang Xiaosu. ^{*} Department of Neurology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China
Corresponding author: Yang Xiaosu, Email: sjnk_xy@aliyun.com

【Abstract】 Objective To explore the effects of willed movement on neurological performance and the extracellular signal-regulated kinase (ERK) and cAMP response element binding protein (CREB) pathway in rats following focal cerebral ischemia. **Methods** Reversible middle cerebral artery occlusion was induced in 144 male Sprague-Dawley rats using intraluminal sutures, and they were randomly divided into a control group, a swimming exercise group, an environment modification group, and a willed movement group. The observation time points were at 7, 15 and 30 days after reperfusion. A behavioral test was performed to evaluate any neurological deficiency. Reverse transcription PCR (RT-PCR) and immunofluorescence were used to detect the ERK and CREB responses in terms of mRNA and phosphorylated ERK (pERK) and phosphorylated CREB (pCREB) protein in the peri-ischemic brain tissue. **Results** The climbing frequency of the willed movement group was significantly higher than that of the environment modification group. Three days after reperfusion the neurological deficit scores of all groups began to decrease, and that of the willed movement group had decreased significantly more than in the other three groups at all time points. ERK/CREB mRNA and pERK and pCREB protein expression were dramatically up-regulated in the willed movement group at 7, 15 and 30 days after reperfusion, significantly more than in the other three groups. **Conclusions** Willed movement may promote motor recovery by up-regulating and activating the ERK/CREB pathway following focal cerebral ischemia.

【Key words】 Brain ischemia; Exercise therapy; Willed movement; Signal pathways

脑血管病是临床常见病,以高发病率、高致残率和

高病死率为特点,我国平均年发病率为250/100 000,其中约70%~80%的患者遗留下不同程度的功能障碍^[1]。近年来,随着临床诊疗技术的发展,脑卒中病死率已明显下降,但其致残率仍在众多疾病中居于首位。因而,对脑卒中康复治疗手段及其机制的研究意义重大。意向性运动是指个体集中注意力、竭尽全力完成某一动作从而达到其预期目标的一种运动方式。

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2015.03.001

基金项目:国家自然科学基金项目(30973167),中南大学中央高校基本科研业务费专项资金资助(2013ttzs316)

作者单位:410008 长沙,中南大学湘雅医院神经内科[沈琴(现在中南大学湘雅二医院放射科)、聂晶晶、殷俊、杨晓苏];湖南省第二人民医院康复科(汤清平);中南大学湘雅口腔医院(李思敏)

通信作者:杨晓苏,Email:sjnk_xy@aliyun.com

研究^[2-3]显示,意向性运动较滚筒式网状训练器运动更能改善局灶性脑缺血大鼠的神经功能,但其作用机制目前尚未明确。基于上述研究背景,本研究以细胞外信号调节激酶(extracellular signal regulated kinase, ERK)-环磷酸腺苷反应元件结合蛋白(cAMP response element binding protein, CREB)通路为切入点,探讨意向性运动影响局灶性脑缺血大鼠神经功能的可能机制。

材料与方法

一、动物模型制备及分组

选取清洁级雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠, 8 ~ 10 周龄, 体重 220 ~ 250 g, 均由中南大学实验动物学部提供。所有实验均遵照国际动物保护和指南实施。参照 Longa 线栓法^[4]制备右侧大脑中动脉栓塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型, 具体操作步骤如下: 以 10% 水合氯醛腹腔内注射(剂量 5 ml/kg 体重)麻醉大鼠, 取仰卧位将其四肢及头部固定于手术台面。颈部备皮消毒后, 取颈正中切口, 沿胸锁乳突肌内缘分离筋膜和肌肉, 依次分离右侧颈总动脉(common carotid artery, CCA)、颈外动脉(external carotid artery, ECA)及颈内动脉(internal carotid artery, ICA), 在 CCA 远心端、近心端及 ECA 起始端挂线, 分别结扎 CCA 近心端和 ECA, 将 CCA 远心端的细线系松结备用。微动脉夹暂时夹闭 ICA 起始端, 用眼科剪于 CCA 距分叉口 1 cm 处剪一小口, 缓慢自切口沿 ICA 插入直径为 0.26 mm 且头端经钝化处理的鱼线, 插入深度约为(19 ± 1) mm 时, 可感觉到阻力感, 即提示栓线头端到达大脑中动脉(middle cerebral artery, MCA)入口, 停止进线, 系牢远心端的细线以固定栓线, 逐层缝合皮肤, 消毒伤口, 栓线在皮外留置长度约为 1 cm。2 h 后, 轻轻将栓线往外拔出 1 cm 左右, 使栓线头端与 MCA 入口脱离, 形成缺血再灌注。

再灌注后 2 h 按照改良的神经功能评分标准^[3]对大鼠进行神经功能缺损评分, 将得分为 2 分和 3 分的大鼠纳入本实验, 剔除者随后补充。将符合纳入条件的大鼠 144 只按随机数字表法分为模型组、游泳运动组、环境改变组和意向性运动组, 每组 36 只。各组大鼠按缺血再灌注后时间分为脑缺血 7 d、15 d 和 30 d 三个观察时间点, 每个观察时间点 12 只大鼠。

二、神经功能缺损评分

参照 Longa 等^[4]和 Berdenson 等^[5]的评分标准并加以改良^[3], 在脑缺血再灌注后第 1、3、7、15 和 30 天遵循盲法原则分别对各组大鼠进行神经功能缺损评分: 0 分, 无神经功能缺损; 1 分, 前肢屈曲; 2 分, 前肢屈曲, 侧推抵抗力下降; 3 分, 行走时向瘫痪侧转圈; 4 分, 行走时向瘫痪侧倾倒; 5 分, 不能自发行走, 有意识

丧失; 6 分, 死亡。

三、动物饲养及干预方式

大鼠 MCAO 术前第 3 天开始, 各组分别进行 3 天的适应性训练(第 1 天 10 min, 第 2 天 20 min, 第 3 天 30 min), MCAO 术后第 3 天开始进行运动干预。模型组大鼠不进行任何训练。

游泳运动组: 每天 10:00 将大鼠从常规饲养箱取出, 放入水箱(0.8 m × 0.8 m × 0.6 m)游泳 30 min, 水温 29 ~ 31 °C, 游泳期间出现呛咳或沉底超过 10 s 不能浮出水面者, 捞起休息 30 s 后继续; 游泳结束后用吸水毛巾擦干毛发, 碘伏消毒手术伤口, 再将大鼠放回常规饲养箱。

环境改变组和意向性运动组每天 10:00 将大鼠从常规饲养箱取出, 置于带人字梯(8 cm × 10 cm × 22 cm)的自制饲养箱(38 cm × 28 cm × 32 cm)。意向性运动组: 食物及水瓶置于箱顶, 大鼠经食物诱导后通过攀爬小梯或箱壁获取食物; 环境改变组: 食物置放在饲养笼内, 不进行食物诱导攀爬训练。期间计数 2 组大鼠爬梯或箱侧壁次数, 爬至梯顶或箱顶为 1 次, 爬至半梯或箱侧壁半高为 0.5 次, 30 min 后, 将大鼠放回常规饲养箱。按照公式爬梯频率(次/小时) = 爬梯次数/时间, 计算大鼠爬梯频率。

这 3 组大鼠除实施干预的时间外, 其余时间均饲养于常规饲养箱(40 cm × 30 cm × 18 cm)内, 食物均于上午干预结束后投放, 每天 17:00 撤除。

四、检测方法及观察指标

1. 逆转录-聚合酶链反应(reverse transcriptase-polymerase chain reaction, RT-PCR)检测缺血周围脑组织 ERK 和 CREB mRNA 的表达: 分别于缺血再灌注第 7、15 和 30 天, 每组大鼠各取 6 只, 断头取脑后去除小脑和脑干, 根据 Ashwal 等^[6]的研究, 取缺血侧大脑半球距嗅球尖端 7 ~ 11 mm 处脑组织, 用 RNA 提取试剂 Trizol (Invitrogen 公司)一步法提取总 RNA 后, 检测所得 RNA 的完整性及浓度。用逆转录试剂盒(MBI Fermentas 公司)合成 cDNA, 以 β-肌动蛋白(β-actin)为内参。经 DNA 序列数据库 GenBank 查出 CREB、ERK 及 β-actin 的 mRNA 序列(表 1), 引物由 Primer 6.0 软件设计、上海生物工程技术公司合成。

表 1 引物序列

基因	引物序列(5'-3')	PCR 产物 (bp)
CREB	上游: CCCAGGGAGGAGCAATACAG	258
	下游: GGGAGGACGCCATAACAACCT	
ERK	上游: ACCGTGACCTCAAGCCTTCC	212
	下游: GATGCAGCCACAGACCAAAA	
β-actin	上游: GAGACCTTCAACACCCAGCC	422
	下游: TCGGGCATCGGAACCGCTCA	

PCR 扩增体系:50 μ l, 其中 cDNA 3 μ l; 扩增条件如下:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 各指标相应温度退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 扩增 35 个循环, 72 $^{\circ}$ C 终末延伸 5 min, 4 $^{\circ}$ C 保温。其中, ERK、CREB、 β -actin 的退火温度分别为 60 $^{\circ}$ C、58 $^{\circ}$ C、55 $^{\circ}$ C。PCR 产物于 2% 琼脂糖凝胶电泳后, 用凝胶成像分析系统(上海天能公司)照相、Quantity One 软件(Bio-Rad)分析各电泳条带灰度值, mRNA 表达以“目的条带灰度值/ β -actin 条带灰度值”表示, 将各指标表达量化后进行统计学分析。

2. 免疫荧光检测缺血周围脑组织磷酸化 ERK (phosphorylated ERK, pERK) 和磷酸化 CREB (phosphorylated CREB, pCREB) 的表达: 分别于缺血再灌注第 7、15 和 30 天, 处死各组剩余的 6 只大鼠, 按常规方法进行脑组织灌流固定、取脑、后固定、脱水后, 冰冻切片(德国 Wetzlar 公司)自距嗅球尖端 7~11 mm 区域切片(厚 30 μ m)。应用漂片法进行 pERK 及 pCREB 的免疫荧光染色。

具体步骤如下: ① 0.01 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS) (pH7.4) 漂洗 3 次, 各 5 min; ② 0.1% Triton X-100 细胞通透 20 min; ③ PBS 漂洗后以 5% 驴血清封闭 15 min; ④ 依据所检测的蛋白分别在切片上滴加 PBS 稀释的兔 pERK 单克隆抗体 (1:200, Cell Signaling 公司)、兔 pCREB 单克隆抗体 (1:400, Cell Signaling 公司), 4 $^{\circ}$ C 孵育 48 h; ⑤ 室温下复温 30 min; ⑥ PBS 漂洗后, 滴加二抗, 即 Alexa Fluor 488 标记驴抗兔抗体 (1:200, Invitrogen 公司), 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h; ⑦ PBS 漂洗后, 晾干、封片、观察。上述 ⑥⑦ 均为暗室操作。

采用 Image-Pro Plus 6.0 软件对切片进行图像分析。每个时间点每只大鼠每个指标随机选取 4 张切片, 在倒置荧光显微镜 (Eclipse T1, 尼康公司) 下观察缺血周边区域, 每张切片选取 5 个不重复视野, 高倍镜下 (10 \times 40) 计数每个视野中的阳性细胞数, 测量总光密度值 (integrated optical density, IOD), 取均数作为测量值进行统计学分析。

五、统计学方法

应用 SPSS 19.0 版统计软件包进行统计学处理。

实验数据用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 所有数据均先进行正态性及方差齐性检验, 组间差异比较用 ANOVA 及 LSD 法分析。P < 0.05 认为差异有统计学意义。

结 果

一、各组大鼠神经功能缺损评分及比较

各组大鼠在再灌注后 2 h 的神经功能缺损评分最高, 1 d 后略下降, 第 3 天略有回升, 以后随时间推移各组评分均呈下降趋势, 再灌注后 2 h 及再灌注后第 1 和 3 天时间点的评分各组间差异均无统计学意义 (P > 0.05)。游泳运动组的神经功能缺损评分在再灌注后第 3 和 7 天时较模型组升高, 且在再灌注第 7 天时组间差异有统计学意义 (P < 0.05), 但在再灌注第 15 和 30 天时间点, 神经功能缺损评分较模型组明显下降 (P < 0.05); 环境改变组的神经功能缺损评分在再灌注后第 7、15 和 30 天时均低于模型组, 且在再灌注后第 15 和 30 天时组间差异有统计学意义 (P < 0.05); 意向性运动组在再灌注后第 7、15 和 30 天时神经功能缺损评分均明显低于其余 3 组 (P < 0.05)。详见表 2。

二、环境改变组和意向性运动组大鼠爬梯频率比较

环境改变组和意向性运动组大鼠的爬梯频率都呈逐渐增加的趋势, 在再灌注后第 7、15 和 30 天时, 意向性运动组大鼠的爬梯频率均较环境改变组大鼠明显增加 (P < 0.05)。详见表 3。

三、各组大鼠缺血周围脑组织 ERK 和 CREB mRNA 的表达

RT-PCR 检测显示, 模型组再灌注后第 15 天时, ERK 和 CREB mRNA 表达较再灌注后第 7 天时上调, 随后基本保持恒定; 与模型组比较, 游泳运动组再灌注第 7 天时的 ERK 和 CREB mRNA 表达减少 (P < 0.05), 而再灌注后第 15 和 30 天后的表达明显增加 (P < 0.05); 环境改变组各时间点的表达均较模型组明显增加 (P < 0.05); 意向性运动组各时间点的表达均较其余 3 组明显增加 (P < 0.05), 且随时间的推移呈递增趋势。具体数据详见表 4。

四、各组大鼠缺血周围脑组织 pERK 和 pCREB 蛋白的表达

表 2 各组大鼠脑缺血再灌注后各观察时间点神经功能缺损评分比较 (分, $\bar{x} \pm s$)

组别	只数	再灌注后 2 h	第 1 天	第 3 天	第 7 天	第 15 天	第 30 天
模型组	12	2.75 \pm 0.45	2.33 \pm 0.65	2.58 \pm 0.67	2.00 \pm 0.60	1.58 \pm 0.67	1.00 \pm 0.60
游泳运动组	12	2.83 \pm 0.39	2.33 \pm 0.89	2.67 \pm 0.65	2.50 \pm 0.52 ^a	1.00 \pm 0.60 ^a	0.50 \pm 0.52 ^a
环境改变组	12	2.83 \pm 0.39	2.25 \pm 0.87	2.58 \pm 0.79	1.92 \pm 0.52 ^b	1.00 \pm 0.43 ^a	0.58 \pm 0.52 ^a
意向性运动组	12	2.75 \pm 0.45	2.17 \pm 0.39	2.42 \pm 0.52	1.33 \pm 0.49 ^{abc}	0.50 \pm 0.52 ^{abc}	0.08 \pm 0.29 ^{abc}

注: 与模型组同时时间点比较, ^aP < 0.05; 与游泳运动组同时时间点比较, ^bP < 0.05; 与环境改变组同时时间点比较, ^cP < 0.05

表 3 环境改变组和意向性运动组大鼠脑缺血再灌注后各观察时间点爬梯频率比较(次/小时, $\bar{x} \pm s$)

组别	只数	第 3 天	第 7 天	第 15 天	第 30 天
环境改变组	12	4.12 ± 0.61	5.63 ± 0.74	8.04 ± 0.75	11.96 ± 0.66
意向性运动组	12	4.21 ± 0.58	8.58 ± 0.60 ^a	14.13 ± 0.98 ^a	18.79 ± 0.84 ^a

注:与环境改变组同时时间点比较,^a $P < 0.05$

免疫荧光染色显示,各组大鼠各时间点缺血周围脑组织均可见 pERK 和 pCREB 蛋白的表达(图 1、2),其中 pERK 在胞核、胞浆、胞膜均有表达,pCREB 主要表达于胞核。

模型组再灌注后第 15 天时,pERK 和 pCREB 表达

较再灌注后第 7 天上调,随后基本保持恒定;再灌注后第 7、15 和 30 天,游泳运动组、环境改变组、意向性运动组大鼠 pERK 和 pCREB 的表达随时间呈上升趋势;再灌注后第 7 天时,游泳运动组与模型组比较,pERK 和 pCREB 的表达均减少,且差异有统计学意义($P < 0.05$),而在再灌注后第 15 和 30 天时,pERK、pCREB 蛋白表达较模型组同时时间点明显增加($P < 0.05$);环境改变组大鼠 pERK 和 pCREB 的表达在各时间点均较同期模型组增多($P < 0.05$);意向性运动组的 pERK、pCREB 的表达在各时间点均较其余 3 组明显增多($P < 0.05$)。具体数据详见表 5 和表 6。

表 4 各组大鼠再灌注后各时间点缺血周围脑组织 ERK 和 CREB mRNA 的表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	ERK mRNA			CREB mRNA		
		第 7 天	第 15 天	第 30 天	第 7 天	第 15 天	第 30 天
模型组	6	0.14 ± 0.02	0.22 ± 0.01	0.23 ± 0.02	0.26 ± 0.02	0.33 ± 0.01	0.33 ± 0.01
游泳运动组	6	0.09 ± 0.02 ^a	0.33 ± 0.01 ^a	0.50 ± 0.02 ^a	0.21 ± 0.02 ^a	0.37 ± 0.01 ^a	0.52 ± 0.02 ^a
环境改变组	6	0.15 ± 0.02 ^b	0.32 ± 0.01 ^a	0.41 ± 0.03 ^{ab}	0.32 ± 0.01 ^{ab}	0.38 ± 0.02 ^a	0.49 ± 0.03 ^{ab}
意向性运动组	6	0.22 ± 0.02 ^{abc}	0.46 ± 0.03 ^{abc}	0.59 ± 0.02 ^{abc}	0.46 ± 0.03 ^{abc}	0.56 ± 0.02 ^{abc}	0.76 ± 0.03 ^{abc}

注:与模型组同时时间点比较,^a $P < 0.05$;与游泳运动组同时时间点比较,^b $P < 0.05$;与环境改变组同时时间点比较,^c $P < 0.05$

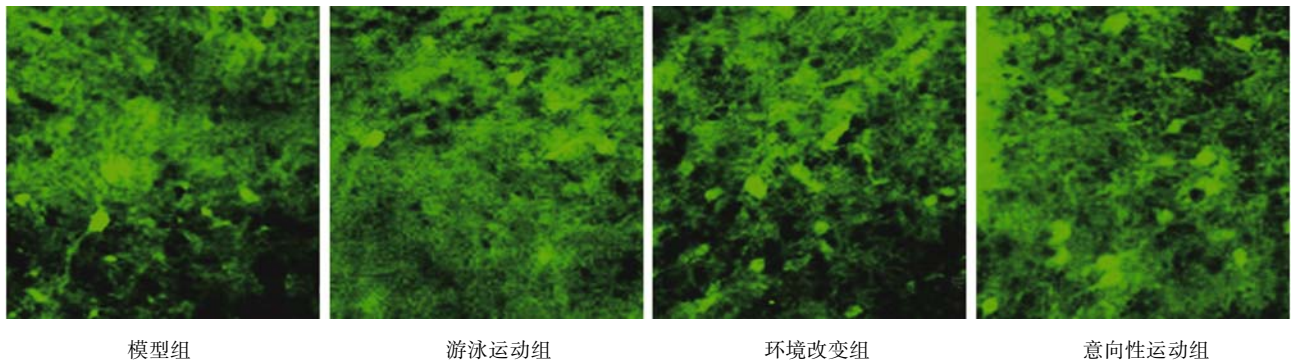


图 1 脑缺血再灌注后第 7 天各组大鼠缺血周围脑组织 pERK 表达(免疫荧光染色, × 400)

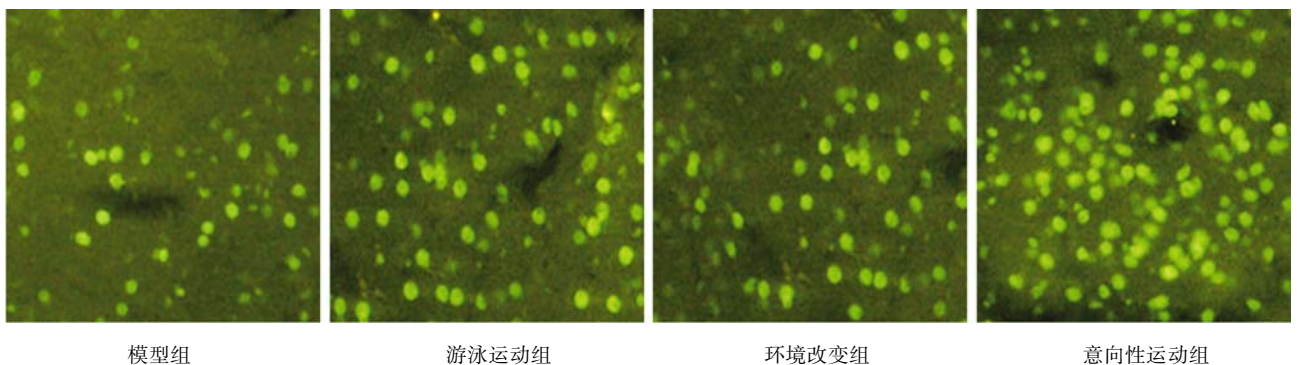


图 2 脑缺血再灌注后第 15 天各组大鼠缺血周围脑组织 pCREB 表达(免疫荧光染色, × 400)

表 5 各组大鼠各观察时间点缺血周围脑组织 pERK 和 pCREB 阳性细胞数比较(个/高倍镜视野, $\bar{x} \pm s$)

组别	只数	pERK			pCREB		
		第 7 天	第 15 天	第 30 天	第 7 天	第 15 天	第 30 天
模型组	6	18.0 ± 2.3	25.7 ± 2.6	26.0 ± 2.8	24.7 ± 2.7	35.3 ± 1.9	36.3 ± 1.8
游泳运动组	6	13.7 ± 2.7 ^a	38.2 ± 3.4 ^a	62.2 ± 3.8 ^a	18.3 ± 2.9 ^a	41.5 ± 1.0 ^a	85.8 ± 4.2 ^a
环境改变组	6	18.7 ± 2.9 ^b	37.2 ± 2.6 ^a	50.8 ± 2.9 ^{ab}	28.2 ± 3.2 ^b	49.2 ± 1.05 ^{ab}	74.3 ± 5.0 ^{ab}
意向性运动组	6	29.3 ± 2.43 ^{abc}	56.8 ± 3.2 ^{abc}	74.0 ± 2.4 ^{abc}	39.5 ± 4.9 ^{abc}	81.5 ± 3.3 ^{abc}	104.7 ± 5.5 ^{abc}

注:与模型组同时时间点比较,^a $P < 0.05$;与游泳运动组同时时间点比较,^b $P < 0.05$;与环境改变组同时时间点比较,^c $P < 0.05$

表 6 各组大鼠各观察时间点缺血周围脑组织 pERK 和 pCREB 的 IOD 值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	pERK ($\times 10^3$)			pCREB ($\times 10^3$)		
		第 7 天	第 15 天	第 30 天	第 7 天	第 15 天	第 30 天
模型组	6	2.13 \pm 0.23	3.02 \pm 0.26	3.07 \pm 0.24	6.52 \pm 0.46	7.41 \pm 0.40	7.36 \pm 0.84
游泳运动组	6	1.46 \pm 0.18 ^a	4.43 \pm 0.33 ^a	6.40 \pm 0.28 ^a	5.85 \pm 0.39 ^a	7.94 \pm 0.34 ^a	12.04 \pm 0.94 ^a
环境改变组	6	2.24 \pm 0.15 ^b	4.32 \pm 0.26 ^a	5.38 \pm 0.37 ^{ab}	7.13 \pm 0.33 ^{ab}	8.22 \pm 0.69 ^a	11.61 \pm 0.63 ^{ab}
意向性运动组	6	3.46 \pm 0.18 ^{abc}	6.45 \pm 0.36 ^{abc}	8.15 \pm 0.38 ^{abc}	8.02 \pm 0.41 ^{abc}	12.41 \pm 1.28 ^{abc}	16.03 \pm 1.77 ^{abc}

注:与模型组同时时间点比较,^a $P < 0.05$;与游泳运动组同时时间点比较,^b $P < 0.05$;与环境改变组同时时间点比较,^c $P < 0.05$

讨 论

ERK 是丝裂原活化蛋白激酶的家族成员之一, pERK 为其活化形式。1992 年就有学者提出, ERK 参与脑缺血再灌注后的神经元损伤过程^[7], 但更多的研究证实, ERK 活化无论是在局灶性脑缺血或全脑缺血中均对神经元存活具有保护作用^[8-10], 其可能通过活化 CREB 后上调脑源性神经生长因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 的表达^[8] 和激活其下游通道调节凋亡相关蛋白 Bcl-x、Bax 等的表达阻止神经元凋亡, 减小脑梗死体积, 从而产生脑缺血损伤后的自我保护机制^[10]。CREB 是一种细胞核内转录因子, 也是 ERK 的重要下游因子, pCREB 为其活化形式。pCREB 通过调控 BDNF、 α -氨基-3-羟基-5-甲基-4-异恶唑丙酸 (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid, AMPA) 受体亚基、神经生长因子、突触素等目的基因的转录, 对神经元的生长发育及存活、突触可塑性、学习记忆等发挥重要作用^[11-13]。另有研究显示, pCREB 可通过 AMPA 受体亚基-2 即谷氨酸受体-2 (glutamate receptor type 2, GluR2) 基因的 Q/R 位点调节 GluR2 蛋白的表达, 阻止 AMPA 受体通道的 Ca^{2+} 内流, 保护受损神经元, 增强突触可塑性^[12], 对脑缺血损伤具有持久性的保护作用^[14], 而且这种神经元保护作用与 CREB 的磷酸化水平呈正相关^[15]。有关运动对 CREB 表达影响的研究显示, 小强度运动通过激活 CREB-BDNF 信号通路, 增强突触可塑性, 改善老龄大鼠的空间学习和记忆能力^[13], 而高强度运动 (60 min/d, 跑台运动) 则抑制大鼠纹状体 ERK 及海马、纹状体、额叶皮质 CREB 的表达^[16]。

本课题组前期研究已报道, 对局灶性脑缺血大鼠给予意向性运动干预后, 与网状式滚筒运动及环境改变比较, 大鼠的运动功能改善更为明显, 且缺血周围脑组织 AMPA 受体及蛋白激酶 C α 相互作用蛋白 (protein interacting with C α kinase, PICK1) 的表达明显增多, 且呈现增强的长时程抑制 (long term depression, LTD), 提示突触传递效能增强^[2-3]。另有研究报道, 意向性运动可通过增加缺血半暗带脑组织神经营养因子-3、生长相关蛋白-43、胶质纤维酸性蛋白及突触素的表达, 增强缺血损伤后神经元的再生和修复^[17-18]。本研究在以

往研究的基础上, 增加游泳运动组, 进一步比较意向性运动与游泳运动对局灶性脑缺血大鼠康复治疗效果的优劣, 并通过检测缺血周围脑组织 ERK-CREB 通路的表达探讨其可能机制。本研究结果显示, 意向性运动组大鼠神经功能改善较其余 3 组更为明显, 且缺血半暗带区在各时间点的 pERK 和 pCREB 阳性细胞数以及 IOD 值均较其余 3 组明显升高 ($P < 0.05$), 并与 ERK 和 CREB mRNA 水平变化一致, 提示意向性运动能改善局灶性脑缺血大鼠的神经功能, 而且较游泳运动有更明显的优势。故推测大鼠在饥饿刺激下, 为获取生存所必需的食物而主动进行的意向性运动更能上调并激活缺血周围脑组织的 ERK-CREB 通路, 进一步调控下游 BDNF、AMPA 受体及凋亡相关蛋白等的表达, 阻止神经元凋亡, 增强突触可塑性, 从而促进脑缺血后的功能恢复。本研究中, 模型组大鼠 pERK 和 pCREB 水平在脑缺血再灌注后 7 和 15 d 呈上升趋势, 之后表达水平基本恒定, 提示脑缺血损伤后 ERK-CREB 的反应性表达上调在脑缺血后 15 d 左右达峰值, 随后将持续保持较高水平直至 30 d^[9, 14]。环境改变组大鼠接受干预时亦存在自主性运动, 但其运动仅为一种娱乐方式, 攀爬次数少, 运动强度小, 但以往研究^[19]显示的丰富环境可通过改变 N-甲基-D-天冬氨酸盐 (N-methyl-D-aspartic acid, NMDA) 及 AMPA 受体的表达, 增加树突分支及树突棘的数量, 增加移植干细胞向损伤区域转移等改善脑缺血后的神经功能。

本研究中, 环境改变组大鼠在再灌注后 15 和 30 d 时的神经功能评分均较模型组同时时间点改善更为明显 ($P < 0.05$), ERK mRNA、CREB mRNA 及 pERK 和 pCREB 的表达亦较模型组增加, 提示丰富环境改善脑缺血后的神经功能也可能与上调并激活 ERK-CREB 通道有关。游泳运动组大鼠在缺血再灌注 7 d 时, 神经功能评分较模型组升高, ERK-CREB 表达较模型组明显下降, 这与近期的研究显示强化游泳运动在脑缺血再灌注 3 d 时即能明显改善大鼠运动功能不一致^[20], 考虑可能是由于样本量过小所致; 或者是因为脑缺血后早期的非自主性运动使大鼠处于应激状态, 体内皮质醇水平升高抑制了 ERK-CREB、BDNF 的表达^[21]; 或因较高强度运动增加脑耗氧量, 降低脑组织抗氧化能力^[16], 从而中和了部分运动对脑缺血后功能恢复的促

进作用,而随着大鼠对这种运动方式及强度的适应,运动对功能改善的促进作用逐渐凸显,故在再灌注 15 和 30 d 时,游泳运动组大鼠的运动功能较模型组明显改善,ERK-CREB 的表达也较模型组明显上调。

综上所述,意向性运动能明显改善局灶性脑缺血大鼠的神经功能,可能与其上调并激活缺血周围脑组织 ERK-CREB 通路有关。本研究的不足之处:①干预组大鼠的运动量监测采用计数爬梯频率,可能存在组间运动强度控制不精准的问题;②没有采用 ERK-CREB 通路的特异性阻断剂。未来的研究可考虑应用血糖、血乳酸、ATP 酶等生化指标从代谢水平控制各组大鼠运动量,并给予 ERK-CREB 通路特异性阻断剂,以更进一步观察意向性运动干预后 ERK-CREB 通路对局灶性脑缺血大鼠的特定影响。

参 考 文 献

- [1] Truelsen T, Mähönen M, Tolonen H, et al. Trends in stroke and coronary heart disease in the WHO MONICA Project[J]. *Stroke*, 2003, 34(6):1346-1352.
- [2] Tang QP, Yang QD, Hu Z, et al. The effects of willed movement therapy on AMPA receptor properties for adult rat following focal cerebral ischemia[J]. *Behav Brain Res*, 2007, 181(2):254-261.
- [3] Tang Q, Tan L, Yang X, et al. Willed-movement training reduces motor deficits and induces a PICK1-dependent LTD in rats subjected to focal cerebral ischemia[J]. *Behav Brain Res*, 2013, 256:481-487.
- [4] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. *Stroke*, 1989, 20(1):84-91.
- [5] 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.
- [6] Ashwal S, Tone B, Tian HR, et al. Core and penumbral nitric oxide synthase activity during cerebral ischemia and reperfusion[J]. *Stroke*, 1998, 29(5):1037-1046.
- [7] Campos-González R, Kindy MS. Tyrosine phosphorylation of microtubule-associated protein kinase after transient ischemia in the gerbil brain[J]. *J Neurochem*, 1992, 59(5):1955-1958.
- [8] Zhang QG, Han D, Hu SQ, et al. Positive modulation of AMPA receptors prevents down-regulation of GluR2 expression and activates the Lyn-ERK1/2-CREB signaling in rat brain ischemia[J]. *Hippocampus*, 2010, 20(1):65-77.
- [9] Kovalska M, Kovalska L, Pavlikova M, et al. Intracellular signaling MAPK pathway after cerebral ischemia-reperfusion injury[J]. *Neurochem Res*, 2012, 37(7):1568-1577.
- [10] Liebelt B, Papapetrou P, Ali A, et al. Exercise preconditioning reduces neuronal apoptosis in stroke by up-regulating heat shock protein-70 (heat shock protein-72) and extracellular-signal-regulated-kinase 1/2[J]. *Neuroscience*, 2010, 166(4):1091-1100.
- [11] Chen L, Miyamoto Y, Furuya K, et al. PREGS induces LTP in the hippocampal dentate gyrus of adult rats via the tyrosine phosphorylation of NR2B coupled to ERK/CREB signaling[J]. *J Neurophysiol*, 2007, 98(3):1538-1548.
- [12] Peng PL, Zhong X, Tu W, et al. ADAR2-dependent RNA editing of AMPA receptor subunit GluR2 determines vulnerability of neurons in forebrain ischemia[J]. *Neuron*, 2006, 49(5):719-733.
- [13] Aguiar AS Jr, Castro AA, Moreira EL, et al. Short bouts of mild-intensity physical exercise improve spatial learning and memory in aging rats: involvement of hippocampal plasticity via AKT, CREB and BDNF signaling[J]. *Mech Ageing Dev*, 2011, 132(11-12):560-567.
- [14] Tanaka K, Nogawa S, Nagata E, et al. Temporal profile of CREB phosphorylation after focal ischemia in rat brain[J]. *Neuroreport*, 1999, 10(11):2245-2250.
- [15] Tanaka K, Nogawa S, Nagata E, et al. Persistent CREB phosphorylation with protection of hippocampal CA1 pyramidal neurons following temporary occlusion of the middle cerebral artery in the rat[J]. *Exp Neurol*, 2000, 161(2):462-471.
- [16] Aguiar A, Boemer G, Rial D, et al. High-intensity physical exercise disrupts implicit memory in mice: involvement of the striatal glutathione antioxidant system and intracellular signaling[J]. *Neuroscience*, 2010, 171(4):1216-1227.
- [17] 侯德仁, 沙地克·沙吾提, 刘建锋, 等. 意向运动疗法对大鼠局灶性脑缺血后 GFAP 和 SYP 表达的影响[J]. *南方医科大学学报*, 2011, 31(9):1543-1546.
- [18] 侯德仁, 沙地克·沙吾提, 刘建锋, 等. 意向运动疗法对大鼠局灶性脑缺血后 NT-3 和 GAP-43 表达的影响[J]. *南方医科大学学报*, 2011, 31(8):1401-1404.
- [19] 李娟, 谢斌. 丰富环境与脑卒中康复[J]. *中国康复理论与实践*, 2012, 18(1):47-52.
- [20] 王玉阳, 王佩佩, 张振燕, 等. 不同强度游泳训练对脑缺血再灌注大鼠蛋白激酶 A 表达的影响[J]. *中华物理医学与康复杂志*, 2013, 35(7):513-518.
- [21] Ke Z, Yip SP, Li L, et al. The effects of voluntary, involuntary, and forced exercises on brain-derived neurotrophic factor and motor function recovery: a rat brain ischemia model[J]. *PLoS One*, 2011, 6(2):e16643.

(修回日期:2014-12-30)

(本文编辑:汪玲)