基础研究 文章编号：0253-3626（2011）05-0578-04

运动锻炼对局灶性脑缺血大鼠脑皮质 RGMa 表达的影响

郭振委，秦新月，孔渝菡
（重庆医科大学附属第一医院神经内科，重庆市高校神经病学重点实验室，重庆 400016）

【摘 要】目的：探讨运动锻炼对卒中后大鼠缺血侧脑皮质排斥性导向分子 A（Repulsive guidance molecule A，RGMa）表达的影响。方法：选用 SD 大鼠 120 只，随机分为 5 组，正常组，假手术组，MCAo 模型 7、14、28 d 组，以上各组再分为：非运动、低运动量、中动量、高动量锻炼组，每组 6 只。应用线栓法制备局灶性脑缺血/再灌注模型，用实时定量 PCR 和免疫组化方法检测缺血侧脑皮质 RGMa 的表达。结果：①实时定量 PCR：低运动量模型各组与对应时间点非运动模型组比，RGMa 相对表达量差异无统计学意义（$P>0.05$）。中运动量模型各组与各对应时间点非运动模型组相比，前者表达量显著下降（$P<0.05$），高运动量模型各组与对应时间点非运动模型组相比，RGMa 相对表达量显著升高（$P<0.05$）。②免疫组化：低运动量模型各组与对应时间点各非运动模型组相比，RGMa 表达差异无统计学意义（$P>0.05$）。中运动量模型各组与对应时间点各非运动模型组相比，前者 RGMa 表达明显下降（$P<0.05$），但中运动量模型 7 d 组 RGMa 表达量与对应非运动模型组相比差异无统计学意义（$P>0.05$），高运动量模型各组与对应时间点各非运动模型组相比，RGMa 表达明显增加（$P<0.05$）。神经功能评分显示中运动量模型组明显改善神经功能（$P<0.05$）。结论：适量锻炼可以降低局灶性脑缺血大鼠患侧皮质 RGMa 的表达，改善神经功能。

【关键词】运动锻炼；脑缺血；排斥性导向分子 A；实时定量 PCR
【中国图书分类法分类号】R743.33 【文献标志码】A 【收稿日期】2011-02-22

Effects of treadmill exercise on the expression of RGMa in infarcted brain cortex of rats after middle cerebral artery occlusion/reperfusion

GUO Zhen-wei, QIN Xin-yue, KONG Yu-han
(*Department of Neurology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To observe the expression of RGMa in infarcted brain cortex of rats with middle cerebral artery occlusion (MCAo) after experiencing treadmill exercise. *Methods*: 120 Sprague-Dawley rats were randomly divided into 5 groups: control group, sham-operation group, and 7, 14, 28 d after ischemia group. Then each group above were randomly divided into four groups: sedentary group, low-intensity, moderate-intensity, high-intensity treadmill exercise group with MCAo. The MCAo/reperfusion model was induced by ligation with nylon monofilament in rats in the study. *Results*: ①Real-time quantitative PCR (RT-qPCR): There are no significant differences between each low-intensity treadmill MCAo group and each sedentary MCAo group for expression of RGMa mRNA ($P>0.05$). There was down-regulation of it in each moderate-intensity treadmill exercise MCAo group, compared with each sedentary MCAo group ($P<0.05$). But there was up-regulation in high-intensity treadmill exercise MCAo group ($P<0.05$). ②The result of immunohistochemistry: There was no significant difference between each sedentary MCAo group and each low-intensity treadmill exercise MCAo group ($P>0.05$). The expression of RGMa was down-regulated in moderate-intensity treadmill exercise MCAo group, except at 7 d, compared with each sedentary MCAo group ($P<0.05$). But the opposite result was got in high-intensity treadmill exercise MCAo group ($P<0.05$). Neurological deficit scores test showed moderate-intensity treadmill exercise improved neurological function in MCAo group ($P<0.05$). *Conclusion*: Moderate-intensity treadmill exercise decreased the expression of RGMa in the peri-ischemia cortex after ischemia stroke and the impaired neural function was improved.

【Key words】treadmill exercise; cerebral ischemia; RGMa; RT-qPCR

脑卒中后的神经康复与脑的可塑性有关，而排斥性导向分子 A（Repulsive guidance molecule A，RGMa）就是一种新发现的与脑可塑性密切相关的分子；它是一种新的轴突生长抑制蛋白，在中枢神经生长发育过程中起多种作用，介导排斥性轴突导向信号和神经管闭合、调控着神经细胞的增殖、分化、存活、诱导生长锥塌陷，从而阻断受损神经再生，影响脑的可塑性[1]。卒中后 RGMa 表达增加，降低了脑的可塑性。有证据表明：运动锻炼可以促进局灶性脑缺血大鼠神经功能的康

作者介绍：郭振委（1982-），男，硕士，研究方向：脑血管疾病。
通信作者：秦新月，女，教授，Email:qinxinyue@yahoo.com。
基金项目：国家自然科学基金资助项目（编号：30770762，30970987）；重庆医科大学附属第一医院基金资助项目（编号：YXJJ2009-02）。

复，本实验拟观察运动锻炼对缺血侧脑皮质 RGMa 表达的影响，探讨卒中后运动锻炼、功能康复与 RGMa 之间的联系。

1 材料与方法

1.1 材料

ABI 7500 Real-Time PCR System（Applied Biosystems），SLY-RTML 六通道动物跑台（北京硕林苑）。RNA 提取试剂 RNA 提取试剂（RNAiso Reagent）（Takara），PrimeScriptTM RT reagent Kit（Takara），PCR 引物（如表 1），BioEasy SYBR Green I 荧光 PCR 试剂盒（杭州博日）。兔多克隆 RGMa 一抗（Abcam）。

1.2 方法

1.2.1 实验动物与分组 成年健康 SD 雄性大鼠，体重 200~280 g，120 只。由重庆医科大学实验动物中心提供。随机分为 5 组，正常组、假手术组（n=24）、MCAo 模型 7 d（n=24）、14 d（n=24）、28 d 组（n=24），以上各组再随机分为非运动、低运动量、中动量、高动量组，每组各 6 只。术前 12 h 禁食不禁水。

1.2.2 大鼠大脑中动脉缺血/再灌注模型制备、神经功能评分

参照 Longa 和 Nagasawa 等方法，结合其他研究者经验，采用线栓法制作大鼠右侧 MCAo/再灌注模型。神经功能评分按 Longa 法进行。

1.2.3 大鼠锻炼方法 各组大鼠均在术前经过 3 d 适应性跑台训练，每天 30 min，分别为 8 m/min，5 min；11 m/min，5 min；15 m/min，20 min。模型组大鼠在缺血再灌注 3 d 后，给予跑台训练。低运动量组，5 m/min，5 min；7 m/min，5 min；9 m/min，20 min。中运动量组，8 m/min，5 min；10 m/min，5 min；13 m/min，20 min。高运动量组，8 m/min，5 min；11 m/min，5 min；20 m/min，20 min。30 min/d，5 d/ 周。

1.2.4 RT-qPCR 反应体系、条件及数据处理

1.2.4.1 RNA 提取及反应条件总 RNA 提取 严格按说明书进行；反应体系：20 μl，反应条件：94℃，2 min，94℃ 10 s，60℃ 15 s，72℃ 31 s，共 40 循环。通过生成的融解曲线确定反应产物的单一性。

1.2.4.2 $2^{-\Delta\Delta Q}$ 法对 RGMa 基因进行相对定量运用相对定量（Relative quantity，RQ）法（$RQ=2^{-\Delta\Delta Q}$）计算目的基因相对表达差异。每个样本的 ΔCt=Ct（target gene）-Ct（β-Actin），$\Delta\Delta Ct=\Delta Ct$（缺血样品）$-\Delta Ct$（正常样品）。

1.2.5 免疫组化检测 按 SABC 免疫组化试剂盒说明书操作，以及 DAB 显色光镜下观察胞膜棕黄色颗粒为阳性着色。应用 Image-pro plus 软件分析，高倍镜（×400）下，在皮质区随机各取 4 个视野计数阳性细胞，以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示。

1.2.6 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计分析软件，数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。资料采用单因素方差分析，组间两两比较方差齐者用 LSD-t 法检验，方差不齐者采用 Dunnet's T3 法检验，以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 神经功能评分

高运动量 7 d 模型组与对应非运动模型组、低运动量模型组相比，神经功能评分差异有统计学意义（P<0.05）。模型 14、28 d 组给予中运动量，大鼠神经功能改善优于对应时间点非运动、低运动量模型组和高运动量模型组（P<0.05）（如表 2）。

2.2 SYBR Green 实时定量 PCR

2.2.1 PCR 产物确定分析 用 ABI7500 配套程序分析软件生成 RGMa 融解曲线，RGMa 基因 PCR 产物的融解曲线峰值约在 87℃，融解温度均一。RGMa 融解曲线峰值高，形状锐利示 RGMa 表达较高，产物特异（如图 1~3）。

2.2.2 SYBR Green 实时定量 PCR 部分扩增曲线 图 4~6 示 MCAo中运动量大鼠缺血侧皮质 RGMa 和 β-actin 的扩增曲线。

表 1 RGMa 和内参引物序列

基因	引物序列	温度	长度
RGMa	Sence:5'-GACTTTCACAGACCACTTCCAGACA-3' Antisense:5'-CTCGTCCATCTCGGCTTGGTA-3'	60℃	199 bp
β-Actin	Sence:5'-GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTA-3' Antisense:5'-GACTCATCGTACTCCTGCTTGCTG-3'		150 bp

表 2 各组大鼠神经功能评分（$\bar{x} \pm s$，n=6）

分组	非运动	低运动量	中运动量	高运动量
正常组	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
假手术组	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
MCAo				
7 d	1.50 ± 0.50●	1.50 ± 0.50●	1.33 ± 0.53●	1.83 ± 0.53▲●
14 d	1.33 ± 0.46●	1.33 ± 0.46●	1.00 ± 0.33▲●	1.83 ± 0.53▲●
28 d	1.17 ± 0.49●	1.17 ± 0.49●	0.67 ± 0.51▲●	1.67 ± 0.50▲●

注：▲，P<0.05，与非运动组相比；●，P<0.05，与正常组和假手术组

基础研究 文章编号：0253-3626（2011）05-0582-04

核心家系 5- 羟色胺转运体基因启动子区多态性与自杀未遂的关联分析

艾 明，高新学，陈建梅，王 我，甘 窈，李大奇，况 利
（重庆医科大学附属第一医院心理卫生中心，重庆 400016）

【摘 要】目的：探讨 5- 羟色胺转运体（Serotonin transporter，5-HTT）基因启动子区多态性（Serotonin transporter gene-linked polymorphic region，5-HTTLPR）位点与自杀未遂之间关联系。方法：以重庆地区汉族人群中自杀未遂核心家系作为研究对象，应用聚合酶链反应技术（Polymerase chain reaction，PCR）检测 5-HTTLPR 位点多态性与自杀未遂之间的分子遗传学联系进行了以家系为基础的基于单体型的单体型相对风险（Haplotype based haplotype relative risk，HHRR）分析及连锁不平衡（Transmission disequilibrium test，TDT）分析。结果：86 个核心家系 258 个家系成员的 5-HTTLPR 基因型和基因频率在患者组与父母组间比较（χ^2=0.088，P=0.767；χ^2=2.670，P=0.263）无显著性差异。HHRR 分析结果显示自杀未遂患者组与虚拟对照组之间的 5-HTTLPR（χ^2=0.26，P>0.05）基因频率无显著性差异。多等位基因 TDT 统计分析 5-HTTLPR 与自杀未遂间未发现存在连锁不平衡（χ^2=2.67，P>0.05）。在 57 个有精神病自杀未遂核心家系中有 47 个杂合子父母纳入 5-HTTLPR 位点的分析，其中有 25 个 S 等位基因传给了患病子女，有 12 个 L 等位基因传递给了患病子女（χ^2=4.57，P<0.05）。结论：汉族人群中 5-HTTLPR 多态性位点与有精神病自杀未遂者间存在连锁不平衡。

【关键词】自杀未遂；基因；多态现象（遗传学）；5- 羟色胺转运体；传递不平衡检验
【中国图书分类法分类号】R195.1 【文献标志码】A 【收稿日期】2011-01-09

An analysis on relationship between polymorphism of serotonin transporter gene-linked polymorphic region and attempted suicide in center families

AI Ming，GAO Xin-xue，CHEN Jian-mei，WANG Wo，GAN Qao，LI Da-qi，KUANG Li
(Center of Mental Health，the First Affiliated Hospital，Chongqing Medical University)

【Abstract】*Objective*：To explore the association between attempted suicide and polymorphism of serotonin transporter gene-linked polymorphic region（5-HTTLPR）. *Methods*：Suicide attempts core families were recruited from the Han population in Chongqing. Using the technique of polymerase chain reaction（PCR）and restriction fragment length polymorphism techniques. A family-based link-age relative risk based on haplotype and disequilibrium analysis were conducted. *Results*：No significant difference of genotypic frequence of 5-HTT gene polymorphism in the promoter region（5-HTTLPR）between the patients and the parents from 258 family members of 86 core families（χ^2=0.088，P=0.767；χ^2=2.670，P=0.263）. the HHRR（χ^2=0.26，P>0.05）and the TDT（χ^2=2.67，P>0.05）of multiple allele did not show association between polymorphism of 5-HTTLPR and attempted suicide. There were 47 heterozygous parents of 5-HTTLPR in 57 psychiatric suicide attempts core families，25 S alleles and 12 L alleles of which transmitted to the suffered children（χ^2=4.57，

作者介绍：艾 明（1981-），男，助教，硕士，
研究方向：自杀的生物学病因及危机干预。
通信作者：况 利，女，教授，Email：kuangLi0308@163.com。
基金项目：重庆市卫生局医学科研计划资助项目（编号：07-2-049）。

injury-induced repulsive guidance molecule expression in the adult human brain[J].Arch Neurol，2005，62（10）：1561-1568.

[7] Ghiani C A，Ying Z，Vellis J D.Exercise decreases myelin-associated glycoprotein expression in the spinal cord and positively modulates neuronal growth[J].Glia，2007，55（9）：966-975.

[8] Chytrova G，Ying Z.Exercise normalizes levels of MAG and Nogo-A growth inhibitors after brain trauma[J].European Journal of Neuroscience，2008，27（1）：1-11.

[9] Doyle L M.Exercise enhances axonal growth and functional recovery in the regenerating spinal cord[J].Neuroscience，2006，141（1）：321-327.

[10] Goldshmit Y，Lythgo N，Galea M P，et al.Treadmill Training after spinal cord hemisection in mice promotes axonal sprouting and synapse formation and improves motor recovery[J].Journal of Neurotrauma，2008，25（5）：449-466.

[11] 徐丽丽，白玉龙，胡永善，等.运动训练改善脑缺血大鼠梗死体积与神经行为能力的实验研究[J].中国康复医学杂志，2008，23（2）：100-102.

（责任编辑：张学颖）