神经病学

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.000857

运动训练起始时间及强度对脑梗死大鼠神经功能的影响和机制研究

陈　帅，李光勤，胡万群，唐　杰，廖　艳，黄　妮
（重庆医科大学附属第一医院神经内科，重庆　400016）

【摘　要】**目的**：观察不同运动训练起始时间及强度对脑梗死大鼠神经功能的变化及梗死侧海马脑源性神经营养因子（brain-derived neurotrophic factor，BDNF）、5-羟色胺受体 1A 亚型（5-hydroxytryptamine receptor 1A subtyte，5-HT1A）表达的影响，并探讨运动训练促进脑梗死大鼠神经功能恢复的机制。**方法**：本研究共分 3 部分：①将成年雄性 SD 大鼠随机分为 S1、I1、E1、E3、E5 组；各组分别代表假手术 1 组，脑梗死 1 组，脑梗死 1、3、5 d 后运动训练组。每组 5 只，运动训练的强度为 15 m/min。根据改良神经功能缺损程度评分（modified neurological severity scores，mNSS）及 BDNF 蛋白表达情况，确定脑梗死后运动训练的最佳起始时间。②在最佳起始时间的基础上，将大鼠随机分为 S2、I2、L、M、H 组；各组分别代表假手术 2 组，脑梗死 2 组，脑梗死低、中、高强度运动训练组。每组 5 只，L、M、H 组运动训练强度分别为 10 m/min、15 m/min、20 m/min，根据 mNSS 及 BDNF 蛋白表达情况，确定脑梗死后运动训练的最佳强度。③运用 5-HT1A 特异性受体拮抗剂 WAY100635，观察 5-HT1A 对脑梗死后运动训练大鼠 BDNF 的影响。此部分实验将大鼠随机分为 S3、I3、E、W 组，各组分别代表假手术 3 组、脑梗死 3 组、运动训练组、WAY100635 组。每组 6 只。运用 Western blot 和荧光定量 PCR 检测 5-HT1A、BDNF 蛋白及 mRNA 变化。**结果**：① E1、E3、E5 组较 I1 组 mNSS 明显降低（$P<0.01$），E1、E3、E5 各组的 mNSS 无统计学差异。E3、E5 组的 BDNF 蛋白表达较 I1 组明显上调（$P<0.05$），E3、E5 组之间的表达无统计学差异。②M 组的 mNSS 较 I2 组明显降低（$P<0.01$），M 组的 BDNF 蛋白水平较 I2 组表达明显升高（$P<0.01$），但 L、H 组较 I2 组的 mNSS 及 BDNF 蛋白表达无统计学差异。脑梗死后运动训练的最佳强度为 15 m/min。③E 组的 mNSS 较 I3 组明显降低（$P<0.05$），但 W 组较 E 组的 mNSS 无统计学差异。E 组较 I3 组的 5-HT1A、BDNF 蛋白及 mRNA 水平均显著提高（$P<0.05$），但 W 组的 BDNF 蛋白及 mRNA 水平较 E 组无统计学差异。**结论**：①运动训练可促进脑梗死后的神经功能恢复，上调 5-HT1A 及 BDNF 表达；②脑梗死后早期（1 d、3 d、5 d）进行运动训练有利于神经功能的恢复，并且脑梗死 3 d 或 5 d 后进行运动训练可有效上调 BDNF 表达水平；③中强度运动训练可有效促进神经功能恢复及 BDNF 表达；④脑梗死后运动训练促进 BDNF 表达的机制可能与 5-HT1A 无关。

【关键词】脑梗死；运动训练；脑源性神经营养因子；神经功能
【中图分类号】R743.3　　【文献标志码】A　　【收稿日期】2015-10-11

Effect of starting time and intensity of exercise training on neurological function after cerebral infarct in rats and its mechanism

Chen Shuai, Li Guangqin, Hu Wanqun, Tang Jie, Liao Yan, Huang Ni
(*Department of Neurology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University*)

【Abstract】***Objective***: To observe the effect of different starting time and intensities of exercise training on neurologic function change and the expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and 5-hydroxytryptamine receptor 1A subtyte (5-HT1A) in hippocampus after cerebral infarct in rats, and to discuss the mechanism of exercise training to improve neurological function recovery in cerebral infarction rats. ***Methods***: The study has three parts: ①Adult male Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into S1, I1, E1, E3 and E5 groups, namely sham group 1, infarct group 1, exercise training of day 1 after infarct group, exercise training of day 3 after infarct group and exercise training of day 5 after infarct group respectively (five rats in each group; the intensity of exercise training was 15 m/min). The best starting time of exercise training after cerebral infarct was decided according to modified neurological severity scores (mNSS) and ex-

作者介绍：陈　帅，Email：674327423@qq.com，研究方向：脑血管疾病。
通信作者：李光勤，Email：liguangqin@tom.com。
基金项目：重庆市教委资助项目（编号：KJ130306）；重庆市渝中区科委资助项目（编号：20130140）；卫计委国家临床重点专科建设项目资金资助（编号：卫办医政函【2012】649 号）。
优先出版：http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20160118.1750.011.html（2016-01-18）

pression of BDNF protein. ②Basing on the best starting time and different intensities of exercise training, rats were randomly divided into S2, I2, L, M and H groups, namely sham group 2, infarct group 2, low-intensity exercise training after infarct group, moderate-intensity exercise training after infarct group and high-intensity exercise training after infarct group (five rats in each group; the intensity of L group, M group and H group was 10 m/min, 15 m/min and 20 m/min respectively). The best intensity of exercise training after cerebral infarct was decided according to mNSS and expression of BDNF protein. ③WAY100635, a 5-HT1A special receptor antagonist, was used to observe the effect of 5-HT1A on BDNF in the rats of exercise training after cerebral infarct. In this part, rats were randomly divided into S3, I3, E and W groups, namely sham group 3, infarct group 3, exercise training group and WAY100635 group (5 rats in each group). Western blot and fluorogenic quantitative PCR were used to detect the protein and mRNA level of 5-HT1A and BDNF. ***Results***: ①The mNSS was decreased in E1, E3 and E5 group than in I1 group ($P<0.01$), without significant statistical differences between E1, E3 and E5 groups. The mNSS was also significantly up-regulated in E3 and E5 group than in I1 group ($P<0.05$), without significant statistical differences between E3 and E5 groups. ②The mNSS was decreased in M group than in I2 group ($P<0.01$), and the BDNF protein was up-regulated in M group than in I2 group ($P<0.01$), without significant statistical differences in L, H and I2 groups. The best intensity of exercise training after cerebral infarct was 15 m/min. ③The mNSS was decreased in E group than in I3 group ($P<0.05$), without significant statistical differences between E group and W group. The protein and mRNA level of 5-HT1A and BDNF was significantly increased in E group than in I3 group ($P<0.05$), without significant statistical differences between E group and W group. ***Conclusion***: Exercise training can improve neurological function and up-regulate the expression of 5-HT1A and BDNF after cerebral infarct. Early exercise training (day 1, day 3 or day 5) is benefit to neurological function recovery and it can up-regulate BDNF effectively day 3 or day 5 after cerebral infarct. Moderate intensity of exercise training can promote neurological function recovery and BDNF expression. The mechanism of exercise training which promote BDNF expression after cerebral infarct may be not related to 5-HT1A.

【Key words】cerebral infarct; exercise training; brain-derived neurotrophic factor; neurological function

脑卒中是一种发病率、死亡率、致残率和复发率均高的疾病，其中约 80%为缺血性脑卒中。脑卒中存活者中约 75%遗留有不同程度的后遗症，给患者带来了极大的痛苦，也给社会和家庭带来了极大的负担。大量临床及动物实验已经证实，运动训练可促进脑梗死后神经功能恢复，但何时开始及以何种强度进行运动训练最好，目前争议较大，且运动训练促进神经功能恢复的机制十分复杂。因此，本实验研究脑梗死后不同运动训练起始时间和强度对大鼠神经功能及海马脑源性神经营养因子（brain-derived neurotrophic factor，BDNF）的影响；并结合5-羟色胺受体 1A 亚型（5-hydroxytryptamine receptor 1A subtyte，5-HT1A）特异性受体拮抗剂 WAY100635，探讨运动训练促进神经功能恢复的分子机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物选择及分组

选用成年雄性 SD 大鼠，体质量在 220~300 g，由重庆医科大学实验动物中心提供。本研究内容共分为 3 部分。第一部分，将大鼠随机分为 S1、I1、E1、E3、E5 组；各组分别代表假手术 1 组，脑梗死 1 组，脑梗死 1、3、5 d 后运动训练组，每组 5 只，运动训练的强度为 15 m/min。根据改良神经功能缺损程度评分（modified neurological severity scores，mNSS）及 BDNF 蛋白表达情况，确定脑梗死后运动训练的最佳起始时间。第二部分，在最佳起始时间的基础上，将大鼠随机分为 S2、I2、L、M、H 组；各组分别代表假手术 2 组，脑梗死 2 组，脑梗死低、中、高强度运动训练组，每组 5 只。L、M、H 组运动训练强度分别为 10 m/min、15 m/min、20 m/min，根据 mNSS 及BDNF 蛋白表达情况，确定脑梗死后运动训练的最佳强度。第 3 部分，根据运动训练的最佳起始时间和强度，运用 5-HT1A 特异性受体拮抗剂 WAY100635，观察 5-HT1A 对脑梗死后运动训练大鼠 BDNF 的影响。此部分实验将大鼠随机分为 S3、I3、E、W组，各组分别代表假手术 3 组、脑梗死 3 组、运动训练组、WAY100635 组，每组 6 只。运用 Western blot 和荧光定量PCR 检测 5-HT1A、BDNF 蛋白及 mRNA 水平变化。

1.2 主要实验设备及试剂

GD-PT 动物实验跑台（上海继德教学实验器械厂），BDNF 抗体（Abcam），5-HT1A 抗体（Immunoway），β-actin 抗体（Immunoway），GADPH 抗体（Abcam），羊抗兔 IgG 抗体（Abbkine），BDNF、5-HT1A 引物（上海生工），GADPH 引物（Ta-KaRa），PCR 试剂盒（TaKaRa）。

1.3 实验方法

1.3.1 动物脑梗死模型的制备 用 10%水合氯醛（0.3 ml/kg）

麻醉大鼠，参照 Longa 的线栓法[1]制备右侧大脑中动脉缺血再灌注模型，缺血时间为 2 h。选用 Longa 评分[1]1~3 分的大鼠作为本实验的研究对象。

1.3.2　运动训练　各组大鼠在标准饲养环境下饲养，正常昼夜节律，自由饮水及进食。S1、S2、S3 组及 I1、I2、I3 组不进行跑台训练。E1、E3、E5 组分别于造模后 1、3、5 d 进行跑台训练，强度 15 m/min，每天 30 min。L、M、H 组开始训练的时间为最佳起始时间，强度分别为 10 m/min、15 m/min、20 m/min，每天 30 min。W 组开始训练时间和强度为最佳起始时间和强度，每天 30 min。各组跑台训练第 1、2 天均为适应性训练，强度 8 m/min，每天 30 min，第 3 天开始进行为期 14 d 的正式训练。W 组于运动训练前 20 min 皮下注射 WAY100635 0.3 mg/kg，每天 1 次，S3、I3、E 组分别皮下注射生理盐水 3 ml/kg。

1.3.3　神经功能评分　各组大鼠于取材当日，采用 mNSS 评估其神经功能缺损程度。mNSS 包括运动、感觉、平衡及反射等 4 项内容[2]。

1.3.4　Western blot 检测　最后 1 次跑台训练后，10%水合氯醛（0.3 ml/kg）深度麻醉大鼠，迅速取出梗死侧海马组织。在各组样本中加入 RIPA 强裂解液及 PMSF 后匀浆。加入适量上样缓冲液煮沸变性。配制 5%的下层胶及 10%的上层胶，依次加入各组蛋白样品 10 μl 及 Marker 5 μl。设置电泳仪为 60 V 恒压，当 Marker 分离出清晰条带后换为 100 V 恒压，直至溴酚兰迁移动到下层胶底部时，停止电泳。将目的蛋白条带以 250 mA 恒流电转至 PVDF 膜上，各蛋白转膜时间均为 60 min。5%脱脂奶粉常温封闭 3 h。4 ℃过夜孵育一抗（β-actin 1:2 000，BDNF 1:1000，GADPH 1:1000，5-HT1A 1:500）。次日取出，TBST 液摇洗（10 min × 4 次）。37 ℃孵育二抗（浓度 1:5 000）2 h，TBST 液摇洗（10 min × 4 次）。应用 Fusion 凝胶成像系统成像并分析条带灰度值，将目的/内参灰度值的比值进行统计学分析。

1.3.5　荧光定量 PCR　取梗死侧海马组织，按 RNA 试剂盒说明进行 RNA 提取。按逆转录试剂盒说明进行逆转录，反应体系为 10 μl，反应条件：37 ℃ 15 min，85 ℃ 5 s，4 ℃ 5 min。PCR 扩增，反应体系 10 μl，反应条件：95 ℃ 30 s，95 ℃ 5 s、60 ℃ 34 s 循环 40 次。BDNF 上游引物序列：5'-CTTGGAGAAGGAAACCGCCT-3'，下游引物序列：5'-GTCCACACAAAGCTCTCGGA-3'。5-HT1A 上游引物序列：5'-TGATCTCGCTCACTTGGCTC-3'，下游引物序列：5'-AGCGGGATATAGAAAGCGCC-3'。内参 GADPH 上游引物序列：5'-AAGTTCAACGGCACAGTCAAGG-3'，下游引物序列：5'-CGCCAGTAGACTCCACGACATA-3'。应用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法对结果进行计算，并用统计软件进行分析。

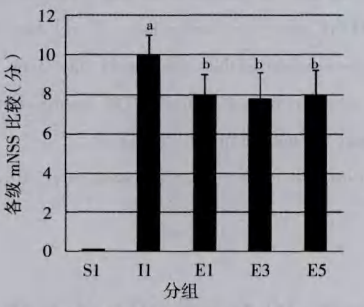
1.4　统计学分析

用 SPSS 17.0 统计分析软件对数据进行统计分析，计量资料均采用均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示。多组间差异比较采用单因素方差分析，组间两两比较方差齐者用 LSD-t 检验，方差不齐者用 Games-Howell 检验。检验水准 α=0.05。

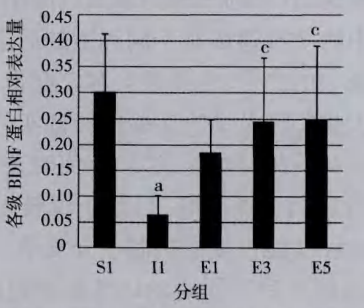
2　结　果

2.1　第一部分各组神经功能评分及 BDNF 蛋白表达变化

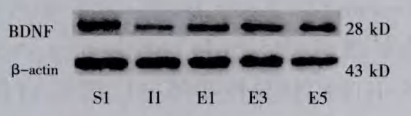
经检验多组间 mNSS（F=72.538，P=0.000）及 BDNF 蛋白（F=3.877，P=0.017）表达差异均有统计学意义。S1 组的 mNSS 为 0 分，I1 组较 S1 组的 mNSS 评分明显升高（P=0.000）。经过运动训练后，E1、E3、E5 组较 I1 组 mNSS 明显降低，其中 $P_{E1组}$=0.006，$P_{E3组}$=0.003，$P_{E5组}$=0.006；但 E1、E3、E5 各组的 mNSS 差异无统计学意义（P>0.05）。I1 组较 S1 组的 BDNF 蛋白表达水平明显降低（P=0.002），E1 组的 BDNF 蛋白水平虽较 I1 组升高，但差异无统计学意义（P=0.082）；E3、E5 组的 BDNF 蛋白表达较 I1 组明显上调，其中 $P_{E3组}$=0.012，$P_{E5组}$=0.010，但 E3、E5 组之间的表达差异无统计学意义（P=0.959）（图 1）。



A. 不同运动训练起始时间对脑梗死大鼠 mNSS 的影响



B. 不同运动训练起始时间对脑梗死大鼠 BDNF 相对表达量的影响



C. 各组大鼠 BDNF 蛋白印迹结果

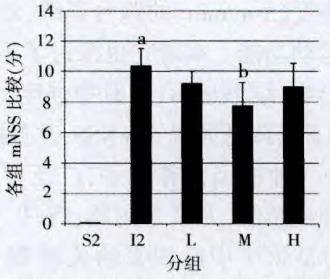
注：S1 代表假手术 1 组，I1 代表脑梗死 1 组，E1 代表脑梗死 1d 后运动训练组，E3 代表脑梗死 3d 后运动训练组，E5 代表脑梗死 5d 后运动训练组。a，与 S1 组相比，P<0.01；b，与 I1 组相比，P<0.01；c，与 I1 组相比，P<0.05

图 1　运动训练起始时间对 mNSS 和 BDNF 的影响（n=5）

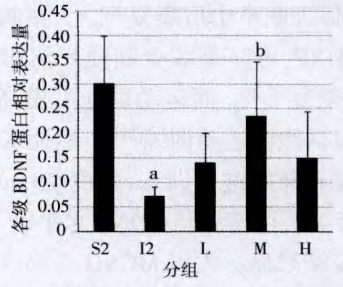
Fig.1　Influence of starting time of exercise training on mNSS and BDNF（n=5）

2.2 第二部分各组神经功能评分及 BDNF 蛋白表达变化

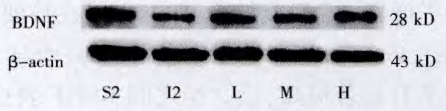
经检验多组间 mNSS（F=64.97，P=0.000）及 BDNF 蛋白（F=5.747，P=0.003）表达差异均有统计学意义。I2 组较 S2 组的 mNSS 评分明显升高（P=0.000），M 组的 mNSS 较 I2 组明显降低（P=0.002），但 L、H 组较 I2 组的 mNSS 差异无统计学意义，其中 $P_{L\text{组}}$=0.117，$P_{H\text{组}}$=0.070。I2 组较 S2 组的 BDNF 蛋白表达水平明显降低（P=0.000），M 组的 BDNF 蛋白水平较 I2 组表达明显升高（P=0.006），L、H 组的 BDNF 蛋白表达较 I2 组虽有升高，但差异无统计学意义，其中 $P_{L\text{组}}$=0.218，$P_{H\text{组}}$=0.152（图 2）。



A. 不同运动训练强度对脑梗死大鼠 mNSS 的影响



B. 不同运动训练强度对脑梗死大鼠 BDNF 相对表达量的影响



C. 各组大鼠 BDNF 蛋白印迹结果

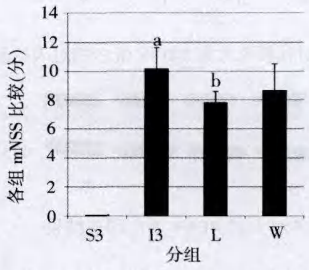
注：S2 代表假手术 2 组，I2 代表脑梗死 2 组，L 代表脑梗死低强度运动训练组，M 代表脑梗死中强度运动训练组，H 代表脑梗死高强度运动训练组。a，与 S2 组相比，P<0.01；b，与 I2 组相比，P<0.01

图 2 运动训练强度对 mNSS 和 BDNF 的影响（n=5）

Fig.2 Influence of intensity of exercise training on mNSS and BDNF（n=5）

2.3 第三部分各组神经功能评分及 5-HT1A、BDNF 蛋白和 mRNA 表达变化

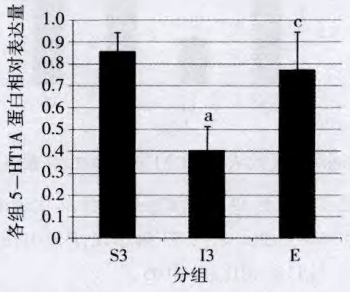
经检验多组间的 mNSS 评分（F=80.072，P=0.000）、5-HT1A 蛋白（F=10.252，P=0.012）、5-HT1A mRNA（F=24.137，P=0.001）、BDNF 蛋白（F=20.948，P=0.000）和 BDNF mRNA（F=122.348，P=0.000）表达差异均有统计学意义。I3 组较 S3 组的 mNSS 评分明显升高（P=0.000），E 组的 mNSS 较 I3 组明显降低（P=0.038），但 W 组较 E 组的 mNSS 差异无统计学意义（P=0.449）（图 3）。I3 组较 S3 组的 5-HT1A 蛋白和mRNA 水平有明显降低，其中 $P_{5\text{-HT1A 蛋白}}$=0.005，$P_{5\text{-HT1A mRNA}}$=0.002；E 组较 I3 组的 5-HT1A 蛋白及 mRNA 水平均明显提高，其中 $P_{5\text{-HT1A 蛋白}}$=0.013，$P_{5\text{-HT1A mRNA}}$=0.001（图 4）。I3 组较 S3 组的 BDNF 蛋白和 mRNA 水平有明显降低，其中 $P_{\text{BDNF 蛋白}}$=0.000，$P_{\text{BDNF mRNA}}$=0.001；E 组较 I3 组的 BDNF 蛋白及 mRNA 水平均明显提高，其中 $P_{\text{BDNF 蛋白}}$=0.001，$P_{\text{BDNF mRNA}}$=0.019；但 W 组的 BDNF 蛋白及 mRNA 水平较 E 组差异无统计学意义，其中 $P_{\text{BDNF 蛋白}}$=0.472，$P_{\text{BDNF mRNA}}$=0.519（图 5）。



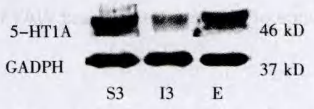
注：S3 代表假手术 3 组，I3 代表脑梗死 3 组，E 代表运动训练组，W 代表 WAY100635 组。a，与 S3 组相比，P<0.01；b，与 I3 组相比，P<0.05

图 3 S3、I3、E、W 组 mNSS 比较（n=6）

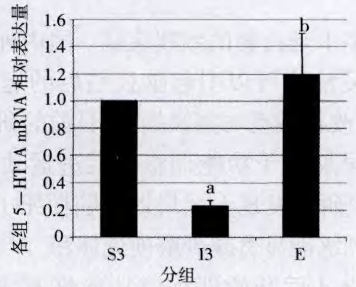
Fig.3 Comparison of mNSS in S3，I3，E，W groups（n=6）



A. 运动训练对脑梗死大鼠 5-HT1A 蛋白相对表达量的影响



B. 各组大鼠 5-HT1A 蛋白印迹结果

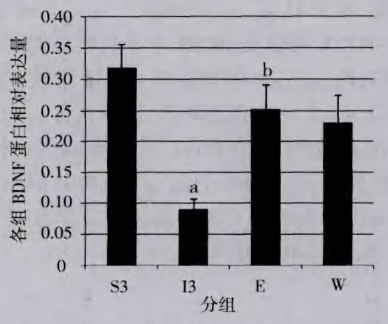


C.运动训练对脑梗死大鼠 5-HT1A mRNA 相对表达量的影响

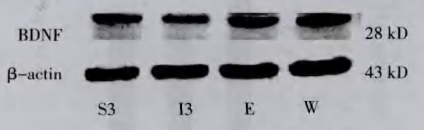
注：S3 代表假手术 3 组，I3 代表脑梗死 3 组，E 代表运动训练组，W代表 WAY100635 组。a，与 S3 组相比，P<0.01；b，与 I3 组相比，P<0.01；c，与 I3 组相比，P<0.05

图 4 运动训练对 5-HT1A 的影响（n=3）

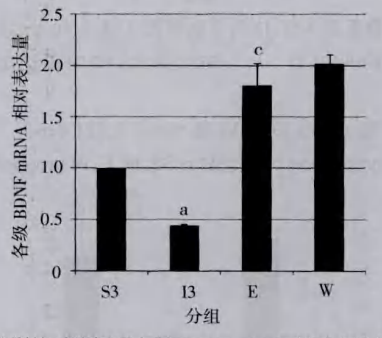
Fig.4 Influence of exercise training on 5-HT1A（n=3）



A. 运动训练对脑梗死大鼠 BDNF 蛋白相对表达量的影响



B. 各组大鼠 BDNF 蛋白印迹结果



C. 运动训练对脑梗死大鼠 BDNF mRNA 相对表达量的影响

注：S3 代表假手术 3 组，I3 代表脑梗死 3 组，E 代表运动训练组，W 代表 WAY100635 组。a，与 S3 组相比，$P<0.01$；b，与 I3 组相比，$P<0.01$；c，与 I3 组相比，$P<0.05$

图 5　运动训练及 WAY100635 对 BDNF 的影响（n=3）

Fig.5　Influence of exercise training and WAY100635 on BDNF (n=3)

3　讨　论

脑卒中是首要的致残疾病。国内外研究表明适当的康复治疗可以引起脑损伤后的运动皮质的重建，从而改善运动功能缺损[3]。目前的研究也证实脑卒中后早期给予功能训练可促进运动功能康复[4]。Yang 等[5]研究发现大鼠局灶性脑梗死 1 d 后开始跑台运动训练能显著减少脑梗死体积，改善神经功能，而梗死 7 d 后开始训练对功能恢复无明显影响。Craig 等[6]的临床分析也显示，卒中后 24 h 内进行康复的预后较 24 h 后进行者好。而 Sundseth 等[7]的一项临床随机对照研究则发现，与 24 h 到 48 h 活动相比，入院后 24 h 内活动增加了不利结局及死亡的可能性。本研究发现，脑梗死 1、3、5 d 后开始的跑台训练，均能使大鼠神经功能得到改善，提示脑梗死后早期的运动康复有助于功能恢复。

而关于康复训练的强度研究也尚存争议。Seo 等[8]研究结果显示：大鼠脑梗死后低强度（8 m/min）较高强度（20 m/min）的跑台训练能改善神经功能。而 Kim 等[9]的研究则显示，以 20 m/min 的跑台训练强度也能使局灶性脑梗死的大鼠的神经功能得到改善。最近，Sun 等[10]的研究则发现，大鼠高强度（26 m/min）和低强度（5 m/min）的跑台训练，均能改善大鼠脑梗死的运动功能。本研究也探讨了不同强度对神经功能的影响，结果显示，只有中强度（15 m/min）的跑台训练可显著降低大鼠的 mNSS，改善神经功能。

BDNF 是一种神经营养因子，广泛存在于哺乳动物的中枢神经系统，尤其是皮质、海马、脊髓中[11]。BDNF 被认为是脑卒中后康复的关键调节因子[12]，可通过促进血管、神经再生，增强突触可塑性和脑修复等形式促进脑卒中后康复[13]。大鼠脑梗死后给予外源性 BDNF，可显著减少脑梗死体积[14-16]，有利于神经功能恢复[17-19]。而运动训练可提高 BDNF 水平，其中也包括跑台运动训练[20-23]。然而 Ke 等[9]发现脑梗死后 24 h 开始跑台训练，强度 20 m/min，每天 30 min，持续 7 d，可使海马 BDNF 水平进一步降低。Lan 等[23]研究结果显示大鼠 MCAO 后第 3 天开始运动训练，强度为 15 m/min，16 d 后大鼠皮质的 BDNF 蛋白水平增高。本研究结果显示，大鼠在脑梗死 3 d 或 5 d 后，以 15 m/min 的强度进行训练，海马 BDNF 蛋白水平有显著提高，且 2 组之间 BDNF 表达水平差异无统计学意义，而在脑梗死 1 d 后就进行跑台训练，BDNF 水平则未见明显提高。本研究还发现只有以中强度（15 m/min）进行训练，可显著提高海马 BDNF 蛋白水平。而以低强度（10 m/min）或高强度（20 m/min）进行运动训练后，海马的 BDNF 蛋白表达水平并未显著增加。结果提示，脑梗死早期（3 d 或 5 d）跑台运动训练可使 BDNF 蛋白水平增加，但脑梗死后过早（1 d）进行训练，对 BDNF 表达或许是不利的。运动训练的强度也至关重要，过低或过高的强度均不能有效促进 BDNF 表达，只有合适的中强度训练才能有效增加 BDNF 表达。

5-HT1A 是 5-HT 受体之一，对脑缺血的神经元有保护作用[24-25]。Galter 等[26]对胚胎中缝核细胞应用 5-HT1A 受体激动剂后，BDNF 蛋白和 mRNA 表

达水平增加，并且认为 5-HT 可通过 5-HT1A 受体提高 BDNF 蛋白和 mRNA 表达水平。过去关于抑郁的研究也表明 5-HT1A 与 BDNF 的相互作用[27]。最近，Lan 等[23]研究发现，大鼠脑梗死后进行跑台运动训练，可提高皮质 5-HT、5-HT1A 以及 BDNF 蛋白水平，因此推测运动训练促进神经功能恢复可能涉及 5-HT/5-HT1A/BDNF 通路。但他们未使用相关阻断剂进行验证。因此，本研究应用 5-HT1A 特异性受体拮抗剂 WAY100635，观察 5-HT1A 对 BDNF蛋白及 mRNA 表达的影响。结果显示，运动训练可使大鼠海马 5-HT1A、BDNF 蛋白和 mRNA 表达水平均增加。然而，应用 WAY100635 后，mNSS 并无显著变化，BDNF 蛋白和 mRNA 水平也未出现显著降低。因此，本研究结果提示，5-HT1A 对 BDNF 的调控，在脑梗死运动训练中可能不起作用或不起主要作用，或许还有其他机制参与调节。

本研究发现，脑梗死 1、3、5 d 后进行运动训练可改善神经功能，但只有脑梗死 3 d 或 5 d 后进行的运动训练才能有效提高 BDNF 蛋白水平。并且，只有中强度的运动训练，才能更好地促进BDNF 表达和神经功能恢复。脑梗死后运动训练，应用 5-HT1A 特异性受体拮抗剂 WAY100635，并未对神经功能及 BDNF 蛋白和 mRNA 表达产生显著的改变。

综上所述，脑梗死后早期适度的跑台运动训练有利于神经功能恢复，有助于上调 BDNF 及 5-HT1A 水平。但过早进行运动训练，对 BDNF 调控或许是不利的，且只有中等强度运动训练才能更好地促进神经功能恢复及 BDNF 表达。脑梗死后跑台运动训练促进 BDNF 表达的机制可能与 5-HT1A 无关，具体的分子机制还需进一步研究。

参 考 文 献

[1] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91.

[2] 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): 1005-1011.

[3] Cecatto RB, Chadi G. The importance of neuronal stimulation in central nervous system plasticity and neurorehabilitation strategies[J]. Funct Neurol, 2007, 22(3): 137-143.

[4] Langhorne P, Coupar F, Pollock A. Motor recovery after stroke: a systematic review[J]. Lancet Neurol, 2009, 8(8): 741-754.

[5] Yang YR, Wang RY, Wang PS. Early and late treadmill training after focal brain ischemia in rats[J]. Neurosci Lett, 2003, 339(2): 91-94.

[6] Craig LE, Bernhardt J, Langhorne P, et al. Early mobilization after stroke: an example of an individual patient data meta-analysis of a complex intervention[J]. Stroke, 2010, 41(11): 2632-2636.

[7] Sundseth A, Thommessen B, Ronning OM. Outcome after mobilization within 24 hours of acute stroke: a randomized controlled trial[J]. Stroke, 2012, 43(9): 2389-2394.

[8] Seo HG, Kim DY, Park HW, et al. Early motor balance and coordination training increased synaptophysin in subcortical regions of the ischemic rat brain[J]. J Korean Med Sci, 2010, 25(11): 1638-1645.

[9] Kim G, Kim E. Effects of treadmill training on limb motor function and acetylcholinesterase activity in rats with stroke[J]. J Phys Ther Sci, 2013, 25(10): 1227-1230.

[10] Sun J, Ke Z, Yip SP, et al. Gradually increased training intensity benefits rehabilitation outcome after stroke by BDNF upregulation and stress suppression[J]. Biomed Res Int, 2014(2014): 925762.

[11] Murer MG, Yan Q, Raisman-Vozari R. Brain-derived neurotrophic factor in the control human brain, and in Alzheimer's disease and Parkinson's disease[J]. Prog Neurobiol, 2001, 63(1): 71-124.

[12] Ploughman M, Windle V, MacLellan CL, et al. Brain-derived neurotrophic factor contributes to recovery of skilled reaching after focal ischemia in rats[J]. Stroke, 2009, 40(4): 1490-1495.

[13] Berretta A, Tzeng YC, Clarkson AN. Post-stroke recovery: the role of activity-dependent release of brain-derived neurotrophic factor[J]. Expert Rev Neurother, 2014, 14(11): 1335-1344.

[14] Yamashita K, Wiessner C, Lindholm D, et al. Post-occlusion treatment with BDNF reduces infarct size in a model of permanent occlusion of the middle cerebral artery in rat[J]. Metab Brain Dis, 1997, 12(4): 271-280.

[15] Schabitz WR, Sommer C, Zoder W, et al. Intravenous brain-derived neurotrophic factor reduces infarct size and counterregulates Bax and Bcl-2 expression after temporary focal cerebral ischemia [J]. Stroke, 2000, 31(9): 2212-2217.

[16] Zhang Y, Pardridge WM. Conjugation of brain-derived neurotrophic factor to a blood-brain barrier drug targeting system enables neuroprotection in regional brain ischemia following intravenous injection of the neurotrophin[J]. Brain Res, 2001, 889(1-2): 49-56.

[17] Schabitz WR, Berger C, Kollmar R, et al. Effect of brain-derived neurotrophic factor treatment and forced arm use on functional motor recovery after small cortical ischemia[J]. Stroke, 2004, 35(4): 992-997.

[18] Schabitz WR, Steigleder T, Cooper-Kuhn CM, et al. Intravenous brain-derived neurotrophic factor enhances poststroke sensorimotor recovery and stimulates neurogenesis[J]. Stroke, 2007, 38(7): 2165-2172.

[19] Muller HD, Hanumanthiah KM, Diederich K, et al. Brain-derived neurotrophic factor but not forced arm use improves long-term outcome after photothrombotic stroke and transiently upregulates binding densities of excitatory glutamate receptors in the rat brain[J]. Stroke, 2008, 39 (3): 1012-1021.

神经病学

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.000678

NMDA受体拮抗剂对神经病理性疼痛大鼠脊髓背角 bFGF 表达的影响

沈　茜，高　进，陈　萍

（重庆医科大学附属第一医院麻醉科，重庆　400010）

【摘　要】目的：探讨鞘内间断多次给予 N-甲基-D-天门冬氨酸（N-methyl-D-aspartate，NMDA）受体拮抗剂对坐骨神经分支选择性损伤模型（spared nerve injury，SNI）大鼠神经病理性疼痛的缓解作用及其可能的机制。**方法**：雄性 SD 大鼠 72 只，体质量 240~260 g，采用随机数字表法，将大鼠随机分为 6 组（n=12）：假手术组（S 组）、坐骨神经分支选择性损伤组（NP 组）、氯胺酮低剂量组（K1 组）、氯胺酮高剂量组（K2 组）、MK-801 低剂量组（M1 组）、MK-801 高剂量组（M2 组）。S 组仅暴露坐骨神经，NP 组、K1 组、K2 组、M1 组、M2 组制备坐骨神经分支选择性损伤模型。从术后 1 d 开始，K1 组、K2 组、M1 组、M2 组鞘内分别注射氯胺酮 50 μg、氯胺酮 100 μg、MK-801 5 μg 和 MK-801 10 μg，容量均为 10 μl，S 组和 NP 组鞘内注射生理盐水 10 μl，1 次/d，连续给药 7 d。分别于术前 1 d 和术后 1~7 d，进行疼痛行为学观察和机械刺激缩足反射阈值（paw withdrawal mechanical threshold，PWMT）测定。所有大鼠均于术后第 7 天处死，免疫组化观察大鼠脊髓 L4~6 节段背角胶质纤维酸性蛋白（glial fibrillary acidic protein，GFAP）和碱性成纤维细胞生长因子（basic fibroblast growth factor，bFGF）表达变化，Western blot 检测脊髓 L4~6 节段 bFGF 蛋白含量变化。**结果**：术后第 7 天给药前和给药后，NP 组术侧 PWMT 较 S 组明显降低（P=0.000），K1 组、K2 组、M1 组和 M2 组术侧 PWMT 较 NP 组明显升高（P=0.000）。免疫组化结果显示，NP 组术侧 bFGF、GFAP 蛋白表达量较 S 组明显升高（P=0.000）；K1 组、K2 组、M1 组和 M2 组 bFGF、GFAP 蛋白表达量较 NP 组明显降低（P=0.000）。Western blot 结果显示，NP 组 bFGF 蛋白表达量较 S 组明显升高（P=0.000）；K1 组、K2 组、M1 组和 M2 组 bFGF 蛋白表达量较 NP 组明显降低（P=0.000）。**结论**：鞘内

作者介绍：沈　茜，Email：344724193@qq.com，
研究方向：神经病理性疼痛的研究和治疗。

通信作者：陈　萍，Email：mazuichen@163.com。

基金项目：重庆市卫生局医学科研计划资助项目（编号：2012-1-018）；重庆市医学重点学科（编号：渝卫科教[2007]2 号）；卫生部国家临床重点专科建设经费资助项目（编号：财社[2011]170 号）。

优先出版：http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20150708.2303.005.html（2015-07-08）

[20] Berchtold NC，Chinn G，Chou M，et al.Exercise primes a molecular memory for brain-derived neurotrophic factor protein induction in the rat hippocampus[J].Neuroscience，2005，133(3)：853-861.

[21] Kim MW，Bang MS，Han TR，et al.Exercise increased BDNF and trkB in the contralateral hemisphere of the ischemic rat brain[J].Brain Res，2005，1052(1)：16-21.

[22] Rasmussen P，Brassard P，Adser H，et al.Evidence for a release of brain-derived neurotrophic factor from the brain during exercise[J].Exp Physiol，2009，94(10)：1062-1069.

[23] Lan X，Zhang M，Yang W，et al.Effect of treadmill exercise on 5-HT，5-HT1A receptor and brain derived neurophic factor in rats after permanent middle cerebral artery occlusion[J].Neurol Sci，2014，35(5)：761-766.

[24] Salazar-Colocho P，Del Rio J，Frechilla D.Neuroprotective effects of serotonin 5-HT 1A receptor activation against ischemic cell damage in gerbil hippocampus：Involvement of NMDA receptor NR1 subunit and BDNF[J].Brain Res，2008(1199)：159-166.

[25] Marco I，Valhondo M，Martin-Fontecha M，et al.New serotonin 5-HT(1A) receptor agonists with neuroprotective effect against ischemic cell damage[J].J Med Chem，2011，54(23)：7986-7999.

[26] Galter D，Unsicker K.Sequential activation of the 5-HT1(A) serotonin receptor and TrkB induces the serotonergic neuronal phenotype[J].Mol Cell Neurosci，2000，15(5)：446-455.

[27] Wu YC，Hill RA，Klug M，et al.Sex-specific and region-specific changes in BDNF-TrkB signalling in the hippocampus of 5-HT1A receptor and BDNF single and double mutant mice[J].Brain Res，2012(1452)：10-17.

（责任编辑：关蕴良）