运动预处理对脑缺血再灌注大鼠 VEGF、NeuN 蛋白表达的影响

裴 飞¹, 王雪冬², 李宝龙¹, 唐 强¹, 朱路文^{1*}

1 黑龙江中医药大学附属第二医院, 黑龙江 哈尔滨 150001;

2 黑龙江中医药大学针灸推拿学院暨康复学院, 黑龙江 哈尔滨 150001

* 通信作者: 朱路文, E-mail: zhuluwen1983@126.com

收稿日期: 2020-04-26; 接受日期: 2020-06-17

基金项目: 黑龙江省博士后基金项目(LBH-Z16195); 哈尔滨市科技局青年后备人才(2017RAQXJ040); 黑龙江中医药大学

“优秀创新人才支持计划”(2018RCD09); 孙申田青年人才基金(ky-201803)

DOI: 10.3724/SP.J.1329.2021.01006

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

摘要 **目的:**探索运动预处理对于脑缺血再灌注大鼠血管内皮生长因子(VEGF)、神经元核心抗原(NeuN)蛋白表达的影响。**方法:**采用随机数字表法将大鼠分为假手术组、模型组、运假组(运动预处理与假手术组)和运模组(运动预处理与模型组),每组 24 只。每组按再灌注 24 h、3 d 后又分为 2 个亚组,每个亚组 12 只。造模前,运假组和运模组行跑台训练 3 周。模型组和运模组大鼠采用改良 Longa 线栓法制备大鼠大脑中动脉阻塞(MCAO)模型,造模 2 h 后将线栓缓慢拔出至颈总动脉主干分叉处。假手术组和运假组大鼠造模方法同上,但线栓仅从颈总动脉插入约 10 mm 以后即拔出,不能阻塞大脑中动脉血流供应。采用改良神经功能评分(mNSS)评估神经功能;免疫组化和蛋白质免疫印迹分别测定缺血侧脑组织 VEGF 和 NeuN 蛋白表达水平。**结果:**①假手术组和运假组未出现神经功能缺损表现,与模型组比较,运模组在再灌注 24 h、3 d 后神经功能缺损评分降低,组间比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。②在 VEGF 表达方面,再灌注 24 h 后,假手术组可见少量的 VEGF 表达,阳性细胞胞体小,突起细;与运模组阳性率(14.40%)相比,假手术组阳性率(4.70%)、模型组阳性率(9.80%)、运假组阳性率(8.80%)均较低,且差异均有统计学意义($P < 0.05$)。再灌注 3 d 后,与运模组阳性率(23.80%)相比,假手术组阳性率(5.40%)、模型组阳性率(12.40%)、运假组阳性率(14.20%)均降低,且差异均有统计学意义($P < 0.05$)。③在 NeuN 蛋白表达水平方面,再灌注 24 h 后,与运模组相比,模型组表达较少,差异有统计学意义($P < 0.05$);再灌注 3 d 后,与运模组相比,模型组表达较少,差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论:**脑缺血再灌注前给予运动预处理可减少脑缺血再灌注以后的神经功能缺损表现,通过增强 VEGF 与 NeuN 的蛋白表达,从而改善感觉运动功能障碍和运动行为。

关键词 缺血再灌注;血管内皮生长因子;神经元核心抗原;运动预处理

缺血性脑卒中是神经功能障碍的主要原因,给患者、护理人员,以及社会带来重大负担。对于缺血性脑卒中主要采用药物以及针灸、推拿、运动等康复手段治疗,尤其是运动康复疗法在临床中对于缺血性脑卒中有很好的治疗效果。朱路文等^[1]研究表明脑缺血后神经功能恢复的加快可能通过针康法(头穴丛刺长留针结合现代康复方法)上调缺血脑

组织血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的表达而实现;孙国剑等^[2]也发现电针疗法与运动训练都能够提高缺血再灌注大鼠大脑皮层中 VEGF mRNA 表达量,而且两者结合效果更好。运动预处理目前也是研究的热点,动物研究表明,运动预处理对脑缺血有益的作用,包括提高存活率、减轻氧化损伤、改善脑血流量和维持神经

引用格式:裴飞,王雪冬,李宝龙,等. 运动预处理对脑缺血再灌注大鼠 VEGF、NeuN 蛋白表达的影响[J]. 康复学报, 2021, 31(1): 37-43.

PEI F, WANG X D, LI B L, et al. Effect of exercise preconditioning on protein expression of VEGF and NeuN in rats with cerebral ischemia-reperfusion [J]. Rehabilitation Medicine, 2021, 31(1): 37-43.

DOI: 10.3724/SP.J.1329.2021.01006

血管完整性^[3-5],但是没有研究证明运动预处理对于脑缺血再灌注大鼠 VEGF、神经元核心抗原(neuronal nuclear antigen, NeuN)的影响。因此,本实验欲探讨运动预处理对于脑缺血再灌注大鼠 VEGF、NeuN 的影响,从而为脑卒中的预防机制提供动物实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物及分组

1.1.1 动物 健康清洁级 Sprague-Dawley 雄性大鼠 96 只,购自辽宁长生生物技术股份有限公司,实验动物许可证号为 SCXK(辽)2015-0001,体质量(220±20)g,月龄 3 个月。饲养条件:SPF 级实验中心,安静环境、室温 20~25℃,湿度为 50%~60%,清洁级饲养,12 h 明暗光照交替,昼夜循环,通风良好,大鼠自由进食进水,每日固定点喂食。

1.1.2 分组 采用随机数字表法将大鼠随机分为假手术组、模型组、运假组(运动预处理与假手术组)和运模组(运动预处理与模型组),每组 24 只。每组按再灌注 24 h、3 d 后又分为 2 个亚组,每个亚组 12 只。实验所有大鼠处置方法均符合小动物伦理。

1.2 主要器材和试剂

动物实验跑台(安徽正华生物仪器设备有限公司);CX41RF 显微镜(OLYMPUS 公司);HM525NX U 冷冻切片机和 Excelsior AS 自动组织脱水机(上海赛默飞世尔仪器有限公司);WB 系统(BIO-RAD 公司);VEGF(Affinity Biosciences, Ab-AF5131);NeuN(Affinity Biosciences, Ab-DF6145);二抗:山羊抗兔 IgG(北京中杉金桥生物技术有限公司, ZB-2301);Actin(bioss, bs-0061R);4%多聚甲醛 PBS 溶液(安徽雷根生物技术有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 模型制备 模型组和运模组大鼠术前 12 h 禁食不禁水,采用 Longa 改良线栓法制备大鼠大脑中动脉阻塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型,2 h 后将线栓缓慢拔出至颈总动脉主干分叉处。6 h 后采用改良的 Bederson 标准进行神经功能初步评分,即:① 0 分,无神经功能缺失体征;② 1 分,提尾时损伤对侧前肢屈曲;③ 2 分,前肢屈曲及对侧抵抗力下降;④ 3 分,向对侧转圈;⑤ 4 分,向对侧转圈及意识障碍。评分为 1~3 分的大鼠纳入本次实验。假手术组和运假组大鼠造模方法同上,但线栓仅从颈总动脉插入约 10 mm 以后即拔出,不能阻塞大脑中动脉血流供应。

1.3.2 处理方法 模型组与假手术组不给予任何治疗。运模组和运假组给予跑台训练,先给予适应性跑台训练,速度 10 m/min,每天训练 20 min,持续 3 d;正式性跑台训练:速度 15 m/min,每天训练 30 min,

坡度为 0,每周训练 6 d,连续训练 3 周。运模组和运假组正式训练 3 周以后,4 组大鼠同时进行造模处理,分别在再灌注 24 h、3 d 后对指标进行观察及取材。

1.4 检测指标及取材

1.4.1 改良神经功能评分(modified neurologic severity score, mNSS) 参照文献[6],分别在再灌注 24 h、3 d 后进行检测,包括:① 运动测试:包括提尾测试和行走测试;② 感觉测试:包括放置测试和本体感觉测试;③ 平衡木测试;④ 反射消失和异常运动:包括耳廓反射,角膜反射,惊恐反射,癫痫、肌阵挛、肌张力异常 4 个方面评估大鼠神经功能缺损程度,总分越高表明损伤程度越重。

1.4.2 取材及标本处理 再灌注 24 h、3 d 以后,每组取 6 只大鼠,大鼠以 10%水合氯醛腹腔注射麻醉,从心尖以 4%多聚甲醛磷酸盐(PBS)缓冲液(pH=7.4, 4℃)进行缓慢灌注后快速断头取脑。分离缺血侧脑组织,然后放入 4%多聚甲醛 PBS 溶液中固定 48 h 后,取视交叉和其后 4 mm 处两点,切取脑冠状薄片,厚度约 4 mm,脱水,常规石蜡包埋。

再灌注 24 h、3 d 以后,对各组其余的 6 只大鼠以 10%水合氯醛腹腔注射麻醉,快速取缺血侧新鲜脑皮层,置于液氮中快速降温,然后迅速放入-80℃冰箱中冻存备用。

1.4.3 免疫组化染色检测 VEGF 表达情况 将每组大鼠脑组织石蜡切片,切片厚度为 3~5 μm 粘附在防脱玻片上,56~60℃烤片 2 h。脱蜡至水,高温抗原修复, PBS 冲洗 3 min×3 次,滴加内源性过氧化物酶阻断剂, PBS 冲洗 3 min×3 次,滴加山羊血清封闭液, 37℃ 30 min。加 VEGF 一抗(1:100), 4℃过夜。恢复至室温后, PBS 冲洗 3 min×3 次。滴加即用型山羊抗兔二抗,室温孵育 20 min, PBS 冲洗 3 min×3 次, DBA 显色 5~10 s,水洗终止;苏木素复染 20 s,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,封片。显微镜在 10×40 倍下对视野中 VEGF 阳性率表达观察, Image-Pro Plus 软件行图像分析,计算目的蛋白表达面积与组织总面积的比率,取平均值进行统计分析。

1.4.4 Western blot 测定 NeuN 蛋白表达水平 将脑组织从-80℃冰箱中取出,按每 0.1 g 脑组织加 1 mL 组织蛋白裂解液至玻璃匀浆器匀浆好的组织当中,充分混匀后,采用去垢剂兼容型考马斯亮蓝蛋白定量试剂盒定量检测各标本总蛋白浓度。每组取 20 μg 蛋白裂解液制样,① 电泳:包括制备 SDS 聚丙烯酰胺凝胶,本次实验浓缩胶浓度 5%,分离胶浓度 12%,灌胶,上样。② 蛋白电泳:将电泳仪调至恒压 100 V 后开始电泳,待指示剂进入分离胶后,调整电压 120 V 继续电泳,待蓝色指示条接近凝胶底

部后停止电泳。③ 转膜:将凝胶按照阳极、海绵垫、滤纸、PVDF 膜、凝胶、滤纸、海绵垫、阴极的顺序夹入转膜夹中,然后将转膜夹按照正负极装配到转膜槽中,连接好正负极,将电泳仪调至恒流 200 mA 转膜 2 h,此时的蛋白已从凝胶转移至 PVDF 膜上。④ 封闭:将有目的蛋白的 PVDF 膜浸泡在 TBST 配制的 5%脱脂牛奶中,室温下在垂直脱色摇床上封闭 1 h。相继加 NeuN 一抗(1:500)、二抗(1:5 000)孵育进行免疫反应,取出 PVDF 膜浸入 PBST 中,摇床摇动 10 min,重复 3 次,加 ECL 发光液,显色曝光。结果采用 Quantity One 图像分析软件进行定量分析等量的样品蛋白灰度值,以各组 NeuN 与内参 Actin 灰度比值即为相对灰度,再除以假手术组相对灰度作为统计指标。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析。数据符合正态分布采用($\bar{x}\pm s$)表示,多组的组间比较采用单因素方差分析,两两比较在方差齐性的情况下用 *LSD-t* 法进行后效检验,方差不齐的情况下用 Tamhane's *T2* 方法进行事后检验。*P*<0.05 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 神经功能缺损评估

假手术组和运假组均未出现神经功能缺损表现。与模型组比较,运模组在再灌注 24 h 后神经功能缺损评分降低(*P*<0.05);与模型组比较,运模组在再灌注 3 d 后神经功能缺损评分降低(*P*<0.05)。

评分越低,损伤程度越轻。见表 1。

表 1 4 组大鼠不同时间 mNSS 评分比较($\bar{x}\pm s$) 分
Table 1 Comparison of mNSS scores in four groups of rats at different times ($\bar{x}\pm s$) Scores

组 别	<i>n</i>	再灌注 24 h	再灌注 3 d
假手术组	12	0	0
运 假 组	12	0	0
模 型 组	12	12.50±0.47	9.50±0.57
运 模 组	12	11.50±0.38 ¹⁾	7.25±0.35 ¹⁾

注:与模型组比较,1) *P*<0.05。
Note: Compared with the model group, 1) *P*<0.05.

2.2 免疫组化染色 VEGF 表达

脑组织半暗带区,VEGF 免疫组织化学染色中的棕褐色或棕黄色颗粒沉着在细胞浆和包膜及细胞周边区,在脑组织的神经元、胶质细胞和内皮细胞均可表达。再灌注 24 h 后,假手术组可见少量的血管内皮生长因子 VEGF 表达,阳性细胞胞体小,突起细,阳性率较低。见表 2、图 1 和图 2。

表 2 4 组大鼠不同时间 VEGF 表达比例 %
Table 2 The ratio of VEGF expression in four groups of rats at different times %

组 别	<i>n</i>	再灌注 24 h	再灌注 3 d
假手术组	6	4.70 ¹⁾	5.40 ¹⁾
运 假 组	6	8.80 ¹⁾	14.20 ¹⁾
模 型 组	6	9.80 ¹⁾	12.40 ¹⁾
运 模 组	6	14.40	23.80

注:与运模组比较,1) *P*<0.05。
Note: Compared with the exercise model group, 1) *P*<0.05.

图 1 4 组脑缺血再灌注 24 h 后缺血侧 VEGF 表达(×400)

Figure 1 VEGF expression in four groups on ischemic side 24 hours after cerebral ischemia reperfusion (×400)

图 2 4 组脑缺血再灌注 3 d 后缺血侧 VEGF 表达(×400)

Figure 2 VEGF expression in four groups on ischemic side 3 days after cerebral ischemia reperfusion (×400)

2.3 NeuN 蛋白的表达水平

NeuN 蛋白的 Western blot 结果显示,再灌注 24 h 后运模组与模型组都有下降,运模组下降程度相比模型组较少;再灌注 3 d 后都有升高,运模组升高程度相比模型组较多。再灌注 24 h 和 3 d 后,运模组分别与假手术组、模型组、运假组比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。见图 3 和图 4。

注:A.假手术组;B.模型组;C.运假组;D.运模组。

Note: A. sham operation group; B. model group; C. exercise sham-operation group; D. exercise model group.

图 3 4 组大鼠脑缺血周边区 NeuN 蛋白表达

Figure 3 NeuN protein expression in the peripheral area of cerebral ischemia in four groups of rats

注:与运模组比较,1) $P<0.05$ 。

Note: Compared with the exercise model group, 1) $P<0.05$.

图 4 4 组大鼠脑缺血周边区 NeuN 蛋白灰度值比较

Figure 4 Comparison of the gray value of NeuN protein in the cerebral ischemic peripheral area in four groups of rats

本研究结果发现,脑缺血再灌注 3 d 后 VEGF 表达更多,3 d 时运模组在缺血周边区的表达明显高于模型组、运假组和假手术组,这一结果提示运动预处理促进了 VEGF 表达,脑缺血再灌注以后也会促进 VEGF 表达,而同样在脑缺血再灌注的条件下,运动预处理组的大鼠 VEGF 表达更多,神经功能缺损表现更低;脑缺血再灌注 3 d 以后 NeuN 蛋白表达明显增多,神经功能缺损表现也更低。在实验中也发现运假组在脑缺血再灌注 3 d 后,VEGF、NeuN 蛋白表达都有增高,考虑主要是运动预处理促进了相关蛋白表达。

3 讨论

在“针康同步、动态治疗、整体康复”的脑卒中康复思想“针康法”指导下^[7],本课题组前期研究做了大量关于动物实验以及临床研究^[8],表明针康法促进缺血区周围皮质突触可塑,降低脑缺血后神经元的损伤,加速神经功能重建^[9];抑制神经元凋亡^[10],保护神经元;促进血管新生^[11-12];降低炎症损伤程度^[13]等。总之,针康法对微血管、神经元、胶质细胞的保护不是单一的,而是整体上调控,从而促进脑缺血后神经血管单元功能重塑^[14]。另外,针康法也强调脑卒中预防的重要性,研究表明运动预处理可改善脑缺血再灌注大鼠血脑屏障通透性,具有脑保护作用^[15];电针预处理降低炎症反应,减少细胞凋亡^[16],炎症反应在缺血性脑卒中的发生和发展中扮演着重要的角色,参与病理损伤的全过程^[17]。

目前对于运动预处理的作用机制有很多研究,其主要在于在反复的运动中,出现短暂的、轻微的脑缺血可有效诱导缺血/缺氧耐受,导致具有调节神经环境、再生过程、神经细胞凋亡和氧化应激等作用,另外也有围绕血流动力学和血管内皮功能,诱导 VEGF 信号^[18]。VEGF 为血管内皮细胞增殖和迁移以及血管通透性的关键调节因子^[19]。有文献报道,VEGF 及受体是血管生成中特异、有效的作用元素,在血管生成中具有重要的意义,而 VEGF 表达的主要刺激因素为血流量增加、内皮剪应力增加、氧化代谢增强等^[20],VEGF 在运动诱导血管生成和增加脑

侧支循环中的作用需要反复进行中、高强度的运动训练^[21]。另有研究报道,Fe-axatilin 通过调节下游信号通路减弱 VEGF 诱导的内皮通透性,这可能有助于其对缺血性脑血管渗漏的保护作用^[22]。基质金属蛋白酶-9、VEGF 参与了脑梗死的发生、发展过程,在缺血性脑卒中其具有重要的临床意义^[23-24]。

NeuN 是一种核蛋白,在成熟神经元胞核中表达,是一种特异的神经元标志物,神经元的成熟与 NeuN 的表达量成正相关性,因此作为神经元的标记物^[25]。金媛媛等^[26]观察到脑缺血后,缺血区 NeuN 阳性细胞减少。因此,本研究采用中等强度跑步训练,观察运动预处理对于脑缺血再灌注后 VEGF、NeuN 的影响。

临床研究表明,运动训练可以提高老年人的脑血管反应性,增加健康老年人大脑中的小血管数目,并减少血液流变特性的异常^[27-28]。纠正心脑血管危险因素的重要方法即为运动疗法,其在心脑血管疾病一级和二级预防中起着重要作用^[29]。缺血性脑卒中的危险因素有效管理对于降低脑卒中的复发率是很重要的^[30],社会支持是患者应对疾病的有效资源之一^[31],然而目前公众对健康生活方式的认识和对危险因素的控制仍然不是最理想的^[32]。本研究结果表明,脑缺血再灌注前给予运动预处理可减少脑缺血再灌注以后的脑损伤程度,通过增强 VEGF、NeuN 蛋白的表达,从而改善感觉运动功能障碍和运动行为。本实验进一步证明临床中运动预处理对于脑卒中的预防机制,从而提供具有脑卒中风险人群预防的依据。

参考文献

- [1] ZHU L W, TANG Q, LI J, et al. Expression of VEGF and LN in brain tissue of ischemic stroke rats by acupuncture-rehabilitation [J]. J Clin Acupuncture and Moxibustion, 2015, 31(10): 71-74. 朱路文, 唐强, 李季, 等. 针康法对脑缺血大鼠脑组织 VEGF、LN 表达的影响[J]. 针灸临床杂志, 2015, 31(10): 71-74.
- [2] SUN G J, MA J T, LI Z B, et al. The influence of electro-acupuncture therapy combined with exercise training on the expressions of vascular endothelial growth factor (VEGF) in rats with cerebral infarction [J]. Chin J Clin(Electr Ed), 2015, 9(9): 1649-1653. 孙国剑, 马军廷, 李占标, 等. 电针结合运动疗法对脑梗死大鼠血管内皮生长因子表达的影响[J]. 中华临床医师杂志(电子版), 2015, 9(9): 1649-1653.
- [3] ZHANG Q, ZHANG L, YANG X J, et al. The effects of exercise preconditioning on cerebral blood flow change and endothelin-1 expression after cerebral ischemia in rats [J]. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2014, 23(6): 1696-1702.
- [4] FENG R, ZHANG M, WANG X, et al. Pre-ischemic exercise alleviates oxidative damage following ischemic stroke in rats [J]. Exp Ther Med, 2014, 8(4): 1325-1329.
- [5] OTSUKA S, SAKAKIMA H, SUMIZONO M, et al. The neuroprotective effects of preconditioning exercise on brain damage and neurotrophic factors after focal brain ischemia in rats [J]. Behav Brain Res, 2016, 303: 9-18.
- [6] BORLONGAN C V, RANDALL T S, CAHILL D W, et al. Asymmetrical motor behavior in rats with unilateral striatal excitotoxic lesions as revealed by the elevated body swing test [J]. Brain Res, 1995, 676(1): 231-234.
- [7] TANG Q, ZHU L W. A new strategy for cerebral apoplexy rehabilitation: acupuncture and rehabilitation method [J]. Chin J Rehabil Med, 2015, 30(10): 1071-1073. 唐强, 朱路文. 脑卒中康复新策略: 针康法[J]. 中国康复医学杂志, 2015, 30(10): 1071-1073.
- [8] GUAN Y, LI J, WANG L, et al. Effect of acupuncture-rehabilitation therapy on homocysteine and cognitive function for patients with ischemic stroke [J]. Chin J Rehabil Theory Pract, 2019, 25(3): 289-293. 关莹, 李季, 王璐, 等. 针康法对缺血性脑卒中患者同型半胱氨酸及认知功能的影响[J]. 中国康复理论与实践, 2019, 25(3): 289-293.
- [9] TANG Q, LIU H G, WANG Y, et al. Effects of cluster needling of scalp acupuncture combined with rehabilitation on forelimb motor function and expression of synaptophysin and growth-associated protein-43 in rats after focal cerebral ischemia [J]. Chin J Rehabil Theory Pract, 2011, 17(10): 973-976. 唐强, 刘宏光, 王艳, 等. 针康法对局灶性脑缺血大鼠前肢运动功能及缺血区突触素和生长相关蛋白-43 表达的影响[J]. 中国康复理论与实践, 2011, 17(10): 973-976.
- [10] TANG Q, TIAN Y, YE T, et al. Effects of acupuncture-rehabilitation therapy on apoptosis and expression of X-linked inhibitor of apoptosis protein and cleaved-caspase-9 in ischemic penumbra of rats with cerebral ischemia [J]. Chin J Rehabil Theory Pract, 2017, 23(12): 1365-1371. 唐强, 田源, 叶涛, 等. 针康法对脑缺血大鼠缺血半暗区细胞凋亡及 X 连锁凋亡抑制蛋白和 cleaved-caspase-9 蛋白表达的影响[J]. 中国康复理论与实践, 2017, 23(12): 1365-1371.
- [11] TANG Q, JIANG Y F, ZHU L W, et al. Effect of cluster needling of scalp acupuncture combined with rehabilitation on neurological function and expression of basic fibroblast growth factor and angiostatin in rats after focal cerebral ischemia [J]. Chin J Rehabil Theory Pract, 2015, 21(10): 1151-1155. 唐强, 姜云飞, 朱路文, 等. 针康法对局灶性脑缺血大鼠神经功能缺损及缺血区碱性成纤维细胞生长因子、血管抑制素蛋白表达的影响[J]. 中国康复理论与实践, 2015, 21(10): 1151-1155.
- [12] TANG Q, RUAN Y, YE T, et al. Effect of acupuncture plus rehabilitation on neurologic deficit and VEGF protein expression in cortex on the infarction side in rats with focal cerebral infarction [J]. Shanghai J Acu-mox, 2017, 36(5): 602-607. 唐强, 阮野, 叶涛, 等. 头穴丛刺联合康复疗法对局灶性脑梗死大鼠神经功能缺损及缺血侧皮层 VEGF 蛋白表达的影响[J]. 上海针灸杂志, 2017, 36(5): 602-607.

- [13] ZHAO Y D,TANG Q,ZHU L W,et al. Effects of acupuncture-rehabilitation therapy on intestinal flora and serum TNF- α and IL-18 in the patients with ischemic stroke [J]. World J Integr Tradit West Med,2019,14(2):232-235.
赵一点,唐强,朱路文,等. 针康法对缺血性卒中患者肠道菌群及血清 TNF- α 、IL-18 的影响[J]. 世界中西医结合杂志,2019,14(2):232-235.
- [14] ZHU L W,TANG Q,WANG Y,et al. Effect of acupuncture-rehabilitation method on functional remodeling neurovascular unit after cerebral ischemia [J]. J Clin Acupuncture and Moxibustion,2016,32(6):70-73.
朱路文,唐强,王艳,等. 针康法对脑缺血后神经血管单元重塑的影响[J]. 针灸临床杂志,2016,32(6):70-73.
- [15] LIANG B Y,ZHU L W,TANG Q,et al. Effects of exercise preconditioning on blood-brain barrier permeability in rats after cerebral ischemia-reperfusion injury [J]. Chin J Rehabil Theory Pract,2019,25(3):302-306.
梁碧莹,朱路文,唐强,等. 运动预处理对大鼠脑缺血再灌注损伤后血脑屏障通透性的影响[J]. 中国康复理论与实践,2019,25(3):302-306.
- [16] ZHU L,YE T,TANG Q,et al. Exercise preconditioning regulates the toll-like receptor 4/nuclear factor- κ B signaling pathway and reduces cerebral ischemia/reperfusion inflammatory injury:a study in rats [J]. J Stroke Cerebrovasc Dis,2016,25(11):2770-2779.
- [17] TANG Q,HUANG H L,ZHU L W,et al. Research progress on the relationship between ischemic stroke and immunoinflammatory factors [J]. Rehabil Med,2020,30(1):79-84.
唐强,黄慧琳,朱路文,等. 缺血性脑卒中与免疫炎症因子关系的研究进展[J]. 康复学报,2020,30(1):79-84.
- [18] REZAEI R,NASOOHI S,HAGHPARAST A,et al. High intensity exercise preconditioning provides differential protection against brain injury following experimental stroke [J]. Life Sci,2018,207:30-35.
- [19] RIBATTI D. The discovery of the fundamental role of VEGF in the development of the vascular system [J]. Mech Dev,2019,160:103579.
- [20] MORO T,BRIGHTWELL C R,PHALEN D E,et al. Low skeletal muscle capillarization limits muscle adaptation to resistance exercise training in older adults [J]. Exp Gerontol,2019,127:110723.
- [21] WANG Y,LI M,DONG F,et al. Physical exercise-induced protection on ischemic cardiovascular and cerebrovascular diseases [J]. Int J Clin Exp Med,2015,8(11):19859-19866.
- [22] CHOI H J,KIM N E,KWON I,et al. Fc-saxatitin inhibits VEGF-induced permeability by regulating claudin-5 expression in human brain microvascular endothelial cells [J]. Microvasc Res,2020,128:103953.
- [23] WAN M,ZHOU Z M. Research progress in effects of VEGF and MMP-9 on ischemic stroke [J]. Chin J Clin Pharmacol Ther,2015,20(3):344-348.
万梅,周志明. VEGF 和 MMP-9 与缺血性脑卒中关系的研究进展[J]. 中国临床药理学与治疗学,2015,20(3):344-348.
- [24] ZHANG J Q,WANG D,ZHU Y L. Research progress of vascular endothelial growth factor and ischemic stroke [J]. Chin J Geriatr Heart Brain Vessel Dis,2019,21(4):446-448.
张佳琪,王迪,朱雨岚. 血管内皮生长因子与缺血性脑卒中的研究进展[J]. 中华老年心脑血管病杂志,2019,21(4):446-448.
- [25] SAITO S,SHIINA T,SHIMIZU Y. NeuN immunoreactivity in the brain of *Xenopus laevis* [J]. Tissue Cell,2017,49(4):514-519.
- [26] JIN Y Y,HU J,FENG L,et al. Spatial organization of neurovascular unit after focal cerebral ischemia-reperfusion in rats [J]. Chin J Rehabil Theory Pract,2015,21(1):31-34.
金媛媛,胡静,冯璐,等. 局灶性脑缺血再灌注大鼠神经血管单元的空间构筑[J]. 中国康复理论与实践,2015,21(1):31-34.
- [27] MURRELL C J,COTTER J D,THOMAS K N,et al. Cerebral blood flow and cerebrovascular reactivity at rest and during sub-maximal exercise:Effect of age and 12-week exercise training [J]. AGE,2013,35(3):905-920.
- [28] ZHANG F,WU Y,JIA J. Exercise preconditioning and brain ischemic tolerance [J]. Neuroscience,2011,177:170-176.
- [29] WANG Z,YANG W W,WANG L. Pathological factors of nerve and skeletal muscle that are prone to recurrence of cardiovascular and cerebrovascular diseases in stroke patients and rehabilitation methods of Chinese and Western medicine [J]. Chin J Rehabil,2018,33(2):163-165.
王尊,杨伟伟,王磊. 脑卒中患者心脑血管疾病易复发的神经和骨骼肌病理因素和中西医康复方法[J]. 中国康复,2018,33(2):163-165.
- [30] CAPRIO F Z,SOROND F A. Cerebrovascular disease:primary and secondary stroke prevention [J]. Med Clin North Am,2019,103(2):295-308.
- [31] GUAN F G,WANG M,LIAN X Q. Association of self-management and social support among stroke patients [J]. Rehabil Med,2018,28(5):50-53,58.
关风光,王玫,连小勤. 脑卒中患者自我管理与社会支持相关性研究[J]. 康复学报,2018,28(5):50-53,58.
- [32] WU S,WU B,LIU M,et al. Stroke in China:advances and challenges in epidemiology,prevention,and management [J]. Lancet Neurol,2019,18(4):394-405.

Effect of Exercise Preconditioning on Protein Expression of VEGF and NeuN in Rats with Cerebral Ischemia-reperfusion

PEI Fei¹, WANG Xuedong², LI Baolong¹, TANG Qiang¹, ZHU Luwen^{1*}

¹ The Second Affiliated Hospital of Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin, Heilongjiang 150001, China;

² Acupuncture and Tuina College and Rehabilitation College, Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin, Heilongjiang 150001, China

* Correspondence: ZHU Luwen, E-mail: zhuluwen1983@126.com

ABSTRACT Objective: To explore the effects of exercise preconditioning on the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and neuronal core antigen (NeuN) proteins in rats with cerebral ischemia-reperfusion. **Methods:** The rats were randomly divided into sham-operation group, model group, exercise sham-operation group (exercise pretreatment and sham-operation group) and exercise model group (exercise pretreatment and model group) by the random number table method, with 24 rats in each group. Each group was then divided into two subgroups according to the cerebral ischemia-reperfusion time of 24 hours and 3 days, with 12 rats in each subgroup. Before the model was built, the exercise sham-operation group and the exercise model group were trained on the treadmill for 3 weeks. In the model group and exercise model group, the modified Longa suture method was used to prepare the rat middle cerebral artery occlusion (MCAO) model. After 2 hours, the suture was slowly pulled out to the branch of the common carotid artery. The method of modeling rats in the sham-operation group and the exercise sham-operation group was the same as the above, but the thread plug was only inserted about 10 mm from the common carotid artery and then pulled out, which could not block the middle cerebral artery blood supply. The modified neurologic severity score (mNSS) was used to assess neurological function, while the immunohistochemistry and Western blot were respectively used to determine the protein expression levels of VEGF and NeuN in the ischemic lateral brain tissue. **Results:** 1) There were no neurological deficits in the sham-operation group and the exercise sham-operation group. Compared with the model group, the neurological deficit scores of the exercise model group at 24 hours and 3 days after cerebral ischemia-reperfusion decreased, and the comparison between the two groups was statistically significant ($P<0.05$). 2) 24 hours after cerebral ischemia-reperfusion, a small amount of VEGF expression were seen in the sham operation group, the positive cell bodies were small, and the protrusions were thin; compared with the positive rate of the exercise model group (14.40%), the positive rate of the sham-operation group (4.70%), the positive rate of the model group (9.80%), the positive rate of the exercise sham-operation group (8.80%) were low, and the differences were statistically significant respectively ($P<0.05$). Three days after cerebral ischemia-reperfusion, compared with the positive rate of the exercise model group (23.80%), the positive rate of the sham-operation group (5.40%), the positive rate of the model group (12.40%), and the positive rate of the exercise sham-operation group (14.20%) were all reduced, and the differences were statistically significant respectively ($P<0.05$). 3) 24 hours after cerebral ischemia-reperfusion, compared with the exercise model group, the expression of NeuN protein in the model group was less, and the difference was statistically significant ($P<0.05$); Three days after cerebral ischemia-reperfusion, compared with the exercise model group, the expression of the model group was less, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion:** Exercise preconditioning before cerebral ischemia-reperfusion can reduce the performance of neurological deficits after cerebral ischemia-reperfusion, and improve sensorimotor dysfunction and motor behavior by enhancing the protein expression of VEGF and NeuN.

KEY WORDS ischemia-reperfusion; vascular endothelial growth factor; neuronal core antigen; exercise preconditioning

DOI: 10.3724/SP.J.1329.2021.01006

《康复学报》第二届编委会名单

主 编: 陈立典

副主编: 曹丽英 吴 毅 黄晓琳 黄锦文 林克忠 敖丽娟

燕铁斌 陶 静 Alice Y M JONES (澳大利亚)

顾 问: 陈可冀 石学敏 孙塑伦 励建安 彭 斌 周谋望

编 委: (按汉语拼音顺序排列)

陈红霞	陈 捷	陈锦秀	陈文华	陈 旸 (美国)	陈友琴 (美国)	陈 月 (美国)
陈卓铭	窦祖林	冯晓东	何 坚	胡 军	黄东锋	黄国志
黄惠榕	黄建平	黄苏萍	贾子善	姜迎萍	金荣疆	孔 健 (美国)
李奎成	李 丽	廖维靖	林国徽	林明和	刘建忠	吕晓东
牟 翔	穆克利 (美国)	彭 军	邱模炎	苏友新	唐 强	唐 巍
王于领	吴民华	吴 强	谢仁明	谢欲晓	闫彦宁	杨 楠
杨珊莉	姚新苗	余曙光	战丽彬	张安仁	赵文汝	

(按英文字母顺序排列)

Kit SINCLAIR (美国) Margot SKINNER (新西兰)

Sheila PURVES (加拿大) Wilfried SCHUPP (德国)

(《康复学报》编委会)