

脑缺血再灌注模型大鼠接受跑台运动锻炼海马反义导向分子A的表达

郭振委¹, 秦新月², 张广慧¹(¹徐州医学院附属连云港市第一人民医院神经内科, 江苏省连云港市 222002; ²重庆医科大学附属第一医院神经内科, 重庆市 400042)

文章亮点:

文章特点在于通过观察轴突生长抑制因子反义导向分子A表达, 确定缺血再灌注大鼠康复锻炼可能的合适锻炼量: 8 m/min, 5 min; 10 m/min, 5 min; 13 m/min, 20 min的跑台训练, 30 min/d, 5 d/周。

关键词:

实验动物; 脑及脊髓损伤模型; 运动锻炼; 脑缺血再灌注; 反义导向分子A; 实时定量PCR; 海马

主题词:

再灌注损伤; 体育运动; 海马; 运动活动

摘要

背景: 脑卒中后, 运动锻炼对其神经功能的康复具有极其重要的作用, 但关于卒中后大鼠运动量的研究鲜有报道。而海马与认知功能密切相关, 但大鼠缺血再灌注后海马内反义导向分子A的表达的研究, 国内外未见报道。

目的: 探索运动锻炼对脑缺血再灌注后大鼠缺血侧海马内反义导向分子A表达的影响。

方法: 将120只SD大鼠随机等分为正常组、假手术组、模型7, 14, 28 d组, 模型7, 14, 28 d组大鼠采用线栓法制作大鼠右侧脑缺血再灌注模型。各组大鼠各等分为4个亚组: 非运动亚组、低、中、高运动量亚组。低运动量组进行5 m/min, 5 min; 7 m/min, 5 min; 9 m/min, 20 min跑台训练; 中运动量组进行8 m/min, 5 min; 10 m/min, 5 min; 13 m/min, 20 min跑台训练; 高运动量组进行8 m/min, 5 min; 11 m/min, 5 min; 20 m/min, 20 min跑台训练。

结果与结论: 非运动时, 模型7 d组大鼠缺血侧海马反义导向分子A mRNA和蛋白表达水平最高, 且反义导向分子A相对表达水平随时间延长而逐渐降低。与非运动相比, 模型14, 28 d组大鼠中运动量时缺血侧海马反义导向分子A mRNA和蛋白表达水平明显下降($P < 0.05$), 而高运动量海马反义导向分子A mRNA和蛋白表达水平表达增加。提示中运动量锻炼可以降低脑缺血再灌注大鼠患侧海马反义导向分子A的表达。

郭振委, 秦新月, 张广慧. 脑缺血再灌注模型大鼠接受跑台运动锻炼海马反义导向分子A的表达[J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(5):685-690.

Expression of repulsive guidance molecule A in the hippocampus of rat models of cerebral ischemia-reperfusion injury during treadmill exercise

Guo Zhen-wei¹, Qin Xin-yue², Zhang Guang-hui¹ (¹Department of Neurology, Lianyungang Municipal First People's Hospital, Xuzhou Medical College, Lianyungang 222002, Jiangsu Province, China; ²Department of Neurology, First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract

BACKGROUND: Exercises play an important role in the recovery of neurological function after stroke. Few studies concerned the amount of exercise in rats after stroke. Hippocampus is strongly associated with cognitive function, but no reports addressed the expression of repulsive guidance molecule A in the rat hippocampus after ischemia and reperfusion.

OBJECTIVE: To explore the effects of exercise on repulsive guidance molecule A expression in the hippocampus on the ischemic side in rats after cerebral ischemia-reperfusion injury.

METHODS: 120 Sprague-Dawley rats were equally and randomly divided into normal group, sham-operation group, and 7-, 14-, 28-day model groups. The model of right cerebral ischemia-reperfusion injury was induced by ligation with nylon monofilament in rats of 7-, 14-, 28-day model groups. Low exercise group received treadmill training of 5 m/min, 5 minutes; 7 m/min, 5 minutes; 9 m/min, 20 minutes. Moderate exercise group received treadmill training of 8 m/min, 5 minutes; 10 m/min, 5 minutes; 13 m/min, 20 minutes. High exercise group received treadmill training of 8 m/min, 5 minutes; 11 m/min, 5 minutes; 20 m/min, 20 minutes.

RESULTS AND CONCLUSION: Repulsive guidance molecule A mRNA and protein expression was highest in the ischemic side of the hippocampus in the 7-day model group without exercise. Moreover, repulsive guidance molecule A relative expression gradually reduced over time. Compared with non-exercise, repulsive guidance molecule A mRNA and protein expression significantly decreased in the 14- and 28-day model groups during moderate exercise ($P < 0.05$), but repulsive guidance molecule A mRNA and protein expression increased during high exercise. Above data confirmed that moderate exercises could decrease repulsive guidance molecule A

郭振委, 男, 1982年生, 河南省义马市人, 汉族, 2011年重庆医科大学毕业, 硕士, 医师, 主要从事脑血管病方面的研究。

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.

2015.05.006

[http://www.cjter.org]

中图分类号:R318

文献标识码:B

文章编号:2095-4344

(2015)05-00685-06

稿件接受: 2014-11-14

expression in the affected side of the hippocampus of rats with cerebral ischemia-reperfusion injury.

Subject headings: Reperfusion Injury; Sports; Hippocampus; Motor Activity

Guo ZW, Qin XY, Zhang GH. Expression of repulsive guidance molecule A in the hippocampus of rat models of cerebral ischemia-reperfusion injury during treadmill exercise. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2015;19(5):685-690.

0 引言 Introduction

脑卒中在全世界有极高的发病率和死亡率, 幸存者中有大部分患者有认知学习和记忆功能缺损, 而海马与记忆等认知功能关系密切相关, 认知功能康复与海马可塑性有关^[1-4]; 而反义导向分子A是一种与脑可塑性密切相关的分子, 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、诱导生长锥塌陷等, 而阻断受损神经轴突再生, 影响脑的可塑性^[5]。脑缺血后反义导向分子A表达增加, 降低了脑的可塑性^[6-9]。既往研究显示运动锻炼可促进局灶性脑缺血大鼠神经功能康复^[10-16], 可以改善肢体运动功能、改善大鼠空间认知记忆、减轻抑郁、缓解氧化应激损伤、促进神经血管新生、减少梗死面积、改善脑血流等, 本实验拟观察运动锻炼对缺血侧海马反义导向分子A表达的影响。

1 材料和方法 Materials and methods

设计: 随机对照动物实验。

时间及地点: 实验于2010年1月至2011年1月在重庆医科大学附属第一医院神经病学实验室完成。

材料:

动物: 健康雄性SD大鼠120只, 鼠龄8周, 质量200-280 g, 由重庆医科大学实验动物中心提供, 许可证号: SCXK(渝)2007-0001。饲养环境: 温度在18-26 °C, 相对湿度40%-70%, 湿度5%-10%, 噪声85 dB以下, 氨浓度20 ppm以下, 通风换气8-12次/h。实验过程中动物的处置符合医学伦理学标准。

大鼠运动锻炼研究使用的主要试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
RNA提取试剂, PrimeScript™ RT reagent Kit	Takara公司
BioEasy SYBR Green I 荧光PCR试剂盒	杭州博日公司
兔多克隆反义导向分子A一抗	Abcam公司
ABI 7500实时PCR体系	Applied Biosystems公司
SLY-RTML六通道动物跑台	北京颂林苑公司
光谱	奥林帕斯公司

方法:

实验动物分组: 120只大鼠随机分为5组: 正常组、假手术组、模型7, 14, 28 d组, 各组再随机分为非运动、低运动量、中运动量、高运动量亚组, 每组各6只。术前12 h禁食不禁水。

脑缺血再灌注模型的制备: 参照Longa等^[17-18]方法, 结合其他研究者经验, 采用线栓法制作大鼠右侧大脑中动脉缺血/再灌注模型。大鼠腹腔注射体积分数3.5%水合氯醛10 mL/kg。大鼠仰卧固定于操作台上。剪去大鼠颈部毛发。颈部正中切口, 沿着胸锁乳突肌内缘分离肌肉和筋膜, 暴露右侧的颈总动脉, 颈外动脉和颈内动脉, 然后分别一次烧断颈外动脉上的分支甲状腺上动脉、颈外动脉和颈内动脉之间的交通支血管, 并同时结扎烧断的颈外动脉近心端, 游离主干, 丝线备用。分离颈内动脉约1 cm栓线备用, 用微动脉夹夹闭颈内动脉和颈外动脉, 用小剪刀在颈外动脉残端做一切口, 将预先准备好的线栓(表面涂有肝素)从颈外动脉缓慢插入颈内动脉, 缚紧颈内动脉上的丝线以防止栓线滑落和出血, 移去颈内动脉处的微动脉夹, 用直镊子将栓线缓慢沿颈内动脉的入颅方向推进, 在渔线进入18-20 mm处(从颈总动脉分叉处算起)微感到阻力时, 表明栓线已经通过大脑中动脉的起始部, 在切口上方扎紧丝线, 完成一侧大脑中动脉的阻塞。移除微动脉夹, 清理术野, 碘伏消毒, 全层缝合伤口。栓塞大脑中动脉2 h后打开手术切口, 轻轻拔出栓线, 待栓头到达颈总动脉分叉处停止, 进行再灌注, 清理手术野, 碘伏消毒, 关闭手术切口。

神经功能评分: 神经功能缺失评分标准: 模型成功后, 大鼠右侧出现Horner's征, 且左侧肢体疼痛回缩反应迟钝或消失的现象。根据Zea Longa 5分制评分标准^[16], 大鼠手术麻醉清醒后评分。0分: 正常, 无神经功能缺损症状; 1分: 轻度局灶性神经功能缺失(不能完全伸展左侧前肢, 呈屈曲、抬高、肩内收、肘关节伸直); 2分: 中度局灶性神经功能缺失(行走时, 大鼠向左侧转圈, 出现“追尾”现象); 3分: 中重度局灶性神经功能缺失(行走时, 大鼠向左侧倾倒); 4分: 不能自发行走, 无自发活动, 意识水平降低甚至丧失。

大鼠运动锻炼方法: 结合先前Fernanda Cechetti等^[19-21]研究运动的方法, 制定了如下运动方式。各组大鼠均在术前经过3 d适应性跑台训练, 30 min/d, 分别为8 m/min, 5 min; 11 m/min, 5 min; 15 m/min, 20 min。模型7, 14, 28 d组大鼠在缺血再灌注3 d后, 给予跑台训练。①低运动量组: 5 m/min, 5 min; 7 m/min, 5 min; 9 m/min, 20 min。②中运动量组: 8 m/min, 5 min; 10 m/min, 5 min; 13 m/min, 20 min。③高运动量组: 8 m/min, 5 min; 11 m/min, 5 min; 20 m/min, 20 min。低运动量、中运动量、高运动量组大鼠训练均为30 min/d, 5 d/周。模型7, 14, 28 d组分别于造模后7, 14, 28 d取材。正常组和假手术组大鼠于运动后28 d处死取材。

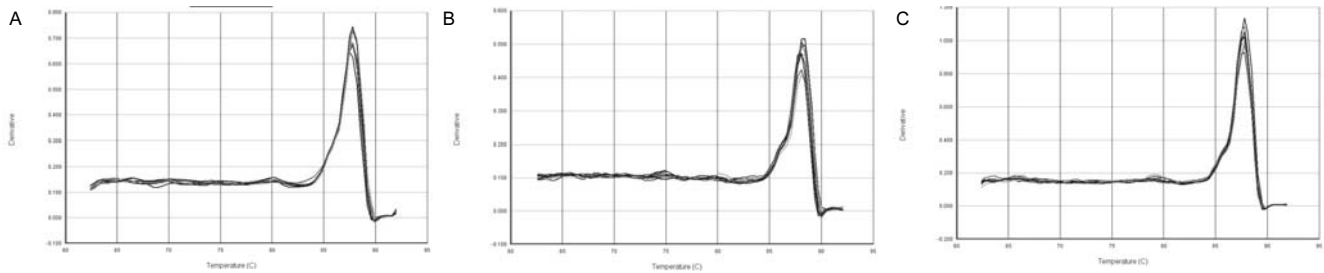


图1 模型7, 14, 28 d中运动量组大鼠缺血侧海马反义导向分子A mRNA扩增产物的熔解曲线

Figure 1 Melting curves of repulsive guidance molecule A mRNA amplification products in the rat hippocampus on the ischemic side in the 7-, 14- and 28-day model groups during moderate exercise

图注: 图中A-C分别为模型7, 14, 28 d中运动量组。

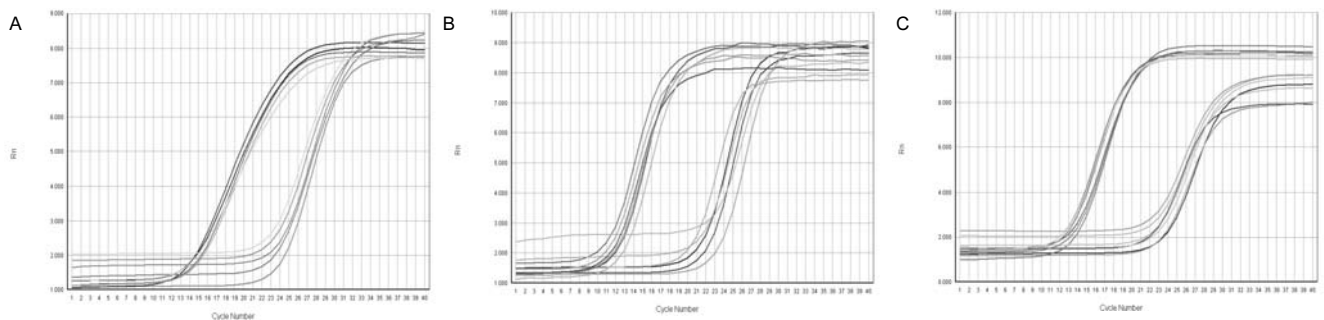


图2 模型7, 14, 28 d组大鼠缺血侧海马反义导向分子A和β-actin mRNA的扩增曲线

Figure 2 Amplification curves of repulsive guidance molecule A and β-actin mRNA amplification products in the rat hippocampus on the ischemic side in the 7-, 14- and 28-day model groups

图注: 图中A-C分别为模型7, 14, 28 d组大鼠中运动量组。

实时定量PCR检测大鼠缺血侧海马中反义导向分子A mRNA的表达: 腹腔注射体积分数3.5%水合氯醛深度麻醉后断头处死, 迅速剥取右侧大脑中动脉供血区完整海马, 液氮保存, 高温灭活。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 °C, 2 min, 94 °C 10 s, 60 °C 15 s, 72 °C, 31 s, 共40循环。

引物序列:

基因	引物序列	退火温度	产物长度
反义导向分子A	正义链: 5'-GAC TTT CAC AGA CCA	60 °C	6 199 bp
	CTT CCA GAC A-3'		
	反义链: 5'-CTC GTC CAT CTC		
	GGC TTG GTA-3'		
β-actin	正义链: 5'-GGA GAT TAC TGC	60 °C	150 bp
	CCT GGC TCC TA-3'		
	反义链: 5'-GAC TCA TCG TAC		
	TCC TGC TTG CTG-3'		

通过生成的熔解曲线确定反应产物的单一性。 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法对反义导向分子A基因进行相对定量, 运用相对定量法计算目的基因相对表达差异。每个样本的 $\Delta Ct = Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{\beta\text{-actin}}$, $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{缺血样品}} - \Delta Ct_{\text{正常样品}}$ 。

免疫组化检测大鼠缺血侧海马中反义导向分子A的表达: 腹腔注射3.5%水合氯醛深度麻醉大鼠, 用40 g/L多聚甲醛经心脏灌流固定, 取出脑组织, 作石蜡切片(片厚4 μm)。

切片常规脱蜡。体积分数3% H_2O_2 溶液灭活内源性酶。加入体积分数3% H_2O_2 溶液和体积分数0.3% Triton X-100, 微波炉加热修复抗原。滴加体积分数5%的正常山羊血清37 °C封闭1 h。滴加兔多克隆反义导向分子A特异性一抗(1:300)4 °C孵育24 h, 然后再用PBS冲洗。次日37 °C复温45 min, 滴加生物素标记羊抗兔IgG 37 °C孵育30 min, PBS冲洗3次。辣根酶标记的链霉卵白素37 °C孵育30 min, PBS洗。DAB显色, 苏木精复染。盐酸乙醇分化, 碳酸锂返蓝, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树脂封固。PBS代替特异一抗作为阴性对照。光镜下观察胞膜反义导向分子A阳性表达呈棕黄色。应用Image-pro plus(美国Media Cybernetics公司)软件分析, 高倍镜(×400)下, 在海马区随机各取4个视野计阳性细胞吸光度值, 取平均值。

主要观察指标: 免疫组化法和实时定量PCR测定实验大鼠海马反义导向分子A的表达情况。

统计学分析: 采用SPSS 13.0统计软件(美国SPSS 公司)分析, 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, 方差不齐者用Dunnet's T3法检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 有15只大鼠在大脑中动脉缺血/再灌注模型制备中死亡, 大鼠补足后, 共120只进入结果分析。

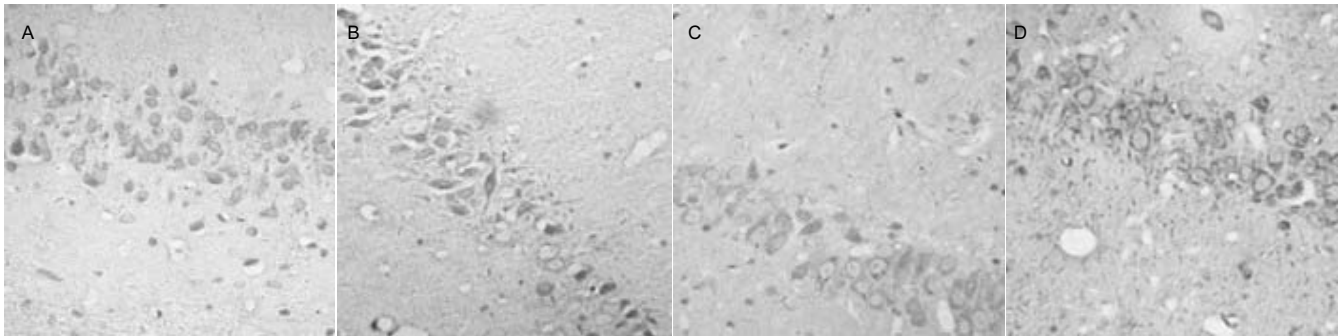


图3 模型14 d组大鼠不同运动程度下海马中反义导向分子A的表达(免疫组化染色, ×200)

Figure 3 Expression of repulsive guidance molecule A in the rat hippocampus of 14-day model group under different degrees of exercise (immunohistochemical staining, ×200)

图注: 缺血侧海马神经元胞膜可见棕黄色反义导向分子A阳性着色。图中A为非运动亚组; B为低运动亚组; C为中运动亚组, 着色最浅; D为高运动量亚组。

表1 跑台运动锻炼对脑缺血再灌注模型大鼠海马反义导向分子A mRNA表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$, $2^{-\Delta\Delta Ct}$)

Table 1 Effects of treadmill exercise on repulsive guidance molecule A mRNA expression in rat models of cerebral ischemia-reperfusion injury

组别	非运动	低运动量	中运动量	高运动量
正常组	0.45±0.15	0.42±0.09	0.36±0.14 ^a	0.59±0.20 ^a
假手术组	0.48±0.10	0.48±0.12	0.34±0.11 ^a	0.57±0.19 ^a
模型组				
7 d	0.88±0.25 ^{bc}	0.80±0.20 ^{bc}	0.93±0.24 ^{bc}	0.97±0.26 ^{abc}
14 d	0.82±0.19 ^{bc}	0.82±0.27 ^{bc}	0.70±0.16 ^{abc}	0.91±0.24 ^{abc}
28 d	0.66±0.22 ^{bc}	0.64±0.25 ^{bc}	0.56±0.18 ^{abc}	0.85±0.30 ^{abc}

表注: 与非运动相比, ^a $P < 0.05$; 与正常组相比, ^b $P < 0.05$; 与假手术组相比, ^c $P < 0.05$ 。

表2 跑台运动锻炼对脑缺血再灌注模型大鼠海马反义导向分子A表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$, A)

Table 2 Effects of treadmill exercise on repulsive guidance molecule A expression in the hippocampus of rat models of cerebral ischemia-reperfusion injury

组别	非运动	低运动量	中运动量	高运动量
正常组	0.062±0.002	0.061±0.003	0.052±0.008 ^a	0.070±0.008 ^a
假手术组	0.061±0.002	0.060±0.006	0.054±0.006 ^a	0.070±0.003 ^a
模型组				
7 d	0.138±0.007 ^{bc}	0.128±0.024 ^{bc}	0.084±0.025 ^{bc}	0.142±0.029 ^{abc}
14 d	0.126±0.022 ^{bc}	0.130±0.020 ^{bc}	0.075±0.023 ^{abc}	0.143±0.030 ^{abc}
28 d	0.100±0.004 ^{bc}	0.101±0.020 ^{bc}	0.056±0.026 ^{abc}	0.150±0.013 ^{abc}

表注: 与非运动相比, ^a $P < 0.05$; 与正常组相比, ^b $P < 0.05$; 与假手术组相比, ^c $P < 0.05$ 。

2.2 跑台运动锻炼对脑缺血再灌注模型大鼠海马反义导向分子A mRNA表达的影响 用ABI7500配套程序分析软件生成反义导向分子A溶解曲线, 反义导向分子A基因PCR产物的溶解曲线峰值约在87 °C, 溶解温度均一。反义导向分子A溶解曲线峰值高, 形状锐利示反义导向分子A表达较高, 产物特异(图1)。

SYBR Green 实时定量PCR部分扩增曲线见图2。

非运动时, 模型7 d组大鼠缺血侧海马反义导向分子A mRNA表达水平最高, 且反义导向分子A相对表达水平随时间延长而逐渐降低。而正常组、假手术组和模型7, 14, 28 d组大鼠缺血侧海马反义导向分子A mRNA表达水平差异无显著性意义($P > 0.05$)。与非运动相比, 模型14, 28 d组大鼠中运动量时缺血侧海马反义导向分子A mRNA表达水平明显下降($P < 0.05$), 而高运动量海马反义导向分子A mRNA表达水平表达增加($P < 0.05$, 见表1)。

2.3 跑台运动锻炼对脑缺血再灌注模型大鼠海马反义导向分子A表达的影响 免疫组化结果显示, 脑缺血再灌注模型后, 缺血侧海马神经元胞膜可见棕黄色反义导向分子A阳性着色(图3), 缺血侧海马反义导向分子A表达水平7 d时较高, 随时间延长表达下降。与非运动相比, 14, 28 d组大鼠中运动量时缺血侧海马反义导向分子A表达水平明显下降($P <$

0.05), 而高运动量时缺血侧海马反义导向分子A表达水平明显增高($P < 0.05$, 见表2)。

3 讨论 Discussion

缺血性脑卒中常常造成患者遗留学习与记忆功能受损^[21-22], 而海马还是对缺血性损伤最敏感的一个脑区, 它在学习与记忆过程中发挥着重要作用^[23-24]。既往研究显示运动锻炼可以促进海马功能恢复, 改善学习与记忆^[25-28], 但其具体的机制尚不明确。

成年哺乳动物中枢神经受损后, 神经元轴突再生无法越过受损处, 无法与靶器官建立神经连接, 胶质瘢痕等阻碍了再生轴突生长锥的延伸, 也就阻断了轴突再生。这与胶质瘢痕抑制轴突再生、大量轴突再生抑制因子存在等有关^[29-30]。而学习与记忆的建立, 有赖于受损神经元的轴突再生^[31], 考虑反义导向分子A可能是这样的一种分子, 卒中后高表达的反义导向分子A抑制轴突再生, 从而使受损的学习与记忆恢复困难, 而其表达的下降, 有利于神经元轴突的再生, 从而改善卒中后受损的学习与记忆, 这可能为它的一个机制。

反义导向分子A是一种轴突再生抑制因子、膜结合蛋白, 不但有轴突导向作用, 而且介导神经管闭合、抑制中

枢神经系统轴突再生、参与凋亡调控、神经系统生长、分化、损伤后神经细胞存活、轴突再生等生理及病理过程^[32]。反义导向分子A与其受体neogenin结合后激活RhoA, 导致抑制/排斥性效应及神经细胞生长锥的塌陷, 引起中枢神经系统轴突再生障碍。Hata等^[6]研究发现大鼠脊髓损伤后, 鞘内注射反义导向分子A特异性抗体进行干预, 可中和反义导向分子A表达, 显著促进受损轴突再生, 且有效促进其神经功能的康复。作者所在课题组前期实验也发现: 运用重组腺病毒介导的反义导向分子A特异性RNA干预方法, 降低了缺血区过度表达的轴突生长抑制因子反义导向分子A, 轴突生长显著延长。人脑局灶性脑缺血后, 反义导向分子A在1 d时升高、1.5-2.5 d达高峰、3-7 d始下降^[3]。本实验结果显示7 d时表达量较高, 随时间延长表达量逐渐下降, 这与Schwab等^[33]研究一致。提示局灶性缺血后, 高运动量/低运动量锻炼都未能降低缺血侧海马区反义导向分子A表达, 而中运动量锻炼后, 大鼠海马区反义导向分子A表达降低。

运动量的大小影响着治疗的效果。Zhang等^[34]报道15 m/min速度比20 m/min的跑台运动速度更明显减小梗死面积、下调神经功能抑制因子表达。Zhang等^[35]报道给予12 m/min的运动量锻炼, 可以刺激并增加卒中后大鼠脑内线粒体的生物合成、减少梗死面积, 这与作者的实验结果一致: 中运动量速度组可显著下调轴突生长抑制因子反义导向分子A表达。Kim等^[36]报道给予20 m/min的高运动量锻炼, 可以改善卒中后大鼠肢体运动功能、减少胆碱酯酶活动, 而起到神经保护作用, Martins等^[37]亦有类似报道, 他们的研究表明高运动锻炼量可以获得最大氧摄入的75%时, 能增强神经保护效应。这与作者的研究结果中运动量可更好改善神经功能不同, 原因可能是动物模型锻炼时是非缺血模型有关, 锻炼周期结束后给予完成缺血模型。本实验结果提示中运动量最有效, 这与Shih等^[38]的研究结果不同, 他的研究示持续的8 m/min的低运动量可以更好地改善突触可塑性及空间认知功能, 不同的原因可能在于我们的研究低运动量速度均相对较低。Yang等^[39]研究显示, 高运动量比低运动量可更好地改善运动功能与减小梗死面积, 他制备大脑中动脉闭塞模型时缺血1 h后再灌注, 而本实验是在缺血2 h后再灌注, 可能因随缺血时间延长脑梗死水肿加重所致。运动锻炼通过促进神经再生, 在神经适应性和神保护性过程中, 显著的影响大脑的可塑性^[40], 但其具体机制, 尚在探索中。本研究表明, 中量运动锻炼可以减弱脑卒中大鼠海马反义导向分子A表达, 为受损轴突再生提供了良好的周围环境; 而受损海马轴突再生, 是大脑可塑性的重要组成部分, 这可能是运动锻炼改善脑卒中认知的结构基础。

综上, 局灶性脑缺血再灌注后, 中运动量锻炼可以减弱脑卒中大鼠海马反义导向分子A表达, 从而为海马受损轴突再生提供良好的外部环境。而海马是与记忆等认知功

能密切相关的重要脑功能区, 为临床上脑卒中患者记忆等认知的改善, 提供了一个可能的康复策略与科研方向。

致谢: 感谢重庆医科大学附属第一医院神经病学实验室的各位老师对试验技术上对我的支持和帮助。感谢重庆医科大学附属第一医院神经病学实验室同仁在技术方面对实验的支持和帮助。

作者贡献: 郭振委和秦新月进行实验设计, 实验实施为郭振委, 实验评估为郭振委、张广慧, 资料收集为郭振委, 郭振委成文, 秦新月审校, 郭振委对文章负责。

利益冲突: 文章内容不涉及相关利益冲突。

伦理要求: 实验过程中对动物的处置应符合2009年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

学术术语: 反义导向分子A-是一种能激活RhoA-Rho激酶路信号通路而不依赖于NgR的新的轴突生长抑制蛋白, 其最初是作为一种排斥性的轴突导向分子而被发现的, 还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以及神经管闭合, 控制着神经元的生存、增殖、分化。

作者声明: 文章为原创作品, 无抄袭剽窃, 无泄密及署名和专利争议, 内容及数据真实, 文责自负。

4 参考文献 References

- [1] Schmidt HL, Vieira A, Altermann C, et al. Memory deficits and oxidative stress in cerebral ischemia-reperfusion: neuroprotective role of physical exercise and green tea supplementation. *Neurobiol Learn Mem.* 2014;114:242-250.
- [2] Wu YY, Wu WY, Gong HL, et al. Astragalosides attenuate learning and memory impairment in rats following ischemia-reperfusion injury. *Mol Med Rep.* 2014;9(4):1319-1324.
- [3] Shih PC, Yang YR, Wang RY. Effects of exercise intensity on spatial memory performance and hippocampal synaptic plasticity in transient brain ischemic rats. *PLoS One.* 2013; 8(10): e78163.
- [4] Luo CX, Jiang J, Zhou QG, et al. Voluntary exercise-induced neurogenesis in the postischemic dentate gyrus is associated with spatial memory recovery from stroke. *J Neurosci Res.* 2007; 85(8):1637-1646.
- [5] Hata K, Fujitani M, Yasuda Y, et al. RGMa inhibition promotes axonal growth and recovery after spinal cord injury. *J Cell Biol.* 2006;173(1):47-58.
- [6] Feng J, Wang T, Li Q, et al. RNA interference against repulsive guidance molecule A improves axon sprout and neural function recovery of rats after MCAO/reperfusion. *Exp Neurol.* 2012;238(2):235-242.
- [7] Wang T, Wu X, Yin C, et al. CRMP-2 is involved in axon growth inhibition induced by RGMa in vitro and in vivo. *Mol Neurobiol.* 2013;47(3):903-913.
- [8] Jiang F, Yin H, Qin X. Fastigial nucleus electrostimulation reduces the expression of repulsive guidance molecule, improves axonal growth following focal cerebral ischemia. *Neurochem Res.* 2012;37(9):1906-1914.
- [9] Zhang G, Zhang JH, Feng J, et al. Electrical stimulation of olfactory bulb downregulates RGMa expression after ischemia/reperfusion injury in rats. *Brain Res Bull.* 2011;86 (3-4): 254-261.

- [10] Wang X, Zhang M, Feng R, et al. Exercise pre-conditioning alleviates brain damage via excitatory amino acid transporter 2 and extracellular signal-regulated kinase 1/2 following ischemic stroke in rats. *Mol Med Rep.* 2014. in press.
- [11] Wang SS, Wang JJ, Wang PX, et al. Determinants of Fatigue after First-Ever Ischemic Stroke during Acute Phase. *PLoS One.* 2014;9(10):e110037.
- [12] Feng R, Zhang M, Wang X, et al. Pre-ischemic exercise alleviates oxidative damage following ischemic stroke in rats. *Exp Ther Med.* 2014;8(4):1325-1329.
- [13] Gao Y, Zhao Y, Pan J, et al. Treadmill exercise promotes angiogenesis in the ischemic penumbra of rat brains through caveolin-1/VEGF signaling pathways. *Brain Res.* 2014;1585: 83-90.
- [14] Luo J, Hu X, Zhang L, et al. Physical exercise regulates neural stem cells proliferation and migration via SDF-1 α /CXCR4 pathway in rats after ischemic stroke. *Neurosci Lett.* 2014;578:203-208.
- [15] Zheng HQ, Zhang LY, Luo J, et al. Physical exercise promotes recovery of neurological function after ischemic stroke in rats. *Int J Mol Sci.* 2014;15(6):10974-10988.
- [16] Schmidt A, Wellmann J, Schilling M, et al. Meta-analysis of the efficacy of different training strategies in animal models of ischemic stroke. *Stroke.* 2014;45(1):239-247.
- [17] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke.* 1989;20(1):84-91.
- [18] Nagasawa H, Kogure K. Correlation between cerebral blood flow and histologic changes in a new rat model of middle cerebral artery occlusion. *Stroke.* 1989;20(8):1037-1043.
- [19] Cechetti F, Rhod A, Simão F, et al. Effect of treadmill exercise on cell damage in rat hippocampal slices submitted to oxygen and glucose deprivation. *Brain Res.* 2007;1157:121-125.
- [20] Scopel D, Fochesatto C, Cimarosti H, et al. Exercise intensity influences cell injury in rat hippocampal slices exposed to oxygen and glucose deprivation. *Brain Res Bull.* 2006;71(1-3): 155-159.
- [21] Cechetti F, Worm PV, Elsner VR, et al. Forced treadmill exercise prevents oxidative stress and memory deficits following chronic cerebral hypoperfusion in the rat. *Neurobiol Learn Mem.* 2012;97(1):90-96.
- [22] Alipanahzadeh H, Soleimani M, Soleimani Asl S, et al. Transforming Growth Factor- α Improves Memory Impairment and Neurogenesis Following Ischemia Reperfusion. *Cell J.* 2014;16(3):315-324.
- [23] Collino M, Aragno M, Mastrocola R, et al. Modulation of the oxidative stress and inflammatory response by PPAR- γ agonists in the hippocampus of rats exposed to cerebral ischemia/reperfusion. *Eur J Pharmacol.* 2006;530(1-2):70-80.
- [24] Cîrneai D, Silaghi-Dumitrescu R. Learning tasks as a possible treatment for DNA lesions induced by oxidative stress in hippocampal neurons. *Neural Regen Res.* 2013; 8(32): 3063-3070.
- [25] van Praag H. Neurogenesis and exercise: past and future directions. *Neuromolecular Med.* 2008;10(2):128-140.
- [26] Vivar C, Potter MC, van Praag H. All about running: synaptic plasticity, growth factors and adult hippocampal neurogenesis. *Curr Top Behav Neurosci.* 2013;15:189-210.
- [27] Voss MW, Vivar C, Kramer AF, et al. Bridging animal and human models of exercise-induced brain plasticity. *Trends Cogn Sci.* 2013;17(10):525-544.
- [28] Yin Y, Gu Z, Pan L, et al. Lu Gan1, How does the motor relearning program improve neurological function of brain ischemia monkeys? *Neural Regen Res.* 2013; 8(16): 1445-1454.
- [29] Mueller BK, Yamashita T, Schaffar G, et al. The role of repulsive guidance molecules in the embryonic and adult vertebrate central nervous system. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2006;361(1473):1513-1529.
- [30] Schwab JM, Conrad S, Monnier PP, et al. Spinal cord injury-induced lesional expression of the repulsive guidance molecule (RGM). *Eur J Neurosci.* 2005;21(6):1569-1576.
- [31] Yin HL, Wang YL, Li JF, et al. Effects of curcumin on hippocampal expression of NgR and axonal regeneration in A β -induced cognitive disorder rats. *Genet Mol Res.* 2014; 13(1):2039-2047.
- [32] Severyn CJ, Shinde U, Rotwein P. Molecular biology, genetics and biochemistry of the repulsive guidance molecule family. *Biochem J.* 2009;422(3):393-403.
- [33] Schwab JM, Monnier PP, Schluesener HJ, et al. Central nervous system injury-induced repulsive guidance molecule expression in the adult human brain. *Arch Neurol.* 2005;62 (10): 1561-1568.
- [34] Zhang A, Bai Y, Hu Y, et al. The effects of exercise intensity on p-NR2B expression in cerebral ischemic rats. *Can J Neurol Sci.* 2012;39(5):613-618.
- [35] Zhang Q, Wu Y, Zhang P, et al. Exercise induces mitochondrial biogenesis after brain ischemia in rats. *Neuroscience.* 2012;205:10-17.
- [36] Kim G, Kim E. Effects of treadmill training on limb motor function and acetylcholinesterase activity in rats with stroke. *J Phys Ther Sci.* 2013;25(10):1227-1230.
- [37] Martins DF, Mazzardo-Martins L, Soldi F, et al. High-intensity swimming exercise reduces neuropathic pain in an animal model of complex regional pain syndrome type I: evidence for a role of the adenosinergic system. *Neuroscience.* 2013;234: 69-76.
- [38] Shih PC, Yang YR, Wang RY. Effects of exercise intensity on spatial memory performance and hippocampal synaptic plasticity in transient brain ischemic rats. *PLoS One.* 2013; 8(10): e78163.
- [39] Yang YR, Chang HC, Wang PS, et al. Motor performance improved by exercises in cerebral ischemic rats. *J Mot Behav.* 2012;44(2):97-103.
- [40] Dimyan MA, Cohen LG. Neuroplasticity in the context of motor rehabilitation after stroke. *Nat Rev Neurol.* 2011;7(2):76-85.