

· 基础研究 ·

不同时间窗经颅磁刺激对脑梗死大鼠 Bcl-2 及脑源性神经营养因子表达的影响

李媛 王梦滢 宋艳玲 梅元武 黎刚 方媛

【摘要】目的 观察大鼠脑缺血-再灌注后不同时间窗开始经颅磁刺激(TMS)对其 B 细胞淋巴瘤/白血病-2 基因(Bcl-2)及脑源性神经营养因子(BDNF)表达的影响。**方法** 将 100 只 SD 大鼠随机分为正常组、假手术组、磁刺激组及模型组,各组又根据术后干预时间点细分为术后 6 h、12 h、24 h、48 h 及 72 h 共 5 个亚组。采用线栓法将磁刺激组及模型组大鼠制成左侧大脑中动脉栓塞/再灌注(MCAO/R)模型。磁刺激组各亚组分别于脑缺血再灌注后 6 h、12 h、24 h、48 h 及 72 h 进行 TMS 治疗,而正常组、假手术组及模型组各亚组均于上述相同时间点给予假磁刺激。各组大鼠均于治疗 14 d 后取脑,采用实时荧光定量 PCR 技术检测脑梗死侧 Bcl-2 及 BDNF mRNA 表达情况。**结果** 各组大鼠梗死侧脑标本均检测到 BDNF 及 Bcl-2 mRNA 阳性表达,磁刺激组各亚组 Bcl-2 及 BDNF mRNA 表达均显著高于其它各亚组水平(模型组术后 72 h 亚组除外);对磁刺激组各亚组进行组内比较发现,该组各亚组 BDNF 及 Bcl-2 mRNA 间差异具有统计学意义($P < 0.05$),其中以术后 24 h 亚组 BDNF 及术后 12 h 亚组 Bcl-2 mRNA 表达水平相对较高。**结论** 脑缺血再灌注 12 ~ 24 h 内给予 TMS 治疗,能显著促进脑梗死大鼠 BDNF 及 Bcl-2 表达,对保护受损神经细胞、促进神经功能恢复具有重要意义。

【关键词】 经颅磁刺激; 脑梗死; 细胞淋巴瘤/白血病-2 基因; 脑源性神经营养因子

Transcranial magnetic stimulation and the expression of Bcl-2 and brain derived neurotrophic factor after cerebral infarction LI Man, WANG Meng-die, SONG Yan-ling, MEI Yuan-wu, Li Gang, FANG Yuan. Department of Neurology, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China

Corresponding author: FANG Yuan, Email: fangyuan28@hotmail.com

【Abstract】Objective To study the effect of transcranial magnetic stimulation (TMS) on the rehabilitation of rats with cerebral infarction. **Methods** One hundred Sprague-Dawley rats were randomly divided into a normal group, a sham-operated control group, a model group and a TMS group with 25 rats in each group. A cerebral infarction model was established in the latter two groups by left middle cerebral artery occlusion (MCAO). TMS was started at either 12 or 24 hours after reperfusion, and sham-TMS was given to the first two groups at the same time points. The expression of Bcl-2 mRNA and BDNF mRNA were measured by RT-PCR after 14 days. **Results** Bcl-2 mRNA and BDNF mRNA were detected in all groups. The expression of Bcl-2 mRNA in the TMS-12 h group, and that of BDNF mRNA in the TMS-24 h group were significantly higher than in the other groups. **Conclusions** The expression of Bcl-2 mRNA and BDNF mRNA in the brains of rats after cerebral infarction peak when TMS is administered 12 h and 24 h after reperfusion, respectively. TMS might have protective and rehabilitative effects on rats after cerebral infarct.

【Key words】 Transcranial magnetic stimulation; Cerebral infarct; B-cell lymphoma/leukemia-2 gene; Brain derived neurotrophic factors

随着缺血性脑卒中发病率逐年增高,针对脑梗死患者的康复治疗已成为当前临床研究的重要内容之一。经颅磁刺激(transcranial magnetic stimulation,

TMS)是一种能够在脑深部组织中诱发感应电流,从而影响相应脑部神经细胞功能的无创技术。相关临床研究表明,TMS 可促进脑梗死患者运动功能恢复^[1];但脑梗死后何时进行 TMS 治疗才能获取最佳疗效目前尚未明确。基于上述背景,本研究通过观察大鼠脑缺血再灌注后不同时间窗开始 TMS 治疗对其 B 细胞淋巴瘤/白血病-2 基因(B-cell lymphoma/leukemia 2, Bcl-2)及脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)表达的影响,初步探

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2010.04.002

基金项目:国家自然科学基金(NO.30640010)

作者单位:430032 武汉,华中科技大学同济医学院附属协和医院神经内科

通信作者:方媛,Email:fangyuan28@hotmail.com

讨 TMS 治疗脑梗死的最佳时间窗及可能机制,为 TMS 更好地应用于脑梗死患者临床治疗提供参考依据。现报道如下。

材料与方法

一、实验动物分组

共选取成年 Sprague-Dawley 雄性大鼠 100 只,由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供,大鼠体重(250 ± 30)g,鼠龄 12 周,将其随机分为正常组、假手术组、磁刺激组及模型组,各组再根据术后开始干预的时间窗细分为术后 6 h、12 h、24 h、48 h 及 72 h 共 5 个亚组,每个亚组有 5 只大鼠。

二、脑梗死动物模型制作

参照廖维靖等^[2]介绍的改良 Longa 线栓法将磁刺激组及模型组大鼠制成左侧大脑中动脉栓塞/再灌注 (middle cerebral artery occlusion/reperfusion, MCAO/R) 动物模型,具体操作步骤如下:首先采用 10% 水合氯醛按每千克体重 3 ml 进行腹腔注射麻醉,待麻醉剂生效后进行颈正中切口,暴露左侧颈总动脉及颈内动脉,结扎颈总动脉近心段并分离颈内动脉;将涂有多聚赖氨酸、直径为 0.28 mm 的尼龙线沿颈动脉分叉处插入颈内动脉约 (18.0 ± 1.0) mm 处,结扎固定尼龙线后缝合皮肤;待大脑中动脉栓塞 90 min 后将线栓拔出约 10 mm 实现血液再灌注。脑梗死大鼠模型制作成功标准如下:大鼠苏醒后提尾时出现右侧前肢内收屈曲;左侧 Horner 征阳性;爬行时向右侧划圈;站立时向右侧倾倒等。凡实验大鼠术后具有上述表现者均提示制模成功。假手术组大鼠手术操作过程均与模型组及磁刺激组一致,但术中不阻断大脑中动脉血流;正常组未给予任何手术处理。

三、TMS 干预

TMS 治疗采用丹麦 Dantec 公司生产的磁刺激器及圆形线圈,线圈直径 12 cm,能产生脉冲强度峰值为 1.9 T 的磁场。磁刺激组各亚组大鼠根据预先设定的时间,分别于脑缺血-再灌注后 6 h、12 h、24 h、48 h 及 72 h 开始 TMS 治疗,磁刺激频率为 0.5 Hz,设置磁场强度为最大输出强度的 70% 水平 (约 1.33 T),每次磁刺激治疗持续 1 min (约 30 个脉冲刺激),每天刺激 2 次,中间间隔 8 h (分别于上午 9:00 及下午 5:00 各刺激 1 次),连续刺激 14 d。正常组、假手术组及模型组各亚组大鼠均于上述相同时间点给予假 TMS 治疗,即所有环境条件及 TMS 治疗条件均与磁刺激组一致,但在治疗过程中磁刺激器无能量输出。

四、大鼠脑内 Bcl-2 及 BDNF mRNA 检测

各组实验大鼠于脑缺血再灌注 14 d 后采用过量

10% 水合氯醛深度麻醉,于冰盘上快速、断头取脑,切取梗死灶周边脑组织约 100 mg,每份标本取约 1×10^5 个细胞,去上清液后加入 Trizol 溶液 0.5 ml,混匀后静置 10 min;每管加入氯仿 200 μ l,用手振摇 15 s;于 4 $^{\circ}$ C 环境下以 12 000 转/min 离心 15 min;取上清液 400 μ l,加入等体积异丙醇混匀, -20 $^{\circ}$ C 静置 30 min;于 4 $^{\circ}$ C 环境下以 12 000 转/min 离心 10 min;去上清液,经 75% 乙醇洗涤、沉淀、离心后,去净残余上清液,于室温下晾干;用 50 μ l 经焦碳酸二乙酯处理过的三蒸水溶解沉淀,选择紫外分光光度计测定其浓度及纯度,在逆转录酶 M-MLV 作用下,将 mRNA 逆转录成 cDNA 分子,采用 SYBR Green I 荧光染料技术进行实时定量多聚酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR),以获取各组标本标准曲线,采用计算机分析 Ct 值。引物设计序列如下,BDNF 上游引物:5'-CCCTTC-TACACTTTACCTCTTG-3';下游引物:5'-GTTTCAC-CCTTTCCACTCCTA-3';Bcl-2 上游引物:5'-GG-GACGCGAAGTGCTATTGGA-3';下游引物:5'-CAG-GCTGGAAGGAGAAGATGC-3'。

五、统计学分析

采用 Excel 2003 版软件进行数据整理及制图,应用 SPSS 12.0 版统计学软件包进行数据分析,主效应及交互效应统计选用多组重复测量方差分析;单独效应分析选用单因素方差分析及单组重复测量资料方差分析, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

结 果

一、不同时间窗干预对各组大鼠 Bcl-2 表达的影响

对相同时间窗各亚组大鼠比较后发现,正常组及假手术组各亚组 Bcl-2 mRNA 组间差异均无统计学意义 ($P > 0.05$);而模型组及磁刺激组各亚组 Bcl-2 mRNA 与正常组及假手术组各亚组比较,发现组间差异均有统计学意义 ($P < 0.05$);磁刺激组与模型组比较,除了术后 72 h 亚组 Bcl-2 mRNA 组间差异无统计学意义外 ($P > 0.05$),其它各亚组间差异均有统计学意义 ($P < 0.05$),提示于脑梗死 72 h 后开始 TMS 治疗对大鼠 Bcl-2 表达无明显影响作用,而在脑梗死 6 ~ 48 h 内给予 TMS 治疗,则能显著增强大鼠 Bcl-2 表达。对组内不同时间窗亚组比较后发现,正常组、假手术组及模型组各亚组 Bcl-2 mRNA 组内差异均无统计学意义 ($P > 0.05$);而磁刺激组各亚组 Bcl-2 mRNA 组内差异具有统计学意义 ($P < 0.01$),以术后 12 h 亚组 Bcl-2 mRNA 表达水平相对较高,提示不同时间窗给予 TMS 治疗对脑梗死大鼠 Bcl-2 表达具有显著影响作用,具体数据详见表 1。

表 1 不同时间窗干预对各组大鼠脑梗死灶 Bcl-2 及 BDNF mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组 别	只数	Bcl-2 mRNA 表达	BDNF mRNA 表达	组 别	只数	Bcl-2 mRNA 表达	BDNF mRNA 表达
磁刺激组				正常组			
术后 6 h 亚组	5	2.78 ± 0.17	2.92 ± 0.25	术后 6 h 亚组	5	1.04 ± 0.12 ^{ab}	1.07 ± 0.15 ^{ab}
术后 12 h 亚组	5	2.97 ± 0.24	6.72 ± 0.04	术后 12 h 亚组	5	1.06 ± 0.21 ^{ab}	1.05 ± 0.19 ^{ab}
术后 24 h 亚组	5	1.09 ± 0.05	26.95 ± 0.71	术后 24 h 亚组	5	1.10 ± 0.24 ^{ab}	1.09 ± 0.09 ^{ab}
术后 48 h 亚组	5	2.44 ± 0.22	25.22 ± 0.27	术后 48 h 亚组	5	1.03 ± 0.28 ^{ab}	1.14 ± 0.26 ^{ab}
术后 72 h 亚组	5	0.36 ± 0.17	0.69 ± 0.06	术后 72 h 亚组	5	1.02 ± 0.09 ^{ab}	1.30 ± 0.29 ^{ab}
模型组				假手术组			
术后 6 h 亚组	5	0.10 ± 0.02 ^a	0.20 ± 0.02 ^a	术后 6 h 亚组	5	1.03 ± 0.06 ^{ab}	1.04 ± 0.17 ^{ab}
术后 12 h 亚组	5	0.24 ± 0.04 ^a	0.74 ± 0.04 ^a	术后 12 h 亚组	5	1.08 ± 0.17 ^{ab}	1.06 ± 0.19 ^{ab}
术后 24 h 亚组	5	0.23 ± 0.02 ^a	1.58 ± 0.02 ^a	术后 24 h 亚组	5	1.02 ± 0.28 ^{ab}	1.16 ± 0.20 ^{ab}
术后 48 h 亚组	5	0.63 ± 0.06 ^a	0.92 ± 0.02 ^a	术后 48 h 亚组	5	1.04 ± 0.15 ^{ab}	1.02 ± 0.22 ^{ab}
术后 72 h 亚组	5	0.36 ± 0.05	0.65 ± 0.02	术后 72 h 亚组	5	1.05 ± 0.15 ^{ab}	1.15 ± 0.37 ^{ab}

注:与相同时间窗磁刺激组各亚组比较,^a $P < 0.05$;与相同时间窗模型组各亚组比较,^b $P < 0.05$

二、不同时间窗干预对各组大鼠 BDNF 表达的影响

对相同时间窗各亚组大鼠比较后发现,正常组及假手术组各亚组 BDNF mRNA 组间差异均无统计学意义($P > 0.05$);而模型组及磁刺激组各亚组 BDNF mRNA 与正常组及假手术组各亚组比较,发现组间差异均有统计学意义($P < 0.05$);磁刺激组与模型组比较,除了术后 72 h 亚组 BDNF mRNA 组间差异无统计学意义外($P > 0.05$),其它各亚组间差异均有统计学意义($P < 0.05$),提示于脑梗死 72 h 后开始 TMS 治疗对大鼠 BDNF 表达无明显影响作用,而在脑梗死 6 ~ 48 h 内给予 TMS 治疗,则能显著增强大鼠 BDNF 表达。对组内不同时间窗亚组比较后发现,正常组、假手术组及模型组各亚组 BDNF mRNA 组内差异均无统计学意义($P > 0.05$);而磁刺激组各亚组 BDNF mRNA 组内差异具有统计学意义($P < 0.01$),以术后 24 h 亚组 BDNF mRNA 表达水平相对较高,提示不同时间窗给予 TMS 治疗对脑梗死大鼠 BDNF 表达具有显著影响作用,具体数据详见表 1。

讨 论

相关研究发现,缺血性脑梗死病灶中存在缺血半暗带区,且半暗带区内神经细胞损伤在一定时间内具有动态变化及可逆性特点,故在有效时间内采取适当治疗可显著抑制半暗带区神经细胞凋亡,减少神经元受损,从而降低脑梗死的致死率及致残率,有效提高患者生活质量^[4-5]。TMS 是一种能改变人类大脑皮质兴奋性的无创、无痛且相对安全的神经电生理技术。当前国内、外有学者于脑梗死患者发病早期给予 TMS 治疗,并证实能有效抑制患者半暗带区神经元凋亡^[4];亦有学者发现对晚期脑梗死患者进行 TMS 治疗,也能取得较好疗效^[5]。本研究通过观察脑梗死后不同时间窗

实施 TMS 治疗对大鼠 BDNF 及 Bcl-2 表达的影响,从而初步探讨 TMS 治疗缺血性脑梗死的最佳时间窗及可能机制。

BDNF 作为神经营养素家族成员之一,主要分布于大脑皮质、海马、小脑等中枢神经组织中,具有促神经元存活、分化、增殖,抑制运动神经元退行性变以及抗神经元凋亡等功效^[6]。有研究发现,脑缺血、缺氧刺激可促进机体内源性 BDNF 表达^[6],并且有实验证实 TMS 治疗可进一步增强脑梗死后 BDNF 表达^[7],上述发现均与本研究结果基本一致;同时本研究还采用 RT-PCR 技术观察不同时间窗 TMS 治疗对脑缺血再灌注大鼠 BDNF mRNA 表达的影响,发现于再灌注 24 h 时给予 TMS 治疗,该亚组大鼠 BDNF mRNA 表达水平明显高于其它各亚组($P < 0.05$),由此推测 TMS 治疗脑梗死存在时间窗效应。目前研究已发现,BDNF 与其受体 TrkB 结合后,能通过拮抗兴奋性氨基酸毒性、稳定细胞内 Ca^{2+} 浓度、拮抗氧自由基、抑制细胞凋亡等参与脑缺血损伤保护过程,既能抑制半暗带区神经元凋亡,又能缓解迟发性神经元坏死^[8],因此本研究推测 TMS 治疗脑梗死可能与增强脑梗死灶 BDNF 表达,从而发挥其神经保护作用有关。

细胞凋亡是脑缺血后神经元死亡的重要形式之一。Bcl-2 在脑缺血过程中广泛表达,其主要功能是阻断细胞凋亡、促进细胞存活^[8]。本研究同时采取 RT-PCR 技术检测各时间窗 TMS 治疗对脑梗死大鼠 Bcl-2 表达的影响,实验结果显示,各时间窗磁刺激亚组 Bcl-2 mRNA 表达水平均明显高于其它各亚组($P < 0.05$),且以再灌注 12 h TMS 亚组 Bcl-2 mRNA 表达水平相对较高,其变化趋势与各磁刺激亚组 BDNF mRNA 变化趋势相似。本研究推测,TMS 治疗不仅能直接促进 Bcl-2 表达,而且还可通过提高 BDNF 水平,间接促进 Bcl-2 表达,从而发挥其抗细胞凋亡及保护神经元作用,促进

神经功能康复。另外有研究发现,TMS 还可通过其它途径对脑梗死发挥治疗作用,如通过促进脑缺血大鼠脑水肿消退及良性调节细胞外 Ca^{2+} 浓度^[8],提高神经系统兴奋性,加强其功能联系,促进新的神经树突及轴突形成^[9-10];并且还可显著影响脑神经递质水平^[11-12],从而促进脑梗死大鼠神经功能恢复。

综上所述,本研究发现 MCAO/R 模型大鼠于脑梗死后 12 ~ 24 h 时间窗内开始 TMS 治疗可显著提高脑梗死灶 BDNF 及 Bcl-2 表达水平,从而尽可能抑制神经元凋亡,挽救缺血半暗带区濒临死亡细胞,有助于促进神经功能恢复及改善脑梗死预后。如能将本实验进一步深入、完善,并进行相关临床研究,那么对指导脑梗死患者选择最佳时间窗实施 TMS 治疗、促其神经功能康复将具有重要意义。

参 考 文 献

- [1] 金鑫,吴小未,王俊芳,等. 经颅磁刺激在脑梗死患者运动功能康复中的效果. 中华医学杂志,2002,82:534-537.
- [2] 廖维靖,刘淑红,范明,等. 线栓阻断大鼠大脑中动脉制作缺血性脑损伤模型的改良. 中华物理医学与康复杂志,2002,24: 345-348.
- [3] Ren C, Gao X. Limb remote-preconditioning protects against focal ischemia in rats and contradicts the dogma of therapeutic time windows for preconditioning. Neuroscience,2008,151:1099-1103.
- [4] Boggio PS,Alonso AM,Mansur CG,et al. Hand function improvement

with low-frequency repetitive transcranial magnetic stimulation of the unaffected hemisphere in a severe case of stroke. Am J Phys Med Rehabil,2006,85:927-930.

- [5] Fitzgerald PB,Benitez J,de Castella A,et al. A randomized controlled trial of sequential bilateral repetitive transcranial magnetic stimulation for treatment-resistant depression. Am J Psychiatry,2006,163:88-94.
- [6] 杨克红,葛树星,徐冰莹,等. 三七皂苷对大鼠脑缺血再灌注损伤中 BDNF mRNA 含量的影响. 中药材,2007,30:313-316.
- [7] Cheeran B,Talelli P,Mori F,et al. A common polymorphism in the brain-derived neurotrophic factor gene (BDNF) modulates human cortical plasticity and the response to rTMS. J Physiol,2008,586:5717-5725.
- [8] Feng HL,Yan L,Guan YZ,et al. Effects of transcranial magnetic stimulation on motor cortical excitability and neurofunction after cerebral ischemia-reperfusion injury in rats. Chin Med Sci J,2005,20:226-230.
- [9] Bartlett DJ,Rae C,Thompson CH,et al. Hippocampal area metabolites relate to severity and cognitive function in obstructive sleep apnea. Sleep Med,2004,5:593-596.
- [10] Shawn DG,Ramona OH. Effects of hypoxia on the brain;Neuroimaging and neuropsychological findings following carbon monoxide poisoning and obstructive sleep apnea. J Int Neuropsychological Soc,2004,10: 60-71.
- [11] Idiman F,Oztura I,Baklan B,et al. Headache in sleep apnea syndrome. Headache,2004,44:603-606.
- [12] 李铁山,阎文静,刘晓光,等. 脑卒中后受损脑同侧肢体偏瘫的经颅磁刺激研究. 中华物理医学与康复杂志,2008,30:355-357.

(修回日期:2009-08-20)

(本文编辑:易 浩)

· 消息 ·

《骨科》征稿启事

《骨科》为专业性医学学术期刊,由华中科技大学同济医学院附属同济医院骨科陈安民教授担任主编,编委会由全国著名骨科专家组成。国内外公开发行,CN 42-1799/R。本刊为双月刊,逢双月 20 日出版。本刊现为《中国学术期刊综合评价数据库》统计源刊,并被《中国生物医学期刊引文数据库 - CMCI》、《中文科技期刊数据库》、中国生物学文献数据库、《中国核心期刊(遴选)数据库》、《中国生物学文摘》、《中国学术期刊(光盘版)》、“中文生物医学期刊文献数据库 - CMCC”、“中国期刊网”、《万方数据 - 数字化期刊群》等收录。

本刊由原《华中医学杂志》改名而成,《华中医学杂志》历史悠久,由医学泰斗裘法祖教授于 1964 年创刊,有较高的学术价值和国内外影响力。本刊宗旨:坚持贯彻党的卫生工作方针政策,介绍骨外科学及其相关领域的临床新进展、新技术、新方法,推动与骨科临床密切相关的基础理论研究,促进国内外骨科学术交流。该刊以广大骨科医生及从事与骨科工作有关人员为读者对象。

本刊主要设有论著、经验介绍、实验研究、专家述评、专家笔谈、临床病例(理)讨论、综述、讲座、短篇报道等栏目。《骨科》面向全国,欢迎全国各地作者踊跃投稿。

来稿时请写明作者单位的详细地址、邮政编码、办公电话以及 Email,以便联系。

来稿请寄:武汉市解放大道 1095 号同济医院内《骨科》编辑部,邮政编码:430030;联系电话:027 - 83662649;Email:orthopaedics2009@163.com(请勿寄给个人)。

《骨科》编辑部