

· 基础研究 ·

低频电刺激对大鼠脑梗死灶镜区皮质突触可塑性的影响

庄志强 金冬梅 燕铁斌 彭源 向云 郑修元

【摘要】目的 研究脑梗死大鼠经低频电刺激治疗后,其梗死灶镜区脑皮质突触可塑性变化,初步从分子水平探讨低频电刺激治疗的基本机制。**方法** 将 48 只 Sprague-Dawley 大鼠随机分为低频电刺激组、安慰刺激组和假手术组。造模术后 3 d,低频电刺激组接受低频电刺激治疗 7 d (20 min/d);安慰刺激组安放电极但不予电刺激;假手术组无特殊处置。以电子显微镜观察各组动物脑梗死灶镜区突触超微结构,采用 Western blot 技术测定其胶质纤维酸性蛋白 (GFAP) 和突触素的蛋白表达水平。**结果** 低频电刺激治疗 7 d 后,与安慰刺激组及低频电刺激治疗前相比,镜区皮质突触的界面曲率增大、突触间隙缩窄;GFAP 蛋白表达水平无显著改变,而突触素蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$)。**结论** 低频电刺激可诱导脑梗死大鼠梗死灶镜区脑皮质发生活跃的突触可塑性变化。

【关键词】 低频电刺激; 脑梗死; 突触; 可塑性; 大鼠

Effects of low-frequency electrical stimulation on synaptic plasticity in the contralesional mirror area of the cortex of rats with cerebral infarction ZHUANG Zhi-qiang, JIN Dong-mei, YAN Tie-bin, PENG Yuan, XIANG Yun, ZHENG Xiu-yuan. Department of Rehabilitation Medicine, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China

Corresponding author: YAN Tie-bin, Email: dr.yan@126.com

【Abstract】 Objective To study changes in synaptic plasticity in the contralesional mirror area of the cortexes of rats with cerebral infarction treated by low-frequency electrical stimulation (LFES) and to explore the therapeutic mechanism of LFES on the molecular level. **Methods** Forty-eight Sprague-Dawley rats were randomly allocated into a LFES group, a placebo group and a sham-operation group. Following middle cerebral artery occlusion (MCAO), rats in the LFES group were treated with LFES for 7 d (20 min/d), while the ones in placebo group were connected with the same LFES device but without electricity. Rats in the sham-operation group were subjected to a MCAO operation without occlusion and then received no special treatment. Synaptic ultra-structures and the expression levels of glia fibrillary acidic protein (GFAP) and synaptophysin in the contralesional mirror area of the cortexes of the rats in each group were measured with electron-microscopy and Western blotting. **Results** Compared with the placebo group or the rats before treatment, rats treated with LFES exhibited ultra-structural changes in the form of larger curvature of synaptic interfaces and narrower synaptic clefts. GFAP expression levels did not fluctuate significantly, but the expression of synaptophysin was significantly up-regulated. **Conclusion** LFES treatment can induce active changes in synaptic plasticity in the contralesional mirror area of the cortex of rats after cerebral infarction.

【Key words】 Low-frequency electrical stimulation; Cerebral infarction; Synapses; Plasticity

脑卒中是中老年人的常见病和多发病,是人类死亡率最高的三大疾病之一,也是三大疾病中致残最重、恢复最慢的病种,给患者造成极大痛苦,给家庭与社会带来极大的负担^[1,2]。脑卒中的康复治疗方法很多,

近年来,神经肌肉电刺激 (neuromuscular electrical stimulation, NMES) 因临床疗效显著而倍受关注^[2-4]。NMES 是利用一定强度的低频脉冲电流刺激一组或多组肌肉,诱发其运动或模拟正常的肌肉自主运动,以达到改善或恢复被刺激肌肉或肌群功能的目的^[3-5]。目前,关于 NMES 作用机制的基础研究甚少^[5-7]。本研究观察低频电刺激治疗对大鼠脑梗死模型梗死灶镜区 (健侧) 皮质突触可塑性 (synaptic plasticity) 的影响,探讨脑卒中后早期进行低频电刺激治疗促进偏瘫肢体功能恢复的分子机制。

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2009.10.002

基金项目:国家自然科学基金项目 (30772304),广东省自然科学基金项目 (8451008901000885)

作者单位:510120 广州,中山大学附属第二医院康复医学科

通信作者:燕铁斌,Email:dr.yan@126.com

材料与方法

一、动物

选择成年雄性 Sprague-Dawley 大鼠, 体重 (250 ± 10) g, 由中山大学实验动物中心提供。分为低频电刺激组、安慰刺激组和假手术组。

二、构建脑梗死模型

参照刘传玉等^[8]介绍的方法构建大鼠永久性脑梗死模型。大鼠腹腔注射 10% 的水合氯醛 (350 mg/kg 体重) 麻醉; 仰卧位固定于手术台上, 颈部正中切口, 长约 2 cm, 暴露分离左侧颈总动脉 (common carotid artery, CCA) 和颈外动脉; 结扎颈外动脉, 在距 CCA 分叉近端 0.5 ~ 0.6 cm 处结扎 CCA, 并结扎颈外动脉根部及分支; 在 CCA 近分叉处剪一小口, 经此插入直径约 0.2 mm 头端圆钝的丝线, 经 CCA 分叉处通过颈内动脉入颅至大脑中动脉的起始部以阻断大脑中动脉血流; 结扎 CCA, 缝合皮肤。假手术组也进行同样的手术, 但不予大脑中动脉阻断。

造模大鼠苏醒后具有下述四项体征者列为研究对象: ①提尾时右侧前肢内收屈曲, ②同侧 Horner 征, ③爬行时向右划圈, ④站立时右侧倾倒。造模共用 87 只大鼠, 其中 32 只符合入选条件, 随机分入 NMES 组和安慰刺激组; 假手术大鼠 16 只, 无死亡。

三、电极皮下植入

大鼠腹腔注射 10% 的水合氯醛 (350 mg/kg 体重) 麻醉, 在右侧前肢背侧作一长约 2 cm 的纵行切口, 切开皮肤和皮下组织, 显露深筋膜。将电刺激治疗仪的两枚电极分别置于前肢背侧远端和伸指肌腹的筋膜上, 以 3 mA 的电刺激强度寻找敏感点; 待动物出现充分的伸指动作时, 以手术缝线在深筋膜的两个电极接触点处做标记, 即为电刺激敏感点。将一根导线的一端固定于前肢远端敏感点上, 另一根导线的一端固定于前肢近端的敏感点上, 之后两根导线经前肢背侧、项背引至颅顶两耳之间的皮下, 作一 0.5 cm 切口, 引出导线另一端 (作为低频电刺激的接口) 并妥善固定。

四、干预措施

造模术后第 3 天开始 NMES 治疗。NMES 组应用英国 Verity Medical 公司产 NeuroTrac™ Continence 治疗仪, 频率为 30 Hz, 脉宽为 250 ms, 电流强度为 3 mA, 每日治疗 20 min, 治疗 7 d。安慰刺激组应用相同的 NMES 仪治疗 7 d, 但不予以电流刺激。假手术组未给予任何治疗。

五、取材方法

大鼠腹腔注射 10% 的水合氯醛 (350 mg/kg 体重), 麻醉后固定于手术台上, 取梗死灶镜区脑组织, 一部分用于 Western blot 检测, 另一部分作超微结构观

察。

六、超微结构观察

取梗死灶镜区脑组织, 切成 1 mm × 1 mm × 1 mm 大小的小块, 固定于 3% 戊二醛和 4% 多聚甲醛固定液中, 环氧树脂包埋、醋酸铀和枸橼酸铅双染, 用超薄切片机切片^[9]。每份标本制作 2 张铜网, 由左上角至右下角的斜线上下移动, 采用 CM10 型透射电镜随机拍摄突触图像 ($\times 28\ 000$)。

七、Western blot 检测

取大鼠新鲜镜区脑组织, 称重后按 5 倍体积添加蛋白抽提液, 充分研磨, 制成匀浆, 冰块中静置 30 min; 置于低温离心机 (4℃) 中以 10 000 转/min 离心 15 min; 吸取上清液, -20℃ 下保存样品。考马斯亮蓝法检测样品的胶质纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP) 和突触素总蛋白含量: 上样量为 20 μ g, 行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳、转胶, 在 5% 脱脂奶粉中室温下封闭 1 h, 一抗 4℃ 孵育 (1:600 小鼠抗大鼠单克隆突触素抗体或 1:1 000 小鼠抗大鼠多克隆 GFAP 抗体), 二抗孵育 (1:7 000 羊抗小鼠 IgG), 洗膜后化学发光法显影。以 β -actin 为内参进行标准对照。用计算机软件处理灰度值, 进行半定量分析。

八、统计学分析

数据采用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 数值均经方差齐性及正态性检验, 应用 SPSS 12.0 版统计软件进行统计学处理; 组间比较采用方差分析, 组内比较 (治疗前、后比较) 采用 t 检验; $P < 0.05$ 表示有统计学意义。

结 果

一、超微结构观察

假手术组和安慰刺激组治疗前、后及低频电刺激组治疗前, 镜区突触超微结构相似, 突触前、后膜大多平直, 少数有轻度弯曲; 而低频电刺激组治疗第 7 天, 镜区凹型突触明显增多, 可见其前膜明显突向后膜, 突触的活性区加长, 突触间隙变窄 (图 1)。

二、Western blot 分析

假手术组、安慰刺激组和低频电刺激组治疗前、后比较, GFAP 的蛋白表达水平差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 见图 2。

治疗第 7 天, 与假手术组、安慰刺激组相比, 低频电刺激组镜区突触素的蛋白表达水平显著上调 ($P < 0.05$); 安慰刺激组镜区突触素蛋白表达水平与假手术组相比, 差异无统计学意义。低频电刺激组治疗前、后比较, 镜区突触素的蛋白表达水平差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 低频电刺激治疗第 7 天, 大鼠梗死灶镜区突触素的蛋白表达水平比治疗前显著升高 (图 3)。

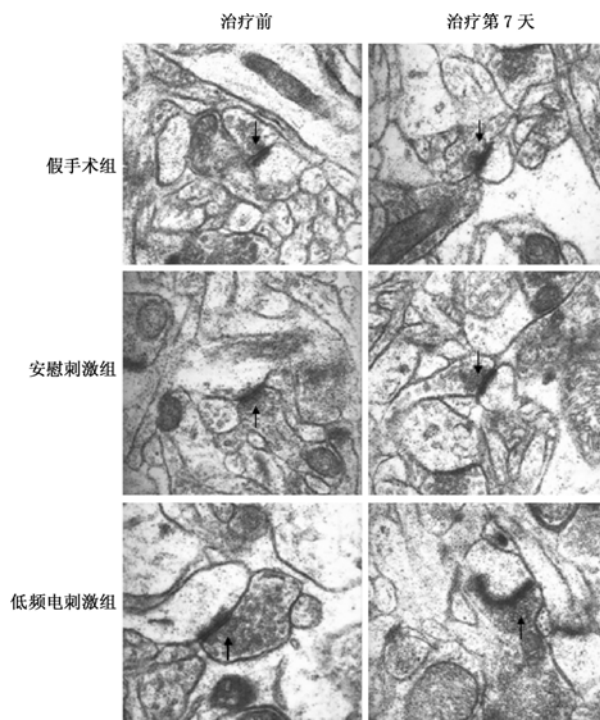


图1 各组大鼠梗死灶镜区突触超微结构观察(醋酸铀-枸橼酸铅双染, $\times 28\ 000$)

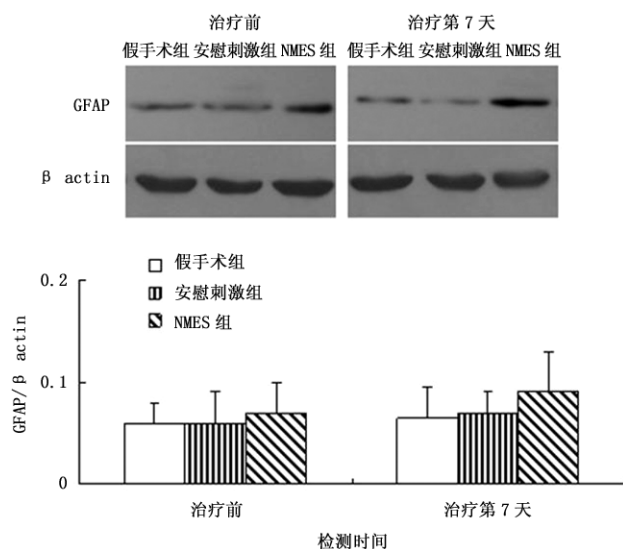
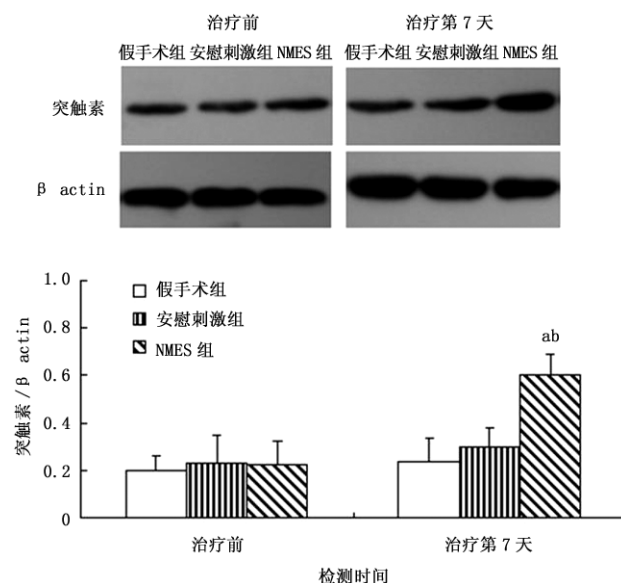


图2 各组大鼠梗死灶镜区的 GFAP 蛋白表达水平

讨 论

对于脑卒中患者, NMES 尤其是低频电刺激早期介入可以显著促进偏瘫肢体的功能恢复、提高生活质量、减少住院时间、降低医疗成本^[3,4,10]。据文献检索, 国内外关于 NMES 的临床应用研究虽然很多, 但关于低频电刺激治疗机制的报道甚少。fMRI 研究表明, NMES 可使梗死灶周围皮质出现活化, 同时健侧脑皮质多个区域也出现活化^[11]。因此, 本研究拟从观察健侧皮质突触可塑性的改变入手, 以 GFAP 和突触素



注: 与安慰刺激组或假手术组治疗第 7 天相比, ^a $P < 0.05$; 与组内治疗前比较, ^b $P < 0.05$

图3 各组大鼠梗死灶镜区的突触素蛋白表达水平

为观察指标, 进一步探讨低频电刺激治疗的可能机制。

星形胶质细胞是中枢神经系统的主要胶质细胞, 对神经细胞起保护、支持作用并参与代谢。GFAP 是星形胶质细胞的骨架蛋白, 在星形胶质细胞受刺激而发生反应时, 其表达水平发生变化, 因此被用来特异性地标记星形胶质细胞, 并被认为是星形胶质细胞活化的标志^[12-14]。突触素是与突触囊泡相连接的磷酸蛋白, 是突触小泡特异性外侧膜蛋白, 在突触囊泡转运和内容物释放过程中都发挥着重要作用。突触素免疫活性增高与轴突末端出芽、侧支形成、囊泡数量递升、活性增强等神经元可塑性变化密切相关^[15,16]。通过对突触免疫产物的定位和定量能够准确反映突触的分布和密度变化^[17,18]。

以往关于电刺激治疗促进脑卒中偏瘫肢体功能恢复的研究, 多限于梗死灶一侧, 有作者认为神经系统受损后, 现存神经元可通过轴突出芽形成不同的径路, 与原有的突触后位点或新的突触后位点发生接触, 形成新的突触; 同时, 平时处于休眠状态的侧支和突触联系被激活, 从而完成神经回路的改造和突触的重组^[19,20]。方燕南等^[16]认为, 反复的电刺激可能通过机械刺激作用上传信号, 到达对侧半球的脑梗死边缘区功能尚存的星形细胞或神经元, 激发它们的活性, 重建与周围神经元的信息联络网, 促使星形胶质细胞增殖, 加强修复功能^[3,16]。

本研究发现, 应用低频电刺激脑梗死大鼠偏瘫侧肢体, 梗死灶镜区(健侧)皮质突触的超微结构发生了活化性改变, 突触素蛋白表达显著上调, 表明低频电刺激治疗过程中, 镜区皮质发生了活跃的可塑性变化, 其

机制可能是:低频电刺激治疗使瘫痪肢体发生强制性使用,信号上传至脑,不仅可引起梗死灶半影区的可塑性改变,镜区也发生了活跃的可塑性变化,提示镜区变化可能对脑卒中患者偏瘫肢体功能康复也具有一定意义。此外,以往有关电刺激治疗脑梗死大鼠的研究发现,梗死灶半影区胶质细胞大量活化,GFAP 表达显著上调^[20]。而本研究发现,低频电刺激治疗第 7 天,大鼠梗死灶镜区的 GFAP 表达虽然略有增加,但差异无统计学意义,提示梗死灶半影区和镜区的神经元可塑性变化模式可能会有所不同——半影区胶质细胞活化表现为加强支持和保护作用,促进树突、轴突、突触发生广泛的可塑性变化;而镜区由于没有梗死灶样损伤,所以胶质细胞反应轻微,可能主要以突触的可塑性变化为主。

由于 NMES 尤其是低频电刺激的临床应用日益增多,深入研究其机制并进一步指导临床应用极为重要。但低频电刺激的治疗机制可能极为复杂,尚需从更多的角度进行深入探讨。

参 考 文 献

- [1] 彭源,金冬梅,燕铁斌,等.神经肌肉电刺激对急性缺血性脑梗死性大鼠运动功能及脑内胶质酸性纤维蛋白表达的影响.中华物理医学与康复杂志,2009,31.
- [2] 游国清,燕铁斌,Hui-Chan CWY.功能性电刺激改善脑卒中早期患者偏瘫下肢功能的随机对照研究.中国康复医学杂志,2007,22:867-870.
- [3] Yan T, Hui-Chan CWY, Li LS. Functional electrical stimulation improves motor recovery of the lower extremity and walking ability of subjects with first acute stroke: a randomized placebo-controlled trial. *Stroke*, 2005, 36: 80-85.
- [4] 郭友华, Yan T, Hui-Chan CWY. 低频电刺激治疗脑卒中偏瘫临床研究进展. 中华物理医学与康复杂志, 2005, 27: 507-509.
- [5] 游国清,燕铁斌.功能性电刺激及其在脑卒中偏瘫患者中的应用.中华物理医学与康复杂志,2007,29:142-144.
- [6] 方燕南,黄如训.星形细胞及胶质纤维酸性蛋白在脑梗死中的作用.国外医学脑血管疾病分册,2000,6:331-334.
- [7] 郭友华, Yan T, Hui-Chan CWY. 低频电刺激治疗脑卒中偏瘫的神经机制研究进展. 中国康复医学杂志, 2005, 20: 156-158.
- [8] 刘传玉,梅元武,张小乔.经颅磁刺激对局灶性脑缺血大鼠梗死周边区 GAP-43 和 Syp 表达的影响.卒中与神经疾病,2006,3: 15-18.
- [9] 杨敏,李涛,余茜.运动训练对脑梗死大鼠行为学及突触形态结构参数的影响.中国康复医学杂志,2007,22:24-27.
- [10] Freeman CT, Hughes AM, Burridge JH, et al. Iterative learning control of FES applied to the upper extremity for rehabilitation. *Control Eng Pract*, 2009, 17: 368-381.
- [11] 靳晓坤,燕铁斌,郑芳芳,等.神经肌肉电刺激诱发健康年轻人手部运动时脑功能性磁共振成像研究.中华物理医学与康复杂志,2009,31:249-252.
- [12] Boccoli JC, Loidl F, Lopez-Costa JJ, et al. Intracerebroventricular administration of Shiga toxin type 2 altered the expression levels of neuronal nitric oxide synthase and glial fibrillary acidic protein in rat brains. *Brain Res*, 2008, 1230: 320-333.
- [13] Beutler B. Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature*, 2004, 430: 257-263.
- [14] Liu XZ, Fan YP, Wang L, et al. Effect of erhuangfang on cerebral and spinal demyelination and regeneration as well as expression of glial fibrillary acidic protein in rats with experimental allergic encephalomyelitis. *Neural Regen Res*, 2007, 2: 491-496.
- [15] Hanaya R, Boehm N, Nehlig A. Dissociation of the immunoreactivity of synaptophysin and GAP-43 during the acute and latent phases of the lithium-pilocarpine model in the immature and adult rat. *Exp Neurol*, 2007, 204: 720-732.
- [16] 方燕南,黄海威,陶玉倩,等.电刺激对大鼠脑梗塞康复中星形细胞与神经元的影响.中国中西医结合杂志,2002,22:531-533.
- [17] Millerot-Serruot E, Chausset A, Mossiat C, et al. Effect of early decrease in the lesion size on late brain tissue loss, synaptophysin expression and functionality after a focal brain lesion in rats. *Neurochem Int*, 2007, 50: 328-335.
- [18] Zhang C, Li Y, Chen J, et al. Bone marrow stromal cells upregulate expression of bone morphogenetic proteins 2 and 4, gap junction protein connexin-43 and synaptophysin after stroke in rats. *Neuroscience*, 2006, 141: 687-695.
- [19] Liu H, Zhang J, Zheng P, et al. Altered expression of MAP-2, GAP-43, and synaptophysin in the hippocampus of rats with chronic cerebral hypoperfusion correlates with cognitive impairment. *Mol Brain Res*, 2005, 139: 169-177.
- [20] Oermann E, Bidmon H, Witte O, et al. Effects of 1 α , 25 dihydroxyvitamin D3 on the expression of HO-1 and GFAP in glial cells of the photothrombotically lesioned cerebral cortex. *J Chem Neuroanat*, 2004, 225-238.

(收稿日期:2008-10-29)

(本文编辑:吴倩)