

· 基础研究 ·

低频电刺激对急性局灶性脑梗死大鼠运动功能及梗死边缘区胶质纤维酸性蛋白表达的影响

彭源 燕铁斌 金冬梅 庄志强 向云 刘慧华 郑修元

【摘要】目的 研究低频电刺激对急性局灶性脑梗死大鼠运动功能和梗死边缘区胶质纤维酸性蛋白(GFAP)表达的影响,探讨低频电刺激治疗促进脑梗死后运动功能恢复的机制。**方法** 54 只成年雄性 SD 大鼠,随机分为低频电刺激组、模型对照组及假手术组,每组 18 只,每组动物再分为治疗 3、7 和 14 d 3 个时间点,每个时间点 6 只。参照 Longa 等的线栓法制成左侧大脑中动脉闭塞(MCAO)模型。低频电刺激组于造模术后 3 d 开始进行低频电刺激治疗,模型对照组应用相同的低频电刺激仪治疗,但不予以电流刺激,假手术组不予任何治疗。分别在治疗前和治疗后各时间点给予平衡木行走测评、转棒上行走测评和网屏试验等功能评定;以免疫组织化学技术观察梗死边缘区胶质纤维酸性蛋白(GFAP)的表达水平变化。**结果** 低频电刺激组大鼠运动功能较模型对照组明显改善($P < 0.05$)。低频电刺激组缺血性半影区的 GFAP 阳性率较模型对照组高($P < 0.05$)。**结论** 低频电刺激能促进脑梗死大鼠运动功能恢复,其中一个重要机制可能是低频电刺激能增强 GFAP 的表达,促进缺血后脑的可塑性变化,构成了脑梗死后功能恢复的物质基础。

【关键词】 低频电刺激; 脑梗死; 运动功能; 胶质纤维酸性蛋白

Effects of low-frequency electrical stimulation on motor function and the expression of glia fibrillary acidic protein around cerebral infarction sites PENG Yuan*, YAN Tie-bin, JIN Dong-mei, ZHUANG Zhi-qiang, XIANG Yun, LIU Hui-hua, ZHENG Xiu-yuan. * Department of Rehabilitation Medicine, The Second Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China

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

【Abstract】Objective To study the effects of low-frequency electrical stimulation(LFES) on motor function and the expression of glia fibrillary acidic protein (GFAP) around cerebral infarction sites in rats. **Methods** Fifty-four male adult Sprague-Dawley rats were randomly divided into a LFES group, a placebo group and a sham operation group (18/group). All groups were randomly divided into 3 treatment groups. A rat model of middle cerebral artery occlusion (MCAO) was established using intraluminal filament occlusion. Treatment was carried out 3 d after the operation. Rats in the LFES treatment groups were stimulated with LFES for 3, 7 or 14 days (10 min/d); the placebo groups were treated in the same way without electric stimulation; the sham operation subgroups didn't receive any therapy. Scores on a beam-walking test, a rotating pole test and a screen test were assessed at each time point mentioned above. Expression of GFAP was also assessed using immunohistochemical techniques. **Results** The paralysed limbs recovered motor function better in the LFES groups than in the control groups. GFAP-positive cells were more numerous at the margins of the infarction area in the treated groups than in the control groups. **Conclusions** LFES might increase the expression of GFAP, which might be an important mechanism in improving brain plasticity after cerebral ischemia, aiding the recovery of the central nervous system and rebuilding its functioning.

【Key words】 Low-frequency electric stimulation; Cerebral infarction; Motor function; Glia fibrillary acidic protein

脑卒中已成为当今社会第三大死亡原因及首位

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2009.10.003

基金项目:国家自然科学基金资助项目(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(彭源、燕铁斌、金冬梅、庄志强、向云、刘慧华、郑修元);广州市第一人民医院(彭源)

通信作者:燕铁斌,Email:Dr. yan@126.com

致残因素。由于脑卒中患者偏瘫侧肢体运动功能存在障碍,从而严重影响了其日常生活活动能力^[1]。有研究发现,低频电刺激(low frequency electric stimulation)可改善脑卒中患者的运动功能^[2-4],从而减轻残疾,提高脑卒中患者的生活质量。但低频电刺激可促进脑卒中后运动功能恢复的机制尚不清楚。胶质纤维酸性蛋白(glia fibrillary acid protein, GFAP)是中枢神经系统重要的生化标记物,可因脑缺血性损

伤而发生变化^[5]。本研究旨在观察低频电刺激对急性脑梗死大鼠运动功能及梗死后梗死灶边缘区 GFAP 表达的影响,探讨低频电刺激改善脑梗死大鼠运动行为的分子机制。

材料与方法

一、实验动物

健康雄性 SD 大鼠 56 只,体重(280 ± 50)g,周龄 8 周,由中山大学实验动物中心提供。

二、局灶性脑缺血模型建立

采用 Longa 等^[6]的线栓法制成大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型。10%水合氯醛(3.5 ml/kg 体重)腹腔注射麻醉,在颈部中央切口,分离左侧颈总动脉、颈外动脉及颈内动脉,将鱼线(直径 0.22 mm,长 20 mm)从颈总动脉送入颈内动脉完全阻塞大脑中动脉,术毕予以青霉素粉剂涂抹切口,预防感染,缝合皮肤。在 MCAO 手术完毕后将美国公司生产的导线植入大鼠右侧前肢的腕背伸肌群的运动点处并从大鼠的头顶穿出以便于低频电刺激治疗。手术完毕后将大鼠放回鼠笼正常喂食和饮水,术后注意对大鼠进行保温。大鼠苏醒后采用改良 Bederson 评分^[7]:0 分——无神经损伤症状;1 分——不能完全伸展对侧前爪;2 分——向右侧转圈;3 分——向右侧倾倒;4 分——不能自发行走,甚至意识丧失。模型对照组和低频电刺激组中取 2 分、3 分者为实验对象,不具备上述体征及手术后未能生存至预定时间的大鼠被淘汰。假手术组只是在动脉内不插线,其余步骤与模型对照组和低频电刺激组完全一致。

三、实验分组

剔除因麻醉和手术意外死亡的大鼠及未达入模标准的大鼠后,将符合入模标准的 MCAO 大鼠 36 只随机分为低频电刺激组和模型对照组,每组 18 只(研究中途各组有出现死亡脱落的也遵循随机原则补充完整),2 组大鼠再随机分为治疗 3、7 和 14 d 3 个时间点,每个时间点 6 只。另外随机取 18 只大鼠作假手术组,其制模过程同上述 2 组,但不予大脑中动脉阻断,其苏醒后改良 Bederson 评分为 0 分,随机分为与上述 2 组各时间点相对应的 3 个时间点,每个时间点 6 只。

四、运动功能评定^[8]

1. 平衡木行走测评:采用长为 170 cm、宽为 2 cm 的方木棒,平放在距地面 7 cm 处,作为一个平衡木让鼠在其上行走,主要评估平衡功能。评分标准分 6 个等级,0 分为能跳上横木,在上面行走不会跌倒;1 分为能跳上横木,在上面行走跌倒几率 < 50%;2 分为能跳

上横木,在上面行走跌倒几率 > 50%;3 分为在健侧后肢帮助下能跳上横木,但受累的偏瘫侧后肢不能帮助向前移动;4 分为在平衡木上不能行走,但可坐在上面;5 分为将鼠放在平衡木上会掉下来。

2. 转棒上行走测评:取长为 150 cm、直径为 4.5 cm 的木棒一根,其中点固定在 3 转/min 的转动器上,分别向左右交替转动,将大鼠放在该棒的一端,可评估动态的平衡功能。评分标准分为 4 个等级,0 分为转动过程中,鼠可在上面行走;1 分为转动过程中鼠不会掉下来,时间达 60 s 以上;2 分为转动开始后鼠从棒上掉下来;3 分为转动开始前鼠就从棒上掉下来。

3. 网屏试验:网屏为 50 cm × 40 cm 网带,网眼为 1 cm × 1 cm,网屏距地面高度为 80 cm,下方铺以 12 cm 厚的海绵,先将网屏水平放置,将大鼠置其上,然后缓慢地将一端抬高,在 2 s 内将网屏变成垂直位,保持 5 s,观察大鼠是否会从网屏上掉下来或用前爪抓住网屏,从而客观评价前爪抓握能力及肌力情况。评分标准分为 4 个等级,0 分为前爪抓住网屏达 5 s 之久不会掉下来;1 分为暂时握住网屏,滑落一段距离,但没有掉下来;2 分为在 5 s 内掉下来;3 分为网屏移动时鼠即掉下来。

五、治疗方法

低频电刺激组造模术后 3 d 开始进行低频电刺激治疗,分别以低频电刺激治疗仪(英国 Verity Medical 公司生产的 NeuroTrac™ Contenance)治疗 3 d、7 d 和 14 d,每天 1 次,每次 10 min,具体参数为频率 30 Hz,脉宽 250 ms,波升/波降为 1 s/1 s,电流强度 3 mA。模型对照组应用相同的低频电刺激治疗仪分别治疗 3 d、7 d 或 14 d,但不予以电流刺激。假手术组未给予任何治疗。

六、病理学检查

各组大鼠处死时,均经左心室常规灌注固定、开颅取脑,分离左右半球,在视交叉前 2 mm 至视交叉后 2 mm 范围内冠状取块,经石蜡包埋,HE 染色,光镜下观察细胞形态变化,低频电刺激组、模型对照组有明显脑梗死灶及假手术组无梗死灶大鼠选出供免疫组化用。免疫组化染色按试剂盒(北京中山生物技术有限公司,SP-9000、ZLI-9033)提供的染色步骤进行,GFAP 抗体来自武汉博士德公司的兔血清抗体。

七、免疫组化染色强度结果分析

使用图像采集卡(北京天地公司生产的软件系统 SPSS 7.5)、IBM 和 Olympus-BX60 显微镜组成的全自动图像分析系统,每张切片于 10 × 40 放大倍数下,从每组各标本的每张切片随机选 5 个视野,统计出每个视野内 GFAP 阳性细胞数,不论染色程度,凡显色者为阳性。故每个时间点有 30 个视野。

八、统计学分析

采用 SPSS 13.0 版统计学软件进行分析。先考察数据,舍去出现的奇异值;然后采用单因素方差分析法进行分析,各组数据以($\bar{x} \pm s$)表示,在确定方差齐性后,组间比较采用 LSD 法,若方差不齐,组间比较采用 Dunnett T3 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、行为学评定

假手术组大鼠麻醉苏醒后活动正常,Bederson 评分、平衡木试验、转棒试验、网屏试验均为 0 分。低频电刺激组和模型对照组评分见表 1。

表 1 低频电刺激组与模型对照组大鼠运动功能评分及 GFAP 阳性细胞比较($\bar{x} \pm s$)

组 别	只数	平衡木行走 测评(分)	转棒行走 测评(分)	网屏评分 (分)	GFAP 阳性 细胞(个/HP)
低频电刺激组	18				
治疗 3 d	6	3.67 ± 0.82	2.00 ± 0.63	2.16 ± 0.41	16.83 ± 1.17
治疗 7 d	6	3.00 ± 0.89	1.50 ± 0.81	1.50 ± 0.55 ^a	32.00 ± 2.09 ^a
治疗 14 d	6	2.16 ± 0.41	1.00 ± 0.00	1.17 ± 0.41 ^a	55.83 ± 4.49 ^a
模型对照组	18				
治疗 3 d	6	3.83 ± 0.43	2.16 ± 0.75	2.33 ± 0.52	15.67 ± 0.82
治疗 7 d	6	3.50 ± 0.55	1.83 ± 0.75	2.16 ± 0.75	27.00 ± 0.98
治疗 14 d	6	2.67 ± 0.52	1.50 ± 0.55	1.67 ± 0.52	31.67 ± 3.39

注:与模型对照组同期比较,^a $P < 0.05$

1. 平衡木行走测评:与假手术组比较,低频电刺激组和模型对照组均有运动功能损害。虽然在不同时间点上低频电刺激组和模型对照组的平衡木评分均有下降的趋势,但两者在各个时间点上的差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2. 转棒行走测评:与假手术组比较,低频电刺激组和模型对照组均有运动功能损害。虽然不同时间点上低频电刺激组与模型对照组的转棒上行走评分有逐渐下降的趋势,但两者在各个时间点上的差异无统计学意义($P > 0.05$)。

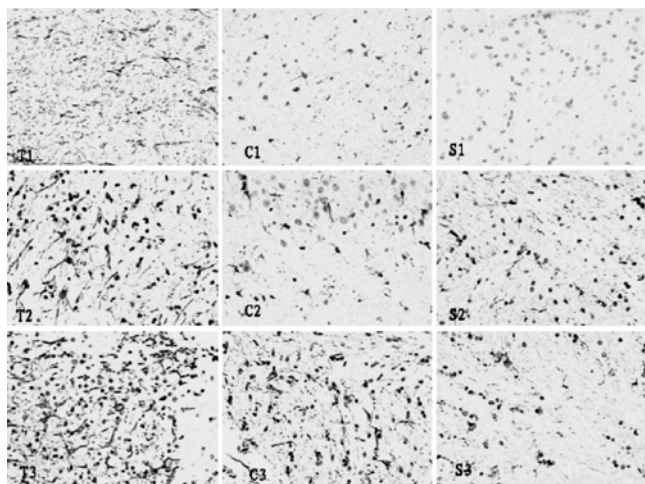
3. 网屏试验评分:与假手术组比较,低频电刺激组和模型对照组均有运动功能损害。在治疗 3 d 时间点上,低频电刺激组与模型对照组的网屏试验评分相比差异无统计学意义($P > 0.05$);在治疗 7 d 和 14 d 时间点上,低频电刺激组网屏试验评分与模型对照组间差异有统计学意义($P < 0.05$)。

二、病理观察

模型对照组大鼠脑缺血 3 d 后,缺血区神经元数量明显减少,脑组织明显水肿,神经细胞间隙扩大,部分空泡形成,病灶侧灰质及海马可见不同程度的缺血、坏死,低频电刺激组缺血周围区神经细胞数目较模型对照组增多,组织水肿减轻,胶质细胞增生明显。

三、各组大鼠脑梗死后 GFAP 的表达

假手术组各时间点上偶见 GFAP 阳性细胞,染色浅,细胞轮廓清晰,星状突起纤细;模型对照组和低频电刺激组在各个时间点上的 GFAP 阳性细胞增多,低频电刺激组治疗 3 d 时脑梗死灶周围 GFAP 出现阳性细胞,密度相对稀少,胞体相对较小,突起分支较细、少,染色相对较浅,在灰质均匀分布,GFAP 阳性细胞数与模型对照组、假手术组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);治疗 7 d 时,GFAP 阳性细胞数开始增多,伴有大量炎性细胞浸润,染色加深,突起变长、增粗和增多,分支显著增多,GFAP 阳性细胞数与模型对照组相比,差异有统计学意义($P < 0.05$);治疗 14 d 时,半影区 GFAP 阳性细胞数达高峰,增粗和变长的 GFAP 阳性进一步增多,GFAP 阳性细胞数与模型对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1 及图 1。



注:T表示低频电刺激组,C表示模型对照组,S表示假手术组;1,2,3 分别表示治疗 3,7,14 d 及同期模型对照组和假手术组
图 1 各组脑缺血大鼠梗死边缘区 GFAP 表达(免疫组化染色,×400)

讨 论

脑卒中是目前人类致死率和致残率最高的疾病之一,因此脑卒中的康复治疗具有极其重要的意义。低频电刺激是脑卒中康复治疗的重要措施之一,也是循证依据支持有效的一种康复治疗手段^[9]。Yan 等^[2]研究发现,急性脑卒中患者经常规康复训练及低频电刺激联合治疗后,其运动功能恢复指标及行走能力皆明显优于模型对照组和对照组。Hara^[9]的研究结果显示,采用低频电刺激刺激偏瘫患者伸肌群,能提高被激活肌群肌电信号水平,增强腕、指各关节伸展和肩关节屈曲主动活动范围、缓解痉挛,从而改善上肢功能。

GFAP 是脑间质纤维的重要亚单位,是星形胶质细胞的一种标志蛋白,GFAP 的表达值可用来评价星形细胞的增殖程度^[10]。近来,星形胶质细胞在脑缺血

中的作用日益受到重视。研究发现,星形胶质细胞在脑缺血早期出现反应性增生和肥大,反应性星形胶质细胞增生可以在损害区周围形成一胶质界膜,减少缺血损伤扩大,在正常组织、损伤区及血管之间起着特殊的运输作用,从而有利于可塑性修复作用发生^[11];活性星形胶质细胞还能释放各种神经营养因子,调节神经元的周围环境^[12];此外,星形胶质细胞还能提供轴索合成基质,参与内源性修复,调节神经元突触的生长和功能成熟^[13,14],因此,在脑梗死后中枢神经系统的修复中起相当重要的作用^[15]。

本研究采用线栓法建立大鼠 MCAO 模型,探讨低频电刺激对脑损伤恢复过程中的影响及作用。研究发现,低频电刺激组治疗后,较模型对照组更能改善脑梗死大鼠的行为学评分,且随着治疗时间的延长,其行为学变化好转。治疗 3 d 后,低频电刺激组与模型对照组之间行为学评分及梗死灶周围 GFAP 表达差异无统计学意义,这可能与低频电刺激治疗时间太短未能体现出低频电刺激的治疗作用有关。随着低频电刺激治疗时间的延长,其运动功能改善及 GFAP 阳性细胞增生逐渐明显,治疗 14 d 后网屏试验评分低频电刺激组与模型对照组比较,差异有统计学意义,低频电刺激组的 GFAP 阳性细胞数目与模型对照组比较,差异亦有统计学意义,提示低频电刺激治疗有助于缺血性脑损伤后偏瘫侧肢体运动功能的恢复,可能与低频电刺激能增加被刺激肌群及其相应关节的本体感觉输入、增强被刺激肌群的收缩强度及促进瘫痪侧肢体的强制性使用^[16]等有关,这些符合正常运动模式的功能性活动通过神经传导通路到达脑梗死边缘区功能尚存的星形胶质细胞或神经元,激发其活性,重建与周围神经元的信号网络,使脑内侧支循环开放、脑组织细胞供血供氧能力增强,从而促进梗死灶周围星形胶质细胞增生,对梗死后脑组织起到保护作用。

低频电刺激是如何促进脑缺血后星形胶质细胞增生的机制还不完全清楚,是否因为低频电刺激治疗开启了病灶周边的备用通道,抑或是通过内源性的干细胞迁移^[17,18],有待于进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 郭友华,燕铁斌. 低频电刺激治疗卒中中偏瘫患者的临床研究进展. 中华物理医学与康复杂志, 2005, 27: 507-509.
- [2] Yan T, Hui-Chan CW, Li LS. Functional electric 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.
- [3] Hara Y, Ogawa S, Tsujiuchi K, et al. A home-based rehabilitation program for the hemiplegic upper extremity by power-assisted neuromuscular electric stimulation. *Disabil Rehabil*, 2008, 30: 296-304.
- [4] Dunning K, Berberich A, Albers B, et al. A four-week, task-specific neuroprosthesis program for a person with no active wrist or finger movement because of chronic stroke. *Phys Ther*, 2008, 88: 397-405.
- [5] Gao Q, Li Y, Chopp M. Bone marrow stromal cells increase astrocyte survival via upregulation of phosphoinositide 3-kinase/threonine protein kinase and mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase pathways and stimulate astrocyte trophic factor gene expression after anaerobic insult. *Neuroscience*, 2005, 136: 123-134.
- [6] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*, 1989, 20: 84-91.
- [7] Marin R, Williams A, Hale S, et al. The effect of voluntary exercise exposure on histological and neurobehavioral outcomes after ischemic brain injury in the rat. *Physiol Behav*, 2003, 80: 167-175.
- [8] 徐莉, 李玲, 陈景藻, 等. 康复训练对大鼠脑梗死神经功能恢复的影响. 中华物理医学与康复杂志, 2000, 22: 86-88.
- [9] Hara Y. Neurorehabilitation with new functional electrical stimulation for hemiparetic upper extremity in stroke patients. *J Nippon Med Sch*, 2008, 75: 4-14.
- [10] Conway EL, Gundlach AL, Graven JA. Temporal changes in glial fibrillary acidic protein messenger RNA and [3H]PK11195 binding in relation to imidazoline-I2-receptor and alpha 2-adrenoceptor binding in the hippocampus following transient global forebrain ischaemia in the rat. *Neuroscience*, 1998, 82: 805-817.
- [11] Mathewson AJ, Berry M. Observations on the astrocyte response to a cerebral stab wound in adult rats. *Brain Res*, 1985, 327: 61-69.
- [12] Környei Z, Szilávik V, Szabó B, et al. Humoral and contact interactions in astroglia/stem cell co-cultures in the course of glia-induced neurogenesis. *Glia*, 2005, 49: 430-444.
- [13] Lin SC, Bergles DE. Synaptic signaling between neurons and glia. *Glia*, 2004, 47: 290-298.
- [14] Ishibashi T, Dakin KA, Stevens B, et al. Astrocytes promote myelination in response to electrical impulses. *Neuron*, 2006, 49: 823-832.
- [15] 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, 8: 331-334.
- [16] 燕铁斌, 许云影, 李常威. 功能性电刺激改善急性脑卒中患者肢体功能的随机对照研究. 中华医学杂志, 2006, 37: 2627-2631.
- [17] Bliss TM, Kelly S, Shah AK, et al. Transplantation of hNT neurons into the ischemic cortex: cell survival and effect on sensorimotor behavior. *J Neurosci Res*, 2006, 83: 1004-1014.
- [18] Hicks AU, Hewlett K, Windle V, et al. Enriched environment enhances transplanted subventricular zone stem cell migration and functional recovery after stroke. *Neuroscience*, 2007, 146: 31-40.

(修回日期: 2009-04-13)

(本文编辑: 松 明)