·基础研究·

成对关联刺激对脑缺血再灌注大鼠感觉运动功能和 MAP-2、GAP-43 表达的影响

胡艳 张香玉 鲁银山 田峻 郭铁成

【摘要】 **目的** 观察成对关联刺激(PAS)对局灶性脑缺血再灌注大鼠感觉运动功能恢复的影响,并从神经可塑性角度探讨其可能的作用机制。**方法** 选取 90 只健康雄性 SD 大鼠,随机分为假手术组、模型组和 PAS 组,每组又分为 7 d、14 d、28 d 3 个亚组,每组 10 只。模型组和 PAS 组大鼠采用 Longa 线栓法制作大脑中动脉栓塞(MCAO)模型,假手术组除不插入线栓外,其余操作与模型组和 PAS 组相同。PAS 组于术后第 1 天开始给予 0.05 Hz、共 90 对脉冲的 PAS 治疗[其中周围神经电刺激(PNS)脉冲波宽 200 μs、刺激强度 6 mA;经颅磁刺激(TMS)强度 120%静息运动阈值(RMT)],持续 30 min,每日 1 次;模型组和假手术组不予任何干预措施。术后第 1、7、14、28 天采用 Garcia 神经行为学评分评定大鼠感觉运动功能,各时间点治疗结束后,采用免疫组化和蛋白质印记法(Western blot)检测大鼠缺血半暗带区微管相关蛋白-2(MAP-2)、生长相关蛋白 43(GAP-43)的表达。**结果** 假手术组大鼠在各时间点均无神经功能损伤的体征。与假手术组同时间点比较,模型组、PAS 组 Garcia 神经功能评分均较低($P<0.05$)。与模型组同时间点比较,PAS 组术后 7 d、14 d、28 d 的 Garcia 神经功能评分均较高($P<0.05$)。与组内术后 1 d 比较,模型组、PAS 组术后 28 d 的 Garcia 神经功能评分显著较高($P<0.05$)。与组内术后 7 d 比较,仅 PAS 组术后 28 d 的 Garcia 神经功能评分较高($P<0.05$)。与假手术组同时间点比较,模型组、PAS 组 GAP-43 蛋白表达水平较高($P<0.05$),MAP-2 蛋白表达水平较低($P<0.05$)。与模型组同时间点比较,PAS 组 GAP-43、MAP-2 蛋白表达水平较高($P<0.05$)。与组内术后 7 d 比较,PAS 组术后 14 d GAP-43、MAP-2 蛋白表达水平较高($P<0.05$)。与组内术后 14 d 比较,PAS 组术后 28 d GAP-43、MAP-2 蛋白表达水平降低($P<0.05$)。**结论** PAS 可促进缺血性脑卒中大鼠感觉运动功能的恢复,其机制可能与促进缺血半暗带区 MAP-2、GAP-43 的表达有关。

【关键词】 脑缺血; 成对关联刺激; 神经运动功能; MAP-2; GAP-43

基金项目:国家自然科学基金(81272156)

The effects of paired associative stimulation on sensorimotor function and the expression of MAP-2 and GAP-43 after focal cerebral ischemia and reperfasion

*Hu Yan**, *Zhang Xiangyu*, *Lu Yinshan*, *Tian Jun*, *Guo Tiecheng*.

* *Department of Rehabilitation Medicine, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China*

Corresponding author: Guo Tiecheng, Email: pmr@tjh.tjmu.edu.cn

【**Abstract**】 **Objective** To observe the effect of paired associative stimulation (PAS) on the recovery of sensorimotor function and to explore the mechanism in terms of neural plasticity. **Methods** Ninety male adult Sprague-Dawley rats were randomly divided into a sham operation group (Sham group), a model group (Model group) and a paired associative stimulation group (PAS group), each of 30. Each group was then subdivided into 7-, 14- and 28-day subgroups with 10 rats in each. A model of focal cerebral ischemia and reperfusion was established using the Longa suture method in the Model and PAS groups. The rats in the Sham group underwent the same surgical procedure except for the occlusion of the middle cerebral artery. The rats received 30 minutes of paired peripheral nerve stimulation and transcranial magnetic stimulation comprising 90 pairs at 0.05 Hz beginning 24 h after the occlusion. The impulse wave width of the peripheral nerve stimulation was 200 μs and the intensity was 6 mA. The intensity of the transcranial magnetic stimulation was 120% of the resting motor threshold. The other two groups weren't given any intervention. Neurological function was tested using Garcia scores on the 1st, 7th, 14th and 28th day after surgery. The rats were then sacrificed and the expression of MAP-2 and GAP-43 in the ischemic penumbra

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2018.10.003

作者单位:430030 武汉,华中科技大学同济医学院附属同济医院康复医学科[胡艳(现在武汉大学中南医院康复科)、张香玉(现在郑州大学第三附属医院)、鲁银山、郭铁成];武汉大学中南医院康复科(田峻)

通信作者:郭铁成,Email:pmr@tjh.tjmu.edu.cn

were detected using western blotting and immunohistochemistry. **Results** No neurological dysfunction was observed in the Sham group at any time. Compared with the Sham group at the same time points, the average Garcia scores of the Model and PAS groups were significantly lower ($P \leqslant 0.05$). However, the average Garcia scores on the 7th, 14th and 28th day were significantly higher in the PAS group compared with the Model group at the same time points ($P \leqslant 0.05$). The average Garcia scores of the Model and PAS groups on the 28th day after surgery were significantly higher than those on the 1st day ($P \leqslant 0.05$), but only the PAS group′s average Garcia score on the 28th day was significantly higher than that on the 7th day. Compared with the Sham group at the same time points, the expression of MAP-2 and GAP-43 protein in the Model and PAS groups was significantly higher, but with that of the Model group significantly lower than that of the PAS group (all $P \leqslant 0.05$). The protein expression of MAP-2 and GAP-43 protein in the PAS group on the 14th day was significantly higher than on the 7th and 28th day ($P \leqslant 0.05$ for both). **Conclusions** PAS can promote the recovery of sensorimotor function after cerebral thrombosis, at least in rats. That may be due to its promoting the expression of the neuroplasticity-associated proteins MAP-2 and GAP-43 in the ischemic penumbra.

【Key words】 Cerebral ischemia; Paired associative stimulation; Sensorimotor functioning; MAP-2; GAP-43; Peripheral nerve stimulation; Transcranial magnetic stimulation

Fund program: National Natural Science Foundation (grant 81272156)

脑卒中是严重危害人类健康的三大疾病之一,是神经系统常见的致残性疾患,给家庭和社会都带来了沉重的精神负担和经济负担[1]。其中缺血性脑卒中是最常见的脑卒中类型[2]。急性缺血性脑卒中后,由于组织缺血缺氧造成了广泛的皮质和皮质下损伤,遗留下各种功能障碍,包括感觉运动功能障碍、认知障碍、吞咽障碍等,其中以感觉运动功能障碍最为多见[3]。相关研究证实,脑卒中后功能的恢复与神经可塑性关系密切[4]。如何提高脑卒中患者的神经可塑性已成为临床康复的热点。

目前,临床上有多种手段可用于提高脑卒中后神经可塑性,有的作用于外周,如电针、周围神经电刺激(peripheral nerve stimulation, PNS),有的直接作用于中枢,如经颅磁刺激(transcranial magnetic stimulation, TMS)、经颅直流电刺激(transcranial direct current stimulation, tDCS)等。成对关联刺激(paired associative stimulation, PAS)是一种结合了 TMS 和 PNS 两种刺激手段的非侵入性大脑刺激(non-invasive brain stimulation, NIBS)技术[5],通过调整两种刺激之间的时间间隔(inter-stimulus interval, ISI),使 PAS 对大脑皮质的兴奋性产生易化或抑制作用,并诱导产生长时程增强(long-term potentiation, LTP)或长时程抑制(long-term depression, LTD)样可塑性变化[6-7]。有研究显示,PAS 对大脑皮质兴奋性的调节作用较 rTMS 和 tDCS 更有优势[8-10]。近年来,陆续出现了一些将 PAS 应用于脑卒中康复的临床研究,结果提示 PAS 可调节脑卒中患者两侧大脑皮质的兴奋性失衡状态,进而促进脑卒中患者功能恢复[11-13]。但其内在分子机制尚不明确,且目前有关 PAS 对脑缺血动物模型功能的影响也鲜见报道。而脑缺血动物模型对于研究脑缺血的病理生理、发病机制、防治措施和修复机制等方面非常重要[14],国际脑血管病委员会一致认为缺血性脑血管病(ischemic cerebrovascular disease, ICVD)的研究应以脑缺血模型为基础[15]。

本研究将 PAS 应用于脑缺血大鼠模型,观察 PAS 对缺血性脑卒中大鼠感觉运动功能恢复的影响,并观察 PAS 对脑缺血大鼠缺血半暗带区神经可塑性相关蛋白生长相关蛋白 43(growth-associated protein, GAP-43)、微管相关蛋白-2(microtubule-associated protein 2, MAP-2)的影响,从神经可塑性的角度来探讨其发挥作用的可能机制。

材料与方法

一、实验材料

1.实验动物及分组:无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级成年健康雄性 Sprague-Dawley(SD)大鼠 90 只,体重(230±10)g,鼠龄 8 周,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供,饲养室温度控制在(22±2)℃,保持昼夜节律 12~12 h,给予充足的食物(普通饲料)和饮水。采用随机数字表法将大鼠分为假手术组、模型组和 PAS 组,每组又分为 7 d、14 d、28 d 3 个亚组,每组 10 只。

2.主要的仪器和试剂:武汉产 CCY-IV 型 TMS 仪;兔来源的 MAP-2、GAP-43 单克隆一抗;小鼠抗 β-actin、辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记羊抗小鼠二抗、HRP 标记羊抗兔二抗(武汉产)。

二、大鼠脑缺血再灌注模型制作及筛选

参照 Longa 线栓法[16]对模型组和 PAS 组大鼠行右侧大脑中动脉阻塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)术。术前 12 h 对所有大鼠禁食。MCAO 模型制备过程如下:SD 大鼠称重后,10% 水合氯醛(3 ml/kg)腹腔注射麻醉后将其仰卧固定于可调节的

温控板上,常规消毒、铺巾。于颈部正中进行切口,钝性分离右侧胸锁乳突肌和锁骨舌骨肌,使右侧颈总动脉和颈外动脉暴露,用 3-0 号丝线结扎颈外动脉(靠近分叉处)和颈总动脉的近心端,动脉夹夹闭颈总动脉,在紧靠颈总动脉结扎线的远端剪一小口,将线栓插入小口,松开动脉夹,将线栓从颈总动脉推进颈内动脉约 20~22 mm,微感阻力时停止,然后固定线栓,防止脱落。于栓塞 90 min 后拔出线栓,结扎颈总动脉远端,2-0号丝线缝合切口,用碘伏棉球消毒皮肤。假手术组只分离右侧颈部动脉,不结扎,不插入线栓,其余操作完全同模型组和 PAS 组。手术结束后将大鼠放至干净清洁饲养笼中。

待动物完全苏醒后,参照 Longa 评分法[16],评分 1~3 级者 MCAO 造模成功,纳入本实验中。排除标准:①在断头取脑时发现有蛛网膜下腔出血者;②未到观察时间点死亡者。由于上述各种原因导致的各组动物样本量不足者,再次遵循随机抽样原则分别予以补充。

三、PAS 干预

PAS 组于造模成功后第 1 天开始接受 PAS 干预。方法如下:将大鼠固定于大鼠固定器上,保证刺激过程中周围环境安静。每对 PAS 包括 1 个 PNS 脉冲和一个中枢 TMS 脉冲。PNS:电极采用环状电极,刺激左侧后肢胫神经,电流强度为感觉阈值的 300%,强度为 6 mA,波形为方波,波宽为 200 μs。TMS:采用 TMS 仪,刺激线圈为“8”字形,直径为 7 cm,仪器最大脉冲磁场强度为 6.0 T;刺激部位为最佳刺激点[即在该部位用最小的磁刺激强度引出左侧腓肠肌最大波幅的运动诱发电位(motor evoked potential,MEP),大约在前囟右旁开 0.5 cm],手柄向后并与大鼠头皮呈切线位,侧面观其与矢状面呈 45°,强度为 120%静息运动阈值(resting motor threshold,RMT)[17]。PNS 和 TMS 之间的 ISI = 15 ms,频率为 0.05 Hz,共 90 个脉冲对,连续刺激 30 min,每日 1 次,于每天上午 8~12 点由专人完成。模型组和假手术组不予任何干预措施。

四、感觉运动功能评分

于术后第 1 天、7 天、14 天、28 天采用 Garcia 评分[18]评定各组大鼠的感觉运动功能,分别从自主活动、四肢活动的对称性、前肢的伸展运动、网屏试验、双侧躯干触觉反射、双侧触须反应 6 个方面进行评分,最低得分 3 分,最高得分 18 分,得分越高代表大鼠的感觉运动功能越好。

五、组织取样和处理

1. Western blot 检测标本采集:术后各时间点治疗结束后 24 h,各组随机选取 5 只大鼠腹腔注射 10%的水合氯醛(3.5 ml/kg)麻醉,断头,于冰上迅速分离右侧脑缺血半暗带,置于离心管中,储存于 -80 ℃冰箱中保存备用。

2. 免疫组织化学样本采集:将剩余的大鼠分别于各时间点治疗结束后 24 h,10% 的水合氯醛(3.5 mL/Kg)腹腔注射麻醉,经心脏依次快速灌注生理盐水500 ml、4%多聚甲醛 250 ml,断头取脑,取前囟后1~4 mm处脑组织置于 4%多聚甲醛、4 ℃固定 24 h,常规浸蜡包埋,冠状面连续切片制作石蜡切片,片厚5 μm。

六、蛋白提取及 Western blot 检测

将取得的 Western blot 检测标本与裂解液混合并匀浆,离心(4 ℃、12000 r/min,5 min)后,提取总蛋白液。取 40 μg 蛋白上样,行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis,SDS-PAGE),浓缩参数 80 V、30 min,分离参数 120 V、90 min,再以 200 mA 转膜、120 min;用含 5%脱脂奶粉的 TBST 封闭 2 h,加入一抗 MAP-2(1∶1000)、GAP-43(1∶1000)4 ℃孵育过夜,TBST 充分洗涤 5~6 次,每次 5 min,加入辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的二抗(1∶50000)37 ℃孵育 2 h,TBST 充分洗涤 5~6 次,每次 5 min,行增强化学发光(enhanced chemiluminescence, ECL)检测,采用 Image-J 软件分析目标蛋白及内参蛋白的灰度值并计算比值。

七、免疫组织化学染色

切片常规脱蜡、水化,加适量的修复液(0.01 M 枸橼酸缓冲液,PH6.0)抗原修复 10~15 min(95~98 ℃),自然冷却,然后将 3%的 H_2O_2 滴加在切片组织上,室温下孵育 15 min 以阻断内源性的过氧化物酶,PBS 漂洗(3 次×3 min),滴加一抗 MAP-2(1∶150)、GAP-43(1∶100),4 ℃湿盒中孵育过夜,PBS 漂洗(3 次×3 min),滴加辣根过氧化物酶标记的二抗,室温下孵育 20~30 min,PBS 漂洗(4 次×3 min),甩干后滴加 DBA 显色剂,苏木素复染细胞核,常规的脱水、透明、封片。阴性对照用 0.01 M PBS 替代一抗,其余步骤同前。每只大鼠随机选取 3 张不连续切片,分别在 100 倍、400 倍下观察,每张切片随机选取梗死灶周边 3 个不重叠的视野,统计 400 倍镜下各视野内 GAP-43、MAP-2 的免疫反应产物光密度(optical density,OD)值,并取平均值。

八、统计学分析

用 SPSS 18.0 统计学软件进行数据分析处理,数据以($\bar{x}\pm s$)形式表示,多组间比较采用单因素方差分析(one-way analysis of variance,ANOVA),多组间一一对比采用最小显著差异法(least significant differ-

ence, LSD), $P<0.05$表示差异有统计学意义。

结　果

一、PAS 对各组大鼠感觉运动功能的影响

假手术组大鼠在各时间点均无神经功能损伤的体征。与假手术组同时间点比较,模型组、PAS 组 Garcia 神经功能评分均较低($P<0.05$)。与模型组同时间点比较,PAS 组术后 7 d、14 d、28 d 的 Garcia 神经功能评分均较高($P<0.05$)。与组内术后 1 d 比较,模型组、PAS 组术后 28 d 的 Garcia 神经功能评分显著较高($P<0.05$)。与组内术后 7 d 比较,仅 PAS 组术后 28 d 的 Garcia 神经功能评分较高($P<0.05$)。详见表 1。

表 1　各组大鼠不同时间点 Garcia 神经功能评分(分,$\bar{x}\pm s$)

组别	术后 1 d	术后 7 d	术后 14 d	术后 28 d
假手术组	17.40±0.52	17.30±0.67	17.60±0.52	17.70±0.48
模型组	8.20±1.22[a]	10.20±1.23[a]	11.00±1.76[a]	11.80±1.23[ac]
PAS 组	8.60±1.10[a]	11.80±1.23[ab]	13.80±1.69[ab]	15.00±0.67[abcd]

注:与假手术组同时间点比较,[a]$P<0.05$;与模型组同时间点比较,[b]$P<0.05$;与组内术后 1 d 比较,[c]$P<0.05$;与组内术后 7 d 比较,[d]$P<0.05$

二、PAS 对缺血性脑卒中大鼠缺血半暗带区 MAP-2、GAP-43 表达和分布的影响

与假手术组同时间点比较,模型组、PAS 组 GAP-43 蛋白表达水平较高($P<0.05$),MAP-2 蛋白表达水平较低($P<0.05$)。与模型组同时间点比较,PAS 组 GAP-43、MAP-2 蛋白表达水平较高($P<0.05$)。与组内术后 7 d 比较,PAS 组术后 14 d GAP-43、MAP-2 蛋白表达水平较高($P<0.05$)。与组内术后 14 d 比较,PAS 组术后 28 d GAP-43、MAP-2 蛋白表达水平降低($P<0.05$)。详见表 2、图 1。

表 2　各组大鼠不同时间点缺血半暗带区 GAP-43、MAP-2 蛋白相对含量的比较($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	GAP-43	MAP-2
假手术组			
7 d	5	0.208±0.074	1.138±0.093
14 d	5	0.205±0.063	1.083±0.085
28 d	5	0.208±0.053	1.078±0.061
模型组			
7 d	5	0.500±0.077[a]	0.163±0.057[a]
14 d	5	0.758±0.058[a]	0.374±0.071[a]
28 d	5	0.634±0.067[a]	0.326±0.077[a]
PAS 组			
7 d	5	0.811±0.125[ab]	0.591±0.134[ab]
14 d	5	1.128±0.101[abc]	0.886±0.089[abc]
28 d	5	0.967±0.102[abd]	0.724±0.076[abd]

注:与假手术组同时间点比较,[a]$P<0.05$;与模型组同时间点比较,[b]$P<0.05$;与组内术后 7 d 比较,[c]$P<0.05$;与组内术后 14 d 比较,[d]$P<0.05$

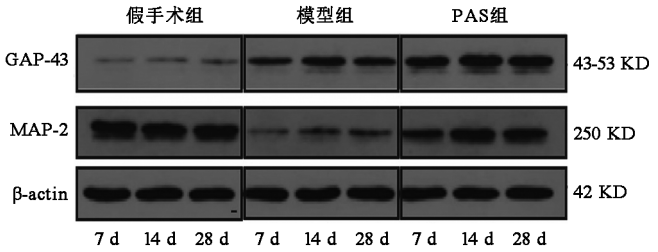


图 1　各组大鼠不同时间点缺血半暗带区 GAP-43、MAP-2 与 β-actin 的蛋白表达条带

MAP-2 阳性神经元细胞的胞体和树突呈棕黄色,假手术组中 MAP-2 在大脑皮质中分布均匀、一致,呈细丝条索状;模型组和 PAS 组的缺血灶中心区几乎无表达,而在梗死灶边界区 MAP-2 的表达量较缺血灶中心区增加,但排列紊乱,形态不规则;PAS 组中缺血灶周边 MAP-2 的染色较模型组颜色深。GAP-43 阳性细胞胞膜可见棕褐色沉积,假手术组中 GAP-43 基本无免疫阳性表达,在模型组和 PAS 组中有少量表达,且 PAS 组中染色略深于模型组。详见表 3、图 2。

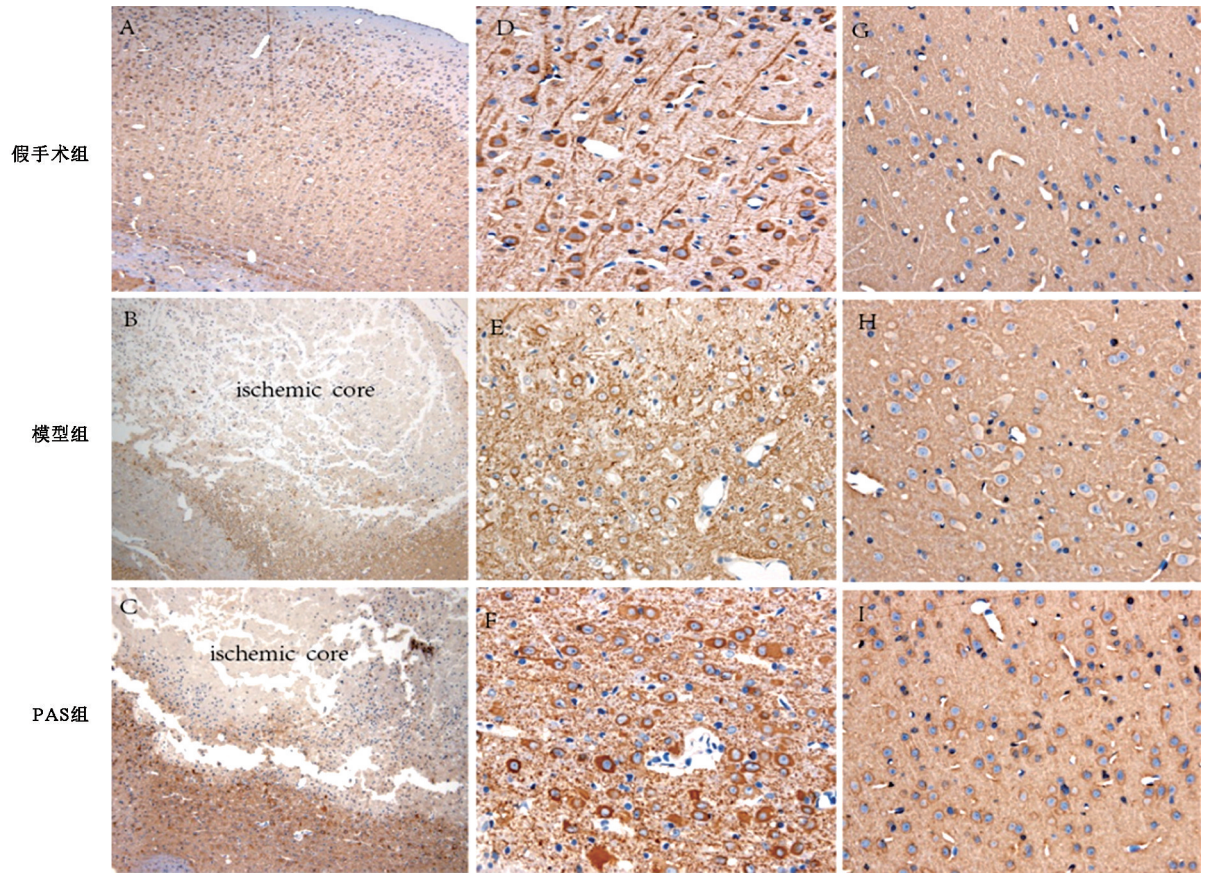
表 3　各组大鼠不同时间点缺血半暗带区 GAP-43、MAP-2 相对 OD 值的比较($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	GAP-43	MAP-2
假手术组			
7 d	5	0.018±0.004	0.478±0.033
14 d	5	0.016±0.003	0.483±0.037
28 d	5	0.015±0.003	0.469±0.034
模型组			
7 d	5	0.045±0.010[a]	0.233±0.032[a]
14 d	5	0.128±0.012[a]	0.304±0.021[a]
28 d	5	0.094±0.011[a]	0.279±0.032[a]
PAS 组			
7 d	5	0.087±0.009[ab]	0.288±0.029[ab]
14 d	5	0.194±0.017[abc]	0.366±0.027[abc]
28 d	5	0.127±0.012[abcd]	0.324±0.029[abcd]

注:与假手术组同时间点比较,[a]$P<0.05$;与模型组同时间点比较,[b]$P<0.05$;与组内术后 7 d 比较,[c]$P<0.05$;与组内术后 14 d 比较,[d]$P<0.05$

讨　论

PAS 是将中枢 TMS 和外周 PNS 两种不同来源的刺激结合的一种方法。ISI 是 PAS 的关键参数之一,其决定了 PAS 对皮质兴奋性的作用类型(易化、抑制或者无作用),当两种刺激产生的神经冲动几乎同步到达初级运动皮质(primary motor cortex, M1)区时,大脑皮质的兴奋性增高;若 TMS 产生的刺激冲动在 PNS 之前到达,则大脑皮质的兴奋性降低[6]。关于如何确定产生稳定的易化或抑制效应的最佳 ISI 参数,目前尚无统一意见。在人体实验研究中,有些学者是根据体感诱发电位(somatosensory evoked potential, SEP)的



注：A、B、C 依次代表假手术组、模型组、PAS 组 MAP-2 蛋白的表达（×100）；D、E、F 依次代表假手术组、模型组、PAS 组 MAP-2 蛋白的表达（×400）；G、H、I 依次代表假手术组、模型组、PAS 组 GAP-43 蛋白的表达（×400）

图 2　术后 14 d 时各组大鼠缺血半暗带区 MAP-2、GAP-43 的表达

潜伏时确定[18-19]，也有部分学者是通过 TMS 诱发的运动电位（motor evoked potential，MEP）潜伏期来确定[20]；在动物实验研究中，Amaya 等[21]将 PAS 应用于灵长类动物时，是根据 SEP 的潜伏时确定。Shin 等[17]将 ISI = 8 ms 的 PAS 应用于脑卒中大鼠，但并未详细介绍 ISI 的确定方法。本课题组前期根据大鼠的 SEP 潜伏期，确定了 PAS 对大鼠大脑皮质产生易化/抑制效应的 ISI，即当 ISI = 5 ms 时，可使大鼠大脑皮质的兴奋性显著降低；当 ISI = 15 ms 时，可使大鼠大脑的皮质兴奋性显著增高[22]。正常情况下，两侧大脑半球处于相互抑制的平衡状态；脑缺血后，这种平衡被打破，表现为患侧半球皮质兴奋性降低，健侧半球皮质兴奋性相对增高[23]。研究表明，提高患侧皮质性兴奋性或者降低健侧皮质兴奋性，均可促进脑卒中后功能的恢复[24]。

临床研究中，兴奋性 PAS 的应用居多[25]，因此，在本研究中我们采用 ISI = 15 ms 的 PAS（记作 PAS15）作用于缺血性脑卒中大鼠的患侧大脑皮质，以提高患侧大脑皮质的兴奋性。此外，PAS 的频率对其产生兴奋效应的大小也有一定的影响[26]。Wischnewski 等[25]对 104 项关于 PAS 应用于健康受试者的实验进行了分析，发现 0.05 Hz 和 0.2 Hz 的 PAS 兴奋性作用最强，且 0.05 Hz 的 PAS 仅需要 90 对就可以产生效应，而0.1 Hz、0.2 Hz 和 0.25 Hz 所需的对数更多（大约 180～270 对），故在本研究中我们采用了 0.05 Hz、共 90 对的 PAS 进行干预。有关 PAS 中 TMS 和 PNS 的刺激强度，参考 Stefan 等[6]采用的方法，即 TMS 的强度是靶肌肉 MEP 为 1 mV、RMT（120±10）%、PNS 刺激强度为 300%的感觉阈值（6.0±2.1）mA。

Garcia 评分由于其评价较全面、评价指标相对固定客观，主观因素的偏倚影响较小，且可操作性好，在国外脑缺血研究中得到了广泛应用[27]。在本研究中，我们采用该评分法对缺血性脑卒中大鼠的感觉运动功能进行评估，结果表明术后第 1 天，模型组和 PAS 组的 Garica 评分显著降低，说明模型制作成功；模型组术后 7 d、14 d、28 d 的行为学评分高于术后第 1 天，说明脑缺血后感觉运动功能可部分自发性恢复，这与前期的研究结果相一致[28]；第 7、14、28 天，PAS 组大鼠的神经功能评分与模型组比较显著升高，说明 PAS 能促进脑缺血大鼠感觉运动功能的改善。前期 Shin

等[17]从术后 1 d 对脑缺血大鼠开始进行连续 5 d PAS 干预,发现术后 7 d 时 PAS 组的 Garcia 评分显著高于假刺激组,与我们的研究结果一致。但在本研究中,我们适当延长了 PAS 的干预时间,发现随着治疗时间的延长,感觉运动功能逐渐恢复,但在 28 d 时仍未能恢复至正常水平,其原因可能是观察的时间窗仍不够长,也可能与受损程度太重有关。

神经可塑性是脑卒中后功能恢复的神经机制,其是指神经系统为了适应内、外环境的改变在结构和功能上发生的适应性变化。提高脑卒中后的可塑性,促进缺血受累神经环路形态结构和功能恢复,是促进脑卒中患者功能恢复的主要策略。脑缺血后轴突和树突的出芽、再生是缺血后神经重塑的重要组成部分。GAP-43 是一种神经组织特有的糖蛋白,主要位于神经元的胞体和生长锥质膜中,能够促发生长锥的生长,引导轴突生长,是国际上公认的轴突出芽、再生的标志[29]。在神经系统发育阶段,GAP-43 显著表达,随着神经系统的逐渐发育成熟,其表达量逐渐降低,当神经元损伤后再生时受到诱导而表达量再次增高[30],上调 GAP-43mRNA 和蛋白的表达水平,可对神经元的生长、发育和再生起到显著的促进作用[31]。本研究中,模型组和 PAS 组 GAP-43 的表达量较假手术组增加($P<0.05$),说明缺血可激活 GAP-43 的表达,缺血灶周边的神经元试图长出轴突,以重建受损的神经功能;PAS 组 GAP-43 的含量在本研究中多次观察的时间点均高于模型组,说明 PAS 可促进轴突的出芽和再生。MAP-2 是哺乳动物大脑中含量最丰富的蛋白之一,是细胞骨架的主要成分,在神经元的发育、分化、神经重塑等方面起着重要作用,被认为是树突出芽和再生的标志物[32],其对缺血后神经元损伤非常敏感[33]。本研究中,模型组和 PAS 组 MAP-2 的表达量较假手术组降低($P<0.05$),说明缺血使细胞骨架受损,树突棘的密度降低;PAS 组 MAP-2 的含量在纵向观察的各时间点均高于模型组,说明 PAS 可促进树突的出芽和再生。模型组和 PAS 组 MAP-2、GAP-43 的表达量随着时间逐渐增加,在 14 d 时达到高峰,随后降低,说明在一定的时间期限内,神经元可发生重塑和再生;PAS 组在各时间点两种蛋白的表达量均较模型组高($P<0.05$),说明 PAS 对 GAP-43 和 MAP-2 有上调和维持作用。在本研究中,在造模后的 7 d、14 d、28 d,PAS 组大鼠的感觉运动功能较模型组显著改善,同时伴有 GAP-43 和 MAP-2 蛋白含量的增高,提示 PAS 可通过促进脑缺血组织 GAP-43、MAP-2 的表达来改善脑缺血大鼠的感觉运动功能。

本研究将 PAS 应用于缺血性脑卒中大鼠,结果表明,PAS 能促进脑卒中大鼠感觉运动功能的恢复,并且在一定的时间窗内,治疗时间越长,效果越显著,可能与 PAS 促进缺血半暗带区神经可塑性相关蛋白的表达有关。该结论为后期将 PAS 应用于临床提供了一定的理论依据。本研究主要存在以下几个方面的不足:①PAS 治疗结束后,其有利效应能否持续尚有待观察;②PAS 结合了外周 PNS 和中枢 TMS 两种刺激手段,其对脑卒中的治疗效果是否优于单纯 PNS 或者 TMS,有待进一步探讨;③PAS 是通过何种途径来上调缺血半暗带区 MAP-2、GAP-43 的表达,尚需开展进一步的深入研究。

参 考 文 献

[1] Grysiewicz RA, Thomas K, Pandey DK. Epidemiology of ischemic and hemorrhagic stroke: incidence, prevalence, mortality, and risk factors[J]. Neurol Clin, 2008, 26(4): 871-895. DOI: 10.1016/j.ncl.2008.07.003.

[2] Nie J, Yang X. Modulation of synaptic plasticity by exercise training as a basis for ischemic stroke rehabilitation[J]. Cell Mol Neurobiol, 2017, 37(1): 5-16. DOI: 10.1007/s10571-016-0348-1.

[3] Phipps MA. Assessment of neurologic deficits in stroke. Acute-care and rehabilitation implications[J]. Nurs Clin North Am, 1991, 26(4): 957-970.

[4] Carmichael ST. Cellular and molecular mechanisms of neural repair after stroke: making waves[J]. Ann Neurol, 2006, 59(5): 735-742.

[5] Wessel MJ, Zimerman M, Hummel FC. Non-invasive brain stimulation: an interventional tool for enhancing behavioral training after stroke[J]. Front Hum Neurosci, 2015, 9(5): 265. DOI: 10.3389/fnhum.2015.00265.

[6] Stefan K, Kunesch E, Cohen LG, et al. Induction of plasticity in the human motor cortex by paired associative stimulation[J]. Brain, 2000, 123(3): 572-584.

[7] Stefan K, Kunesch E, Benecke R, et al. Mechanisms of enhancement of human motor cortex excitability induced by interventional paired associative stimulation[J]. J Physiol, 2002, 543(2): 699-708.

[8] Player MJ, Taylor JL, Alonzo A, et al. Paired associative stimulation increases motor cortex excitability more effectively than theta-burst stimulation[J]. Clin Neurophysiol, 2012, 123(11): 2220-2226.

[9] 随燕芳,宋振华,童良前,等. 成对关联刺激与重复经颅磁刺激对大脑皮质兴奋性的调节作用[J]. 中华物理医学与康复杂志, 2013, 35(7): 547-551. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2013.07.009.

[10] Strube W, Bunse T, Malchow B, et al. Efficacy and interindividual variability in motor-cortex plasticity following anodal tDCS and paired-associative stimulation[J]. Neural Plast, 2015, 20(1): 530423.

[11] Uy J, Ridding MC, Hillier S, et al. Does induction of plastic change in motor cortex improve leg function after stroke [J]. Neurology, 2003, 61(7): 982-984.

[12] Castel-Lacanal E, Gerdelat-Mas A, Marque P, et al. Induction of cortical plastic changes in wrist muscles by paired associative stimulation in healthy subjects and post-stroke patients[J]. Exp Brain Res, 2007, 180(1): 113-122.

[13] Castel-Lacanal E, Marque P, Tardy J, et al. Induction of cortical plastic changes in wrist muscles by paired associative stimulation in

the recovery phase of stroke patients[J]. Neurorehabil Neural Repair, 2009, 23(4): 366-372.DOI: 10.1177/1545968308322841.
[14] 孟胜喜,霍清萍. 局灶性脑缺血动物模型的研究进展[J].中西医结合心脑血管病杂志,2016,14(12): 1366-1370.DOI: 10.3969/j.issn.1672-1349.2016.12.019.
[15] Garcia JH. Experimental ischemic stroke: a review[J]. Stroke,1984, 15(1): 5-14.
[16] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91.
[17] Shin H, Han T, Paik N. Effect of consecutive application of paired associative stimulation on motor recovery in a rat stroke model: a preliminary study[J]. Int J Neurosci,2009, 118(6): 807-820.
[18] Garcia JH, Wagner S, Liu KF, et al. Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats. Statistical validation[J]. Stroke,1995, 26(4): 627-635.
[19] Ilic NV,Milanovic S,Krstic J,et al.Homeostatic modulation of stimulation-dependent plasticity in human motor cortex[J]. Physiol Res, 2011, 60 (1): 107-112.
[20] Stinear JW, Hornby TG. Stimulation-induced changes in lower limb corticomotor excitability during treadmill walking in humans[J]. J Physiol, 2005, 567(2): 701-711.
[21] Amaya F, Paulus W, Treue S, et al. Transcranial magnetic stimulation and PAS-induced cortical neuroplasticity in the awake rhesus monkey[J]. Clin Neurophysiol,2010, 121(12): 2143-2151.
[22] Zhang X, Sui Y, Guo T, et al. Effect of paired associative stimutation on motor cortex excitability in rats[J]. Curr Med Sci, 2018, 35(5): 903-909. DOI:10.1007/S11596-018-1960-8.
[23] Shimizu T, Hosaki A, Hino T, et al. Motor cortical disinhibition in the unaffected hemisphere after unilateral cortical stroke[J]. Brain, 2002, 125(8): 1896-1907.
[24] Nowak DA, Grefkes C, Ameli M, et al. Interhemispheric competition after stroke: brain stimulation to enhance recovery of function of the affected hand[J]. Neurorehabil Neural Repair, 2009, 23(7): 641-656.
[25] Wischnewski M, Schutter DJ. Efficacy and time course of paired associative stimulation in cortical plasticity: Implications for neuropsychiatry[J]. Clin Neurophysiol, 2016, 127(1): 732-739.
[26] Sale MV, Ridding MC, Nordstrom MA. Factors influencing the magnitude and reproducibility of corticomotor excitability changes induced by paired associative stimulation[J]. Exp Brain Res, 2007, 181(4): 615-626.
[27] 程发峰,宋文婷,郭少英,等. 三种神经功能评分在鼠类局灶性脑缺血模型评价中的比较[J]. 中国康复医学杂志, 2011,26(4): 337-341.DOI: 10.3969/j.issn.1001-1242.2011.04.009.
[28] Li W, Huang R, Shetty RA, et al. Transient focal cerebral ischemia induces long-term cognitive function deficit in an experimental ischemic stroke model[J]. Neurobiol Dis,2013, 59(11): 18-25.DOI: 10.1016/j.nbd.2013.06.014.
[29] Denny J. Molecular mechanisms, biological actions, and neuropharmacology of the growth-associated protein GAP-43[J]. Curr Neuropharmacol,2006, 4(4): 293-304.
[30] Korshunova I, Mosevitsky M. Role of the growth-associated protein GAP-43 in NCAM-mediated neurite outgrowth[J]. Adv Exp Med Biol,2010, 663(1): 169-182.
[31] Li S, Carmichael ST. Growth-associated gene and protein expression in the region of axonal sprouting in the aged brain after stroke[J]. Neurobiol Dis,2006, 23(2): 362-373.
[32] Kowalski RJ, Williams RJ. Microtubule-associated protein 2 alters the dynamic properties of microtubule assembly and disassembly[J]. J Biol Chem, 1993, 268(13): 9847-9855.
[33] Li Y,Jiang N, Powers C, et al. Neuronal damage and plasticity identified by microtubule-associated protein 2, growth-associated protein 43, and cyclin D1 immunoreactivity after focal cerebral ischemia in rats[J]. Stroke,1998, 29(9): 1972-1980, 1980-1981.

(修回日期:2018-09-12)
(本文编辑:凌 琛)

·消息·

《中华物理医学与康复杂志》征订启事

《中华物理医学与康复杂志》是中华医学会主办的物理医学与康复(康复医学)专业的高水平学术期刊。本刊严格贯彻党和国家的卫生工作方针政策,本着理论与实践相结合、提高与普及相结合的原则,积极倡导百花齐放、百家争鸣;全面介绍物理治疗、物理医学与康复领域内领先的科研成果和新理论、新技术、新方法、新经验以及对物理因子治疗、康复临床、疗养等有指导作用,且与康复医学密切相关的基础理论研究,及时反映我国康复治疗、物理医学与康复、康复医学的重大进展;同时密切关注国际康复医学发展的新动向,促进国内外物理治疗、物理医学与康复的学术交流。

《中华物理医学与康复杂志》为月刊,大 16 开,内芯 80 页码,中国标准刊号:ISSN 0254-1424 CN 42-1666/R,邮发代号:38-391,每月 25 日出版;2019 年每册定价 27.5 元,全年 330 元整。热忱欢迎国内外物理治疗、物理医学与康复、康复医学领域以及神经内科、神经外科、骨科等相关科室的各级医务工作者踊跃订阅、投稿。订购办法:①邮局订阅:按照邮发代号 38-391,到全国各地邮局办理订阅手续。②直接订阅:通过邮局汇款至《中华物理医学与康复杂志》编辑部订购,各类订户汇款时务请注明所需的杂志名称及年、卷、期、册数等。编辑部地址:430100 武汉市蔡甸区中法新城同济专家社区平层 E 栋《中华物理医学与康复杂志》编辑部;电话:(027)-69378391;E-mail:cjpmr@tjh.tjmu.edu.cn;杂志投稿网址:www.cjpmr.cn 。