

· 基础研究 ·

经颅磁刺激对脑梗死大鼠皮质 c-Fos 和 BDNF 表达的影响

张小乔 梅元武 刘传玉

【摘要】目的 研究经颅磁刺激(TMS)对脑梗死大鼠梗死侧皮质 c-Fos、脑源性神经营养因子(BDNF)表达的影响。**方法** 采用 80 只 SD 大鼠制作一侧永久性大脑中动脉闭塞的脑梗死模型,随机分为模型组和 TMS 组。模型组自由饲养;TMS 组于动物清醒后当天即给予每天 2 次、每次 30 个脉冲的 TMS 治疗(频率为 0.5 Hz,场强为 1.33 T)。各组在大鼠脑梗死后 1,7,14,21 和 28 d(每时间点 8 只)检测梗死侧大脑皮质 c-Fos、BDNF 的表达。**结果** 模型组和 TMS 组梗死灶周围皮质均可见 c-Fos 和 BDNF 的阳性表达,与模型组相同时间点比较,TMS 组 7,14,21 和 28 d 时 c-Fos 表达较高,差异有统计学意义($P < 0.05$),7,14 和 21 d 时 BDNF 表达较高,差异有统计学意义($P < 0.01$)。**结论** TMS 能促进大鼠脑梗死后梗死侧皮质 c-Fos 和 BDNF 的表达,从而发挥其脑保护及康复治疗效应。

【关键词】 经颅磁刺激; 脑梗死; c-Fos; 脑源性神经营养因子

Effects of transcranial magnetic stimulation on the expression of c-Fos and brain-derived neurotrophic factor of the cerebral cortex in rats with cerebral infarction ZHANG Xiao-qiao, MEI Yuan-wu, LIU Chuan-yu. Department of Neurology, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China

【Abstract】Objective To study the effects of transcranial magnetic stimulation (TMS) on the expression of c-Fos and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) of the cerebral cortex in rats with cerebral infarction. **Methods** Cerebral infarction models were established by using of left middle cerebral artery occlusion (MCAO) and randomly divided into a model group ($n = 40$) and a TMS group ($n = 40$), in additional, TMS treatment (2 times per day, 30 pulses per time) with frequency of 0.5 Hz and magnetic field intensity of 1.33 Tesla was carried out in TMS group after infarction. The expression of c-Fos and BDNF was measured at 1 d, 7 d, 14 d, 21 d and 28 d after infarction, respectively. **Results** The positive expression c-Fos and BDNF was detected in the cortex around the infarction areas, while the expression of c-Fos and BDNF was increased significantly in TMS group in comparison to those in model group at 7 d, 14 d, 21 d, 28 d ($P < 0.05$) and 7 d, 14 d, 21 d after infarction ($P < 0.01$), respectively. **Conclusion** TMS might have protective effects and rehabilitative effects on cerebral infarction by promoting the expression of c-Fos and BDNF of the cerebral cortex in rats with cerebral infarction.

【Key words】 Transcranial magnetic stimulation; Cerebral infarction; c-Fos; Brain-derived neurotrophic factor

脑梗死在临床上是一种发病率、致残率都很高的急性脑血管疾病,目前尚无十分有效的治疗方法。对于脑梗死患者的脑保护和康复治疗是目前研究的重点之一。经颅磁刺激(transcranial magnetic stimulation, TMS)是一种能够在脑深层产生感应电流,从而影响相应脑部神经细胞功能的无创方法,具有穿透力强、非侵入性和无痛感等优点,自 20 世纪末已应用于神经科学的基础和临床研究。由于磁刺激能兴奋深部的外周神经组织、大脑和脊髓,并且可以通过调节其频率、强度、刺激间歇及持续时间来影响中枢神经系统的兴奋性,因而对外周及中枢神经系统损伤疾病具有潜在的治疗作用^[1]。在脑缺

血治疗方面,已有研究显示,重复 TMS 可保护短暂性脑缺血所诱导的迟发性神经元死亡^[2];临床研究表明, TMS 可促进脑梗死患者运动功能康复^[3,4]。有关 TMS 对脑梗死的保护及康复治疗机制,目前还不甚明了。本研究以线栓法制作大鼠局灶性脑梗死模型,观察 TMS 对脑梗死大鼠梗死侧皮质 c-Fos 和脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)表达的影响,探讨 TMS 治疗脑梗死的理论机制,为 TMS 应用于临床脑梗死患者的治疗提供实验依据。

材料和方法

一、实验动物及分组

成年 Sprague-Dawley 雄性大鼠 80 只,由华中科技

大学同济医学院实验动物中心提供,体重 200 ~ 250 g, 鼠龄 12 周。大鼠随机分为模型组和 TMS 组,各组再根据脑梗死时间随机分为 1, 7, 14, 21 和 28 d 5 个亚组,每亚组 8 只。模型组造模成功后自由喂养;TMS 组造模成功后于动物清醒当天即给予 TMS 治疗。

二、脑梗死动物模型的建立

采用 Longa 线栓法^[5]制作大鼠一侧大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)的脑梗死模型。大鼠腹腔注射 10% 水合氯醛(350 mg/kg 体重),麻醉成功后取仰卧位固定于手术台上,经颈正中稍偏左切口,分离、暴露左侧颈总动脉、颈内动脉及颈外动脉,结扎颈总动脉近段、颈外动脉根部及分支。在颈总动脉近分叉处剪一小口,经此插入直径为 0.2 mm、头端圆钝的渔线,经颈总动脉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,插入深度为(19.0 ± 0.5) mm。结扎颈总动脉后缝合皮肤。

制模成功的标准为:动物苏醒后表现为提尾时右侧前肢内收屈曲;同侧 Horner 征;爬行时向右侧划圈;站立时向右侧倾倒。凡具有上述 4 项体征者列入研究对象。

三、TMS 治疗方法

应用丹麦 Dantec 公司生产的磁刺激器及圆形线圈,线圈直径为 12 cm,脉冲磁场强度峰值为 1.9 T。TMS 组动物在制模成功后清醒当天即行 TMS 治疗,刺激频率为 0.5 Hz,强度为最大输出强度的 70%,每次持续 1 min(即 30 个脉冲刺激),每天刺激 2 次,中间间隔 8 h(分别于上午 9 时和下午 5 时各刺激 1 次),至各时间点动物处死前一天结束 TMS 治疗。

四、梗死侧大脑皮质 c-Fos 和 BDNF 表达的检测

各组动物在规定时间用点过量的 10% 水合氯醛深度麻醉,开胸经左心室插管至升主动脉,先用 100 ml 生理盐水快速冲洗血液,接着用 4% 多聚甲醛 PBS 400 ml 灌注固定,然后将动物断头取脑,置于 4% 多聚甲醛中后固定过夜。之后以石蜡包埋,行连续冠状位切片。

取相同层面的 2 张切片,分别以免疫组化 SABC 法检测 c-Fos 和 BDNF 的表达。切片脱蜡、入水后加入 3% H₂O₂ 甲醇溶液,室温下作用 10 min;加入正常

山羊血清,室温下作用 20 min;分别加入兔抗 c-Fos 单克隆抗体(1:500,购自北京中山生物技术有限公司)和兔抗 BDNF 单克隆抗体(1:100,购自武汉博士德生物技术有限公司),置 4℃ 湿盒中过夜;加入生物素标记的二抗,室温下作用 10 min;加入链酶亲和素-过氧化物酶溶液,室温下作用 10 min;滴加新鲜配制的 DAB-H₂O₂ 显色液,室温下显色 5 ~ 10 min。以自来水冲洗,脱水、透明、中性树胶封片,光镜下观察。

c-Fos 阳性细胞胞核或胞浆呈棕黄色,BDNF 阳性细胞胞浆呈棕黄色。

五、图像分析

每张切片取梗死侧不同皮质的 5 个视野照相(Olympus 光学显微镜,×200),用 HPIAS-1000 型彩色图像分析系统测定每个视野内的阳性细胞数,分别计算 c-Fos 及 BDNF 的阳性细胞表达率。

六、统计学分析

用 SPSS 10.0 统计软件进行分析,所有数据以($\bar{x} \pm s$)表示,TMS 组与模型组的比较采用两样本的 *t* 检验。

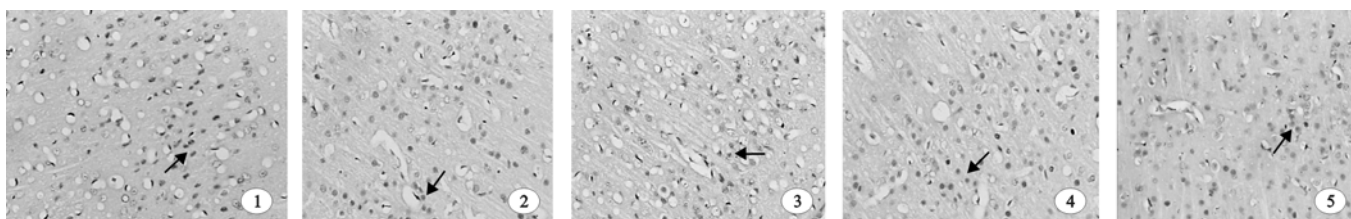
结 果

一、梗死侧皮质 c-Fos 阳性表达结果

脑梗死后 1 d,模型组及 TMS 组大鼠梗死侧皮质均可见大量的 c-Fos 阳性细胞,主要存在于梗死灶周围,2 组比较差异无统计学意义;随着时间的推移,模型组和 TMS 组梗死侧皮质 c-Fos 阳性细胞逐渐减少,但 TMS 组 7, 14, 21 和 28 d 时 c-Fos 阳性细胞率均高于相同时间点的模型组,差异均有统计学意义($P < 0.05$),见表 1 及图 1 ~ 5。结果提示 TMS 组动态表达水平较模型组高。

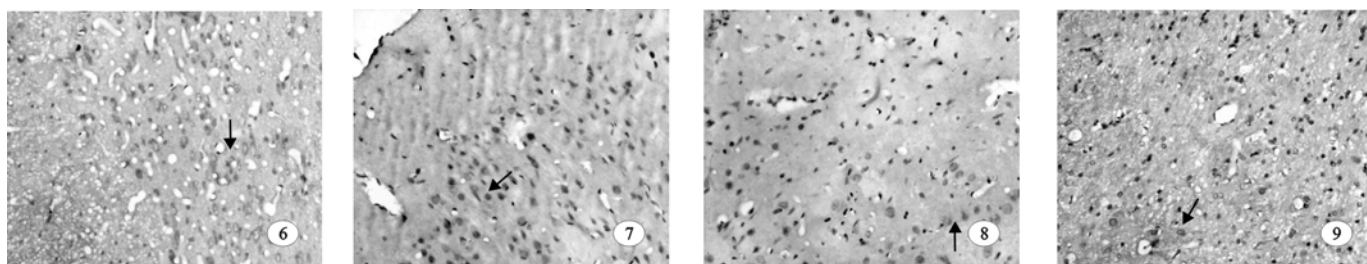
二、梗死侧皮质 BDNF 阳性表达结果

脑梗死后 1 d,模型组及 TMS 组大鼠梗死灶周围皮质均可见较多的 BDNF 阳性细胞,至第 7 天阳性表达率达峰值,然后逐渐下降,至 28 d 表达水平最低;与模型组相同时间点比较,TMS 组 7, 14 和 21 d 时 BDNF 阳性表达率均较高,差异均有统计学意义($P < 0.05$),见表 1 及图 6 ~ 9。



注:箭头处为阳性细胞

图 1 模型组脑梗死 1 d 梗死侧皮质 c-Fos 阳性细胞(SABC, ×200); 图 2 TMS 组脑梗死 7 d 梗死侧皮质 c-Fos 阳性细胞(SABC, ×200); 图 3 模型组脑梗死 7 d 梗死侧皮质 c-Fos 阳性细胞(SABC, ×200); 图 4 TMS 组脑梗死 28 d 梗死侧皮质 c-Fos 阳性细胞(SABC, ×200); 图 5 模型组脑梗死 28 d 梗死侧皮质 c-Fos 阳性细胞(SABC, ×200)



注:箭头处为阳性细胞

图 6 TMS 组脑梗死 7 d 梗死侧皮质 BDNF 阳性细胞(SABC, ×200); 图 7 模型组脑梗死 7 d 梗死侧皮质 BDNF 阳性细胞(SABC, ×200); 图 8 TMS 组脑梗死 21 d 梗死侧皮质 BDNF 阳性细胞(SABC, ×200); 图 9 模型组脑梗死 21 d 梗死侧皮质 BDNF 阳性细胞(SABC, ×200)

表 1 TMS 组和模型组脑梗死不同时间点梗死侧皮质 c-Fos 和 BDNF 阳性细胞表达率比较(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	c-Fos	BDNF
模型组		
1 d	42.36 ± 10.91	12.36 ± 3.68
7 d	30.08 ± 9.75	15.33 ± 4.05
14 d	19.28 ± 6.47	9.99 ± 3.21
21 d	11.24 ± 3.15	8.19 ± 3.25
28 d	6.78 ± 2.16	5.46 ± 2.42
TMS 组		
1 d	41.68 ± 11.14	13.96 ± 3.64
7 d	39.79 ± 9.80 *	20.63 ± 5.88 *
14 d	36.46 ± 8.52 *	16.15 ± 5.66 *
21 d	29.54 ± 7.82 *	14.63 ± 4.70 *
28 d	24.20 ± 5.18 *	6.84 ± 2.93

注:与模型组比较, * $P < 0.05$

讨 论

c-Fos 属于即早基因(immediate early genes, IEGs) Fos 家族的重要成员。在中枢神经系统中, IEGs 在正常条件下的表达通常很低, 而许多生理性刺激和病理情况均可短暂地诱导 IEGs 在细胞内的表达。脑缺血是 IEGs 强有力的诱导剂, 许多实验研究表明, 不论是局灶性脑缺血还是全脑缺血均可诱导 IEGs 的快速表达, IEGs 表达的强弱、空间分布及时程与缺血部位、范围、持续时间以及是否再灌注存在密切的关系^[6,7]。本实验制造一侧大脑中动脉完全闭塞的永久性脑缺血模型, 在脑梗死后 1 d, c-Fos 的表达仍处于较高水平, 与 Collaco-Moraes 等^[7]的实验结果基本一致。在模型组, 随着时间的推移, c-Fos 的表达很快下降至低水平; 而在 TMS 组, c-Fos 的表达虽然也处于下降趋势, 但其总体表达水平都较模型组高, 这表明 TMS 能持续性促进大鼠脑梗死急性期后梗死侧皮质神经细胞内 c-Fos 的表达。结果还显示, c-Fos 的阳性细胞主要位于梗死灶周围, 这是因为缺血中心区的细胞由于受损严重, 存在持续性的蛋白质合成障碍, 阻碍 c-Fos mRNA 的翻译。磁刺激的原理是利用一定强度的时变磁场刺激可兴奋组织, 从而在组织内产生感应电场。研究证明, 低场强的 TMS 可对神经系统的 Ca^{2+} 活动、神经元兴奋性及神经递质等产生广泛的调节作用^[8]。关于 TMS 诱导 c-

Fos 表达的机制尚不清楚, 我们推测可能是由于 TMS 能激活梗死灶周围存活的神经细胞, 使其功能增强所致。

c-Fos 可与其它 IEGs 表达产物以亮氨酸拉链结构相结合, 形成同源或异源二聚体复合物——转录因子 AP-1, 然后结合至靶基因启动子的 AP-1 位点。AP-1 被认为是细胞核内的“第三信使”, IEGs 通过 AP-1 的 DNA 结合活性调节前脑啡肽、血管活性肠肽、酪氨酸羟化酶、神经生长因子和 BDNF 等基因的表达^[9,10], 从而促使神经细胞对刺激和损伤产生不同的适应性变化, 增强神经元的修复能力, 加速神经元网络的重建, 以恢复其正常功能。由此我们推测, TMS 可能通过促进脑梗死后 c-Fos 的表达来发挥脑保护及康复治疗效应。

基于 c-Fos 能形成 AP-1 来调节 BDNF 靶基因的表达, 本实验同时用免疫组化的方法检测了大鼠梗死侧大脑皮质神经细胞 BDNF 的表达, 发现其阳性表达细胞也主要存在于脑梗死灶周围, 这与袁琼兰等^[11]研究大鼠脑缺血再灌注时 c-Fos 和神经营养因子在神经元内的表达特点相似。结果显示, TMS 治疗 7, 14 和 21 d 时, 大鼠脑梗死侧大脑皮质神经细胞 BDNF 的表达均明显增加, 而在治疗 28 d 时增加不明显, 这可能是由于此时 c-Fos 的表达虽有增加, 但总体水平较低, 不足以引起 BDNF 的表达显著增加。BDNF 通过与其受体——酪氨酸激酶受体 B 结合, 能对脑缺血产生多种神经保护效应: 如拮抗兴奋性氨基酸毒性^[12], 稳定细胞内 Ca^{2+} 浓度^[13]; 增强抗氧化酶的活性, 减轻自由基损伤^[14]; 抗细胞凋亡^[15]; 修复受损的神经元, 促进神经元再生, 刺激轴突的芽生和新突触的形成等。由此, 我们推断 TMS 可通过诱导 c-Fos 表达来促进梗死侧皮质 BDNF 的表达, 从而对脑梗死发挥神经保护和康复治疗效应。另外, TMS 还可通过其它的作用机制对脑梗死发挥治疗效应: 如磁刺激能引起局部脑血流量的增加^[16]; 可增强梗死灶周围血管内皮细胞生长因子及其受体 Flk-1 的表达^[17], 从而减轻缺血性脑损伤, 有利于神经细胞生长, 形成新的树突和轴突; 刺激从皮质到锥体束到脊髓及肌肉的整个运动神经传导通路, 对运动

神经传导通路有易化作用,促进突触的生成和皮质功能的重建^[18]。

关于 TMS 的安全性问题,目前的研究主要集中在其是否能引起癫痫发作,导致视、听觉及大脑高级神经功能紊乱和继发性脑出血。国内的研究结果表明,低频、小剂量的 TMS 应用是安全的^[19,20]。我们选用的刺激频率为 0.5 Hz、磁场强度为 1.33 T,实验过程中未见大鼠痫性发作及明显的躁动、欣快等异常行为,无意识改变及瘫痪加重。至于在保证治疗安全的前提下,如何选择合适的参数(如刺激频率、强度和持续时间)才能对脑梗死发挥最佳的治疗效果,尚需行进一步的基础和临床研究。

参 考 文 献

- Alvaro PL. Repetitive transcranial magnetic stimulation: technical principles, safety, and potential therapeutic applications. EEG Clin Neurophysiol, 1997, 103:48.
- Fujiki M, Kobayashi H, Abe T, et al. Repetitive transcranial magnetic stimulation for protection against delayed neuronal death induced by transient ischemia. J Neurosurg, 2003, 99:1063-1069.
- 钮竹, 张通, 方定华, 等. 经颅磁刺激在急性脑梗死运动功能康复中的作用. 中国康复理论与实践, 2001, 7:16-18.
- 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.
- Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. Stroke, 1989, 20:84-91.
- Takemoto O, Tomimoto H, Yanagihara T. Induction of c-Fos and c-jun gene products and heat shock protein after brief and prolonged cerebral ischemia in gerbils. Stroke, 1995, 26:1639-1648.
- Collaco-Moraes Y, Aspey BS, de Bellerche JS, et al. Focal ischemia causes an extensive induction of immediate early genes that are sensitive to MK2801. Stroke, 1994, 25:1855-1860.
- Post A, Keck ME. Transcranial magnetic stimulation as a therapeutic tool in psychiatry: what do we know about the neurobiological mechanisms. J Psychiatr Res, 2001, 35:193-215.
- Yu AC, Lee YL, Fu WY, et al. Gene expression in astrocytes during and after ischemia. Prog Brain Res, 1995, 105:245-253.
- Hsu CY, An G, Liu JS, et al. Expression of immediate early gene and growth factor mRNAs in a focal cerebral ischemia model in the rat. Stroke, 1993, 24:178-181.
- 袁琼兰, 蓝顺清, 李瑞祥, 等. c-Fos 和神经营养因子在大鼠脑缺血再灌注时的神经元表达特点. 神经解剖学杂志, 2001, 17:77-81.
- Brandoli C, Sanna A, De Bernardi MA, et al. Brain-derived neurotrophic factor and basic fibroblast growth factor downregulate NMDA receptor function in cerebellar granule cells. J Neurosci, 1998, 18:7953-7961.
- Cheng B, Mattson MP. NT-3 and BDNF protect CNS neurons against metabolic/excitotoxic insult. Brain Res, 1994, 640:56-67.
- Mattson MP, Lovell MA, Furukawa K, et al. Neurotrophic factors attenuate glutamate-induced accumulation of peroxides, elevation of intracellular Ca^{2+} concentration and neurotoxicity, and increase antioxidant enzyme activities in hippocampal neurons. J Neurochem, 1995, 65:1740-1751.
- Schabitz UR, Sommer C, Zoder W, et al. Intravenous BDNF reduces infarct size and counterregulates Bax and Bcl-2 expression after temporary focal cerebral ischemia. Stroke, 2000, 31:2212-2217.
- Sander D, Meyer BU, Roricht S, et al. Effect of hemisphere selective repetitive magnetic stimulation on middle cerebral artery blood flow velocity. Electroencephalogr Clin Neurophysiol, 1995, 97:43-48.
- 朱镛连. 脑的可塑性与功能重组. 中华内科杂志, 2000, 30:567-568.
- 黄晓琳, 韩肖华, 郭铁成, 等. 电针联合经颅磁刺激对急性脑缺血大鼠 VEGF 及其受体 Flk-1 表达的影响. 中华物理医学与康复杂志, 2004, 26:581-584.
- 黄福南, 曹起龙, 沈定国, 等. 经颅磁场刺激安全性的动物实验研究. 中华物理医学与康复杂志, 1998, 203:136-139.
- 孙毅, 汤晓芙, 郭玉璞. 经颅磁刺激安全性的实验研究. 中华神经科杂志, 1996, 29:217-221.

(修回日期:2005-11-20)

(本文编辑:吴 倩)

· 个案报道 ·

特大面积烧伤并双侧膝关节离断 1 例的综合康复治疗

廖麟荣 刘四文 唐丹 刘海兵

我们于 2002 年 3 月收治 1 例全身特大面积烧伤并因双小腿筋膜间室综合征行双侧膝关节离断术患者,采用系统的综合康复治疗取得较满意的疗效,现报道如下。

一、资料与方法

(一)临床资料

患者,男,34 岁,于 2000 年 3 月因乙烯渗漏爆炸致全身特大面积烧伤,烧伤面积达 95%,浅Ⅱ度~Ⅲ度,于外院接受对症支持治疗,并因双小腿筋膜间室综合征行双侧膝关节离断术及瘢痕

增生切除术。患者为进一步康复、安装假肢而入住我院。

入院时对患者进行功能评价:(1)皮肤——除会阴、头皮及面部部分皮肤外,其余部位均有不同程度的瘢痕。(2)关节活动范围——髋关节屈曲 90~96°,伸展 13~15°,无屈曲、外展、外旋挛缩;肩关节前屈 132~150°,后伸 32~40°,外展 122~142°,外旋 72~81°,内收与内旋无明显受限;肘关节屈曲、伸展达正常范围;腕关节屈曲 41~68°,伸展 65~70°;双手挛缩于功能位。(3)徒手肌力检查——髋屈曲、伸展、外展及内收肌群,躯干肌群,肘屈曲及伸展肌群均为 4+级;肩屈曲、伸展及外展,腕手部肌群均为 4-级。(4)残肢情况——双侧残肢皮肤较薄,感觉减退;残端处骨突明显,软组织较少,有压痛,无幻肢痛,无创