

· 基础研究 ·

经颅磁刺激对脑梗死大鼠学习记忆功能的影响

刘传玉 周素荣 孙旭文 刘竹丽 吴洪亮 梅元武

【摘要】目的 研究经颅磁刺激(TMS)对脑梗死后大鼠学习记忆功能和海马血管新生及锥体细胞树突结构的影响。**方法** 将48只雄性SD大鼠分为假手术组、自然恢复组和TMS组,每组16只。采用线栓法对自然恢复组和TMS组大鼠制作一侧大脑中动脉闭塞的脑梗死模型,并在制模后第2天,对TMS组给予每天2次、每次30个脉冲的TMS治疗,疗程4周;观察各组大鼠治疗后的Y-迷宫中的学习记忆成绩和梗死海马血管新生及锥体细胞树突结构变化。**结果** ①TMS组大鼠学习尝试次数少于自然恢复组($P < 0.01$),记忆再现次数多于自然恢复组($P < 0.01$);②TMS组海马区微血管计数明显多于自然恢复组($P < 0.05$);③TMS组海马CA3区锥体细胞树突顶树突总长度长于自然恢复组($P < 0.01$)。**结论** TMS能促进脑梗死大鼠学习记忆功能的恢复,其机制可能与促进海马血管新生及锥体细胞树突结构的改变有关。

【关键词】 脑梗死; 大脑中动脉; 记忆; 海马; 毛细血管新生; 经颅磁刺激

Effects of transcranial magnetic stimulation on the learning and memory abilities of those with cerebral infarction LIU Chuan-yu*, ZHOU Su-rong, SUN Xu-wen, LIU Zhu-li, WU Hong-liang, MEI Yuan-wu.

* Department of Neurology, Yantai Yuhuangding Hospital, Yantai 264000, China

【Abstract】Objective To study the effects of transcranial magnetic stimulation (TMS) on learning and memory, and angiogenesis and the dendritic structure of hippocampal CA3 pyramidal neurons after cerebral infarction. **Methods** Forty-eight male Sprague-Dawley rats were divided into a sham operated group, a model group and a TMS group ($n = 16$). Rat models of focal cerebral infarction were established with unilateral middle cerebral artery (MCA) suture occlusion in the model and TMS groups. The rats of the TMS group were given 4 weeks of TMS treatment beginning 1 day after the infarction (2 times per day, 30 pulses per time). Their learning and memory abilities were tested with a Y-maze. Angiogenesis and the dendritic structure of their hippocampal CA3 pyramidal neurons were detected after 4 weeks. **Results** Compared with the model group, learning and memory improved significantly in the TMS group. The average microvessel density of the hippocampus in the TMS group was significantly more than in the model group. The total length of apical dendrites of hippocampal CA3 pyramidal neurons in TMS group was significantly longer than in the model group. **Conclusions** The improved learning and memory observed following TMS treatment are likely to be related to changes in angiogenesis, the dendritic structure of the hippocampal CA3 pyramidal neurons, and enhanced synaptic plasticity.

【Key words】 Cerebral infarction; Middle cerebral artery; Memory; Hippocampus; Angiogenesis; Transcranial magnetic stimulation

认知功能障碍是脑梗死患者常见的临床表现,而学习记忆障碍是认知功能障碍的主要表现之一,它和运动神经功能障碍一样,是现代康复治疗研究的重点。实验和临床研究表明,经颅磁刺激(transcranial magnetic stimulation, TMS)可促进脑梗死动物和患者运动功能康复^[1-2],但TMS对脑梗死学习记忆功能的影响国际上鲜见报道。本研究通过线栓法建立大鼠一侧大

脑中动脉闭塞的脑梗死模型,观察TMS对脑梗死大鼠学习记忆功能的影响,并通过检测脑梗死大鼠患侧海马血管新生及海马CA3区锥体细胞树突结构的变化,探讨其可能机制。

材料与方法

一、实验动物及分组

成年、健康SD雄性大鼠,体重(225 ± 25)g,12周龄,由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供。随机取16只行假手术作为假手术组,其余大鼠制造大鼠大脑中动脉栓塞(middle cerebral artery occlusion,

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2011.01.003

作者单位:264000 烟台,山东省烟台毓璜顶医院神经内科(刘传玉、周素荣、孙旭文、刘竹丽、吴洪亮);华中科技大学同济医学院附属协和医院神经内科(梅元武)

MCAO)模型,将造模成功且符合入选条件并存活的可随机分为自然恢复组和 TMS 组,每组各 16 只,TMS 组于 MCAO 后 24 h 给予 TMS 治疗,假手术组及自然恢复组常规饲养,3 组均于造模 28 d 后取材。

二、脑梗死动物模型的制作

参照廖维靖等^[3]的大鼠大脑中动脉缺血方法,对自然恢复组及 TMS 组大鼠制作左侧脑梗死模型。当大鼠苏醒后,表现为提尾时右侧前肢内收屈曲、左侧面部出现 Horner 征、爬行时身体向右侧画圈、站立时身体向右侧倾倒 4 项体征者为脑梗死动物模型制作成功。共用大鼠 145 只,有 48 只符合入选条件并存活到规定时间。

三、TMS 治疗方法

TMS 组在模型制作成功后的第 2 天行 TMS 治疗。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,脉冲磁场的强度峰值为 1.9 T。固定大鼠头部,线圈紧贴头皮,线圈平面与大鼠左侧大脑半球呈相切关系,刺激时大鼠保持清醒。刺激频率为 0.5 Hz,强度为 70% 最大输出强度,每次持续 1 min (即 30 个脉冲刺激),每天刺激 2 次,中间间隔时间 8 h (于 9:00 和 17:00 各刺激 1 次),连续治疗 28 d。

四、学习和记忆能力评价

各组大鼠于治疗后第 28 天行 Y 型电迷宫测试^[4],选用电压 40 V,设一臂为起步区,按 I → II → III → I 臂顺序轮流作为安全区。大鼠在起步区静置适应 3 min,然后予以电击致其逃至安全区,灯光持续 15 s,然后熄灯休息 45 s,开始下一次操作。

1. 学习能力评价:大鼠受电击后,从起步区直接逃至安全区定为正确反应;以大鼠达到连续 10 次电击均为正确反应之前所需的电击次数 (即尝试次数),表示其学习获得能力。若尝试次数超过 30 次,则以 30 次为最大值计数。

2. 记忆能力评价:上述达标大鼠休息 24 h 后,同法检测其记忆力。以每只大鼠在 10 次电击中的正确反应次数作为记忆成绩。

五、微血管密度测定

实验第 28 天,学习和记忆能力评价后各组随机取 8 只大鼠深麻醉后用生理盐水 200 ml 快速左心室灌注冲洗,再用 4% 多聚甲醛 (pH 7.4, 0.01 M PB 配置) 300 ml 先快后慢灌注固定,灌注时间 45 ~ 60 min,灌注完毕立即断头取脑,4% 多聚甲醛后固定 (不超过 24 h),蒸馏水浸泡 4 h,常规乙醇脱水、二甲苯透明、浸蜡、包埋。石蜡切片机连续冠状切片 (片厚 7 μ m),每个标本中取 2 张切片,采用免疫组化链霉亲和素-生物素-过氧化酶复合物技术 (strept avidin-biotin complex, SABC) 检测凝血 VIII 因子 (co-

agulation factor VIII, VIII 因子),操作步骤严格按说明书说明进行。微血管密度 (microvessel density, MVD) 计数按 Weidener 等^[5]方法进行,凡 VIII 因子免疫组化染色成棕黄色的单个内皮细胞或内皮细胞簇作为一个血管计数,每张切片在同一皮层缺血区周边选择 4 个高倍 ($\times 400$) 视野进行微血管计数,参照 Weidener 计数方法,计算出海马区每 mm^2 面积内微血管的数量,即微血管密度,然后求其均值,2 张切片的平均值作为该动物的 MVD。

六、海马锥体细胞树突的定量测量

实验第 28 天,学习和记忆能力评价后各组随机取 8 只大鼠经深麻醉后迅速断头取患侧大脑海马,修成 5 mm 厚的组织块。采用 Golgi-Cox 染色法染色、切片,染色后神经细胞和突起染棕黑色,底衬淡黄色或无色,在 Olympus 显微镜下观察。采用画线法测定患侧海马 CA3 区锥体细胞顶树突总长度和一级树突直径,每只观察 5 个锥体细胞,其均值作为该动物的定量测量值^[6]。

七、统计学分析

应用 SPSS 12.0 版软件进行统计分析,每组样本计量结果用 ($\bar{x} \pm s$) 表示;3 组间大鼠学习记忆功能、海马 CA3 锥体细胞树突结构参数、MVD 的组间比较,用单因素方差分析 (One-way ANOVA),其间两两比较用 q 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、TMS 对脑梗死大鼠学习记忆功能的影响

3 组学习和记忆能力比较,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。与假手术组比较,自然恢复组和 TMS 组大鼠学习和记忆能力低,表现为学习尝试次数多,记忆再现次数少;与自然恢复组比较,TMS 组大鼠学习尝试次数少,记忆再现次数多,见表 1。

表 1 TMS 对脑梗死大鼠学习记忆功能的影响 (次, $\bar{x} \pm s$)

组 别	只数	学习尝试 次数	记忆再现 次数
假手术组	16	7.8 ± 2.1	7.9 ± 1.4
自然恢复组	16	25.7 ± 4.3^a	3.9 ± 1.0^a
TMS 组	16	19.1 ± 4.2^{ab}	6.3 ± 1.1^{ab}

注:与假手术组比较,^a $P < 0.01$;与自然恢复组比较,^b $P < 0.01$

二、微细血管密度

结果显示,微血管形态不规则,管腔由染成棕黄色的内皮细胞围成,见图 1。TMS 组大鼠海马区可见较多散在的单个内皮细胞,而其它组大鼠相应部位仅见少见散在的单个内皮细胞。微血管计数:自然恢复组明显多于假手术组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);而 TMS 组海马区微血管计数明显多于假手术组和自然

恢复组,差异有统计学意义($P < 0.01$, $P < 0.05$)。见表 2。

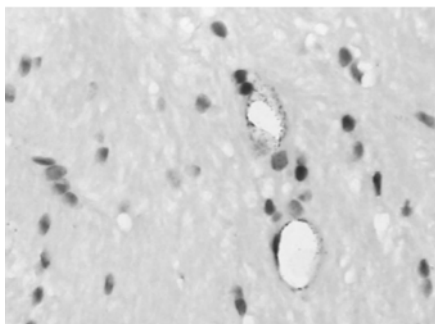


图 1 VIII 因子免疫组织化学染色阳性的血管照片(免疫组化 SABC 染色, $\times 400$)

表 2 TMS 对大鼠海马区 MVD 的影响(血管数/ mm^2 , $\bar{x} \pm s$)

组 别	只数	MVD
假手术组	8	44.7 ± 11.2
自然恢复组	8	58.1 ± 10.3^a
TMS 组	8	69.8 ± 10.4^{bc}

注:与假手术组比较, $^aP < 0.05$, $^bP < 0.01$;与自然恢复组比较, $^cP < 0.05$

三、TMS 对脑梗死大鼠患侧海马 CA3 锥体细胞树突结构的影响

自然恢复组和 TMS 组大鼠患侧海马 CA3 区锥体细胞树突有明显断裂破坏,见图 2~4。3 组大鼠患侧海马 CA3 区锥体细胞顶树突总长度比较,差异有统计学意义($P < 0.01$);其中 TMS 组长于自然恢复组和假手术组($P < 0.01$),而自然恢复组长于假手术组($P < 0.05$)。3 组间海马 CA3 区锥体细胞一级树突直径的差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 3。

表 3 TMS 对大鼠海马 CA3 区锥体细胞树突结构的影响(μm , $\bar{x} \pm s$)

组 别	只数	顶树突总长度	一级树突直径
假手术组	8	158.1 ± 14.3	6.0 ± 0.8
自然恢复组	8	174.7 ± 15.1^a	5.9 ± 0.7
TMS 组	8	194.5 ± 16.5^{bc}	6.3 ± 0.8

注:与假手术组比较, $^aP < 0.05$, $^bP < 0.01$;与自然恢复组比较, $^cP < 0.01$

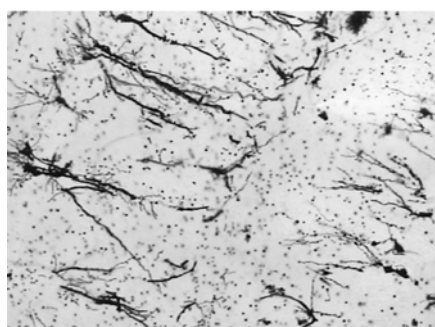


图 2 假手术组海马 CA3 锥体细胞 (Golgi-Cox 染色, $\times 100$)

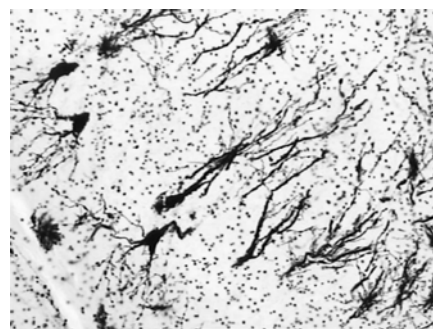


图 3 自然恢复组患侧海马 CA3 锥体细胞 (Golgi-Cox 染色, $\times 100$)

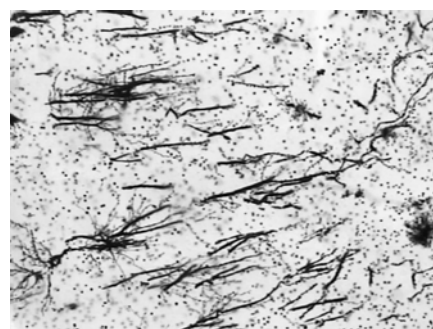


图 4 TMS 组患侧海马 CA3 锥体细胞 (Golgi-Cox 染色, $\times 100$)

讨 论

磁刺激能兴奋深部的外周神经组织、大脑和脊髓,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,并能增强海马 CA1 细胞的长时程增强,对外周及中枢神经系统损伤的疾病具有潜在的治疗作用^[7-8]。目前,TMS 已成功用于抑郁症、精神分裂症、强迫症、癫痫、帕金森病等的治疗^[9-10]。在脑缺血治疗方面,已有研究显示,重复 TMS 可保护短暂脑缺血所诱导的迟发性神经元死亡^[11]。临床研究表明,TMS 可促进脑梗死患者运动功能康复,并能改善患者脑卒中后的抑郁状态^[2,12]。本研究结果显示,TMS 治疗 4 周后大鼠的学习记忆功能较自然恢复组显著改善,表明 TMS 也能促进脑梗死大鼠学习记忆功能的改善。

目前,有关 TMS 促进脑梗死康复的机制尚不清楚。研究表明,脑缺血、缺氧可诱导血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)及其受体的表达,并激活血管新生机制,新生血管形成可在一定程度上减少神经功能的缺失,微血管新生的范围与程度直接关系到缺血边缘区血流的改善,影响神经元生理功能的恢复,从而决定了患者的预后,尤其是在梗死周围半暗带中新生血管的数量与脑卒中患者的存活率直接相关^[13-14]。Issa 等^[15]定量分析了 10 例脑卒中死亡患者脑组织中新生血管密度与生存时间关系,发现有 9 例患者缺血半球内微血管密度明显增加,以缺血半

暗区增加更为显著,与患者的生存时间呈正相关。Khaleel 等^[16]的研究发现,TMS 治疗可改善急性脑梗死患者脑血流量。本研究对脑缺血后 28 d 大鼠海马区微血管密度的分析结果显示,与假手术组相比缺血 28 d 时自然恢复组和 TMS 组微血管计数明显多于假手术组,而 TMS 组缺血 28 d 时微血管计数又明显多于相应时间的自然恢复组,说明在脑缺血后在海马区微血管有代偿性增生,而 TMS 对这种增生有促进作用。局灶脑缺血后在海马区微血管的增生对改善海马区的微循环、促进学习记忆功能恢复具有重要意义,而 TMS 对这一过程有明显的促进作用,这可能是 TMS 促进脑缺血后学习记忆功能恢复的一个重要机制。

树突是神经元间信息交换的重要结构,其长度、直径及分枝均反映细胞的功能状态。Jones 等^[17-18]的研究显示,电刺激梗死大鼠感觉运动皮质会提高对侧未受损的感觉运动皮质树突的复杂性。有趣的是限制健侧肢体活动树突生长会消失,功能也会恶化。Kleim 等^[19]研究发现,复杂运动训练可引起未受损半球运动依赖性突触发生增强,脑的可塑性可通过损伤后训练而加强。本研究结果显示,局灶脑梗死 28 d 后自然恢复组大鼠海马 CA3 区锥体细胞顶树突总长度长于假手术组,可能亦为代偿所致,而 TMS 组增长更为明显,表明 TMS 能促进这种代偿的发生。从本结果可以看出,TMS 治疗可促进患侧海马 CA3 区锥体细胞树突结构参数的改变,使顶树突总长度延长。这说明 TMS 治疗可在一定程度上影响脑缺血大鼠海马 CA3 区锥体细胞树突结构重组,进而影响动物学习记忆功能。考虑这也是 TMS 促进脑缺血后学习记忆功能恢复的机制之一。至于 TMS 治疗可影响脑缺血大鼠海马 CA3 区锥体细胞树突结构重组的原因,有待进一步研究探讨。

从本研究结果可以看出,TMS 治疗可以改善动物的学习记忆功能,并能促进患侧海马血管新生、促进动物海马 CA3 区锥体细胞树突结构的改变,使顶树突总长度延长,这可能就是 TMS 治疗促进脑缺血大鼠学习记忆功能改善的形态学基础,如能进行进一步的研究,将为 TMS 治疗脑梗死提供新的理论依据。

参 考 文 献

- [1] 刘传玉,梅元武,张小乔. 经颅磁刺激对脑缺血大鼠功能恢复和健侧突触结构的影响. 中华物理医学与康复杂志,2005,27:707-710.
- [2] Emara TH, Moustafa RR, Elnahas NM, et al. Repetitive transcranial magnetic stimulation at 1Hz and 5Hz produces sustained improvement in motor function and disability after ischaemic stroke. Eur J Neurol, 2010, 17:1203-1209.

- [3] 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,2002,24:349-352.
- [4] Jezek K, Wesierska M, Fenton AA. Hippocampus-dependent retrieval and hippocampus-independent extinction of place avoidance navigation, and stress-induced out-of-context activation of a memory revealed by reversible lesion experiments in rats. Physiol Res, 2002,51 Suppl 1: S35-47.
- [5] Weidner N, Semple JP, Welch WR, et al. Tumor angiogenesis and metastasis-correlation in invasive breast carcinoma. N Engl J Med, 1991,324:1-8.
- [6] 张艳美,杨权,许崇涛,等. 慢性应激对大鼠海马 CA3 区锥体细胞形态结构的效应. 中华精神科杂志,2002,35:22-24.
- [7] Ogiue-Ikeda M, Kawato S, Ueno S. Acquisition of ischemic tolerance by repetitive transcranial magnetic stimulation in the rat hippocampus. Brain Res, 2005, 1037:7-11.
- [8] Alvaro PL. Repetitive transcranial magnetic stimulation: Technical principles, safety, and potential therapeutic applications. EEG Clin Neurophysiol, 1997, 103: 48.
- [9] 王晓明,谢建平,周树舜,等. 重复经颅磁刺激技术及其临床应用进展. 国外医学·物理医学与康复学分册,2004, 24:43-46.
- [10] 王晓明,杨德本,黄慧,等. 重复经颅磁刺激治疗抑郁症的初步研究. 中华精神科杂志,2003, 36: 175-175.
- [11] 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.
- [12] 陈运平,梅元武,孙圣刚,等. 低频重复经颅磁刺激对脑卒中后抑郁状态和神经功能缺损的治疗效应. 中国临床康复,2005, 9: 18-19.
- [13] Hai J, Li ST, Lin Q, et al. Vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis induced by chronic cerebral hypoperfusion in rat brain. Neurosurgery, 2003, 53:963-970.
- [14] Bellomo M, Adamo EB, Deodato B, et al. Enhancement of expression of vascular endothelial growth factor after adeno-associated virus gene transfer is associated with improvement of brain ischemia injury in the gerbil. Pharmacol Res, 2003,48:309-317.
- [15] Issa R, Krupinski J, Bujny T, et al. Vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, in human brain tissue after ischemic stroke. Lab Invest, 1999, 79: 417-425.
- [16] Khaleel SH, Bayoumy IM, El-Nabil LM, et al. Differential hemodynamic response to repetitive transcranial magnetic stimulation in acute stroke patients with cortical versus subcortical infarcts. Eur Neurol, 2010, 63:337-342.
- [17] Jones TA, Schallert T. Overgrowth and pruning of dendrites in adult rats recovering from neocortical damage. Brain Res, 1992, 581:156-160.
- [18] Jones TA, Schallert T. Use-dependent growth of pyramidal neurons after neocortical damage. J Neurosci, 1994, 14:2140-2152.
- [19] Kleim JA, Jones TA, Schallert T. Motor enrichment and the induction of plasticity before or after brain injury. Neurochem Res, 2003,28: 1757-1469.

(修回日期:2010-06-14)

(本文编辑:松 明)