

· 基础研究 ·

经颅电刺激对脑缺血再灌注大鼠运动功能和微管相关蛋白-2、生长相关蛋白-43 的影响

杨丽霞 刘芳 陈正红

【摘要】目的 研究经颅电刺激对局部脑缺血再灌注大鼠运动功能恢复的影响并从神经可塑性角度探讨其机制。**方法** 将 72 只雄性 Sprague-Dawley 大鼠按完全随机分组法分为电刺激组、模型组、假手术组和正常组,采用线栓法制备短暂性大脑中动脉缺血再灌注模型,造模后 24 h 电刺激组给予经颅电刺激。分别于造模后第 3、7、14 和 28 天采用前肢放置试验(FPT)和走横木试验(BWT)进行评分,采用免疫组织化学法检测微管相关蛋白-2(MAP-2)和生长相关蛋白-43(GAP-43)在梗死灶周围的灰度值。**结果** 电刺激组 FPT 和 BWT 评分在第 7、14、28 天优于模型组,差异具有统计学意义($P < 0.05$);电刺激组梗死灶周围 MAP-2 的表达在第 14 天、28 天高于模型组($P < 0.01$);电刺激组梗死灶周围 GAP-43 的表达在第 3 天、7 天和 14 天高于模型组($P < 0.05$)。**结论** 经颅电刺激能促进脑缺血大鼠肢体功能恢复,上调梗死灶周围 MAP-2 和 GAP-43 的表达。

【关键词】 脑缺血再灌注; 经颅电刺激; 微管相关蛋白-2; 生长相关蛋白-43; 前肢放置试验; 走横木试验

The effect of transcranial electrical stimulation on functional recovery and the expression of microtubule-associated protein-2 and growth-associated protein-43 after cerebral focal ischemia YANG Li-xia*, LIU Fang, CHEN Zheng-hong. * Department of Psychology, The Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang 550004, China

Corresponding author: LIU Fang, Email: Liufang_c@126.com

【Abstract】 Objective To assess the influence of transcranial electric stimulation (TES) on the recovery of motor function after cerebral focal ischemia and reperfusion and to explore the mechanisms in terms of neural plasticity. **Methods** An acute focal ischemia-reperfusion model was established by transient occlusion of the right middle cerebral artery (MCAO). Seventy-two male Sprague-Dawley rats were randomly divided into a TES group, a model group, a sham-operation group and a normal group. The TES group was given TES 24 h after MCAO; the model group received the operation without any treatment. Forelimb placing (FPT) and beam walking (BWT) were measured at the 3rd, 7th, 14th and 28th day after reperfusion. Microtubule-associated protein-2 (MAP-2) and growth-associated protein-43 (GAP-43) and grey levels of reaction products in the peri-infarct region were examined by immunohistochemical techniques. **Results** The TES group rats had markedly better FPT and BWT performance at the 7th, 14th and 28th day after MCAO, compared with the model group. Expression of MAP-2 had increased significantly more at the 14th and 28th day in the peri-infarct region in the TES group compared with the model group. Expression of GAP-43 was significantly elevated in the peri-infarct region in the TES group compared with the model group at all time points. **Conclusions** TES can improve motor function and neural plasticity following cerebral ischemia and reperfusion damage. The functional enhancement may be partly due to up-regulation of the expression of GAP-43 and MAP-2 in the peri-infarct region.

【Key words】 Cerebral ischemia and reperfusion; Transcranial electrical stimulation; Microtubule-associated protein-2; Growth associated protein-43; Forelimb placing test; Beam walking test

研究表明,非侵入性经颅电刺激能增强健康人语言表达和学习推理能力,对慢性疼痛及帕金森病患者有积极的影响,它能以可逆的方式调节大脑皮质的兴奋性,具有副作用小、作用时间长的特点,已成为一种

有价值的调节神经可塑性的手段^[1-2]。本研究旨在探讨经颅电刺激对局部脑缺血再灌注大鼠肢体功能恢复的影响,并从中枢神经可塑性的角度探讨电刺激促进大鼠功能恢复的机制。

材料与方法

一、动物及分组

选用纯种健康雄性 Sprague-Dawley 大鼠 72 只,体

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2011.06.003

作者单位:550004 贵阳,贵阳医学院附属医院心理科(杨丽霞),神经科(刘芳);贵州省交通医院内科(陈正红)

通信作者:刘芳,Email:Liufang_c@126.com

重(250 ± 25) g, 鼠龄 12 周左右, 由贵阳医学院实验动物中心提供。将动物按完全随机分组法分为电刺激组 30 只、模型组 30 只、假手术组 6 只、正常组 6 只。

二、制作短暂性大脑中动脉缺血再灌注模型

电刺激组和模型组采用改良的 Longa 法^[3]制作短暂性大脑中动脉缺血再灌注模型: 使用单纤维尼龙线, 将一端加热烤制光滑呈圆球形, 直径 $0.25 \sim 0.28$ mm; 用 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉大鼠, 逐层分离暴露右侧颈总动脉、颈内动脉; 经颈总动脉切口插入尼龙线进入颈内动脉约 $18 \sim 20$ mm 至大脑中动脉近端, 阻断大脑中动脉供血 2 h 后抽出尼龙线。假手术组手术过程同上, 但只将栓线插入 15 mm 后 1 min 拔出。正常组不造模。

参考 Longa 等^[3]介绍的评分标准判定模型是否成功: 0 分为无神经功能缺失症状; 1 分为轻度局灶神经功能缺失, 不能完全伸展左侧前爪, 提尾悬吊时左前肢屈曲; 2 分为中度局灶神经功能缺失, 爬行时向左侧转圈, 追尾; 3 分为重度局灶神经功能缺失, 爬行时向左侧倾倒; 4 分为不能自行行走, 甚至意识丧失。得分 1~3 分者作为实验对象。

三、电刺激治疗

应用河南产 CCS-1 型电刺激仪, 刺激电极为圆形, 直径 0.2 cm, 阴极和阳极间距为 1.5 cm。行电刺激时, 阳极置于大鼠头皮双眼间到人字缝处相应的感觉运动区^[4], 阴极置于正前方, 采用脉宽 100 μ s、电压 1000 V, 连续刺激 10 次, 每次刺激间隔 $1 \sim 2$ s。术后 24 h 开始对电刺激组大鼠进行治疗, 6 d 为 1 个疗程, 休息 1 d 进行下一个疗程治疗。

四、行为学测试

1. 前肢放置试验 (forelimb placing test, FPT): 参照文献^[5], 包括 3 个亚试验, 即视觉亚试验、触觉亚试验和本体觉亚试验。视觉亚试验 a 为前方刺激, 试验桌位于动物前方, 而视觉亚试验 b 则为侧方刺激, 试验桌位于动物左侧肢体侧方; 试验中, 动物被试验者握在手中, 前爪悬空, 自桌面上方 10 cm 向桌面缓慢倾斜靠近, 正常反应为鼠前肢即刻抓向桌面, 损伤鼠肢体反应延迟。计分方法: 肢体放置反应正常计 0 分, 反应延迟但不超过 2 s 计 1 分, 反应延迟超过 2 s 计 2 分。触觉亚试验也分前方和侧方刺激, 动物被握在试验者手中, 前爪悬空, 用桶状容器遮挡使其既看不到也不能用胡须触及桌面, 使其左前爪背侧轻触桌面, 刺激深度仅达皮肤和毛发, 动物反应及评分标准同视觉亚试验。本体觉亚试验仅有前方刺激, 操作方法及评分标准同触觉亚试验, 但刺激深度不同, 即本体觉亚试验给予较重的压力, 刺激深度达肌肉和关节。得分范围为 0~10 分, 功能损伤越重, 得分越高。

2. 走横木试验 (beam-walking test, BWT): 参照文

献^[6], 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, 在上面行走时滑倒几率 $\leq 50\%$; 2 分为能跳上横木, 在上面行走时滑倒几率 $> 50\%$; 3 分为在健侧后肢帮助下能跳上横木, 但受累侧后肢不能向前移动; 4 分为在横木上不能行走, 但可坐在上面; 5 分为放在横木上会掉下来。

电刺激组和模型组大鼠分别于造模后第 3、7、14 和 28 天进行上述两种测试。正常组与假手术组于术后第 1 天进行测试。

五、组织制备及免疫组织化学分析

电刺激组和模型组于再灌注后第 3、7、14 和 28 天各取 5 只, 假手术组和正常组均于术后第 3 天各取 5 只, 以 4% 多聚甲醛行心脏灌注; 取脑, 去掉嗅脑、脑干和小脑, 将其余脑组织冠状等分为前、中、后 3 段; 取中段置于灌注液中固定 24 h (4°C), 常规石蜡包埋, 5 μ m 厚连续冠状切片; 一抗采用小鼠抗微管相关蛋白-2 (microtubule-associated protein-2, MAP-2) 单克隆抗体和兔抗生长相关蛋白-43 (growth associated protein-43, GAP-43) 抗体 (武汉博士德生物技术有限公司提供); 切片脱蜡后用卵白素生物复合物染色法 (avidin biotin complex staining, ABC) 染色。采用 MIAS 系列显微图像处理系统 (四川大学计算机系图像图形研究所提供) 测定各时相点皮质梗死灶周边阳性表达的灰度值, 灰度值与细胞反应强度呈反比, 每例标本测 3 张切片, 每张切片随机选取 5 个阳性视野, 取平均值为测定值。

六、统计学分析

用 SPSS 16.0 版统计软件进行分析, 结果以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示。不同时间点 FPT、BWT 评分比较采用重复测量的方差分析进行检验, 2 组间相应时间点数据的比较采用两样本 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、各组行为学测试结果

造模后, 电刺激组 Longa 评分为 (2.13 ± 0.80) 分, 模型组 Longa 评分为 (1.96 ± 0.81) 分, 另各有 6 只大鼠因 Longa 评分为 0 或 4 分而被淘汰, 2 组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。重复测量的方差分析结果显示, 造模后电刺激组和模型组运动功能逐渐改善 ($P < 0.01$), 且两组大鼠运动功能恢复程度不同, 电刺激组大鼠第 7、14 和 28 天的 FPT、BWT 评分优于模型组 ($P < 0.01$ 或 0.05), 见表 1。正常组与假手术组大鼠评分为 0 分, 提示手术过程不影响上述评分结果。

二、各组 MAP-2 及 GAP-43 检测结果

假手术组、正常组大鼠大脑皮质可见神经细胞胞浆和树突有 MAP-2 染色, 树突排列整齐, 分层清晰。而梗死灶周围皮质树突排列紊乱、扭曲, 缺血再灌注后

第 3 天染色减淡,中心坏死区染色消失。缺血再灌注后第 14、28 天可见电刺激组梗死灶周 MAP-2 染色加深,短小树突致密交织,树突和周围神经细胞胞浆染色加深,2 组灰度值比较,差异有统计学意义($P < 0.01$),见图 1 和表 2。

假手术组及正常组大鼠额顶叶脑皮质有少量散在 GAP-43 阳性细胞。缺血再灌注大鼠梗死灶周围 GAP-43 表达在第 3、7 和 14 天明显高于正常组($P < 0.01$);电刺激组 GAP-43 表达在第 3、7 和 14 天明显高于模型组($P < 0.01$)。见图 2 和表 2。

表 1 各组大鼠 FPT 及 BWT 评分比较(分, $\bar{x} \pm s$)

分 组	只数	FPT 评分	BWT 评分
电刺激组			
第 3 天	24	6.29 ± 1.94	4.38 ± 0.65
第 7 天	19	3.53 ± 0.96^a	3.05 ± 0.71^a
第 14 天	14	2.50 ± 0.94^a	2.07 ± 0.62^a
第 28 天	9	1.33 ± 0.87^b	1.33 ± 0.87^a
模型组			
第 3 天	24	5.96 ± 1.65	4.54 ± 0.59
第 7 天	19	4.68 ± 0.82	3.89 ± 0.74
第 14 天	14	3.40 ± 0.76	3.22 ± 0.70
第 28 天	9	2.44 ± 0.88	2.50 ± 0.53

注:与模型组相比,^a $P < 0.01$,^b $P < 0.05$

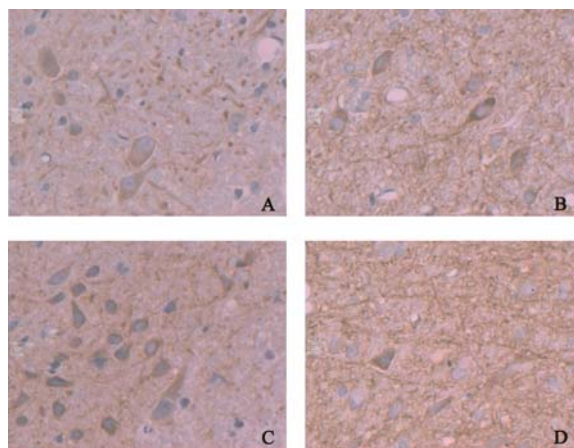
表 2 各组梗死灶周围皮质 MAP-2 及 GAP-43 免疫阳性灰度值比较($\bar{x} \pm s$)

分 组	只数	MAP-2 灰度值	GAP-43 灰度值
电刺激组			
第 3 天	5	145.20 ± 8.04	125.16 ± 8.33^{ab}
第 7 天	5	114.60 ± 8.90	98.28 ± 7.13^{ab}
第 14 天	5	98.43 ± 7.02^a	142.37 ± 6.34^{ab}
第 28 天	5	90.18 ± 7.75^a	165.15 ± 4.71
模型组			
第 3 天	5	150.21 ± 8.00	134.99 ± 8.53^b
第 7 天	5	120.28 ± 9.88	108.55 ± 8.47^b
第 14 天	5	108.91 ± 8.33	150.11 ± 6.78^b
第 28 天	5	97.80 ± 5.89	166.59 ± 6.49
假手术组	5	107.65 ± 3.18	170.69 ± 7.85
正常组	5	108.55 ± 5.02	168.41 ± 3.51

注:与模型组相比,^a $P < 0.01$;与正常组相比,^b $P < 0.01$

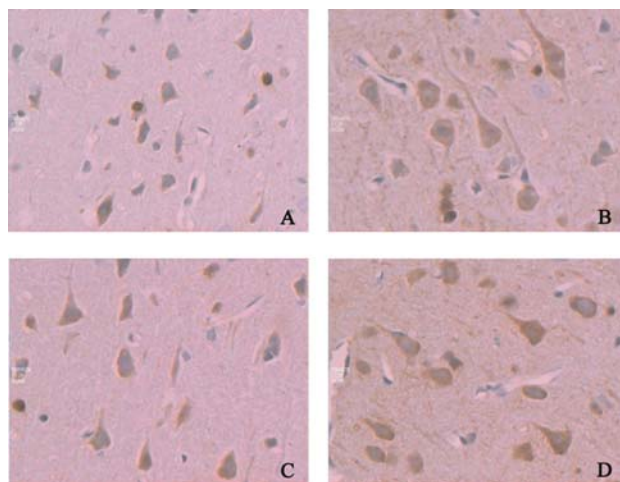
讨 论

MAP-2 主要在中枢神经系统神经元胞体和树突表达,既是神经元的标志蛋白,又是功能蛋白,参与神经元的生长和损伤后修复过程,是研究神经再塑的分子标志物^[7]。GAP-43 是一种特异性胞膜磷酸蛋白,能启动生长锥形成,促进单胺递质释放与维持长时程增强效应,在引导轴突生长和调节轴突形成新的联系上起关键作用,被认为是神经元发育和再生的内在决定性因子,也是研究神经元可塑性的分子标志物^[8]。本



注:A.缺血再灌注后第 14 天模型组;B.缺血再灌注后第 14 天电刺激组;C.缺血再灌注后第 28 天模型组;D.缺血再灌注后第 28 天电刺激组

图 1 缺血再灌注后不同时间点梗死灶周围 MAP-2 的表达(ABC 染色, $\times 400$)



注:A.缺血再灌注后第 3 天模型组;B.缺血再灌注后第 3 天电刺激组;C.缺血再灌注后第 7 天模型组;D.缺血再灌注后第 7 天电刺激组

图 2 缺血再灌注后不同时间点梗死灶周围 GAP-43 的表达(ABC 染色, $\times 400$)

实验中,电刺激组和模型组大鼠早期功能恢复的同时伴随着梗死灶周围 GAP-43 表达的增高;后期功能进一步恢复,MAP-2 表达也相应增加,提示 GAP-43 和 MAP-2 的表达增加是功能恢复的物质基础之一。因此我们推测,能促使这两种蛋白表达增强的措施,将有助于脑缺血后损伤功能的恢复。

由于脑梗死后大鼠运动障碍以肢体远端精细功能损害为主,肢体近端及躯干部损伤较轻,因此选择敏感的行为功能评分标准尤为重要。我们选择的 BWT 可直接反映大鼠运动协调性与整合能力;而 FPT 是一种大鼠前肢运动感觉测试指标,能直接反映动物短期感觉运动功能的微小变化,较其他传统的方法更敏感。本研究结果显示,BWT 和 FPT 评分结果随时间的变化趋势一致,电刺激组运动功能恢复优于模型组。

有研究报道,脑卒中患者接受经颅直流电刺激(transcranial direct current stimulation, tDCS)后,伴随着运动皮质兴奋性的增强,瘫痪肢体运动功能亦明显改善,因此认为 tDCS 是一项能增强皮质可塑性的技术^[9-10]。研究表明, tDCS 可以根据刺激方式的不同上调或下调皮质兴奋性,改变大脑半球的抑制和易化状态,促进两侧大脑半球活性的恢复,从而促进大脑可塑性变化^[11]。同时, tDCS 可以调节钠、钙通道的传导性和突触前、后神经递质水平,促进新突触的形成,从而影响脑的可塑性变化^[12]。宋新光 and 姚勇^[13]报道了直流脉冲式经颅电刺激用于皮质运动诱发电位检查的临床观察,目前已被广泛应用。徐军等^[14]观察到,69 例接受经颅电刺激联合周围神经电刺激的脑血管病后遗症患者在肢体功能恢复、肌张力改善、肢体疼痛缓解方面的疗效都明显优于单独周围神经电刺激和药物治疗,但具体机制不详。基础研究发现,大鼠损伤侧运动皮质区接受经颅电刺激后,瘫痪肢体运动功能改善较对照组明显,运动诱发电位波幅增宽、潜伏期缩短,能促进神经元和胶质细胞的可塑性变化^[15-16]。本实验也得到一致的结果,即电刺激组大鼠运动功能的恢复优于模型组,且 MAP-2 和 GAP-43 在梗死灶周围表达高于模型组,提示经颅电刺激可以促进脑缺血再灌注大鼠运动神经功能的恢复,其机制可能和上调梗死灶周围 MAP-2 和 GAP-43 的表达有关,即经颅电刺激可以促进损伤大脑神经可塑性的变化。

在经颅电刺激安全性方面, MacDonald^[17]基于超过 1 5000 例研究对象的临床比较研究显示,在外科手术监测中,经颅电刺激几乎不引起癫痫发作、心律失常和意识改变,不产生神经心理方面的负面影响,未发现头痛和内分泌失调。本课题组前期研究也发现,给予正常大鼠不同刺激电压(500 ~ 1500 V)及刺激次数(10 次/d 与 50 次/d)的经颅电刺激干预,连续 3 ~ 15 d,均未发现其行为学和病理形态学的变化^[18]。本实验考虑到实验动物有脑损伤基础,而目前临床经颅电刺激的常用参数是 500 ~ 1000 V,因此选择了较小的刺激电压。在实验中未发现动物经电刺激后出现昏迷、抽搐及行为失常,脑组织大体和光镜观察均未发现继发性出血,进一步证实了此刺激参数对大鼠应用的可行性。关于不同刺激参数下疗效和安全性的比较还有待下一步的实验深入探讨。另外,我们也发现,电刺激瞬间大鼠有类似疼痛的惊跳反应,考虑是电刺激头皮时导致局部疼痛,人体使用时可通过选择最佳刺激部位、改变刺激电极的大小和导电胶的性能来克服这一缺点。

参 考 文 献

- [1] Sparing R, Dafotakis M, Meister IG, et al. Enhancing language performance with non-invasive brain stimulation: a transcranial direct current stimulation study in healthy humans. *Neuropsychologia*, 2008, 46: 261-268.
- [2] Williams JA, Imamura M, Fregni F. Updates on the use of non-invasive brain stimulation in physical and rehabilitation medicine. *J Rehabil Med*, 2009, 41: 305-311.
- [3] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*, 1989, 20: 84-91.
- [4] 杨安峰, 王平. 大鼠的解剖和组织. 北京: 科学出版社, 1985: 159-170.
- [5] Deryck M, Reempts V, Duytschaever H. Neocortical localization of tactile, proprioceptive limb placing reactions in the rats. *Stroke*, 1992, 23: 44-60.
- [6] Sutton RL, Feeney DM. Alpha-noradrenergic agonists and antagonists affect recovery and maintenance of beam-walking ability after sensorimotor cortex ablation in the rat. *Rest Neurol Neurosci*, 1992, 4: 1-11.
- [7] Dehmelt L, Halpain S. The MAP-2/Tau family of microtubule-associated proteins. *Genome Biol*, 2005, 6: 204.
- [8] Emery DL, Raghupathi R, Saatman KE, et al. Bilateral growth-related protein expression suggests a transient increase in regenerative potential following brain trauma. *J Comp Neurol*, 2000, 424: 521-531.
- [9] Brown JA, Lutsep H, Cramer SC, et al. Motor cortex stimulation for enhancement of recovery after stroke: case report. *Neurol Res*, 2003, 25: 815-818.
- [10] Hummel F, Celnik P, Giraux P, et al. Effects of non-invasive cortical stimulation on skilled motor function in chronic stroke. *Brain*, 2005, 128: 490-499.
- [11] Fregni F, Pascual-Leone A. Technology insight: non-invasive brain stimulation in neurology-perspectives on the therapeutic potential of rTMS and tDCS. *Nat Clin Pract Neurol*, 2007, 3: 383-393.
- [12] Bolognini N, Pascual-Leone A, Fregni F. Using non-invasive brain stimulation to augment motor training-induced plasticity. *J Neuroeng Rehabil*, 2009, 6: 8.
- [13] 宋新光, 姚勇. 无痛性经颅大脑皮层电刺激的运动诱发电位及其临床应用. *现代电生理学杂志*, 2008, 15: 96-99.
- [14] 徐军, 李捷胡, 安居, 等. 经皮大脑皮层电刺激治疗脑血管病后遗症. *中国康复医学杂志*, 1999, 14: 169-171.
- [15] 刘芳, 张璐, 吕如锋, 等. 经颅电刺激对脑梗死大鼠的运动功能及神经微丝表达的影响. *中华物理医学与康复杂志*, 2004, 26: 449-551.
- [16] 张璐, 方宇, 刘芳, 等. 经颅电刺激对大鼠脑梗死后运动功能恢复的影响. *临床神经电生理学杂志*, 2003, 12: 216-200.
- [17] MacDonald DB. Safety of intraoperative transcranial electrical stimulation motor evoked potential monitoring. *J Clin Neurophysiol*, 2002, 19: 416-429.
- [18] 段广军, 刘芳, 张文渊. 经颅电刺激安全性的动物试验研究. *临床神经电生理学杂志*, 2005, 14: 153-155.

(修回日期: 2011-03-02)

(本文编辑: 吴 倩)