

· 基础研究 ·

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

刘芳 张璐 吕如锋 张文渊 董佑忠

【摘要】目的 研究经颅电刺激治疗对大鼠脑梗死后运动功能、神经微丝蛋白(NFP-200)表达及脑可塑性物质基础的影响机制。**方法** SD 成年雄性大鼠大脑中动脉闭塞(MCAO)后,经颅电刺激大鼠双眼脑间到人字缝处相应的双侧感觉运动区,以横木行走试验(BWT)评价大鼠的精细运动功能恢复情况,免疫组化法观察各时段缺血性半影区神经元轴突变化及 NFP-200 的表达。**结果** 经颅电刺激治疗的大鼠,运动功能的恢复较对照组明显改善($P < 0.01$)。治疗组第 1 个疗程末缺血性半影区 NFP-200 阳性神经轴突的形态学变化及表达与对照组相似($P > 0.05$),从 2~6 个疗程缺血性半影区阳性纤维的表达均较对照组高($P < 0.05$)。**结论** 经颅电刺激可以改善急性脑梗死大鼠瘫痪肢体运动功能,可能与以下机制有关:经颅电刺激直接兴奋大脑皮质的运动中枢,形成神经冲动,引起相应大脑皮质神经元发生可塑性变化,促进中枢神经轴突发芽及形成新的神经联系,从而使兴奋从大脑皮质传导到骨骼肌乃至整个运动系统。

【关键词】 脑梗死; 经颅电刺激; 运动技能; NFP-200 的表达

Effect of transcranial electric stimulation on motor function and neurofibrillar expression in rat with brain infarction LIU Fang*, ZHANG Lu, LÜ Ru-feng, ZHANG Wen-yuan, DONG You-zhong. * Department of Neurology, The First Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guizhou 550004, China

【Abstract】 Objective To study the effect of transcranial electric stimulation (TES) on motor function and neurofibrillar (NF200) expression in rat with brain infarction and to explore mechanism of brain plasticity. **Methods** The infarction model was established by middle cerebral artery occlusion (MCAO) in adult Sprague-Dawley male rats. Transcranial electric stimulation of sensory-motor areas of both sides was applied, and the recovery of fine motor function of rat was reflected with beam walking test and the change of neurofilament protein (NFP-200) expression examined. **Results** The recovery of motor function of the rats treated with TES was significantly better than the controls ($P < 0.01$). At the end of the first week, NFP-200 expression was similar in rats of the TES and the control groups. From the 2nd to 6th week of TES treatment, the expression of NFP-200 in the ischemic penumbra was higher than that of the control group ($P < 0.05$). **Conclusion** TES can improve the motor function of the paralyzed limbs, probably due to direct effects of TES on the plasticity of the motor center of cerebral cortex.

【Key words】 Cerebral infarction; Transcranial electric stimulation; Motor function; NFP-200 expression

经颅电刺激作为运动功能检查手段和作为判断运动功能恢复的早期指标已得到临床认可并被运用^[1,2],本科在应用经颅电刺激运动诱发电位(MEP)检测脑梗死偏瘫患者运动功能时意外发现,被刺激的瘫痪肢体出现一过性好转^[3]。为探索 MEP 对脑卒中后瘫痪肢体的康复作用,在了解经颅电刺激对动物模型应用的安全性后^[4,5],我们采用神经电生理学、组织学、免疫组织化学方法探讨经颅电刺激对实验大鼠脑梗死后运动功能恢复的作用。

材料和方法

一、大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlu-

sion, MCAO)模型制备及运动功能评分

选用纯种健康雄性 SD 大鼠 150 只(贵阳医学院动物实验中心提供),3~4 月龄,体重 250~350 g。采用改良 Zea Longa 方法^[6]复制 MCAO 模型。150 只大鼠随机分为 4 组,即对照组和治疗组各 60 只,假手术组 24 只,正常组 6 只。治疗组及对照组按缺血时间又分 1,2,3,4,5,6 周组,每组 10 只,治疗组脑梗死后行经颅电刺激;对照组脑梗死后不做经颅电刺激治疗,作为实验对照。在每周末分别观察 2 组 BWT,同时每组处死 10 只大鼠以进行 NFP-200 测定。假手术组按缺血时间又分 1,2,3,4,5,6 周组,每组 4 只,假手术组行经颅电刺激,每周末处死 4 只行 NFP-200 测定作为实验安全对照。根据 Feeney 等^[7]的走横木实验(beam walking test, BWT)方法评价大鼠的精细运动功能恢复情况。BWT 评分等级为 1~7 分。7 分:能顺利爬行

作者单位:550004 贵阳,贵阳医学院附属医院神经内科(刘芳、吕如锋、张文渊、董佑忠);河南省人民医院神经内科(张璐)

平衡木,瘫痪肢体完全起作用,无明显神经体征;6分:能爬过平衡木,瘫痪肢体起作用大于50%;5分:能爬过平衡木,瘫痪肢体起作用小于50%;4分:不能顺利爬过平衡木,跌倒几率小于50%;3分:不能顺利爬过平衡木,跌倒几率大于50%;2分:在平衡木上不能行走,但可坐在上面;1分:完全不能爬过平衡木且无法将后肢放在水平位,放在平衡木上会掉下来。MCAO后每天测试1次并打分,结果由掌握该方法的2人分别评定,其中一人不知分组情况。

二、电刺激治疗

正常组:不做手术,作为测量神经微丝蛋白(neurofilament protein, NFP-200)的正常标准对照。

经颅电刺激采用CCS-1型大脑皮质电刺激仪,头皮刺激时,阳极置于大鼠头皮的双眼脑间到人字缝处相应的双侧感觉运动区,阴极置于正前方,用100 μ s脉宽、1 000 V电压的窄高压方波刺激。每天1次,6 d为1个疗程,停1 d后进行下1个疗程,1~6组分别治疗1~6个疗程。每个疗程末用BWT评分法评价大鼠运动功能的恢复情况。以上3组及正常组均自由活动、饮食,观察期间无动物死亡。

三、组织切片制备及免疫组化染色

经颅电刺激治疗第1,2,3,4,5和6周末,治疗组和对照组经BWT评分后随机取各组动物,在麻醉下开胸,用0.9%生理盐水200 ml经左心室快速冲洗之后,用4%多聚甲醛(0.1 mol/L PBS配制,pH7.4)400 ml灌注固定。迅速取脑,置入4%多聚甲醛内4℃固定过夜后,常规石蜡包埋,由前至后连续切片,厚度为5 μ m,前、后段每隔10片取2片,中段每隔5片取2片,进行NFP-200测定。

免疫组化染色(ABC法):NFP-200为单克隆抗鼠抗人神经蛋白抗体。NFP-200免疫组化染色试剂盒购自武汉博士德生物技术有限公司,按其提供的说明书操作步骤进行。空白对照组用0.1 M PBS代替一抗,其余步骤相同。

四、NFP-200 阳性纤维的测定

对NFP-200阳性纤维染色的切片,在缺血半影区,用光镜网格尺($\times 40$ 物镜下面积为0.0625 mm²)计数阳性纤维于网格尺的中横线及中垂线相交的点数(每一样本随机取6张切片,每张切片在缺血区域随机取5个视野,即上、中、下、左、右5个视野),不论染色程度,凡显色者均为阳性。

五、统计学分析

本实验的观察及测量均采用双盲法进行。用SPSS 8.0统计软件包对数据进行分析,所有计量资料用($\bar{x} \pm s$)表示,两样本均数比较用 t 检验。用2组及多组比较的方法分析治疗组、对照组差异,选择 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

结 果

一、BWT 运动功能评定

经颅电刺激治疗组和对照组6周末,瘫痪大鼠运动功能的BWT评分见表1。

二、NFP-200 神经元轴突形态学变化及阳性纤维表达

正常组及假手术组:NFP-200阳性纤维在大脑皮质分布均匀,排列规则,两组相比差异无显著性意义($P > 0.05$)。

对照组:脑缺血1周末,坏死边缘区NFP-200阳性纤维数较假手术组显著减少, $P < 0.05$,纤维排列紊乱、不规则。染色较假手术组明显变浅,纤维变短、变细。脑缺血2~6周后,梗死灶边缘区NFP-200阳性纤维数随缺血时间的延长而逐渐增加。阳性纤维染色加深,纤维变粗、扭曲。脑缺血后6周NFP-200阳性纤维数增加为(25.3 ± 1.2)条,但仍少于假手术组, $P < 0.05$ 。

治疗组:脑缺血1周,坏死边缘区NFP-200阳性纤维减少,排列不规则,染色较假手术组变浅,纤维变短、变细。2~6周后,梗死灶边缘区NFP-200阳性表达均较对照组高,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表2。

表1 6周末不同缺血时间组的各10只瘫痪大鼠运动功能的BWT评分(分, $\bar{x} \pm s$)

组别	术前评分	术后治疗前评分	1周($n_1=10$)	2周($n_2=10$)	3周($n_3=10$)	4周($n_4=10$)	5周($n_5=10$)	6周($n_6=10$)
治疗组	7	1	1.81 $\pm$ 0.25	3.68 $\pm$ 0.75 *	5.07 $\pm$ 0.74 **	5.54 $\pm$ 0.62 **	5.98 $\pm$ 0.25 **	6.74 $\pm$ 0.49 **
对照组	7	1	1.21 $\pm$ 0.30	2.72 $\pm$ 0.53	2.91 $\pm$ 0.42	2.98 $\pm$ 0.74	3.01 $\pm$ 0.75	3.55 $\pm$ 0.30

注:与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

表2 缺血半影区NFP-200阳性纤维数目(条, $\bar{x} \pm s$)

组别	1周($n_1=10$)	2周($n_2=10$)	3周($n_3=10$)	4周($n_4=10$)	5周($n_5=10$)	6周($n_6=10$)
治疗组	16.2 $\pm$ 1.3 *	22.3 $\pm$ 1.2 **	28.5 $\pm$ 1.3 **	28.7 $\pm$ 1.3 **	29.2 $\pm$ 2.1 **	35.5 $\pm$ 4.2 **
对照组	15.9 $\pm$ 1.2	18.7 $\pm$ 1.2	19.8 $\pm$ 1.3	20.1 $\pm$ 1.1	23.5 $\pm$ 1.2	25.3 $\pm$ 1.2

注:与对照组比较,* $P > 0.05$,** $P < 0.05$

至第 6 周末,阳性纤维数表达为 (35.5 ± 4.2) 条,与假手术组相比差异无显著性意义($P > 0.05$)。表现为阳性纤维染色加深,明显增粗和扭曲,其末端呈梭形,酷似生长锥,阳性纤维呈辐射状从梗死灶周围向中央延伸。

讨 论

近年发现经颅电(磁)刺激 MEP,不仅可以检测大脑运动皮质锥体束的兴奋性,而且重复经颅电刺激可以兴奋皮质,改善偏瘫患者肌力^[3,8],提示经颅电刺激有促进康复的作用。

本实验用 BWT 主要观察在 MCAO 后大鼠瘫痪肢体的运动及恢复情况,结果表明,右侧 MCAO 后,大鼠都出现左侧肢体运动功能障碍,表现为完全瘫痪,BWT 评分仅 1 分。术后 1 周治疗组和对照组运动功能开始恢复,对照组虽未经治疗,但 6 周末瘫痪肢体的运动功能也有一定的改善,这说明急性脑梗死后运动功能存在着自然恢复过程,即运动功能有可塑性。但两组比较,治疗组运动功能恢复明显好于对照组($P < 0.01$),提示经颅电刺激大脑皮质可以促进急性脑梗死后运动功能的恢复。其机制可能是:对大脑运动皮质进行电刺激可调节皮质的兴奋性,诱发出皮质运动区一定强度感应电流,使神经细胞去极化,运动皮质活性增强,还能刺激未受损的神经元发生出芽和形成新的突触联系,使中枢神经系统内剩余的神经环路发生实质性重组,建立新的连接^[9]。从而使皮质运动通路获得超常的运动输出,进而使兴奋更容易从大脑皮质传导到脊髓及整个运动系统^[10]。经颅电刺激还能增加脑内血流速度,改善脑组织缺血、缺氧^[11,12],促进脑卒中后运动功能的恢复。

神经元轴突的出芽和再生是神经元在损伤及缺血时发生可塑性变化的重要标志^[9,13]。我们的免疫组化观察结果显示,治疗组神经纤维轴突及一些相关蛋白的表达均较对照组发生了显著变化。我们采用单克隆 NFP-200 蛋白质作为神经轴突的标记物,NFP-200 是一种与神经元生长、发育过程有关的蛋白,主要存在于神经元轴突中。脑损伤后,再生神经组织中 NFP-200 含量较高,特别是在生长的神经元轴突中,因此 NFP-200 常被用于探查缺血性半影区神经元轴突的形态学变化及相关蛋白的表达,并由此证实神经元轴突的出芽及再生。本实验结果还显示,治疗组在第 1 周末缺血半

影区 NFP-200 阳性神经纤维的形态变化及表达数与对照组相似($P > 0.05$),从 2~6 周,缺血性半影区 NFP-200 阳性纤维的表达数均较对照组高($P < 0.05$),其变化在脑缺血 6 周最为显著,表现阳性纤维明显增粗、扭曲和染色加深,并从梗死灶周围区向中央区延伸。由此可见经颅电刺激治疗可通过增强梗死灶边缘缺血半影区神经微丝蛋白活性,从而促进急性脑梗死后运动功能的恢复,同时也说明脑梗死后运动功能恢复有确切的物质基础。

参 考 文 献

- Escudero JV, Sancho J, Bautista D, et al. Prognostic value of motor evoked potential obtained by transcranial magnetic brain stimulation in motor function recover in patients with acute ischemic stroke. *Stroke*, 1998, 29:1854-1859.
- Cruz-Martinez A, Munoz J, Palacios F. The muscle inhibitory period by transcranial magnetic stimulation. Study in stroke patients. *Electromyogr Clin Neurophysiol*, 1998, 38:189-192.
- 魏立平, 张文渊, 董佑忠. 脑卒中患者经颅电刺激运动诱发电位及体感运动诱发电位的临床研究. *临床神经电生理学杂志*, 2001, 10:76.
- 宋新光, 徐军, 段明霞, 等. 大脑皮质与脊髓经皮电刺激的临床研究. *中华物理医学与康复杂志*, 1991, 13:48-51.
- 潘映福. 临床诱发电位学. 北京:人民卫生出版社, 2000. 537-540.
- Zea Longa EL, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*, 1989, 20:84-91.
- Feeney DM, Gonzalez A, Law WA. Amphetamine, haloperidol and experience interact to affect rate of recovery after motor cortex injury. *Science*, 1982, 217:855.
- 徐军, 李捷, 胡安居. 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*, 1994, 4:169-171.
- Stroemer RP, Kent TA, Hulsebosch CE. Neocortical neural sprouting, synaptogenesis, and behavioral recovery after neocortical infarction in rats. *Stroke*, 1995, 26:2135.
- 方燕南, 张艳, 黄如训, 等. 电刺激治疗对脑梗死后运动功能及星形胶质细胞活性的影响. *中国神经精神疾病杂志*, 2000, 1:9-11.
- 王晓明, 谢建平, 黄慧, 等. 正常人重复经颅磁刺激后脑血流速度的变化. *临床神经电生理杂志*, 2003, 4:202-203.
- Post A, Muller MB, Engelmann M, et al. Repetitive transcranial magnetic stimulation in rats evidence for a neuroprotective effect in vitro and in vivo. *Eur J Neurosci*, 1999, 11:3247-3254.
- Schlaepfer WW. Neurofilament; structure, metabolism and implication in disease. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1987, 46:117.

(修回日期:2004-03-29)

(本文编辑:熊芝兰)