

· 基础研究 ·

重复经颅磁刺激治疗脑出血家兔的实验研究

王涛 郭铁成 朱晓临 张杨 张允健 孙圣刚 梅元武

【摘要】 目的 探讨重复经颅磁刺激(rTMS)对脑出血家兔的治疗作用及其相关机制。**方法** 家兔 36 只,随机分为 A、B、C 组。A 组(治疗组)和 B 组(模型组)采用家兔自体血注射制作脑出血模型,C 组(对照组)注射生理盐水。A 组家兔于造模后 12 h 开始实施 rTMS,每日 3 次;B 组和 C 组不进行 rTMS。各组家兔分别于模型制作后 12 h、24 h、48 h、72 h、1 周、2 周处死。采用 TUNEL 法和免疫组化技术,检测出血灶周围脑组织中细胞凋亡及 bcl-2、TNF- α 和 IL-6 的表达。**结果** 3 组均未见自发性出血。C 组未见凋亡细胞及 bcl-2 阳性表达;A 组和 B 组均有凋亡细胞和 bcl-2 表达水平增高,2 组相比,A 组的凋亡细胞较少,bcl-2 表达水平更高($P < 0.05$)。C 组无 TNF- α 和 IL-6 阳性细胞;A 组和 B 组均有 TNF- α 和 IL-6 表达,2 组相比,A 组的 TNF- α 表达水平较低,IL-6 表达较高(P 均 < 0.05)。**结论** rTMS 刺激可通过调控炎症因子表达、减轻炎症损伤以及上调 bcl-2 的表达、减少细胞凋亡,在脑出血中发挥治疗作用。

【关键词】 经颅磁刺激; 脑出血; 细胞凋亡; 细胞因子; 家兔

An experimental study of the effects of repetitive transcranial magnetic stimulation on cerebral hemorrhage in rabbits WANG Tao*, GUO Tie-cheng, ZHU Xiao-lin, ZHANG Yang, ZHANG Yun-jian, SUN Sheng-gang, MEI Yuan-wu. * Department of Neurology, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China

【Abstract】 Objective To observe the possible therapeutic effect of repetitive transcranial magnetic stimulation(rTMS) on cerebral hemorrhage in rabbits and explore the underlying mechanism. **Methods** Thirty-six rabbits were divided randomly into 3 groups, group A (receiving rTMS) and group B (no rTMS) were experimental groups, and group C was control group. The cerebral hemorrhage model was made by injection of self-body blood, and the control group was made by injection of saline. The rabbits in group A were treated with rTMS 3 times a day and those in the groups B and C without rTMS. Rabbits in all the 3 groups were sacrificed separately after 12, 24, 48, 72 hours and 1 and 2 weeks after the establishment of the model. TUNEL and immunohistochemistry methods were used to detect the apoptosis and the expressions of TNF- α , bcl-2 and IL-6 in the perihematomal brain tissues. **Results** No spontaneous intracerebral hemorrhage was observed in all of the 3 groups. Neither positive apoptotic cell and bcl-2 expression nor expressions of TNF- α and IL-6 was observed in group C. The apoptotic cells were found in both groups A and B, with less of the cells in group A than those in group B($P < 0.05$). The increased expressions of bcl-2, TNF- α and IL-6 were detected in both groups A and B. Compared to group B, the levels of bcl-2 and IL-6 were significantly higher in group A ($P < 0.05$), and in contrast, the expressions of TNF- α was reduced to a significant extent in group A after rTMS ($P < 0.05$). **Conclusion** rTMS could be beneficial for treating cerebral hemorrhage by regulating the expressions of the inflammatory cytokines such as TNF- α and IL-6, diminishing the inflammatory lesions, and reducing the apoptosis course by up-regulating the expression of bcl-2.

【Key words】 Repetitive transcranial magnetic stimulation(rTMS); Cerebral hemorrhage; Apoptosis; Cytokine; Rabbit

国内外的实验和临床研究显示,重复经颅磁刺激(repetitive transcranial magnetic stimulation, rTMS)能促进脑梗死患者的运动功能恢复。早期通常认为,脑栓塞患者因病灶常伴有出血性梗死而应慎用 rTMS,对脑出血患者则禁用 rTMS。但近年来的研究证实,在采用

常规临床参数和标准情况下,rTMS 不会引起神经组织损伤和出血,而且随着对磁刺激认识的不断深入,人们发现 rTMS 具有减轻脑水肿、保护缺血神经元的作用^[1-4]。

脑出血后脑血流减少是脑水肿和继发性脑损伤的重要原因之一,血肿周围出现的继发性缺血符合缺血性半暗带的特征^[5]。在脑出血和继发缺血性损伤中,细胞坏死与凋亡并存。在坏死相关的超早期炎症因子表达中,TNF- α 和 IL-6 起重要作用;而 bcl-2 则为重要

作者单位:430022 武汉,华中科技大学同济医学院附属协和医院神经内科(王涛、张杨、张允健、孙圣刚、梅元武);华中科技大学同济医学院附属同济医院康复医学科(郭铁成);河南省洛阳市东方医院神经内科(朱晓临)

的凋亡抑制基因。鉴于 rTMS 对脑缺血的保护作用,我们设想 rTMS 对脑出血也具有神经保护和治疗作用。为进一步探讨其可行性和作用机制,本实验观察了 rTMS 对脑出血后细胞凋亡、TNF- α 、IL-6、bcl-2 表达的影响,旨在为脑出血的 rTMS 治疗提供理论依据。

材料与方法

一、动物分组

成年健康雄性家兔 36 只,体重 2~3 kg,由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供。随机分为 A、B、C 组,其中 A 组为磁刺激治疗组(简称治疗组),B 组为脑出血模型组(简称模型组),C 组为对照组。

二、脑出血模型的制备

家兔用氯氨酮加异丙嗪肌肉注射进行麻醉(氯氨酮 50 mg 加异丙嗪 25 mg/kg 体重),中度麻醉后俯卧位固定于立体定位仪上,齿杆高于耳杆 3 mm。注射位点为右侧大脑额叶(前囟偏右 3 mm,偏后 4 mm,深度为 10 mm),用脱毛剂(8% 硫化钠溶液)头皮脱毛,0.5% 碘伏皮肤消毒,在颅骨前囟后 4 mm、中线右侧旁 3 mm 处钻一直径约为 1.5 mm 的圆孔,深达硬脑膜。自家兔一侧耳中动脉按 0.5 ml/kg 自身体重抽取动脉血,沿钻孔处缓慢(3 mm/min)进针 10 mm,缓慢均匀(0.2 ml/min)注射到右侧额叶,注射完毕后留针 5 min,然后以 2 mm/min 的速度退针,用补牙胶封颅骨孔,缝合头皮。肌注青霉素 40 万 U 以预防感染。对照组操作同上,注入生理盐水 2 ml。

三、rTMS 治疗

A 组家兔于手术后 12 h 开始实施 rTMS,将清醒实验家兔置于长方形器具中,头部暴露于一直径 8 cm 的圆形磁刺激线圈下(Maglite 磁刺激器, Dantec 公司),最大磁场强度为 1.9 T,刺激强度为阈上强度的 50%,频率为 2 Hz,每日 3 次。B、C 两组不进行 rTMS 治疗。

四、脑组织取材与切片

分别于模型制作后 12 h、24 h、48 h、72 h、1 周、2 周抽取各组动物,用氯氨酮加异丙嗪肌肉注射深度麻醉后仰卧位固定,开胸暴露心脏,用眼科剪剪开心尖,将灌注针经左心室插入升主动脉,剪开右心耳。先快速灌入 37℃ 的生理盐水 500 ml,冲洗过程大约 15 min,接着滴注 400 ml 4℃ 灌注固定液。灌注时先快速灌注 5 min,然后调慢速度于 1 h 内完成。开颅取脑,置于装有少量同样固定液的容器内。于 4℃ 冰箱内放置 1 h。然后取血肿注射部位的脑组织常规进行石蜡包埋固定切片。

五、IL-6、TNF- α 、bcl-2 检测

按 ABC 试剂盒说明书进行;将组织块在石蜡切片机上行 5 μ m 厚的连续冠状切片,每只家兔间隔取 2

张脑片行免疫组化染色,PBS 洗 3 次,每次 5 min;0.2% Triton X-100 室温下孵育 30 min,PBS 洗 3 次,每次 5 min;0.03% H₂O₂ 甲醛处理 30 min,PBS 洗 3 次,每次 5 min;1:50 牛血清白蛋白 37℃ 1 h;第一级抗兔抗 IL-6、TNF- α 抗体(1:50 美国 Santa Cruz 公司)、bcl-2 (1:100 美国 Santa Cruz 公司)4℃ 孵育 24 h,PBS 洗 3 次,每次 5 min;鼠抗兔 IgG 1:100 37℃ 1 h,PBS 洗 3 次,每次 5 min;0.05 DAB,0.01% H₂O₂ 的 0.05 mol/L Tris-HCL 缓冲液(pH 7.6)室温下显色;70%~100% 酒精梯度脱水,二甲苯透明后中性树胶封片。

六、细胞凋亡检测

采用 TUNEL 法,具体操作步骤按试剂盒说明书进行(试剂均为美国 Sigma 公司产品),TUNEL 阳性反应细胞核呈深棕色,计数每高倍镜下阳性细胞数。

七、图像分析

所有切片均采用同济千屏影像工程公司开发的 HPIAS-1000 高清晰度彩色病理图文分析系统对免疫组织切片进行图像分析,所有切片均采用同一放大倍数($\times 200$)、同一光照强度(4.0)分析。每张脑片选用 3 张相邻的切片。计数每张切片上阳性细胞数。所有数据均由分析系统自动计算。

八、统计学处理

应用统计软件 SAS 6.12 进行处理,多组均数间的比较采用方差分析,显著性水准为 $\alpha = 0.05$ 。

结 果

一、血肿周围脑组织的形态学变化

磁刺激后治疗组的血肿无扩大,肉眼和镜下未见血肿周围脑组织自发性出血。治疗 2 周后,A 组与 B 组的血肿范围无明显差异。

二、血肿周围脑组织细胞凋亡、bcl-2 蛋白的表达

B 组脑组织中可见凋亡细胞呈散在分布,24 h 后阳性细胞数明显增多,bcl-2 阳性表达水平也增高;C 组脑组织中未见凋亡细胞及少量 bcl-2 阳性表达;A 组脑组织中可见散在凋亡细胞及 bcl-2 阳性表达,其中凋亡细胞数少于 B 组,而 bcl-2 阳性细胞数则多于 B 组,差异有显著性意义($P < 0.05$)(表 1,表 2)。

三、IL-6 表达

C 组无 IL-6 免疫反应;术后 12 h B 组及 A 组血肿周围区域出现深棕黄色 IL-6 阳性细胞,B 组及 A 组 IL-6 免疫反应此时达高峰,24 h 这 2 组 IL-6 的阳性细胞数目减少,72 h B 组的阳性细胞数目较 24 h 显著减少($P < 0.05$),而 A 组 48 h 与 24 h 相比阳性细胞数目无显著减少($P > 0.05$);A 组在前 3 个时间点阳性细胞数目均多于 B 组($P < 0.05$);1 周后 B 组和 A 组均无阳性细胞出现(表 3)。

四、TNF- α 表达

C 组于各个时间点均无 TNF- α 阳性细胞出现; B 组 12 h 无 TNF- α 阳性细胞出现, 24 h 出现散在 TNF- α 阳性细胞, 72 h 达高峰, 之后下降, 2 周时无 TNF- α 阳

性细胞; B 组与 C 组相比差异有显著性意义 ($P < 0.05$); A 组自 24 h 开始直至 2 周, TNF- α 阳性细胞数目显著减少, 与 B 组相比差异均有显著性意义 ($P < 0.05$) (表 4)。

表 1 B 组、C 组与 A 组细胞凋亡数目 (个/mm², $\bar{x} \pm s$)

组别	n	12 h	24 h	48 h	72 h	1 周	2 周
C 组	6	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0
B 组	6	3.0 $\pm$ 0.1	12.3 $\pm$ 1.5 [#]	18.7 $\pm$ 10.6 [#]	49.1 $\pm$ 2.6 [#]	17.7 $\pm$ 9.3 [#]	9.6 $\pm$ 5.3 [#]
A 组	6	2.9 $\pm$ 0.1	8.3 $\pm$ 1.0 ^{#*}	11.3 $\pm$ 5.1 ^{#*}	27.9 $\pm$ 2.1 ^{#*}	9.3 $\pm$ 4.5 ^{#*}	3.9 $\pm$ 2.4 ^{#*}

注: 与 C 组比较, [#] $P < 0.05$; 与 B 组比较, ^{*} $P < 0.05$

表 2 rTMS 对脑出血后血肿周围组织 bcl-2 表达的影响 (个, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	bcl-2 阳性细胞数				
		12 h	24 h	48 h	72 h	1 周
C 组	6	4.8 $\pm$ 0.6	7.5 $\pm$ 0.8	6.3 $\pm$ 0.4	3.0 $\pm$ 0.3	1.0 $\pm$ 0.2
B 组	6	16.3 $\pm$ 1.8 [#]	36.7 $\pm$ 6.3 [#]	24.3 $\pm$ 2.8 [#]	19.0 $\pm$ 1.9 [#]	6.9 $\pm$ 2.3 [#]
A 组	6	18.9 $\pm$ 2.1 [#]	68.3 $\pm$ 6.1 ^{#*}	43.2 $\pm$ 6.9 ^{#*}	22.4 $\pm$ 2.1 [#]	11.0 $\pm$ 1.2 [#]

注: 与 C 组比较, [#] $P < 0.05$; 与 B 组比较, ^{*} $P < 0.05$

表 3 rTMS 对脑出血后血肿周围组织 IL-6 表达的影响 (个, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	IL-6 染色阳性细胞数				
		12 h	24 h	48 h	72 h	1 周
C 组	6	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0
B 组	6	71.8 $\pm$ 11.8 [#]	34.6 $\pm$ 8.5 [#]	19.65 $\pm$ 6.2 [#]	7.8 $\pm$ 3.4 [#]	0.0 $\pm$ 0.0
A 组	6	79.6 $\pm$ 6.3 ^{#*}	42.1 $\pm$ 7.5 ^{#*}	27.1 $\pm$ 4.3 ^{#*}	9.3 $\pm$ 2.3 [#]	0.0 $\pm$ 0.0

注: 与 C 组比较, [#] $P < 0.05$; 与 B 组比较, ^{*} $P < 0.05$

表 4 rTMS 对脑出血后血肿周围组织 TNF- α 表达的影响 (个, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	TNF- α 染色阳性细胞数				
		12 h	24 h	48 h	72 h	1 周
C 组	6	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0
B 组	6	0.0 $\pm$ 0.0	0.15 $\pm$ 0.06 [#]	0.24 $\pm$ 0.11 [#]	0.47 $\pm$ 0.06 [#]	0.32 $\pm$ 0.12 [#]
A 组	6	0.0 $\pm$ 0.0	0.06 $\pm$ 0.01 ^{#*}	0.13 $\pm$ 0.08 ^{#*}	0.34 $\pm$ 0.06 ^{#*}	0.22 $\pm$ 0.07 ^{#*}

注: 与 C 组比较, [#] $P < 0.05$; 与 B 组比较, ^{*} $P < 0.05$

讨 论

rTMS 的基本原理是将脉冲磁场作用于脑组织, 利用磁场脉冲诱发出一定强度的感应电流, 使神经细胞去极化, 从而产生兴奋。对皮质运动区的强化刺激 (长程重复磁刺激) 可兴奋运动传导通路, 促进突触生成、侧枝再生和皮层功能重组, 从而促进运动功能康复。近年来, 陆续有学者尝试将 rTMS 用于治疗抑郁症、睡眠障碍、帕金森病和缺血性脑血管病等疾病, 均取得了令人振奋的疗效^[1-4]。不过, rTMS 能否用于脑出血的治疗尚无相关研究。早前学者们从 rTMS 治疗机制的角度出发, 认为在脑出血中应持谨慎态度。其主要着眼点是 rTMS 的生物安全性问题, 即 rTMS 是否会引起癫痫发作和继发性脑出血等损害。有实验表明, 在应用临床常规上限的磁刺激脉冲数目及最大刺激强度的情况下, TMS 对大脑中动脉阻断 (middle cerebral artery occlusion, MCAO) 大鼠模型的神经功能缺失未产生明

显的影响。在病理上, TMS 既不增加 MCAO 大鼠脑梗死的范围, 也不引起脑梗死中心或边缘区以及非缺血区内的脑出血 (包括镜下出血)^[6]。本研究显示, 选择适当的参数时, rTMS 对实验性脑出血家兔较为安全, 未引起癫痫发作、自发性出血及其它形态学变化, 可以进一步探索其临床应用的可能性。

脑出血是常见而严重的脑血管病, 死亡率和致残率均高。观察发现, 脑出血后的低灌注状态所导致的继发性损伤是脑出血致残率高的主要原因。脑出血一旦发生, 其周围的低灌注便开始发生, 且不随出血的清除而逆转, 这正是目前亟待解决的问题。这种低灌注状态的发生与血肿直接造成的局部微循环机械压迫、来自血肿的血管活性物质以及相伴随的炎症过程有关^[5]。研究已证实, 有多种细胞因子参与此过程, 其中一些起损伤作用, 而另一些起保护作用。在超早期表达的炎症因子中, TNF- α 和 IL-6 分别起损伤与保护作用。有观察显示, 脑出血后 12 h TNF- α 的表达水平便

已升高,3 d 达高峰,7 d 时虽呈下降趋势,但仍高于 12 h 的水平,提示 TNF- α 表达水平随病情的控制而逐渐下降^[7]。IL-6 具有神经营养作用,观察显示其水平在脑出血的早期即可自发性升高,在对抗损伤性炎症因子的过程中起重要作用,对脑出血的预后意义重大^[8]。本实验结果显示,脑出血后模型组和治疗组的 TNF- α 表达水平均有增高,于 3 d 达高峰。rTMS 治疗后 TNF- α 表达水平较模型组降低,这种效应在整个治疗期间均存在;与此同时,模型组和治疗组的 IL-6 表达水平虽均有升高,但治疗组的 IL-6 表达水平较模型组有明显升高,这种效应在出血后 48 h 尤为明显。这一结果提示 rTMS 可以减轻脑出血后的炎症损伤,这种治疗效应的产生可能是通过调控炎症因子的表达来完成。

细胞凋亡是不同于细胞坏死的一种细胞死亡方式,其过程受一系列相关基因的调节和控制。有研究证实,脑出血后出血灶周围脑组织便开始出现凋亡细胞,主要分布在出血灶周围的神经细胞中,而且凋亡的变化在一定程度上反映了周围脑组织的损伤程度^[9]。我们的观察显示,在模型组和治疗组的出血灶周围均有神经细胞凋亡发生,而在对照组中则未见凋亡细胞。这一结果与以往的观察结果相同。经过 rTMS 治疗后,治疗组的凋亡细胞数较未接受治疗的模型组明显减少,说明 rTMS 能够延缓和减轻脑出血所导致的细胞凋亡。

Bcl-2 是重要的凋亡抑制基因,主要通过阻断细胞凋亡的早期环节而发挥作用。本研究发现,模型组和治疗组的脑出血灶周围脑组织中 bcl-2 的表达均有增加,而治疗组的增加幅度尤为突出,表明 bcl-2 自然参与了出血灶周围脑组织中细胞凋亡的调控,而 rTMS 则使 bcl-2 的表达明显上调,这可能是 rTMS 能够减少脑出血后细胞凋亡的重要原因。

尽管 rTMS 已被用于多种神经精神疾病的治疗,但迄今对这种治疗作用的生化机制所知甚少。有研究显示 rTMS 对即早基因有调节作用。Muller 等^[10]研究发现 rTMS 在在体和离体实验中都有神经保护作用。他们研究了长期 rTMS 刺激对大鼠脑梗死模型脑内脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BD-

NF)、胆囊收缩素(cholecystokinin, CCK)及神经肽酪氨酸(neuropeptidetyrosine, NPY) mRNA 表达的影响,发现 rTMS 刺激后海马 CA₃ 区、颗粒细胞层及顶叶和梨状区皮质 BDNF mRNA 表达显著增加,认为 rTMS 刺激后 BDNF 的变化可能是其神经保护作用的基础。我们的研究显示,长期的 rTMS 刺激不但可以调控炎症因子的表达、减轻炎症损伤;而且还能上调 bcl-2 的表达、减少脑出血后常见的细胞凋亡。但这种刺激的信号转导过程仍不清楚。因此,有关 rTMS 脑出血治疗作用的确切机制,尚需进行进一步的实验研究。

参 考 文 献

- 1 Trompetto C, Assini A, Buccolieri A, et al. Motor recovery following stroke: a transcranial magnetic stimulation study. Clin Neurophysiol, 2000, 111: 1860-1867.
- 2 Liepert J, Graef S, Uhde I, et al. Training-induced changes of motor cortex representations in stroke patients. Acta Neurol Scand, 2000, 101: 321-326.
- 3 Chen R, Classen J, Gerloff C, et al. Depression of motor cortex excitability by low-frequency transcranial magnetic stimulation. Neurology, 1997, 48: 1398-1403.
- 4 Glassman SD, Zhang YP, Shields CB, et al. An evaluation of motor-evoked potentials for detection of neurologic injury with correction of an experimental scoliosis. Spine, 1995, 20: 1765-1775.
- 5 刘春风, 汤继宏, 包仕尧. 大鼠脑出血后脑血流和脑水份含量变化的研究. 中风与神经疾病杂志, 1997, 14: 261-263.
- 6 孙毅, 许桂芬. 脉冲磁刺激对大鼠脑缺血结构与功能的影响. 脑与神经疾病杂志, 1998, 6: 197-199.
- 7 张化彪, 黎杏群, 张铭湘. 脑出血大鼠脑内 bFGF 和 TNF 蛋白的表达. 中国神经精神疾病杂志, 2002, 28: 307-308.
- 8 Dziedzic T, Bartus S, Klimkowicz A, et al. Intracerebral hemorrhage triggers interleukin-6 and interleukin-10 release in blood. Stroke, 2002, 33: 2334-2335.
- 9 Matsushita K, Meng W, Wang X, et al. Evidence for apoptosis after intracerebral hemorrhage in rat striatum. J Cereb Blood Flow Metab, 2000, 20: 396.
- 10 Muller MB, Toschi N, Kresse AE, et al. Long-term repetitive transcranial magnetic stimulation increases the expression of brain-derived neurotrophic factor and cholecystokinin mRNA, but not neuropeptide tyrosine mRNA in specific areas of rat brain. Neuropsychopharmacology, 2000, 23: 205-215.

(收稿日期:2003-04-30)

(本文编辑:郭正成)

· 学会信息 ·

中华医学会物理医学与康复学分会关于增补全国委员的通知

经中华医学会物理医学与康复学分会第六届委员会第三次常委工作会议讨论通过,并经中华医学会组织管理部审查批准,增补雷明全(西藏)和李豫(河南)为中华医学会物理医学与康复学分会第六届委员会委员。

中华医学会物理医学与康复学分会
二〇〇三年五月三十日