

功能性电刺激治疗对急性脑梗死大鼠运动功能和缺血半影区微管相关蛋白-2 表达的影响*

金冬梅¹ 庄志强¹ 燕铁斌^{1,2} 向云¹ 彭源¹ 郑修元¹

摘要 目的:观察功能性电刺激(FES)治疗对急性脑梗死大鼠运动功能和缺血半影区微管相关蛋白-2(MAP-2)表达的影响。方法:制作急性大脑中动脉栓塞模型大鼠。随机分为假手术组、FES 安慰治疗组和 FES 治疗组共三组,每组又分为治疗 0d、3d、7d、14d 四个亚组,每亚组共 6 只,术后 3 天开始 FES 治疗。FES 治疗引起瘫痪侧腕伸指动作,每天 1 次,每次 10min。在治疗前和治疗后的各个时间点采用网屏试验评定运动功能,评定后取材,应用免疫组化技术观察半影区 MAP-2 变化。结果:治疗 7d 和 14d 后,FES 治疗组的运动功能较安慰治疗组明显改善($P<0.05$)、MAP-2 阳性细胞数和光密度值明显增加($P<0.01$)。结论:FES 治疗可以改善急性脑梗死大鼠的运动功能,并增强脑梗死周围缺血半影区 MAP-2 的蛋白表达,增强脑的可塑性。

关键词 功能性电刺激;脑梗死;运动功能;微管相关蛋白

中图分类号:R743.3 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2009)-06-0505-04

Effects of functional electrical stimulation on motor function and protein expression of microtubule-associated protein 2 in the penumbra field of the rats with acute cerebral infarction/JIN Dongmei, ZHUANG Zhiqiang, YAN Tiebin, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2009, 24(6):505—508

Abstract Objective: To observe the effects of functional electrical stimulation (FES) on motor function and the expression of microtubule-associated protein 2 (MAP-2) in the penumbra field of the rats with acute cerebral infarction. **Method:** Acute cerebral infarction was made by means of middle cerebral artery occlusion. Rats were randomly divided into sham-operated, FES placebo-treatment and FES treatment groups. Each group was divided into 0-day, 3-day, 7-day and 14-day subgroups and 6 rats for each subgroup. FES treatment to induce wrist and fingers extension was carried out 3 days after operation and was performed once daily, 10 minutes each time. The motor function and protein expression of MAP-2 were observed before treatment and at each treatment points. **Result:** After treatment for 7 days and 14 days, the motor function of FES treatment group was significantly improved, comparing with that of FES sham-treatment group ($P<0.05$), and the MAP-2 labeled cells and expression were also significantly enhanced comparing with that of the FES sham-treatment group ($P<0.01$). **Conclusion:** FES treatment can improve motor function and enhance the expression of MAP-2 in the penumbra field of the rats with acute cerebral infarction.

Author's address Department of Rehabilitation Medicine, the Second Affiliated Hospital, Sun-Yat Sen University, Guangzhou, 510120

Key words functional electrical stimulation; cerebral infarction; motor function; microtubule-associated protein

功能性电刺激(functional electrical stimulation, FES)是利用一定强度的低频脉冲电流,通过预先设定的刺激程序来刺激 1 组或多组肌肉,诱发肌肉运动或模拟正常的自主运动,以达到改善或恢复被刺激肌肉或肌群功能的目的^[1]。FES 从 20 世纪 60 年代开始用于治疗脑卒中慢性期患者^[2-3],近年来开始应用于急性期,据报道可以改善脑卒中患者的运动功能^[4-5]。我们在临床工作中也发现 FES 治疗可促进脑卒中急性期患者运动功能的恢复^[1,5-6],但有关 FES 促进功能恢复机制的相关报道很少。因此本研究观察 FES 治疗对急性脑梗死大鼠运动功能的影响,并观察 FES 治疗后梗死灶周围脑区即缺血半影

区微管相关蛋白-2 (MAP-2) 表达的变化,以探讨 FES 改善急性脑梗死运动功能的分子机制。

1 材料与方法

1.1 动物及分组

成年雄性 SD 大鼠,体重 $250\pm 10\text{g}$,由中山大学

* 基金项目:国家自然科学基金项目(30772304);广东省自然科学基金项目(8451008901000885)

1 中山大学附属第二医院康复医学科,广州,510120

2 通讯作者

作者简介:金冬梅,女,主治医师,在读博士

收稿日期:2009-03-06

实验动物中心提供。分为假手术组、FES 安慰治疗组和 FES 治疗组,术后 3d 开始 FES 治疗,每组又分为治疗 0d、3d、7d、14d 四个亚组,每亚组 6 只。

1.2 动物模型制作

1.2.1 MCAO 模型制作:采用 Longa 线栓法^[7]制作大脑中动脉栓塞 (MCAO) 模型。10%的水合氯醛按 350mg/kg 剂量腹腔注射麻醉大鼠,将麻醉后大鼠仰卧位固定于手术台上,在颈部中央切口,分离左侧颈总动脉、颈外动脉及颈内动脉,将鱼线(直径 0.22mm,长 20mm)从颈总动脉经颈内动脉送入并完全阻塞大脑中动脉,然后结扎颈总动脉并缝合皮肤。假手术组不在动脉内插鱼线,其余步骤与其他两组相同。

1.2.2 皮下电极埋置:参考 Leung 等^[8]的方法。MCAO 造模步骤结束后,在大鼠偏瘫侧即右侧上肢前臂的伸侧做约长 2cm 的纵向切口,用 FES 两个电极刺激大鼠偏瘫侧上肢前臂伸肌肌群,电流 3mA,以能产生充分的伸腕和伸指动作为标准来确定导线的固定位置,然后将两根特制导线(美国 Chris Weir 公司生产 AS633 型号导线)缝扎固定于伸肌的筋膜膜上,其中一根固定于肌群的近端,另一根固定于远端,并将两根导线通过皮下组织从大鼠的头顶两耳之间穿出并固定于颅顶,以便进行 FES 治疗时连接 FES 治疗仪的电极。3 组均进行皮下电极埋置。

1.2.3 动物造模成功后的入组标准:术后 3d 进行改良 Bederson 评分^[9]:0 分:无神经功能缺失症状;1 分:不能完全伸展右侧前爪;2 分:向左侧转圈;3 分:向左侧倾倒;4 分:不能自发行走,甚至意识丧失。评分为 2 分和 3 分的入组本实验。

1.3 FES 治疗

采用英国 Verity Medical 公司生产的 FES 治疗仪(型号 Neuro Trac™ Continence)。将 FES 治疗仪的两个电极与大鼠颅顶的两根导线连接进行治疗,使大鼠偏瘫上肢产生伸腕和伸指动作。

FES 刺激模式及参数:波形为双向方波,频率 30Hz,脉宽 0.25ms,波升:波降=1s:1s,电流强度 3—4mA。术后 3d 开始治疗,每天 1 次,每次 10min, FES 治疗 3d、7d、14d 组分别治疗 3d、7d 和 14d。FES 安慰治疗组连接电极,但不给予电流刺激,假手术组不给予任何处理。

1.4 观察指标

1.4.1 运动功能评定:采用网屏试验评定运动功能,由两名实验人员盲法评定,取其得分的平均值进行分析。网屏的网带为 50cm×40cm,网眼为 1cm×1cm,网屏距地面高度为 80cm,下方铺 12cm 厚的海绵;

网屏水平放置,将大鼠放在上面,然后在 2s 内将网屏变成垂直位。评分标准:0 分:前爪握住网屏达 5s 以上不会掉下来;1 分:暂时握住网屏,滑落一段距离但没掉下来;2 分:在 5s 内掉下来;3 分:网屏转动时大鼠即刻掉下来。网屏实验共评定 4 次,在造模成功后 3 天即开始治疗前、FES 治疗 3d 后、7d 后、14d 后各评定一次。

1.4.2 免疫组织化学检测:在相应时间点上先从小鼠左心室灌注 37℃生理盐水 150ml,再灌注 4%多聚甲醛 150ml,断头取脑,置于 4%多聚甲醛液中固定 24h 后,常规石蜡包埋,在视交叉水平 5μm 冠状连续切片,隔 5 取 1。切片脱蜡、微波炉热修复、血清封闭,加一抗(1:1000,鼠抗 MAP-2 单克隆抗体,ABCAM 公司),4℃孵育过夜,然后依次加生物素化二抗(山羊抗鼠 IgG)、试剂 SP,最后 DAB 显色、苏木素复染、脱水、透明、封片、镜检照像。光学显微镜观察,采用 MPIAS-1000 型多媒体图像分析系统进行 MAP-2 阳性细胞计数和光密度分析,每张切片选 6 个视野,取平均值分析。

1.5 统计学分析

应用 SPSS 13.0 统计软件进行统计分析。3 组间以及各组的不同时间点之间的比较均采用方差分析, $P<0.05$ 表示差异有显著性意义。

2 结果

2.1 运动功能评定

各组大鼠在不同时间点的网屏试验评分组内比较显示:假手术组各个时间点之间的评分差异无显著性意义;FES 安慰治疗组在 14d 后运动功能改善明显,评分较之前的时间点差异有显著性意义($P<0.05$);FES 治疗组在治疗 7d 和治疗 14d 后运动功能均有改善,与各个时间点的评分差异均有显著性意义($P<0.05$)。

不同时间点的各组之间评分结果比较显示, FES 治疗组和 FES 安慰治疗组的运动功能均差于假手术组($P<0.05$);治疗前和治疗 3d 后, FES 治疗组和 FES 安慰治疗组之间差异无显著性,治疗 7d 和治疗 14d 后, FES 治疗组较 FES 安慰治疗组运动功能改善明显,差异有显著性意义($P<0.05$)。见表 1。

2.2 免疫组织化学检测

对于脑梗死缺血半影区 MAP-2 阳性细胞数,各组大鼠在不同时间点的组内比较显示:假手术组各个时间点之间差异无显著性意义;FES 安慰治疗组在 7d 和 14d 后脑缺血半影区 MAP-2 阳性细胞数有明显增加,与其他时间点相比差异有显著性意义($P<$

表 1 各组大鼠不同时间点网屏试验评分 ($\bar{x} \pm s$)

组别	治疗前	治疗第 3 天	治疗第 7 天	治疗第 14 天
假手术组	0.17±0.41	0.33±0.52	0.17±0.41	0.00±0.00
FES 安慰治疗组	2.67±0.52 ^②	2.5±0.55 ^②	2.00±0.63 ^②	1.17±0.75 ^{①②}
FES 治疗组	2.67±0.52 ^②	2.33±0.52 ^②	1.33±0.52 ^{①②③}	0.33±0.52 ^{①②③}

①各组组内比较 $P < 0.05$; ②与假手术组比较 $P < 0.05$; ③与 FES 安慰治疗组比较 $P < 0.05$

0.01); FES 治疗组在治疗 7d 和治疗 14d 后 MAP-2 阳性细胞数也有明显增加, 与各个时间点之间差异有显著性意义 ($P < 0.01$)。在不同时间点的各组之间结果比较: FES 治疗组和 FES 安慰治疗组的 MAP-2 阳性细胞数均少于假手术组 ($P < 0.01$); 治疗前和治疗 3d 后, FES 治疗组和 FES 安慰治疗组之间差异无显著性意义; 治疗 7d 和治疗 14d 后, FES 治疗组较 FES 安慰治疗组 MAP-2 阳性细胞数明显增加, 差异有显著性意义 ($P < 0.01$)。

表 2 各组大鼠不同时间点脑梗死缺血半影区 MAP-2 阳性细胞数和光密度值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	治疗前	治疗第 3 天	治疗第 7 天	治疗第 14 天
阳性细胞数				
假手术组	56.50±2.88	55.83±3.43	57.33±3.60	58.00±3.74
FES 安慰治疗组	17.67±2.16 ^②	18.00±2.28 ^②	25.83±2.32 ^{①②}	32.50±1.87 ^{①②}
FES 治疗组	18.33±2.16 ^②	20.33±1.86 ^②	30.17±1.47 ^{①②③}	39.50±1.87 ^{①②③}
光密度值				
假手术组	0.5080±0.0086	0.4948±0.0123	0.5032±0.0133	0.5048±0.0158
FES 安慰治疗组	0.3335±0.0102 ^②	0.3485±0.0080 ^②	0.3906±0.0064 ^{①②}	0.4760±0.0048 ^{①②}
FES 治疗组	0.3309±0.0097 ^②	0.3458±0.0099 ^②	0.4621±0.0074 ^{①②③}	0.5324±0.0082 ^{①②③}

①各组组内比较 $P < 0.01$; ②与假手术组比较 $P < 0.01$; ③与 FES 安慰治疗组比较 $P < 0.01$

3 讨论

脑卒中后会遗留多种功能障碍, 其中以运动功能障碍最为多见, 极大地影响了患者的日常生活活动能力和生存质量, 给家庭和社会带来了沉重的负担, 因此脑卒中的治疗一直是临床与基础研究的热点^[10-13]。

FES 属于神经肌肉电刺激的范畴, 近年来其应用于脑卒中后瘫痪肢体的研究越来越多, 据报道 FES 可以改善急性慢性脑卒中患者的上肢各关节的活动度和运动功能^[4,14], 改善下肢的运动功能和步行能力等^[5-6]。FES 进行治疗时要求所治疗肢体在解剖上具有完整的神经传导通路, 即是由于中枢神经系统 (脑和脊髓) 损伤引起的肌肉功能障碍, 而对于不具有完整的神经传导通路的周围神经损伤所引起的肌肉无力, FES 难以发挥作用^[15-16]。有学者认为, FES 治疗可以通过对瘫痪肢体感觉和运动的输入, 利用中枢神经的可塑性, 促进大脑功能的重组, 从而促进脑卒中患者的功能恢复^[17-18]。本研究结果发现, FES 安慰治疗组在治疗 14d 后, 其运动功能较前有明显改善, 而 FES 治疗组在治疗 7d 和 14d 时, 均较治疗前有明显改善, 尤其治疗 14d 后改善最为显著, 说明 FES 治疗可促进运动功能恢复, 同时说明随治疗时

对于脑梗死缺血半影区 MAP-2 光密度值, 各组大鼠在不同时间点的组内比较: 假手术组各个时间点之间差异无显著性意义; FES 安慰治疗组在 7d 和 14d 后有明显增加, 与其它时间点相比有显著性差异 ($P < 0.01$); FES 治疗组在治疗 7d 和治疗 14d 后同样也有明显增加, 与各个时间点之间有显著性差异 ($P < 0.01$)。在不同时间点的各组之间结果比较: 治疗 14d 后, FES 治疗组的光密度值高于假手术组 ($P < 0.01$), 除此之外, FES 治疗组和 FES 安慰治疗组的光密度值均低于假手术组 ($P < 0.01$); 治疗前和治疗 3d 后, FES 治疗组和 FES 安慰治疗组之间差异无显著性意义, 治疗 7d 和治疗 14d 后, FES 治疗组较 FES 安慰治疗组光密度值明显增加, 差异有显著性意义 ($P < 0.01$)。见表 2 和图 1 (见彩色插页)。

间延长, 对运动功能的改善越来越好。而 FES 治疗组在治疗 7d 和 14d 后, 其运动功能较 FES 安慰治疗组明显改善, 表明 FES 治疗可以促进急性脑梗死大鼠偏瘫肢体的运动功能恢复, 这与临床所报道 FES 可以改善脑梗死患者的运动功能是一致的。但 FES 是促进脑可塑性的分子机制是什么? 脑内与可塑性相关的因子是怎样变化的? 有关此方面的研究报道甚少。

MAP-2 是一种热稳定的磷蛋白, 属于结构性微管相关蛋白家族, 是最重要的神经细胞骨架蛋白之一, MAP-2 在大鼠神经元中表达丰富, 它在核周质中合成后转运到树突, 因此主要存在于神经细胞的树突和胞体中^[19-21]。作为细胞骨架成分, MAP-2 既是一种结构蛋白, 又是一种活跃的功能性蛋白, 对兴奋性氨基酸、生长因子等反应敏感, 是细胞内信号传递的重要环节, 对神经元的发育、分化, 对细胞结构的维持, 神经元突起的生长及线粒体的轴突转运具有重要意义, 既参与神经元的生长过程, 也参与了损伤后的修复过程^[20-23]。MAP-2 对脑缺血敏感, 常作为缺血诱导神经元损伤的早期标志物^[24], 脑梗死后缺血中心区受损神经元 MAP-2 表达丧失, 而相对完整的神经元和缺血半影区 MAP-2 表达选择性升高, 与

缺血后的神经元恢复相对应^[20]。本研究对脑梗死周围缺血半影区 MAP-2 表达的观察发现,在 FES 治疗 7d 和治疗 14d 后,FES 安慰治疗组和 FES 治疗组 MAP-2 阳性细胞数和光密度值较前均明显增加,表明随时间延长,脑的可塑性逐渐增强,也从机制上解释了运动功能随时间延长而逐渐改善的现象。而在治疗 7d 和 14d 后,FES 治疗组 MAP-2 阳性细胞数和光密度值较安慰治疗组均有明显增加,尤其在治疗 14d 后,FES 治疗组 MAP-2 的光密度值高于假手术组,说明 FES 治疗可以增强脑缺血半影区的 MAP-2 表达,从而促进微管的稳定性,促进神经元的发育、分化及树突的重建等,并最终促进运动功能的恢复。

4 结论

功能性电刺激治疗可以改善急性脑梗死大鼠的运动功能,并增强脑梗死周围缺血半影区微管相关蛋白-2 的表达,增强脑的可塑性。

参考文献

- [1] 游国清,燕铁斌, Hui-Chan CW. 功能性电刺激改善脑卒中早期患者偏瘫下肢功能的随机对照研究 [J]. 中国康复医学杂志, 2007, 22(10): 867—870.
- [2] Liberson WT, Holmquest HJ, Dow M. Functional electrotherapy: stimulation of the peroneal nerve synchronized with the swing phase of the gait of hemiplegic patients [J]. Arch Phys Med Rehabil, 1961, 42(2): 101—105.
- [3] Hara Y, Ogawa S, Muraoka Y. Hybrid power-assisted functional electrical stimulation to improve hemiparetic upper-extremity function[J]. Am J Phys Med Rehabil, 2006, 85(12): 977—985.
- [4] Alon G, Levitt AF, McCarthy PA, et al. Functional electrical stimulation enhancement of upper extremity functional recovery during stroke rehabilitation: a pilot study[J]. Neurorehabil Neural Repair, 2007, 21(3): 207—215.
- [5] Yan T, Hui-Chan CWY, Li LSW. Functional electrical stimulation improves motor recovery of the lower extremity and walking ability of subjects with first acute stroke: a randomized, placebo-controlled trial[J]. Stroke, 2005, 36(1): 30—85.
- [6] 燕铁斌,许云影,李常威. 功能性电刺激改善急性脑卒中患者肢体功能的随机对照研究 [J]. 中华医学杂志, 2006, 37: 2627—2631.
- [7] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. Stroke, 1989, 20(1): 84—91.
- [8] Leung LY, Tong KY, Zhang SM, et al. Neurochemical effects of exercise and neuromuscular electrical stimulation on brain after stroke: A microdialysis study using rat model [J]. Neurosci Lett, 2006, 397(1—2): 135—139.
- [9] Marin R, Williams A, Hale S, et al. The effect of voluntary exercise exposure on histological and neurobehavioral outcomes after ischemic brain injury in the rat [J]. Physiol Behav, 2003, 80(2—3): 167—175.
- [10] Gralla J, Brekenfeld C, Arnold M, et al. Acute stroke: present and future of catheter-based interventions [J]. Herz, 2008, 33(7):507—517.
- [11] Schouten EA, Schiemanck SK, Brand N, et al. Long-term deficits in episodic memory after ischemic stroke: evaluation and prediction of verbal and visual memory performance based on lesion characteristics[J]. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2009, 18(2):128—138.
- [12] Tsai YW, Yang YR, Chen GH, et al. The time window of intermittent hypoxia intervention after middle cerebral artery occlusion[J]. Chin J Physiol, 2008, 51(5):324—328.
- [13] Freret T, Bouet V, Leconte C, et al. Behavioral deficits after distal focal cerebral ischemia in mice: Usefulness of adhesive removal test[J]. Behav Neurosci, 2009, 123(1):224—230.
- [14] Hara Y. Neurorehabilitation with new functional electrical stimulation for hemiparetic upper extremity in stroke patients [J]. J Nippon Med Sch, 2008, 75(1): 4—14.
- [15] Bogataj U, Gros N, Kljajic M, et al. The rehabilitation of gait in patients with hemiplegia: a comparison between conventional therapy and multi-channel functional electrical stimulation therapy[J]. Phy Ther, 1995, 75(6): 490—502.
- [16] 燕铁斌. 积极推广神经肌肉电刺激技术在中枢神经损伤中的应用[J]. 中国康复医学杂志, 2007, 22(10): 865—866.
- [17] Weingarden H, Ring H. Functional electrical stimulation-induced neural changes and recovery after stroke [J]. Eur Med J, 2006, 42(2): 87—90.
- [18] 游国清, 燕铁斌. 功能性电刺激及其在脑卒中偏瘫患者中的应用[J]. 中华物理医学与康复杂志, 2007, 29(3): 142—144.
- [19] Derksen MJ, Ward NL, Hartle KD, et al. MAP2 and synaptophysin protein expression following motor learning suggests dynamic regulation and distinct alterations coinciding with synaptogenesis [J]. Neurobiol Learn Mem, 2007, 87(3): 404—415.
- [20] 邢影, 徐忠信, 陈加俊等. 大鼠局灶性脑梗死微管相关蛋白表达动态变化及针刺的影响[J]. 中国实验诊断学, 2005, 9(5): 683—685.
- [21] Kaufmann WE, MacDonald SM, Altamura CR. Dendritic cytoskeletal protein expression in mental retardation: an immunohistochemical study of the neocortex in Rett syndrome[J]. Cereb Cortex, 2000, 10(10): 992—1004.
- [22] Nonaka H, Niidome T, Shinozuka Y, et al. A role for SOX2 in the generation of microtubule-associated protein 2-positive cells from microglia [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 380(1): 60—64.
- [23] 常丽英, 赵惠, 张苏明, 等. 溶栓治疗对脑梗死大鼠细胞骨架结构微管相关蛋白-2 的影响 [J]. 脑与神经疾病杂志, 2005, 13(6): 446—449.
- [24] 槐雅萍, 贾子善, 宋华勤. 早期“强制性使用”对局灶性脑梗死大鼠大脑皮层微管相关蛋白-2 表达的影响 [J]. 中国康复医学杂志, 2005, 20(4): 264—266.