

电针结合重复经颅磁刺激对脑缺血大鼠 海马突触素的影响*

韩肖华¹ 黄晓琳^{1,2} 王熠钊¹ 黄国付¹

摘要 **目的:**研究电针结合重复经颅磁刺激对脑缺血大鼠海马突触素的影响。**方法:**120 只 Wistar 大鼠随机分为正常组、模型组、电针组、重复经颅磁刺激组和电针结合重复经颅磁刺激组, 根据不同时间点每个组又细分为 7d、14d 和 28d 组 3 个亚组。复制大脑中动脉栓塞模型, 分别给予电针、磁刺激和电针结合磁刺激干预。免疫荧光标记方法观察缺血侧海马 CA3 区突触素的表达, 蛋白印迹技术定量分析不同时间点、不同组别之间缺血侧海马突触素表达的差异。**结果:**电针、磁刺激和电针结合磁刺激都能显著上调 3 个时间点海马突触素的表达。从时间上看, 随着治疗时间的增加, 突触素的表达逐步上调; 不同组间比较, 第 28 天时电针结合磁刺激海马突触素的表达最显著。**结论:**三种干预方法都能促进脑缺血大鼠海马突触素的表达, 其中第 28 天时电针结合磁刺激效果最显著。

关键词 电针; 经颅磁刺激; 脑缺血; 突触素; 海马

中图分类号: R493, R741 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-1242(2009)-12-1057-04

Effect of electroacupuncture combined with repetitive transcranial magnetic stimulation on the expression of synaptophysin in hippocampus after ischemia/HAN Xiaohua, HUANG Xiaolin, WANG Yizhao, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2009, 24(12):1057—1060

Abstract Objective: To investigate the effect of electroacupuncture (EA) combined with repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) on the expression of synaptophysin (SYN) in hippocampus after cerebral ischemia. **Method:** One hundred and twenty healthy male Wistar rats were divided into normal, model, EA, rTMS and EA + rTMS group randomly. Furthermore, rats in each group were divided into 7d, 14d and 28d, 3 subgroups. Model of middle cerebral artery occlusion(MCAO) was established, followed by 7d, 14d or 28d of EA, rTMS and EA + rTMS treatment. The expression of SYN in area CA3 of the hippocampus of the ischemic cerebral hemisphere were investigated in different time points and different groups by immunofluorescence technique and semi-quantitative analysis of the expression of SYN in hippocampus of the ischemic cerebral hemisphere in different time points and different groups was processed by Western blot. **Result:** The expression of SYN in all 3 rehabilitation intervention groups increased significantly on days of 7, 14 and 28. The longer treatment time, the more significant expression of SYN and the expression in the EA+rTMS group was the most significant on day of 28. **Conclusion:** All three interventions can improve the expression of SYN in hippocampus of the ischemic cerebral hemisphere and EA + rTMS is more efficient on day of 28.

Author's address Department of Rehabilitation Medicine, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, 430030

Key words electroacupuncture; transcranial magnetic stimulation; cerebral ischemia; synaptophysin; hippocampus

中枢神经系统突触结构和功能的可塑性变化是神经康复的基础, 探索如何促进突触结构可塑性变化的方法和技术也是我们康复治疗的努力方向之一。突触前膜分布有大量的突触蛋白, 它们在突触的信号传导过程中发挥重要的作用, 受到广泛关注。突触素(synaptophysin, SYN)广泛存在于机体所有神经终末, 特异性地分布于突触前囊泡膜上, 是一种与突触功能密切相关的膜蛋白, 与神经生长、修复再生和突触重塑密切相关, 成为近年来基础医学和康复医学研究的热点^[1-2]。国内外的研究已经证实了电针(electroacupuncture, EA)、重复经颅磁刺激

(repetitive transcranial magnetic stimulation, rTMS)和两者结合能改善脑梗死神经功能缺损^[3-4]。本研究运用大脑中动脉栓塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型, 观察脑缺血后海马 SYN 表达的时间规律, 比较不同康复干预方法对 SYN 表达的影响, 为临床康复治疗提供可靠的实验依据。

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30672216); 华中科技大学同济医学院附属同济医院科研基金(2008)

1 华中科技大学同济医学院附属同济医院康复医学科, 武汉, 430030

2 通讯作者

作者简介: 韩肖华, 男, 主治医师, 博士

收稿日期: 2009-08-18

1 材料与方法

1.1 实验动物分组及动物造模

120只健康雄性Wistar大鼠(购置于同济医学院实验动物中心),体重(200 ± 20)g,实验室温度 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ 。随机分成5组,即正常组、模型组、EA组、rTMS组、EA+rTMS组,每组又根据不同的时间点(7d、14d和28d)再分为3个亚组,每个亚组8只。

参照廖维靖等^[5]的大鼠MCAO模型造模方法,腹腔注射6%的水合氯醛(剂量为每公斤体重350mg),颈部正中切口,长约2cm,暴露右侧颈总动脉和颈外动脉,0号丝线结扎颈外动脉。分离与颈总动脉伴行的迷走神经,在距颈总动脉分叉处近端0.5—0.6cm处结扎颈总动脉。在结扎线的远端置丝线备用。用微小动脉夹夹闭备用线远端的颈总动脉,在备用线的近端用眼科剪剪一小切口,将黑色5/0尼龙线栓送进切口,向上推至动脉夹处,将备用线稍微扎紧,随即松开动脉夹。将线栓沿颈总动脉、颈内动脉顺行向上插入至大脑中动脉起始部,遇阻力时停止,从颈总动脉分叉处计算插入深度为(1.9 ± 0.2)cm,造成大脑中动脉供血阻断。正常组不作特殊处理。

1.2 治疗方法

EA方法:参照《实验针灸学》中大鼠的常用针灸穴位定位方法^[6],选取督脉经穴“百会”、“大椎”。以30号1寸毫针斜刺入“百会”10mm,直刺入“大椎”5mm。将针柄分别连接至G6805-II型电针仪上,“百会”接负极,“大椎”接正极。选取连续波,频率为20Hz,强度为1—2mA。每次治疗30min,每天1次。

rTMS方法:采用MagLite磁刺激仪(DANTEC Corp. Ltd),圆形刺激线圈直径为12cm,刺激频率为0.5Hz,强度为70%最大输出强度。刺激时固定大鼠头部,线圈紧贴头皮,与大鼠右侧大脑半球相切,中心位于动物右耳前9mm^[7],连续刺激20次为1组,每日2组。

EA+rTMS方法:于EA治疗结束后进行磁刺激,方法及参数分别同EA组和rTMS组。

以上治疗均在大鼠造模成功后当天即开始,根据不同时间点分别治疗7d、14d和28d。

模型组和正常组动物自然饲养,不作特殊处理。

1.3 组织切片制作

按照各个时间点计算实验结束后,每个亚组随机取4只动物,腹腔注射6%的水合氯醛深度麻醉大鼠后,用200ml生理盐水快速左心室灌注冲洗,再用4%多聚甲醛500ml先快后慢灌注固定,恒定灌注时间45—60min。灌注完毕立即断头取脑,4%多聚

甲醛溶液后固定不超过24h。常规脱水、透明、浸蜡、石蜡包埋,海马冠状位连续切片。在前囟点正中后3.30—4.30mm处收集5张4 μm 厚切片。

1.4 免疫荧光染色

切片经二甲苯脱蜡后,依次经无水乙醇、95%乙醇、75%乙醇脱水;3% H_2O_2 室温下孵育10min以灭活内源性过氧化物酶活性;抗原修复后滴加山羊血清(1:10)封闭抗原;加1滴Chemicon公司小鼠抗大鼠SYN单克隆抗体(1:100),4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜;加1滴北京中山生物技术公司FITC标记山羊抗小鼠IgG(1:100),37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育30min;甘油缓冲液1滴封片。Olympus荧光显微镜观察。

1.5 Western印迹检测

实验结束后,每个亚组另取4只大鼠深度麻醉,迅速断头称取右侧海马组织50mg。蛋白质提取后用紫外分光光度计测定标准和样本蛋白的OD值,根据标准曲线计算各样品蛋白浓度。配制4%浓缩胶和10%分离胶,150V恒压电压下SDS-PAGE凝胶电泳50min,电泳完成后将蛋白质从SDS-PAGE凝胶转移至NC膜上,转移电流为276mA,转移时间为35min。将NC膜用5% milk/TBS封闭液室温振荡封闭1h后加入适当稀释的一抗(SYN 1:100, Chemicon公司; GAPDH 1:5000, Jackson Immuno Research Lab),4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。滴加辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠IgG二抗(1:5000, Jackson Immuno Research Lab),37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1h后ECL显色系统(Santa Cruz公司)显色。胶片进行显影,定影,凝胶电泳分析系统(Hoeftle公司)图像扫描并分析各条带的灰度值。

1.6 图像分析

采用HPIAS-1000高清晰彩色病理图像分析系统对免疫荧光染色切片进行图像分析。阳性细胞的免疫反应强度用平均光密度(OD值)表示。各组所有标本检测均由同一实验者在相同光学条件下完成。凝胶电泳分析系统分析SYN蛋白条带灰度值,计算各条带灰度值与内参GAPDH蛋白条带灰度值的比值。

1.7 统计学分析

所有数据以均数 $\pm$ 标准差表示,采用SPSS 10.0统计软件对数据进行方差分析, $P<0.05$ 表示差异有显著性意义。

2 结果

2.1 SYN免疫荧光表达

脑缺血第7天时,模型组大鼠缺血侧海马CA3

区 SYN 表达的 OD 值为 0.25 ± 0.05 , 比正常组表达减少。随后模型组大鼠缺血侧海马 CA3 区 SYN 表达逐步增高, 第 28 天时 SYN 表达的 OD 值增高到 0.45 ± 0.09 。3 个康复干预组同样也呈现出相同的趋势: 实验第 7 天时, 各组大鼠缺血侧海马 CA3 区 SYN 表达的 OD 值已经接近或达到正常组水平; 第 14 天时镜下见大量的荧光着色细胞, 分布密集, 且荧光强度增加, 但是 3 组之间组内比较差异没有显著性意义; 第 28 天时, EA 组、rTMS 组和 EA+rTMS 组大鼠缺血侧海马 CA3 区 SYN 表达的荧光强度进一步增强, 与同时点模型组比较差异显著 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), EA 组、rTMS 组和 EA+rTMS 组组间比较则显示 rTMS 组和 EA+rTMS 组 SYN 表达的高于 EA 组, 差异有显著性意义, 见图 1(见彩色插页)、表 1。

2.2 SYN 蛋白印迹分析

各组大鼠缺血侧海马 SYN 的表达在第 7 天时最低, 随着时间的延长, 各组反应条带的灰度逐渐增加。对于不同的时间点而言: 第 7 天和第 14 天时, EA 组、rTMS 组和 EA+rTMS 组 SYN 反应条带灰度与内参 GAPDH 灰度的比值明显高于对应时间点的模型组, 进行统计分析发现差异有显著性意义, 但是 3 组组间比较差异没有显著性; 第 28 天时, rTMS 组和 EA+rTMS 组大鼠缺血侧海马 SYN 的表达显著增高, 尤其是 EA+rTMS 组 SYN 反应条带灰度与内参 GAPDH 灰度的比值为 2.59 ± 0.28 , 与模型组比较差异有显著性 ($P < 0.01$) (见图 2, 表 2)。

3 讨论

3.1 SYN 与脑缺血后海马结构和功能重塑的关系

SYN 广泛存在于机体所有神经终末, 特异性地分布于突触前囊泡膜上, 是一种与突触功能密切相

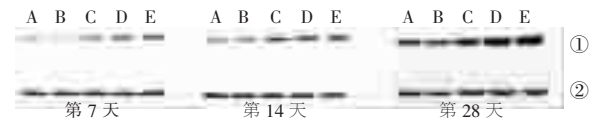


图 2 第 7、14、28 天 各组大鼠脑缺血侧海马 SYN 表达的蛋白印迹分析 (以 GAPDH 为内参)

A、B、C、D、E 分别代表正常组、模型组、EA 组、rTMS 组和 EA+rTMS 组。注: ①Synaptophysin, ②GAPDH

关的膜蛋白, 它与神经生长、修复再生和突触重塑密切相关。除了参与胞吐及递质的释放、突触的形成外, SYN 参与突触重塑、影响突触可塑性的作用也受到广泛关注。因此, SYN 正日益成为研究突触可塑性最常用的指标之一^[8-9]。有研究发现^[10]: 在局灶性脑缺血大鼠的皮质中, SYN 早期的表达同对照组相比无显著差异; 而在梗死后 14d 及 30d 与对照组相比则明显增加。这种 SYN 表达的增加与大鼠的行为学功能恢复在时间上是一致的。这一研究结果有力地证实了大脑神经结构重建的存在, 同时也为脑损伤后功能恢复提供了理论依据。在我们的研究中也得出了相似的结果: 大脑中动脉栓塞 7d 后大鼠海马 SYN 含量与正常组比较明显下降。而随着时间的延长, 模型组大鼠海马 SYN 的表达增加。但是仅仅依靠这种脑损伤后的自我修复而产生的 SYN 表达的上调是不够的。探索积极有效的康复干预方法来上调 SYN 的表达, 促进海马结构和功能的有效重塑非常有意义。

3.2 EA 结合 rTMS 治疗的理论依据

经络、腧穴的特异性是针灸治疗起效的重要影响因素之一。督脉属奇经八脉之一, 是人体诸阳经脉之总汇, 对整个经脉系统有统帅作用。《难经·二十八难》中说: 督脉者, 起于下极之俞, 并于脊里, 上至风府, 入属于脑, 说明其主脉行于脊里, 向上行至项后风府进入脑内, 上循巅顶, 故督脉与脑、脊髓等关系相当密切。历代医家素有“病变在脑, 首取督脉”之说。现代的基础研究也证实, EA 督脉腧穴百会、水沟、大椎等可以通过减少凋亡神经元^[11], 保护脑微血管的完整性^[12], 促进碱性成纤维细胞生长因子的内源性表达^[13]而发挥其在脑缺血后的神经保护作用。依据祖国医学理论, 大椎位于第 7 颈椎棘突下方, 为“诸阳之会”。《针灸甲乙经》云: 百会能醒神升阳且为手足三阳、督脉之会, 有祛风醒脑、宣闭开窍、升提阳气之功效, 能主治风证和神志病。《行针指要歌》中指出“或针风, 先向风府、百会中”。rTMS 可以利用一定强度的时变磁场刺激来兴奋组织, 从而在组织内产生感应电场, 影响大脑内诸多代谢过程及电活动。研究表明 rTMS 不仅可作为脑卒中后功能评估和预测预后的方法, 而且作为一种安全有效的干预手

表 1 各组大鼠海马 CA3 区 SYN 免疫组

化检测结果分析 ($\text{OD}_{x \pm s}$)

组别	鼠数	第 7 天	第 14 天	第 28 天
正常组	4	0.33 ± 0.08	0.35 ± 0.07	0.32 ± 0.06
模型组	4	0.25 ± 0.05	0.34 ± 0.06	0.45 ± 0.09
EA 组	4	0.32 ± 0.09	$0.47 \pm 0.07^{\text{①}}$	$0.64 \pm 0.11^{\text{①③}}$
rTMS 组	4	0.31 ± 0.13	$0.49 \pm 0.11^{\text{①}}$	$0.78 \pm 0.13^{\text{②}}$
EA+rTMS 组	4	0.34 ± 0.13	$0.51 \pm 0.13^{\text{①}}$	$0.86 \pm 0.16^{\text{②}}$

与模型组比较: ① $P < 0.05$, ② $P < 0.01$; 与电针结合重复经颅磁刺激组比较 ③ $P < 0.05$

表 2 各组大鼠海马 SYN 蛋白印迹

检测结果分析 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	第 7 天	第 14 天	第 28 天
正常组	4	0.52 ± 0.06	0.55 ± 0.07	0.57 ± 0.06
模型组	4	0.31 ± 0.05	0.47 ± 0.09	1.25 ± 0.09
EA 组	4	$0.58 \pm 0.07^{\text{①}}$	$0.81 \pm 0.09^{\text{①}}$	$1.78 \pm 0.15^{\text{①③}}$
rTMS 组	4	$0.62 \pm 0.10^{\text{①}}$	$0.84 \pm 0.11^{\text{①}}$	$1.97 \pm 0.18^{\text{①③}}$
EA+rTMS 组	4	$0.67 \pm 0.13^{\text{①}}$	$0.86 \pm 0.13^{\text{①}}$	$2.59 \pm 0.28^{\text{②}}$

与模型组比较: ① $P < 0.05$, ② $P < 0.01$; 与电针结合重复经颅磁刺激组比较 ③ $P < 0.05$

段^[14]对脑功能恢复有促进作用。除了改善患者的运动功能^[15-16],rTMS还可用于治疗中风后吞咽功能障碍^[17]、失语^[18]等。正是基于百会、大椎穴位的特异性和rTMS的有效性和安全性,所以实验中我们选取电针百会、大椎结合rTMS进行研究。

3.2 EA结合rTMS促进脑缺血后神经功能康复的可能机制

刘罡等^[19]的研究已经证实跑台训练可以提高脑缺血损伤后脑组织SYN的含量,提示正确合理的康复干预方法可以促进SYN的表达。在我们的研究中,我们综合运用EA和rTMS,观察了7d、14d和28d时SYN的动态变化,结果发现:无论是EA、rTMS还是EA+rTMS都能显著上调3个时间点海马SYN的表达。从时间上看,随着治疗时间的增加,SYN的表达也逐步上调;不同组间比较,28d时EA+rTMS的效果最佳。结合以往的研究,我们同时发现:在7d、14d时随着SYN表达的上调,大鼠的Bederson神经功能缺损评分逐渐优化^[20],提示SYN表达增加促进了大鼠神经功能的康复。以上研究结果提示EA结合rTMS是一种有效的康复治疗方法。在对脊髓损伤模型的研究中,已经证实无论是rTMS还是EA均可以促进损伤部位神经细胞轴突的生长^[21-22],因此我们推测EA结合rTMS上调SYN表达的机制可能与EA结合rTMS促进脑缺血后神经轴突的出芽形成许多侧支,从而增加了突触囊泡的数量有关。作为一种与突触功能密切相关的膜蛋白,SYN特异性地分布于突触前囊泡膜上,发挥着参与突触重塑、影响突触可塑性的作用,从而促进脑缺血后神经功能的康复。

参考文献

- [1] Joca SR,Guimaraes FS, Del Bel E. Inhibition of nitric oxide synthase increases synaptophysin mRNA expression in the hippocampal formation of rats [J]. Neurosci Lett,2007,421(1): 72—76.
- [2] Pavlov SP, Grosheva M, Streppel M,et al. Manually-stimulated recovery of motor function after facial nerve injury requires intact sensory input[J]. Exp Neurol,2008,211(1):292—300.
- [3] Nowak DA, Grefkes C, Dafotakis M, et al. Effects of low-frequency repetitive transcranial magnetic stimulation of the contralesional primary motor cortex on movement kinematics and neural activity in subcortical stroke [J]. Arch Neurol, 2008,65(6):741—747.
- [4] 韩肖华,黄晓琳,王熠钊,等.电针结合经颅磁刺激对脑缺血大鼠学习记忆功能的影响[J].中国康复医学杂志,2009,24(6):494—497.
- [5] 廖维靖,刘淑红,范明,等.线栓阻断大鼠脑中动脉制作缺血性脑损伤模型的改良 [J]. 中华物理医学与康复杂志,2002,24(6): 349—352.
- [6] 李忠仁主编.实验针灸学[M].北京:中国中医药出版,2003.327—329.
- [7] 刘传玉,梅元武,张小乔.经颅磁刺激对局灶性脑缺血大鼠梗死周边区GAP-43和Syp表达的影响 [J]. 卒中与神经疾病, 2006,13(1):51—54.
- [8] Thompson SN, Gibson TR, Thompson BM, et al.Relationship of calpain-mediated proteolysis to the expression of axonal and synaptic plasticity markers following traumatic brain injury in mice[J]. Exp Neurol,2006,201(1):253—265.
- [9] Sun D, McGinn MJ, Zhou Z, et al.Anatomical integration of newly generated dentate granule neurons following traumatic brain injury in adult rats and its association to cognitive recovery[J]. Exp Neurol,2007,204 (1):264—272.
- [10] Stroemer RP, Kent TA, Hulsebosch CE, et al. Neocortical neural sprouting synaptogenesis and behavioral recovery after neocortical infarction in rats[J]. Stroke, 1995, 26(11): 2135—2144.
- [11] Wang SJ, Omori N, Li F, et al. Potentiation of Akt and suppression of caspase-9 activations by electroacupuncture after transient middle cerebral artery occlusion in rats [J]. Neuroscience Lett, 2002, 331(2): 115—118.
- [12] 孔立红,毛娟娟.电针对局灶性脑缺血再灌注大鼠uPA、PAI-1的影响[J].中国康复医学杂志,2007,22(3):260—261.
- [13] Ou YW, Han L, Da CD,et al. Influence of acupuncture upon expressing levels of basic fibroblast growth factor in rat brain following focal cerebral ischemia-evaluated by time-resolved fluorescence immunoassay[J]. Neurol Res, 2001, 23(1):47—50.
- [14] Yozbatiran N, Alonso-Alonso M, See J, et al. Safety and behavioral effects of high-frequency repetitive transcranial magnetic stimulation in stroke[J]. Stroke, 2009, 40(1): 309—312.
- [15] Mály J, Dinya E. Recovery of motor disability and spasticity in post-stroke after repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) [J]. Brain Res Bull,2008, 76(4): 388—395.
- [16] Kim YH, You SH, Ko MH, et al. Repetitive transcranial magnetic stimulation-induced corticomotor excitability and associated motor skill acquisition in chronic stroke [J]. Stroke, 2006, 37(6):1471—1476.
- [17] Khedr EM, Abo-Elfetoh N, Rothwell JC. Treatment of post-stroke dysphagia with repetitive transcranial magnetic stimulation[J]. Acta Neurol Scand,2009,119(3):155—161.
- [18] Naeser MA, Martin PI, Nicholas M, et al. Improved picture naming in chronic aphasia after TMS to part of right Broca's area: an open-protocol study[J]. Brain Lang, 2005,93(1):95—105.
- [19] 刘罡,胡永善,贾杰,等.跑台训练对脑缺血大鼠脑组织超微结构及突触素表达的影响[J].中国康复医学杂志,2008,23(10): 872—874.
- [20] 彭力,黄晓琳,韩肖华,等.电针结合经颅磁刺激对脑缺血大鼠功能及神经干细胞的影响 [J]. 中华物理医学与康复杂志, 2008,30(9):598—602.
- [21] 李晓滨,陈玉玲,曾园山,等.督脉电针与神经干细胞移植联合应用促进脊髓全横断大鼠受损伤的神经元存活及其轴突再生[J].解剖学报,2006,37(1):30—35.
- [22] 张新,霍小林,潘立东.重复经颅磁刺激对脊髓运动功能恢复的影响及其机制的实验研究 [J]. 中国康复理论与实践,2008,14 (3):228—230.