

功能性电刺激对急性脑梗死大鼠运动功能和缺血半影区与镜区突触素表达的影响*

金冬梅¹ 庄志强¹ 燕铁斌^{1,2} 向云¹ 彭源¹

摘要 目的:观察功能性电刺激(FES)对急性脑梗死大鼠运动功能和缺血半影区与镜区突触素(SYN)表达的影响。**方法:**采用 Longa 线栓法制作大鼠中动脉栓塞(MCAO)模型,MCAO 造模步骤结束后,在大鼠偏瘫侧上肢埋置金属导线连接 FES 治疗仪。将大鼠随机分为 3 组:假手术组、安慰电刺激组和 FES 组,每组又分为 0d、3d、7d、14d 4 个亚组,每亚组 6 只。FES 在术后 3d 开始,使大鼠偏瘫上肢产生伸腕和伸指动作,每天 1 次,每次 10min。在 FES 刺激前后的各个时间点进行网屏实验以观察各组的运动功能变化;应用 Western-blot 技术检测缺血半影区和镜区 SYN 蛋白表达。**结果:**FES 组在刺激 7d 和 14d 后运动功能较安慰电刺激组明显改善($P<0.05$)。脑缺血半影区在刺激 3d、7d、14d 后、镜区在刺激 7d、14d 后,FES 刺激组较安慰电刺激组 SYN 蛋白表达水平明显增高($P<0.05$)。**结论:**FES 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和镜区 SYN 的蛋白表达,即增强脑的可塑性,但半影区的可塑性出现早于镜区,且表达强于镜区。

关键词 功能性电刺激;脑梗死;大鼠;运动功能;突触素

中图分类号:R743.3 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2009)-12-1061-04

Effects of functional electrical stimulation on motor function and expression of synaptophysin in penumbra field and contralesional field of rats with acute cerebral infarction/JIN Dongmei, ZHUANG Zhiqiang, YAN Tiebin, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2009, 24(12):1061—1064

Abstract Objective:To observe the effects of functional electrical stimulation (FES) on motor function and expression of synaptophysin (SYN) in penumbra field and contralesional field of rats with acute cerebral infarction. **Method:**Rat model of middle cerebral artery occlusion (MCAO) was established with Longa's method of intraluminal filament occlusion. Wires were implanted on the hemiplegic upper limbs for connecting with FES instrument. Rats were randomly divided into FES group, FES placebo group and sham operation group. In each group, rats were randomly allocated into baseline, 3d, 7d and 14d subgroups (6/subgroup). FES treatment was carried out 3d after MCAO operation to cause extension of wrist and digitals of hemiplegic upper limb. Scores of screen test was assessed at each time point mentioned above to observe the motor function. Expression levels of SYN was assessed by Western blot technique. **Result:**After treatment for 7d and 14d, the motor function of FES group improved significantly compared with that of FES placebo group ($P<0.05$). Compared with that of FES placebo group, SYN protein expression levels in FES group were higher at the 3rd d, 7th d and 14th d treatment time points in penumbra field and at the 7th d and 14th d treatment points in contralesional field ($P<0.05$). **Conclusion:**FES treatment can improve motor function and enhance the expression of SYN in penumbra field and contralesional field of rats with acute cerebral infarction. FES can enhance the cerebral plasticity.

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

Key words functional electrical stimulation; cerebral infarction; rat; motor function; synaptophysin

功能性电刺激(functional electrical stimulation, FES)能改善急性慢性脑卒中患者上肢各关节的活动度和运动功能^[1-2],改善下肢的运动功能和步行能力等^[3-4],但有关 FES 促进功能恢复机制的相关报道很少。神经元之间的信息传递是由突触来完成的,突触密度在研究神经器官的结构和功能中是一个重要的参数,突触素(synaptophysin, SYN)是研究突触密度

及神经发育的标志物^[5]。因此本研究观察 FES 刺激

* 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 中山大学孙逸仙纪念医院康复医学科,广州,510120

2 通讯作者

作者简介:金冬梅,女,主治医师,博士

收稿日期:2009-07-30

对急性脑梗死大鼠运动功能的影响,并观察 FES 刺激后梗死灶周围脑区即缺血半影区以及镜区突触素表达的变化,以探讨 FES 改善急性脑梗死运动功能的分子机制,为 FES 的临床应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 动物模型制作与分组

1.1.1 MCAO 模型制作: 成年雄性 SD 大鼠,体重 $250 \pm 10\text{g}$,由中山大学实验动物中心提供。所有 SD 大鼠饲养于普通实验环境,环境温度控制在 $24\text{—}25^\circ\text{C}$ 。采用 Longa 线栓法制作大脑中动脉栓塞(MCAO)模型^[6]。10%的水合氯醛按 350 mg/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。

1.1.2 皮下电极埋置: 参考 Leung^[7]和金^[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 $3\text{—}4\text{mA}$,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)缝扎固定于伸肌的肌筋膜上,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 刺激时连接 FES 治疗仪的电极。3 组均进行皮下电极埋置。

1.1.3 动物分组: 术后 3d 进行改良 Bederson^[9]评分: 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:向右侧转圈;3 分:向右侧倾倒;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。动物分为假手术组、安慰电刺激组和 FES 刺激组,每组又分为刺激 0d(即刺激前)、3d、7d、14d 4 个亚组,每亚组 6 只。

1.2 FES

FES 在术后 3d 开始。采用英国 Verity Medical 公司生产的 FES 治疗仪(型号 Neuro TracTM 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刺激,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= $1\text{s}:1\text{s}$,电流强度

4mA 。每天 1 次,每次 10min ,FES 3d、7d、14d 组分别刺激 3d、7d 和 14d。安慰电刺激组连接电极,但不给予电流刺激,假手术组不给予任何处理。

1.3 观察指标

1.3.1 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 $50\text{cm} \times 40\text{cm}$,网眼为 $1\text{cm} \times 1\text{cm}$,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,保持 5s,观察大鼠是否会从网屏上掉下来或用前爪抓住网屏,从而客观的评价前爪抓握能力及肌力的情况。

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。网屏试验共评定 4 次,在造模成功后 3d 即开始刺激前、FES 刺激 3d、7d、14d 后各评定一次。

1.3.2 脑组织的样本制备: 各组大鼠在各规定时间点进行神经功能评分后,10%水合氯醛(0.3ml/kg)腹腔注射麻醉,于手术台上快速断头取脑,分离新鲜脑组织,手术刀片修块保留额极后梗死范围冠状脑组织,取双侧(包括梗死侧及对侧),分别置于离心管中液氮冻存。后转移至 -80°C 冰箱保存,留待后续分子实验使用。

1.3.3 Western-blot 检测半影区和镜区的 SYN 蛋白表达: 脑组织常规 PBS 缓冲液冲洗、裂解、离心、取上清、蛋白定量、凝胶电泳,然后以 100V 恒压转移 2h 转至 PVDF 膜,TTBS 液洗 3 次,每次 5min ,加封闭液 10ml (5%脱脂奶粉溶于 TTBS),振荡封闭 1h,加 TTBS 稀释的一抗(鼠抗 SYN 单克隆抗体,AB-CAM 公司), 4°C 孵育过夜后用 TTBS 洗膜, $5\text{min} \times 3$,加入二抗(羊抗鼠二抗 $1:500$),室温振荡孵育 1h,TTBS 洗膜, $5\text{min} \times 3$,在暗房将膜置发光液中反应 3min,取出放入暗盒中,压紧曝光、显影并定影;之后以同样方法将 PVDF 膜与内参蛋白鼠抗 $\beta\text{-actin}$ 抗体($1:2500$)杂交。

1.3.4 数据采集: 用灰度分析软件得出表达图像峰面积灰度值,与 $\beta\text{-actin}$ 表达峰面积灰度值相比进行标准化处理。

1.4 统计学分析

应用 SPSS 13.0 统计软件进行分析。各组结果以平均值 $\pm$ 标准差表示,3 组组间以及各组不同时间点组内的比较均采用重复测量方差分析,方差齐则采用 LSD 法进行分析,若方差不齐,则采用 Dunnett 法进行分析。

2 结果

2.1 运动功能评定

各组大鼠在不同时间点的评分组内比较显示:假手术组各个时间点之间的评分差异无显著性意义;安慰电刺激组在刺激 14d 后、FES 刺激组在刺激 7d、14d 后运动功能明显改善($P<0.05$)。结果见表 1。

在不同时间点的各组之间评分结果比较显示:各时间点, FES 刺激组和安慰电刺激组的运动功能均差于假手术组($P<0.05$);刺激前、刺激 3d 后, FES 组和安慰电刺激组之间差异无显著性意义, 刺激 7d、14d 后, FES 刺激组较安慰电刺激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 半影区与镜区 SYN 蛋白表达

2.2.1 半影区: 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间的 SYN 蛋白表达水平无显著性差异;安慰电刺激组在刺激 7d、14d 后、FES 刺激组在刺激 3d、7d、14d 后 SYN 蛋白表达水平较刺激前有显著性差异($P<0.05$)。见表 2 和图 1。

在不同时间点的各组之间结果比较显示:各时间点, FES 刺激组和安慰电刺激组的 SYN 蛋白表达水平平均高于假手术组($P<0.05$);刺激前, FES 刺激组和安慰电刺激组之间差异无显著性意义, 刺激 3d、7d、14d 后, FES 刺激组较安慰电刺激组 SYN 蛋白表达水平明显增高, 差异有显著性意义($P<0.05$)。结果见表 2 和图 1。

2.2.2 镜区: 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的 SYN 蛋白表达水平无显著性差异;安慰电刺激组在刺激 14d 后、FES 刺激组在刺激 7d、14d 后 SYN 蛋白表达水平较之前的各个时间点有显著性差异($P<0.05$)。见表 2 和图 2。

不同时间点的各组之间结果比较, 刺激前、刺激 3d 后, 三组之间未见显著性差异, 刺激 7d 和 14d 后, FES 刺激组和安慰电刺激组的 SYN 蛋白表达水平平均高于假手术组($P<0.05$);刺激 7d、14d 后, FES 刺激组较安慰电刺激组 SYN 蛋白表达水平明显增高, 差异有显著性意义($P<0.05$)。结果见表 2 和图 2。

2.2.3 半影区与镜区的比较: 半影区 SYN 蛋白表达增高的出现早于镜区:半影区安慰电刺激组在刺激 7d 后出现, 而镜区在刺激 14d 后才出现;半影区 FES 刺激组在刺激 3d 后即出现, 而镜区在刺激 7d 后才出现。见表 2。

半影区 SYN 蛋白表达要强于镜区:安慰电刺激组刺激 7d、14d 后、FES 刺激组刺激 3d、7d、14d 后, 其半影区的 SYN 蛋白表达水平平均高于镜区, 差异有显著性意义($P<0.05$)。见表 2。

表 1 各组大鼠不同时间点网屏试验评分 ($\bar{x}\pm s$)

组别	刺激前	刺激第 3 天	刺激第 7 天	刺激第 14 天
假手术组	0.17±0.41	0.33±0.51	0.00±0.00	0.17±0.41
安慰电刺激组	2.50±0.84 ^②	2.33±0.52 ^②	2.16±0.75 ^②	1.67±0.52 ^{①②}
FES 刺激组	2.67±0.52 ^②	2.16±0.41 ^②	1.50±0.55 ^{①②③}	1.17±0.41 ^{①②③}

①各组在不同时间点的组内比较 $P<0.05$; ②不同时间点 FES 刺激组和安慰组分别与假手术组之间的比较 $P<0.05$; ③不同时间点 FES 刺激组与安慰组之间的比较 $P<0.05$

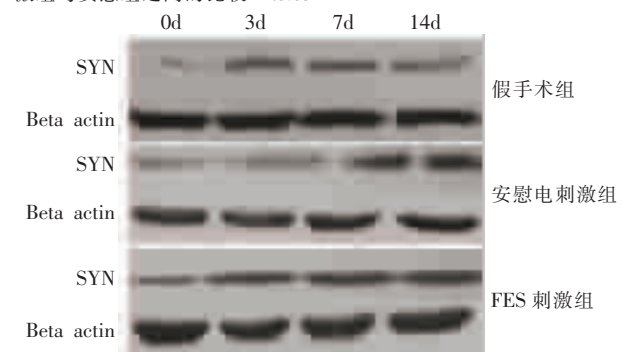


图 1 各组大鼠不同时间点半影区 SYN 表达 (Western blot)

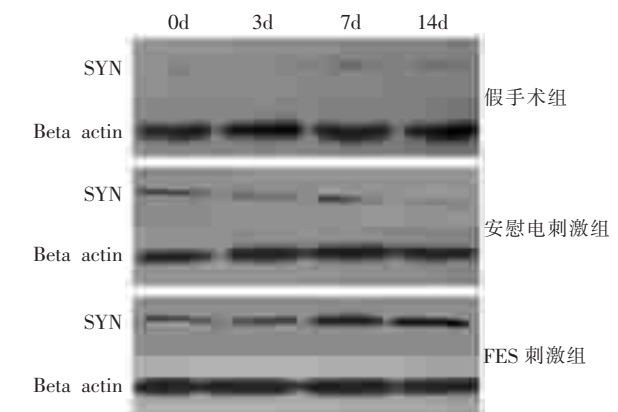


图 2 各组大鼠不同时间点镜区 SYN 表达 (Western blot)

表 2 各组大鼠不同时间点半影区和镜区 SYN 蛋白表达水平 ($\bar{x}\pm s$)

组别	刺激前	刺激第 3 天	刺激第 7 天	刺激第 14 天
半影区				
假手术组	0.09±0.74	0.10±0.05	0.12±0.02	0.11±0.06
安慰电刺激组	0.10±0.16 ^②	0.11±0.04 ^②	0.18±0.08 ^②	0.25±0.05 ^{①②}
FES 刺激组	0.10±0.57 ^②	0.21±0.11 ^{②③}	0.37±0.07 ^{①②③}	0.43±0.09 ^{①②③}
镜区				
假手术组	0.10±0.03	0.10±0.73	0.10±0.34	0.11±0.04
安慰电刺激组	0.09±0.05	0.11±0.25	0.12±0.07 ^{②④}	0.17±0.06 ^{①②④}
FES 刺激组	0.10±0.17	0.11±0.39 ^④	0.18±0.04 ^{①②③④}	0.25±0.09 ^{①②③④}

①各组在不同时间点的组内比较 $P<0.05$; ②不同时间点 FES 刺激组和安慰电刺激组分别与假手术组之间的比较 $P<0.05$; ③不同时间点 FES 刺激组与安慰电刺激组之间的比较 $P<0.05$; ④半影区与镜区在各个相同时间点的比较 $P<0.05$

3 讨论

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^[10]。很多的临床研究已证实 FES 刺激可以改善脑卒中患者的运动功能^[11-16]。本研究应用 FES 刺激急性脑梗死大鼠,在造模成功后 3d 开始刺激,观察时间点为刺激前即刺激 0d、3d、7d、14d,结果发现刺激后大鼠的运动功能未出现恶化,而呈逐步改善趋势,证明造模后 3d 开始刺激,是应用 FES 的一个合适的时间窗。应用网屏试验评定大鼠的运动功能,结果显示:安慰电刺激组(刺激 14d 后)和 FES 刺激组(刺激 7d 和 14d 后)运动功能明显改善($P<0.05$),说明随时间推移,大鼠运动功能有逐渐改善趋势。但 FES 刺激组运动功能改善的出现(刺激 7d 后)要早于安慰电刺激组(刺激 14d 后),且在刺激 7d 和刺激 14d 后,FES 刺激组较安慰电刺激组运动功能改善明显 ($P<0.05$),证实 FES 可以明显地改善大鼠的抓握功能,与临床上 FES 可以改善脑卒中患者运动功能的报道一致。

脑皮质损伤后的大脑结构和功能会发生一系列改变,这其中就包括突触的数目、大小、形状的改变,突触联系效能的增加等^[17-19]。Adkins^[20]等应用皮质电刺激治疗脑梗死大鼠,结果发现大鼠运动功能明显改善,同时应用电镜观察发现梗死灶周围脑区突触密度增加,并且运动功能提高和突触密度增加呈正相关关系,证实了电刺激治疗可以增加突触的可塑性。Kleim^[21]等报道对大鼠进行够物训练可以增加其脑损伤侧皮质神经元的突触数目。突触素是研究突触密度及神经发育的标志物,对突触免疫产物的定位和定量能够准确反映突触的分布和密度。本研究发现脑梗死缺血半影区的 SYN 蛋白表达水平,假手术组各个时间点之间无显著性差异,提示大鼠大脑皮质未损伤的情况下并不表现出明显的突触可塑性。安慰电刺激组在刺激 7d、14d 后表达明显增高、FES 刺激组在刺激 3d、7d、14d 后表达较之前的各个时间点有显著性差异,说明脑皮质梗死后,不论有无干预,脑组织均会发生一定程度的可塑性变化。但 FES 刺激组 SYN 变化(刺激 3d 后)要早于安慰电刺激组(刺激 7d 后),且刺激 3d、7d、14d 后,FES 刺激组较安慰电刺激组 SYN 蛋白表达明显增高 ($P<0.05$),说明 FES 刺激能更早、更强地促进脑梗死半影区的 SYN 表达增强,即促进突触的功能增强,促进脑的可塑性增强。

目前很多研究发现大鼠一侧脑皮质损伤后,

对侧脑组织即镜区脑组织也表现出了可塑性的改变^[22-23]。Luke^[24]观察证实成年大鼠一侧皮质感觉运动区缺血性损伤后,健侧肢体的抓握功能要好于假手术组,同时对侧镜区脑皮质出现了突触的功能增强,推测是由于患侧肢体的功能障碍而更多的使用健侧肢体进行平衡、支撑、抓握等动作行为从而促进了镜区的可塑性改变。也有学者提出丰富的环境刺激对正常大鼠和存在脑损伤的大鼠均可增强其突触可塑性改变^[25]。本研究结果显示镜区的 SYN 蛋白表达水平,安慰电刺激组在刺激 14d 后、FES 刺激组在刺激 7d、14d 后明显升高($P<0.05$);刺激 7d、14d 后,FES 刺激组较安慰电刺激组蛋白表达明显增高,差异有统计学意义($P<0.05$),说明脑皮质损伤后镜区出现了可塑性的改变,突触效能的增强,且 FES 刺激后这种可塑性的出现更早,突触效能更强。

本研究同时发现,镜区可塑性的出现晚于半影区,且 SYN 的表达要弱于半影区,说明脑皮质损伤后,可塑性更多地表现为半影区,但镜区可塑性的改变对于大鼠偏瘫肢体的恢复也起到了一定的作用。FES 刺激后大鼠的运动功能改善,半影区和镜区的突触可塑性增强,且这种可塑性的逐渐增强与大鼠的运动功能恢复时序性相对应,因此本研究推测突触可塑性增强是大鼠运动功能恢复的机制之一。

4 结论

FES 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和镜区 SYN 的蛋白表达,即增强脑的可塑性,但半影区的可塑性出现早于镜区且表达强于镜区。

参考文献

- [1] 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.
- [2] 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.
- [3] Yan T, Hui-Chan CW, Li LS. 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): 80-85.
- [4] 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, 86(37): 2627-2631.
- [5] Urquhart A, Kimpton CP, Downes TJ, et al. Variation in short tandem repeat sequences-A survey of twelve microsatellite loci for use as forensic identification markers [J]. *Int J Legal Med*, 1994, 107(1): 13-19.
- [6] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91.
- [7] 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*

(下转1069页)