

·基础研究·

经颅电刺激加康复训练对脑缺血再灌大鼠功能恢复和微管相关蛋白-2的影响

杨丽霞¹ 刘芳^{2,3}

摘要

目的:研究经颅电刺激加康复训练能否促进大鼠局部脑缺血再灌后的功能恢复并从神经可塑性角度探讨其机制。

方法:线栓法制备SD大鼠短暂大脑中动脉缺血再灌模型(MCAO),术后随机分为电刺激加康复组(A)、康复组(B)、对照组(C)。A组给予经颅电刺激、滚笼和平衡木训练。B组仅给予滚笼和平衡木训练。分别于术后3、7、14和28天用走横木试验(BWT)进行运动功能评分,以及用免疫组化法检测微管相关蛋白-2(MAP-2)在梗死灶周围的免疫活性强度。

结果:A组BWT评分在第7、14、28天优于B组和C组,差异有显著性意义($P<0.05$);A组皮质缺血周边区MAP-2表达水平在第14、28天高于B组和C组,差异有显著性意义($P<0.05$)。

结论:经颅电刺激加康复训练能促进大鼠MCAO后肢体功能恢复,其机制可能与上调缺血灶周边MAP-2的表达有关,上述作用优于单独康复训练。

关键词 脑梗死;经颅电刺激;康复训练;微管相关蛋白-2;大鼠

中图分类号:R743,R454.1,R493 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2011)-08-0750-04

The effect on functional recovery and microtubule-associated protein-2 expression using transcranial electric stimulation combined with rehabilitative training following focal ischemia-reperfusion infarct in rats/ YANG Lixia,LIU Fang//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2011, 26(8): 750—753

Abstract

Objective: To assess the influence of transcranial electric stimulation (TES) combined with rehabilitative training on brain plasticity and behavioral functional performance in rats following a focal ischemia-reperfusion insult.

Method: After an acute focal ischemic insult developed by transient occlusion of right middle cerebral artery (MCAO), the TES combined with rehabilitation group(A) were given TES, balancing, rotating and walking exercises everyday; the rehabilitation group(B) were given only balancing, rotating and walking exercises everyday; the control group(C) was without any treatment. Microtubule-associated protein-2(MAP-2) were examined by immunohistochemical techniques, and density of reaction product and narrow-beam-walking tasks(BWT) were measured at the 3rd, 7th, 14th and 28th d after infarction respectively.

Result: A group provided marked improvement in BWT at the 7th, 14th and 28th d compared with B group and C group($P<0.05$). The expression of MAP-2 demonstrated statistically significant increases at the 14th and 28th d in the peri-infarct regions in A group compared with other two groups($P<0.05$).

Conclusion: These results support the efficacy of combining rehabilitative training with TES on improving functional outcome and neuronal plasticity following ischemic cerebral damage. The function enhancement may be partly due to the up-regulation of expression of MAP-2 in peri-infarct regions. Meanwhile, this efficacy is superior to rehabilitative training only.

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2011.08.013

1 贵阳医学院附属医院心理科,550004; 2 贵阳医学院附属医院神经内科; 3 通讯作者

作者简介:杨丽霞,女,硕士,主治医师; 收稿日期:2010-08-31

Author's address Department of psychological, the affiliated hospital of Guiyang Medical College,Guiyang,550004

Key word cerebral ischemic infarction;transcranial electric stimulation;rehabilitative training;microtubule-associated protein-2;rats

脑卒中是引起成人残疾的主要原因之一,超过69%的生存者遗留持续肢体功能障碍。除了一定程度的自然恢复,以促进功能恢复为目的的康复训练被证明是有效的,然而,治疗的结局通常实际意义有限,大约55%—60%进行完整标准康复治疗的患者仍然表现一定程度的功能缺陷,影响日常生活^[1]。因此,需要开发新的康复手段去改变现状。非侵入性皮质刺激技术能调节皮质的兴奋性,无创,无痛,副作用小,使其成为一种有价值的调节神经可塑性的工具^[2]。本研究旨在探讨经颅电刺激联合运动康复对大鼠局部脑缺血再灌注后肢体功能恢复的影响,并从中枢神经可塑性的角度探讨功能恢复的机制。

1 材料与方法

1.1 动物及分组

选用纯种健康雄性SD大鼠84只,体重(250±25)g,鼠龄12周左右,由贵阳医学院实验动物中心提供。造模前7 d每组大鼠进行滚筒和平衡木训练,隔天1次,每次30min。动物随机分为:电刺激加康复组(24只);康复组(24只);对照组(24只);假手术组(6只);正常组(6只)。

1.2 短暂性大脑中动脉缺血再灌(MCAO)模型

采用改良的Longa法^[3],使用单纤维尼龙线,加热将一端烤制光滑呈圆球形,直径0.25—0.28mm,消毒备用。用10%水合氯醛350mg/kg腹腔注射麻醉大鼠,逐层分离暴露右侧颈总动脉、颈内动脉。经颈总动脉切口插入尼龙线进入颈内动脉约18—20mm至大脑中动脉近端,阻断大脑中动脉血供2h后抽出尼龙线。术后提尾左前肢内收屈曲,爬行时左侧转圈追尾现象为成功标志。假手术组手术过程同上,只是将栓线插入15mm深度后1min拔出。

1.3 电刺激治疗

采用CCS-1型大脑皮质电刺激仪(河南),将表面电极改装为:刺激电极圆形,直径0.2cm,阴极和阳极间距为1.5cm。头皮刺激时,阳极置于大鼠头皮双眼脑间到人字缝处(感觉运动区),阴极置于正前方,用100μs脉宽、1000V电压,刺激间隔2—3s、连

续刺激10次。术后24h开始对电刺激加康复组进行治疗,6d为1个疗程,休息1d后进行下一疗程。

1.4 康复训练

滚筒训练用长40cm,直径30cm的圆形网状仪器进行训练,手摇按5转/min进行训练,训练抓握、旋转走运动。平衡木训练采用了170cm×2cm的方木棒,作为一个平衡木,训练行走平衡和协调功能。电刺激加康复组及康复组大鼠术后24h进行上述两种康复训练,每天训练30min,6d为1疗程,休息1d进行下一疗程。

1.5 走横木试验(narrow-beam-walking tasks, BWT)

0分:能跳上横木,在上面行走不会跌倒;1分:能跳上横木,在上面行走,脚滑几率少于50%;2分:能跳上横木,在上面行走,脚滑几率大于50%;3分:在健侧后肢帮助下能跳上横木,但受累的瘫侧后肢不能帮助向前移动;4分:在平衡木上不能行走,但可坐在上面;5分:放在平衡木上会掉下来。分别于脑缺血再灌后3、7、14和28d对各组大鼠进行上述行为学评分。

1.6 组织制备及免疫组化

动物于MCAO再灌注后第3、7、14和28天各取材5只,以4%多聚甲醛心脏灌注,取脑,去掉嗅脑、脑干和小脑,将余部脑组织冠状等分为前、中、后3段,取中段置于灌注液中固定24h(4℃),常规石蜡包埋,5μm厚冠状连续切片。采用小鼠抗(microtubule-associated protein-2, MAP-2)单克隆抗体(武汉)。切片脱蜡后经0.3%的H₂O₂处理,ABC法染色。采用MAIS显微图像处理系统(四川大学图像图形研究所)测定各时像点皮质缺血灶周边MAP-2表达的灰度值,灰度值与细胞反应强度呈反比,每例标本测3张切片,每张切片随机选取5个阳性视野,取平均值为测定值。

1.7 统计学分析

用SPSS 10.0统计软件进行分析。组间比较用单因素方差分析(one-way ANOVA), $P<0.05$ 为有显著性差异。

2 结果

各组大鼠 MACO 后第 3 天的 BWT 无明显差异 ($P>0.05$), 功能缺损明显。但随后第 7、14 和 28 天各组大鼠运动功能逐渐改善, 第 7—14 天恢复最快, 其中, 电刺激加康复组大鼠上述时段的 BWT 评分优于康复组和对照组 ($P<0.01-0.05$), 康复组的行为功能改善程度也较对照组好 ($P<0.01-0.05$), 见表 1。假手术组大鼠手术前后 BWT 得分均为 (0 ± 0) 分, 提示手术操作不影响行为测试评分。

假手术组、正常组 MAP-2 灰度值分别为 (107.65 ± 3.18) 和 (112.55 ± 5.02) , 差异无显著性意义 ($P>0.05$), 主要是神经细胞胞浆和树突染色, 可见排列整齐垂直皮质表面走行的树突, 分层清晰。而梗死周围皮质树突排列紊乱、扭曲, 缺血早期染色减弱, 中心坏死区染色消失。然后, 随缺血再灌注时间增加, 缺血灶周围出现 MAP-2 染色增强的改变 (见图 1)。再灌注后第 14、28 天, 电刺激加康复组比康复

组梗死灶周围皮质 MAP-2 阳性表达的量更加明显, 差异有显著性意义 ($P<0.05$)。同时, 康复组在上述时间梗死灶周围皮质 MAP-2 的阳性表达高于对照组 ($P<0.05$), 见表 2。

表 1 脑缺血再灌注大鼠走衡木试验评分情况 ($\bar{x}\pm s$, 分)

组别	第 3 天	第 7 天	第 14 天	第 28 天
电刺激加康复组	4.40 ± 0.73	2.93 ± 1.03^{①}	1.40 ± 0.97^{①③}	0.60 ± 0.55^{①③}
康复组	4.35 ± 0.73	3.73 ± 0.88	2.40 ± 0.97^{②}	1.60 ± 0.89^{②}
对照组	4.55 ± 0.59	3.93 ± 0.79	3.20 ± 0.63	2.60 ± 0.55

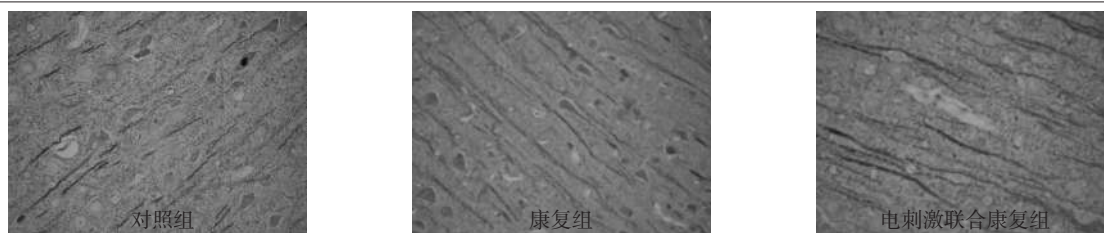
注: 与康复组相比① $P<0.05$; 与对照组相比② $P<0.05$, ③ $P<0.01$

表 2 梗死灶周围皮质 MAP-2 免疫阳性灰度值 ($\bar{x}\pm s$)

组别	第 3 天	第 7 天	第 14 天	第 28 天
电刺激加康复组	146.06 ± 7.72	123.58 ± 8.23	90.91 ± 7.08^{①③}	81.36 ± 6.01^{①③}
康复组	145.73 ± 9.09	111.85 ± 10.32	102.45 ± 5.90^{②}	93.88 ± 10.01^{②}
对照组	150.21 ± 8.64	120.28 ± 10.67	114.38 ± 9.74	108.02 ± 10.28

注: 与康复组相比① $P<0.05$; 与对照组相比② $P<0.05$, ③ $P<0.01$

图 1 缺血再灌注第 28 天时对照组、康复组、电刺激联合康复组梗死灶周围 MAP-2 的表达 ($\times 400$)



3 讨论

目前已取得共识, 促进神经可塑性变化已成为治疗缺血性脑损伤的根本途径之一。MAP-2 是一种热稳定磷蛋白, 属于结构性微管相关蛋白家族, 主要在中枢神经系统神经元胞体和树突表达, 可作为神经元的标志蛋白。它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, 参与神经元的生长和损伤后修复过程。MAP-2 对脑缺血最敏感, 在缺血中心表达丧失, 而在缺血半暗带却选择性的升高, 因此, MAP-2 被认为是神经生长和修复相关蛋白, 是研究神经再塑的分子标志物^[4]。与上述结论一致, 本试验发现随着各组大鼠运动功能的改善, 梗死灶周围 MAP-2 的表达也逐渐增高。

近年来, 非侵入性皮质刺激在脑卒中康复中的

积极作用已受到关注。经颅直流电刺激 (transcranial direct current stimulation, tDCS) 和经颅磁刺激 (transcranial magnetic stimulation, TMS) 被认为是两项能增强皮质可塑性的技术^[5-7]。研究表明, 两者可以根据刺激方式的不同上调或下调皮质兴奋性, 从而改变半球内抑制和易化, 促进两半球活性的恢复, 同时, 他们可以调节钠、钙通道的传导性, 调节突触前后的神经递质, 促进新突触的形成, 从而影响脑的可塑性变化。作用机制涉及长时程增强/抑制 (LTP/LTD) 机制、N-甲基-D-天冬氨酸 (NMDA) 受体等^[7]。

区别于 tDCS 输出的恒流弱电流, 国内宋新光设计的直流载波式大脑皮质电刺激 (TES) 仪输出的是强的方波脉冲, 与 TMS 的作用相同, 它可以直接兴奋运动神经通路, 产生运动及诱发电位, 已广泛用于

临床皮质运动诱发电位的检查。关于TES用于康复治疗报道比较少,徐军^[8]等首先观察到接受TES联合周围神经电刺激的脑血管后遗症患者在肢体功能恢复、肌张力改善、肢体疼痛缓解方面的疗效都明显优于单独周围神经电刺激和内科治疗,但具体机制不详。动物研究发现,与对照组比较,TES刺激的脑梗死大鼠瘫痪肢体功能明显改善,缺血半影区内胶质纤维酸性蛋白和神经微丝200蛋白的表达增多,MEP的波幅增宽,潜伏期缩短,显示TES可以促进脑梗死后功能的恢复和可塑性变化^[9-10]。目前高压脉冲皮质刺激的治疗理论尚不清楚,我们认为TES可以直接兴奋大脑皮质运动中枢,也可兴奋皮质脊髓束以致肌肉的整个运动系统,因此对运动传导通路有易化作用,能促进突触生成和皮质功能重建,从而达到运动功能康复的目的。同时,考虑到不同强度电磁场对神经系统的普遍效应,推测TES的作用也可能与上述tDCS和TMS的部分机制相同。另外,我们从临床MEP检查和上述研究的参数范围内选择了刺激参数,此参数在动物和人使用的安全性方面也得到了肯定^[11-12]。

与其他研究一致,本实验发现康复训练组运动功能恢复优于对照组^[13-14],康复训练可以改变皮质兴奋性,加强现存的神经通路,促进新功能和结构的形成,促进可塑性的变化,从而改善功能。其长期效应机制也涉及LTP机制、NMDA受体等^[15]。因此,我们认为康复练习和经颅电刺激有相同的作用机制,那么,联合两者可能有叠加的效应及优化的作用。首先,皮质电刺激可以为运动训练提前做好皮质兴奋性,因此,优化运动训练的过程,导致更显著而持久的功能的获得^[7]。其次,运动训练时便携式经颅电刺激可能是增强运动训练较适合的工具^[16]。本试验结果支持这一推测,电刺激加康复组大鼠运动功能评分明显优于其他两组,且MAP-2在缺血后期的表达明显增高,提示经颅电刺激联合康复训练可以明显促进卒中后大鼠运动功能的恢复和神经可塑性变化,其作用优于单独使用康复训练。因此,可以推测,非侵入性皮质电刺激联合运动训练可以成为一种传统神经康复措施的辅助手段。然而,下一步的关键是更好地了解各自和相互作用的机制的同时,决定适当的参数和确切的治疗时间窗。

参考文献

- [1] Schaechter JD. Motor rehabilitation and brain plasticity after hemiparetic stroke[J]. *Prog Neurobiol*, 2004, 73(1): 61—72.
- [2] Williams JA, Imamura M, Fregni F. Updates on the use of non-invasive brain stimulation in physical and rehabilitation medicine[J]. *J Rehabil Med*, 2009, 41(5): 305—311.
- [3] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84—91.
- [4] 徐丽丽, 白玉龙, 胡永善, 等. 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[J]. *中国康复医学杂志*, 2009, 24(6): 505—508.
- [5] Brown JA, Lutsep H, Cramer SC, et al. Motor cortex stimulation for enhancement of recovery after stroke: case report[J]. *Neurol Res*, 2003, 25(8): 815—818.
- [6] Hummel F, Celnik P, Giraux P, et al. Effects of non-invasive cortical stimulation on skilled motor function in chronic stroke[J]. *Brain*, 2005, 128(pt3): 490—499.
- [7] Bolognini N, Pascual-Leone A, Fregni F. Using non-invasive brain stimulation to augment motor training-induced plasticity[J]. *J Neuroeng Rehabil*, 2009, 6: 8.
- [8] 徐军, 李捷胡, 安居, 等. 经皮大脑皮层电刺激治疗脑血管后遗症[J]. *中国康复医学杂志*, 1999, 14(4): 169—171.
- [9] 刘芳, 张璐, 吕如锋. 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[J]. *中华物理医学与康复杂志*, 2004, 26(8): 449—551.
- [10] 张璐, 方宇, 刘芳. 经颅电刺激对大鼠脑梗死后运动功能恢复的影响[J]. *临床神经电生理学杂志*, 2003, 12(4): 216—200.
- [11] 徐光军, 刘芳, 张文渊. 经颅电刺激在急性脑梗死患者运动功能康复中的作用[J]. *临床神经电生理学杂志*, 2007, 16(5): 281—284.
- [12] 段广军, 刘芳, 张文渊. 经颅电刺激安全性的动物试验研究[J]. *临床神经电生理学杂志*, 2005, 14(3): 153—155.
- [13] 郑海清, 胡昔权, 潘三强, 等. 康复训练对脑梗死大鼠功能恢复及皮质梗死边缘区神经细胞超微结构的影响[J]. *中国康复医学杂志*, 2008, 23(7): 605—608.
- [14] 徐丽丽, 白玉龙, 胡永善. 运动训练改善脑缺血大鼠梗死体积与神经行为能力的实验研究[J]. *中国康复医学杂志*, 2008, 2(2): 100—102.
- [15] Butefish CM, Davis BC, Wise SP, et al. Mechanisms of use-dependent plasticity in the human motor cortex[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 3661—3665.
- [16] Nitsche MA, Paulus W. Sustained excitability elevations induced by transcranial DC motor cortex stimulation in human[J]. *Neurology*, 2001, 57: 1899—1901.