

·基础研究·

高频重复经颅磁刺激对脑梗死大鼠运动诱发电位皮质潜伏时和中枢运动传导时间的影响

马玉娟¹ 黄 杰¹ 方征宇¹ 王 秋¹ 尤春景^{1,2}

摘要

目的:观察不同刺激强度的高频重复经颅磁刺激(rTMS)对脑梗死大鼠运动诱发电位(MEP)的影响。

方法:43只大鼠随机分为正常组、模型组、假刺激组、rTMS组(按不同刺激强度分80% MT亚组、100% MT亚组、120% MT亚组)。测定运动阈值(MT)后制备大脑中动脉栓塞模型。模型成功24h后给予20Hz,刺激时间2s,间隔时间28s,总脉冲数为1200的rTMS刺激,连续刺激14d。观察术前、术后1d、治疗7d和治疗14d时双侧中枢传导时间(CMCT)和皮质潜伏时(CL)的变化。

结果:①术前各组左右侧CMCT、CL的比较差异均无显著性意义($P>0.05$)。②术后1d左侧CMCT、CL较术前和右侧缩短($P<0.01$)。③治疗7d时,双侧CMCT、CL各组之间以及各组双侧CMCT、CL比较差异均无显著性意义($P>0.05$)。④治疗14d时,100% MT亚组左侧CMCT、CL较正常组和治疗7d时均缩短($P<0.05$),双侧CMCT、CL均较术前缩短(左侧 $P<0.01$,右侧 $P<0.05$);80% MT亚组右侧CMCT、CL较术后1d缩短($P<0.05$)。

结论:本实验结果提示20Hz rTMS有助于促进脑梗死大鼠双侧CMCT和CL缩短使双侧大脑达到某种平衡或者代偿,80% MT和100% MT两种强度的rTMS作用可能较大。

关键词 脑梗死;经颅磁刺激;运动诱发电位;中枢传导时间;皮质潜伏时

中图分类号:R743 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2011)-10-0898-05

Effects of high-frequency repetitive transcranial magnetic stimulation on cortical latency and central motor conduction time of motor evoked potential of rats with cerebral infarction/MA Yujuan, HUANG Jie, FANG Zhengyu, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2011, 26(10): 898—902

Abstract

Objective:To investigate the effects of high-frequency repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) with different intensities on motor evoked potential(MEP) of rats with cerebral infarction.

Method: A total of 43 rats were randomly divided into blank control group, model control group, sham stimulation control group, rTMS group which was divided into 3 subgroups, 80% MT subgroup, 100% MT subgroup and 120% MT subgroup. Resting motor threshold(MT) was determined, then the middle cerebral artery occlusion (MCAO) model was established. After the model was made successfully 24 hours, consecutive blocks of rTMS were given at 20Hz with 2s duration, 28s interval and 1200 total number of pulses for 14d. The central motor conduction time(CMCT) and cortical latency(CL) were detected at different time points, before MCAO operation, and 1d after operation, after 7d rTMS and after 14d rTMS.

Result: Before MCAO operation, CMCT and CL between both sides had no significant difference in each group ($P>0.05$). At the 1st d after operation, both CMCT and CL on the left side reduced significantly as compared with those on the right side and that before operation($P<0.01$). After 7d rTMS, CMCT and CL on both sides had

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2011.10.002

*基金项目:国家自然科学基金(30801220)、湖北省自然科学基金(2008CDB383)

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:马玉娟,女,硕士研究生; 收稿日期:2010-11-05

on difference between the groups, each group also had no difference between both sides ($P>0.05$). After 14d rTMS, CMCT and CL on the left side reduced as compared with those in blank control group and those after 7d rTMS in 100% MT subgroup ($P<0.05$), CMCT and CL on both sides also reduced as compared with those before operation (left $P<0.01$ and right $P<0.05$), CMCT and CL on the right side reduced as compared with those at the 1st d after operation in 80% MT subgroup ($P<0.05$).

Conclusion: RTMS of 20Hz might promote the reducing of CMCT and CL, as well as the balance of both side hemispheres or evoke the unaffected hemisphere to compensate the functional impairments of affected hemisphere through decreasing CMCT and CL on both sides. RTMS of 80% MT and 100% MT seemed to have the best effect.

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

Key word cerebral infarction; transcranial magnetic stimulation; motor evoked potential; central motor conduction time; cortical latency

自1985年Barker等首次将磁刺激技术应用到中枢神经系统以来,经颅磁刺激(transcranial magnetic stimulation, TMS)以其无创、无痛、操作简便、可深部刺激及副作用小等优势被广泛应用于基础和临床。TMS在临床中主要用于测定运动诱发电位(motor evoked potential, MEP)、中枢运动传导时间(central motor conduction time, CMCT)等,基本取代了电刺激^[1]。因MEP与运动功能间存在着很好的相关性,现阶段主要应用在分析TMS对大脑的影响、探索大脑功能、研究神经连接等方面。1989年出现的重复经颅磁刺激(repetitive transcranial magnetic stimulation, rTMS),因在刺激结束后仍有持续的生物学效应,被作为一种治疗手段应用于抑郁症、帕金森病、难治性癫痫等疾病。更有研究表明^[2-4], rTMS还可通过调节皮质的兴奋性激发神经网络重塑,对中枢神经系统损伤起到早期保护和功能重建的作用,因而也被广泛应用于神经系统损伤康复的研究中。

1 材料与方法

1.1 实验仪器与运动阈值(motor threshold, MT)测定
重复经颅磁刺激仪(CCY-I型,武汉依瑞德医疗设备新技术有限公司,最高刺激频率为100Hz);圆形线圈(线圈外径6cm,中心最大磁场强度3.5T);肌电图仪(美国Cadwell公司),参数设定:脉冲时限0.1ms,扫描速度10ms/cm,波幅灵敏度100 μ V/cm,分析时程100ms。

体重240—320g的健康雄性SD大鼠12只,10%浓度的水合氯醛腹腔麻醉(3ml/kg)后,俯卧位固定于

操作台上。MT测定参考孙毅等^[5-6]的方法,尾部接地,用同心圆针电极插入大鼠左后肢胫后外侧肌群中,收集复合肌肉动作电位。将刺激器的长轴与大鼠身体的纵轴垂直,刺激线圈平均半径处置于鼠脑中线旁,大约右眼后毗与右耳缘连线中点水平的区域(额顶叶皮质的体表投影区)接受最强点刺激。先给予一个较大强度的单次刺激,记录到波形、潜伏期基本恒定的运动诱发电位后,逐渐降低刺激强度。每次刺激间隔不少于10s,以防止刺激效应的叠加,将连续5次刺激至少引出2个波幅不小于200 μ V的最小刺激强度定为运动阈值,表示为最大输出强度的百分比。12只SD大鼠的平均静息运动阈值为最大输出的21.58% $\pm$ 3.63% (取近似值22%)。

1.2 实验动物分组及模型制备

成年健康雄性SD大鼠86只,体重220—300g,由华中科技大学同济医学院实验动物学部提供,属清洁动物,在恒温条件下饲养,自由饮水和进食。采用随机数字表法,分为正常组、模型组、假刺激组、rTMS组(按不同刺激强度分80% MT亚组、100% MT亚组、120% MT亚组)。纳入结果分析的有43只大鼠,其中大脑中动脉栓塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)大鼠有36只。

参考廖维靖等^[7]的方法制作右侧MCAO模型。自颈总动脉分叉处插入线栓的平均深度为(19.00 $\pm$ 0.93)mm。动物清醒后,按Bederson方法进行神经功能缺损评分^[8]。标准:0分,无明显神经功能缺失表现;1分,提尾悬空时左前肢屈曲;2分,向左侧行走;3分,向左侧转圈,成追尾状。2—3分的大鼠纳入实验研究。

1.3 实验动物的干预方法

rTMS组大鼠置于自制的大小适当的透明固定器中,线圈放置同MT测定。假刺激组大鼠的固定同上,但线圈平面与头皮垂直。模型制作成功24h后rTMS组给予rTMS,刺激参数为:频率20Hz,刺激时间2s,间隔时间28s,总脉冲数为1200,连续刺激14d。80% MT亚组、100% MT亚组、120% MT亚组分别给予的刺激强度为80% MT、100% MT、120% MT。假刺激组给予100% MT组的刺激参数^[4,9]。模型组大鼠为模型制作成功的大鼠,不给予任何刺激。正常组大鼠不做任何处理,自由进食饮水。

1.4 运动诱发电位的测定

各组在术前、术后1d、治疗7d、治疗14d时各测定1次MEP。清醒状态下的大鼠固定在自制的大小适当的透明固定器中,双下肢暴露在固定器外,按MT测定方法给予2倍MT强度的单次刺激^[6],双侧皮质运动区及脊髓(L3水平)为刺激点,刺激左侧皮质在右后肢胫外侧肌群记录MEP波,刺激右侧皮质在左后肢胫外侧肌群记录。计算CMCT,即皮质运动区和脊髓TMS刺激诱导的MEP潜伏时之差。在皮质运动区刺激诱导的MEP潜伏时即为皮质潜伏时(cortical latency, CL)。

1.5 统计学分析

各组计量资料以均数±标准差表示。采用SPSS17.0软件处理,各时间点前后及各时间点左右侧的比较采用配对*t*检验;组间均数的比较采用单因素方差分析,两两比较采用LSD检验,方差不齐时采用Games-Howell检验。检验结果判定,以*P*<0.05为差异有显著性意义,*P*<0.01为差异有高度显著性意义。

2 结果

2.1 MCAO大鼠手术前后及左右侧CMCT、CL的变化,见表1。

术后1d左侧CMCT、CL较术前和右侧缩短(*P*<0.01),右侧CMCT、CL较术前比较差异均无显著性意义(*P*>0.05);左右CMCT、CL术前比较差异均无显著性意义(*P*>0.05)。

2.2 各时间点组间、组内左右侧及各组各时间点后CMCT和CL的比较,见表2—3。

表1 MCAO大鼠手术前后及左右侧CMCT和CL的比较 (x±s,ms,n=36)

指标	术前		术后1d	
	左侧	右侧	左侧	右侧
CMCT	4.85±0.26	4.85±0.24	4.50±0.39 ^{①②}	4.97±0.47
CL	7.17±0.29	7.18±0.29	6.84±0.39 ^{①②}	7.35±0.48

①与术前比较,*P*<0.01;②与右侧比较,*P*<0.01

①术前各组左右侧CMCT、CL的比较差异均无显著性意义(*P*>0.05)。80% MT亚组双侧CMCT均较假刺激组延长,左侧CL较假刺激组延长,右侧较正常组延长(*P*<0.05)。②术后1d,左侧CMCT各组之间差异均无显著性意义(*P*>0.05),左侧CL假刺激组较正常组和80% MT亚组均缩短(*P*<0.05);右侧CMCT、CL,模型组和80% MT亚组均较正常组、假刺激组延长(*P*<0.05);与右侧相比,左侧CMCT、CL模型组、120% MT亚组缩短(*P*<0.05),假刺激组缩短(*P*<0.01)、100% MT亚组缩短(CMCT *P*<0.05,CL *P*<0.01),80% MT亚组虽有缩短,但差异无显著性意义(*P*>0.05)。③治疗7d时,双侧CMCT、CL各组之间以及各组双侧CMCT、CL比较差异均无显著性意义(*P*>0.05)。④治疗14d时,100% MT亚组左侧CMCT、CL较正常组缩短,且左侧CMCT较右侧缩短(*P*<0.05);右侧CMCT、CL各组之间以及各组双侧CL的比较差异均无显著性意义(*P*>0.05)。⑤左侧CMCT、CL,100% MT亚组治疗14d时较术前和治疗7d时均缩短;80% MT亚组治疗14d时CMCT较术前缩短;120% MT亚组术后1d较术前缩短;模型组治疗14d时较术前缩短(*P*<0.05);余组各时间点差异均无显著性意义(*P*>0.05)。⑥右侧CMCT、CL,80% MT亚组治疗14d时较术后1d缩短,且治疗7d时CL较术后1d缩短(*P*<0.05);100% MT亚组治疗14d时较术前缩短,治疗14d时CMCT较治疗7d时缩短(*P*<0.05);余组各时间点差异均无显著性意义,*P*>0.05。

3 讨论

双侧大脑半球间抑制的失衡被认为是脑卒中后一个明显异常的电生理模式。该观点认为双侧运动区之间经胼胝体的相互抑制的不平衡可能阻碍运动的恢复。已有建议用体外诱导抑制健侧半球或者易化患侧半球M1区的兴奋性以提高脑卒中后患手的运动功能^[4]。rTMS可以起到这种调节作用,根据不

表2 各时间点组间、组内左右侧及各时间点前后CMCT的比较 (x±s, ms)

组别	鼠数	术前		术后1d		治疗7d		治疗14d	
		左侧	右侧	左侧	右侧	左侧	右侧	左侧	右侧
正常组	7	4.86±0.13	4.69±0.21	4.70±0.42	4.70±0.39	4.77±0.20	4.76±0.45	4.69±0.31	4.64±0.24
模型组	7	4.93±0.15	4.93±0.29	4.57±0.45 ^②	5.21±0.44 ^{③④}	4.47±0.20 ^⑥	4.86±0.40	4.49±0.31 ^⑤	4.86±0.45
假刺激组	8	4.70±0.17	4.73±0.24	4.34±0.35 ^①	4.70±0.41	4.61±0.34	4.85±0.43	4.56±0.27	4.84±0.47
80% MT亚组	7	4.97±0.40 ^④	4.97±0.28 ^{③④}	4.74±0.29	5.23±0.37 ^{③④}	4.63±0.33	4.77±0.48	4.57±0.39 ^⑤	4.73±0.31 ^⑦
100% MT亚组	7	4.83±0.28	4.89±0.13	4.44±0.40 ^①	4.86±0.42	4.80±0.42	4.90±0.24	4.27±0.32 ^{③①⑥⑧}	4.51±0.29 ^{⑤⑧}
120% MT亚组	7	4.84±0.24	4.77±0.22	4.41±0.43 ^{②⑤}	4.89±0.54	4.73±0.28	4.76±0.21	4.57±0.32	4.64±0.50

与右侧比较:①P<0.05,②P<0.01;与正常组比较:③P<0.05;与假刺激组比较:④P<0.05与术前比较:⑤P<0.05,⑥P<0.01;与术后1d比较:⑦P<0.05;与治疗7d比较:⑧P<0.05

表3 各时间点组间、组内左右侧及各时间点前后CL的比较 (x±s, ms)

组别	鼠数	术前		术后1d		治疗7d		治疗14d	
		左侧	右侧	左侧	右侧	左侧	右侧	左侧	右侧
正常组	7	7.16±0.13	7.00±0.18	7.07±0.58 ^④	7.06±0.49	7.11±0.27	7.01±0.46	7.09±0.40	7.06±0.32
模型组	7	7.24±0.21	7.26±0.33	6.90±0.40 ^②	7.57±0.39 ^{③④}	6.83±0.21 ^{①⑤}	7.24±0.40	6.93±0.32 ^⑤	7.27±0.53
假刺激组	8	6.99±0.19	7.05±0.21	6.63±0.38 ^①	7.05±0.48	7.05±0.47	7.23±0.43	6.89±0.32	7.15±0.45
80% MT亚组	7	7.31±0.46 ^④	7.33±0.46 ^③	7.16±0.32 ^④	7.61±0.29 ^{③④}	6.94±0.32	7.10±0.41 ^⑦	6.93±0.40	7.14±0.30 ^⑦
100% MT亚组	7	7.14±0.32	7.19±0.13	6.84±0.33 ^②	7.34±0.50	7.19±0.41	7.27±0.27	6.69±0.25 ^{③⑥⑧}	6.90±0.26 ^⑤
120% MT亚组	7	7.19±0.17	7.11±0.23	6.71±0.40 ^{②⑤}	7.23±0.56	7.03±0.26	7.10±0.22	6.94±0.30	7.06±0.59

与右侧比较:①P<0.05,②P<0.01;与正常组比较:③P<0.05;与假刺激组比较:④P<0.05;与术前比较:⑤P<0.05,⑥P<0.01;与术后1d比较:⑦P<0.05;与治疗7d比较:⑧P<0.05

同的刺激参数,抑制或易化皮质兴奋性,使两半球间的抑制平衡正常化,引起可能的皮质感觉运动区神经的可塑性改变以改善脑卒中后的运动功能^[3-4]。

通常认为≤1Hz的rTMS为低频,对大脑皮质的兴奋性起抑制作用,≥5Hz的rTMS为高频,对大脑皮质的兴奋性起易化作用。而且研究证实这种调节在刺激结束后仍能持续几分钟,其作用机制类似于神经突触反复激活后在海马区观察到的长时程增强或长时程抑制的突触活动^[4]。

TMS则是一项研究运动通路完整性,对预测运动功能恢复状况非常有用的技术。动物实验和临床研究结果均显示,TMS诱导的MEP与运动功能间存在着很好地相关性,运动功能的异常总是伴有MEP的改变,如CMCT、CL的延长,甚至是MEP的完全消失等^[10]。

CMCT是对皮质运动区到脊髓运动神经元之间的神经传导时间的估计,包括皮质神经元的兴奋、通过皮质脊髓束的传导以及脊髓运动神经元超过引起靶肌肉兴奋的阈值所需的时间^[10]。CMCT、CL的延长可有几种机制,比如对缺血性损伤易感的快的皮质脊髓纤维的缺失,对慢传导纤维的募集,或者皮质脊髓投射减少以及髓鞘脱失导致的皮质运动下行冲动在脊髓水平暂时整合以代偿下行传导冲动的减少^[10-11]。

本实验显示脑梗死术后的大鼠,在患肢上仍能记录到MEP波,这可能与突触和轴突的不同恢复有关。因为有研究发现MCAO 3h后轴索可迅速恢复,但是即使1h的局部缺血也会引起运动皮质长期的突触传递缺失。尽管突触兴奋缺失,皮质刺激仍可直接兴奋运动神经元轴突,进而沿锥体束下传引起瘫痪肌肉的运动诱发电位^[12]。线圈较大刺激了其他运动相关皮质进而引起神经冲动的下传也是不能排除的因素。

术后1d左侧CMCT、CL均较术前和右侧缩短(P<0.01),右侧CMCT、CL较术前差异无显著性意义(P>0.05)。众所周知,靶肌肉轻微收缩可以引起TMS诱导的MEP潜伏时的缩短,这是一种常用的易化方法。易化现象提示皮质神经元的兴奋性增强^[13]。故推测脑梗死后健侧皮质神经元的兴奋性增高,患侧皮质神经元的兴奋性较健侧降低,大脑半球间的抑制失衡。健侧CMCT、CL的缩短可能和健侧皮质神经元的高兴奋性致皮质神经元达到兴奋的时间缩短有关。

治疗7d时,双侧CMCT、CL各组间及各组左右侧CMCT、CL比较差异均无显著性意义(P>0.05)。提示在治疗7d时,rTMS对脑梗死大鼠的干预和脑梗死大鼠的自然恢复并无差别,各组脑梗死大鼠的健侧和患侧大脑半球的兴奋性达到了新的平衡。

治疗14d时,100% MT亚组左侧CMCT、CL较正常组缩短,且左侧CMCT较右侧缩短均($P<0.05$)。说明100% MT的rTMS对脑梗死大鼠干预14d后,出现了双侧大脑半球兴奋性的再次失衡,且以健侧大脑兴奋性增高为主。可能是因为患侧大脑经胼胝体对健侧大脑的抑制减低所致,或者是通过大脑的某种环路促进了健侧大脑的代偿功能,其机制还有待进一步的研究。

100% MT亚组治疗14d时左侧CMCT、CL较正常组和治疗7d时均缩短,双侧CMCT、CL均较术前缩短($P<0.05$);80% MT亚组治疗14d时右侧CMCT、CL均较术后1d缩短($P<0.05$)。说明低中剂量(80%、100% MT)的rTMS治疗14d后对大脑的兴奋性均有所改变。因有研究发现患侧半球皮质内抑制无论增强还是减弱,运动功能均有改善^[14]。故推测这两种剂量的rTMS作用效果可能较好,可能通过缩短双侧中枢的传导时间以达到某种平衡或者代偿,具体机制有待进一步的研究。120% MT亚组治疗7d、14d与术前术后比较差异均无显著性意义,说明干预作用不明显或者是观察的时间不够长。模型组左侧CMCT、CL治疗14d时较术前缩短($P<0.05$),但较术后和治疗7d比较差异均无显著性意义,提示脑梗死后的自然恢复可能主要是健侧大脑的兴奋性增加。

术前双侧CMCT 80%MT亚组较均较假刺激组延长,右侧CMCT 80%MT亚组较正常组也延长($P<0.05$)可能是由于样本量小且个体间差异较大所致,有待进一步的实验验证。

本实验研究还发现,各时间点各组之间比较差异并不明显,考虑到大脑半球间对TMS的反应差异极其有限^[10-11],故提示半球间的不对称分析比与对照组的比较分析更敏感;脑梗死后CMCT和CL的变化趋势基本一致,提示脑梗死后CMCT的变化主要受CL的影响;CMCT和CL检测对脑梗死后健侧大脑的高兴奋异常较患侧大脑的低兴奋更易测出。

4 结论

20Hz rTMS有助于促进脑梗死大鼠双侧CMCT和CL缩短,使双侧大脑达到某种平衡或者代偿。80% MT、100% MT的rTMS作用可能较大,但其具

体作用机制有待进一步研究。

参考文献

- [1] 戴毅,崔丽英.经颅磁刺激的基础与临床应用[J].中华神经科杂志,2008,41(8):557—559.
- [2] Hummel FC, Cohen LG. Non-invasive brain stimulation: a new strategy to improve neurorehabilitation after stroke?[J]. Lancet Neurol, 2006,5(8):708—712.
- [3] Fregni F, Pascual-Leone A. Technology insight: noninvasive brain stimulation in neurology—perspectives on the therapeutic potential of rTMS and tDCS[J]. Nat Clin Pract Neurol, 2007, 3(7):383—393.
- [4] Nowak DA, Grefkes C, Ameli M, et al. Interhemispheric competition after stroke: brain stimulation to enhance recovery of function of the affected hand[J]. Neurorehabil Neural Repair, 2009,23(7):641—656.
- [5] 孙毅,汤晓芙,郭玉璞.经颅磁刺激安全性的实验研究[J].中华神经科杂志,1996, 29 (4):217—221.
- [6] Luft AR, Kaelin-Lang A, Hauser TK, et al. Transcranial magnetic stimulation in the rat[J]. Exp Brain Res, 2001,140(1): 112—121.
- [7] 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): 321—324.
- [8] Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, et al. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurological examination[J]. Stroke, 1986,17(3):472—476.
- [9] Hiscock A, Miller S, Rothwell J, et al. Informing dose-finding studies of repetitive transcranial magnetic stimulation to enhance motor function: a qualitative systematic review[J]. Neurorehabil Neural Repair, 2008,22(3):228—249.
- [10] Chen R, Cros D, Curra A, et al. The clinical diagnostic utility of transcranial magnetic stimulation: Report of an IFCN committee[J]. Clin Neurophysiol, 2008,119(3):504—532.
- [11] Pennisi G, Alagona G, Rapisarda G, et al. Transcranial magnetic stimulation after pure motor stroke[J]. Clin Neurophysiol, 2002,113(10):1536—1543.
- [12] Bolay H, Gürsoy-Ozdemir Y, Unal I, et al. Altered mechanisms of motor-evoked potential generation after transient focal cerebral ischemia in the rat: implications for transcranial magnetic stimulation[J]. Brain Res, 2000,873(1):26—33.
- [13] Yang HD, Minn YK, Son IH, et al. Facilitation and reciprocal inhibition by imagining thumb abduction[J]. J Clin Neurosurg, 2006,13(2):245—248.
- [14] Liepert J. Motor cortex excitability in stroke before and after constraint-induced movement therapy[J]. Cog Behav Neurol, 2006,19(1):41—47.