·基础研究·

神经肌肉促进技术与脑梗死大鼠偏瘫侧肢体骨密度和血瘦素水平*

王聪聪[1] 贾立坤[2] 张秀清[2,3]

摘要

目的:探讨神经肌肉促进技术对脑梗死大鼠偏瘫侧肢体骨密度和血瘦素水平的影响。

方法:40只老年雌性Wistar大鼠随机分为假手术组10只和脑梗死模型组30只,用线栓法致大脑中动脉闭塞制备偏瘫大鼠模型,随机分为对照组、常规治疗组、常规治疗加神经肌肉促进技术治疗组(综合组)。在治疗半个月、1个月、2个月、3个月4个时间点,通过测定偏瘫肢体近端骨密度(BMD)、血清总碱性磷酸酶(ALP)、骨碱性磷酸酶(BALP)、骨钙素(BGP)、白介素-6(IL-6)观察骨质疏松情况,同时也观察了血瘦素((LP)水平的变化。

结果:①治疗第1个月起,常规治疗加神经肌肉促进技术组血清BGP、BALP和ALP水平较对照组明显增高;治疗第2月起,常规治疗组和常规治疗加神经肌肉促进技术组骨密度、BALP和ALP水平明显高于对照组;治疗第3月时,常规治疗加神经肌肉促进技术组骨密度、血清BALP和ALP水平明显高于常规治疗组。治疗第1个月起,常规治疗加神经肌肉促进技术组血清IL-6水平较对照组下降;治疗2月起,常规治疗组血清IL-6水平较对照组下降,常规治疗加神经肌肉促进技术组与假手术组差异无显著性意义($P>0.05$);治疗第3个月时,两治疗组血清IL-6水平与假手术差异无显著性意义($P>0.05$)。②治疗第1个月起,常规治疗组和常规治疗加神经肌肉促进技术组血清LP水平明显高于对照组;治疗第2个月起, 常规治疗加神经肌肉促进技术组血清LP水平明显高于常规治疗组;治疗第3个月时,常规治疗加神经肌肉促进技术组与假手术组血清LP水平差异无显著性意义($P>0.05$)。

结论:神经肌肉促进技术升高血清BGP、BALP、ALP水平,降低血清IL-6水平,改善了偏瘫侧肢体骨密度水平,从而预防骨质疏松症的发生、发展,其机制可能与上调血瘦素水平改善骨形成、抑制骨吸收有关。

关键词 神经肌肉促进技术;脑梗死;血瘦素;骨密度

中图分类号:R743 **文献标识码**:A **文章编号**:1001-1242(2012)-08-0692-05

Effects of neuromuscular facilitation technique on bone mineral density of paralyzed limb and expression of serum leptin level following cerebral infarction in rats/WANG Congcong, JIA Likun,ZHANG Xiuqing// Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2012, 27(8): 692—696

Abstract

Objective: To investigate the effects of neuromuscular facilitation technique on bone mineral density(BMD) of paralyzed limb and expression of serum leptin(LP) level following cerebral infarction in rats.

Method: Acute cerebral infarction was modeled in aged female Wistar rats using permanent middle cerebral artery occlusion(PMCAO) technique. Forty rats were randomly divided into sham operation group, control group, conventional treatment group, conventional treatment combined with neuromuscular facilitation technique group(combined treatment group), each group had 10 rats. The conditions of osteoporosis were examined by measuring BMD of proximal paralyzed limb, serum total alkaline phosphatase (ALP), bone alkaline phosphatase (BALP), osteocalcin (BGP), interleukin -6 (IL-6) after treatment for 0.5, 1, 2, and 3 months.In addition,the expression of LP was de-

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2012.08.002

*基金项目:山东省自然科学基金资助项目(Y2007C070)

1 山东大学医学院神经内科,济南市历下区经十路16766号,250012; 2 山东省千佛山医院; 3 通讯作者

作者简介:王聪聪,女,硕士研究生; 收稿日期:2012-02-06

termined by enzyme-linked immunosorbent assay at different time points.

Result: ①After 1 month of treatment, the expressions of serum BGP、BALP and ALP in combined treatment group were significantly higher than that in control group; after 2 months of treatment, compared with control group the expressions of serum BALP,ALP and BMD elevated remarkably in combined treatment group and conventional treatment group; after 3 months of treatment, it were higher in combined treatment group than that in conventional treatment group. After 1 month of treatment compared with control group, the expression of serum IL-6 decreased in combined treatment group; after 2 months of treatment that decreased in conventional treatment group, there was no significant difference between sham operation group and combined treatment group; after 3 months of treatment there was no significant difference of the expression of serum IL-6 in sham operation group and two treatment groups. ②After 1 month of treatment the expression of serum LP was significantly higher in two treatment groups than that in control group; after 2 months of treatment it was significantly higher in combined treatment group than that in conventional treatment group; after 3 months of treatment there was no significant difference between sham operation and combined treatment group.

Conclusion: Neuromuscular facilitation technique can improve BMD of hemiplegic limb after cerebral infarction by increasing serum BGP, BALP, ALP levels and decreasing serum IL-6 level , thereby preventing osteoporosis occurrence and development, which may be associated with up-regulation of expression of LP to promote the proliferation and differentiation of osteoblasts and the bone formation as well as inhibit the absorption of osteoclast.

Author's address Department of Neurology,Qianfoshan Hospital, Shandong University,Jinan,250014

Key word neuromuscular facilitation technique; cerebral infarction; serum leptin; bone mineral density

脑卒中患者因长期卧床和肌动异常可引起不同程度的骨质疏松症,偏瘫侧肢体尤为明显,而且脑卒中患者较正常人更易摔倒,导致骨折发生率也明显增高,严重影响患者生存质量。脑卒中后骨质疏松症的治疗成为现代康复治疗中的新方向。本实验通过对脑梗死大鼠偏瘫肢体进行神经肌肉促进技术治疗,观察神经肌肉促进技术对偏瘫肢体骨密度、血瘦素水平的影响,探索神经肌肉促进技术防治脑卒中继发性骨质疏松的作用和可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

健康老年雌性Wistar大鼠由山东省中医药大学提供,鼠龄6个月,体重300—350g。利用线栓法制作左侧大脑中动脉永久性闭塞模型,将造模成功的30只大鼠进行完全随机分组,分为对照组、常规治疗组、常规治疗加神经肌肉促进技术治疗组(综合组),每组各10只,另外假手术组10只。

1.2 实验方法

1.2.1 脑梗死模型制作:参考Longa等[1]介绍的方法改良后制作大鼠脑梗死模型。选用日本产尼龙线,直径0.205mm,每段长40mm,头端烧成光滑球形,具体方法如下:用10%水合氯醛(300mg/kg体重)腹腔注射麻醉大鼠后,将其仰卧固定于手术台上;颈部正中切开皮肤,钝性分离颈部肌肉及颌下腺,暴露分离出左侧颈总动(common carotid artery,CCA)、迷走神经、颈外动脉(external carotid artery,ECA)和颈内动脉(internal carotid artery,ICA);结扎ECA以及CCA近心端,并在CCA分叉处近心端放一线备用,在备用线与CCA近心端结扎处剪一"V"形切口;用制备好的尼龙线沿CCA插入ICA至大脑中动脉起始处,进线长度距离颈总动脉分叉处为(18.5 ± 0.5)mm,然后将备用线结扎以固定栓线;局部伤口用青霉素稀释液冲洗,以预防感染,顺序缝合肌肉皮肤。假手术组处理同上,线栓只插至距CCA分叉5mm处。按Longa等[1]介绍的5分制评分标准,在手术结束、大鼠麻醉清醒后进行评分:0分为无神经功能缺失;1分为提尾时右前肢屈曲;2分为向右侧转圈、追尾;3分为向右侧倾倒;4分为意识障碍。评分1—3分为造模成功。

1.2.2 干预措施: 一般治疗组于造模后24h给予胞二磷胆碱500mg/kg体重(山东齐鲁制药)腹腔注射[2],每天1次。神经肌肉促进技术治疗组在上述药物治疗基础上对其患侧前肢加用神经肌肉促进技术。方

法：采用自制滚筒式网状训练器：其中长1.0m,直径60cm的圆形网状仪器;中间被分为4个格;可同时训练4只鼠;底座有一固定架;一端有一手摇柄;可手摇按5转/min进行转动训练;该器材可训练大鼠的抓握、旋转、行走等运动,术后第3天起,10min/d,5d/周。

1.2.3 骨质疏松情况评估:①骨密度测定：各组大鼠治疗后0.5月、1月、2月、3月，用GE公司的LUNAR-Prodigy双能X线骨密度测定仪进行测定。方法：用10%水合氯醛麻醉. 将大鼠双上肢伸展。固定于检测台上，确定扫描区域在大鼠双上肢范围内，扫描后选中左侧上肢近端，得出骨密度值，最后进行计算机分析。②血清骨钙素（osteocalcin，bone gamma carboxyglutamic acid containing proteins, BGP）、骨碱性磷酸酶(bone alkaline phosphatase，BALP)、血清总碱性磷酸酶(serum total alkaline phosphatase，ALP)、白介素-6（interleukin-6，IL-6)含量测定：各组大鼠治疗后在上述各时间点，颈静脉窦抽血，3000转/min离心15min,取上清液,保存于-20℃冰箱中待测。取血前大鼠禁食12h，不禁水。采用ELISA法检测血清BGP、BALP、ALP、IL-6含量。分别按照大鼠BGP、BALP、ALP、IL-6 ELISA试剂盒说明书进行操作，检测入为450nm时的吸光值，以吸光度值为纵坐标，相应的标准品浓度为横坐标，作相应曲线，样品的相应含量可根据其吸光度值由标准曲线换算出相应的浓度。用自动生化分析仪测定ALP含量。

1.2.4 血瘦素测定：分别于大鼠治疗后上述时间点，按照上述方法取大鼠血清，采用ELISA法检测血清瘦素（Leptin，LP）含量。按照大鼠LP ELISA试剂盒（武汉博士德试剂公司）说明书进行操作，检测入为450nm时的吸光值，以吸光度值为纵坐标，相应的标准品浓度为横坐标，作相应曲线，样品的瘦素含量可根据其吸光度值由标准曲线换算出相应的浓度。

1.3 统计学分析

采用SPSS 17.0版统计软件对数据处理，每个时间点分别进行两样本均数比较的t检验，组间比较用单因素方差分析进行统计学分析。

2 结果

2.1 神经肌肉促进技术对骨密度的影响

本研究显示，对照组及两个治疗组骨密度均低于假手术组，尤其是对照组从半个月开始骨密度持续减少（$P<0.01$）。治疗2个月时两治疗组骨密度明显高于对照组（$P<0.05$），但两治疗组间骨密度差异无显著性意义（$P>0.05$）；治疗3个月时，常规治疗加神经肌肉促进技术治疗组骨密度明显高于对照组、常规治疗组($P<0.05$)。见表1。

2.2 神经肌肉促进技术对血清BGP、BALP、ALP、IL-6表达的影响

2.2.1 血清BGP含量检测结果：治疗1、2、3个月常规治疗加神经肌肉促进技术治疗组血清BGP含量较对照组高（$P<0.05$）；常规治疗组治疗3个月时血清BGP含量较对照组高（$P<0.05$),但低于常规治疗组加神经肌肉促进技术治疗组（$P<0.05$）。见表2。

2.2.2 血清BALP和ALP含量检测结果：治疗1个月时常规治疗加神经肌肉促进技术治疗组较常规治疗组、对照组血清BALP、ALP增加（$P<0.0.5$）；治疗2、3个月时两治疗组血清BALP、ALP含量较对照组增加（$P<0.05$),且常规治疗加神经肌肉促进技术组更加显著（$P<0.01$）。见表3—4。

2.2.3 血清IL-6含量检测结果：对照组血清IL-6含量较假手术组明显增高（$P<0.05$）。治疗1个月起，常规治疗加神经肌肉促进技术治疗组血清IL-6含量明显低于对照组、常规治疗组（$P<0.01$）；治疗2个月时，两治疗组血清IL-6含量低于对照组，且常规治疗加神经肌肉促进技术治疗组明显低于常规治疗

表1 各组大鼠各时间点骨密度值（n=10，$\bar{x}\pm s$，$\times 10^{-2}$g/cm^2）

组别	造模后时间			
	半个月	1个月	2个月	3个月
对照组	11.3±1.5	10.8±1.2	10.4±1.0	10.1±0.8
常规治疗组	11.2±1.2	10.9±0.8	12.5±1.1①	12.6±1.0
常规治疗+神经肌肉促进术组	11.4±1.0	10.9±1.1	12.6±1.5①	13.4±0.6①③
假手术组	13.6±1.1	13.8±0.8	13.6±1.5	13.9±1.0

与对照组比较:①$P<0.05$;②$P<0.01$; 常规治疗加神经肌肉促进术治疗组与常规治疗组比较:③$P<0.05$

表2 各组大鼠各时间点血清BGP水平比较(n=10，$\bar{x}\pm s$，μg/L)

组别	造模后时间			
	半个月	1个月	2个月	3个月
对照组	1.58±0.13	2.15±0.14	2.25±0.30	2.50±0.47
常规治疗组	1.54±0.21	2.14±0.20	2.21±0.13	2.73±0.55①
常规治疗+神经肌肉促进术组	1.61±0.12	2.80±0.06①	2.91±0.11①	3.20±0.74①③
假手术组	1.52±0.10	1.52±0.24	1.59±0.16	1.64±0.55

与对照组比较:①$P<0.05$;②$P<0.01$; 常规治疗加神经肌肉促进术治疗组与常规治疗组比较:③$P<0.05$

组(*P*<0.05);治疗3个月时常规治疗加神经肌肉促进技术治疗组血清IL-6含量与常规治疗组差异无显著性意义(*P*>0.05)。见表5。

2.3 神经肌肉促进技术对血清瘦素水平的影响

治疗1个月时,常规治疗组和常规治疗加神经肌肉促进技术组血清LP水平明显高于对照组(*P*<0.05);治疗2个月时,常规治疗加神经肌肉促进技术组血清LP水平明显高于常规治疗组(*P*<0.05);治疗3个月时,常规治疗加神经肌肉促进技术组与假手术组血清LP水平差异无显著性意义(*P*>0.05)。见表6。

表3 各组大鼠各时间点血清BALP水平比较(n=10,$\bar{x}\pm s$,U/L)

组别	造模后时间			
	半个月	1个月	2个月	3个月
对照组	53.4±6.7	67.3±5.1	68.5±3.4	82.8±7.8
常规治疗组	51.8±4.1	68.4±1.3	76.5±4.6①	97.5±3.9①
常规治疗+神经肌肉促进术组	54.6±4.5	84.1±5.6①③	125.0±3.8②	129.6±7.6②
假手术组	50.4±3.1	51.8±3.5	51.5±5.6	51.3±4.3

与对照组比较:①*P*<0.05;②*P*<0.01;常规治疗加神经肌肉促进术治疗组与常规治疗组比较:③*P*<0.05

表4 各组大鼠各时间点血清ALP水平比较(n=10,$\bar{x}\pm s$,U/L)

组别	造模后时间			
	半个月	1个月	2个月	3个月
对照组	162.1±1.7	163.4±2.1	160.7±3.6	178.5±1.8
常规治疗组	163.1±2.6	162.3±2.2	162.1±1.7①	252.3±2.0①
常规治疗+神经肌肉促进术组	160.4±1.2	251.0±1.6①③	263.1±2.4②	312.4±3.5②
假手术组	102.0±3.8	105.3±1.4	106.3±2.4	103.2±1.2

与对照组比较:①*P*<0.05;②*P*<0.01;常规治疗加神经肌肉促进术治疗组与常规治疗组比较:③*P*<0.05

表5 各组大鼠各时间点血值IL-6水平比较(n=10,$\bar{x}\pm s$,ng/ml)

组别	造模后时间			
	半个月	1个月	2个月	3个月
对照组	0.208±0.021	0.215±0.012	0.206±0.025	0.218±0.023
常规治疗组	0.194±0.018	0.208±0.015	0.180±0.010①	0.168±0.012
常规治疗+神经肌肉促进术组	0.196±0.023	0.174±0.022②③	0.167±0.012①③	0.165±0.024
假手术组	0.152±0.022	0.155±0.021	0.152±0.030	0.160±0.032

与对照组比较:①*P*<0.05;②*P*<0.01;常规治疗加神经肌肉促进术治疗组与常规治疗组比较:③*P*<0.05

表6 各组大鼠各时间点瘦素水平比较(n=10,$\bar{x}\pm s$,μg/L)

组别	造模后时间			
	半个月	1个月	2个月	3个月
对照组	2.52±0.32	2.55±0.61	2.67±0.21	2.89±0.45
常规治疗组	2.48±0.57	4.13±0.75①	4.38±0.52	6.21±0.62
常规治疗+神经肌肉促进术组	3.30±0.54	4.50±0.71②	5.85±0.63②③	6.26±0.55
假手术组	5.85±0.61	5.78±0.37	5.80±0.30	6.26±0.34

与对照组比较:①*P*<0.05;②*P*<0.01; 常规治疗加神经肌肉促进术治疗组与常规治疗组比较:③*P*<0.05

3 讨论

骨密度测定是目前诊断骨质疏松、预测脆性骨折风险和评价药物干预疗效的最佳定量指标[6]。虽然单独的骨密度测定无法准确反映由于骨质改变所致的骨结构和骨性能的异常,也不能全面评价骨质量和骨生物学性能上的变化,但骨密度可反映约70%的骨强度,双能X线吸收法是目前国际学术界公认的骨密度检查方法,其测定值被作为骨质疏松症的诊断金标准。本实验显示两治疗组在治疗2个月时BMD较对照组高,在治疗3个月时常规治疗加神经肌肉促进技术治疗组较常规治疗组效果明显。本实验发现,结合BMD和一些骨代谢生化指标血清BGP、BALP、ALP、IL-6水平,神经肌肉促进技术能够促进骨吸收同时抑制骨形成,从而明显改善脑梗死大鼠偏瘫肢体骨密度水平,预防骨质疏松。陈一冰等[7]研究发现运动后大鼠骨转换增高,在骨吸收轻度增强的基础上骨形成显著增加,从而促进了骨密度增加。Davey等[8]也认为运动会引起骨碱性磷酸酶和I型前胶原羧基端前肽等骨形成生化标志物显著升高,而骨吸收生化标志物I型胶原交联N末端肽显著下降。此结论与本实验结果吻合,但运动影响骨代谢的机制不清。在LP与脑血管病之间关联的研究方面,20世纪90年代末欧洲研究就提出高水平瘦素为脑出血的危险因素[10],现代研究提出瘦素与诸多脑血管疾病危险因素密切,但是关于瘦素在脑血管病中的调控作用及具体机制尚不完全清楚。细胞系研究与动物实验[11]已经证明瘦素在急性炎症过程中起重要作用,作为炎症介质网络中的一种因子,具有抑制炎症的作用。陈国芳等[12]研究LP水平在急性脑梗死后持续升高。茅新蕾等[13]研究发现男女脑梗死患者瘦素水平均较对照组升高,然而在动脉粥样硬化性血栓性脑梗死和腔隙性脑梗死患者中均无显著性意义,即使校正后依然无显著差异。但是研究显示LP对骨质疏松有保护作用,Scariano[14]等通过调查100例绝经后妇女和37例男性,发现LP与骨密度相关,校正骨密度后瘦素与骨形成呈正相关,提示LP有提高骨密度的作用。瘦素对骨质疏松的保护作用有可能的机制[15—16]:①瘦素在中枢通过神经系统介导对骨组织有抑制骨形成的作用。②然而瘦素在外周有强烈促进骨形成的作用。首先,瘦素

呈剂量、时间依赖性地提高ALP、I型胶原及BGP的信使RNA与蛋白质水平；其次瘦素能够促进胶原合成，刺激成骨细胞增殖、分化，保护分化成熟的成骨细胞，减少其凋亡；另外瘦素还能增加人类骨髓基质细胞中的护骨素水平从而抑制破骨细胞的生成，诱导人类单核细胞白介素-1受体拮抗剂的表达和分泌从而阻断了白介素-1介导的骨量丢失增加。③关于瘦素对骨组织的中枢抑制作用和外周促进作用哪个占主导地位的问题，相关研究表明由于瘦素主要由骨髓中脂肪细胞和骨组织细胞自身产生，因此其在骨组织环境中局部浓度较高，瘦素的外周局部作用可能占主导地位。而且实验表明瘦素全身给药后对成骨细胞和骨形成的作用也说明了其外周作用的直接性。另一方面，由于脂肪量与骨密度成正比，产生较多的高脂肪机体并未出现中枢调节下的骨量下降。综上所述，说明与中枢间接抑制骨量作用相比，瘦素对成骨细胞的直接调节更主要，对骨量起到保护的作用。

本实验通过酶联免疫法测定各组脑梗死大鼠血清瘦素水平，显示常规治疗加神经肌肉促进技术组血清瘦素水平高于其他实验组及对照组，而且血清瘦素水平从1个月时开始高于对照组和常规治疗组，2个月时达最高峰，3个月时趋于平稳，仍保持较高水平，明显高于对照组。由此推测神经肌肉促进技术改善脑梗死偏瘫肢体骨密度水平可能包括上调血清瘦素水平，改善骨形成、抑制骨吸收，从而改善脑梗死偏瘫肢体骨密度水平，促进运动功能的恢复，预防偏瘫肢体骨质疏松症的发生发展，但是神经肌肉促进技术改善偏瘫肢体骨密度的机制是多方面的，以及如何上调血清瘦素水平尚不十分清楚。另外，瘦素对脑血管病的具体机制及如何发挥调控作用需要进一步深入研究。

参考文献

[1] Longa EZ, Weinstein PR, CadBon S,et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke,1989,20:84—91.

[2] Hurtado O,Moro MA,Cardenas A,et al. Neuroprotection afforded by prior citicoline administration in experimental brain ischemia: effects on glutamate transport[J]. Neurobiol Dis, 2005,18:336—345.

[3] 杨伟民，邵斌. 骨代谢生化指标与骨质疏松症[J]. 中国骨质疏松杂志，2004，1：118—121.

[4] Gad HI. The potential osteogenic effects of systemic leptin and insulin administration in streptozotocin-induced diabetic female rats[J]. Saudi Med J,2007,28(8):1185—1190.

[5] Kwan Tat S, Padrines M, Theoleyre S, et al. IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1:interrelations in bone resorption pathophysiology[J].Cytokine Growth Facter Rev,2004,l5:49—60.

[6] Siris ES, Chen YT, Abbott TA, et al. Bone mineral density thresholds for pharmacyological intervention to prevent fractures [J]. Arch Interm Med,2004,164(10):1108—1112.

[7] 陈一冰，李靖，熊正英，等. 运动对大鼠骨细胞凋亡及IGF-1表达的影响[J]. 中国运动医学杂志，2003，22(4)：418—419.

[8] Davey RA, Morris HA. Effects of dihydrotestrone on osteoblast gene expression in osteopenic ovariectomized rats[J]. Endocr Res ,2004,30(3):361—368.

[9] 明亮，何予工，黄宗强. 运动对骨质疏松症骨代谢生化指标的影响[J].中华物理医学与康复杂志，2007,29(7)：496—497.

[10] Soderberg S, Ahren B, Stegmayr B, et al.Leptin is a risk maker for first-ever hermorrhagic stroke in a population-based cohort[J].Stroke, 1999,30(2):328—337.

[11] 张江，王大力.瘦素与脑卒中[J].中国实用神经疾病杂志，2006,9(1):109—110.

[12] 陈国芳，耿德勤，蔚志刚. 瘦素和白细胞介素6、8与急性脑梗死的关系[J]. 中华急诊医学杂志，2007，16(10)：1074—1076.

[13] 茅新蕾,张颖冬. 缺血性脑卒中患者血浆胰岛素、瘦素水平的改变及其临床意义[J].临床神经病学杂志，2003,16(3):140—142.

[14] Scariano JK,Garry PJ, Montoya GD, et al.Serum leptin levels, bone mineral density and osteoblast alkaline phosphatase activity in elderly men and women[J]. Mech Ageing Dev,2003, 124(3):28l—286.

[15] 韩国胜，陈亮. 瘦素与骨代谢、骨质疏松关系的研究进展[J]. 中国康复医学杂志,2009,24(1)：95—97.

[16] 吴岩，许应星，肖鲁伟，等.瘦素对骨质疏松症效应的研究进展[J].中国骨质疏松杂志，2010,16(5)：377—379.