

# 功能性电刺激促进脑梗死大鼠肢体功能恢复的神经再生机制\*

向云<sup>1</sup> 王维<sup>1</sup> 杨万章<sup>1,2</sup> 何志承<sup>1</sup>

## 摘要

**目的:**观察功能性电刺激(FES)对急性脑梗死大鼠神经功能和梗死侧室管膜下区(SVZ)神经干细胞(NSC)增殖的影响,探讨FES治疗脑梗死后神经功能恢复的可能机制。

**方法:**将大鼠中动脉阻塞(MCAO)模型大鼠随机分为FES治疗组、安慰电刺激组和假手术组,于造模后第2天开始进行FES治疗。采用改良神经功能损害评分(mNSS)评定大鼠神经功能,运用免疫荧光染色检测梗死侧SVZ区溴脱氧尿嘧啶核苷(BrdU)及BrdU/巢蛋白(nestin)、BrdU/神经胶质纤维酸性蛋白(GFAP)双标阳性细胞表达数量。

**结果:**各时间点FES治疗组大鼠mNSS评分显著低于安慰电刺激组和假手术组( $P<0.05$ )。治疗后FES治疗组大鼠脑梗死侧SVZ区BrdU<sup>+</sup>细胞数较安慰电刺激组和假手术组明显增加( $P<0.05$ ),但各组BrdU<sup>+</sup>/nestin<sup>+</sup>细胞数占BrdU<sup>+</sup>细胞数比率无显著性差异( $P>0.05$ )。

**结论:**FES能显著促进脑梗死大鼠神经功能恢复,其中一个重要机制是通过促进梗死侧SVZ区NSC的增殖。

**关键词** 功能性电刺激;神经干细胞;溴脱氧尿嘧啶核苷

**中图分类号:**R454.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2013)-06-0533-05

**Study on effects of unctional electrical stimulation promoting neurologic function recovery and neural regeneration in rats with cerebral infarction/XIANG Yun, WANG Wei, YANG Wanzhang, et al//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2013, 28(6): 533—537**

## Abstract

**Objective:** To investigate the effects of functional electrical stimulation(FES) on neurologic function of rats with acute cerebral infarction and to explore it's possible mechanism of proliferation of neural stem cells(NSC) in the ischemic subventricular zone(SVZ).

**Method:** Acute cerebral infarction of rat's model was made by means of middle cerebral artery occlusion(MCAO). Rats were randomly allocated into FES group, placebo stimulation group and sham-operation group. FES treatment was carried out 2 days after operation. The modified neurological severity score(mNSS) was adopted to evaluate neurologic function. Bromodeoxyuridine(BrdU), BrdU /nestin and BrdU /glial fibrillary acid protein(GFAP) positive cells in the ischemic SVZ were detected by immunofluorescence staining technique.

**Result:** The mNSS score in FES group was lower significantly than that in placebo stimulation group and sham-operation group( $P<0.05$ ). Compared with other two groups, the expression levels of BrdU<sup>+</sup> cells in ischemic SVZ in FES group were significantly higher( $P<0.05$ ). The ratio of BrdU-nestin double-positive cells among BrdU-positive cells was not significantly different among three groups( $P>0.05$ ).

**Conclusion:** FES treatment can significantly improve the recovery of neurologic function of rats with acute cerebral infarction. One of the important mechanisms was promoting NSCs proliferation in ischemic SVZ.

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2013.06.010

\*基金项目:深圳市科技计划项目(201203223);南山区科技计划项目(南科研卫2011-006)

1 广东医学院附属南山医院康复医学科,深圳,518052; 2 通讯作者

作者简介:向云,男,博士,主治医师; 收稿日期:2012-12-31

**Author's address** Department of Rehabilitation Medicine, Nanshan Affiliated Hospital of Guangdong Medical College, Shenzhen, 518052

**Key word** functional electrical stimulation; neural stem cell; bromodeoxyuridine

功能性电刺激(functional electrical stimulation, FES)是利用一定强度的低频脉冲电流,刺激失去神经控制的肌肉,使其产生收缩,以替代或矫正肢体丧失的功能<sup>[1]</sup>。目前已广泛应用于偏瘫患者的康复治疗之中,对患者肢体感觉运动功能的恢复有着十分确切的促进作用<sup>[2]</sup>。但有关FES促进功能恢复机制的报道极少。Becker等<sup>[3]</sup>研究发现,功能性电刺激能促进成年脊髓受损大鼠神经祖细胞增殖。我们前期的研究也发现,功能性电刺激治疗能促进急性脑梗死大鼠脑内碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)、表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)的表达<sup>[4]</sup>。bFGF、EGF是促进神经干细胞(neural stem cell, NSC)增殖的最为重要的影响因子<sup>[5]</sup>。鉴于此,我们推测FES是通过上调生长因子水平进而发挥促进NSC增殖,改善肢体神经功能的作用。因此,本文在前期实验基础上,拟观察FES对急性脑梗死大鼠运动功能及梗死后侧室管膜下区(subventricular zone, SVZ)区NSC的影响,探讨FES改善脑梗死大鼠运动功能的内源性机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物及模型制作

成年雄性S-D大鼠,体重250—280g,周龄8—10周,由广东省实验动物中心提供。FES治疗组和安慰电刺激组参照Longa等<sup>[6]</sup>介绍的线栓法制成永久大脑中动脉梗死(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型,麻醉大鼠,于颈部中央切口,分离左侧颈总动脉、颈外动脉及颈内动脉,将鱼线(直径0.26mm,长30mm)从左侧颈总动脉插入颈内动脉约20mm以完全阻塞大脑中动脉血供。假手术组也进行同样的手术,但不予大脑中动脉阻断。

### 1.2 分组

造模成功第2天采用改良神经功能损害评分<sup>[7]</sup>(modified neurological severity score, mNSS)量表评定大鼠神经功能受损程度。评分为7—12分的大鼠入选本实验,随机分为FES治疗组、安慰电刺激

组,每组各12只大鼠。每个组又根据观察时间点分为第7、14天组2个亚组,每亚组6只大鼠。假手术组无任何症状。

### 1.3 干预措施

应用FES治疗仪(NeuroTrac™ Contenance, Verity Medical公司,英国)于术后第2天开始对FES治疗组进行治疗,先将大鼠俯卧位固定于大鼠固定器中,大鼠右侧前肢去毛并固定于外展90°位,将电刺激器的两个电极分别置于大鼠前肢背伸肌群的近端和远端,经皮刺激患侧前肢肌肉,产生稳定伸腕伸指动作。刺激参数为频率100Hz,脉宽200μs,强度为3—4mA,电流通断比为5s:8s,双向对称方波。每日2次,每次10min。安慰电刺激组连接相应的低频电刺激仪,但不予电流刺激。假手术组不予特殊处理。

### 1.4 神经功能缺损评定

mNSS:采用mNSS分别在FES治疗前、治疗第7、14天时进行神经功能缺损评定。该量表包括运动(肌肉状态、异常动作)、感觉(视觉、触觉、本体感觉)和反射检查,通过运动试验、感觉实验、平衡木实验、反射丧失和不正常运动,综合评价神经系统损伤的严重程度,4个项目的总和为最终评分。严重损伤评分为18—13分;中度损伤评分为12—7分;轻度损伤评分为6—1分。

### 1.5 5-溴脱氧尿嘧啶核苷(BrdU)注射及冰冻切片制作

治疗后第7、14天时间点处死大鼠,处死前3天开始腹腔注射BrdU(50mg/kg),每天2次,两次间隔8h。处死时给予大鼠腹腔注射10%水合氯醛(400mg/kg)麻醉。从大鼠左心室灌注磷酸缓冲液(PBS, 1M)150ml,再灌注4%多聚甲醛150ml,断头取脑,置于4%多聚甲醛内固定24h后,再置于25%蔗糖中脱水2d,冷冻包埋剂包埋,冰冻切片机将脑组织SVZ区切成30μm冠状切片。将切好脑组织置于含叠氮化钠的PBS溶液中,保存于4℃冰箱。

### 1.6 免疫荧光化学染色

脑组织切片做BrdU和巢蛋白(nestin)或者Br-

dU和神经胶质纤维酸性蛋白(Glial Fibrillary Acidic Protein, GFAP)双标。将大鼠脑片放于24孔板中;PBS漂洗,柠檬酸盐缓冲液微波抗原修复,自然冷却至室温;PBS漂洗,2N/L盐酸DNA变性60min;PBS漂洗,10%小牛血清+1.3% TritonX100 封闭非特异抗原及破膜1h后,吸干封闭液直接加入BrdU(绵羊多抗,1:200,Abcam公司);4℃孵育过夜(12—20h);PBS洗3次,滴加荧光二抗(驴抗绵羊,1:200, Dylight488,abcam公司),室温避光孵育1.5h;双染时,PBS洗3次,分别加入nestin(兔单抗,1:400, Abcam公司)或GFAP(小鼠多抗,1:500, abcam公司),室温中避光孵育3h;PBS洗3次,分别加入相应的二抗,驴抗兔(1:200, AF 594 Invitrogen公司)或者驴抗小鼠(1:200, AF 594 Invitrogen公司)室温中孵育1.5h;PBS洗3次,含DAPI防荧光淬灭液封片,通过激光共聚焦显微镜(Leica SP5)拍片统计。

### 1.7 免疫荧光结果分析

每个亚组6只动物,以梗死侧SVZ区为观察部位。每只大鼠随机抽取5张侧脑室脑片,用计算机图像分析软件(Image tool version 1.0),统计梗死侧SVZ区阳性细胞数。参照Kuhn等人的方法<sup>[8]</sup>,每张切片上选取一个固定的区域,0.15mm×0.15mm,计数该区域内所有阳性细胞并换算成细胞数/mm<sup>2</sup>单位表达。

### 1.8 统计学分析

采用SPSS 15.0统计学软件对神经功能评分及SVZ区阳性细胞数结果进行统计学分析,采用单因素方差分析比较不同时间点组间差异, $P<0.05$ 为差异有显著性意义。

## 2 结果

### 2.1 改良神经功能损伤评分mNSS

假手术组大鼠各时间点mNSS评分均为0分。治疗前,FES治疗组与安慰电刺激组同假手术组比较,两组均有神经功能损害( $P<0.05$ )。但FES治疗组与安慰电刺激组评分无明显差异( $P>0.05$ )。随着时间进展,FES治疗组和安慰电刺激组mNSS评分均显著降低( $P<0.05$ ),说明大鼠的神经功能均趋于好转。在第7、14天时间点上,FES组mNSS评分显著低于安慰电刺激组( $P<0.05$ ),说明FES能明显改

善脑梗死大鼠神经功能,见图1。

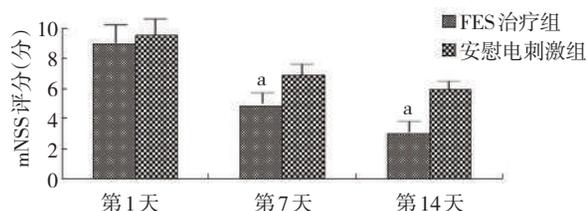
### 2.2 梗死侧SVZ区BrdU的表达

对于脑梗死侧SVZ区,三组大鼠在各时间点的组内比较显示:假手术组各个时间点之间差异无显著性意义;FES治疗组和安慰电刺激组BrdU阳性细胞数均在第7天增殖达到高峰,第14天时相对减少,两个时间点组内差异有显著性意义( $P<0.05$ );在不同时间点的组间结果比较:FES治疗组和安慰电刺激组的BrdU阳性细胞数均高于假手术组( $P<0.05$ );治疗第7、14天两时间点上,FES治疗组brdU阳性细胞数均较安慰电刺激组明显增加,差异有显著性意义( $P<0.05$ ),见图2。

### 2.3 BrdU阳性细胞特征

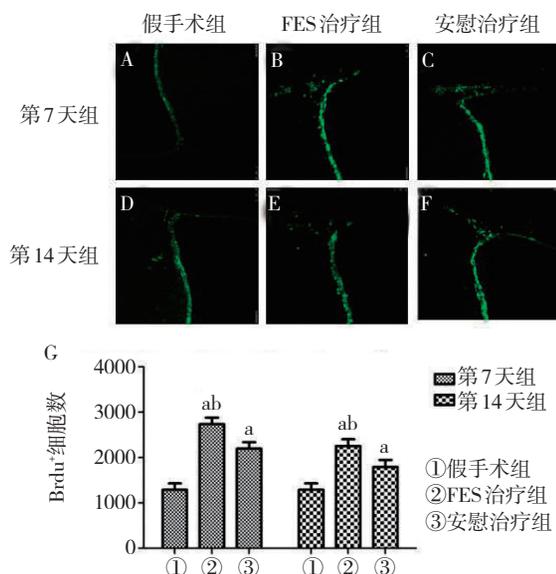
FES治疗组和安慰电刺激组梗死侧SVZ区Br-

图1 FES治疗组和安慰电刺激组mNSS评分比较



注:与安慰电刺激组相同时间点比较, $P<0.05$

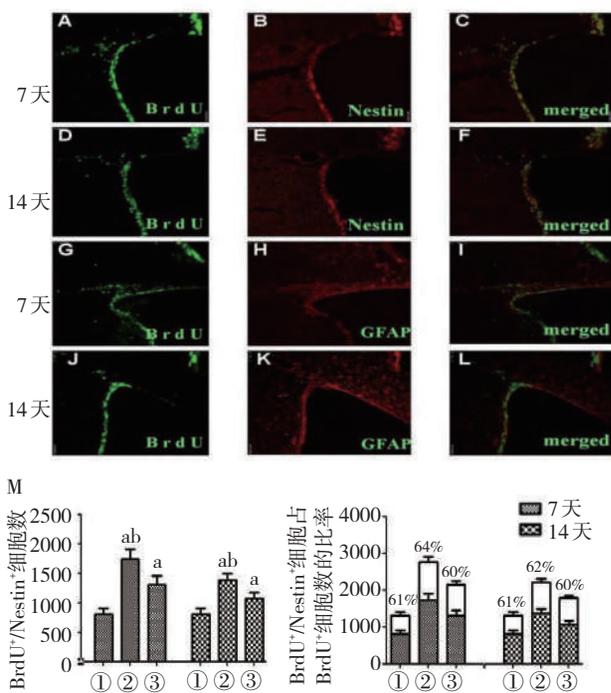
图2 大鼠梗死侧SVZ区BrdU<sup>+</sup>细胞数密度



A到F为三组大鼠各时间点梗死侧SVZ区BrdU免疫荧光染色。比例尺,75μm。G,三组大鼠各时间点梗死侧SVZ区BrdU<sup>+</sup>细胞数密度定量分析。与假手术组相同时间点比较,a: $P<0.05$ ;与安慰电刺激组相同时间点比较,b: $P<0.05$

dU<sup>+</sup>/nestin<sup>+</sup>细胞数均在治疗后第7天达到高峰,第14天时有所下降。两组各时间点BrdU<sup>+</sup>/nestin<sup>+</sup>细胞数均明显高于假手术组( $P < 0.05$ );在第7、14天,FES治疗组梗死侧SVZ区BrdU<sup>+</sup>/Nestin<sup>+</sup>细胞数均高于安慰电刺激组( $P < 0.05$ )。三组大鼠各时间点梗死侧SVZ区中BrdU<sup>+</sup>/nestin<sup>+</sup>细胞占BrdU<sup>+</sup>细胞的比率并没有明显的差异。在本研究中,三组大鼠各时间点梗死侧SVZ区均未发现BrdU<sup>+</sup>/GFAP<sup>+</sup>细胞,见图3。

图3 三组大鼠各时间点梗死侧SVZ区BruU阳性细胞特征



①假手术组;②FES治疗组;③安慰治疗组  
A到L分别为第7、14天 BrdU(A,D,绿色)与 nestin(B,E,红色),BrdU(G,I,绿色)与 GFAP(H,K,红色)免疫荧光双标染色。C,F,I和L分别是BrdU/Nestin,BrdU/GFAP合成图像。各时间点均未发现BrdU<sup>+</sup>/GFAP<sup>+</sup>细胞(I,L)。比例尺,75μm。M,三组大鼠各时间点梗死侧SVZ区BrdU<sup>+</sup>/Nestin<sup>+</sup>细胞密度定量分析。H,三组大鼠各时间点梗死侧SVZ区BrdU<sup>+</sup>/Nestin<sup>+</sup>细胞占BrdU<sup>+</sup>细胞比率分析。与假手术组相同时间点比较,a: $P < 0.05$ ;与安慰电刺激组相同时间点比较,b: $P < 0.05$ 。

### 3 讨论

脑卒中是当今社会上三大死亡原因之一及首位致残因素<sup>[9]</sup>。脑卒中患者往往残留肢体偏瘫,严重影响日常生活活动能力。近年来研究发现,神经系统受损后SVZ、颗粒细胞层下区(Subgranular Zone, SGZ)等区域的NSC会发生增殖,迁移到神经损伤处参与神经网络结构与功能的重组<sup>[10]</sup>。但损伤诱发的

NSC增殖数量有限,并不能完全修复受损神经组织,患者往往残留各种各样的功能障碍。所以,如何通过外源性因素促进神经系统内源性NSC增殖是康复领域中重要的研究方向。

自从20世纪60年代以来,FES逐渐受到临床的重视,已常规用于脑卒中后偏瘫患者的康复治疗<sup>[12,11]</sup>。本实验结果表明,随着时间的推移,FES治疗组与安慰电刺激组大鼠偏瘫肢体神经功能都有恢复的趋势;在第7、14天时间点上,FES治疗组mNSS评分均明显低于安慰电刺激组,说明FES治疗能促进脑梗死大鼠偏瘫前肢的功能恢复。我们推测其促进受损后神经功能恢复的机制是:FES通过刺激运动轴突去极化产生动作电位,向下传导收缩肌肉,增加肌力并防止肌肉萎缩;同时相伴的感觉神经去极化还可以上传到中枢神经系统,激活皮质神经环路,促进受损神经系统的重塑<sup>[12]</sup>。这与Barsi等<sup>[13]</sup>通过FES辅助抓握训练能促进大脑皮质运动诱发电位波幅,即运动皮质兴奋性升高的结论一致。另有研究表明,FES通过激活中枢神经系统的兴奋性,可以促进脑梗死侧bFGF、EGF蛋白和mRNA的表达<sup>[4]</sup>、脑源性神经营养因子(Brain Derived Neurophic Factor, BDNF)及其受体TrkA的表达<sup>[14]</sup>等,而这些都是促进NSCs增殖的分子基础。因此,我们推测,FES是通过促进梗死侧SVZ区NSCs增殖而发挥治疗作用。

BrdU可在增殖S期竞争性地整合入增殖细胞新合成的DNA中,是用以研究细胞增殖的理想方法,BrdU<sup>+</sup>代表前体细胞<sup>[15]</sup>。本研究结果表明,脑梗死损伤后,安慰电刺激组大鼠梗死侧SVZ区BrdU<sup>+</sup>细胞数明显增加,在第7天达到高峰,第14天后数量有所降低但仍高于治疗前,这与大多数文献的结论相符<sup>[16-17]</sup>。安慰电刺激组与假手术组各时间点组间比较,梗死侧SVZ区BrdU<sup>+</sup>细胞数量差异均有显著性意义,说明缺血本身就是一个刺激前体细胞增殖的因素。在治疗第7、14天时间点,FES治疗组与安慰电刺激组比较差异均有显著性意义。这表明FES可以在脑梗死大鼠神经功能自行恢复的基础上进一步促进梗死侧SVZ区前体细胞的增殖,改善受损神经功能。

SVZ区前体细胞拥有增殖和分化的特征,为了明确其细胞性质,我们又进行了BrdU/nestin、BrdU/

GFAP免疫双标细胞计数。Nestin目前已成为识别NSC的重要标志蛋白<sup>[18]</sup>。GFAP是星型胶质细胞的标志蛋白<sup>[3]</sup>。BrdU<sup>+</sup>/nestin<sup>+</sup>细胞代表新增殖的NSC,而BrdU<sup>+</sup>/GFAP<sup>+</sup>代表新增殖的神经胶质细胞。实验发现,相比假手术组,FES治疗组和安慰电刺激组BrdU<sup>+</sup>/nestin<sup>+</sup>细胞数均明显增加,FES治疗组增加更显著( $P<0.05$ )。但是三组大鼠各时间点比较,BrdU<sup>+</sup>/nestin<sup>+</sup>双标细胞占BrdU<sup>+</sup>细胞数的比率并没有明显的差异。说明FES能促进大鼠梗死侧SVZ区前体细胞和NSC增殖,而对前体细胞中NSC所占比率并没有影响。本实验中,三组大鼠各时间点梗死侧SVZ区均未发现BrdU<sup>+</sup>/GFAP<sup>+</sup>细胞。结果同Kuniyasu Wada等的研究一致<sup>[19]</sup>。这可能是新增殖的NSC在迁移到神经受损处之后才进一步分化为神经元与胶质细胞。

本研究结果显示,FES可以促进微观大鼠梗死侧SVZ区前体细胞及NSC增殖,从而发挥宏观促进大鼠偏瘫神经功能恢复的作用。脑梗死早期阶段,各实验组梗死侧SVZ区均未发现NSC向星型胶质细胞分化证据。而FES对梗死侧SVZ区NSC向神经元分化和迁移的影响将在日后作进一步的研究。

## 参考文献

- [1] Liberson WT, Holmquest HJ, Scot D, et al. Functional electrotherapy: stimulation of the peroneal nerve synchronized with the swing phase of the gait of hemiplegic patients[J]. Arch Phys Med Rehabil, 1961,42:101—105.
- [2] 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.
- [3] Becker D, Gary DS, Rosenzweig ES, et al. Functional electrical stimulation helps replenish progenitor cells in the injured spinal cord of adult rats[J]. Exp Neurol, 2010,222(2): 211—218.
- [4] 向云. 功能性电刺激对脑梗死大鼠脑bFGF、EGF表达和神经干细胞增殖影响的研究[D]. 广州: 中山大学, 2010:50—60.
- [5] Griiti A, Parati EA, Cova L, et al. Multipotential stem cells from the adult mouse brain proliferate and self-renew in response to basic fibroblast growth factor[J]. J Neurosci, 1996, 16(3):1091—1100.
- [6] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion histological and neurobehavioral outcomes after ischemic brain injury in the rat[J]. Stroke, 1989,20:84—91.
- [7] Chen J, Sanberg PR, Li Y, et al. Intravenous administration of human umbilical cord blood reduces behavioral deficits after stroke in rats[J]. Stroke, 2001,32(11): 2682—2688.
- [8] Kuhn HG, Dickinson-Anson H, Gage FH. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation[J]. J Neurosci, 1996,16(6): 2027—2033.
- [9] 彭源, 燕铁斌, 金冬梅, 等. 低频电刺激对急性局灶性脑梗死性大鼠运动功能及梗死边缘区胶质酸性蛋白表达的影响[J]. 中华物理医学与康复杂志, 2009,31(10):655—658.
- [10] Yagita Y, Kitagawa K, Ohtsuki T, et al. Neurogenesis by progenitor cells in the ischemic adult rat hippocampus[J]. Stroke, 2001, 32(8):1890—1896.
- [11] MOE JH, POST HW. Functional electrical stimulation for ambulation in hemiplegia[J]. J Lancet, 1962,82:285—288.
- [12] Bergquist AJ, Clair JM, Lagerquist O, et al. Neuromuscular electrical stimulation: implications of the electrically evoked sensory volley[J]. Eur J Appl Physiol, 2011, 111(10):2409—2426.
- [13] Barsi GI, Popovic DB, Tarkka IM, et al. Cortical excitability changes following grasping exercise augmented with electrical stimulation[J]. Exp Brain Res, 2008, 191(1):57—66.
- [14] 向云, 燕铁斌, 庄志强, 等. 功能性电刺激促进急性脑梗死大鼠脑内源性神经干细胞增殖的研究[J]. 中华神经医学杂志, 2009, 8(12):1197—1202.
- [15] Yu F, Keinan A, Chen H, et al. Detecting natural selection by empirical comparison to random regions of the genome [J]. Hum Mol Genet, 2009, 18(24): 4853—4867.
- [16] Matsumoto J, Morioka M, Hasegawa Y, et al. Sodium orthovanadate enhances proliferation of progenitor cells in the adult rat subventricular zone after focal cerebral ischemia[J]. Pharmacol Exp Ther, 2006,318(3):982—991.
- [17] Zhang RL, Zhang ZG, Zhang L, et al. Proliferation and differentiation of progenitor cells in the cortex and the subventricular zone in the adult rat after focal cerebral ischemia[J]. Neuroscience, 2001,105(1):33—41.
- [18] 陆敏, 张苏明, 常立英, 等. 常规和强化运动训练对脑缺血再灌注大鼠海马齿状回区nestin表达的影响[J]. 中国康复医学杂志, 2008,23(11):986—989.
- [19] Mudò G, Belluardo N, Mauro A, et al. Acute intermittent nicotine treatment induces fibroblast growth factor-2 in the subventricular zone of the adult rat brain and enhances neuronal precursor cell proliferation[J]. Neuroscience, 2007,145(2): 470—483.