

·基础研究·

经颅交流电刺激对缺血性脑卒中大鼠rs-fMRI的影响*

李明哲^{1,2,3} 魏 雷⁴ 张英杰² 洪大基¹ 王 鹤⁴ 单春雷^{1,3,5}

摘要

目的:建立缺血性脑卒中大鼠右侧大脑中动脉阻塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型,观察经颅交流电刺激(transcranial alternating current stimulation, tACS)干预对缺血性脑卒中大鼠行为学及静息态功能性磁共振成像(resting-state functional magnetic resonance imaging, rs-fMRI)的影响。

方法:24只雄性SD大鼠随机分为假手术组(S组)、模型组(M组)和tACS组(T组),记录体重,神经缺损评分(neurological deficit scores, NDS)及造模前(B)、造模后1天(D1)、造模后10天(D10)的rs-fMRI,对比观察tACS干预对MCAO模型大鼠rs-fMRI的影响。

结果:NDS评分:M组、T组2h、D1、D3、D5、D7与S组相比显著升高($P < 0.05$);T组D3、D5、D7与M组相比显著降低($P < 0.05$)。体重:M组、T组D1与其他各时间相比显著下降;S组D5、D7与其他各时间相比显著上升;S组D3与B、D1相比显著上升($P < 0.05$);而M组在D1、D3、D5、D7与S组相比均显著下降($P < 0.05$)。脑成像:D10时,T组在健侧前额叶皮质、患侧前额叶皮质、健侧前扣带皮质的脑区局部一致性(regional homogeneity, ReHo)显著高于S组($P < 0.05$);T组D10在患侧前额叶皮质、患侧海马的ReHo显著高于D1($P < 0.05$)。D1时,T组在健侧下丘脑、患侧脑脚间核、健侧嗅球的基于体素的形态学分析(voxel-based morphometry, VBM)显著高于S组($P < 0.05$);T组D10在患侧海马、上丘脑、纹状体的VBM显著低于D1($P < 0.05$)。此外,T组D10时灰质体积显著大于S组($P < 0.05$)。D1时,T组在嗅球的双侧血管小球层、纹状体的低频振荡振幅(amplitude of low-frequency fluctuation, ALFF)显著高于S组($P < 0.05$);D10时,T组在双侧小脑、纹状体、前额叶皮质、嗅球的ALFF显著高于S组($P < 0.05$)。

结论:tACS早期干预对MCAO大鼠的脑功能有影响,可能与其增强神经元活动及增大灰质体积有关。除了对学习记忆相关脑区,tACS可能还对运动相关脑区有影响从而促进运动功能康复。

关键词 经颅交流电刺激;大脑中动脉阻塞模型;脑区局部一致性;低频振荡振幅;基于体素的形态学分析

中图分类号:R743.3,R493 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2021)-03-0260-07

Effects of transcranial alternating current stimulation on resting-state functional magnetic resonance of MCAO rats/LI Mingzhe, WEI Lei, ZHANG Yingjie, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2021, 36(3): 260—266

Abstract

Objective: A stroke rat model (MCAO) was established to dynamically observe the effects of transcranial alternating current stimulation (tACS) intervention on behavioral performance and resting state functional magnetic resonance imaging (rs-fMRI) in cerebral ischemia rats.

Method: Twenty-four male SD rats were randomly divided into sham-operation group (S group), model group

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2021.03.002

*基金项目:上海市卫生计生委中西医结合康复诊疗提升项目[ZY(2018-2020-FWTX-8002)];上海市卫生计生委加快中医药事业发展三年行动计划项目[ZY(2018-2020-CCCX-2004-05)];国家自然科学基金面上项目(81874035);上海领军人才项目(010)

1 上海中医药大学,上海市,201203; 2 上海市针灸经络研究所; 3 上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院; 4 复旦大学张江国际脑影像中心; 5 通讯作者

第一作者简介:李明哲,女,硕士,助理研究员; 收稿日期:2020-04-22

(M group) and tACS group (T group). Body weight at five time points, neurological deficit scores (NDS) at six time points and rs-fMRI before modeling, at D1 and D10 were recorded. The effects of tACS on the brain function of MCAO rats were observed.

Result: NDS in M group and T group were increased compared with S group at 2h, D1, D3, D5 and D7 ($P < 0.05$). T group were decreased when compared with M group at 3D, 5D, 7D ($P < 0.05$). Body Weight in M group and T group at D1 decreased significantly compared with other time points ($P < 0.05$); S group at D5 and D7 increased significantly compared with other time points ($P < 0.05$); S group at D3 increased significantly compared with B group at D1 ($P < 0.05$); M group at D1, D3, D5, D7 decreased significantly compared with S group ($P < 0.05$). Brain Imaging: At D10, the ReHo in T group increased significantly compared with S group in left prefrontal cortex, right prefrontal cortex and left anterior cingulate cortex; the ReHo at D10 were increased significantly compared with that at D1 in T group in right prefrontal cortex, right hippocampus ($P < 0.05$). At D1, the voxel-based morphometry (VBM) in T group increased significantly compared with S group in left of olfactory bulb, right interpeduncular nucleus, left hypothalamic region. The VBM at D10 were decreased significantly compared with that at D1 in T group in right hippocampus, right brachium of the superior colliculus, right striatum; and the volume of gray matter at D10 in T group in whole brain was increased significantly compared with that in S group ($P < 0.05$). At D1, the ALFF in T group increased significantly compared with that in S group in right/left glomerular layer of the olfactory bulb, striatum; At D10, the ALFF in T group increased significantly compared with that in S group in Cerebellum, striatum, prefrontal cortex and olfactory bulb ($P < 0.05$).

Conclusion: The early intervention of tACS had effects on the brain function of MCAO rats, which may related to the enhancement of neuronal activity and the increase of gray matter volume. In addition to learning and memory-related brain regions, tACS may also affect the motor-related brain regions and promote motor rehabilitation.

Author's address Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai, 201203

Key word transcranial alternating current stimulation; middle cerebral artery occlusion model; regional homogeneity; amplitude of low-frequency fluctuation; voxel-based morphometry

脑卒中是全球高发的急性脑血管疾病,磁共振功能成像在神经系统领域有很大优势,可对解剖结构、病理生理、分子层面进行检测^[1],揭示脑卒中后脑组织病理生理学变化和脑结构重塑机制。目前已有多种磁共振(magnetic resonance imaging, MRI)技术逐步应用于急性缺血性卒中的诊断及治疗,对缺血性卒中的治疗起重要的指导作用^[2],脑功能学的局部一致性(regional homogeneity, ReHo)、低频振荡振幅(amplitude of low-frequency fluctuation, ALFF)、基于体素的形态学分析(voxel-based morphometry, VBM)等方法,均可为中心神经系统疾病提供真实细致的可视化影像学数据^[3]。

非侵入性脑刺激已经广泛应用于促进突触可塑性或增强大脑功能连接的研究中,经颅交流电刺激(transcranial alternating current stimulation, tACS)可对任意频率产生持续性脑震荡,已成为运动康复

领域的一种重要手段。目前,还未见tACS干预脑卒中的相关研究,本研究利用静息态功能磁共振成像(resting state functional magnetic resonance imaging, rs-fMRI)技术观察缺血再灌注模型大鼠在tACS干预后的脑结构和功能的变化,以期今后的临床研究提供一定的依据和参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

清洁级SD大鼠24只,雄性,体重200g,饲养于上海岳阳医院动物房,许可证号为SYXK(沪)2013—0109。饲养环境为昼夜12h交替,室内温度25℃,湿度50%—60%,食物和水自由摄取。适应性饲养1周,当体重达到250—280g时,按照体重随机分为假手术组(S组)、模型组(M组)和tACS组(T组),每组各8只。

1.2 MCAO模型大鼠制备

参照文献[4]制备右侧大脑中动脉阻塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型大鼠。采用R540增强型小动物麻醉机(深圳市瑞沃德生命科技有限公司)在异氟烷气麻下以颈内动脉线栓法制备大鼠右侧局灶性脑缺血模型,1.5h后缓慢回抽鱼线,剪去多余栓线,逐层缝合皮肤。S组除不插线外,全过程同其他二组。

1.3 治疗方法

1.3.1 经颅交流电刺激组(T组):在制作MCAO模型前3天,采用4%异氟烷、氧气4L/min诱导下将大鼠麻醉2min,并在2.5%异氟烷、氧气0.5L/min维持气麻下使大鼠俯卧,头部备皮,矢状位剪开额顶部皮肤2cm,暴露皮下筋膜,用浸满双氧水的棉签使筋膜完全剥脱,直至暴露出颅骨前囟及右侧颅骨,应用立体定位仪定位前囟前1.0mm,中线右旁2.3mm,即右侧运动皮层(M1区),在颅骨表面埋入电极帽,并用牙科水泥在相应位置固定。造模后2h,以0.5mA、20Hz的交流电进行干预,每天1次,每次30min,共干预7d。

1.3.2 假手术组(S组)与模型组(M组):造模前3天同样在麻醉后暴露出颅骨前囟及右侧颅骨,定位M1区,但并不埋置电极帽。造模后2h进行同样的抓取和气体吸入麻醉(气麻),每天1次,每次30min,共干预7d。

1.4 观察指标

1.4.1 大鼠体重:分别测量各组大鼠在造模前(B)、造模后1天(D1)、造模后3天(D3)、造模后5天(D5)、造模后7天(D7)五个时间的体重,观察各组大鼠体重的变化。

1.4.2 大鼠术后评分:造模前(B)、缺血再灌注后2h(2h)、造模后1天(D1)、造模后3天(D3)、造模后5天(D5)、造模后7天(D7)分别采用Zea-Longa评分^[5]进行神经缺损评分(neurological deficit scores, NDS),2分为中度局灶性神经功能缺失,提尾悬空时左前肢屈曲、内收,行走时向左侧转圈;3分为重度局灶性神经功能缺失,站立不稳,行走时向左侧倾倒;4分为不能自发行走,意识水平降低。评分为2分及以上表明模型大鼠大脑中动脉阻塞成功。

1.4.3 小动物静息态功能磁共振成像:采用布鲁克

11.7 T小动物磁共振扫描仪对干预前(B)、造模后1天(D1)、造模后10天(D10)的S组、M组和T组大鼠(每组各4只)进行扫描。将大鼠头部放于大鼠专用头部表面线圈内,静息态成像采用自由感应衰减平面回波序列(free induction decay echoplanar imaging, FID-EPI),扫描参数如下:TE/TR 8.127ms/3000ms, FOV 27mm×27mm,层数为60,层厚为0.3mm,层间距0,平均1,重复200,矩阵256×256, FA 90°,带宽454545.5Hz,时间10min。原始数据在转换为DICOM格式后导出数据并进行数据分析,预处理后进行后处理,采用全半高宽(full width half maximum, FWHM)为6mm×6mm×6mm的高斯核对计算得到的局部一致性的图进行平滑。

1.5 统计学分析

应用SPSS 24.0软件两因素重复测量方差分析分析体重和神经功能评分,数据以均数±标准差表示。LSD检验比较组间差异,以Mauchly检验观察是否满足球形假设,有交互作用,分析各因素的单独效应;无交互作用时,分析各因素的主效应,以 $P < 0.05$ 为有显著性差异。rs-fMRI的功能数据的矫正,voxel $P=0.001$ cluster $P=0.05$,GRF(gaussian random field correction);将Reho、VBM、ALFF图像进行组群统计获得平均图像,通过阈值校正后得到具有显著性差异的脑激活区图像叠加到标准脑图像中。

2 结果

2.1 NDS比较

NDS的干预和时间存在交互作用($P < 0.01$),M组、T组与S组相比在2h、D1、D3、D5、D7显著升高($P < 0.05$);M组与T组相比在D3、D5、D7显著升高($P < 0.05$)。M组其他各时间与B相比均显著升高;T组各时间之间比较均有显著性差异($P < 0.05$),见图1。

2.2 大鼠体重

M组、T组D1与其他各时间相比显著下降;S组D5、D7与其他各时间相比显著上升;S组D3与B、D1相比显著上升($P < 0.05$);而M组在D1、D3、D5、D7与S组相比均显著下降($P < 0.05$),见图2。

2.3 rs-fMRI数据

图3中的彩色区域为两组组间比较具有显著性

图1 各组大鼠不同时间点神经缺损评分(NDS)比较

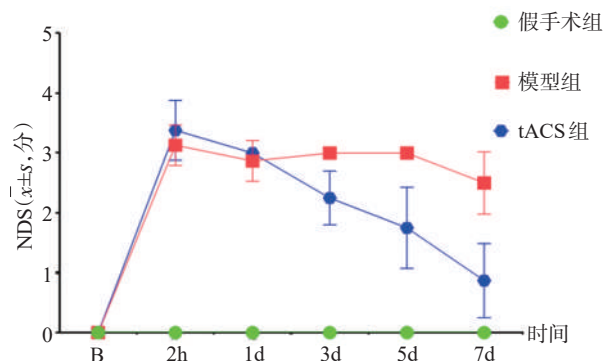


图2 各组大鼠不同时间点体重比较

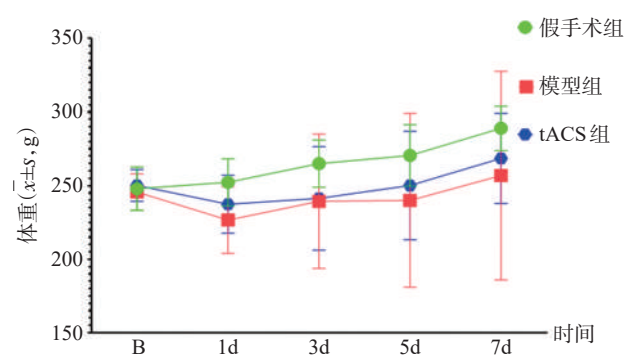
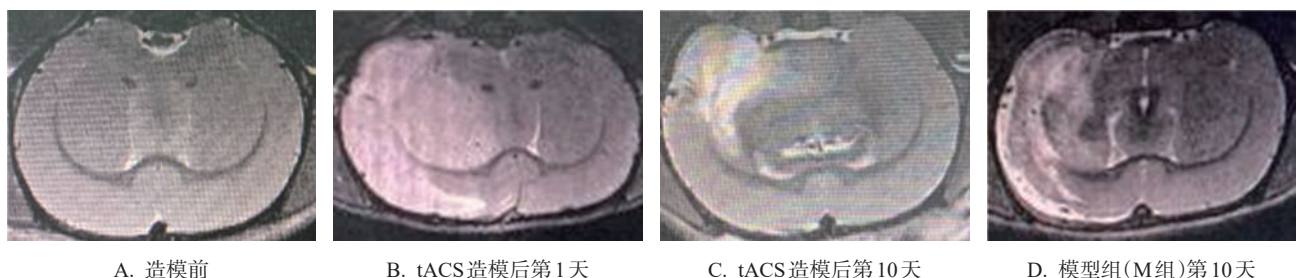


图3 T2-weighted 成像



差异的脑区 ($P < 0.001$, cluster > 20)。基于当前样本制作的模板 T2 模板(template), 基于当前样本分割组织后的模板, 这里是灰质模板(tissue), 以构建 3D 模式图。

2.3.1 脑区局部一致性(ReHo): D10时, T组在健侧前额叶皮质、患侧前额叶皮质、健侧前扣带皮质的 ReHo 显著高于 S 组 ($P < 0.05$); T组 D10 在患侧前额叶皮质、患侧海马的 ReHo 显著高于 D1 ($P < 0.05$), 见表 1。

2.3.2 形态学分析(VBM): D1 时, T组在健侧下丘脑、患侧脑脚间核、健侧嗅球的 VBM 显著高于 S 组 ($P < 0.05$); T组 D1 在患侧海马、上丘脑、纹状体的 VBM 显著高于 D10 ($P < 0.05$)。此外, T组灰质体积显著大于 S 组 ($P < 0.05$), 见表 2。

2.3.3 低频振荡振幅: D1 时, T组在嗅球的双侧血管小球层、纹状体的 ALFF 显著高于 S 组 ($P < 0.05$); D10 时, T组在双侧小脑、纹状体、前额叶皮质、嗅球的 ALFF 显著高于 S 组 ($P < 0.05$), 见图 4—5。

3 讨论

脑缺血容易造成脑组织损伤, 引发一系列的炎症反应, 细胞凋亡, 并造成不同程度的神经元坏死,

表1 脑区局部一致性(ReHo)

脑区	D10 体素	T组>S组 Z值	T组 D10>D1 体素	T值
左侧前额叶皮质	231	4.54 ^①	-	-
右侧前额叶皮质	362	4.4 ^①	17	124.51 ^①
	-	-	15	292.83 ^①
左侧前扣带皮质	150	3.99 ^①	-	-
右侧海马	-	-	33	107.5 ^①

注: ① $P < 0.05$

表2 T组基于体素的形态学分析(VBM)

脑区	D1 体素	T组>S组 T值	T组 D1>D10 体素	T值
左侧小脑或脑干	-	-	-	-
右侧脑脚间核	170	5.1 ^①	-	-
左侧下丘脑	87	4.9 ^①	-	-
左侧嗅球	570	5.85 ^①	-	-
右侧海马			431	5.58 ^①
右侧上丘脑			208	5.06 ^①
右侧纹状体			295	4.71 ^①

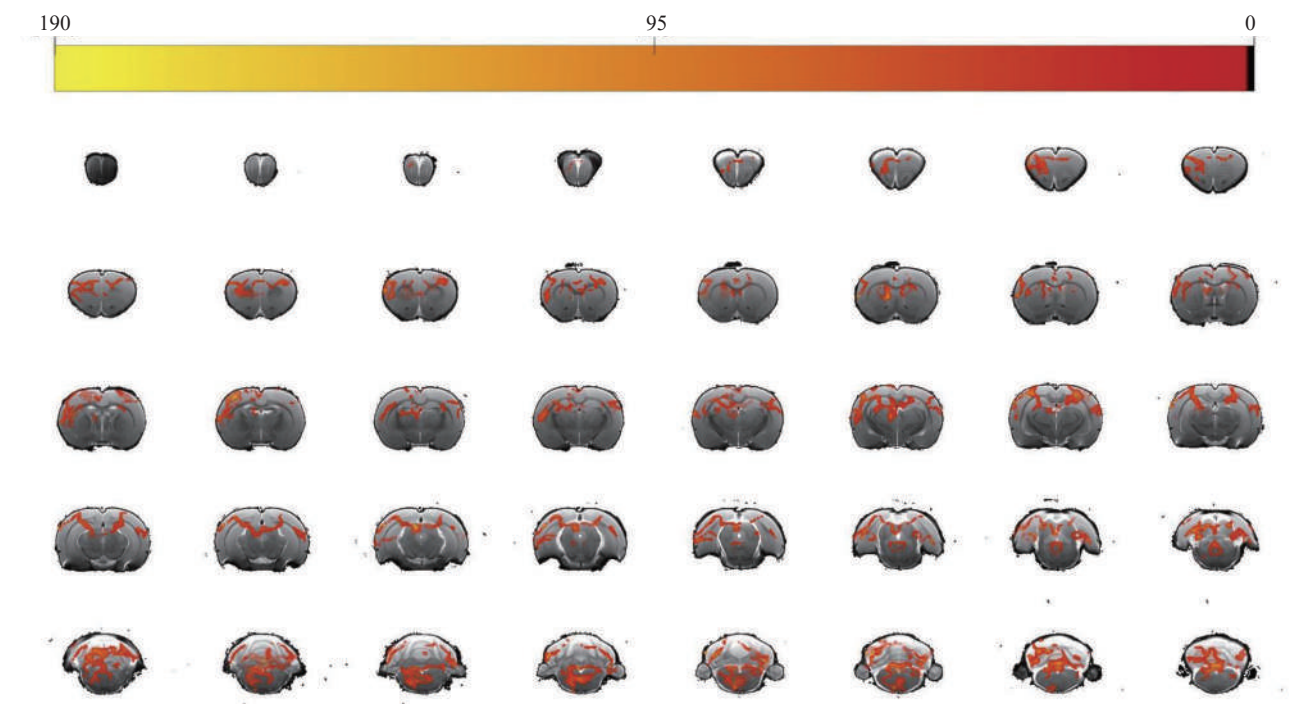
注: ① $P < 0.05$

从而导致神经功能缺损。因此, 减少脑缺血后脑组织的损伤, 降低炎症损伤, 才能挽救濒临死亡的神经细胞。由此可知, 急性缺血性卒中中患者的早期有效治疗至关重要, 研究脑缺血后的康复也具有非常重要的意义。

图4 造模后第1天低频振荡振幅(ALFF)(T组减S组)



图5 造模后第10天低频振荡振幅(ALFF)(T组减S组)



T组:tACS组;S组:假手术组

新神经调控技术的出现,成为治疗缺血性脑卒中的新方案,经颅电刺激就是其中最有力的一种,它能调节突触可塑性、改变皮层兴奋性,实现对大脑神经活动的调控。目前,关于经颅直流电刺激(transcranial direct current stimulation, tDCS)的研究较多,有研究对744例脑卒中偏瘫患者上肢进行功能性电刺激(functional electrical stimulation, FES)干预,有助于进一步提高患者上肢运动功能和日常生活活动能力^[5]。tDCS和镜像疗法均可以改善脑卒中患者患侧大脑皮质兴奋性和上肢运动功能,联合应用效果更佳^[6]。

近年来,tACS神经调控技术越来越受关注,尤其是在认知神经科学领域。tACS可调节大脑活动,从而影响行为,与功能性磁共振成像的结合可提供潜在诱发大脑活动变化的信息,可以引起快速额顶叶连接变化^[7],可使p300振幅显著增加^[8]。然而,个体间存在很大差异,使tACS成为目前不可靠的治疗手段,但 γ 功率tACS对运动性能有作用,存在对侧运动皮层的交叉频率效应^[9]。10—25Hz在运动执行过程中事件相关同步/去同步;20Hz脑电与运动学习相关,以20Hz的tACS作用于右侧初级运动皮层能易化左手的运动学习能力,对卒中后运动功能康复存在潜在作用^[10]。运动学习涉及多个脑区,并伴有突触可塑性、运动皮层可塑性的变化,因此能改善由神经系统损伤,如脑卒中等,引起的运动功能障碍。内质网对细胞内稳态调节起主导作用,在机体老化过程中细胞内的动态平衡被打破,而运动对于延缓衰老、预防衰老相关疾病的发生起到保护作用^[11];20Hz经颅交流电刺激可明显提高受试者运动学习能力^[12]。但目前,缺乏tACS调控缺血性脑卒中的相关研究。

本研究发现NDS评分与rs-fMRI数据存在正相关,但并非完全一致,虽然NDS评分是由2名不知道实验分组情况的工作人员进行,但仍存在假阳性,事实上脑成像数据显示脑缺血梗死区较小或未见缺血区,所以NDS评分并不能单独作为评价模型制备成功及干预效果的依据。

脑模板是脑影像统计分析的基础,是为消除不同脑图像之间在空间以及尺度等方面存在的差异提供的统一标准^[13]。本研究使用了大鼠脑自定义模板

图像,结构清晰,保留了原始图像的特殊性,更能代表大脑的形态结构。模型组未进行干预,在脑功能的功能学、形态学的分析中,无法得到良好的配准结果,主要原因是病灶过大,所以本研究无法进行比较分析,后续可增加样本量。同时,磁共振T1灌注成像可预测缺血性卒中模型出血性转化(hemorrhagic transformation, HT)的价值^[14],故后续还可对脑梗死体积进行测算,分析感兴趣区分别与全脑其他体素进行脑功能连接分析,以及弥散张量成像(diffusion tensor imaging, DTI)、nodding的测算及分析,可能就能找出不同时间、组间的差异。

ReHo算法D10时,健侧前额叶皮层、患侧前额叶皮层、健侧前扣带皮层为T组>S组的差异脑区,说明MCAO模型大鼠因患侧脑缺血,建立了健侧的侧支循环,同时健侧的前扣带皮层可能也与患侧脑缺血相关,而这些区域可能是脑损伤及tACS干预发挥脑组织保护作用的相关脑区。D10>D1的ReHo数据中,T组患侧前额叶皮层、患侧海马存在部分激活,说明tACS干预可使患侧前额叶皮层及患侧海马改变,有可能是tACS干预发挥脑组织保护作用的相关脑区。

VBM方法对脑组织成分进行体素组间比较分析,定量检测出脑灰质和白质的密度和体积,从而量化分析脑形态学上的异常。D1时,T组>S组的差异脑区为:健侧下丘脑、患侧脑脚间核、健侧嗅球;D1>D10 T组的差异脑区为:患侧海马、患侧上丘脑、患侧纹状体;说明脑缺血早期tACS干预可能影响健侧下丘脑、患侧脑脚间核、健侧嗅球;而tACS干预对患侧海马、患侧上丘脑、患侧纹状体也有影响。由于模型组病灶过大,无法得到良好的配准结果,而VBM算法中D1时,能看到T组与M组之间的差异脑区。此外,电刺激会引起部分灰质体积增大,说明tACS干预可能更有利于患侧肢体运动功能的恢复。

ALFF反映静息状态局部自发活动,静息状态下灰质的ALFF高于白质,低频振荡的产生可能是由于自发的神经元活动,体现有连接的脑区之间交互信息时产生的自身节律性活动,可作为反映大脑的特征之一。本研究中D1时,T组>S组差异性脑区较少,D10时,差异的脑区增多,因此产生的疗效可能和缺血区的自我恢复、侧支循环的建立相关。和

D10相比较,D1时tACS干预引起的差异的脑区较多,说明作用于M1区的tACS干预的短期效应可能就能引起一定的脑功能及脑区的差异。

本研究通过三种脑功能成像的分析方法,发现tACS刺激患侧M1区可引起双侧大脑功能改变,与S组相比,除前额叶、海马外,与运动相关脑区,如下丘脑、纹状体等亦发生变化,结合NDS的结果,说明这种变化可能是积极的,tACS刺激存在促进运动功能康复的潜力。

综上所述,tACS干预可能通过增强运动皮质的神经元活动及其神经网络,从而改善缺血再灌注损伤大鼠的运动功能;可能对缺血再灌注损伤大鼠脑区局部一致性、低频振幅、基于体素的形态学分析均产生有利影响;可能在调控脑可塑性方面发挥重要作用。在今后的研究中应该扩大样本量,继续深入研究,为临床研究提供更多的实验依据。

参考文献

- [1] 李若阳,陈榆舒,陈柏君,等. 磁共振功能成像在中医治疗缺血性中风病领域内的应用现状[J]. 中华中医药学刊,2020,38(4):120—124.
- [2] 梁里昂,李力仙,邢晓辉,等. 磁共振技术在大鼠缺血性卒中的研究进展[J]. 中国脑血管病杂志,2014,11(08):445—448.
- [3] 郎奕,崔方圆,邹忆怀. VBM及DTI技术应用于脑卒中的研究现状[J]. 中西医结合心脑血管病杂志,2016,14(11):1237—1242.
- [4] 刘勇,王洪,赵军,等. 针刺介入时机对缺血性中风大鼠神经功能评分和Bcl-2、Bax表达的影响[J]. 环球中医药,2014,7(08):581—586.
- [5] 张悦琪,赵梦娟,赵春善. 功能性电刺激改善脑卒中偏瘫患者上肢功能的Meta分析[J]. 中国康复理论与实践,2020,26(3):295—300.
- [6] 陈慧,蔡倩,徐亮,等. 经颅直流电刺激联合镜像疗法对脑卒中患者上肢运动功能的影响[J]. 中国康复理论与实践,2020,26(3):301—305.
- [7] Mondino M, Ghumman S, Gane C, et al. Effects of transcranial stimulation with direct and alternating current on resting-state functional connectivity: an exploratory study simultaneously combining stimulation and multiband functional magnetic resonance imaging[J]. Front Hum Neurosci, 2020, 13:474.
- [8] Dallmer-Zerbe I, Popp F, Lam AP, et al. Transcranial alternating current stimulation (tACS) as a tool to modulate P300 amplitude in attention deficit hyperactivity disorder (ADHD): preliminary findings[J]. Brain Topogr, 2020, 33(2):191—207.
- [9] Mastakouri AA, Scholkopf B, Grosse-Wentrup M., et al. Beta power may mediate the effect of Gamma-TACS on motor performance[J]. Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc, 2019, 2019:5902—5908.
- [10] 穆思雨. 基于经颅交流电刺激的运动学习能力调节研究[D]. 天津:天津大学,2018.
- [11] 王友华,陈伟. 运动调节内质网应激和线粒体自噬防治衰老相关疾病研究进展[J]. 生理科学进展,2019,50(3):236—241.
- [12] 许敏鹏,魏泽,穆思雨,等. 20Hz经颅交流电刺激对运动序列学习能力的影响[J]. 航天医学与医学工程,2019,32(4):333—339.
- [13] 赵媛媛,雷建峰,王战京. 基于MR图像的大鼠脑自定义模板的构建[J]. 北京生物医学工程,2018,37(4):403—409.
- [14] 俞佳凤,张静,孙岩,等. 磁共振T1灌注成像预测缺血性卒中模型出血性转化的价值[J]. 影像研究与医学应用,2018,2(19):155—156.