

电刺激对大鼠脑梗塞运动功能及突触的影响^①

张艳¹ 黄如训¹ 吴金浪² 方燕南¹ 刘焯霖¹

(中山医科大学 1 附属第一医院神经内科 2 电镜室; 广州, 510080)

摘要 目的:评价电刺激治疗对大鼠脑梗塞后运动功能的影响及其机理。**方法:**观察正常SD大鼠在右侧大脑中动脉闭塞后,使用电刺激治疗6周时,大鼠运动功能的改善情况,结合透射电镜对大鼠脑内坏死边缘区(A区),远隔区(B区)及镜区(C区)³个脑区的突触数目及突触界面某些结构的变化进行了定量分析。**结果:**治疗组运动功能较对照组有一定的改善,治疗组在坏死边缘区有突触数目的增多,突触间隙变窄,突触活性区长度增加,突触后膜致密物质厚度增厚,而在远隔区及镜区,突触的数目及结构改变不明显。**结论:**电刺激可以改善急性脑梗塞偏瘫的运动功能,可能与电刺激通过外周神经通路,传到中枢,引起突触可塑性变化有关。

关键词 脑梗塞; 电刺激; 运动技能; 突触; 大鼠

中图分类号 R743.33

THE EFFECT OF REPEATED ELECTRIC STIMULATION ON MOVEMENT AND SYNAPTIC PLASTICITY IN CEREBRAL ISCHEMIA RATS

Zhang Yan¹ Huang Ruxun¹ Wu Jinlang² Fang Yannan¹ Liu Zhuolin¹

(¹ Department of Neurology, ² Electronic Microscope Laboratory, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510080)

Abstract Objective: In order to evaluate the effects of electro-stimulation to motor skills after cerebral infarction and its mechanism. **Methods:** The movement recovery of normal Sprague-Dawley rats was observed, the number and structure changes of synapse of the border of infarct focus(area A), the isolated area(area B) and the mirror area (area C) were analyzed by transmission electron microscope, after the right cerebral middle artery of the rats was occluded and received 6 weeks electric stimulation. **Results:** The data showed that the movement improvement in the treatment group was quicker than in control group. Comparing with control group, the dense of synapse was significantly increased, the interspace of the synapse is narrower, the length of the postsynaptic thickening was longer and the dense material of postsynapse was thicker in area A of the treatment group, but there were no dominant changes between the two groups of area B and C. **Conclusions:** It is suggested that electric stimulation could improve the movement ability, it may be related to the changes of the synapse plasticity *via* stimulating the periphery nerve pathway.

Subject headings cerebral infarction; electric stimulation; motor skills; synapses; rats

中枢神经系统损伤后的结构性修复,即可塑性,是功能恢复的基础,而突触则是其中的关键部位。在脑梗塞后瘫痪肢体的康复治疗中,经常使用电刺激疗法^[1,2],但是目前,对其作用机制了解甚少,尤其是关键结构的变化,尚缺乏研究,影响了康

复水平的提高。为此,我们用模拟临床的大鼠大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型,观察电刺激对偏瘫肢体功能及脑内突触的影响,以探讨其对神经可塑性的作用及有关机制。

1 材料和方法

1.1 动物的选择

选用纯种健康雄性SD大鼠70只(广东省医用实验动物中心提供),3~4月龄,体重250~350g。自由饮用自来水,饲用普遍颗粒型大鼠饲料(含蛋白23%,脂肪4.7%,钠盐0.24%),动物房温度控制18~26℃,光暗周期12h。

1.2 MCAO模型的制备

按已建立的方法^[3],在无菌条件下钻颅,暴露右侧大脑中动脉(middle cerebral artery, MCA),电凝距嗅束上下各2mm的MCA两点,即可见主干供血中断,术后48h,随机选取5只,活体取脑,TTC(戊四氮唑,2,3,5-triphenyltetrazolium chloride)染色。

1.3 运动功能

根据Feeney^[4]的走横木试验(beam walking test)来判断大鼠的精细运动功能。beam是由1块1.2m×2.5cm的木板制成,1侧有强光及噪声刺激,另1侧为黑笼子。MCAO术前1周每隔1天,测试训练两次,术后6h,12h时测试打分,术后每天测试1次。结果由两人评价,其中1人不知具体分组情况。

Beam walking test的评分为1~7分,依其是否顺利爬过平衡木及瘫痪肢体起作用的情况评分。正常为7分;爬过平衡木,瘫痪肢体起作用达50%为6分;完全不能爬过平衡木,且无法将后肢放在水平位为1分。

1.4 电刺激治疗

将MCAO后3d的大鼠,选beam walking test评分为1分的,共60只,配对分为治疗组和对照组,前者依据以往经验^[5],在瘫痪肢体取4个部位,相当于人的手三里,外关,伏兔,三阴交,使用半导体综合医疗机,电刺激,每日1次,每次30min,频率75次 min^{-1} ,电流60~80 μA ,6d为1个疗程,停1d后可进行下一疗程。

1.5 病理检查

6个疗程结束,从治疗组及对照组各随机选10只。按常规电镜方法灌注,固定,取脑,从脑前极从头端至尾端每隔2mm冠状切片,可切5~6片,拍摄各脑片正反面图像,用IBAS V 2.5图象分析仪,测量各脑片正反面的总脑体积及梗塞灶体积,计算

脑梗塞灶占全脑体积的百分比。所有电镜标本的取材均取同一脑片的相同部位,即取第3张脑片上的病灶坏死边缘区(A区),病灶脑顶叶皮层即远隔区(B区)及对侧与病灶相对应的皮层即镜区(C区),经脱水,包埋,切片,使用透射电镜观察并拍摄突触图象。

1.6 突触数目及结构的测定

从治疗组及对照组的A、B、C区各选取8000倍视野下的50张电镜照片,使用IBAS V 2.0及2.5图象分析仪,进行测量,统计其突触数目。电镜照片放大到30000倍随机选取50个突触测量突触界面的结构参数,包括突触活性区长度,突触界面曲率,突触间隙宽度及突触前后膜致密物质厚度。活性区长度及突触前后膜致密物质厚度参考Guilder^[6]方法进行测量。界面曲率以突触界面弧长与弦长之比来表示^[7]。每个突触间隙宽度用多点平均法测定。

1.7 统计处理

本实验的观察及测量均采用双盲法进行。按SPSS统计软件包对数据进行处理,所有计量资料数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两样本均数比较,用 t 检验。

2 结果

2.1 MCAO模型

本实验制备的70只MCAO大鼠,除5只因麻醉及术中出血排除出本实验,其余65只术后麻醉苏醒即有左侧前肢屈曲,走平地时出现划圈,beam walking test评分为1分。48h后5只大鼠TTC染色均见额、顶、颞叶,以及部分枕叶皮层及纹状体外侧2/3区域有白色缺血灶。

2.2 走横木试验的结果

MCAO术前所有70只大鼠评分为7分,术后3d选用的60只均为1分,在6周治疗过程中,实验组及对照组均有5只死亡,至第6周末时各存活25只。两组在实验过程中,每周末评分在6分以上者的分布情况见表1。

2.3 梗塞灶体积比较

MCAO术后治疗6周末,在两组随机选10只取病理标本,肉眼即可见大鼠脑在额、顶、颞和部分枕叶皮层及纹状体外侧2/3区域有软化灶。梗塞体积占全脑体积的百分比,即梗塞灶体积比,在两组无明显差别($P > 0.05$)。

表1 两组各周末评分达6分以上的大鼠数目

Table 1 The number of rats which beam walking test score over 6 every week after treatment in 2 groups (n/1)

| | n | 1st week | 2nd week | 3rd week | 4th week | 5th week | 6th week |
|-----------------|----|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Treatment group | 25 | 0 | 0 | 2 | 5 | 8 | 12 |
| Control group | 25 | 0 | 0 | 0 | 2 | 4 | 7 |

2.4 突触数目及结构变化

对照组与治疗组的突触,在A、B、C 3个脑区都具有典型的非对称性界面特征,其突触后膜有浓密而厚的电子致密物质,突触囊泡呈圆形,符合兴奋型突触的形态特点(图1)。



图1 突触形态(30 000×)

Fig-1 The structure of synapse

其数目及结构变化情况分别见表2、3、4。从表2可见,坏死边缘区(A区),同对照组相比治疗组的突触数目(dense of synapse)显著增多($P < 0.01$) (图2、3),突触间隙宽度(interspace of synapse)明显变窄($P < 0.01$),突触活性区长度(length of postsynaptic thickening)增加($P < 0.05$),突触后膜致密物质厚度增厚(thickness of dense material of postsynapse) ($P < 0.05$),突触前膜致密物质厚度(thickness of dense material of

presynapse)及突触界面的曲率(tortuous of synapse)在两组间无明显差异。从表3、4可见,远隔区(B区)和镜区(C区)的各参数无明显差异。



图2 治疗组A区突触(8 000×)

Fig-2 Synapses of treatment group in area A



图3 对照组A区突触(8 000×)

Fig-3 Synapses of control group in area A

表2 边缘区(A区)突触数目及结构

Table 2 Synaptic number and structure in area A

| | Treatment group | Control group | P |
|---|-----------------|---------------|-------|
| Dense of synapse ¹⁾ (n/1) | 17.2±3.7 | 7.2±2.2 | <0.01 |
| Interspace of synapse (b/nm) | 15.2±0.6 | 22.6±4.6 | <0.05 |
| Length of postsynaptic thickening (l/nm) | 516.±134 | 344±71 | <0.05 |
| Thickness of dense material of postsynapse (d/nm) | 68.±17 | 43±11 | <0.05 |
| Thickness of dense material of presynapse (d/nm) | 39.±19 | 29±10 | <0.05 |
| Tortuous of synapse(κ/nm) | 1.05±0.04 | 1.02±0.08 | >0.05 |

1) synaptic number in 8×10³ transmission electron microscope fields

表 3 远隔区(B区)突触数目及结构

Table 3 Synaptic number and structure in area B

| | Treatment group | Control group | P |
|---|-----------------|---------------|-------|
| Dense of synapse ¹⁾ ($n/1$) | 11.6±3.9 | 8.4±4.0 | >0.05 |
| Interspace of synapse (b/nm) | 20.1±0.8 | 20.2±0.5 | >0.05 |
| Length of postsynaptic thickening (l/nm) | 382±134 | 369±77 | >0.05 |
| Thickness of dense materiel of postsynapse (d/nm) | 73±10 | 73±11 | >0.05 |
| Thickness of dense material of presynapse (d/nm) | 37±12 | 33±10 | >0.05 |
| Tortuous of synapse(κ/nm) | 1.07±0.06 | 1.03±0.03 | >0.05 |

1) synaptic number in 8×10^3 transmission electron microscope fields

表 4 镜区(C区)突触数目及结构

Table 4 Synaptic number and structure in area C

| | Treatment group | Control group | P |
|---|-----------------|---------------|-------|
| Dense of synapse ¹⁾ ($n/1$) | 13.8±4.4 | 13.1±3.5 | >0.05 |
| Interspace of synapse (b/nm) | 20.5±0.4 | 20.5±0.8 | >0.05 |
| Length of postsynaptic thickening (l/nm) | 417±176 | 395±70 | >0.05 |
| Thickness of dense materiel of postsynapse (d/nm) | 73±17 | 56±22 | >0.05 |
| Thickness of dense material of presynapse (d/nm) | 35±10 | 38±12 | >0.05 |
| Tortuous of synapse(κ/nm) | 1.04±0.26 | 1.04±0.04 | >0.05 |

1) synaptic number in 8×10^3 transmission electron microscope fields

3 讨论

3.1 电刺激治疗可以影响脑梗塞偏瘫肢体运动功能有确实的物质基础

我们观察的结果显示,电刺激一段时间,可以明显改善急性脑梗塞偏瘫肢体的运动功能,虽不能缩小梗塞体积,但对坏死边缘区的突触数目及结构都有明显的影响,说明大鼠运动功能的恢复有确实的物质基础。电刺激6周后,坏死边缘区突触密度增加,可增加神经传导,使残存的神经元发挥更大的作用。突触间隙变窄,利于加速突触间传递功能。突触后膜致密物质厚度增厚,其代表的机能意义尚难定论,因为刺激方式或环境条件不同均会使其增厚或变薄。有研究表明^[9],突触后膜致密物质含有微管蛋白,肌动蛋白,神经丝蛋白,fordrin(钙调蛋白的一种主要结合蛋白)以及环核苷酸二酯等多种蛋白质。有人用超速离心法分离得到犬大脑皮层突触后膜致密物质,经化学分析发现,其中除肌动蛋白、微管蛋白及钙调蛋白外,还含有5-核苷酸酶、少量的细胞色素氧化酶以及大量相对分子质量为51 000的蛋白质,而最后一种蛋白质是突触后膜的特异性蛋白,在突触活动过程中有增加磷酸化的作用。因而,许多人认为突触功能活动变化时,某些酶及其底物蛋白的磷酸化过程引起其分子

构型的改变,从而表现为致密物质厚率增加或变薄,也有人认为这些蛋白的功能在于组装和调控突触后膜上的通道和受体分子。总之,突触后膜致密物质的变化可能是机能变化的形态基础。

3.2 电刺激治疗的可能机制

本实验中,治疗组的突触数目增多及结构改变均发生在坏死边缘区,而在远隔区及镜区无明显变化。MCAO后,脑梗塞区已坏死,发生不可逆的改变,但感觉及运动的神经传导通路在外周神经部分仍旧完整。脑内存在一些神经传导的旁路,电刺激偏瘫肢体,引起神经冲动,经完整的外周神经传导至中枢神经(脑),经平时少起作用的旁路刺激大脑皮层,引起坏死边缘区的突触数目及结构发生改变,从而影响了偏瘫肢体的运动功能。目前,有一种循经感传理论^[10],认为从现代神经解剖学和神经生理学的角度来看,循经感传的形成应包括从外周感受器,传入神经,直至中枢神经系统的各级中枢,尤其是与感觉传入有关的各级中枢活动。在正常情况下,体内的某些因素对循经感传的出现有一定的掩盖或抑制作用,当神经系统功能受损时,干扰阻抑因素的作用被解除,出现了“脱抑制现象”,故循经感传就更容易显现出来。在脑血管意外等脑部疾患的患者,循经感传的出现率,明显高于正常人,针对脑血管意外患者的这种特点,电刺激可能是一种有效的治疗手段。

由此可见,电刺激治疗有助于偏瘫肢体运动功能的恢复,可能与其电刺激瘫痪肢体,通过外周感受器,形成神经冲动,传导到中枢,引起相应大脑皮层突触数目及结构发生可塑性有关。

参 考 文 献

- 1 Magnusson M, Johansson K, Johansson B B. Sensory stimulation promotes normalization of postural control after stroke. *Stroke*, 1994, 25(6): 1176
- 2 韩玉芹,孟庆芝.脑卒中患者早期实施康复医疗对偏瘫肢体运动功能的恢复. *中国康复*, 1996, 11(1): 32
- 3 方燕南,黄如训,苏镇培,等.高血压鼠与正常鼠局部脑梗死后微循环结构改变的区别. *中山医科大学学报*, 1995, 16(3): 8
- 4 Feeney D M, Gonzalez A, Law W A. Amphetamine, haloperidol and experience interact to affect rat of recovery after motor injury. *Science*, 1982, 217: 855
- 5 俞雁彤,杨毅红.一种新的针刺促通技术:电针神经干治疗中风肢瘫. *中国康复*, 1994, 9(3): 119
- 6 Rees S, Guldner F H, Aitkin L, et al. Activity dependent plasticity of postsynaptic density structure in the ventral cochlear nucleus of the rats. *Brain Res*, 1985, 325: 370
- 7 Verensen G, Cardozo J N. Changes in size and shape of synaptic connection after usual training: an ultrastructural approach of synaptic plasticity. *Brain Res*, 1981, 218: 79
- 8 罗兰,陆汉新,吴馥新,等.脱甘氨酸胺精氨酸加压素引起小鼠脑内突触结构可塑性变化的定量观察. *解剖学报*, 1991, 22: 93
- 9 Wu K, Siekevitz P. Neurochemical characteristics of postsynaptic density fraction isolated from adult canine hippocampus. *Brain Res*, 1988, 457: 98
- 10 姚志彬,陈以慈. *脑研究前沿*. 广州:广东科技出版社, 1995. 437

(1997-09-02 收稿 1998-04-24 修回)

·简 讯·

我校国家重点科技项目:荧光定量 PCR 检测试剂盒问世

中山医科大学达安基因诊断中心承担的国家重点科技研究项目——荧光探针定量 PCR 诊断试剂盒的研制开发,日前已获实质性进展。据悉该项目中肝炎和结核等 10 余种常见病病原体诊断试剂盒已完成实验研究和部分临床应用观察。这一具有革命性突破的 PCR 试剂盒的问世,填补了国内该项高新技术产品开发与应用的空白。

PCR 方法自 1989 年开始应用于临床检验以来,以其简便、快速、灵敏的优势很快成为临床实验诊断学的技术热点。短短几年,国内临床 PCR 技术已应用到肝炎、肺部感染和性病等传染性疾病及遗传病、肿瘤、优生优育等领域,检测项目达 60 多种。然而,在实验室设计、条件控制及人员操作未得到严格管理的情况下,常规 PCR 技术极易出现因扩增产物污染所致的假阳性。同时,手工实验操作步骤繁复也使 PCR 技术临床应用未能达到应有的敏感性。此外,常规 PCR 技术还存在只能定性不能定量的不足。因此,国外许多大型的生物技术公司竞相投入巨资开发更适合临床应用的新一代 PCR 技术。1995 年,美国 Perkin Elmer 公司开发成功具有革命性的荧光定量 PCR 技术,融汇 PCR 和 DNA 探针杂交技术的优点,直接探测 PCR 过程中荧光信号的变化以获得定量的结果,把 PCR 技术的高敏感性、探针技术的高特异性和光谱技术的精确计量性巧妙而有机地结合在一起;应用此项技术检测沙门氏菌的试剂盒已得到美国 FDA 批准。同时,国外许多大型制药企业和医疗机构也纷纷采用该技术作为药物疗效考核的手段。中山医科大学达安基因诊断中心多年来密切跟踪这一新技术的发展,依靠自身科研力量与国内外先进科学技术,致力于荧光定量 PCR 检测技术研究开发,率先在我国开发出 10 余种常用荧光定量 PCR 检测试剂盒。

荧光定量 PCR 技术在临床上具有良好的可靠性和巨大的优越性,它的出现,使 PCR 技术在临床上的应用范围更为广泛;可对乙型肝炎、丙型肝炎、结核杆菌、巨细胞病毒、弓形虫及性病系列等的治疗过程和愈后监控提供准确的检测依据;可为治疗药物(如乙型肝炎)的疗效考核提供依据;同时,为临床医院的科研提供了新的手段。荧光定量 PCR 技术是对常规 PCR 技术的进一步完善,该技术的整个实验操作过程均在完全闭管的状态下进行,无需 PCR 后处理和繁复冗长的电泳检测,成为常规 PCR 的更新换代技术,是目前最先进的 PCR 技术。荧光探针定量 PCR 检测试剂盒在我国问世,对推动疾病的基因诊断疗效考核、疾病分子学机制的研究、流行病学调查和优生优育等都有十分重要的意义。

(冯世容)