

· 博士之窗 ·

电刺激对大鼠脑梗塞康复中星形细胞
与神经元的影响^{*}

方燕南 黄海威 陶玉倩 李 玲 丁明晖 李 花 曾进胜

内容提要 目的 探讨大鼠急性脑梗塞后的康复机制。方法 用易卒中型双肾双夹型肾血管性高血压大鼠复制大脑中动脉闭塞模型,随机分为电刺激治疗组(简称治疗组)和对照组,用走平衡木法评价大鼠康复功能。于电刺激治疗后第 1、3、6、9 周末在脑梗塞灶边缘区观察神经元与星形胶质细胞的超微结构,胶质酸性蛋白表达,神经丝蛋白和微管相关蛋白 2 表达,神经元凋亡及脑微血管舒张情况。结果 治疗组从 3~9 周末瘫痪肢体功能恢复较对照组明显,在脑梗塞边缘区上述表达及脑微血管舒张数量均较对照组高($P < 0.05$)。结论 电刺激治疗可以促进瘫痪肢体功能恢复,其机理可能是电刺激增加星形胶质细胞增殖,增强神经元活性,激发脑微血管舒张。

关键词 电刺激 脑梗塞 星形细胞 神经元 脑微血管

Study on Effect of Electrical Stimulus on Repairing of Astrocytes and Neurons in Rehabilitation after Middle Cerebral Artery Occlusion in Rats FANG Yan-nan, HUANG Hai-wei, TAO Yu-qian, et al *The First Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University, Guangzhou (510080)*

Objective : To explore the mechanism of rehabilitation after middle cerebral artery occlusion (MCAO).

Methods : MCAO model was reproduced with two-kidney, two clip renovascular hypertensive rats stroke-prone (RHRSP), which were divided into two groups, the treated group (treated with electric stimulus) and the control group (untreated model) randomly. The rehabilitation of rats was evaluated by balance beam walking test. The ultrastructural changes of neurons and astrocytes, expressions of glial fibrillary acidic protein (GFAP)-positive cells, neurofilament (NF) protein, and cerebral capillary dilatation M-associated protein-2 (MAP2), as well as the neurons apoptosis and the number of dilatation of cerebral capillary in the margin of infarcted area were observed by the end of 1st, 3rd, 6th and 9th week after modeling. **Results :** The motor function of paralysed limbs recovered better in the treated group than that in the control group by the end of 3-9th week after MCAO, the expression of GFAP-positive cells in astrocytes and NF, MAP2 in neurons as well as the number of cerebral capillary dilatation at the margin of infarcted area were higher than those in the control group ($P < 0.05$). **Conclusion :** Electric stimulation treatment could improve the recovery of motor function of paralyzed limbs. It might be due to the effect of electric stimulus in increasing astrocytes proliferation, reinforcing activity of neurons and evoking the dilatation of cerebral capillary.

Key words electric stimulus, cerebral infarction, astrocyte, neuron, cerebral capillary

查阅国内外文献不难发现,对卒中大鼠行为和感觉运动功能的研究多数只限于评价,采用实验性卒中模型有目的地进行瘫痪肢体的功能训练后脑组织是如何修复的报道不多。此外,目前的实验多选用正常鼠,

而脑内的许多变化与高血压性脑动脉硬化相关,如脑内神经生化的递质、血脑屏障及血管壁厚度等不同于正常鼠,可以影响脑梗塞干预性治疗结果⁽¹⁾。故我们采用易卒中型双肾双夹型肾血管性高血压大鼠(renovascular hypertensive rats stroke-prone, RHRSP)模型,重点研究星形细胞与神经元活性及功能性电刺激对脑梗塞后神经功能康复的影响。

^{*} 本课题受国家教委博士点(No. 9950)广东省科委攻关(No. 9827816)国家“九五”攻关(No. 969060223)基金及广东省卫生厅基金(No. 96)资助

材料与方法

1 脑梗塞模型制备 选用纯种健康雄性 SD 大鼠 200 只(广东省医用实验动物中心提供)3 月龄,体重 90~110g。均按原设计方法复制 RHRSP 模型⁽²⁾,术后 12 周的 RHRSP 收缩压为(26.21±3.25)kPa,用我们改良的方法复制右大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型⁽³⁾。

2 运动功能评分 根据 Feeney 等⁽⁴⁾大鼠走平衡木试验(beam walking test, BWT)评分等级(1~7 分法),评价大鼠的精细运动功能恢复情况。RHRSP 在行 MCAO 术前 1 周每隔 1 天进行测试训练 2 次, MCAO 后每天测试 1 次并打分。结果由 2 人评价,其中 1 人不知分组情况。

3 电刺激治疗 MCAO 后 3 天的 RHRSP 大鼠,经 BWT 评分为 1 分(完全不能爬过平衡木,且无法将后肢放在水平位)者选出 180 只(余 20 只超过 1 分者退出实验)随机分为电刺激治疗组(简称治疗组)和对照组,各 90 只。治疗组在瘫痪肢体取 4 个穴位,相当人的足三里、外关、伏兔、三阴交,使用半导体综合医疗机(广东羊城电子设备厂, YC-EO II B)进行电刺激,每天 1 次,每次 30min,频率 75 次/min,电流 60~80 μ A,6 天为 1 个疗程,停 1 天后进行下 1 个疗程。每疗程末用 BWT 评分法评价大鼠运动功能的恢复情况。对照组不作任何处理。两组随机各选 30 只鼠饲养到 MCAO 后 9 周,做功能恢复评分基数鼠。

4 病理学检查 在电刺激治疗第 1、3、6、9 周末,治疗组和对照组经 BWT 评分后随机各选 5 只(两组共 40 只),按电镜方法固定取脑,从前极头端至尾端每隔 2mm 冠状切片 5~6 张,在第 3 张脑片上,梗塞灶边缘区取 1cm×1cm×1cm 大小的脑组织进行常规电镜[EDAX-9800 能谱仪(149QV)]观察星形细胞增殖与神经元的改变。

5 免疫组化染色 两组于 1、3、6、9 周每周末经 BWT 评分后随机抽出 10 只大鼠(共 80 只)取脑,福尔马林固定,石蜡包埋,超薄切片,分别进行 ABC 法染色。(1)星形胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acid protein, GFAP)测定:采用单抗法[为 GFAP 单克隆抗体(试剂为 DAKO 产品, Code No. Z334, Lot No. 119)]。(2)神经丝蛋白(NF)和微管相关蛋白 2(MAP2)测定:用单抗法,试剂为 DAKO LSAB(试剂盒为美国 DAKO 公司产品),前者单抗为 NF 单克隆鼠抗人神经丝蛋白抗体,后者为 MAP2 单克隆微管相关蛋白 2 抗体(Boehring Mannheim, Cat No.

1284959)。

GFAP 使用 Konton IBAS 2.0 及 2.5 全自动图像分析系统,每张切片于 10×20 放大倍数下进行。(1)阳性细胞计数:从每组各标本的每张切片随机选 5 个视野,统计出每个视野内 GFAP 阳性细胞数。(2)阳性胞浆光密度:选取 30 个 GFAP 阳性细胞,测其阳性胞浆平均光密度(OD 值),同时测定胼胝体 OD 值做背景,两者相减即得到校正的 OD 值(COD 值),以任意单位(arbitrary unite, AU)表示。NF 和 MAP2 测定用自动图像分析系统,随机取上下左右中 5 个视野,测定其免疫反应产物阳性信号的面积(占当时视野面积的百分比)。

另外,两组各选 6 只大鼠按电镜取材法和包埋,用涂有 DAKO 胶的载玻片捞片,用 TUNEL 试剂(In situ Cell Death Detection Kit, POD, BM 公司)进行染色,观察并计算凋亡细胞染色阳性细胞数目。

6 统计学方法 按 SPSS 9.0 统计软件包对数据进行处理,两样本均数比较用 t 检验。

结 果

1 两组走平衡木试验结果 200 只 RHRSP 在 MCAO 术前 BWT 均为 7 分,术后 180 只均未超过 1 分。按 1、3、6、9 周末达 6 分(爬过平衡木,瘫痪肢体起作用达 50%)或以上者记为康复成功,参加 BWT 评分大鼠第 1 周两组各 90 只中达 6 分者两组均为 0,第 3 周两组各 75 只达 6 分者治疗组 12 只、对照组 2 只(两组比较差异有显著性, $\chi^2 = 6.8, P < 0.05$),第 6 周两组各 60 只达 6 分者分别为 52 只和 27 只(两组比较差异有显著性, $\chi^2 = 23.2, P < 0.01$),第 9 周两组各 45 只达 6 分者分别为 42 只和 26 只(两组比较差异有显著性, $\chi^2 = 15.4, P < 0.01$)。

2 两组脑梗塞后电刺激的电镜改变 第 1 周末:在脑梗塞灶边缘区对照组星形细胞足突肿胀,线粒体肿胀,治疗组星形细胞内线粒体增多,星形细胞与神经元接触靠近较多,且这些神经元的细胞器多正常。第 3 周末:对照组星形细胞肿胀消失,两组星形细胞和神经元内的线粒体形态正常,完整的细胞器增多,且星形细胞与正常微血管和神经元的接触均增多,星形细胞也明显增多,但以治疗组更多。第 6 周和第 9 周末,两组胶质星形细胞增殖和神经元改变同第 3 周。

3 两组大鼠在 MCAO 后电刺激治疗不同时间梗塞灶边缘区微血管开放数目 以 2000 倍数为 1 个电镜视野,每只鼠数 10 个不同视野,每个时间段组各有 3 只,故每个时间段组有 30 个不同视野。微血管扩张

表 1 两组 MCAO 后不同疗程 GFAP 阳性细胞数与神经元凋亡、NF 及 MAP2 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	疗程 (W)	GFAP 阳性		神经元凋亡数	NF 阳性	MAP2
		细胞数(个)	OD 值(%)	(个/200 倍视野)	OD 值(%)	OD 值(%)
治疗	1	36.63±4.11(50)	45.79±0.49(30)	74.7±8.8(6)	10.0±1.1(50)	10.3±1.7(50)
	3	44.97±3.24(50)*	52.97±0.59(30)*	38.3±6.4(6)	13.2±2.3(50)	12.8±1.5(50)
	6	44.20±3.43(50)*	49.44±0.80(30)*	10.2±3.7(6)	22.9±2.7(50)*	21.7±1.3(50)*
	9	27.67±4.09(50)	43.25±0.48(30)*	2.6±1.5(6)	26.5±1.7(50)*	24.4±2.1(50)*
对照	1	35.30±3.27(50)	45.78±0.52(30)	73.2±7.3(6)	10.8±1.2(50)	10.2±1.8(50)
	3	35.53±3.55(50)	46.40±0.56(30)	41.7±6.3(6)	10.9±1.8(50)	10.8±2.3(50)
	6	30.53±2.60(50)	40.17±1.13(30)	12.1±5.8(6)	11.9±2.3(50)	11.3±1.1(50)
	9	27.20±3.39(50)	34.20±0.50(30)	3.2±1.4(6)	11.7±1.5(50)	11.9±2.3(50)

注 :与对照组同期比较,* $P<0.05$;()内数据为样本数

标准为管腔扩张呈圆形,内皮细胞核为常染色质,无内皮细胞水肿或内皮细胞内膜断裂,视野下为完整的微血管计数 1 个。两组在 MCAO 后 1、3、6、9 周微血管开放数治疗组分别为 33、48、45、46 个,对照组分别为 19、31、25、23 个。经秩和检验, $Z=-2.309$, $P<0.05$ 。

4 两组大鼠脑梗塞后 GFAP 阳性细胞数目、光密度(OD)值、神经元凋亡数、NF 阳性及 MAP2 结果见表 1。GFAP 阳性细胞数:在 MCAO 第 3 和 6 周末治疗组较对照组增多,差异有显著性($P<0.05$)。GFAP 光密度值(OD 值):在 MCAO 第 3、6、9 周末治疗组较对照组高,差异有显著性($P<0.05$)。神经元凋亡细胞(染色阳性细胞数)两组均逐渐减少,但两组比较差异无显著性。NF 和 MAP2 的阳性信号密度值(OD 值):在第 6 和 9 周末治疗组均明显高于对照组,差异有显著性($P<0.05$)。

讨 论

本研究结果显示两组在 MCAO 后第 1 疗程末运动功能开始改善,第 6 和 9 周末功能恢复更加明显,说明急性脑梗塞后运动功能确实存在着自然恢复过程,即运动功能有可塑性。通过瘫痪电刺激治疗后 1~9 周 BWT 的评分明显高于对照组,说明电刺激治疗在脑梗塞后的肢体功能恢复中具有积极的促进作用。

星形细胞的改变在脑梗塞后的早期和后期是不同的。在 MCAO 后 GFAP 阳性细胞数目在梗塞边缘区逐渐升高,而凋亡的神经元逐渐减少,结合电镜结果,说明星形细胞的这种改变应当有利于全脑各组织成分的联系,积极地进行功能代偿。

本研究电刺激治疗组正常微血管扩张数明显多于对照组,且代表着神经元功能和联系的 NF 和 MAP2 在第 3~9 周的阳性信号密度值明显高于对照组。考

虑电刺激治疗促进急性脑梗塞后运动功能康复的可能机制为:反复的电刺激可能通过机械刺激,通过感觉传导通路或非特异性感觉传导通路或网状结构,到达对侧半球的脑梗塞边缘区功能尚存的星形细胞或神经元,激发它们的活性,重建与周围神经元的信息联络网,使脑内侧支循环开放、脑组织细胞供血、供氧能力增强,虽不能使坏死的神经元死而复生,但却可以清除梗塞边缘区的水肿,挽救濒临失去功能的神经元,促使星形胶质细胞增殖,加强修复功能;另一方面使瘫痪肢体功能重建。这提示电刺激可能通过该“重建的通路”以促进星形胶质细胞的缺血性水肿的消退,从而更好地发挥其功能,促进神经元信息联络网的重建,进行功能代偿。这可能与星形细胞能引起脑微血管舒张的假说有关⁽⁵⁾。但这种微血管的扩张究竟是否与星形细胞有关,有待今后进一步提出更多的实验证据来证实。

参 考 文 献

1. Wang LC. A reproducible model of middle cerebral infarcts, compatible with long-term survival in aged rats. Stroke 1995; 26(11):2087—2098.

2. 黄如训,曾进胜,苏镇培.易卒中型肾血管性高血压大鼠模型.中国神经精神疾病杂志 1991;17(6):257—259.

3. FANG Yan-nan, HUANG Ru-xun, LIN Jian-wen, et al. Changes after dynamic observation of ultrastructural cerebral infarction in renovascular hypertensive rat. Chinese Medical Journal 2000;113(6):520—524.

4. Feeney DM, Gonzalez A, Law WA. Amphetamine, haloperidol and experience interact to affect rat of recovery after motor injury. Science 1982 217:855.

5. Harder DR, Alkayed NJ, Lange AR, et al. Functional hyperemia in the brain hypothesis for astrocyte-derived vasodilator metabolites. Stroke 1998 29(1):229—234.

(收稿 2002-01-04 修回 2002-04-06)