

· 基础研究 ·

电刺激对脑梗死大鼠运动功能和 Rho 激酶表达的影响

陈涛 张秀清 唐吉友

【摘要】目的 探讨单侧与双侧电刺激对脑梗死大鼠肢体运动功能和 Rho 激酶表达的影响。**方法** 采用线栓法制作 Sprague-Dawley 大鼠大脑中动脉永久性闭塞模型,将造模成功且存活的脑梗死大鼠分为假手术组、对照组、单侧电刺激组、双侧电刺激组(各 36 只),假手术组、对照组自然恢复,单、双侧电刺激组接受电刺激治疗。利用平衡木试验(BWT)观察造模后第 3 天、第 7 天、第 14 天和第 21 天各组大鼠运动功能恢复情况,同时采用免疫组化染色法检测脑梗死灶周边区 Rho 激酶的表达水平,采用 2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC)染色法检测脑梗死灶体积的变化。**结果** 第 7,14,21 天,电刺激组大鼠 BWT 评分明显高于对照组($P < 0.05$);第 14,21 天双侧电刺激组优于单侧电刺激组($P < 0.05$)。第 14,21 天,电刺激组 Rho 激酶表达水平明显低于对照组($P < 0.05$),且双侧电刺激组 Rho 激酶表达水平较单侧电刺激组更低($P < 0.05$)。与对照组比较,2 个电刺激组第 3 天脑梗死灶体积无明显变化($P > 0.05$),第 21 天脑梗死灶体积显著缩小($P < 0.05$),双侧电刺激组与单侧电刺激组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 早期电刺激能够促进脑梗死大鼠运动功能的恢复,并且促进脑梗死灶体积缩小,双侧电刺激疗效优于单侧电刺激,其机制可能与下调脑梗死灶周边区 Rho 激酶的表达有关。

【关键词】 电刺激; 脑梗死; 运动功能; Rho 激酶

Effects of electric stimulation on motor function and the expression of Rho kinase following cerebral infarction CHEN Tao, ZHANG Xiu-qing, TANG Ji-you. Department of Neurology, Qianfoshan Hospital Affiliated to Shandong University, Ji'nan 250014, China

Corresponding author: ZHANG Xiu-qing, Email: zhangxiuqing1952@163.com

【Abstract】Objective To investigate the effects of electric stimulation on motor function and expression of Rho kinase following cerebral infarction in rats. **Methods** Acute cerebral infarction was modeled in adult male Sprague-Dawley (SD) rats using the permanent middle cerebral artery occlusion (PMCAO) technique. The rats were randomly divided into sham operation, control, unilateral electric stimulation and bilateral electric stimulation groups (each group had 36 rats). Electric stimulation was applied to the paralyzed (unilateral or bilateral) limbs in the last two groups. Motor function recovery and the expression of Rho kinase were examined using a beam walking test (BWT) and immunohistochemistry respectively at the 3rd, 7th, 14th and 21st day after stimulation. In addition, the cerebral infarction volume was also determined by 2, 3, 5-triphenyl tetrazolium chloride (TTC) staining at different time points. **Results** Motor function improved significantly in the electric stimulation groups compared with the control group, and the effect in the bilateral electric stimulation group was better than that in the unilateral electric stimulation group. The expression of Rho kinase decreased remarkably in the electric stimulation groups, and it was significantly lower in the bilateral group than in the unilateral electric stimulation group. No difference in cerebral infarction volume was found at the 3rd day. At the 21st day, the cerebral infarction volume had decreased significantly in both stimulation groups compared with the control group, but no difference was seen between the unilateral and bilateral electric stimulation groups. **Conclusions** Early electric stimulation, especially bilateral electric stimulation, can improve motor function after cerebral infarction and reduce cerebral infarction volume, which may be associated with down-regulation of the expression of Rho kinase in the border zone of the infarction.

【Key words】 Electric stimulation; Cerebral infarction; Motor function; Rho kinase

电刺激疗法作为一种常用的治疗手段,在脑梗死

患者临床治疗和康复中起着重要作用,然而其确切的分子机制并未阐明,并且对于脑卒中患者早期能否应用电刺激治疗仍存在争议。Rho 激酶作为 Rho 蛋白的主要下游效应分子,被认为在脑梗死的发生发展过程中起着重要作用,其抑制剂——盐酸法舒地尔

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2010.07.003

基金项目:山东省卫生厅计划课题(2007WH114)

作者单位:250014 济南,山东大学附属千佛山医院神经内科

通信作者:张秀清,Email:zhangxiuqing1952@163.com

(fasudil)已应用于临床,并取得了满意效果。本实验通过对脑梗死大鼠早期给予电刺激治疗,观察电刺激对其运动功能、脑梗死体积和 Rho 激酶表达的影响,进一步探讨电刺激治疗脑梗死的分子学机制。

材料与amp;方法

一、主要试剂和仪器

北京产兔抗大鼠 ROCK2 IgG,上海产 Supervision™,HRP 试剂盒,武汉产二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)显色液,上海产 2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC)粉末,上海产 BT701-1A 型电刺激仪。

二、实验动物及分组

健康雄性 Sprague-Dawley (SD)大鼠由山东中医药大学提供,鼠龄 4~5 个月,体重 250~300 g。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 108 只大鼠进行完全随机分组,分为单侧电刺激组、双侧电刺激组和对照组,每组 36 只,另选取假手术组 36 只。每组根据观察时间点再分为第 3 天、第 7 天、第 14 天和第 21 天 4 个亚组,第 3 天与第 21 天亚组各 12 只,第 7 天和第 14 天亚组各 6 只。

三、脑梗死模型制作

选用日本产尼龙线,直径 0.205 mm,每段长 40 mm,头端烧成光滑球形,参考 Longa 等^[1]介绍的方法改良后制作大鼠脑梗死模型。具体方法如下:用 10% 水合氯醛(300 mg/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脉(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 5 mm 处。术后将动物置于放有清洁垫料的饲养笼内,给予常规饮水及进食。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。评分为 1~3 分为造模成功。

四、电刺激方法

从大鼠造模成功后第 1 天开始行电刺激治疗。单侧电刺激组和双侧电刺激组分别刺激瘫痪侧和双侧肢

体,假手术组和对照组不予刺激。采用针刺电极(后肢刺激环跳穴和阳陵泉穴,前肢刺激肩髃穴和曲池穴),刺激频率 3 Hz,电流强度以肢体微微抖动为宜,每次 30 min,每天 1 次,治疗 6 d 休息 1 d。

五、神经功能评分

根据 Feeney 等^[2]介绍的走横木试验(beam walking test, BWT),于造模成功后第 3 天、第 7 天、第 14 天、第 21 天评价大鼠运动功能恢复情况。横木为 120 cm×2.5 cm 的木板,一端给予强光及噪音刺激,对侧端为黑笼子。各组大鼠均于术前 1 周进行测试,隔日训练 1 次,共 2 次。BWT 评分等级为 1~7 分:7 分为能顺利爬过平衡木,瘫痪肢体完全起作用,无明显神经体征;6 分为能爬过平衡木,瘫痪肢体起作用≥50%;5 分为能爬过平衡木,瘫痪肢体起作用<50%;4 分为不能顺利爬过平衡木,跌倒几率≤50%;3 分为不能顺利爬过平衡木,跌倒几率>50%;2 分为在平衡木上不能行走,但可坐其上;1 分为不能爬过平衡木且无法将后肢置于水平位,放在平衡木上会掉下。

六、免疫组织化学染色检测 Rho 激酶的表达

各组大鼠于相应时间点腹腔注射过量水合氯醛麻醉后,开胸暴露心脏,剪开右心耳,从左心室置管灌注预冷的 4℃肝素化生理盐水(50 U/ml)250 ml,将血液冲洗干净;用 4% 多聚甲醛 250 ml 灌注固定 30 min,快速断头取脑;参照大鼠脑立体定位图谱,冠状面切取前囟前后 2 mm 厚脑片放入 10% 中性甲醛溶液中后固定 48 h;常规梯度乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,连续 5 μm 切片;按试剂盒说明进行免疫组化染色;切片经脱水,透明,中性树脂胶封片,镜下观察。用磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)代替一抗做阴性对照。图像分析:每张切片取梗死灶周边区不同的 3 个视野照相(Olympus 光学显微镜,×400),用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析系统测定梗死灶周边区免疫表达阳性反应产物的积分光密度值(integral optical density, IOD)。每只大鼠取 3 张相同部位脑片进行检测,求其算术平均值。

七、脑梗死体积测定

各组大鼠于第 3 天与第 21 天腹腔注射过量水合氯醛麻醉后,快速断头取脑;于 -20℃冰箱中速冻 20 min 后切片,从额极到枕极切成 5 层等厚(2 mm)的冠状脑片;立即置于 37℃ 1% TTC 溶液中水浴,避光孵育 30 min,不时翻动脑切片,使其均匀接触染色液;脑片取出后放入 4% 多聚甲醛溶液中保存,用数码相机将每一张切片摄像后,用相关图像分析系统测定梗死面积,换算成体积。梗死体积=(各切片正面梗死面积之和+各片反面梗死面积之和)/2×每片厚度,以脑梗死体积/正常大鼠大脑体积×100%表示。

八、统计学分析

采用 SPSS 13.0 版统计软件,数据以($\bar{x} \pm s$)表示,多样本均数比较用单因素方差分析(ANOVA),若总体均数不等或不全相等时,进行 q 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、电刺激对脑梗死大鼠 BWT 评分的影响

对照组各亚组大鼠 BWT 评分均明显低于假手术组($P < 0.05$),第 14 天肢体功能较前明显改善($P < 0.05$)。在刺激前和刺激第 3 天,单侧电刺激组和双侧电刺激组与对照组 BWT 评分比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),刺激第 7,14 和 21 天,单侧电刺激组和双侧电刺激组 BWT 评分明显高于对照组($P < 0.05$);刺激第 14 和 21 天,双侧电刺激组 BWT 评分明显高于单侧电刺激组($P < 0.05$)。见表 1。

二、电刺激后脑梗死大鼠梗死灶周边区 Rho 激酶表达的变化

免疫组织化学染色结果显示,Rho 激酶主要表达于大脑皮质脑梗死灶的周边区,梗死区内可见少量 Rho 激酶表达产物,主要集中在细胞核的周围(图 1)。电刺激前和刺激第 3 天,各组大鼠脑梗死周边区 Rho 激酶的表达无明显变化,而自第 7 天起对照组和 2 个电刺激组脑梗死灶周边区 Rho 激酶表达开始升高,第 14 天达到高峰,第 21 天仍持续表达且高于第 7 天。电刺激治疗第 14 和 21 天,Rho 激酶表达量与对照组

相比明显下降($P < 0.05$),且双侧电刺激组较单侧电刺激组下降更明显($P < 0.05$),见图 2。

三、电刺激对脑梗死体积的影响

正常脑组织呈深红色,梗死区呈白色。假手术组大鼠未见梗死灶,对照组第 3 天梗死灶明显,第 21 天梗死灶体积明显较第 3 天小($P < 0.05$)。2 个电刺激组梗死灶体积与对照组比较,第 3 天差异均无统计学意义($P > 0.05$),第 21 天明显小于对照组($P < 0.05$)。单侧电刺激组与双侧电刺激组相应时间点梗死灶体积比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 2 和图 3。

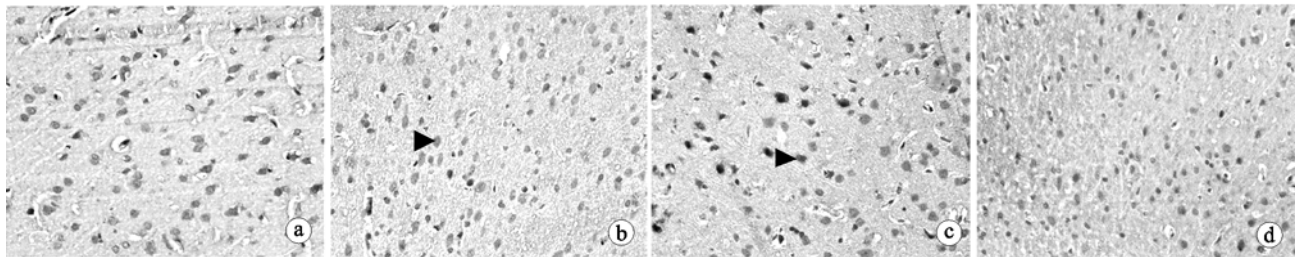
讨 论

治疗脑梗死的理论基础是脑组织具有可塑性,其主要机制包括远隔抑制功能消失论、替代论与功能重组、突触再现和神经突起再生(发芽)^[3]。有研究表明,电刺激能够促进脑卒中患者偏瘫肢体功能改善,增强肌肉力量,降低痉挛以及激活脑组织等^[4],并且神经影像学如功能性磁共振和经颅磁刺激检查到脑卒中恢复过程中脑组织可被激活^[5],然而其确切的分子机制却并未得到阐明。本实验研究表明,早期应用电刺激能够明显促进脑梗死大鼠瘫痪肢体运动功能恢复并缩小脑梗死灶体积,同时脑梗死灶周边区 Rho 激酶的表达水平明显下降。提示电刺激对脑梗死后运动功能的改善作用和缩小脑梗死灶体积的机制可能与下调脑梗死灶周边区 Rho 激酶的表达水平有关。

表 1 各组大鼠各观察时间点 BWT 评分比较(分, $\bar{x} \pm s$)

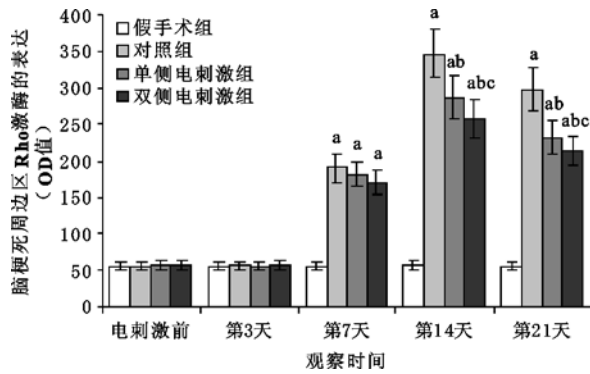
组 别	只数	刺激前	第 3 天	第 7 天	第 14 天	第 21 天
假手术组	6	7.00 ± 0.00	7.00 ± 0.00	7.00 ± 0.00	7.00 ± 0.00	7.00 ± 0.00
对照组	6	1.00 ± 0.00 ^a	1.17 ± 0.41 ^a	1.67 ± 0.52 ^a	2.50 ± 0.55 ^{ab}	3.33 ± 0.52 ^{ab}
单侧电刺激组	6	1.00 ± 0.00 ^a	1.33 ± 0.52 ^a	2.33 ± 0.52 ^{ac}	3.67 ± 0.52 ^{ac}	4.83 ± 0.41 ^{ac}
双侧电刺激组	6	1.00 ± 0.00 ^a	1.50 ± 0.55 ^a	2.50 ± 0.55 ^{ac}	4.67 ± 0.52 ^{acd}	5.67 ± 0.52 ^{acd}

注:与假手术组相应时间点比较,^a $P < 0.05$;对照组内比较,^b $P < 0.05$;与对照组相应时间点比较,^c $P < 0.05$;与单侧电刺激组相应时间点比较,^d $P < 0.05$



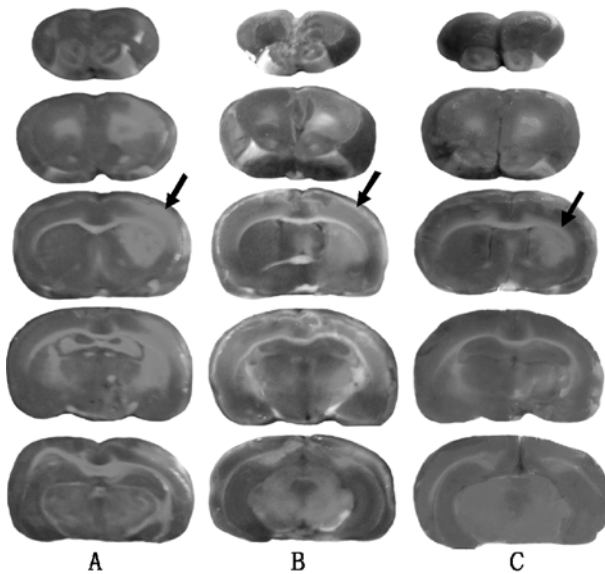
注:a. 假手术组大鼠大脑皮质可见少量 Rho 激酶阳性表达产物;b. 对照组大鼠脑梗死灶周边区大脑皮质 Rho 激酶阳性表达产物明显增多(棕黄色颗粒,箭头所示);c. 单侧电刺激组大鼠脑梗死灶周边区 Rho 激酶阳性表达产物明显减少(箭头所示);d. 双侧电刺激组大鼠脑梗死灶周边区 Rho 激酶阳性表达产物明显较单侧电刺激组少

图 1 电刺激第 14 天各组大鼠脑梗死周边区 Rho 激酶的表达(免疫组化染色,×400)



注:与假手术组相应时间点比较,^a $P < 0.05$;与对照组相应时间点比较,^b $P < 0.05$;与单侧电刺激组相应时间点比较,^c $P < 0.05$

图 2 各组大鼠脑梗死灶周边区 Rho 激酶表达的变化



注:A. 对照组,B. 单侧电刺激组,C. 双侧电刺激组;图中箭头所指为左侧脑梗死灶,呈白色

图 3 电刺激第 21 天各组大鼠脑梗死体积的变化

表 2 对照组与 2 个电刺激组第 3 天与第 21 天脑梗死体积比较(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	只数	第 3 天	第 21 天
对照组	6	31.72 ± 6.24	20.31 ± 3.46 ^a
单侧电刺激组	6	30.76 ± 5.82	14.37 ± 2.45 ^{ab}
双侧电刺激组	6	30.43 ± 5.47	14.26 ± 2.38 ^{ab}

注:与组内第 3 天比较,^a $P < 0.05$;与对照组第 21 天比较,^b $P < 0.05$

Rho 激酶是 Rho 相关卷曲螺旋形成的蛋白激酶 (Rho-associated coiled-coil forming protein kinase, ROCK), 是小分子单体 GTP 结合蛋白 Rho 最主要的下游效应分子。Rho 激酶主要的作用机制是对肌球蛋白轻链磷酸化酶进行磷酸化修饰, 从而导致其失活, 失去对磷酸化肌球蛋白的脱磷酸作用。此外, Rho 激酶还能够直接对肌球蛋白轻链进行磷酸化修饰, 从而诱导肌球蛋白内在 ATP 酶活性产生持续收缩^[6]。Rho 激酶除了引起缺血性脑卒中血流动力学障碍, 包括血管收

缩、内皮功能紊乱、血液高黏度与继发性炎症反应以外^[7-8], 最近有研究证实, Rho 激酶还可直接作用于缺血神经元, 从而直接导致生长锥塌陷及神经突起回缩。Yamashita 等^[9]研究表明, Rho 激酶的表达与活性在脑缺血部位增强, 其定位与神经元轴突相一致, 其抑制剂法舒地尔可以降低 Rho 激酶的表达与活性, 具有神经保护作用。Yano 等^[10]的研究也表明, 大鼠脑梗死后, 脑实质内 Rho 激酶活性显著升高, 主要定位于神经元与血管细胞。本研究发现, 对照组大鼠第 7 天 Rho 激酶在神经元胞浆和轴突内有明显表达, 第 14 天达到高峰, 第 21 天 Rho 激酶的表达仍高; 而给予电刺激第 14 天, Rho 激酶的表达显著下降, 提示电刺激可导致其活性降低, 并且双侧电刺激组优于单侧电刺激组。

对照组大鼠第 14 天 BWT 评分较前增高, 且第 21 天脑梗死体积较第 3 天缩小, 说明急性脑梗死存在着自然恢复过程。给予电刺激第 7 天, 电刺激组大鼠瘫痪肢体运动功能改善较对照组明显, 且给予电刺激第 14 天, 双侧电刺激组功能改善优于单侧电刺激组。我们推测这可能与抑制 Rho 激酶的表达有关。本研究进一步显示, 2 个电刺激组第 21 天的梗死体积明显小于对照组, 说明电刺激能够缩小脑梗死灶体积。然而, 尽管双侧电刺激对脑梗死大鼠瘫痪肢体运动功能的改善以及对 Rho 激酶表达的抑制作用明显优于单侧电刺激, 但是, 这两种电刺激方式对脑梗死体积的影响无明显差异。双侧电刺激之所以对瘫痪肢体运动功能的改善作用优于单侧电刺激, 可能还与损伤对侧大脑感觉运动皮质、运动前区、辅助运动区以及顶叶皮质的激活^[11]和大脑半球之间的抑制解除有关^[12]。

结合我们前期研究的发现, 早期电刺激能够降低大鼠脑梗死周边区 Nogo-A 和 NgR 的表达, 也能诱导脑组织微管相关蛋白-2 和存活素的表达; 一方面, 可促进梗死灶周围受损神经元轴突、树突的延伸, 抑制受损神经元凋亡, 重建与周围神经元的信息联络网; 另一方面, 通过促进缺血灶及其周边区微血管再生, 增加缺血区血液供应, 减轻神经元损害, 防止脑梗死灶扩大, 有利于神经功能恢复^[13-14]。因此, 我们推测早期电刺激能够促进脑梗死大鼠运动功能的恢复可能与调节 Nogo-A-NgR/ P75 NTR /Lingo-1 受体复合物-Rho/Rho 激酶这一信号通路有关。以往对 Rho 激酶作用机制的研究多强调其在血管平滑肌、血管内皮细胞以及炎症细胞中的表达, 而我们的研究证实 Rho 激酶可在脑梗死大鼠神经元内表达, 直接影响缺血神经元的生长, 该机制可为临床治疗脑卒中患者提供新的思路。

参 考 文 献

[1] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral

artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*, 1989, 20:84-91.

[2] Feeney DM, Gonzalez A, Law WA. Amphetamine, haloperidol and experience interact to affect rate of recovery after motor cortex injury. *Science*, 1982, 217:855-857.

[3] 朱镛链. 脑的可塑性与功能重组. *中华内科杂志*, 2000, 39: 567-568.

[4] Popovic MB, Popovic DB, Sinkjaer T, et al. Restitution of reaching and grasping promoted by functional electric therapy. *Artif Organs*, 2002, 26:271-275.

[5] Jang SH. A review of motor recovery mechanisms in patients with stroke. *Neurol Rehabil*, 2007, 22:253-259.

[6] Amano M, Ito M, Kimura K, et al. Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). *J Biol Chem*, 1996, 271:20246-20249.

[7] Shin HK, Salomone S, Potts EM, et al. Rho-kinase inhibition acutely augments blood flow in focal cerebral ischemia via endothelial mechanisms. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2007, 27:998-1009.

[8] Rikitake Y, Kim HH, Huang ZH, et al. Inhibition of Rho kinase (ROCK) leads to increased cerebral blood flow and stroke protection. *Stroke*, 2005, 36:2251-2257.

[9] Yamashita K, Kotani Y, Nakajima Y, et al. Fasudil, a Rho kinase (ROCK) inhibitor, protects against ischemic neuronal damage in vitro and in vivo by acting directly on neurons. *Brain Res*, 2007, 1154:215-224.

[10] Yano K, Kawasaki K, Hattori T, et al. Demonstration of elevation and localization of Rho-kinase activity in the brain of a rat model of cerebral infarction. *Eur J Pharmacol*, 2008, 594:77-83.

[11] Cao Y, D'Olaberriague L, Vikingstad EM, et al. Pilot study of functional MRI to assess cerebral activation of motor function after post-stroke hemiparesis. *Stroke*, 1998, 29:112-122.

[12] Mudie MH, Matyas TA. Can simultaneous bilateral movement involve the undamaged hemisphere in reconstruction of neural networks damaged by stroke? *Disabil Rehabil*, 2000, 22:23-37.

[13] 杨冰, 张秀清, 唐吉友, 等. 电刺激对脑梗死大鼠运动功能恢复及 Nogo-A、NgR 表达的影响. *山东大学学报 (医学版)*, 2008, 46:931-935.

[14] 司志华, 张秀清, 唐吉友. 电刺激治疗对脑梗死大鼠运动功能和脑组织微管相关蛋白 2 及存活素表达的影响. *临床神经病学杂志*, 2009, 22:120-123.

(修回日期:2010-02-05)

(本文编辑:吴倩)

《中华物理医学与康复杂志》第六届编辑委员会组成名单

顾问: 裘法祖 南登崑 陈安民 陈景藻 许云影(香港) Ernest W. Johnson(美国)

名誉总编辑: 谭维溢 吴宗耀

总编辑: 郭正成

副总编辑: 李晶 黄晓琳 燕铁斌 陆廷仁 郭铁成(常务)

常务编辑委员: 王伟 王宁华 华桂茹 孙启良 李玲 李建军 纪树荣 励建安 吴毅
陆再英 张长杰 岳寿伟 郑光新

编辑委员: (按姓氏笔画排序)

王刚	王冰水	王茂斌	尤春景	毛容秋	卢成皆(澳大利亚)	刘世文
刘宏亮	孙星炯	汤晓芙	李红玲	李胜利	李常威(香港)	李晓捷
杜宝琮	何成奇	何作云	邱平	邱纪方	汪培华	张继荣
周士枋	敖丽娟	顾新	郭龙德	倪朝民	徐永健	徐军
梅元武	董时富	傅成礼	谢欲晓	窦祖林	廖维靖	