

重复经颅磁刺激对脊髓运动功能恢复的影响及其机制的实验研究

张新¹, 李建军^{1,2}, 霍小林³, 戴红⁴, 潘立东⁵

[摘要] 目的 观察重复经颅磁刺激(rTMS)对大鼠脊髓损伤后运动功能恢复的影响,并对其作用机制进行初步探索。方法 利用重物撞击法制作成年大鼠 T₁₀ 脊髓损伤模型,实验组给予经皮 0.5 Hz 大脑皮质区磁刺激,每天 500 个脉冲,共 4 周。通过运动行为学 BBB 评分,组织学及免疫组化荧光法观察生长相关蛋白 43(GAP43)和 5-羟色胺(5-HT)在脊髓损伤区的变化情况。结果 实验组 BBB 评分明显高于模型组($P < 0.01$);组织学表现符合慢性不完全性脊髓损伤病理变化;实验组 GAP43 及 5-HT 水平明显高于模型组($P < 0.01$);且损伤头端增加明显显著高于尾端($P < 0.01$)。结论 rTMS 有促进脊髓损伤大鼠运动功能恢复的作用,机制可能与促进轴突生长锥可塑性及残存下行 5-HT 能纤维神经递质分泌增加有关。

[关键词] 脊髓损伤;重复经颅磁刺激(rTMS);生长相关蛋白 43(GAP43);5-羟色胺(5-HT)

Effects of Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation on Locomotor Outcome of Spinal Cord Injured Rats ZHANG Xin, LI Jian-jun, HUO Xiao-lin, et al. Department of Neurosurgery, Beijing Charity Hospital, Capital Medical University School of Rehabilitation Medicine, China Rehabilitation Research Centre, Beijing 100068, China

Abstract: **Objective** To explore the effect of repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) on spinal cord injured rats. **Methods** Weight drop spinal cord injury model was made at thoracic 10 segments with NYU impactor device. Stimulated group received daily superthreshold rTMS continued for 4 weeks. BBB locomotor scores were recorded weekly. Growth associated protein 43 (GAP43) and 5-hydroxytryptamine (5-HT) were detected with immunofluorescence staining in the area of rostral and caudal to the lesion. **Results** The BBB scores in stimulation group improved compared with that in the control ($P < 0.01$). GAP43 and 5-HT markers increased in the stimulation group ($P < 0.01$), and they increased in the rostral than in the caudal areas ($P < 0.01$). **Conclusion** rTMS can improve the locomotor function of incomplete spinal cord injury rats, which may result from the increase of expression of GAP43 and 5-HT.

Key words: spinal cord injury; repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS); growth associated protein 43 (GAP43); 5-hydroxytryptamine (5-HT)

[中图分类号] R651.2 [文献标识码] A [文章编号] 1006-9771(2008)03-0228-03

[本文著录格式] 张新,李建军,霍小林,等.重复经颅磁刺激对脊髓运动功能恢复的影响及其机制的实验研究[J].中国康复理论与实践,2008,14(3):228-230.

经颅磁刺激是一种简单易行、安全无痛的刺激形式。近年来,重复经颅磁刺激(rTMS)在抑郁症、帕金森病、癫痫、神经性疼痛、脑卒中、脑损伤神经功能恢复方面进行较多的实验和临床研究^[1],证实磁刺激具有改变细胞膜的离子通道、改变细胞兴奋性、促进神经细胞再生、诱导轴突发芽生长等作用,在神经重塑再生方面的研究显示了强大的临床应用前景。本研究旨在探索 rTMS 对脊髓损伤后运动功能恢复的影响。

1 材料与方法

1.1 动物分组与造模 首都医科大学实验动物中心提供的清洁级成年雌性 Sprague-Dawley 大鼠,体重(250±10)g。2%异戊巴比妥钠 40 mg/kg 腹腔注射

麻醉。利用 NYU 脊髓打击器(美国),以 75 g·cm 致伤力制作第 10 胸椎节段脊髓损伤模型。造模大鼠饲养 8 周后随机进入模型组(对照组,n=20)和实验组(实验组,n=20),另设正常对照组(不损伤脊髓,n=15)。

1.2 rTMS 方法 造模第 8 周实验组大鼠清醒状态下置于固定器中。蝶形线圈磁场中心置于大鼠前囟上方,每日定时行阈上强度刺激(最大磁场强度 2 T,实验中磁场输出强度为 70%),频率 0.5 Hz,每日 500 个脉冲,连续刺激 4 周。模型组同法置于固定器中,探头无磁脉冲输出。

1.3 运动行为学 BBB 评分 所有实验大鼠用 BBB 法于造模后每周盲法进行评价。将动物放置于直径为 2 m 的圆形平台上,观察记录其后肢的行走及肢体活动。

1.4 HE 及髓鞘染色 造模后第 8 周模型组和实验组各随机过量麻醉处死 5 只,灌注固定,截取脊髓损伤区节段行常规 HE 及髓鞘染色后光镜下观察。

1.5 免疫组织化学荧光染色 正常对照组 15 只,实验组和模型组于造模后 12 周各随机处死 15 只,恒冷

作者单位:1. 北京博爱医院神经外科,北京市 100068;2. 首都医科大学康复医学院,北京市 100068;3. 中国科学院电工研究所,北京市 100080;4. 首都医科大学康复研究室,北京市 100054;5. 中国康复研究中心基础研究所,北京市 100068。作者简介:张新(1976-),男,辽宁沈阳市人,主治医师,主要研究方向:脊髓损伤基础与临床研究。

箱连续脊髓横贯水平切片,片厚 $40\ \mu\text{m}$,损伤头、尾侧分别切取完整灰质片,每侧标本连续切片顺次裱为 4 套。取第 1 与第 3 套切片按 SP 法进行 5-羟色胺(5-HT)免疫组织化学反应 Avidin-FITC 荧光显色;取第 2 与第 4 套切片按 SP 法进行生长相关蛋白 43(GAP43)免疫组织化学反应 Avidin-CY3 荧光显色。封片后荧光显微镜下观察。

1.6 图像分析与统计处理 采用 LEICAQ Win 图像处理与分析系统进行图像分析。实验数据先进行方差齐性检验,采用 SPSS11.5 软件进行 ANOVA 分析,多组均数两两比较用 S-N-K 及 LSD 检验,实验组尾端 GAP43 表达与 5-HT 密度值之间的相关性用 Pearson 检验。 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 BBB 评分 正常对照组大鼠为 21 分,稳定无变化。所有造模大鼠术后 1 周末后肢运动即开始恢复,第 2-3 周恢复较快,5 周时平均达到 (7.40 ± 0.71) 分,即后肢处于不负重体位,髋、膝、踝全关节节律性屈伸运动,并处于平台期直至第 8 周。实验组在刺激第 2 周末评分逐渐提高,至第 4 周时平均达到 (13.20 ± 0.68) 分,即前后肢持续协调的足底负重步态,优势爪在刚触地和抬起时内旋或外旋,明显高于模型组 (7.73 ± 0.70) ($P < 0.01$)。见图 1。

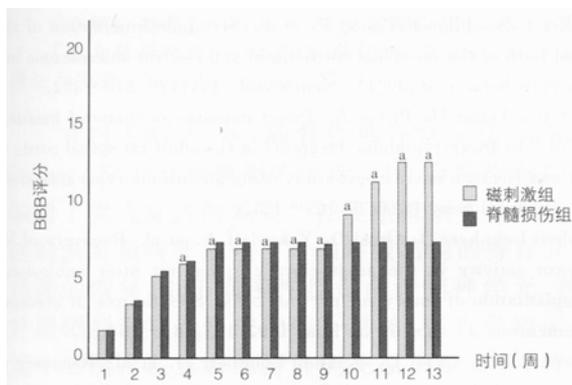


图 1 实验组与模型组 BBB 评分比较

2.2 组织学观察 模型组和实验组硬脊膜均完整,损伤节段处脊髓表面淡黄染,血管迂曲,脊髓明显狭窄,神经根完整连续。光镜下观察,模型组与实验组均见损伤区空洞形成,空洞内壁光滑,部分呈噬洞样改变,周围环绕密集胶质纤维细胞,横断面空洞外围未见灰质成分,腹侧及腹外侧索可见少量白质纤维束残留。两组组织学表现无明显差异。

2.3 GAP43 免疫组化荧光染色 正常对照组 T_{10} 水平 GAP43 表达光密度(OD)为 (3.25 ± 0.79) ,模型组头端为 (11.14 ± 3.91) ,尾端为 (9.98 ± 2.75) ,头、尾端之间无显著性差异($P > 0.05$);实验组头端为 $(92.62$

$\pm 18.31)$,尾端为 (42.30 ± 14.14) ,头、尾端之间有非常显著性差异($P < 0.01$)。

2.4 5-HT 免疫组化荧光染色 模型组 5-HT 染色标记广泛分布于脊髓灰质,高倍镜下见标记位于突触前膜、突触及胞体周围。正常对照组 T_{10} 水平 5-HT 能纤维占灰质面积为 $(13.74 \pm 1.17)\%$ 。模型组头端为 $(6.74 \pm 1.56)\%$,尾端为 $(1.31 \pm 0.48)\%$,与正常对照组相比,头、尾端密度均明显减少($P < 0.01$),与头端比较,尾端减少更明显($P < 0.01$)。实验组头端为 $(11.52 \pm 2.65)\%$,尾端为 $(6.00 \pm 1.32)\%$,头、尾两端与模型组比较均明显增加($P < 0.01$)。

2.5 相关分析 12 周时实验组尾端 GAP43 表达与 5-HT 密度值呈正相关($r=0.662$, $P=0.037$)。

3 讨论

脊髓损伤的修复是神经科学领域的一大难题。传统观点认为,作为体内高度分化的细胞,成年哺乳动物脊髓神经细胞已经失去了有丝分裂的能力。中枢神经系统可塑性理论认为,脊髓损伤后可能通过损伤轴突残端出芽或残留轴突侧支出芽形式再生,并延伸至相应的靶细胞,形成突触联系,恢复或部分恢复对靶细胞的神经支配;亦可通过提高神经元兴奋性,扩大神经元池募集作用,上调神经递质分泌等重塑代偿机制发挥作用。

神经元末梢的突触传递是一个电-化学-电的过程,即由突触前神经元胞体在生物电变化的作用下,在突触末梢释放化学物质,引起突触后神经元的生物电改变。脊髓损伤后,上运动神经元失去传入信号的反馈,输出信号丧失或终止于脊髓损伤平面的近端,导致控制运动的神经通路中断,上运动神经元处于断联休克抑制状态,其代谢、轴浆运输受抑制,合成分泌神经生长因子、神经递质等均处于抑制状态。其信号传导、轴突生长、髓鞘形成无法实现,是脊髓功能恢复需要克服的关键屏障。经颅磁刺激使大脑皮质区产生感应电流,作用于上运动神经元,人工诱发动作电位在下行传导束中传导,通过重复刺激的积累效应促进轴浆运输,促进代谢、生长,激发神经可塑性发挥代偿作用。

大鼠 5-HT 纤维主要由延髓水平中缝核群发出,与运动神经元有着密切的突触连接^[2-3]。5-HT 递质诱发脊髓运动神经元除极化,其机制可能与其降低细胞膜钾离子通道电流而降低静息膜电位有关^[4]。研究显示,通过移植胚胎脑干来源的 5-HT 能神经元到成年大鼠损伤脊髓(横断和压迫损伤)的尾端,提高了后肢运动功能^[5-6];这种效应还可被 5-HT 降解酶抑制剂 zimelidine 增强^[7]。Hashimoto 等发现,中、重度大鼠脊髓压迫伤 14 d 后损伤远端 5-HT 含量的降低与运动功能的恶化相关联^[8]。Sarunashi 等制作大鼠胸 8 半

切脊髓损伤模型,伤后损伤远端的 5-HT 能纤维显著减少,对侧无变化,而大鼠双后肢的运动功能均减低,以损伤侧为重,3 周后发现 5-HT 能纤维穿越脊髓中线至伤侧,伤侧的 5-HT 纤维密度增加达对侧的 20% 以上,并且与运动功能的恢复相关^[9]。

本研究中,磁刺激干预后损伤区 5-HT 递质上调,其机制推断为积累的磁刺激通过直接或间接途径激活了残存 5-HT 能纤维的胞体,改善了轴浆运输,增加递质合成代谢,使突触末端的 5-HT 递质分泌增加,以旁分泌或/和突触连接形式作用于脊髓前角运动神经元,部分恢复了上位中枢对脊髓远端的调控,表现为 BBB 评分提高,运动功能的部分恢复。损伤区远端 5-HT 密度与 GAP43 表达呈正相关,GAP43 表达增加是神经可塑性的表现,推断突触末端 5-HT 囊泡递质分泌的增加与生长锥代谢活跃或突触膜扩大延展等机制有关。

GAP43 是一种特异性的与神经细胞发育及再生相关的酸性膜磷脂蛋白。在发育成熟的中枢神经系统中,成熟神经元轴突的生长和突触的可塑性处于抑制状态,以保证正常稳定的生理活动;当轴突受到损伤后,轴突的延长和重建又可以被重新诱导。在神经系统的发育和损伤再生等事件研究中,常能监测到 GAP43 在 mRNA 和蛋白水平上表达的明显升高^[10]。本研究中,脊髓损伤大鼠经重复经颅磁刺激后,损伤区 GAP43 呈高表达,表明损伤轴突末端膜结构处于代谢旺盛,生长活跃状态中。激活的生长锥可能通过扩张突触前膜表面积而增加囊泡递质释放,或通过延长伸展形成新的突触,建立新的突触连接,最终扩大其生物学效应,这是神经系统重塑代偿机制的体现。

然而 GAP43 在损伤尾端相对于头端的弱表达,说明这种活跃的代谢和生长没有跨越损伤的胶质瘢痕空洞区。据此推断损伤区的胶质瘢痕可能是阻止再生突触继续生长的重要障碍因素。脊髓损伤形成的胶质瘢痕一般在 4 周左右处于稳定阶段,本研究也发现,脊髓损伤大鼠 BBB 评分至伤后 5 周时进入平台期,在以后观察的 8 周内,模型组 BBB 未见进一步提高。这与以往报道的结论一致。实验组大鼠经过 4 周的重复磁刺激后,轴突生长锥虽然处于生长代谢旺盛状态,但胶质瘢痕的形成可能阻止其进一步生长,这也说明从神经再生的角度来看,在形成稳定胶质瘢痕前对损伤脊髓的干预可能是最佳时机。

临床上创伤性脊髓损伤多来自脊柱骨折脱位瞬间撞击压迫造成的原发损伤,及随后瀑布式的炎症链锁反应造成的继发损伤;随后进入组织修复瘢痕形成的慢性期,同时期伴随着神经功能不同程度的恢复。临床上一般认为,脊髓损伤后 1 年左右进入平台期。这

说明多数的脊髓损伤为解剖学上非完全横贯性损伤,具有一定修复代偿能力,临床上 ASIA 残损分级为 C 和 D 级的病例应确定为下行运动传导束不完全损伤,A 和 B 级从临床体检上判断为运动完全损伤,然而并不确定其在解剖连续和电生理传导上的完全终断;另外,对于颈髓完全性损伤,即使在部分保留带范围内的轻微进步也可能会给脊髓损伤患者的日常生活独立能力带来显著提高。脊髓损伤后残存下行传导束为我们的研究提供了解剖学基础。

人体具有强大的生理代偿储备能力,这在中枢神经系统也不例外。本研究通过外部的磁电刺激在脑内神经元产生累积的生物学效应,激发扩大脊髓损伤后神经功能重塑代偿机制,使残存的神经功能得到最大的发掘和利用。动物实验验证了我们的假设,由此推断外部强化的神经生物学效应配合自身主动的学习-实践-再学习等康复训练必将激发人体神经系统可塑性发挥作用。

[参考文献]

- [1]张新,李建军.经颅磁刺激研究及应用进展[J].中国康复理论与实践,2006,12(10):879-882.
- [2]Fuxe K, Agnati LF. Two principal modes of electrochemical communication in the brain: Volume versus wiring transmission[M]. // Fuxe K, Agnati LF. Volume Transmission in the Brain: Novel THE ROLE OF 5-HT IN SPINAL MOTOR CONTROL 703 Mechanisms for Neural Transmission. New York: Raven Press, 1991: 1-9.
- [3]Marlier L, Sandillon F, Poulat P, et al. Serotonin innervation of the dorsal horn of the rat spinal cord: Light and electron microscopic immunocytochemical study[J]. Neurocytol, 1991, 20:310-322.
- [4]Ridet JL, Tamir H, Privat A. Direct immunocytochemical localization of 5-hydroxytryptamine receptors in the adult rat spinal cord: A light and electron microscopic study using an anti-idiotypic antiserum [J]. Neurosci Res, 1994, 38:109-121.
- [5]Feraboli Lohnherr D, Orsal D, Yakovlev A, et al. Recovery of locomotor activity in the adult chronic spinal rat after sublesional transplantation of embryonic nervous cells: Specific role of serotonergic neurons[J]. Exp Brain Res, 1997, 113:443-454.
- [6]Gimenez RM, Orsal D, Feraboli Lohnherr D, et al. Recovery of locomotion following transplantation of monoaminergic neurons in the spinal cord of paraplegic rats[J]. Ann N Y Acad Sci, 1998, 860:393-411.
- [7]Gimenez RM, Provencher J, Feraboli Lohnherr D, et al. Activation of locomotion in adult chronic spinal rats is achieved by transplantation of embryonic raphe cells reinnervating a precise lumbar level[J]. Neuroscience, 2000, 20:5144-5152.
- [8]Hashimoto T, Fukuda N. Contribution of serotonin neurons to the functional recovery after spinal cord injury in rats[J]. Brain Res, 1991, 539:263-270.
- [9]Saruhashi Y, Young W, Perkins R. The recovery of 5-HT immunoreactivity in lumbosacral spinal cord and locomotor function after thoracic hemisection[J]. Exp Neurol, 1996, 139:203-213.
- [10]Gajda M, Adriaensen D, Cichocki T. Development of the innervation of long bones: expression of the growth associated protein 43 [J]. Folia Histochem Cytobiol, 2000, 38:103-110.

(收稿日期:2007-11-20)