

·基础研究·

早期电针刺激局灶性脑缺血大鼠健侧肢体的康复效果*

黄力平¹ 向 珩¹ 肖 娜¹ 周 石^{1,2} 曹龙军¹ 王文龙^{1,3} 张建琦¹ 田 强¹

摘要

目的:在SD大鼠实验性局灶性脑缺血早期,应用穴位电针刺激健侧肢体,评价健侧肢体的康复效果,探讨其在脑卒中患者早期康复中的应用价值。

方法:应用大脑中动脉栓塞法造模,将30只造模成功的SD大鼠,随机分为健肢治疗组(HT)、患肢治疗组(DT)、模型非治疗组(MC),并另设假手术对照组(OC),每组10只,共40只。术后24h开始电针刺激穴位曲池、内关、足三里、下巨虚,采用“巨刺法”,左右交叉行刺。治疗电流强度3mA,疏密波10Hz,50Hz/5s,10s。15min/次,1次/d,7d/周。分别在治疗第3d、7d、14d和21d进行神经行为学的评价。治疗21d后,冰生理盐水灌注取脑、切片、TTC染色,IPP分析计算脑梗死体积。

结果:①神经行为学(mNSS)评价:电针刺激治疗3d时,HT组mNSS评分低于MC组($P<0.05$);治疗7d和14d时,HT、DT组更显著低于MC组($P<0.01$),HT组显著低于DT组($P<0.01$);21d治疗后,HT组和DT组评分均恢复至接近正常水平,显著低于MC组($P<0.01$),HT组与DT组之间没有差异($P>0.05$)。②脑梗死体积:HT和DT组脑梗死体积均低于MC组($P<0.05$),而且HT组与DT组比较也显著下降($P<0.05$)。

结论:脑卒中后超早期健肢电针治疗较患肢治疗能够更早地促进MCAO大鼠神经功能恢复,减少患侧脑梗死体积,是一种有效的早期康复介入方式。

关键词 电针;单侧肢体;巨刺;交叉迁移;康复

中图分类号:R245;R493 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2012)-09-0808-05

Effects of electroacupuncture on unaffected limbs at very early stage of cerebral local focus ischemia in rats/HUANG Liping,XIANG Heng,XIAO Na, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2012, 27 (9): 808—812

Abstract

Objective:To determine the effects of electroacupuncture(EA) treatment on unaffected limbs at very early stage of experiment local focus ischemic brain damage in rats.

Method:Thirty SD rats with middle cerebral artery occlusion (MCAO) were randomly divided into EA on unaffected limbs group(HT) or affected limbs group(DT), and control group (MC) 10 rats in each group. Another 10rats was set as sham operation control group (OC). EA groups received EA on the accupoints of Quchi (LI 11) and Neiguan (PC6) on forelimb, and Zusanli (ST36) and Xiajuxu (ST39) on hindlimb. EA was given with opposing needle(ju ci) method, cross stimulation at left and right side, at 3mA, in cycles of (loose/dense)10Hz:50Hz/5s:10s, 15min per session, once a day, 7 sessions per week. Infarction volume of the brain was calculated by TTC dying and photoshop IPP analyses. Neurological scores were evaluated by modified neurological severity score (mNSS) method at day 3, 7, 14 and 21 post-MCAO.

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2012.09.005

*基金项目:天津市高等学校科技发展基金项目(2006ZX02)

1 天津体育学院健康与运动科学系,300381; 2 澳大利亚南十字星大学运动科学系; 3 天津市人民医院康复医学科

作者简介:黄力平,女,教授; 收稿日期:2012-03-01

Result: The mNSS scores in HT group was lower than that of MC group at day 3 ($P<0.05$); At day 7 and 14, the scores in both EA groups were lower than that of MC group ($P<0.01$) and also significant differences were found between both EA groups ($P<0.01$). The mNSS scores in both EA groups were almost returned to the level of OC group at day 21 and much lower than that of MC group ($P<0.01$). The infarction volume in HT group was less than that in DT group, while that in both EA groups was lower than that in MC group ($P<0.05$).

Conclusion: EA on unaffected limbs at very early stage after stroke had greater beneficial effect in facilitating neurological function recovery and alleviating the infarction volume of brain, compared to that on affected limbs.

Author's address Tianjin University of Sport, 51 Weijin South Road, Hexi District, Tianjin 300381

Key word electroacupuncture; unilateral-limb; ju ci; cross-education; rehabilitation

在脑卒中偏瘫康复中强调早期介入、早期治疗,这样可以更好的改善患者的功能状态和预后。大量文献指出脑卒中后神经康复效果主要取决于治疗开始时间,越早越好。然而,动物实验研究显示,脑卒中早期受损脑组织对刺激处于易损期,在脑梗死后立即积极训练患侧肢体导致脑损伤面积增大,功能恢复延迟,即使在损伤后7—15d积极训练患侧,也导致功能能力较对照组低^[1]。因而提示对患侧训练有个“时间窗”,不是越早越好。Biernaskie^[2]研究还发现,脑损伤后第5天开始将动物放在丰富环境中,不限制健肢,练习够取物品和爬台阶,40d后损伤侧皮质面积并没有扩大,而且健侧脑皮质重组明显,提示健肢参与利于功能恢复的可能性。在运动生理学上有训练效果交叉迁移现象,是指单侧肢体运动训练可以产生对侧同源部位功能(力量、关节活动度、功能)的同步提高^[3],4—6周电针刺激一侧胫骨前肌促使两侧踝背屈力量增长也已被证实^[4-5],其机制比较倾向于中枢神经控制^[3,6],但所有研究多是在健康机体中进行的。是否这种交叉迁移机制在脑损伤动物中发挥有益作用?在损伤早期积极训练健肢是否可促进患肢功能恢复,又不增加脑损伤面积?这是个值得探讨的科学问题,对脑卒中早期康复治疗方式方法筛选和疗效研究有重要意义,当前还没有相关研究存在。为此,本文假设脑损伤后早期健侧肢体针刺康复治疗可以促进功能恢复,且不增加脑损伤面积。拟以大鼠大脑中动脉阻塞永久性脑损伤模型为实验对象,通过比较早期不同时间点健肢针刺治疗与患侧肢体针刺治疗各组动物神经功能恢复和脑损伤体积大小来探讨此问题。

1 材料与方法

1.1 实验动物及造模

SPF级SD(Sprague Dawley)健康雄性大鼠40只,90日龄,体重320—350g(由中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心提供)。动物实验在天津体育学院动物实验室完成。实验期间,室温控制在20—25℃,湿度50%左右,昼/夜周期12h/12h,通风良好,动物自由饮食水。实验前先进行1周的适应性饲养,采用改进的EZ-Longa大脑中动脉阻塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)造模方法^[7],按外科无菌手术进行操作,制作颈总动脉线栓插入法MCAO右侧偏瘫大鼠模型,术后3h和24h Longa评分2—4分视为造模成功。

1.2 实验动物分组、功能评定及取材

30只造模成功大鼠,随机分为健侧治疗组(HC)、患侧治疗组(DT)、MCAO模型非治疗对照组(MC),另设同期买入相同条件大鼠为假手术对照组(OC),共4组,每组10只,共40只;分别在治疗第3d、7d、14d和21d进行神经行为学评价。21d后麻醉处死,冰盐水灌注取脑,备测脑梗死体积。

1.3 电针刺激治疗方案

电针刺激穴位及解剖位置参照华兴邦《大鼠穴位图谱的研制》及拟人比照法取穴定位;解剖参考《大鼠的解剖和组织》^[8]。①取穴:上肢:曲池、外关;下肢:足三里、下巨虚。②操作:采用“巨刺法”,即左右经交叉行刺,以达交叉迁移。毫针(1寸,0.18mm)直刺,下肢5—8mm,上肢4—6mm。③刺激参数:频率:10Hz;强度:3mA;波形:疏密波(疏波/密波=10Hz, Hz/5s, 10s);电极:曲池和足三里分别接负极,内关和下巨虚分别接正极,组成曲池与内关和足三里与下巨虚两个电针环路。④电针治疗方案:术后24h开始治疗,15min/次,1次/d,7次/周。每次治

疗前将大鼠用水合氯醛(0.3ml/100g)腹腔麻醉,自然体位固定于电针刺激治疗台上,针刺得气后,接通电针仪的电极,调整刺激参数,进行治疗;MCAO非治疗组和假手术对照组同样实施麻醉、固定,但不进行电针刺激治疗。针刺操作由有执业资格同一针灸师完成。

1.4 神经行为学评价

1.4.1 Longa评分^[4]:应用本评分主要确定MCAO模型成功与否。该量表共有6项内容用于判断大鼠神经功能缺损情况:0分代表完全正常,1、2、3、4、5分分别代表由轻到重神经功能缺损情况,因此,得分越低代表大鼠神经功能越好,得分3—4分视为造模成功。

1.4.2 改良的神功功能缺损严重程度评分(modified neurological severity score points, mNSS)评分^[9]:应用该方法评定MCAO大鼠经过电针治疗后康复效果。该量表共有4项内容,分别是运动功能、感觉功能、平衡能力和反射情况,共计18分,分数越高,神经损伤程度越严重:无力完成任务或者正常反射消失记1分;1—6分:轻度损伤;7—12分:中度损伤;13—18分:严重损伤。

1.5 脑梗死体积测定

TTC(2,3,5—氯化三苯基四氮唑;C19H15CLN4)染色法测定MCAO大鼠脑梗死体积^[10]:动物麻醉断头取脑,将脑放入-20℃冰箱冷冻20min至脑变硬,用切脑模具自大脑半球额极至枕极连续冠状位切片,每片厚约2mm,约能切7片;将脑片迅速放入1% TTC磷酸缓冲液(PH=7.4)中,37℃避光孵育10—15min,取出脑片,置于10%甲醛溶液中避光固定24h。正常脑组织由于线粒体琥珀酸脱氢酶正常而被染成粉红色,梗死区该酶活性丧失而呈苍白色,界线分明,利用图像分析软件IPP 6.0(Image Pro Plus 6.0)分析,分别测出梗死面积及缺血侧半球面积,梗死体积(mm³)=梗死面积(mm²)×厚度(切片

数×2mm)。为了减小实验操作误差及水肿的影响,本研究以相对梗死体积,即梗死体积占半球体积百分比,(梗死体积百分比)表示:

$$\text{脑梗死体积百分比} = \text{梗死体积} / \text{健侧半球体积} \times 100\%$$

1.6 统计学分析

应用SPSS软件统计分析,对神经功能缺损评分进行秩和检验;对脑梗死体积和体积百分比分别进行 t 检验和 χ^2 检验。

2 结果

2.1 脑卒中后早期健肢电针治疗后mNSS评分变化

见表1。MCAO大鼠术后24h各组mNSS评分均升高,具有显著性意义($P<0.01$)。三组比较:3d治疗后HT与MC组比较评分显著降低($P<0.05$),DT组与MC组之间没有显著性差异($P>0.05$),HT与DT组比较也没有显著性差异($P>0.05$);治疗7d时HT、DT组mNSS评分进一步显著降低,而MC组没有显著性改变,两组分别与MC组比较具有极显著差异($P<0.01$),HT比DT降低的程度更明显($P<0.01$);14d时HT和DT组也较MC组具有显著性降低($P<0.01$),HT较DT显著性降低($P<0.01$);21d时,HT和DT组均较MC组显著性降低($P<0.01$),HT和DT组比较没有显著性差异($P>0.05$)。

不同时间点各组变化比较:总的趋势是随着时间延长,各组神经功能都有不同程度的恢复,积分逐渐降低。3d时仅有HT组评分显著降低(HT vs MC, $P<0.05$);7d较3d时,HT、DT组mNSS评分均进一步显著降低(分别 $P<0.01$; $P<0.01$);而MC组没有显著性改变($P>0.05$);14d时与7d时比较,三组都具有显著性降低(HT, DT, MC均为 $P<0.01$);21d时与14d时比较各组均进一步降低($P<0.05$)。表明早期健肢治疗在运动、感觉、平衡和反射等多方面综合神经功能评定中恢复快于患肢治疗组和自然恢复组;早期电针治疗,无论是患肢还是健肢都显著提高脑

表1 脑卒中后早期健肢电针治疗后不同时间点mNSS评分变化

($\bar{x} \pm s$)

组别	3h	1d	3d	7d	14d	21d
HT	12 ± 0.54	13 ± 0.81	11 ± 1.19 ^①	6 ± 1.00 ^{②④⑤}	1 ± 0.92 ^{②④⑥}	1 ± 0.72 ^②
DT	13 ± 0.68	13 ± 1.03	12 ± 1.17	10 ± 1.84 ^{③⑤}	4 ± 2.44 ^{③⑥}	1 ± 1.68 ^{③⑦}
MC	13 ± 0.59	14 ± 0.65	12 ± 0.82	12 ± 0.84	6 ± 1.35 ^⑥	4 ± 0.38 ^⑦
OC	0	0	0	0	0	0

HTvsMC:① $P<0.05$,② $P<0.01$;DTvsMC:③ $P<0.01$;HTvsDT:④ $P<0.01$;7dvs3d:⑤ $P<0.01$;14dvs7d:⑥ $P<0.01$;21dvs14d:⑦ $P<0.05$

损伤动物的神经肌肉功能。

2.2 早期健肢电针治疗对脑梗死体积影响

见表2。结果显示,HT和DT组脑梗死体积均低于MC组($P<0.05$),而且HT组也低于DT组,具有显著性意义($P<0.05$)。梗死体积占整个半球的百分比:HT组为15%(75mm³),DT组为22%(109mm³),MC组为36%(181mm³);与MC组比较,HT梗死体积下降了59%,DT下降了40%。说明早期健肢电针治疗更有利于挽救梗死区周围半影区脑组织,减小脑梗死区域,是功能较早恢复的物质基础。

表2 21d电针刺激治疗MCAO大鼠脑梗死体积比较($\bar{x}\pm s$)

组别	梗死体积(mm ³)	梗死体积百分比(%)
HT	75.32 ± 23.69 ^{①②}	15.00 ± 4.53 ^{①②}
DT	108.59 ± 26.22 ^①	21.76 ± 5.06 ^①
MC	181.18 ± 24.71	36.43 ± 4.59

①HT和DT组与MC组比较 $P<0.05$;②HT组与DT组比较 $P<0.05$

3 讨论

本研究发现,早期电针治疗,无论是刺激健肢还是患肢都能显著地促进神经肌肉功能恢复,然而,早期电针治疗健肢较患肢能够更快地促进运动、平衡、感觉和反射的全面恢复(第1周),到第3周时两组功能恢复程度才达到基本一致;并且,与功能恢复一致的变化是两治疗组脑损伤体积都比损伤对照组显著减小,没有使梗死区扩大,但健肢治疗组比患肢组更明显缩小。这个发现证实了早期电针干预的安全可靠效果及健肢电针干预可能在损伤早期更好地促进患侧皮质重组。急性脑损伤后缺血区周围都有一个半影区,其中神经元处于代谢和功能抑制状态,如若治疗得当可以使之逆转、活化,重新发挥功能,这是现代缺血性脑卒中治疗学主要关注点。健肢治疗后脑梗死体积明显减小,可能是在脑梗死早期促进了缺血半影区神经元活化与功能恢复。fMRI研究显示,早期康复训练使得M1皮质损伤猕猴手的精细抓握能力恢复,伴随远离损伤部位前运动皮质腹侧面积扩大,与损伤周围皮质突触增多^[11]。该机制是否为本研究中早期健肢治疗功能恢复快的原因之一还需进一步研究。

Biernaskie^[12]研究证实:脑损伤后第5天在丰富环境中训练大鼠较第14天和第30天开始训练增加运动功能和手精细活动能力恢复明显优越,诱导了

非损伤侧脑皮质的功能重组,完整半球神经元树突长度和分支数增大,尤其是第五层锥体细胞树突生长,增加了皮质的突触联系,表明未损伤的完整皮质对早期康复训练更敏感。当用利多卡因麻醉健侧脑皮质后,同样训练4周,运动功能恢复受到重大影响,因此,证实健侧脑皮质参与了卒中后脑功能重组。应用正电子发射计算机断层扫描(PET)和18F-2-脱氧葡萄糖(FDG)研究发现,电针刺激健康人右侧肢体穴位时,对侧脑感觉运动皮质区葡萄糖代谢增高。而针刺脑卒中瘫痪侧肢体穴位时,对侧丘脑、额叶和顶叶皮质区葡萄糖代谢增高,并且针刺前所见的葡萄糖代谢低下区也明显增高,病灶缩小或消失,表明针刺健康人仅有对侧效应,而针刺患者有双侧效应^[13]。应用多普勒研究发现,健患侧交替针刺组较常规患侧针刺组可以更加有效地扩张大脑中动脉,降低其血流速度,提高缺血脑组织血液灌流和临床疗效^[14]。本研究观察到健肢治疗后脑缺血体积下降了60%,综合功能恢复更快,很可能与双侧脑皮质功能重组有关。但迄今还没有直接证据表明脑卒中单纯健肢电针治疗影响双侧脑功能机制的研究。

许多动物实验研究表明,脑缺血后轴突发芽的时间过程是:脑卒中后第1—3天触发始动^[15],第7—14天开始并保持^[16],第28天达到成熟期^[17],因此,从细胞学上也提示脑卒中后早期治疗有“时间窗”。在突出发芽始动关键点给予适宜干预可能有助于功能康复。本研究电针治疗开始于损伤后24h,因此神经元轴突发芽可能是电针治疗,尤其是健肢治疗疗效的原因之一,有待于进一步证实。

选择早期健肢电针治疗方法还源于如下两个考虑:第一,在生理学上有训练效果交叉迁移现象^[3],研究表明,对健康青年受试者进行为期4—6周“足三里和下巨虚”单侧电针穴位治疗也可以同步提高双侧胫骨前肌肌肉力量,表现出治疗效应的交叉迁移现象^[18,4],且fMRI研究显示双侧大脑皮质感觉运动相关脑区和对侧丘脑显著激活,支持大脑皮质参与了针刺交叉迁移的形成机制^[5-6]。脑卒中早期健肢电针治疗是否可以通过此机制产生作用,值得探讨。第二,人类脑卒中早期,尤其是较严重的脑卒中,临床情况复杂,早期训练常常不易实施,而在中

国穴位针刺是老百姓欣然接受、医师容易实施的传统治疗方法。第三,针灸治疗脑卒中也有“巨刺”疗法,属于古代九刺之一。《灵枢·官针》篇曰:“巨刺者,左取右,右取左”,是根据经络气血相贯,左右倾移,上下互调而采用的一种选穴针刺方法。祖国医学认为,人体手足阳明皆交会于督脉的大椎穴,所以脉气左右交贯,因而针刺健侧肢体的穴位,可以治疗对侧的疾患。第四,选穴:梁永瑛对近28年有关针灸治疗脑卒中的论文进行总结归纳,发现治疗迟发性瘫痪主要以手足阳明、督脉、少阳经穴为主,曲池、手三里、足三里是使用频率最高的腧穴,意欲开窍启闭,疏通经络^[9]。本研究中MCAO大鼠脑损伤属于早期弛缓期,因而选择曲池、内关、足三里和下巨虚进行治疗,结果显示早期电针治疗可以显著提高神经肌肉功能,减小脑损伤,与以往报道体针治疗缺血性脑卒中有96%—98.97%一致。

总之,本文首次观察到,早期健肢训练促进单侧MCAO脑损伤大鼠神经行为学改变,同时缩小脑梗死体积,但须进一步对其机制进行研究。

4 结论

早期穴位电针治疗MCAO永久性脑损伤动物健侧肢体比患肢治疗能更快地促进神经肌肉功能恢复,减少脑梗死体积,可能是通过交叉迁移机制,促使两侧大脑感觉运动皮质功能重组之故。

参考文献

- [1] Humm JL, Kozlowski DA, James DC, et al. Use-dependent exacerbation of brain damage occurs during an early post-lesion vulnerable period[J]. Brain Res, 1998, 783(2): 286—292.
- [2] Biernaskie J, Chernenko G, Corbett D. Efficacy of rehabilitative experience declines with time after focal ischemic brain injury[J]. J Neurosci, 2004, 24: 1245—1254.
- [3] Hortobagyi T. Cross education and the human central nervous system[J]. IEEE Engineering in Medicine and Biology Magazine, 2005, 24(1): 22—28.
- [4] Zhou S, Huang LP, Liu J, et al. Bilateral effects of 6 weeks' unilateral acupuncture and electroacupuncture on ankle dorsiflexors muscle strength: a pilot study[J]. Arch Phys Med Rehabil, 2012, 93(1): 50—55.
- [5] Huang LP, Zhou S, Hu XL, et al. An fMRI investigation on brain activity in response to unilateral acupuncture, electroacupuncture and electromyostimulation on ST36 and ST39. Acupuncture and Physiology InTech Co, 2011 online.
- [6] Jeun SS, Kim JS, Kim BS, et al. Acupuncture stimulation for motor cortex activities: a 3T fMRI study[J]. Am J Chin Med, 2005, 33(4): 573—578.
- [7] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20: 84—91.
- [8] 杨安峰主编. 大鼠的解剖和组织[M]. 第1版, 科学出版社, 北京, 1985: 48—68.
- [9] Chen J, Sanberg PR, Li Y, et al. Intravenous administration of human umbilical cord blood reduces behavioral deficits after stroke in rats[J]. Stroke, 2001, 32: 2682—2688.
- [10] Bederson JB, Pitts LH, Germano SM, et al. Evaluation of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a stain for detection and quantification of experimental cerebral infarction in rats[J]. Stroke, 1986, 17: 1304—1308.
- [11] Higo N. Training-induced recovery of manual dexterity after a lesion in the motor cortex[J]. Keio J Med, 2010, 59(1): 4—9.
- [12] Biernaskie J, Szymanska A, Windle V, et al. Bi-hemispheric contribution to functional motor recovery of the affected forelimb following focal ischemic brain injury in rats[J]. Eur J Neurosci, 2005, 21(4): 989—999.
- [13] 贾少微, 徐文贵, 王全师, 等. 应用PET研究针刺信号对人脑能量代谢的影响[J]. 中西医结合杂志, 2002, 22(7): 508—511.
- [14] 雷龙鸣, 吴林, 胡跃强, 等. 不同针刺方案对脑梗死偏瘫患者康复及病灶侧大脑中动脉平均血流速度的影响[J]. 中国针灸, 2009, 29(7): 517—520.
- [15] Carmichael ST, Chesselet MF. Synchronous neuronal activity is a signal for axonal sprouting after cortical lesions in the adult[J]. J Neurosci, 2002, 22: 6062—6070.
- [16] Stroemer RP, Kent TA, Hulsebosch CE. Neocortical neural sprouting, synaptogenesis, and behavioral recovery after neocortical infarction in rats[J]. Stroke, 1995, 26: 2135—2144.
- [17] Carmichael ST, Wei L, Rovainen CM, et al. New patterns of intracortical projections after focal cortical stroke[J]. Neurobiol Dis, 2001, 8: 910—922.
- [18] Huang LP, Zhou S, Lu Z, et al. Bilateral effect of unilateral electroacupuncture on muscle strength[J]. Journal of Alternative and Complementary Medicine, 2007, 13(5): 539—546.
- [19] 梁永瑛. 针灸治疗中风偏瘫选穴规律研究[J]. 上海针灸杂志, 2007, 26(10): 28—30.