

经颅低频电刺激对急性局灶性脑缺血大鼠缺血区单胺类递质的影响

邓志宽¹, 叶建宁¹, 徐锁全²

[摘要] 目的 观察经颅低频电刺激对急性局灶性脑缺血模型大鼠缺血区单胺类递质的影响。方法 选取健康成年雄性 Wistar 大鼠 30 只, 体重 200 ~ 250 g, 随机分为假手术组、假手术刺激组、模型组, 各 5 只, 以及电刺激组 15 只, 电刺激组又根据不同刺激电压分为 10 V 组、30 V 组和 50 V 组, 各 5 只。应用线栓法建立大鼠中动脉闭塞模型。造模成功后, 立即以感觉皮质为中心, 在双侧安置刺激电极并固定。电刺激组在持续缺血后 1 h, 假手术刺激组在假手术后 1 h, 应用脑电场刺激仪行经颅低频电刺激, 刺激频率 30 Hz, 刺激波形为正弦波, 刺激持续时间 1 h。应用荧光分光光度法分别测定大鼠缺血区脑组织内多巴胺 (DA)、去甲肾上腺素 (NE) 和 5-羟色胺 (5-HT) 含量。结果 与假手术组相比, 假手术刺激组单胺类递质无明显变化 (均 $P > 0.05$), 模型组大鼠 DA、NE 及 5-HT 含量明显下降 (均 $P < 0.01$)。与假手术组比较, 电刺激 10 V 组及 30 V 组于电刺激治疗 1 h 后, DA、NE 及 5-HT 含量均无明显改变 (均 $P > 0.05$), 而电刺激 50 V 组大鼠额叶脑组织内 DA、NE 及 5-HT 含量增高 (均 $P < 0.05$)。结论 一定强度的经颅低频电刺激可使局灶性脑缺血区单胺类递质含量增高。

[关键词] 经颅低频电刺激; 大脑中动脉闭塞; 单胺

Effect of Transcranial Low Frequency Electrical Stimulation on Contents of Monoamines in Ischemic Area of Rats with Middle Cerebral Artery Occlusion DENG Zhi-kuan, YE Jian-ning, XU Suo-quan. The Department of Neurology, Affiliated Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China

Abstract: **Objective** To observe the effect of transcranial low frequency electrical stimulation on the contents of monoamines in ischemic area of rats with middle cerebral artery occlusion (MCAO). **Methods** Permanent MCAO model of Wistar rat was established with silk thread enveloped with polyammoniacum. The ischemic areas received various intensity of transcranial low frequency electrical stimulation for 1 hour in rats underwent 1 hour of ischemia. Then the affected tissue was processed with fluorospectrophotometry to determine the contents of dopamine (DA), noradrenalin (NE) and 5-hydroxytryptamine (5-HT). **Results** Compared with the sham-operation group, the contents of DA, NE and 5-HT in ischemic area of MCAO model rats decreased obviously (all $P < 0.01$), while all three monoamines investigated in the sham-operation group with transcranial low frequency electrical stimulation had no significant change. In the MCAO groups stimulating with lower (10 V) and middle (30 V) intensity transcranial low frequency electrical field, the contents of DA, NE and 5-HT in ischemic area had no significant increase. But in the MCAO group stimulating with high (50 V) intensity transcranial low frequency electrical field, the contents of DA, NE and 5-HT in ischemic area increased significantly ($P < 0.05$). **Conclusion** Some degree of intensity transcranial low frequency electrical field stimulation can increase the contents of DA, NE and 5-HT in ischemic area of rats subjected to MCAO.

Key words: transcranial low frequency electrical stimulation; middle cerebral artery occlusion; monoamine

[中图分类号] R743.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1006-9771(2008)12-1136-03

[本文著录格式] 邓志宽, 叶建宁, 徐锁全. 经颅低频电刺激对急性局灶性脑缺血大鼠缺血区单胺类递质的影响[J]. 中国康复理论与实践, 2008, 14(12): 1136-1138.

急性缺血性脑卒中是最常见的脑血管疾病之一, 也是中老年人致死、致残的主要原因。在缺血早期给予神经保护是急性脑缺血早期治疗十分重要的措施^[1]。有研究表明, 一定强度和频率的经颅电或磁刺激对神经功能的恢复有促进作用^[2,3], 并可提高脑损伤后神经递质的浓度^[4], 但其对急性缺血期的神经递质的影响仍缺乏研究。本研究拟采用经颅低频电刺激仪对大鼠大脑中动脉闭塞 (middle cerebral artery occlusion, MCAO) 模型进行刺激, 观察其对大鼠缺血区脑组织单胺类递质含量的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

选取健康成年雄性 Wistar 大鼠 30 只, 体重 200 ~ 250 g, 由第三军医大学实验动物中心提供, 适应性饲养 3 d 后, 分为假手术组 5 只、假手术刺激组 5 只、模型组 5 只及电刺激组 15 只, 电刺激组又根据不同刺激电压分为 10 V 组、30 V 组和 50 V 组, 每亚组各 5 只。

1.2 模型建立 应用线栓法建立大鼠 MCAO 模型: 用 10% 水合氯醛麻醉大鼠, 剂量为 350 mg/kg 体重; 于大鼠颈前正中切口, 分离并暴露右侧颈总动脉、颈外

作者单位: 1. 第三军医大学附属新桥医院神经内科, 重庆市 400037; 2. 中国人民解放军第 253 医院儿科, 内蒙古呼和浩特市 010017。作者简介: 邓志宽 (1965-), 男, 江苏东台市人, 副教授, 博士后, 主要从事缺血性脑血管疾病及高原脑水肿发病机制及防治研究。

动脉(external carotid artery, ECA)及颈内动脉,结扎 ECA 远心端,分离和夹闭翼腭动脉近心端;于 ECA 根部剪口,将长 22 mm、直径 0.22 mm、表面涂布聚氨酯清漆的丝线经 ECA 逆向导入颈内动脉,其头端到达大脑前动脉近端壁时可有轻微阻力,此时停止插入。丝线进入血管长度一般为 18~20 mm。造模成功标志为:大鼠清醒后提尾时出现右侧前肢内收屈曲,爬行时向右侧转圈,以及站立时向右侧倾倒。假手术组除进行麻醉及手术操作外,不行动脉栓塞。

1.3 电刺激方法 假手术刺激组和电刺激组大鼠造模成功后,立即于双眼脑间至人字缝处(对应于感觉皮质区域)安置刺激电极(国家发明专利号 ZL 01103273.1,国际分类主分类号 A61N1-04)并固定。电刺激组大鼠持续缺血后 1 h,以及假手术刺激组接受假手术后 1 h,应用脑电刺激仪(由上海同济大学信息工程研究所生产)给予电刺激,刺激频率 30 Hz,波形为正弦波,刺激持续时间 1 h。

假手术刺激组给予 50 V 电刺激 1 h;电刺激 10 V 组 30 V 组和 50 V 组分别给予 10 V 30 V 和 50 V 低频电刺激 1 h;假手术组和模型组均不给予电刺激。

1.4 取材 假手术组在假手术 2 h 后,模型组在线栓栓塞 2 h 后,假手术刺激组、电刺激组在电刺激 1 h 后,迅速断头取前脑,在冰上取右侧缺血区脑组织(即右侧感觉皮质),假手术组及假手术刺激组取相应部位脑组织。脑组织在电子天平上精确称重后(精确度 0.1 mg),加冷酸化正丁醇 4.0 ml,用玻璃匀浆器匀浆,漩涡振荡;以 3 000 r/min 离心 5 min(离心半径 8.2 cm);取上清 2.0 ml,加正庚烷 4.0 ml,0.1 mol/L HCl 5 ml,漩涡振荡;以 3 000 r/min 离心 5 min(离心半径 8.2 cm),其水相含多巴胺(dopamine, DA)、去甲肾上腺素(noradrenalin, NE)和 5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)。

1.5 检测方法 NE 和 DA 测定^[5]:取水相 0.5 ml,加 0.067 mol/L 磷酸缓冲液 1.7 ml(pH 7.2),加碘试液 0.1 ml,静置 2 min,加 6 mol/L 乙酸 0.5 ml,煮沸 20 min。应用英国 Perkin Elmer 公司产 LS50B 型荧光分光光度计,分别用激发光波长/发射光波长为 475 nm/385 nm 和 370 nm/322 nm 测定 NE 和 DA 的荧光值。样品空白管先用碱性亚硫酸钠液煮沸 5 min,然后加入相应试剂。

5-HT 测定^[5]:取水相 0.5 ml,加 0.5% 半胱氨酸 0.1 ml,0.005% 邻苯二甲醛 3.0 ml,0.02% NaIO₄ 0.1 ml,煮沸 5 min。应用 LS50B 型荧光分光光度计,用激发光波长/发射光波长为 350 nm/475 nm 测定 5-HT 的荧光值。样品空白管先用 0.02% NaIO₄ 煮沸 5 min,然后加入相应试剂。

1.6 标准品的处理及计算 取 NE、DA 和 5-HT 标准品混溶于 0.01 mol/L HCl,终浓度均为 0.0015 g/L,配成混合标准液。取上述混合标准液 0 ml、0.1 ml、0.2 ml、0.3 ml 和 0.4 ml,分别加水 0.5 ml、0.4 ml、0.3 ml、0.2 ml 和 0.1 ml,与样品管相同,依次加入相应试剂。样品单胺类递质含量的计算:标准品荧光值减去标准空白管荧光值,对浓度进行回归,求出回归方程。样品管减去样品空白管荧光值后,根据回归方程计算样品管浓度,再计算出每克脑组织中相应单胺类递质的含量(ng/g 组织湿重)。

1.7 统计学处理 所得实验数据以($\bar{x} \pm s$)表示,应用 SPSS 12.0 统计软件进行成对样品 Student *t* 检验。

2 结果

2.1 不同强度经颅低频电刺激后 MCAO 大鼠缺血区脑组织 DA 含量变化 与假手术组相比,假手术刺激组 DA 含量无显著性变化($P > 0.05$),模型组则显著下降($P < 0.001$);与模型组相比,10 V 及 30 V 组 DA 含量虽有一定程度增高,但差异无统计学意义($P > 0.05$),而 50 V 组 DA 含量增高($P < 0.05$),见表 1。

2.2 不同强度经颅低频电刺激后 MCAO 大鼠缺血区脑组织 NE 含量变化 与假手术组相比,假手术刺激组 NE 含量无显著性变化($P > 0.05$),模型组则明显下降($P < 0.01$);与模型组相比,10 V 及 30 V 组 NE 含量虽有一定程度增高,但差异无统计学意义($P > 0.05$),而 50 V 组 NE 含量增高($P < 0.05$),见表 1。

2.3 不同强度经颅低频电刺激后 MCAO 大鼠缺血区脑组织 5-HT 含量变化 与假手术组相比,假手术刺激组 5-HT 含量无显著性变化($P > 0.05$),模型组则明显下降($P < 0.01$);与模型组相比,10 V 及 30 V 组 5-HT 含量虽有一定程度增高,但差异无统计学意义($P > 0.05$),而 50 V 组 5-HT 含量增高($P < 0.05$),见表 1。

表 1 经颅低频电刺激后 MCAO 大鼠缺血区脑组织单胺类递质浓度的变化(ng/g 组织湿重, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	DA	NE	5-HT
假手术组	5	599.54 ± 90.18	1553.30 ± 197.43	1015.81 ± 138.49
假手术刺激组	5	701.01 ± 127.21	1258.82 ± 128.31	1136.89 ± 170.82
模型组	5	275.79 ± 79.78 ^a	876.43 ± 216.19 ^b	548.79 ± 135.89 ^b
电刺激组				
10 V 组	5	311.28 ± 93.41	992.37 ± 168.03	627.42 ± 98.51
30 V 组	5	367.37 ± 48.59	1067.38 ± 181.50	605.41 ± 91.93
50 V 组	5	441.64 ± 77.37 ^c	1206.91 ± 125.26 ^c	750.08 ± 102.14 ^c

注:a.与假手术组相比, $P < 0.001$;b.与假手术组相比, $P < 0.01$;c.与模型组相比, $P < 0.05$ 。

3 讨论

以电为基础神经元兴奋及其传导与膜内外信号的转导在大脑信息处理中起重要作用^[6]。神经细胞易受弱电场或动作电位阈下电流的影响。体外研究证实,培养的脑片^[7]及锥体细胞^[8]对外加弱电场的反应

明显。大脑皮质锥体细胞对弱电场和磁场十分敏感,可调节细胞的放电频率和脑电振荡,提示阈下电场刺激可使神经元去极化或超极化,改变神经元的兴奋性。颅外外加电场和电流除在脑内形成直接电场和电流外,在脑内产生的诱生电流和电场对脑组织内神经元的兴奋性也产生影响。由于在体神经元自发活性较强,处于神经网络之中,相互间的联系广泛,因而对诱生电流可能更敏感。合理应用弱电场和电流对大脑的作用,可能是一种神经保护及促进神经功能康复的重要手段^[2,3]。

本研究采用大鼠脑电生理频率作为体外电场刺激频率,而选择正弦波电场主要是考虑正弦电场对脑内神经元效应不依赖于其所加电场的方向,且产生的效应较恒定^[9,10]。如较强的正弦曲线电场(高于阈值 100 ~ 150 mV/mm)可抑制惊厥药物诱导的海马脑片的病理性电活动^[11],该作用不依赖于所加电场的方向,且在外加电场撤去后其抑制作用仍持续 4 min 以上,其有效频率为 20 ~ 50 Hz,频率过高如 500 Hz 以上则无效。

本研究结果显示,大鼠在急性脑缺血时,缺血区单胺类递质 DA、NE 及 5-HT 含量明显下降,这种单胺类递质含量的降低与缺血导致的神经元死亡或神经递质的合成、运输、释放下降密切相关。研究结果还显示,应用一定强度的正弦曲线电场刺激,可使大鼠脑缺血区 DA、NE 及 5-HT 含量增高,但刺激强度太低则无明显影响。此外,采用较强的正弦曲线电场刺激,假手术刺激组大鼠脑内单胺类递质的浓度也无明显改变,表明电刺激对正常生理状态下的神经元递质的合成和分泌可能无影响。

颅外低频电刺激增加缺血区单胺类递质 DA、NE 及 5-HT 含量的机制目前尚不清楚。其原因涉及缺血区神经元丧失数量的减少或递质合成、释放的改善。本研究组织学观察显示,颅外低频电刺激可增加缺血区神经元数量(资料未列出),提示对脑缺血具有神经保护作用。颅外低频电刺激主要通过直接的及脑内诱生电场和电流起作用。神经元属于可兴奋细胞,在静息状态下处于膜外为正、膜内为负的静息电位,哺乳动物神经元的膜静息电位一般为 -60 ~ -75 mV。外加或诱生的电场和电流可直接影响细胞膜电位^[7]或通过诱导离子通道电压的变化,间接使膜电位发生改变,影响神经元的兴奋性;去极化改变使神经元兴奋,而超极化改变则抑制其兴奋^[12]。在添加外加电场后,膜静息电位极性与电场方向一致的神经细胞可出现静息电位增高、细胞超极化,不易被兴奋;而膜静息电位极性与电场方向相反的神经细胞则可处于去极化状态,易于兴奋。如果带电离子(如 K^+ 、 Na^+ 、 Ca^{2+} 等)极性与外加

电场一致,则其移动受抑制,可减少 ATP 的消耗;如果带电离子极性与外加电场相反,则其移动受阻,如 Ca^{2+} 移动受限,细胞内信号转导受抑制,细胞代谢活动减少,ATP 的消耗同样也减少,其总的效应可能是导致缺血神经元损伤减轻。我们推测,经颅低频电刺激可能通过上述机制,最终导致缺血区单胺类递质 DA、NE 及 5-HT 含量的增加。

综上所述,一定强度的经颅低频电刺激可显著提高脑缺血区单胺类递质的含量,可能表明其潜在的神经保护作用,但对其机制仍需做进一步研究。

[参考文献]

- [1] Ly JV, Zavala JA, Donnan GA. Neuroprotection and thrombolysis: combination therapy in acute ischemic stroke [J]. *Expert Opin Pharmacother*, 2006, 7:1571-1581.
- [2] 刘传玉,梅元武,张小乔. 经颅磁刺激对脑缺血大鼠功能恢复和健侧突触结构的影响[J]. *中华物理医学与康复杂志*, 2005, 27:707-710.
- [3] 刘芳,张璐,吕如锋,等. 经颅电刺激对脑梗死大鼠的运动功能及神经微丝表达的影响[J]. *中华物理医学与康复杂志*, 2004, 8:449-451.
- [4] 邓志宽,叶建宁,徐锁全. 不同强度脑电场刺激对抑郁大鼠额叶单胺类递质含量的影响[J]. *中国临床神经科学*, 2006, 14:406-409.
- [5] 何美霞,可君,李志刚. 脑组织单胺类神经递质的测定[J]. *河南医科大学学报*, 1996, 31:113-114.
- [6] Kalmijn AJ, Ivan FG, McClune MC. The physical nature of life[J]. *J Physiol (Paris)*, 2002, 96:355-362.
- [7] Jefferys JGR. Nonsynaptic modulation of neuronal activity in the brain: electric currents and extracellular ions[J]. *Physiol Rev*, 1995, 75:689-723.
- [8] Frank SB. A model for the detection of weak ELF electric and magnetic fields[J]. *Bioelectrochem Bioenerg*, 1998, 47:207-212.
- [9] Bawin SM, Sheppard AR, Mahoney MD, et al. Comparison between the effects of extracellular direct and sinusoidal currents on excitability in hippocampal slices[J]. *Brain Res*, 1986, 362:350-354.
- [10] Bawin SM, Abur Assal ML, Sheppard AR, et al. Long-term effects of sinusoidal extracellular electric fields in penicillin-treated rat hippocampal slices[J]. *Brain Res*, 1986, 399:194-199.
- [11] Bikson M, Lian J, Hahn PJ, et al. Suppression of epileptiform activity by high frequency sinusoidal fields in rat hippocampal slices[J]. *J Physiol*, 2001, 531:181-191.
- [12] McCormick DA. Membrane Properties and Neurotransmitter Actions[M]//Shepherd GM. *The Synaptic Organization of the Brain*. Oxford: Oxford University Press, 1998: 37-76.

(收稿日期:2008-07-29)