

· 基础研究 ·

大鼠全脑缺血再灌注后脑组织巢蛋白和红细胞生成素的表达

王常鸿 王守彪

【摘要】目的 本实验以巢蛋白(nestin)作为神经干细胞标志物,应用大鼠全脑缺血模型研究 Nestin 与红细胞生成素(EPO)的表达变化规律及其关系,初步探讨内源性神经干细胞增殖、分化的相关机制。**方法** 共选取健康成年 SD 大鼠 36 只,将其分为正常对照组及实验组。实验组采用 Pulsinelli 四血管闭塞法制作大鼠全脑缺血模型,于全脑缺血 30 min 再灌注 3 h、6 h、12 h、24 h、3 d、7 d、14 d 及 21 d 时各取 4 只大鼠处死取材,将脑组织标本制作成石蜡切片,应用免疫组织化学染色法检测 Nestin 与 EPO 表达水平。**结果** (1) 正常对照组海马区、室旁区、皮质区均未见 Nestin 染色阳性细胞,实验组缺血再灌注 3 h 室管膜下区、海马区即有 Nestin 染色阳性细胞表达,于再灌注 14 d 时达到高峰,再灌注 21 d 仍有表达,但表达强度逐渐减弱。对照组与实验组各时间段 Nestin 均数进行方差分析,发现差异具有统计学意义($P < 0.05$),实验组各相邻时间段 Nestin 均数间相比,差异均具有统计学意义(均 $P < 0.05$);(2) 正常对照组大鼠海马区可见少量 EPO 表达,实验组缺血再灌注 3 h 时开始有少量表达,于再灌注 24 h 时达到高峰,以后则逐渐减弱,但在缺血 21 d 后仍有表达。正常对照组与实验组各时间段 EPO 均数经方差分析,发现差异具有统计学意义($P < 0.05$);实验组 EPO 表达水平除再灌注 7 d 与 3 d 时差异无统计学意义($P > 0.05$)外,其余各相邻均数间差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。**结论** 大鼠全脑缺血再灌注后脑组织 Nestin、EPO 阳性表达细胞增加;EPO 阳性细胞表达增加是脑组织神经损伤后早期保护性反应之一;Nestin、EPO 的表达规律具有一致性,EPO 可能具有促进神经干细胞增殖的功能。

【关键词】 大鼠; 缺血再灌注; 巢蛋白; 红细胞生成素

The expression of Nestin and EPO after whole cerebral ischemia-reperfusion in rat WANG Chang-hong*, WANG Shou-biao. * Department of Rehabilitation, the Second Affiliated Hospital of Medical College, Qingdao University, Qingdao 266042, China

【Abstract】Objective To observe dynamic changes of Nestin and Erythropoietin (EPO) expression after cerebral ischemia and investigate possible mechanism of intrinsic neurogenesis. **Methods** A total of 36 Sprague-Dawley rats were divided into a control group ($n = 4$) and an experimental group ($n = 32$) randomly. The experimental group were further divided into 8 subgroups corresponding to the observation time points of 3, 6, 12, 24 hours and 3, 7, 14, and 21 days after reperfusion. The model of experimental ischemia was made by 4-VO. The specimens were made into paraffin section. The expression of Nestin and EPO were detected by immunohistochemistry method. **Results** (1) Nestin detection: No Nestin positive cells were observed in hippocampal zone, subventricular zone (SVZ) and cortex in the control group. The expression of Nestin started at 3 h in SVZ but not in hippocampal zone and it started to increase at 6 h after cerebral ischemia and reach a peak at 14d after cerebral ischemia in the hippocampal zone, then decreased at 21 d. The difference of Nestin expression among different time points is statistically significant ($P < 0.05$). (2) EPO detection: A few EPO positive cells were observed in hippocampal zone in the control group. The expression of EPO started to increase at 3 h after cerebral ischemia and reach a peak at 24 h after cerebral ischemia, then decreased with time. The difference of EPO expression among the different time points is statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** (1) The increased expression of EPO and Nestin after cerebral ischemia might be a beneficial protective response of cells to the ischemic injury. (2) The sequence of expression of EPO and Nestin after cerebral ischemia is relevant. EPO may promote proliferation of NSC.

【Key words】 Rat; Ischemia-reperfusion; EPO; Nestin

脑血管疾病是神经系统常见病和多发病,其死亡人数约占所有患病死者的 10%,是目前人类三大死因

之一,存活者中约 50% ~ 70% 遗留瘫痪、失语等严重残疾,给患者家庭及社会带来沉重负担^[1]。虽然目前临床超早期溶栓和急性期神经细胞保护干预取得了重要进展,但对于大多数脑缺血患者而言,神经细胞死亡

作者单位:266042 青岛,青岛大学医学院第二附属医院康复医学科(王常鸿);青岛大学医学院人体解剖学教研室(王守彪)

不可避免,如何积极有效地促进脑缺血损伤后神经细胞功能恢复及再生仍是目前研究重点。

巢蛋白(Nestin)是一种中间丝蛋白,系未分化状态多能神经干细胞的抗原标志物之一,主要存在于胚胎发生期中枢神经系统(central neural system, CNS)中^[2]。目前检测 Nestin 表达水平是鉴定神经干细胞(neural stem cell, NSC)最重要、最常用的手段之一^[3-5]。红细胞生成素(erythropoietin, EPO)是一种含唾液酸的酸性糖蛋白,传统认为 EPO 是一种主要影响红细胞生成的体液因子,能促进血祖细胞增殖与分化;然而近年来研究发现, CNS 中星形胶质细胞可通过旁分泌方式分泌 EPO, 然后与邻近神经元细胞膜上的 EPO 受体(EPO-R)相结合,且对 CNS 有保护作用,能同时调控神经元多项功能^[6]。

本研究以 Nestin 作为神经干细胞标志物,应用大鼠全脑缺血模型初步探讨脑缺血后 Nestin 与 EPO 的表达规律及其关系,从而探讨 NSC 的增殖、分化机制,为临床治疗神经系统疾病提供理论依据。现报道如下。

材料与方法

一、实验仪器和试剂

主要实验仪器包括:科迪 150 型石蜡切片机(浙江金华产), Simple PCI 图像分析系统(德国产), PM-6 型 Olympus 解剖显微镜(日本 Olympus 公司);主要试剂包括:多聚赖氨酸(Sigma 公司), SABC 免疫组化试剂盒(Booster 公司), Nestin 兔抗鼠单克隆抗体(Booster 公司), EPO 兔抗鼠单克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司), DAB 显色剂(Booster 公司)。

二、实验动物及分组

共选取健康成年 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 36 只(实验动物编号 2004LA-213, 清洁级, 动物合格证书号:医动字第 410117 号), 雌雄不限, 均购自河南省实验动物中心;将其分为 2 组, 即正常对照组(4 只)和实验组(32 只)。

三、主要实验操作步骤

1. 动物模型建立:将实验组大鼠俯卧位固定于操作台上, 采用 10% 水合氯醛按 0.35 ml/100 g 体重进行腹腔注射麻醉, 于背部后正中中线第一颈椎水平作 1 ~ 2 cm 长纵形切口, 暴露左、右两侧翼突孔, 用电动微型钻打磨扩大双侧翼状孔暴露椎动脉, 用自制热烧针在酒精灯上烧红后, 于直视条件下迅速插入打磨好的翼状孔并热凝椎动脉, 术后缝合切口;再将大鼠仰卧位固定于操作台上, 于颈部正中中部作长约 1 cm 的切口, 在气管两侧仔细分离出颈总动脉, 套线备用;3 h 后待大鼠清醒时, 用无创动脉夹夹闭两侧颈总动脉, 30 min 后

松开动脉夹、复灌, 缝合切口。正常对照组大鼠不作任何特殊处理。

2. 标本制作:实验组大鼠分别于全脑缺血 30 min 再灌注 3 h, 6 h, 12 h, 24 h, 3 d, 7 d, 14 d 及 21 d 时各取 4 只处死取脑, 经 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉后, 打开胸腔、暴露心脏, 用 10 号针头刺入升主动脉, 采用手术缝合线固定针头, 快速灌注 20 ℃ 生理盐水(同时剪开右心耳)至流出液无血色;继续注入 4% 多聚甲醛 200 ml(4 ℃), 再次夹闭双侧颈总动脉, 钳闭腹主动脉, 经导管注入苏木素液 20 ml(判定全脑缺血是否完全), 染色 10 min 后取脑, 肉眼观察有脑膜蓝染或脑组织表面血管蓝染者弃之, 无色者用多聚甲醛后固定 6 h。正常对照组分别于实验开始和结束时各取 2 只大鼠处死取脑组织。

参照 Bregma 大鼠脑定位法, 于前囟向后 1.5 ~ 5.0 mm 区域内取脑组织块(厚约 3.5 mm), 经梯度酒精脱水、二甲苯透明(50 ℃, 20 min)、浸蜡、石蜡包埋处理后行组织块切片, 每 2 张连续切片为一组, 分别进行 Nestin 和 EPO 免疫组织化学染色。

3. 免疫组化阳性细胞观察:分别取大鼠海马 CA1 区、室旁区及皮质部位标本, 采用光学显微镜(×400)随机各选择 3 个视野进行观察并照相。免疫组化结果判定标准如下:在光学显微镜下, Nestin 阳性表达细胞为细胞浆呈黄色或棕黄色染色, EPO 阳性表达细胞为细胞浆或细胞核呈黄色或棕黄色染色。利用 Simple PCI 显微图像分析系统对本标进行计算机显微图像分析, 计算每个视野中 Nestin 和 EPO 阳性细胞数量并测定其光吸收值, 所得数据采用($\bar{x} \pm s$)表示。

四、统计学分析

采用 SPSS 10.0 版软件进行统计学比较, 对所得数据进行单因素方差分析, 实验组相邻时间段均数间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

结 果

一、Nestin 蛋白免疫组织化学染色结果分析

正常对照组大鼠海马区、室旁区均未见 Nestin 染色阳性细胞(图 1)。实验组大鼠缺血再灌注 3 h 时, 发现脑室下区(subventricular zone, SVZ)有 Nestin 阳性细胞表达(图 2), 海马区也有少量表达;再灌注 6, 24 h 时表达水平增强, 染色较明显;再灌注 7 d 时染色强度明显增加, 于再灌注 14 d 时达到高峰(图 3), 再灌注 21 d 时仍有表达, 但强度有所下降。正常对照组与实验组各时间段 Nestin 染色强度经方差分析, 发现其间差异具有统计学意义($P < 0.05$)。实验组各相邻时间段 Nestin 染色强度间比较, 发现差异具有统计学意义

($P < 0.05$), 具体结果详见表 1。

表 1 大鼠全脑缺血再灌注后不同时间点 Nestin 蛋白的表达变化[阳性细胞数/每视野($\times 400$), $\bar{x} \pm s$]

组别	只数	海马 CA1 区	室旁区	皮质区
正常对照组	4	0	0	0
实验组				
再灌注 3 h	4	20.33 $\pm$ 1.50	23.31 $\pm$ 1.52	15.21 $\pm$ 0.64
再灌注 6 h	4	35.16 $\pm$ 0.43	29.16 $\pm$ 3.42	27.16 $\pm$ 1.37
再灌注 12 h	4	64.83 $\pm$ 1.21	61.83 $\pm$ 2.54	42.83 $\pm$ 3.15
再灌注 24 h	4	71.50 $\pm$ 2.33	69.50 $\pm$ 1.09	60.50 $\pm$ 2.42
再灌注 3 d	4	79.66 $\pm$ 2.43	85.66 $\pm$ 4.26	68.66 $\pm$ 3.90
再灌注 7 d	4	95.33 $\pm$ 3.61	97.33 $\pm$ 4.27	79.33 $\pm$ 1.36
再灌注 14 d	4	110.16 $\pm$ 6.51	117.16 $\pm$ 0.45	93.16 $\pm$ 3.83
再灌注 21 d	4	91.33 $\pm$ 2.16	95.33 $\pm$ 3.11	74.33 $\pm$ 1.56

注:实验组各相邻时间段均数间比较,均 $P < 0.05$

二、EPO 蛋白免疫组织化学染色结果分析

正常对照组大鼠海马区可见微量、较弱 EPO 表达, EPO 阳性细胞散在分布, 表现为胞浆呈棕黄色颗粒状(图 4); 实验组大鼠脑缺血再灌注 3 h 时即开始有少量 EPO 表达, 再灌注 6 h 时 EPO 表达增加, 再灌注 12 h 时 SVZ 区表达明显加强(图 5), 再灌注 24 h 时达到峰值(图 6), 再灌注 3 d 时 EPO 强度有所减弱, 再灌注 21 d 时仍有 EPO 表达。正常对照组与实验组各时间段 EPO 染色强度经方差分析, 发现其间差异具有统计学意义($P < 0.05$)。实验组大鼠 EPO 染色强度除再灌 3 d 与再灌 7 d 时差异无统计学意义($P > 0.05$)外, 其余各相邻时间段 EPO 染色强度间比较, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$), 具体结果详见表 2。

表 2 大鼠全脑缺血再灌注后不同时间点 EPO 蛋白的表达变化[阳性细胞数/每视野($\times 400$), $\bar{x} \pm s$]

组别	只数	海马 CA1 区	室旁区	皮质区
正常对照组	4	9.22 $\pm$ 2.51	11.22 $\pm$ 2.19	8.01 $\pm$ 0.37
实验组				
再灌注 3 h	4	27.37 $\pm$ 1.62	30.37 $\pm$ 0.23	22.37 $\pm$ 1.23
再灌注 6 h	4	36.17 $\pm$ 0.75	37.37 $\pm$ 2.27	27.37 $\pm$ 1.24
再灌注 12 h	4	71.33 $\pm$ 1.26	76.33 $\pm$ 1.26	66.33 $\pm$ 1.61
再灌注 24 h	4	90.50 $\pm$ 0.64	92.50 $\pm$ 1.52	82.50 $\pm$ 2.53
再灌注 3 d	4	41.83 $\pm$ 2.05	42.50 $\pm$ 1.73	37.50 $\pm$ 3.64
再灌注 7 d	4	38.34 $\pm$ 2.50	42.17 $\pm$ 2.87	38.17 $\pm$ 1.48
再灌注 14 d	4	30.33 $\pm$ 1.86	31.33 $\pm$ 2.91	21.33 $\pm$ 1.72
再灌注 21 d	4	24.23 $\pm$ 1.22	19.46 $\pm$ 1.81	14.22 $\pm$ 2.56

注:正常对照组与实验组各时间段均数经方差分析, $P < 0.05$; 实验组除再灌 3 d 与再灌 7 d 外, 其余各相邻时间段均数间比较, 均 $P < 0.05$

三、大鼠全脑缺血再灌注后不同时间段海马区 Nestin、EPO 表达规律分析

正常对照组海马区可见较弱水平的 EPO 表达, 未见 Nestin 阳性表达细胞, 全脑缺血再灌注后 3 h 海马区可见少量 Nestin 和 EPO 阳性表达细胞, 然后表达强

度逐渐增加, EPO 于再灌注 24 h 时达到高峰, 然后表达强度逐渐减弱; Nestin 于再灌注 14 d 时达到高峰, 然后表达强度逐渐减弱, 再灌注 21 d 时 EPO 及 Nestin 仍有表达且均高于正常对照组水平, 大鼠脑缺血再灌注后 Nestin 与 EPO 的表达变化规律具有一致性(图 7)。

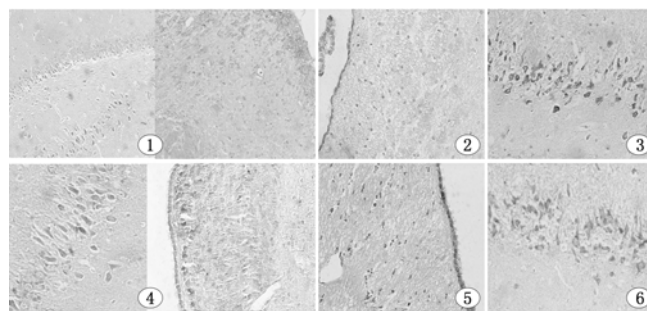


图 1 正常对照组大鼠海马区、室旁区 Nestin 表达(免疫组织化学染色, $\times 40$); **图 2** 实验组大鼠全脑缺血再灌 3 h 时 SVZ 区 Nestin 表达(免疫组织化学染色, $\times 40$); **图 3** 实验组大鼠全脑缺血再灌 14 d 时海马 CA1 区 Nestin 表达(免疫组织化学染色, $\times 200$); **图 4** 正常对照组大鼠海马区、室旁区 EPO 表达(免疫组织化学染色, $\times 100$); **图 5** 实验组大鼠全脑缺血再灌 12 h 时 SVZ 区 EPO 表达(免疫组织化学染色, $\times 40$); **图 6** 实验组大鼠全脑缺血再灌 24 h 时海马 CA1 区 EPO 表达(免疫组织化学染色, $\times 200$)

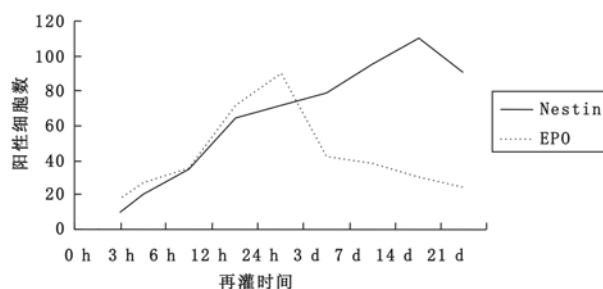


图 7 大鼠全脑缺血再灌注后海马区 Nestin、EPO 表达的变化

讨 论

脑组织缺血后机体将发生一系列复杂变化, 如促进成年动物脑内神经干细胞增殖、迁移和分化, 分化的新生神经元能部分替代或修复受损神经元, 从而在一定程度上改善受损神经功能。研究内源性神经干细胞的增殖、迁移及分化机制对促进脑卒中后神经功能可塑性、改善缺失神经功能具有重要意义。

一、Nestin 及脑缺血再灌后 Nestin 表达

Hockfield 等^[7]发现, Nestin 是由胚胎大鼠脊髓神经管神经前体细胞表达的一种蛋白, 被 anti-nestin 抗体(rat 401)特异性识别。在神经系统发育过程中, 当神经细胞迁移基本完成后, 其表达水平开始下降, 并随神经细胞成熟而逐渐停止表达。Nestin 的确切功能目前尚不清楚, 因其多出现于胚胎期神经细胞中, 故推测与胚胎神经细胞某些功能有关, 如维持原始细胞特殊

形态、参与细胞迁移等。Nestin 中间丝蛋白是公认的早期原始神经细胞标志物,在成年动物脑中只有少量表达^[4]。

本研究正常对照组大鼠脑室管膜、SVZ 区均未发现 Nestin 阳性细胞,推测这可能是因为处于相对静止状态的神经干细胞表达 Nestin 水平较低的缘故,并且不同实验室使用 Nestin 抗体结合抗原能力、反应条件等也有差异。实验组大鼠脑缺血再灌注 3 h 即有 Nestin 阳性细胞表达,再灌注 3 d、7 d 时表达强度明显增强,于 14 d 时达到峰值,其可能原因包括:因某种或某些因素改变了大脑海马区微环境,重现了胚胎神经发生时状态,神经干细胞随微环境改变而发生增殖、分化,Nestin 表达水平亦随之增加。

二、EPO 及脑缺血再灌注后 EPO 表达

脑缺血再灌注损伤是一个极其复杂的病理过程,脑缺血再灌注在触发一系列复杂损伤级联反应的同时,也启动了很多内源性因子参与脑保护机制。有研究发现,转基因小鼠脑内过表达 EPO 可缩小脑梗死体积 22%^[8],提示脑源性 EPO 在脑缺血性损伤中具有脑保护效应;Bernaudin 等^[9]发现,小鼠发生局灶持续性脑缺血后,其神经元、星形胶质细胞、小胶质细胞和内皮细胞均有 EPO 表达;朱红灿等^[10]报道,沙土鼠前脑缺血后脑源性 EPO 在海马 CA1 区表达水平于再灌注 12 h 时达到高峰。EPO 在不同脑缺血模型、不同脑区域及不同细胞类型中均有表达,表明 EPO 的表达没有细胞或区域特异性。本研究结果发现,正常对照组海马区、室旁区、皮质中有少量 EPO 阳性细胞表达,实验组脑缺血再灌注 3 h 时海马区即有 EPO 表达,于再灌注 6、12 h 时逐渐增多,于再灌注 24 h 时达到峰值,以后 EPO 表达则逐渐减弱,但再灌注 21 d 时仍未恢复至正常水平;实验组大鼠室旁区、皮质部位的 EPO 表达规律与海马区基本相似。

近年来研究发现,EPO 具有抑制 NO 介导氧自由基形成、减轻兴奋性氨基酸毒性的作用,同时还具有抗炎、减少神经元凋亡及促进血管形成等神经保护作用,因此倍受关注^[11-13]。本研究认为,在脑缺血再灌注损伤早期即能观察到内源性 EPO 表达增多,这可能是神经损伤后早期保护性反应之一。

三、大鼠全脑缺血再灌注后 Nestin、EPO 表达规律及其间关系

Mckay^[14]于 1997 年提出,NSC 是指具有分化为神经元、星形胶质细胞或少突胶质细胞的能力,能自我更新并可提供大量脑组织细胞的细胞群。目前 NSC 在脑内的分布尚有较多争论,SVZ 区和海马齿状回的颗粒下层(subgranular layer, SGL)已被证实是产生 NSC 最活跃的区域^[15,16]。NSC 生理功能及其增殖、分化、

迁移的影响机制目前尚不明确,其增殖、分化可能受一系列因子调控,包括转录因子、信号分子和生长因子等共同作用,其中研究较多的是由细胞因子(特别是生长因子等)组成的细胞外环境因素^[17]。除上述因素外,调节脑缺血后神经细胞再生还可能有 EPO 等因素参与^[18]。EPO 不但能促进红系祖细胞增殖、分化和成熟,同时还可调控神经元的多种功能,如降低神经元对缺氧、缺血的敏感性,增强神经元存活能力,促进神经祖细胞的增殖及抑制细胞凋亡等^[19]。本研究结果显示,正常对照组大鼠海马区及脑室下区有少量 EPO 表达,未发现 Nestin 表达,而实验组大鼠 EPO 于缺血再灌注 24 h 时达到高峰,随后逐渐降低;Nestin 表达则明显高于正常对照组,于再灌注 14 d 时达到高峰,随后逐渐降低。大鼠全脑缺血再灌注后 EPO 与 Nestin 的表达规律具有一致性,只是 EPO 表达高峰出现时间较 Nestin 明显提前,推测脑缺血损伤启动自身保护机制,内源性 EPO 产生增多,并与其它因素共同直接或间接刺激海马、室旁区、皮质区域的 NSC 分裂、增殖,同时使 Nestin 表达上调,并于再灌注 14 d 时达到高峰。脑缺血再灌注 21 d 时,发现实验组大鼠脑组织 EPO 恢复到接近正常水平,而 Nestin 仍有较高水平表达,这显然不能用 EPO 是促进 Nestin 表达的唯一因素来解释,进一步证明了神经干细胞增殖受一系列因子调控的观点,可以确定的是脑缺血后脑内 EPO 及其受体水平的升高是一种内在缺血反应,有助于新生神经元产生及缺损神经功能修复。

综上所述,本研究主要得出以下结论:(1)大鼠全脑缺血再灌注后脑组织 Nestin、EPO 阳性表达细胞增加;(2)EPO 阳性表达细胞增加是神经损伤后早期保护性反应之一;(3)Nestin、EPO 的表达规律具有一致性,EPO 可能具有促进神经干细胞增殖的作用。

参 考 文 献

- [1] 王维治,罗祖明,主编.神经病学.北京:人民卫生出版社,2004:126-145.
- [2] Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. Cell, 1990, 60:585-595.
- [3] 安沂华,王红云,张相彤,等.大鼠胚胎神经干细胞移植治疗脑出血的实验研究.中华神经外科杂志,2002,18:50-53.
- [4] Uchida K, Okano H, Hayashi T, et al. Grafted swine neuro epithelial stem cell can form myelinated axons and both efferent and afferent synapses with xenogenetic rat neurons. J Neurosci Res, 2003, 72: 661-669.
- [5] An YH, Wan H, Zhang ZS, et al. Effect of rats Schwann cell secretion on proliferation of human neural stem cells. Biomed Environ Sci, 2003, 15:55-60.
- [6] Yu X, Shacka JJ, Eells JB, et al. Erythropoietin receptor signaling is required for normal brain development. Development, 2002, 129:

- 505.
- [7] Hockfield S, McKay RDG. Identification of major cell classes in the developing mammalian nervous system. *Annu Rev Neurosci*, 1985, 5:3310-3328.
- [8] Wiessner C, Allegrini PR, Ekatodramis D, et al. Increased cerebral infarct volumes in polyglobulic mice over expressing erythropoietin. *Cereb Blood Flow Metab*, 2001, 21:857-864.
- [9] Bernaudin M, Marti HH, Roussel S, et al. Apotential role for erythropoietin in focal permanent cerebral ischemia in mice. *Cereb Blood Flow Metab*, 1999, 19:643-651.
- [10] 朱红灿, 孙圣刚, 李红戈. 脑源性促红细胞生成素在短暂性前脑缺血沙土鼠海马的表达变化. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 2003, 12:22-25.
- [11] Marti HH, Bernaudin M, Petit E, et al. Neuroprotection and angiogenesis: dual role of erythropoietin in brain ischemia. *Physiol Sci*, 2000, 15:225-229.
- [12] Kawakami M, Sekiguchi M, Sato K, et al. Erythropoietin receptor mediated inhibition of exocytotic glutamate release confers neuroprotection during chemical ischemia. *J Biol Chem*, 2001, 276: 39469-39475.
- [13] Agnello D, Bigini P, Villa P, et al. Erythropoietin exerts anti-inflammatory effect on the CNS in a model of experimental auto-immune encephalomyelitis. *Brain Res*, 2002, 952:128-138.
- [14] McKay R. Stem cells in the central nervous system. *Science*, 1997, 276:66-71.
- [15] Price J. Neural stem cell—Where are you. *Nat Med*, 2001, 7:998-999.
- [16] Roy NS, Wang S, Jiang T, et al. In vitro neurogenesis by progenitor cells isolated from the adult human hippocampus. *Nat Med*, 2000, 6: 271-277.
- [17] Sham NM, Marchionni MA, Isaacs I, et al. Glial growth factor restricts mammalian neural crest stem cells to glial fate. *Cell*, 1994, 77:349-360.
- [18] Shingo T, Sorokan ST, Shimazaki T, et al. Erythropoietin regulates the in vitro and in vivo production of neuronal progenitors by mammalian forebrain neural stem cells. *Neuroscience*, 2001, 21:9733-9743.

(收稿日期:2007-10-29)

(本文编辑:易 浩)

· 短篇论著 ·

神经肌肉电刺激治疗脑卒中后痉挛型构音障碍疗效观察

杨丹丹 徐琳峰 于向华 陈丽娜

痉挛型构音障碍是脑卒中后常见后遗症之一,临床上以饮水呛咳、吞咽困难、语音语调异常为主要特点,目前尚无特别有效的治疗方法。我科运用康复训练结合发音肌神经肌肉电刺激治疗脑卒中后痉挛型构音障碍,取得了较好的疗效,现报道如下。

一、资料与方法

(一)临床资料

2003 年至 2006 年我科收治脑卒中后并发痉挛型构音障碍患者 50 例,均符合言语治疗学中痉挛型构音障碍的评定标准^[1],脑卒中均经头颅 CT 或 MRI 证实。50 例患者随机分为治疗组和对照组,2 组病例临床资料比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$),具有可比性,见表 1。

表 1 2 组的临床资料

组别	例数	男/女 (例)	年龄 (岁)	病变半球 (左/右)	脑梗死/ 脑出血 (例)	病程 (d)
治疗组	25	12/13	62.50 ± 15.69	10/15	12/13	29.80 ± 14.08
对照组	25	11/14	63.46 ± 13.17	13/12	11/14	28.25 ± 12.22

(二)治疗方法

2 组患者根据 Frenchay 构音障碍评定^[2]结果选择治疗顺序,按呼吸、喉、腭和腭咽区、舌体、舌尖、唇、下颌运动逐个进行训练,遵循由易到难的原则。如对重度、极重度构音障碍的患

者进行呼吸训练、唇舌训练。重度患者舌运动严重受限,舌表现为僵硬状态,治疗师用压舌板或带上指套帮助患者做舌的前伸、后缩、上举、侧方运动。对轻度、中度构音障碍患者进行舌唇训练、发音训练、语调、语速训练等。每日 1 次,每次 30 min。治疗组除上述治疗外,还应用发音肌神经肌肉电刺激,采用 DXZ-2 型低频诊疗仪(北京产),刺激参数为双向方波,波宽为 700 ms,输出强度为 0 ~ 25 mA,频率为变频固定,有固定通断片,应用专用体表电极,放置颈部甲状软骨两侧,相当于环杓后肌、甲杓肌体表投影处,刺激强度以肌肉产生较强刺激为准,每日 1 次,每次 20 min,共治疗 45 d。

(三)评定标准

按 Frenchay 构音障碍评定法^[2],给予患者正常、轻、中、重、极重度构音障碍评定。2 组患者在治疗前和治疗 45 d 后,分别对其构音障碍进行评定。治疗效果评定标准:无效——训练前、后无变化;有效——语言程度缓解 I 度;显效——语言程度缓解 II ~ III 度;基本痊愈——语言程度接近正常^[3]。

(四)统计学分析

采用 SPSS 10.0 版统计软件包对数据进行 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

二、结果

治疗前,2 组的构音障碍评定指标比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$),见表 2。治疗后 45 d,2 组的构音障碍较治疗前明显改善,治疗组与对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$),总有效率比较差异也有统计学意义 ($P < 0.01$),见表 3。