

· 基础研究 ·

电针对脑梗死大鼠神经前体细胞增殖水平的影响

李常新 黄如训 陈立云 温红梅 解龙昌 方燕南 魏利华 牛小媛

【摘要】 目的 研究电针治疗对脑梗死病灶周围及海马处神经前体细胞增殖水平的影响。**方法** 采用易卒中型肾血管性高血压大鼠(RHRSP),电凝法制成大脑中动脉闭塞(MCAO)模型。行神经行为学功能评定、神经前体细胞标记及电针治疗,免疫组化染色观察并计数电针治疗后梗死灶边缘、对侧镜区及双侧海马5-溴脱氧尿核苷(bromodeoxyuridine, BrdU)标记的细胞。**结果** MCAO后神经功能评分减低,约5 d后恢复正常。电针治疗促使梗死灶边缘、对侧镜区 BrdU 阳性细胞增多,随着治疗时间增加,细胞增多更明显。**结论** 电针治疗可促使神经前体细胞增殖及迁移,可能是电针促进康复疗效的重要机制之一。

【关键词】 电针; 脑梗死; 5-溴脱氧尿核苷; 神经前体细胞

The effect of electroacupuncture on proliferation of neural precursor cells in rats after acute cerebral infarction LI Chang-xin*, HUANG Ru-xun, CHEN Li-yun, WEN Hong-mei, XIE Long-chang, FANG Yan-nan, WEI Li-hua, NIU Xiao-yuan. * Department of Neurology, the First Affiliated Hospital, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China

【Abstract】 Objective To investigate the distribution and proliferation of neural precursor cells(NPCs) in perifocal area and the hippocampus, and to examine the effect of electroacupuncture(EA) on them after acute cerebral infarction. **Methods** Stroke-prone renovascular hypertensive rats(RHRSP) were used to establish middle cerebral artery occlusion(MCAO) models by electric coagulation. EA was applied 24 hour after cerebral infarction. Neurobehavioral tests and scoring were carried out once a day since MCAO, and twice a week the next week, until performing Garcia test before decapitation. The rats were decapitated 5 days and 2 weeks, respectively, after EA. The BrdU positive cells in ischemic perifocal area, contralateral mirror area and the hippocampus were checked by immunohistochemistry staining. **Results** The Garcia scores were less than 18 until the 5th day after MCAO, and the scores in EA group were significantly higher than that in the control group at the second and third days. There are more BrdU-positive cells in the ipsilateral ischemic perifocal areas and hippocampus than that in the contralateral corresponding area(both EA group and control group, $P < 0.05$). The NPCs congregated in the ischemic perifocal areas 2 weeks after MCAO ($P < 0.01$). BrdU positive cells increased significantly in the ischemic perifocal areas after EA treatment ($P < 0.05$), and increased as time went by within 2 weeks. **Conclusion** The proliferative NPCs in the ischemic perifocal areas and hippocampus can be induced by stroke and kept increasing during 2 weeks of the EA. Our data indicated that an endogeneous proliferative NPCs may play an important role in recovery from stroke.

【Key words】 Electroacupuncture; Cerebral infarction; Bromodeoxyuridine; Neural precursor cells

越来越多的证据表明,神经发生(neurogenesis)现象见于成体脑组织某些特定区域,在此过程中神经前体细胞(neural precursor cells, NPCs)增殖、移行并可分化为神经元和胶质细胞。脑梗死后NPCs可移行至缺血灶周围,补充、修复神经元的缺失和功能损伤,发挥内源性抗损伤的修复作用^[1]。这一研究为包括脑卒中在内的中枢神经系统损伤后功能恢复提供了一种

新的可能治疗途径。在脑卒中治疗中,康复占重要地位,其方法很多但较少深入研究,国内外尚鲜见电针对脑梗死后NPCs作用的报道。本课题用易卒中型肾血管性高血压大鼠(stroke-prone renovascular hypertensive rats, RHRSP)制成大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型,动态观察急性脑梗死和电针治疗后梗死灶边缘及海马区(包括齿状回)NPCs增殖的变化,探讨电针对NPCs的影响,旨在为脑卒中治疗提供一种新的思路。

材料与方法

一、实验动物及两种模型制作

雄性SD大鼠50只,体重80~120 g(广东省医用

基金项目:原中山医科大学“211工程”课题基金资助项目(No. 061),2003年度广东省中医药局课题基金资助项目(No. 103052)

作者单位:030001 太原,山西医科大学附属第一医院神经内科(李常新、解龙昌、魏利华、牛小媛);中山大学附属第一医院神经内科(黄如训、温红梅、方燕南);北京天坛医院神经内科(陈立云)

实验动物场提供),按已建立的方法复制 RHRSP 模型^[2]。用 SDP-1 型大鼠心率血压计(中日友好医院研制)测血压,肾动脉狭窄前测量 1 次,狭窄后每周测量 1 次。造模后 16 周取血压 ≥ 26.7 kPa (200 mmHg)且无脑卒中症状、体重 450~500 g 的 RHRSP 30 只,采用电凝法制成 MCA 闭塞(MCAO)模型。参照 Wahl 等^[3]的方法电凝 MCA 跨嗅束后的主干,并于显微镜下见 MCA 供血中断。另外 10 只作相同的开颅术,但不凝闭 MCA(假手术组)。

二、实验方法

1. 动物分组:取 MCAO 造模成功的 20 只为实验组,随机分为 5 d 组与 2 周组两大组,每组 10 只,每组再分为电针治疗组(电针组)及不行电针治疗的梗死组,每组 5 只。假手术组(不凝闭 MCA)10 只,均分至 5 d 与 2 周组。

2. 神经功能评分:按照 Garcia 等^[4]的 18 分综合评分法进行评分。MCAO 后 12 h 开始每日 1 次(1 周后改为 2 次/周)由 2 人同时对电针组和梗死组评分,其中 1 人不知观察鼠属于何组。并测量体重和血压。

3. NPCs 标记:使用细胞增殖特异性标记物 5-溴脱氧尿核苷(Bromodeoxyuridine, BrdU, Sigma 公司)以 10 mg/ml 溶于生理盐水。MCAO 后 24 h 开始各组腹腔注射 BrdU(30 mg/kg 体重,1 次/d),标记处于增殖状态的 NPCs。连续注射 5 d(5 d 组)及 2 周(2 周组),最后一次注射后 2 h 处死。

4. 电针治疗:MCAO 后 24 h 用 JD-9605 型电脑针灸治疗仪(上海产)对电针组行电针刺激,选穴为病灶对侧相当于人的手三里、外关、伏兔及足三里,1 次/d。电刺激脉冲频率为 75 次/min,电流强度为 1~2 mA,20 min/次。5 d 组治疗 5 次,于治疗结束次日处死,2 周组治疗 6 d 为 1 个疗程,停 1 d 后进行下 1 个疗程,2 个疗程结束后次日处死。电针治疗过程中,5 d 组于第 4 日死亡 1 只,2 周组于第 11、13 日各死亡 1 只。

5. 病理检查:经左心室常规灌注固定、开颅取脑。由前向后作冠状切片,取经梗死灶中心及海马处脑组织块各 1 块,行固定、脱水、浸蜡、包埋、石蜡切片(片厚 5 μ m),行常规 HE 染色及免疫组化染色。免疫组化染色按试剂盒(北京中山生物技术有限公司,SP-9000,ZLI-9033)提供的染色步骤进行,一抗孵育前用胰蛋白酶-盐酸处理使 DNA 解链,BrdU 一抗为 Sigma 公司的小鼠单克隆抗体。

三、细胞计数及统计学分析

每只鼠均选取经梗死灶中心及海马处的 3 张切片,光镜下在每张切片患侧海马、对侧海马、梗死边缘及对侧镜区各取 3 个视野(10 $\times$ 40),计数 BrdU 标记阳性细胞个数。BrdU 阳性细胞数据呈偏态分布,故以

中位数(Median)表示各组数据。用 SPSS 11.5 软件包非参数方法中的 Mann-Whitney 检验及 Kruskal-Wallis 检验进行统计分析,差异有统计学意义后,对秩次作单因素方差分析,进行两两比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。神经功能评分比较用成组设计资料的 t 检验。

结 果

一、神经功能评分

假手术组评分为 18 分(正常)。MCAO 及电针治疗后评分随时间延长而逐渐增高,5 d 时均恢复正常。故将电针 5 d 组与 2 周组合并为电针组,两梗死组合并为梗死组进行分析(表 1)。

表 1 电针治疗后 1~4 d 与梗死组神经功能(Garcia)评分比较(分, $\bar{x} \pm s$)

组 别	n	1 d	2 d	3 d	4 d
电针组	7	13.50 $\pm$ 0.83	15.83 $\pm$ 1.32*	17.00 $\pm$ 0.63*	17.64 $\pm$ 0.52
梗死组	10	12.67 $\pm$ 0.52	14.33 $\pm$ 0.52	15.17 $\pm$ 0.98	17.17 $\pm$ 0.75

注:假手术组神经功能评分均为 18 分。与梗死组比较,* $P < 0.05$

由表 1 可见,电针作用 2 d 与 3 d 时,大鼠神经功能评分较梗死组高,说明电针对急性脑梗死后神经功能损害有改善作用。

二、病理检查

HE 染色可见梗死 5 d 时病灶内脑组织软化,少量细胞核固缩,毛细血管增生,灶周有胶质细胞增生。2 周时上述区域为软化灶,灶内有炎性细胞浸润。与梗死 5 d 比较,梗死 2 周毛细血管及胶质细胞增生较明显,电针 2 周后更显著,海马及齿状回清晰可见,HE 染色无明显差别。

三、NPCs 检测

假手术组 BrdU 阳性细胞存在于室管膜、脑室下区(subventricular zone, SVZ)及海马,因量很少,排列稀疏,故未计数统计。脑梗死及电针治疗后 BrdU 阳性细胞除在海马处增加外,梗死边缘及对侧镜区也增多,病灶侧多于病灶对侧(电针组及梗死组均 $P < 0.05$),密集分布于病灶周围;电针治疗后梗死边缘区 BrdU 阳性细胞明显多于梗死组($P < 0.05$),在梗死边缘、对侧镜区电针治疗 2 周较治疗 5 d 增多($P < 0.05$),见表 2。

讨 论

近年对内源性神经干细胞作用的研究,使得对包括脑卒中在内的脑损伤修复机制有了新的认识,并为该类疾病的治疗提供了新的靶点。NPCs 指存在于神经系统中并能够增殖分化成神经元、胶质细胞的神经干细胞。BrdU 作为一种胸腺嘧啶脱氧核苷类似物,在

表 2 各组脑组织表达 BrdU 细胞数(BrdU 阳性细胞数/
10×40 倍视野)(中位数)

组 别	动物数	患侧海马	对侧海马	梗死边缘 (或患侧皮质)	对侧镜区
5 d 组					
假手术组	5	2	1	0	0
梗死组	5	6*△	2△	19*△	1
电针组	4	7*△	1△	28**☆	2
2 周组					
假手术组	5	2	1	0	0
梗死组	5	10*△▲	4△▲	33*☆▲	3△▲
电针组	3	10*△	3	43**☆▲	7△▲

注:经两个和多个独立样本秩和检验及其两两比较,与同组对侧比较,* $P < 0.05$;与梗死组比较,# $P < 0.05$;与假手术组比较,△ $P < 0.05$,☆ $P < 0.01$;电针 2 周组与电针 5 d 组或梗死 2 周组与梗死 5 d 组比较,▲ $P < 0.05$

细胞增殖周期的 S 期可嵌入细胞核 DNA 中,用免疫组化方法能将其检测出来,因而 BrdU 阳性细胞可看作具有增殖活性的前体细胞。这类细胞可在病理情况下出现反应性增殖、移行,并定向分化为特定神经细胞,以修复神经系统组织的损伤、缺失,因而具有一定的治疗潜能。基于以上理论,我们做了实验性脑梗死及电针治疗后 NPCs 增殖研究,以深入了解脑梗死后功能恢复的物质基础及其发生机制,进一步指导临床脑卒中治疗。

成年哺乳动物海马齿状回、SVZ 存在 NPCs,且终生具有增殖能力^[5],增殖后可移行并进一步分化。研究认为皮质缺血后,起源于 SVZ 及 SGZ 的前体细胞可最终移行至缺血灶周围,发挥其修复作用^[1]。本研究中,BrdU 阳性细胞在假手术组仅见于室管膜、SVZ 及海马区,不出现于其它脑区;而在 MCAO 后 NPCs 主要见于梗死灶边缘,显示 NPCs 发生增殖、迁移,集中对病灶代偿、修复。以往曾观察到脑梗死后,除梗死灶边缘缺血明显外,在对侧镜区甚至远隔区也有程度相对较轻的缺血损伤^[6]。本次研究中增加的 NPCs 主要集中于梗死灶边缘,其次是海马,在镜区也有出现。说明缺血可成为内源性因素诱导 NPCs 增殖、移行。

脑梗死后的恢复受多种因素影响,不同的因素引起的病理损害机制不同,作用时间也不一致。选择时机行改善循环、减轻灶周水肿、保护脑细胞等综合治疗可为减少神经细胞死亡、维持其继续存活提供微环境。脑梗死康复有多种方法,电针作为一种传统的非药物治疗手段在临床脑卒中治疗中有肯定的价值^[7],针灸在缺血后神经发生中的作用已见报道^[8],因此电针的作用机制研究已逐渐引起重视。

以往研究表明,脑组织梗死灶边缘区及远隔区神经细胞的功能尚存,外周感觉及运动传导通路仍完整,电针刺激瘫痪侧肢体可能为一种有效的治疗手段。电

针治疗可加快全身血循环,并增加脑侧支循环而加强脑血供应^[9],减轻坏死边缘区水肿,可挽救濒临失去功能的神经元,加强修复功能^[10,11]。目前有用循经感传解释针刺作用的可能机制^[12]。取上、下肢的阳明经穴来治疗中风偏瘫,可促进全身气血运行,有利于受损脑组织恢复血氧供应^[13]。本研究观察到电针可改善功能结局,增加行为学评分;治疗后梗死边缘 BrdU 阳性细胞数增加,且随疗程延长而进一步增多。所以电针有明显促进 NPCs 增殖、迁移的作用,主要在损伤局部,在远隔部位如对侧镜区也有作用。2 周内随着治疗时间增加,这一作用越明显。结合以往有关神经发生及脑梗死功能恢复可塑性机制研究资料^[6],我们推测电针可能通过促使内源性 NPCs 增殖、向病灶区移行并分化为神经元及胶质细胞进行补偿、修复等起重要作用。早期使用电针治疗有利于为恢复期的进一步康复打下更好的基础,增多的神经前体细胞可能是脑梗死康复治疗的脑内重要物质基础。NPCs 增殖需要微环境,因此推测电针可能提供一种微环境有利于 NPCs 增殖、迁移。至于电针是通过什么途径或机制来改变这种微环境,还有待今后进一步的研究。

致谢:本研究得到中山大学附属第一医院针灸科阮经文副教授在针灸治疗方面的指导以及中山大学医学统计与流行病学系张晋昕博士给予数据统计的帮助,特此感谢!

参 考 文 献

- Zhang RL, Zhang ZG, Zhang L, et al. Proliferation and differentiation of progenitor cells in the cortex and the subventricular zone in the adult rat after focal cerebral ischemia. *Neuroscience*, 2001, 105:33-41.
- 黄如训, 曾进胜, 苏镇培. 易卒中型肾血管性高血压大鼠模型. *中国神经精神疾病杂志*, 1991, 17: 257-259.
- Wahl F, Allix M, Plotkine M, et al. Neurological and behavioral outcomes of focal cerebral ischemia in rats. *Stroke*, 1992, 23: 267-272.
- Garcia JH, Wagner S, Liu KF, et al. Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke*, 1995, 26:627-635.
- Pencea V, Bingaman KD, Freedman LJ, et al. Neurogenesis in the subventricular zone and rostral migratory stream of the neonatal and adult primate forebrain. *Exp Neurol*, 2001, 172:1-16.
- 黄如训, 张艳, 方燕南, 等. 大鼠脑梗死后运动功能可塑性物质基础及发生机制. *中华医学杂志*, 2000, 80:769-772.
- Si QM, Wu GC, Cao XD. Effects of electroacupuncture on acute cerebral infarction. *Acupunct Electrother Res*, 1998, 23:117-124.
- Kim EH, Kim YJ, Lee HJ, et al. Acupuncture increases cell proliferation in dentate gyrus after transient global ischemia in gerbils. *Neurosci Lett*, 2001, 297:21-24.
- Gao H, Guo J, Zhao P, et al. The neuroprotective effects of electroacupuncture on focal cerebral ischemia in monkey. *Acupunct Electrother Res*, 2002, 27:45-57.
- 方燕南, 张艳, 黄如训, 等. 电刺激治疗对脑梗死后运动功能及星形

- 胶质细胞活性的影响. 中国神经精神疾病杂志, 2000, 26: 9-11.
- 11 Wang SJ, Omori N, Li F, et al. Functional improvement by electro-acupuncture after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Neurol Res*, 2003, 25: 516-521.
 - 12 刘俊岭, 陈振荣, 胡翔龙, 等. 2000 年度经络研究进展. 针刺研究, 2001, 26: 72-76.
 - 13 刘克英, 秦培森, 刘秀梅, 等. 电针阳明经穴治疗缺血性脑卒中及经颅彩色多普勒超声观察. 中国针灸, 2000, 12: 735-737.

(修回日期: 2004-05-06)

(本文编辑: 郭正成)

· 短篇论著 ·

颈牵引加手法治疗椎动脉型颈椎病疗效观察

刘圣凤 李家蓉 黄源彬

我科近两年来采用颈牵引加手法治疗椎动脉型颈椎病, 取得了显著疗效。现报道如下。

一、资料与方法

一般资料: 患者 183 例, 来源于我院康复科、神经科及骨科门诊, 均符合椎动脉型颈椎病的诊断标准^[1]。将患者分为观察组与对照组。观察组 98 例中, 男 58 例, 女 40 例; 年龄 25 ~ 68 岁; 病程 1 个月 ~ 2 年半; 对照组 85 例中, 男 45 例, 女 40 例; 年龄 30 ~ 68 岁; 病程 1 周 ~ 3 年。临床表现为颈部僵硬、疼痛、眩晕、耳鸣、恶心或上肢麻木; 颈部有压痛、活动受限、椎间孔挤压试验阳性。MRI 或 CT 检查示椎间盘突出 81 例; X 线片示颈椎生理曲度变直、椎间隙狭窄、椎体边缘与钩椎关节增生、后纵韧带钙化 102 例; 脑血流图示 52 例椎动脉供血不足, 部分供血不足 38 例。单纯椎动脉型颈椎病 86 例, 椎动脉型伴有神经根型症状 57 例, 椎动脉型伴有交感神经型症状 38 例, 椎动脉型伴有脊髓型症状 2 例。2 组患者的年龄、性别、病程经统计学处理, 差异无统计学意义。

治疗方法: 观察组采用颈牵引加手法治疗。颈牵引采用枕颌式牵引, 患者取坐位, 颈前倾 5 ~ 10°; 一般从 3 ~ 5 kg 开始, 逐渐增大至 8 ~ 10 kg, 但以不超过体重的 1/4 为宜, 通常以患者感觉舒适且能减轻症状为准; 一般采用持续牵引, 每日 1 次, 每次 20 ~ 30 min, 10 次为 1 个疗程。手法治疗的基本手法有揉、拿、滚、捏、推、拍及穴位点压。具体方法为患者去枕俯卧, 双手支撑前额, 适当内收下颏。治疗师位于床头, 双手拇指相对或重叠置于椎体上方, 由上至下逐一下压, 反复 3 次; 然后治疗师位于患者侧面, 双手拇指压在颈椎旁, 向对侧横向加压, 用力的大小视病情及患者的反应而定, 反复 3 次; 最后患者取仰卧位, 头置于床外, 治疗师弓步站立, 一手固定于患者的枕部, 另一手托住其下颏, 前臂固定于头的一侧, 轻轻伸展患者颈部并向后牵拉, 持续 2 ~ 3 s 后, 逐渐放松, 反复 3 ~ 4 次; 在治疗同时, 采用基本手法对颈背部、双上肢及面部进行放松治疗及穴位(如风池、风府、天柱、大椎、夹脊穴、百会、攒竹、鱼腰、太阳、阳白、阿是穴等)点按。手法治疗每日 1 次, 每次 30 min, 10 次为 1 个疗程, 与牵引同步。轻者一般 1 ~ 2 个疗程, 重者 3 ~ 4 个疗程。对照组采用超短波加干扰电疗法。超短波采用上海产 LTD-CD31 型超短波电疗机, 输出功率为 200 W, 工作频率为 40.68 MHz, 波长为 7.374 m。取 14 cm × 10 cm 板状电容电极 2 个于颈肩部斜对置, 微热量, 每日 1 次, 每次 20 min, 10 次为 1 个疗程。干扰电疗采用 HGB-200 电脑骨折愈合仪, 取干扰电模

式中的动态干扰电疗法, 选用 25 cm² 的可粘电极 4 个。电极的放置方法视患者病情而定。症状局限于颈部的患者将 4 个电极置于颈椎两侧交叉对置, 症状波及肢体者将电极置于颈椎及患肢交叉对置。差频 50 ~ 100 Hz, 强度以患者耐受量为限, 每次 20 ~ 30 min, 每日 1 次, 10 次为 1 个疗程。轻者一般 1 ~ 2 个疗程, 重者 3 ~ 4 个疗程。

疗效标准: 治愈——症状和体征消失, 颈部活动自如, 能正常活动及工作; 显效——症状明显改善, 体征基本消失, 颈部活动不受限, 能坚持活动及工作; 有效——症状和体征改善, 颈部活动稍受限, 可适当活动及工作; 无效——治疗后症状和体征无变化。

二、结果

观察组 98 例中, 治愈 62 例, 占 63.3%; 显效 24 例, 占 24.5%; 有效 9 例, 占 9.2%; 无效 3 例, 占 3.1%; 总有效率为 96.9%。对照组 85 例中, 治愈 23 例, 占 27.1%; 显效 20 例, 占 23.5%; 有效 32 例, 占 37.6%; 无效 10 例, 占 11.8%, 总有效率为 88.2%。2 组总有效率比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 观察组疗效明显优于对照组。

三、讨论

临床上对椎动脉型颈椎病一般采取非手术疗法, 常采用颈牵引与手法治疗。颈牵引可使椎间隙增宽, 椎间孔增大, 颈背部痉挛的肌肉放松, 并有助于改善局部血液循环, 促进水肿吸收, 松解粘连, 从而缓解和消除对神经根的压迫和对椎动脉的刺激, 使症状逐渐减轻和消失^[2]。手法治疗有助于矫正椎间关节的不稳定, 缓解肌肉痉挛, 消除或减轻对椎动脉或交感神经的刺激和压迫、改善椎-基底动脉的供血情况, 使脑的循环得到改善, 从而使症状得以缓解^[3]。采用推、揉、捏、滚、拍及穴位点按可起到活血化瘀、舒筋活络、调和气血等作用^[2]。颈牵引加手法治疗椎动脉型颈椎病简单方便, 无痛苦, 疗效显著, 值得采用。

参 与 文 献

- 1 林治瑾, 主编. 临床外科学. 天津: 天津科学技术出版社, 1995. 6, 2014, 2029.
- 2 南登崑, 郭正成, 主编. 康复医学临床指南. 北京: 科学出版社, 1999. 152, 239, 412.
- 3 赵新建, 付飞, 刘玉春. 体外反搏加手法治疗椎动脉型颈椎病. 中华理疗杂志, 2001, 24: 311.

(收稿日期: 2004-04-20)

(本文编辑: 郭正成)