

· 基础研究 ·

电针刺激神经干对脑缺血再灌注后不同时期皮层 BDNF mRNA 表达的影响

郭宗君 王鲁民

【摘要】目的 观察脑缺血再灌注大鼠脑源性神经营养因子(BDNF)的动态变化过程及电针刺激神经干对 BDNF 表达的影响。**方法** 共选取成年健康雌性 Wistar 大鼠 68 只,采用线栓法建立脑缺血再灌注动物模型,并随机分为对照组(4 只)、MCAO 组(32 只)及神经干电针刺激组(32 只)。神经干电针刺激组大鼠于再灌注后 2 h,6 h,12 h,24 h,2 d,3 d,7 d 及 14 d 时各进行 1 次神经干电针刺激。利用原位杂交法观察上述时间点各组大鼠脑皮层 BDNF mRNA 表达的时程变化过程。**结果** 脑缺血 1 h 再灌注 2 h,6 h,12 h,24 h,2 d 及 3 d 时,MCAO 组与对照组比较,前者缺血侧脑皮层 BDNF mRNA 阳性细胞数量显著增多(均 $P < 0.01$),并且于再灌 2 h 及再灌 24 h 时分别出现峰值,如再灌 2 h 时的 BDNF mRNA 含量显著高于再灌 6 h 及再灌 12 h 时的 BDNF mRNA 含量,而再灌 24 h 时的 BDNF mRNA 含量则显著高于其它各时间点的 BDNF mRNA 含量(均 $P < 0.05$)。经电针刺激神经干后,大鼠在缺血再灌 2 h 以后的各时间点里,其缺血侧脑皮层 BDNF mRNA 阳性细胞数量均显著多于 MCAO 组及对照组(均 $P < 0.05$)。**结论** 电针刺激缺血再灌注大鼠神经干,可显著增强其缺血侧脑皮层 BDNF mRNA 的表达,可能是电针刺激发挥脑保护效应的重要机制之一。

【关键词】 缺血再灌注; 脑源性神经营养因子; 神经干刺激疗法

Expression of brain derived neurotrophic factor after nerve trunk stimulation by electroacupuncture in rats with cerebral ischemia/reperfusion GUO Zong-jun*, WANG Lu-min. * Department of Psychology and Behavioral Science, Zhejiang University, Hangzhou 310028, China

【Abstract】 Objective To observe the expression of brain derived neurotrophic factor(BDNF) mRNA after nerve trunk stimulation by electroacupuncture in rats' cortex with cerebral ischemia/reperfusion. **Methods** The MCAO model was established by ligation of the artery for 1 hour, and then reperfusion was conducted for 2h, 6h, 12h, 24h, 2d, 3d, 7d and 14d. The expression of BDNF mRNA after the cerebral ischemia/reperfusion injury (MCAO group) was observed and comparison was made between the electroacupuncture group and the control group. **Results** The number of cells with positive expression of BDNF mRNA in the cortex after 2h, 6h, 12h, 24h, 2d and 3d of reperfusion was more than that in the control group (all $P < 0.01$), but after 7d and 14d of reperfusion, there had no difference between the two groups (all $P > 0.05$). At 2h of reperfusion, the amount of the positive cells peaked and was much more than that at the 6h and 12h time points ($P < 0.05$). At 24h reperfusion, the amount of the positive cells had reached another apexes and much more than the other time points respectively ($P < 0.05$). In the electroacupuncture group, at 2h reperfusion, the number of the positive cells demonstrated no significant increase when compared with that of the MCAO group ($P > 0.05$), but after 6h reperfusion, a significant increase of expression of BDNF mRNA was observed against the MCAO group and control group, and the increase lasted to 14d after reperfusion. **Conclusion** Nerve trunk stimulation with electroacupuncture could improve and maintain the expression of BDNF mRNA for a long time, and this might contribute to the protection effect of electroacupuncture against the brain ischemia/reperfusion injury.

【Key words】 Ischemia/reperfusion; Brain derived neurotrophic factor; Nerve trunk stimulation therapy

相关研究发现,脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)在机体发生脑缺血后的损伤及修复过程中具有重要作用^[1]。当发生脑缺血后,BD-

NF 蛋白表达明显增强,可显著减轻缺血性脑损伤(如脑水肿)、抑制神经元坏死等,具有确切的脑保护效应^[2]。通过一系列实验研究证实,电针(electroacupuncture, EA)对脑缺血再灌注模型大鼠脑组织具有多方面的保护作用^[3,4],对临床治疗急性脑缺血患者也有较好的疗效。本研究通过制作缺血再灌注实验动物模型,以观察脑皮层 BDNF mRNA 表达在发生缺血再灌注后的时程变化规律及电针刺激神经干对其表达水平的影响。

基金项目:青岛市科技局资助项目(2000-66),国家科委“九五”攻关资助项目(96-906-02-23)

作者单位:310028 杭州,浙江大学心理与行为科学系(郭宗君);青岛大学医学院附属医院脑血管病研究所(郭宗君),青岛大学医学院附属第二医院急诊科(王鲁民)

材料与方法

一、实验动物及分组

共选取成年健康雌性 Wistar 大鼠 68 只, 体重 240 ~ 260 g, 平均 (253 ± 15) g, 清洁级, 由青岛市药检所动物养殖中心提供。应用线栓法建立大脑中动脉梗阻 (middle cerebral artery occlusion, MCAO) 及再灌注实验动物模型, 并将其随机划分为对照组 (4 只)、MCAO 组 (32 只) 及神经干电针刺激组 (32 只)。各组大鼠一般情况经统计学分析, 差异均无显著性意义, 具有可比性。

二、MCAO 模型制备

MCAO 动物模型的制作参照 Longa 等^[5]介绍的方法并加以改进。首先应用 10% 水合氯醛按大鼠每千克体重给予 300 mg 进行麻醉, 待麻醉剂生效后, 将一钝头尼龙鱼线自左侧颈外动脉处插入, 经颈总动脉分叉处及颈内动脉颅外段进入颈内动脉颅内段, 并继续深入直至到达大脑中动脉分支处, 阻断左侧大脑中动脉血流约 60 min 后拔出尼龙鱼线, 此时模型制备完成。对照组大鼠在模型制备过程中, 除尼龙鱼线不完全阻塞大脑中动脉外, 其它操作步骤皆与另外 2 组大鼠操作步骤基本一致。

三、电针刺激神经干方法

神经干电针刺激组大鼠于脑缺血 1 h 再灌注 30 min 时 (大鼠此时尚未清醒) 均首次给予神经干电针刺激。应用直径 0.4 mm、长 25 mm 的华佗牌不锈钢毫针, 斜向前刺入大鼠右侧 (与缺血侧相对) 臂丛神经干组织 (深达 6 mm), 并与电源正极相连; 于前囟后 1 mm、左旁开 1 mm 处刺入另一毫针, 并连接电源负极。于大脑缺血再灌注后 2 h, 6 h, 12 h, 24 h, 2 d, 3 d, 7 d 及 14 d 时各进行 1 次神经干电针刺激, 每次刺激时间为 30 min。电针刺激设备采用 G6805-2 型电针刺激仪, 选用低频连续波进行治疗, 该波频率为 2 ~ 6 Hz, 电流强度为 2 mA。每只大鼠均在麻醉状态下进行神经干电针刺激治疗。

四、标本采集及原位杂交分析

MCAO 组和神经干电针刺激组分别于术后 2 h, 6 h, 12 h, 24 h, 2 d, 3 d, 7 d 及 14 d 时各取 4 只大鼠用 10% 水合氯醛麻醉 (方法、剂量同上) 后, 于左心室插管至升主动脉处行心脏灌注, 依次灌入 0.9% NaCl 约 300 ml、4% 多聚甲醛 (由 0.01 M PBS 液配制而成) 约 400 ml, 当灌注完毕后开颅取大鼠脑组织, 取材范围为大脑前囟前 1 mm 至前囟后 2 mm 区域, 以确保脑梗死部位包含其中^[6,7]。随后将标本置入 4℃ 4% 多聚甲醛液中固定 24 h, 常规规石蜡包埋后行连续冠状切片 (切片厚 5 μ m)。

切片经常规脱蜡至水处理后, 先用 3% H_2O_2 处理 10 min, 再用蒸馏水洗涤 3 次, 每次 2 min。寡核苷酸探针 (序列 5'-GCAAC CAAAG TATGA AATAA CCATA GTAAG-3') 由博士德试剂公司提供。于脑切片上滴加经稀释处理过的胃蛋白酶 (37℃ 环境下), 20 min 后由浓度为 0.5 M 的 PBS 液洗涤 3 次, 每次洗涤 5 min, 随后经双蒸馏水洗涤 5 min 并加入预杂交液 20 μ l, 放置杂交湿盒内反应 4 h。再于 40℃ 环境中, 将脑切片置入 20 μ l 杂交液中杂交 10 ~ 12 h, 然后分别用 $2 \times$ SSC 洗涤 10 min (分 2 次进行), $0.5 \times$ SSC 洗涤 15 min, $0.2 \times$ SSC 洗涤 15 min。镜下控制 DAB 显色时间。采用 0.01 M 的 PBS 替代寡核苷酸探针作为阴性对照。

五、实验数据与统计学分析

采用 OLYMPUS 显微照相仪的高倍镜 ($\times 400$) 进行观察, 于缺血侧脑皮层区域各随机选取 8 个视野进行 BDNF mRNA 阳性细胞计数, 并计算平均单个视野的阳性细胞数目。实验所得数据采用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 应用 SPSS 10.0 版统计软件进行 t 检验, $P < 0.05$ 为差异具有显著性意义。

结 果

一、缺血再灌注后脑皮层 BDNF mRNA 表达的时程变化分析

经原位杂交分析后发现, 对照组大鼠脑皮层有基础水平的 BDNF mRNA 表达, 平均单个视野的阳性细胞数目为 (8.38 ± 2.49) 个。MCAO 组大鼠在脑缺血 1 h 再灌注 2 h, 6 h, 12 h, 24 h, 2 d 及 3 d 时与对照组比较, 前者 BDNF mRNA 表达显著增强 (均 $P < 0.01$); 而再灌注 7 d 及 14 d 时, 上述 2 组间 BDNF mRNA 表达差异无显著性意义 (均 $P > 0.05$)。进一步研究后发现, MCAO 组大鼠 BDNF mRNA 阳性细胞数量在再灌注 2 h 及 24 h 时各出现一个峰值 (呈现双驼峰现象), 如再灌注 2 h 时的阳性细胞数量显著多于再灌注 6 h 及 12 h 时的阳性细胞数量; 而再灌注 24 h 时的阳性细胞数量则显著高于其它各再灌注时间点的阳性细胞数量 (均 $P < 0.05$)。具体数据详见表 1 及图 1。

二、电针刺激神经干对缺血再灌注后脑皮层 BDNF mRNA 表达的影响

神经干电针刺激组大鼠于脑缺血再灌注 2 h 时与 MCAO 组比较, 其缺血侧脑皮层 BDNF mRNA 表达 2 组间差异无显著性意义; 当缺血再灌注 6 h 以后, 神经干电针刺激组大鼠 BDNF mRNA 表达水平显著增强, 平均单个视野的 BDNF mRNA 阳性细胞数量明显多于 MCAO 组及对照组 (均 $P < 0.05$), 并于再灌注 24 h 时达到峰值。具体数据详见表 1 和图 1。

表 1 各组大鼠缺血再灌注后其脑皮层平均单个视野 BDNF mRNA 阳性细胞数量比较(个, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	再灌 2 h	再灌 6 h	再灌 12 h	再灌 24 h	再灌 2 d	再灌 3 d	再灌 7 d	再灌 14 d
MCAO 组	32	64.50 $\pm$ 5.45	53.50 $\pm$ 6.99 *	54.13 $\pm$ 3.94 *	90.50 $\pm$ 12.39 *	72.00 $\pm$ 5.17 *	81.75 $\pm$ 9.40 *	17.00 $\pm$ 4.29 *	10.75 $\pm$ 3.19 *
神经干电针刺激组	32	67.13 $\pm$ 5.94	81.75 $\pm$ 2.94	88.25 $\pm$ 5.20	111.63 $\pm$ 9.06	103.88 $\pm$ 4.14	103.25 $\pm$ 4.27	32.00 $\pm$ 6.93	16.75 $\pm$ 2.95

注:与神经干电针刺激组比较, * $P < 0.05$; 放大倍率为 400 倍

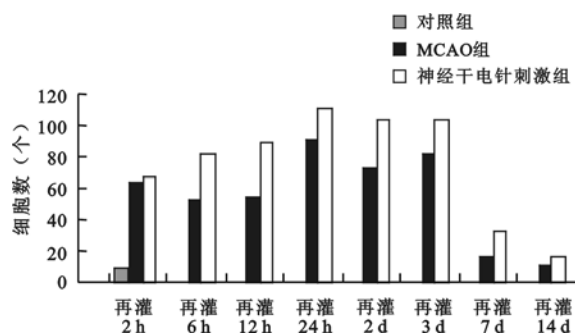


图 1 各组大鼠脑皮层平均单个视野 BDNF mRNA 阳性细胞数量比较

讨 论

有研究表明,当机体发生脑缺血再灌注损伤后,其脑神经细胞的损伤程度与 BDNF 的表达水平密切相关, BDNF mRNA 水平增强能够提高神经元的抗损伤能力^[1,8]。通过本实验可观察到,大鼠缺血侧脑皮层 BDNF mRNA 表达于再灌注早期即有显著增强,于再灌注 24 h 时达到峰值,并连续维持在较高水平直至再灌注后第 3 天;检测再灌注 7 d 和 14 d 时的 BDNF mRNA 表达水平,发现此时已降至基础水平。本实验观察到 MCAO 组大鼠在缺血再灌注 2 h 时,其脑皮层 BDNF mRNA 表达水平出现第一个高峰,该高峰可能是由脑皮层在应急状态下的保护性反应所引起;而在缺血再灌注 24 h 时,脑皮层 BDNF mRNA 表达水平出现第二个高峰值,且该峰的峰值较第一个峰值更高、持续时间更长,分析认为缺血后脑神经细胞的自我修复过程可能与该高峰密切相关^[9]。

临床实践表明,针刺对急性脑缺血患者具有良好的治疗效果^[3],如电针刺激可以干预脑组织在发生缺血再灌注后的损伤过程,减轻急性脑缺血后的水肿程度,良性调节细胞外钙离子浓度等^[10];而 BDNF 具有维持多种神经元细胞存活、减少运动神经元死亡及直接促进轴突生长、神经元修复和再生等功效^[11]。Yun 等^[12]研究证实,电针可以防止抑郁症大鼠脑内 BDNF 含量的下降;同时还有报道指出,电针能够提高神经生长因子及 BDNF 在缺血灶周围脑皮层中的表达,对脑缺血损伤具有一定的保护作用^[13]。本实验通过采用神经干电针刺激法来探讨电针刺激非穴位部位对缺血侧脑皮层 BDNF mRNA 表达的影响,实验结果表明在脑缺血再灌注 6 h 以后,电针刺激神经干能够显著提高 BDNF mRNA 的表达水平,并持续至再灌注后第 14 天,说明神经干电针刺激与穴位

电针刺激具有相似的治疗效果,而且直接刺激神经干还具有临床操作简单、患者易于接受等优点。有学者认为,体内 BDNF 含量增高,可能加强了体内 GABA 抑制系统的活性而抵消了谷氨酸盐的神经毒性作用,从而产生脑保护效应^[14];而针刺的循经感传现象也可能与 BDNF 表达的增高有一定关系^[15]。另有报道指出,通过重复电刺激动物前肢神经以观察其对运动皮层(MI)代表区的影响(如给予实验组大鼠每秒 1 次的串脉刺激,持续时间为 1.5 ~ 2.0 h),发现大鼠脑皮质前肢运动区边界向面部触须运动区方向移动,并同时伴有运动阈值的改变^[16],表明体表传入、信息的改变可快速引起 MI 神经元输出特性发生变化。由此推测,神经干电针刺激也许可同样引发脑皮质区神经元输出特性发生变化,从而影响 BDNF mRNA 的表达。

综上所述,当大鼠发生脑缺血再灌注损伤后,其脑皮层 BDNF mRNA 含量显著增加,而电针刺激神经干可进一步提高脑缺血再灌注后的 BDNF mRNA 含量,该变化过程可能与神经系统功能受损时机体的循经感传现象敏感性增强有关,也可能是神经电生理信号与神经生化信号经有机整合后所产生的积极效应,其确切机制还有待进一步研究。

参 考 文 献

- Schabitz WR, Berger C, Kollmar R, et al. Effect of brain-derived neurotrophic factor treatment and forced arm use on functional motor recovery after small cortical ischemia. *Stroke*, 2004, 35:992-997.
- Marmigere F, Rage F, Tapia-Arancibia L. Regulation of brain-derived neurotrophic factor transcripts by neuronal activation in rat hypothalamic neurons. *J Neurosci Res*, 2001, 66:377-389.
- Frank-Kai-Hoi S, Eric W, Xiang Y, et al. Does acupuncture have additional value to standard poststroke motor rehabilitation? *Stroke*, 2002, 33:186-194.
- 傅立新, 石学敏, 李平, 等. 针刺对脑缺血及再灌注家兔脑水肿、自由基病理学损伤的保护作用及相关性分析. *中国中医基础医学杂志*, 2000, 6:52-55.
- Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*, 1989, 20:84-91.
- Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. Australia: Academic Press, 1988. 23-38.
- 郭宗君, 丰岩清, 郭云良, 等. 神经生长因子对脑缺血再灌注后生长相关蛋白和突触素表达的影响. *中华物理医学与康复杂志*, 2000, 22:201-203.
- 石向群, 杨金升, 汪泳, 等. 脑源性神经营养因子在大鼠脑缺血再灌注损伤过程中基因表达的变化. *脑与神经疾病杂志*, 2002, 10:260-262.
- Kokaia Z, Nawa H, Uchino H, et al. Regional brain-derived neurotrophic factor mRNA and protein levels follow in transient forebrain ischemic in

- the rat. Mol Brain Res, 1996, 38: 139-146.
- 10 黄晓琳, 韩肖华, 李春芳, 等. 电针结合磁刺激对脑缺血大鼠脑组织含水量和细胞外钙离子浓度的影响. 中华物理医学与康复杂志, 2003, 25: 206-208.
 - 11 Croll SD, Ip NY, Lindsay RM, et al. Expression of BDNF and trkB as a function of age and cognitive performance. Brain Res, 1998, 812: 200-208.
 - 12 Yun SJ, Park HJ, Yeom MJ, et al. Effect of electroacupuncture on the stress-induced changes in brain-derived neurotrophic factor expression in rat hippocampus. Neurosci Lett, 2002, 318: 85-88.
 - 13 陈英辉, 黄显奋. 电针对 MCAO 大鼠皮层神经营养因子表达的影响. 中风与神经疾病杂志, 2000, 17: 139-141.
 - 14 Sommer C, Kollmar R, Schwab S, et al. Exogenous brain-derived neurotrophic factor prevents postischemic down regulation of [3H] muscimol binding to GABA(A) receptors in the cortical penumbra. Brain Res Mol Brain Res, 2003, 111: 24-30.
 - 15 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.
 - 16 李幸芳, 恽君惕, 齐慧新, 等. 重复电刺激前肢神经引起成年大鼠运动皮层的可塑性改变. 基础医学与临床, 1994, 14: 181-184.
- (修回日期: 2004-05-29)
(本文编辑: 易 浩)

· 短篇论著 ·

微波凝固与手术治疗口腔粘液腺囊肿的对比观察

姚瑶 张浙

微波在医学中的应用已有多年, 近年来用微波治疗肿瘤已取得了良好的效果。自 1998 年 3 月以来, 我们应用微波凝固治疗口腔粘液腺囊肿, 并同时与手术疗效进行对比分析, 现报道如下。

一、资料与方法

1. 一般资料: 口腔粘液腺囊肿患者 112 例, 依据临床特征而确诊。其中男 42 例、女 70 例; 年龄 16~67 岁; 病损部位在下唇 64 例、舌部 48 例; 病程 1~3 年。将 112 例患者分为 2 组, 即微波组 65 例、手术组 47 例。

2. 仪器设备: 采用 WB-100B 型微波治疗机, 频率为 2 450 MHz, 最大输出功率 80 W, 有数码显示, 辐射器有针状、圆盘状, 以适应温度需要, 输出功率和治疗时间可预先设置, 连续可调。

3. 治疗方法: (1) 微波组, 常规消毒, 用局部浸润或阻滞麻醉, 待麻醉生效后, 按照病损所在的不同部位, 选用针状辐射天线直接插入肿瘤内部, 有时可两种天线交叉使用, 进行加温凝固。微波输出功率为 10~60 W, 持续时间为 3~8 s, 病损范围大者, 可分散进行热凝, 直到肿瘤消失。若囊肿未全部脱落, 原囊肿边缘尚存少许积液者, 间隔 7~10 d 后, 再治疗 1 次, 术后无需特殊处理, 可应用抗生素、漱口剂。(2) 手术组, 在常规消毒、局麻下, 手术切除病变组织, 缝合止血。2 组患者均嘱其每 7 d 复诊一次, 共复诊 3 次, 记录结果。

4. 疗效标准: 痊愈——自觉症状及体征全部消失, 无复发; 有效——自觉症状及体征部分消失或减轻; 无效——自觉症状及体征仅有轻微改变或无改变, 治疗后复发。

5. 统计学分析: 2 组疗效对比分析采用 χ^2 检验。

二、结果

微波组 3 次复诊总有效率为 98.46%, 手术组为 100%, 2 组有效率比较, 差异无显著性意义 ($P > 0.05$) (见表 1)。有 1 例患者经微波凝固治疗 2 次后, 第 3 次复诊仍复发, 重复进行第 3 次治疗后治愈。

三、讨论

粘液腺囊肿是由于粘液腺排泄管受阻, 腺体内的分泌物滞

留于腺内, 使腺泡逐渐膨胀而形成囊肿。它是最常见的小唾液腺瘤样病变, 好发于下唇及舌尖腹侧^[1]。保守治疗常采用抽尽囊液后, 向囊腔内注入药物, 但囊肿易复发, 因此临床上最常用的治疗方法仍为手术切除, 然而手术切除同样存在复发问题, 且由于手术创伤较大, 术中或术后伤口出血较多, 常需缝合处理, 加之术后疤痕形成使患者不适。随着微波在医学领域的广泛应用, 用微波治疗口腔白斑、扁平苔藓、血管瘤、口疮等均有报道^[2], 口腔粘液腺疾患的微波凝固治疗也已逐步开展。

微波辐射是一种电磁辐射。微波产热是以生物体本身作为热源, 进行内部加热, 故热不易扩散到外部, 而且微波辐射场中的组织受热均匀, 因此热效应甚佳^[3]。周曾同等^[4]用微波辐射进行实验性白斑癌变的阻断研究曾取得理想效果。

本组病例采用手术和微波凝固治疗口腔粘液腺囊肿, 经对比观察发现 2 种疗法具有相似的治疗效果, 且微波凝固具有定位准确、治疗时间短、对正常组织损伤小、伤口无需缝合、安全无副作用、无后遗症及费用低廉等优点。微波治疗该病是一种较理想的治疗方法, 但远期疗效仍需进一步观察。

表 1 2 组治疗结果对比

组 别	n	治愈病例数(例, %)		有效率 (%)
		治疗 1 次	治疗 2 次	
微波组	65	62(95.38)	2(3.08)	98.46
手术组	47	46(97.87)	1(2.13)	100

注: 2 组有效率比较, $P > 0.05$

参 考 文 献

- 1 邱蔚六, 主编. 口腔颌面外科学. 北京: 人民卫生出版社, 2002. 300-301.
- 2 毛祖彝, 郝莉. 微波热凝治疗口腔黏膜常见病. 华西口腔医学杂志, 1994, 3: 163-165.
- 3 唐国瑶, 周曾同, 华丽, 等. 微波辐射对金地鼠颊囊白斑癌变阻断效果的肉眼观察. 临床口腔医学杂志, 2001, 3: 211-212.
- 4 周曾同. 微波辐射阻断金地鼠颊囊白斑癌变的实验研究. 临床口腔医学杂志, 1998, 3: 160-162.

(修回日期: 2004-08-02)

(本文编辑: 郭正成)