

低频电刺激对急性脑梗死大鼠脑 bFGF、EGF 表达和内源性神经干细胞增殖的影响

向云 燕铁斌 金冬梅 庄志强 彭源

【摘要】目的 观察低频电刺激(LFES)治疗对急性脑梗死大鼠脑内源性神经干细胞(NSC)和碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、表皮生长因子(EGF)表达的影响,探讨 LFES 治疗改善脑梗死后神经功能的机制。**方法** 选择成年 Sprague-Dawley 大鼠,用随机数字表法分为 LFES 治疗组、安慰刺激组和假手术组,每组又根据观察时间点分为治疗第 3,7,14 天 3 个亚组。LFES 治疗组和安慰刺激组大鼠制作急性大脑中动脉梗死模型。术后第 3 天,LFES 治疗组开始接受 LFES 治疗(频率 30 Hz,脉宽 250 μ s,强度为 3 mA,每次 10 min),观察在治疗第 3 天、第 7 天、第 14 天大鼠海马齿状回和室管膜下区 NSC 巢蛋白的表达水平,检测梗死侧脑组织 bFGF、EGF 总蛋白和 mRNA 的表达量,同时采用网屏试验评价大鼠运动功能。**结果** LFES 治疗组大鼠巢蛋白阳性细胞数在治疗第 7 天、第 14 天明显高于安慰刺激组($P < 0.05$);梗死侧脑组织 bFGF、EGF 总蛋白和 mRNA 表达量在治疗第 7 天、第 14 天明显高于安慰刺激组($P < 0.05$);LFES 治疗组网屏试验评分在治疗第 14 天明显高于安慰刺激组($P < 0.05$)。**结论** LFES 能促进急性脑梗死大鼠脑内源性 NSC 的增殖和 bFGF、EGF 的表达,并改善大鼠运动功能,增强脑的可塑性。

【关键词】 低频电刺激; 神经干细胞; 碱性成纤维细胞生长因子; 表皮生长因子; 脑梗死

The effect of low frequency electrical stimulation on basic fibroblast growth factor and epidermal growth factor expression and on endogenous neural stem cell proliferation in the brains of rats with acute cerebral infarction XIANG Yun*, YAN Tie-bin, JIN Dong-mei, ZHUANG Zhi-qiang, PENG Yuan. * Department of Rehabilitation Medicine, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China

Corresponding author: YAN Tie-bin, Email: Dr.yan@126.com

【Abstract】Objective To observe the effects of low frequency electrical stimulation (LFES) on the proliferation of endogenous brain neural stem cells (NSCs) and on the expression of basic fibroblast growth factor (bFGF) and epidermal growth factor (EGF) in rats with acute cerebral infarction; to explore the therapeutic mechanism of LFES in improving neural function. **Methods** Fifty-four rats were randomly divided into a LFES group, a placebo stimulation group and a sham-operated group. Each group was further divided into 3rd day, 7th day and 14th day subgroups, with 6 rats in each subgroup. An acute cerebral infarction model was induced in the rats of the LFES and placebo stimulation groups by middle cerebral artery occlusion (MCAO). Three days after the operation, rats in the LFES group began LFES treatment (frequency 30 Hz, pulse width 250 μ s, current intensity 3 mA, 10 min/d), while the placebo stimulation group was treated identically but without electricity. The rats in the sham-operated group had no special treatment. The expression of nestin positive cells in the subgranular zone of the hippocampus and the subventricular zone was detected by immunohistochemical staining. The expression of bFGF, EGF proteins and mRNA in the ischemic hemisphere was detected by Western blotting and RT-PCR analysis. A screen test was applied to evaluate motor function. **Results** Nestin-positive cells in the subgranular and subventricular zones of rats in the LFES group increased significantly more than in the placebo stimulation group at the 7th and 14th day. The expression of bFGF, EGF proteins and mRNA in the ischemic hemisphere was up-regulated compared to the placebo stimulation group at the 7th and 14th day. At the 14th day a difference in motor function was observed in rats in the LFES group compared with the placebo stimulation group. **Conclusion** LFES can promote the proliferation of endogenous brain NSCs and the expression of bFGF and EGF in rats with acute cerebral infarction. It can also improve motor function and enhance neural plasticity in the brain.

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2010.12.001

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30973166,30772304)

作者单位:510120 广州,中山大学孙逸仙纪念医院康复医学科(向云、燕铁斌、金冬梅、庄志强);深圳市第六人民医院(南山医院)康复医学科(向云);广州市第一人民医院康复医学科(彭源)

通信作者:燕铁斌,Email:Dr.yan@126.com

【Key words】 Low frequency electrical stimulation; Neural stem cells; Basic fibroblast growth factor; Epidermal growth factor; Cerebral infarction

脑卒中后偏瘫即肢体运动功能障碍,在急性期患者的发生率约为 60% ~ 80%。虽然脑卒中发生后患者的肢体运动功能会有一定程度的恢复,但这种恢复往往不足以代偿功能障碍,并严重影响其日常生活活动能力,给患者、家庭和社会造成沉重的负担^[1]。目前,脑卒中后受损神经功能的康复已成为研究的热点。

研究表明,大脑在受损后存在功能重组和神经可塑性的变化^[2-3]。近年来,以运动再学习、强制性运动和神经肌肉电刺激(neuromuscular electrical stimulation)为代表的新型康复治疗手段受到了越来越多的重视^[4-6]。其中低频电刺激(low-frequency electrical stimulation, LFES)因临床疗效显著而倍受关注^[7-10]。神经肌肉电刺激是利用一定强度的低频脉冲电流刺激一组或多组肌肉,诱发其运动或模拟正常的肌肉自主运动,以达到改善或恢复被刺激肌肉或肌群功能的目的^[11]。已往的 LFES 研究主要集中在临床疗效的观察上^[12-15],我们在临床工作中也发现 LFES 治疗可以促进脑卒中急性期患者运动功能的恢复^[8, 14],但有关 LFES 促进肢体运动功能恢复的内在机制,特别是从神经可塑性角度进行的研究甚少^[16-17]。

在神经可塑性的研究中,神经干细胞(neural stem cell, NSC)的探索是近年的热点,研究方向主要集中在内源性 NSC 和外源性 NSC 的移植上,但外源性 NSC 常受到来源有限、伦理问题、免疫排斥、移植后功能重组和成瘤性等问题的限制。因此,本研究选择内源性 NSC 为研究方向,拟从观察 LFES 治疗对急性脑梗死大鼠脑内海马齿状回颗粒细胞层下区(subgranular zone, SGZ)和脑室管膜下区(subventricular zone, SVZ)内源性 NSC 和脑部碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)、表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)的影响入手,初步探讨脑梗死后早期应用 LFES 治疗促进偏瘫侧肢体功能恢复的分子学机制。

材料与方法

一、实验动物及分组

成年雄性 Sprague-Dawley 大鼠 54 只,体重 250 ~ 300 g,周龄 8 ~ 10 周,中山大学实验动物中心提供。用随机数字表法分为 LFES 治疗组、安慰刺激组和假手术组,每组 18 只,3 组又根据观察时间点分为治疗第 3, 7 和 14 天 3 个亚组,每个亚组 6 只。

二、模型制作和 LFES 皮下电极埋置

1. 模型制作: LFES 治疗组和安慰刺激组参照

Longa 等^[18]介绍的线栓法制成永久大脑中动脉梗死(middle cerebral artery occlusion)模型。麻醉大鼠后,于颈部中央切口,分离左侧颈总动脉、颈外动脉及颈内动脉,将鱼线(直径 0.22 mm,长 40 mm)从颈总动脉插入颈内动脉约 19 mm 以完全阻塞大脑中动脉。假手术组也进行同样的手术,但不予大脑中动脉阻断。造模成功后采用改良 Bederson 评分表进行评定:0 分为无神经损伤症状;1 分为不能完全伸展对侧前爪;2 分为向左侧转圈;3 分为向左侧倾倒;4 分为不能自发行走,甚至意识丧失^[19]。评分 2 分及 3 分者入选。

2. 皮下电极埋置:各组参照 Leung 等^[20]介绍的方法,在模型制作完成后,在大鼠右侧前肢背侧作一长约 2 cm 的纵行切口,切开皮肤和皮下组织,显露深筋膜;将 LFES 治疗仪(NeuroTrac™ Continnence, Verity Medical 公司,英国)附带的 2 根电极(金属线头式)分别置于前肢背侧远端和近端伸指肌腹的筋膜上,以 3 mA 的电刺激寻找敏感点,待动物出现充分的伸指动作时,用手术缝线在深筋膜的 2 个电极接触点处做标记,即为电刺激敏感点;将 2 根特制导线(美国 Chris Weir 公司生产的 AS633 型导线)缝扎固定在伸肌的筋膜上,一根固定于前肢远端敏感点上,另一根固定于前肢近端的敏感点上,并将 2 根导线经前肢背侧、项背,穿至颅顶两耳之间的皮下,从皮肤切口处引出(作为 LFES 的电极接口),妥善固定。

三、LFES 治疗

应用 LFES 治疗仪(NeuroTrac™ Continnence, Verity Medical 公司,英国)于术后第 3 天开始对 LFES 治疗组进行治疗,将治疗电极与大鼠头顶穿出的导线连接,刺激偏瘫侧前肢肌肉收缩,产生伸腕伸指动作,刺激参数为频率 30 Hz,脉宽 250 μs,波升/波降比为 1 s/1 s,强度为 3 mA,每日 1 次,每次 10 min。安慰刺激组连接 LFES 治疗导线,但不予电刺激。假手术组不予特殊处理。

四、观察指标

1. 运动功能评定:采用网屏试验评定大鼠运动功能,由 2 名实验人员评定,实施盲法,取其得分的均值进行分析。网屏为 50 cm × 40 cm 网带,网眼大小为 1 cm × 1 cm,网屏距地面高度为 80 cm,下方铺以 12 cm 厚的海绵,先将网屏水平放置,大鼠置于其上,然后缓缓地将一端抬高,在 2 s 内将网屏变成垂直位,保持 5 s,观察大鼠是否会从网屏上掉下或用前爪抓住网屏,从而评价前爪抓握能力及肌力的情况。评分标准分为 4 个等级:0 分为前爪抓住网屏达 5 s 而不会掉下

来;1 分为暂时握住网屏,滑落一段距离,但 5 s 内未掉下;2 分为在 5 s 内掉下来;3 分为网屏转动时鼠即掉下。

2. 免疫组织化学染色:于 LFES 治疗后第 3 天、第 7 天和第 14 天取各组大鼠脑组织,分别在前凶前 1.0 mm 至前凶后 0.8 mm 处与前凶后 3.0~4.5 mm 处(相当于大鼠室管膜下区和海马区)冠状切取 2 mm 厚组织块,制成蜡块,切成厚度 5 μm 薄片。切片经封闭后,用一抗(兔抗巢蛋白多克隆抗体,1:100,博士德公司)孵育,4℃下过夜;滴加二抗(羊抗兔巢蛋白抗体,1:200,福建迈新公司),链霉素抗生物素蛋白-过氧化酶(S-P)试剂(福建迈新公司)。使用由图像采集卡、Olympus-BX60 显微镜组成的全自动图像分析系统,每只大鼠取 5 张非连续切片(每隔 5 张取 1 张切片),在 400 倍放大倍数和相同的光亮程度下,每个部位在 SVZ 和 SGZ 取 5 个非重叠视野进行巢蛋白阳性细胞数计数(以胞浆内呈黄色或棕黄色为阳性)。

3. Western blot 分析:于 LFES 治疗后各时间点处死大鼠,自前凶前 1.2 mm 至前凶后 4.0 mm 处取左侧脑组织约 100 mg,提取蛋白。取 25 μg 蛋白进行电泳分离,电转印后封闭 2 h;加入小鼠抗 bFGF(1:500, Milipore)、EGF(1:1000, Abcam)抗体,4℃下过夜;加入羊抗小鼠辣根过氧化物酶、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH),室温下孵育 2 h;显影、定影、扫描后,应用 TANON 2020 型凝胶成像分析系统(上海)测定目标条带的光密度(optical density, OD)值,计算 bFGF、EGF 与 GAPDH 的 OD 值比值,作为其蛋白表达相对值。

4. RT-PCR 分析:采用 Trizol 试剂裂解脑组织,提取总 RNA,测定 RNA 浓度,采用 RT 试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA。依据大鼠 bFGF、EGF 基因序列设计引物,见表 1。反应条件如下:预变性温度 94℃持续 5 min,变性温度 94℃持续 1 min,退火温度 55℃持续 1 min,延伸温度 72℃持续 1 min,共循环 33 次,最后延伸温度 72℃持续 10 min。使用 Image Pro Plus 5.0 成像分析系统分析结果,计算 bFGF、EGF 与 GAPDH 的 OD 值比值,作为其 mRNA 表达相对值。

表 1 RT-PCR 引物名称、序列和产物长度

引物名称	序列	产物(bp)
bFGF	Sense:5' CGTCAAACCTACAGCTCCAA 3'	207
	Antisense:5' CGTCAAACCTACAGCTCCAA 3'	
EGF	Sense:5' CCTGACTCTACCTCACCCTC 3'	134
	Antisense:5' TCCACGGATTCAACATACA 3'	
GAPDH	Sense:5' CAAGTTC AACGGCAGTCAAG 3'	402
	Antisense:5' ACAGTCTTCTGAGTGGCAGTGAT 3'	

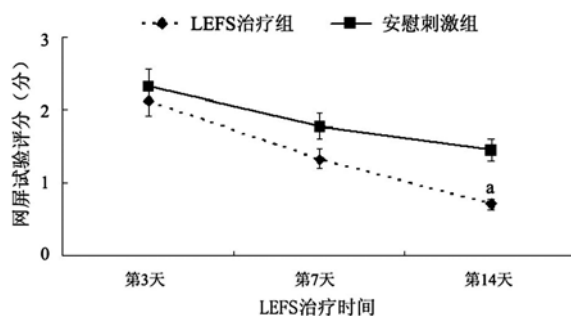
五、统计学分析

采用 SPSS 13.0 版统计学软件进行分析,实验数据用($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差或重复测量的方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、运动功能评定

假手术组大鼠各时间点网屏试验评分均为 0 分,LFES 治疗组和安慰刺激组的网屏试验评分均高于假手术组($P < 0.05$),提示运动功能受损;治疗第 3 天和第 7 天,LFES 治疗组和安慰刺激组之间网屏试验评分比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);治疗第 14 天,LFES 治疗组网屏试验评分明显较安慰刺激组低,差异有统计学意义($P < 0.05$),提示 LFES 治疗组运动功能改善明显,见图 1。



注:与安慰刺激组相同时间点相比,* $P < 0.05$

图 1 LFES 治疗组和安慰刺激组网屏试验评分比较

二、SGZ 和 SVZ 巢蛋白阳性细胞数比较

LFES 治疗组和安慰刺激组 SGZ 和 SVZ 巢蛋白阳性细胞数在治疗第 3 天增高,第 7 天达到峰值,第 14 天时有下降,2 组各时间点巢蛋白阳性细胞数均高于假手术组,差异具有统计学意义($P < 0.05$);LFES 治疗组第 3 天巢蛋白阳性细胞数较安慰刺激组高,但差异无统计学意义($P > 0.05$),2 组第 7 天和第 14 天巢蛋白阳性细胞数比较,差异具有统计学意义($P < 0.05$),见表 2。

三、bFGF、EGF 总蛋白表达比较

各组不同时间点脑梗死侧组织 bFGF、EGF 总蛋白相对 OD 值的动态变化见表 3。LFES 治疗第 3 天,LFES 治疗组 bFGF、EGF 蛋白量已经开始增加,治疗第 7 天进一步升高,与安慰刺激组和假手术组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),在治疗第 14 天蛋白表达量较第 7 天略有下降,但仍高于安慰刺激组和假手术组($P < 0.05$),见图 2。

四、bFGF、EGF 的 mRNA 表达比较

各组不同时间点脑梗死侧组织 bFGF、EGF 的 mRNA 表达量在 LFES 治疗第 3 天已经开始增加,

表 2 各组 SGZ 和 SVZ 区巢蛋白阳性细胞数(个/高倍镜视野, $\bar{x} \pm s$)

组别	只数	SGZ			SVZ		
		第 3 天	第 7 天	第 14 天	第 3 天	第 7 天	第 14 天
LFES 治疗组	18	17.62 ± 3.23 ^a	28.11 ± 4.34 ^{ab}	21.12 ± 4.76 ^{ab}	11.34 ± 1.56 ^a	20.23 ± 4.23 ^{ab}	14.23 ± 2.51 ^{ab}
安慰刺激组	18	15.33 ± 2.87 ^a	20.85 ± 3.34 ^a	18.72 ± 2.58 ^a	10.44 ± 1.76 ^a	14.95 ± 2.18 ^a	12.55 ± 2.98 ^a
假手术组	18	9.45 ± 1.67	9.57 ± 1.76	9.48 ± 1.17	6.18 ± 1.13	6.43 ± 1.56	6.32 ± 1.22

注:与假手术组相同时间点比较,^a $P < 0.05$;与安慰刺激组相同时间点相比,^b $P < 0.05$

表 3 各组不同观察时间点脑梗死侧组织 bFGF、EGF 总蛋白的表达(相对 OD 值, $\bar{x} \pm s$)

组别	只数	bFGF			EGF		
		第 3 天	第 7 天	第 14 天	第 3 天	第 7 天	第 14 天
LFES 治疗组	18	0.53 ± 0.067 ^a	0.71 ± 0.074 ^{ab}	0.69 ± 0.063 ^{ab}	0.45 ± 0.058 ^a	0.64 ± 0.068 ^{ab}	0.57 ± 0.063 ^{ab}
安慰刺激组	18	0.54 ± 0.064 ^a	0.61 ± 0.068 ^a	0.57 ± 0.055 ^a	0.39 ± 0.050 ^a	0.55 ± 0.059 ^a	0.49 ± 0.053 ^a
假手术组	18	0.39 ± 0.047	0.37 ± 0.053	0.38 ± 0.058	0.33 ± 0.041	0.31 ± 0.038	0.34 ± 0.043

注:与假手术组相同时间点比较,^a $P < 0.05$;与安慰刺激组相同时间点相比,^b $P < 0.05$

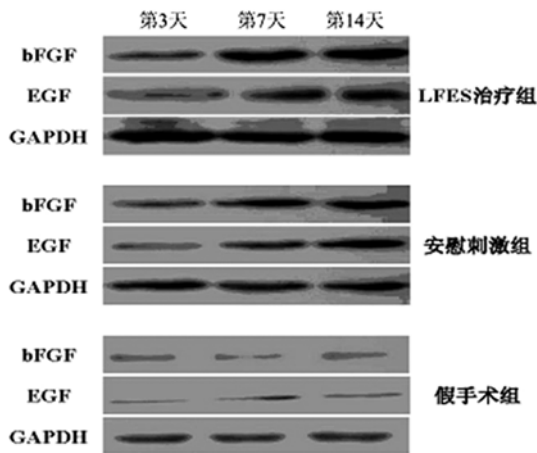
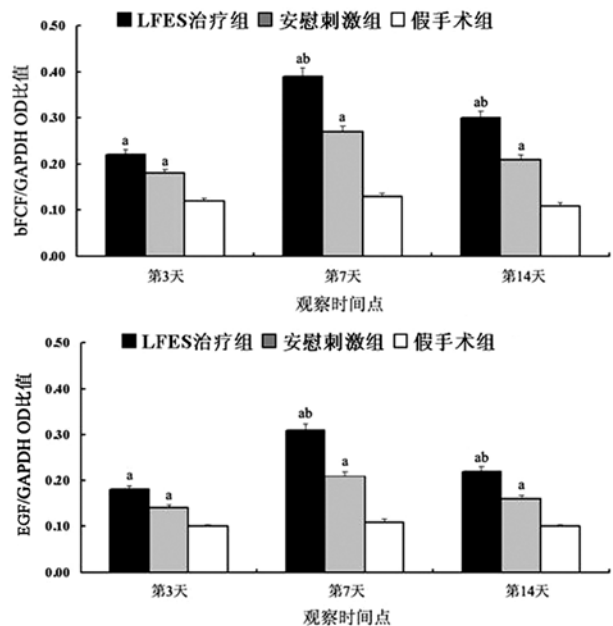
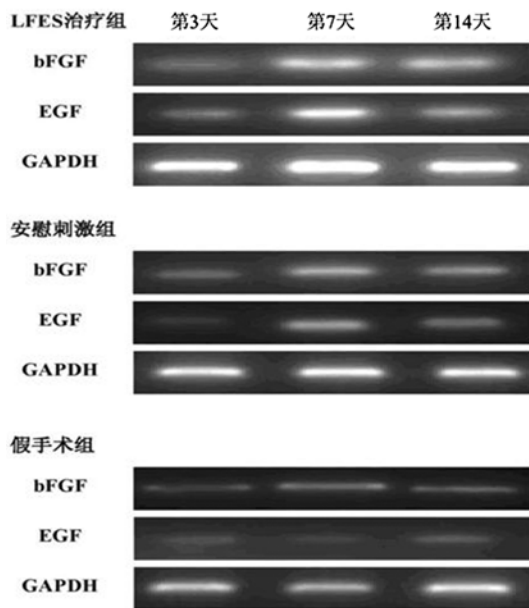


图 2 各组不同观察时间点 bFGF、EGF 总蛋白的表达量

第 7 天时进一步升高,与安慰刺激组和假手术组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),在治疗第 14 天 mRNA 表达量较第 7 天略有下降,但仍高于安慰刺激组和假手术组($P < 0.05$),见图 3。

讨 论

LFES 是脑卒中康复治疗的重要措施之一,也是循证医学证据支持有效的一种康复治疗手段^[21],探讨其作用机制对于指导 LFES 的临床应用具有重要意义。大鼠脑内 NSC 主要位于 SGZ 和 SVZ,大多数在生理状态下保持低水平增殖并不断更新^[12, 22];在缺血损伤等病理状态下,这些干细胞可以增殖、迁移和分化,部分增殖的 NSC 分化为神经元,参与神经重建,显示出神经系统损伤后自我修复的潜在能力,现已证实缺血后产



注:与假手术组相同时间点比较,^a $P < 0.05$;与安慰刺激组相同时间点相比,^b $P < 0.05$

图 3 各组不同观察时间点 bFGF、EGF 的 mRNA 表达量

生的神经生长因子是促使内源性 NSC 变化的强烈诱导因素之一^[2, 23-27]。在激活内源性 NSC 的多种因素中, 细胞生长因子的作用尤为突出^[28]。bFGF、EGF 作为最重要的细胞生长因子, 已经被证实是促进 NSC 增殖最为重要的影响因子^[29-30], bFGF 促进 NSC 变化的作用呈现出浓度相关性并在 NSC 增殖早期发挥作用, 而 EGF 主要在 NSC 增殖后期发挥作用^[31]。

一、LFES 治疗促进 NSC 的增殖

巢蛋白属于类中间丝, 其功能与维持原始细胞特殊的形态、参与细胞迁移等有关, 巢蛋白在干细胞增殖旺盛阶段出现并大量表达, 目前已成为识别 NSC 的重要标志性蛋白^[32]。本实验结果显示, 局灶性脑梗死后, LFES 治疗组和安慰刺激组大鼠梗死侧脑组织 SGZ 和 SVZ 的巢蛋白阳性细胞数在治疗后第 3 天增多, 第 7 天达到峰值, 第 14 天有所下降, 这与已往大多数文献的结论相符^[22, 32-34]。在各观察时间点安慰刺激组与假手术组比较, SGZ 和 SVZ 巢蛋白阳性细胞数差异均有统计学意义, 说明缺血本身就是一个刺激脑内源性 NSC 增殖的因素, 其机制可能是脑梗死后局部存在可以促进 NSC 原位增殖的信号物质、神经生长因子或诱导 NSC 迁移和趋向的因子, 并且损伤局部的微环境适宜新生细胞的增殖^[26, 33, 35]。在治疗第 7 天和第 14 天, LFES 治疗组 SGZ 和 SVZ 巢蛋白阳性细胞数与安慰刺激组比较差异有统计学意义, 说明 LFES 在缺血情况下能进一步促进内源性 NSC 的增殖, 其机制可能为: LFES 可增加被刺激肌群及其相应关节的本体感觉输入, 增强被刺激肌群的收缩强度, 促进瘫痪侧肢体的强制性、重复性使用; LFES 可通过依赖性、可塑性和长时程增强等方式促进神经功能恢复; LFES 可通过神经传导通路刺激脑梗死边缘区功能尚存的星形胶质细胞或神经元并激发其活性, 重建与周围神经元的信号网络, 使脑内侧枝循环开放, 脑组织细胞供血供氧能力增强、代谢加强, 从而促进梗死灶周围星形胶质细胞增生, 对梗死后脑组织起到保护作用等^[22-23, 26, 33]。

二、LFES 治疗增加脑梗死侧 bFGF、EGF 蛋白和 mRNA 的表达量

本研究结果显示, 急性脑梗死后 LFES 治疗第 7 天和第 14 天, LFES 治疗组梗死侧脑组织 bFGF、EGF 蛋白和 mRNA 的表达量与假手术组比较, 差异有统计学意义, 这与巢蛋白阳性细胞数的变化一致, 由此推测 LFES 可能是通过提高梗死侧脑组织的 bFGF、EGF 含量来发挥促进 NSC 增殖的作用。

本研究还发现, LFES 治疗组与安慰刺激组比较, 在治疗第 3 天 bFGF、EGF 蛋白与 mRNA 的表达量和巢蛋白阳性细胞数差异无统计学意义, 而在治疗第 7 天和第 14 天比较则差异有统计学意义, 说明 LFES 促进

神经发生的作用在缺血发生后的早期并不明显, 而在治疗后期效果明显。这种现象可能与以下因素有关: 在 LFES 治疗第 3 天大鼠脑梗死仍处于急性期, 病理生理状态尚不稳定; LFES 治疗时间过短 (仅 3 d), 其促进 NSC 增殖的作用还未显现。上述结果提示在临床上应用 LFES 治疗时必须考虑到治疗的介入时机和治疗持续时间的问题。

三、LFES 治疗改善大鼠偏瘫侧肢体行为学功能

网屏试验结果显示, LFES 治疗组和安慰刺激组在第 14 天得分比较, 差异有统计学意义, 这与分子水平上观察到的各组脑组织 bFGF、EGF 表达量和巢蛋白阳性细胞数变化基本相符。我们认为 LFES 治疗可能首先改变大鼠脑缺血区域局部神经再生微环境, 再表现出大鼠宏观的行为学功能改变, 这一方面证明了 LFES 治疗有助于缺血性脑损伤后偏瘫侧肢体运动功能的恢复, 另一方面也说明发挥 LFES 的治疗作用需要一定的时间。

综上所述, LFES 治疗可以提高急性脑梗死大鼠脑部 bFGF、EGF 的表达, 促进内源性 NSC 的增殖, 从而改善偏瘫侧肢体的行为学运动功能, 增强脑的可塑性。本研究仅观察了 LFES 治疗后 14 d 内的神经行为学和微观分子变化, 其长期疗效和机制, 如延长观察时间至 28 d, 对于研究 LFES 治疗效果的维持具有重要意义, 还有待进一步探讨。

参 考 文 献

- [1] 杨楠, 郑利群. 中西医结合卒中单元治疗缺血性脑卒中的成本-效果分析. 中华中医药学刊, 2009, 27: 1331-1333.
- [2] Minger SL, Ekonomou A, Carta EM, et al. Endogenous neurogenesis in the human brain following cerebral infarction. *Regen Med*, 2007, 2: 69-74.
- [3] Yang WM, Shim KJ, Choi MJ, et al. Novel effects of *Nelumbo nucifera* rhizome extract on memory and neurogenesis in the dentate gyrus of the rat hippocampus. *Neurosci Lett*, 2008, 443: 104-107.
- [4] Krutulyte G, Kimtys A, Krisciūnas A. The effectiveness of physical therapy methods (Bobath and motor relearning program) in rehabilitation of stroke patients. *Medicina (Kaunas)*, 2003, 39: 889-895.
- [5] Page SJ, Levine P, Leonard A, et al. Modified constraint-induced therapy in chronic stroke: results of a single blinded randomized controlled trial. *Phys Ther*, 2008, 88: 333-340.
- [6] Lim KB, Lee HJ, Lim SS, et al. Neuromuscular electrical and thermal-tactile stimulation for dysphagia caused by stroke: a randomized controlled trial. *J Rehabil Med*, 2009, 41: 174-178.
- [7] Yan T, Hui-Chan CW, Li LS. Functional electrical stimulation improves motor recovery of the lower extremity and walking ability of subjects with first acute stroke: a randomized, placebo-controlled trial. *Stroke*, 2005, 36: 80-85.
- [8] 燕铁斌, 许云影, 李常威. 功能性电刺激改善急性脑卒中患者肢体功能的随机对照研究. 中华医学杂志, 2006, 86: 2627-2631.
- [9] Tong RK, Ng MF, Li LS. Effectiveness of gait training using an electro-

- mechanical gait trainer, with and without functional electric stimulation in subacute stroke: a randomized controlled trial. *Arch Phys Med Rehabil*, 2006, 87:1298-1304.
- [10] Kottink AI, Hermens HJ, Nene AV, et al. A randomized controlled trial of an implantable 2-channel peroneal nerve stimulator on walking speed and activity in poststroke hemiplegia. *Arch Phys Med Rehabil*, 2007, 88:971-978.
- [11] 郭友华, 燕铁斌, Hui-Chan CWY. 低频电刺激治疗卒中中偏瘫的神经机制研究进展. *中国康复医学杂志*, 2005, 20:156-158.
- [12] Peckham PH, Knutson JS. Functional electrical stimulation for neuromuscular applications. *Annu Rev Biomed Eng*, 2005, 7:327-360.
- [13] Chan MK, Tong RK, Chung KY. Bilateral upper limb training with functional electric stimulation in patients with chronic stroke. *Neurorehabil Neural Repair*, 2009, 23:357-365.
- [14] 游国清, 燕铁斌, Christina WH. 功能性电刺激改善卒中早期患者偏瘫下肢功能的随机对照研究. *中国康复医学杂志*, 2007, 22:867-870.
- [15] Chae J, Sheffler L, Knutson J. Neuromuscular electrical stimulation for motor restoration in hemiplegia. *Top Stroke Rehabil*, 2008, 15:412-426.
- [16] 金冬梅, 庄志强, 燕铁斌, 等. 功能性电刺激治疗对急性脑梗死大鼠运动功能和缺血半影区微管相关蛋白-2 表达的影响. *中国康复医学杂志*, 2009, 24:505-508.
- [17] 彭源, 燕铁斌, 金冬梅, 等. 功能性电刺激对急性缺血性脑梗死性大鼠运动功能及脑内胶质酸性纤维蛋白表达的影响. *中华物理医学与康复杂志*, 2009, 31:655-658.
- [18] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*, 1989, 20:84-91.
- [19] Marin R, Williams A, Hale S, et al. The effect of voluntary exercise exposure on histological and neurobehavioral outcomes after ischemic brain injury in the rat. *Physiol Behav*, 2003, 80:167-175.
- [20] Leung LY, Tong KY, Zhang SM, et al. Neurochemical effects of exercise and neuromuscular electrical stimulation on brain after stroke: a microdialysis study using rat model. *Neurosci Lett*, 2006, 397:135-139.
- [21] Hara Y. Neurorehabilitation with new functional electrical stimulation for hemiparetic upper extremity in stroke patients. *J Nippon Med Sch*, 2008, 75:4-14.
- [22] Rossella G, Angela G, Luca B. Neural stem cells. *Circ Res*, 2003, 92:598-608.
- [23] Goulsd E, Gross CG. Neurogenesis in adult mammals: some progress and problems. *J Neurosci*, 2002, 22:619-623.
- [24] Yamashita T, Ninomiya M, Hernández Acosta P, et al. Subventricular zone-derived neuroblasts migrate and differentiate into mature neurons in the post-stroke adult striatum. *J Neurosci*, 2006, 26:6627-6636.
- [25] Yan YP, Sailor KA, Vemuganti R, et al. Insulin-like growth factor-I is an endogenous mediator of focal ischemia-induced neural progenitor proliferation. *Eur J Neurosci*, 2006, 24:45-54.
- [26] Komitova M, Mattsson B, Johansson BB, et al. Enriched environment increases neural stem/progenitor cell proliferation and neurogenesis in the subventricular zone of stroke-lesioned adult rats. *Stroke*, 2005, 36:1278-1282.
- [27] Thored P, Arvidsson A, Cacci E, et al. Persistent production of neurons from adult brain stem cells during recovery after stroke. *Stem Cells*, 2006, 24:739-747.
- [28] Sugiura S, Kitagawa K, Tanaka S, et al. Adenovirus mediated gene transfer of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor enhances neurogenesis and angiogenesis after focal cerebral ischemia in rats. *Stroke*, 2005, 36:859-864.
- [29] Gritti A, Parati EA, Cova L, et al. Multipotential stem cells from the adult mouse brain proliferate and self-renew in response to basic fibroblast growth factor. *J Neurosci*, 1996, 16:1091-1100.
- [30] Palmer TD, Markakis EA, Willhoite AR, et al. Fibroblast growth factor-2 activates a latent neurogenic program in neural stem cells from diverse regions of the adult CNS. *J Neurosci*, 1999, 19:8487-8497.
- [31] Leker RR, Soldner F, Velasco I, et al. Long-lasting regeneration after ischemia in the cerebral cortex. *Stroke*, 2007, 38:153-161.
- [32] 陆敏, 张苏明, 常立英, 等. 常规和强化运动训练对脑缺血再灌注大鼠海马齿状回区 nestin 表达的影响. *中国康复医学杂志*, 2008, 23:986-989.
- [33] Liu XS, Zhang ZG, Zhang RL, et al. Stroke induces gene profile changes associated with neurogenesis and angiogenesis in adult subventricular zone progenitor cells. *Cereb Blood Flow Metab*, 2007, 27:564-574.
- [34] Briones TL, Suh E, Jozsa L, et al. Changes in number of synapses and mitochondria in presynaptic terminals in the dentate gyrus following cerebral ischemia and rehabilitation training. *Brain Res*, 2005, 1033:51-57.
- [35] Briones TL, Woods J, Wadowska M, et al. Astrocytic changes in the hippocampus and functional recovery after cerebral ischemia are facilitated by rehabilitation training. *Behav Brain Res*, 2006, 171:17-25.

(修回日期:2010-08-10)

(本文编辑:吴倩)

本刊办刊方向:

立足现实; ; 关注前沿; ; 贴近读者; ; 追求卓越