

功能性电刺激对急性脑梗死大鼠运动功能及室管膜下区内源性神经干细胞的影响

刘慧华 燕铁斌 谭志梅 何晓阔

【摘要】目的 观察不同时间点功能性电刺激(FES)对急性脑梗死大鼠神经功能和室管膜下区(SVZ)内源性神经干细胞增殖、迁移及分化的影响。**方法** 采用大脑中动脉阻塞(MCAO)法制作急性脑梗死大鼠模型 212 只,其中 128 只大鼠符合入选标准,最终 108 只完成实验。将这 108 只大鼠按随机数字表法分为对照组、假刺激组和 FES 组,每组 36 只,每组再按治疗时间的不同分为治疗 1、3、7 和 14 d 四个亚组,每亚组 9 只大鼠。术后第 3 天开始以表面电极刺激瘫痪侧前肢,治疗强度(约 4~5 mA)以引起瘫痪侧出现伸腕伸指动作为准,每日 1 次,每次治疗 15 min。分别于治疗前和治疗各时间点,采用改良神经功能缺损评分(mNSS)法评定各组大鼠神经功能变化情况;采用免疫组织荧光化学法检测缺血侧脑组织 SVZ 的 BrdU⁺/GFAP⁺、BrdU⁺/DCX⁺、BrdU⁺/NeuN⁺ 阳性细胞表达的动态改变。**结果** 治疗第 7 天和第 14 天,FES 组的 mNSS 评分与其余 2 组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);治疗第 14 天,单独行运动功能项目的评分比较,FES 组的评分与其余 2 组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);FES 组大鼠梗死侧 SVZ 的 BrdU⁺ 细胞数目在 FES 治疗第 7 天达到高峰;FES 组 BrdU⁺/GFAP⁺ 阳性细胞数目表达在治疗第 7 天和第 14 天分别与假刺激组和对照组比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$);BrdU⁺/DCX⁺ 细胞数目随着时间延长增加,在治疗第 14 天时 FES 组阳性细胞数目均高于假刺激组和对照组($P < 0.05$);BrdU⁺/NeuN⁺ 仅在治疗第 14 天时有少量表达,组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** FES 治疗能够改善急性脑梗死大鼠神经功能,促进 SVZ 神经干细胞的增殖和分化。

【关键词】 电刺激疗法; 脑梗死; 功能性电刺激; 神经干细胞; 室管膜下区

The effects of functional electrical stimulation on motor function and on the proliferation, migration and differentiation of neural stem cells in the subventricular zone Liu Huihua^{*}, Yan Tiebin, Tan Zhimei, He Xiaokuo. ^{*} Department of Rehabilitation Medicine, Sun Yat-sen Memorial Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China

Corresponding author: Yan Tiebin, Email: dr.yan@126.com

【Abstract】Objective To investigate the effects of functional electrical stimulation (FES) on motor function and on the expression, proliferation, migration and differentiation of endogenous neural stem cells in the subventricular zone (SVZ) after cerebral ischemia. **Methods** Middle cerebral artery occlusion (MCAO) was used to induce a model of cerebral ischemia in 108 rats using the modified Zea-Longa method of intraluminal filament occlusion. They were then randomly divided into an FES group, a placebo stimulation group and a control group with 36 cases in each. Superficial FES electrodes were pasted on the paralyzed forelimbs of the rats in the first two groups, though FES treatment was administered only to the FES group beginning on the 3rd day after the MCAO operation. The stimulation was designed to produce extension of the wrist and digits of the paralyzed forelimb. Before, and after 1, 3, 7 and 14 days of the treatment, the neurological deficit was evaluated using modified neurological severity scoring (mNSS). BrdU⁺/GFAP⁺, BrdU⁺/DCX⁺ and BrdU⁺/NeuN⁺ cells in the SVZ were detected using immunofluorescence technique. **Results** After 7 and 14 days of treatment, the average motor function of the rats in the FES group had improved significantly when compared with the averages of the other two groups. Compared with the other two groups, the average number of BrdU⁺/GFAP⁺ positive cells in the ischemic SVZ was also significantly greater in the FES group after 7 and 14 days of treatment. After 14 days, BrdU⁺/Dcx⁺ positive cells in the FES group had also increased significantly more,

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2015.09.002

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30973166);国家自然科学基金资助项目(30772304)

作者单位:510120 广州,中山大学孙逸仙纪念医院康复科(刘慧华、燕铁斌、谭志梅、何晓阔);郑州大学附属第一医院康复科(谭志梅);湖北省十堰市太和医院康复科(何晓阔)

通信作者:燕铁斌,Email:dr.yan@126.com

but only a few BrdU⁺/NeuN⁺ cells had appeared in any of the three groups. **Conclusion** FES can improve motor function after cerebral ischemia, and promote proliferation and differentiation of neural stem cells in the SVZ.

【Key words】 Electrical stimulation; Brain ischemia; Functional electrical stimulation; Neural stem cells; Subventricular zone

脑损伤后,机体受中枢神经系统内细胞微环境变化及基因转录的调控,内源性神经干细胞(neural stem cells, NSCs)被迅速激活并增殖;在一定趋化因子的作用下,增殖的 NSCs 可向损伤部位迁移并分化为相应的功能细胞^[1]。然而,损伤后内源性 NSCs 的增殖和迁移分化具有一定的时间和空间限制,由此导致内源性 NSCs 在功能代偿方面的有限性和不足^[2-3]。文献报道,电刺激对内源性 NSCs 增殖分化有直接或间接的促进作用^[4]。有临床研究已证实功能性电刺激(functional electrical stimulation, FES)可以改善脑卒中急性期和恢复期患者的肢体运动功能^[5-6],相关基础研究亦已证实,FES 可促进急性脑梗死大鼠脑内突触的可塑性改变,促进损伤侧皮质、侧脑室室管膜下区(subventricular zone, SVZ)等部位 Nestin 阳性细胞的表达^[7-9],由此说明 FES 对损伤大脑内源性 NSCs 行为具有一定的调节作用,但其对内源性 NSCs 的增殖、迁移及分化是否有影响,目前尚不清楚。本研究在已有文献报道支持及前期研究基础上,进一步验证 FES 是否可通过影响脑梗死大鼠内源性 NSCs 聚集区域之一 SVZ 的干细胞行为,进而促进大鼠神经功能的恢复。

材料与方法

一、实验动物模型制作及分组

选取清洁级(SPF 级)成年雄性 Sprague-Dawley (SD)大鼠 212 只,体重 250 ~ 300 g,中山大学实验动物中心提供[许可证号 SYXK(粤)2007-0081],参照改良的 Zea-Longa 线栓法^[10]制备右侧大脑中动脉阻塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型。方法如下:大鼠禁食 6 h 后,以 10% 水合氯醛(350 mg/kg 体重)腹腔注射麻醉,仰卧位置于手术台上,四肢及头部固定好,剪去颈部鼠毛,碘伏消毒手术区,沿气管右侧切开颈部皮肤,钝性分离皮下筋膜及甲状腺,注意不要损伤甲状腺组织及血管;沿右侧胸锁乳突肌肌腱向下分离,显微血管镊小心分离大鼠右侧颈总动脉(common carotid artery, CCA)、颈外动脉(external carotid artery, ECA)及颈内动脉(internal carotid artery, ICA);结扎 ECA 主干和 CCA 近心端,眼科显微剪在 CCA 主干距分叉约 1 cm 处剪一“V”字形切口;将栓线[购于北京沙东生物技术有限公司,线头直径(0.36 ± 0.02) mm,直径 0.26 mm,长 40 mm]从 CCA 经 ICA 送入,确认线栓自 CCA 分叉处进入 ICA 约 18 ~ 20 mm,阻断

MCA 所有血流来源;结扎 ICA,甲状腺复位,关闭并缝合皮肤切口,碘伏消毒缝合伤口;术后以 0.9% 的氯化钠溶液 2.0 ml 一次性注入大鼠腹腔,以补充术中术后的体液流失;电热毯和灯照保暖,维持肛温在 36 ~ 37 ℃。

MCAO 模型完成后 2 ~ 4 h,大鼠恢复清醒后,采用改良的 Bederson 神经功能评分标准^[11]对模型进行神经功能初步评分。造模成功标准:动物出现左眼的 Horner 征,爬行时出现前肢屈曲或向左侧转圈(追尾现象),即神经功能评分 2 ~ 3 分,表明 MCAO 模型大鼠制作成功。

将造模成功并完成本实验研究的 108 只大鼠按随机数字表法分为 FES 组、假刺激组和对照组,每组 36 只。每组再按治疗时间的不同分为治疗 1、3、7 和 14 d 四个亚组,每亚组 9 只大鼠。本实验保证各亚组大鼠笼内环境及饲养条件相同。

二、治疗方法

FES 治疗仪(NeuroTrac™ Continnence,英国 Verity Medical 公司)术后第 3 天开始治疗,FES 组大鼠给予 FES 治疗,每日治疗 1 次,每次 15 min,治疗 1、3、7 和 14 d 四个亚组分别给予 FES 治疗 1、3、7、14 次;FES 治疗仪的治疗电极夹附于事先已确定好的刺激点上,刺激患侧前肢产生肌肉收缩,出现伸腕伸指动作;FES 刺激模式及参数^[12]:波形采用双向对称方波,频率 100 Hz,脉宽 300 μs,波升:波降 = 1 s:1 s,电流强度 4 ~ 6 mA(出现伸腕伸指动作为准),通断比为 3 s:5 s。假刺激组仅连接电极,但不给予电流刺激。对照组大鼠仅常规饲养,不给予任何处理。

三、大鼠行为学功能评定

分别于治疗第 1、3、7 和 14 天,采用改良神经功能缺损评分(modified neurological severity score, mNSS)量表^[13]对各亚组大鼠进行行为学评定。评定项目包括运动实验(包括提尾实验和行走实验两部分,主要评定大鼠的运动功能)、感觉实验(包括放置实验和本体感觉实验两部分,主要评定大鼠的感觉功能)、平衡木实验以及反射丧失和不正常运动实验(包括耳廓反射、角膜反射、惊恐反射)。每次均由 2 位专业实验人员进行盲法评定,取评分的平均值进行统计学分析。

四、实验方法

1. 药物注射及脑组织取材:5-溴脱氧核苷尿嘧啶(bromodeoxyuridine, BrdU)BrdU 粉剂以 40 ℃生理盐水

按照 5 mg/ml 的质量体积比进行配置,配置过程中严格避光无菌操作^[14];大鼠脑梗死后第 3 天(开始治疗的第 1 天)开始 BrdU 注射(50 mg/kg),治疗第 1 天腹腔注射 2 次,中间间隔 4 h;以后隔天注射。

分别于治疗第 1、3、7 和 14 天,各亚组大鼠 BrdU 注射后以 10% 水合氯醛(350 mg/kg 体重)行腹腔麻醉,开胸后暴露心脏,剪开右心耳,顺次以 4 ℃生理盐水 200 ml 及 4% 多聚甲醛溶液(pH=7.4)200~250 ml 经左心室灌注,观察大鼠四肢灌注后是否已经僵硬;灌注完毕后取脑,龙胆紫标注前囟位置;大脑稍冷冻后放入磨具中,取前囟前 2.0 mm 至前囟后 2.0 mm(相当于大鼠 SVZ)冠状切;放入 4% 多聚甲醛溶液中,后固定过夜,继而以 15% 蔗糖脱水至脑组织沉底后,改用 30% 蔗糖脱水至脑组织沉底后 4 ℃保存,准备制备冰冻切片。

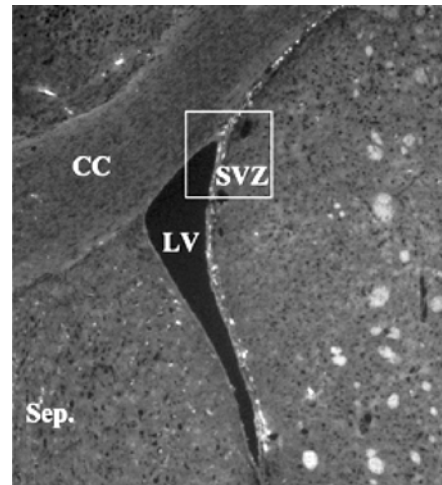
利用中山大学北校区公共试验平台的冰冻切片机切片(Thermo Fisher Scientific 公司)。30% 蔗糖中已脱水完毕的脑组织滴加冰冻切片包埋剂(optimum cutting temperature compound,OCT 包埋剂)完全包埋,切片厚度 10 μm,切片每 3 张取一张;切片组织贴附于多聚赖氨酸包被的载玻片上,37 ℃风干,切片盒内密封保存于 -30 ℃冰箱。

2. 免疫荧光双重标记染色:①取出脑组织切片,室温风干 15 min 后,用免疫组化笔在脑切片周围画圈,0.01 mol/L 的磷酸盐吐温缓冲液(phosphate buffered saline with tween-2,PBST)漂洗 10 min × 1;②取约 200 ml 柠檬酸缓冲液,微波高火档 3 min 至沸腾后,置入玻片,调至最低档加热 10 min 后取出,自然冷却至室温;③0.01 mol/L 的 PBST 漂洗 10 min 1 次,滴加 2 N 的盐酸(hydrochloric acid, HCl),37 ℃ 孵育 30 min;④0.01 mol/L 的 PBST 漂洗 10 min 1 次,滴加正常山羊血清(normal goat serum,NGS)和 0.3% TritonX-100,室温孵育 30~60 min;⑤直接滴加一定浓度的一抗,4 摄氏度孵育过夜;⑥0.01 mol/L 的 PBST 漂洗 5 min 3 次,滴加一定浓度与一抗匹配的荧光二抗,避光室温 60 min,具体匹配详见表 1;⑦重复以上步骤④~⑥,标记第二个一抗及二抗;⑧(可选)DAPI 复染核;⑨

0.01 mol/L 的 PBST 漂洗 5 min 3 次,以抗荧光衰减封片剂封片(25 μl 即可),镜下观察。

本次免疫荧光选用的细胞标记物分别为胶质纤维酸性蛋白(glia fibrillary acidic protein,GFAP)、微管相关蛋白 doublecortin(DCX)、神经元核心抗原(neuronal nuclear antigen,NeuN)和巢蛋白(Nestin)。

3. 图像处理:使用 Olympus-BX51WI 研究级正置荧光显微镜(日本 Nikon 公司)及 Axio Observer Z1 全自动倒置荧光显微镜(德国 Carl Zeiss 公司)拍摄荧光图片,主要拍摄部位见图 1;采用计算机图像分析系统软件 Image-Pro Plus Version 6.0(IPP6.0)进行图片合成处理。每只大鼠取 5 帧非连续冰冻切片(每隔 5 张取 1 张切片),400 倍放大倍数的高倍镜视野(high power-field,HP)和相同的光亮程度下观察,随机取 5 个非重叠视野进行双标阳性细胞数计数。



注:SVZ 室管膜下区,LV 侧脑室,CC 胼胝体,Sep. 脑正中

图 1 荧光显微镜主要观察及拍摄部位

五、统计学方法

使用 SPSS 15.0 版统计学软件对数据进行统计学处理,统计数据以($\bar{x} \pm s$)来表示,对所有数值行方差齐性分析及正态性分布检验;采用单因素方差分析对组间相同时间点评分进行比较,用 LSD 法及 Bonferroni 法进行两两比较; $P < 0.05$ 则认为差异有统计学意义。

表 1 荧光双标抗体匹配

| 荧光双标抗体组合 | 双标抗体 | 一抗 | | | 二抗 | | |
|-------------|--------|----------|--------|------|-------------|-------|------|
| | | 种属 | 浓度 | 孵育时间 | 种属 | 浓度 | 孵育时间 |
| BrdU/Nestin | BrdU | 绵羊多抗 IgG | 1/400 | 20 h | 驴抗绵羊 AF594 | 1/200 | 1 h |
| | Nestin | 小鼠单抗 IgG | 1/200 | 24 h | 山羊抗小鼠 AF488 | 1/200 | 1 h |
| BrdU/DCX | BrdU | 小鼠单抗 IgG | 1/400 | 20 h | 山羊抗小鼠 AF555 | 1/200 | 1 h |
| | DCX | 兔多抗 IgG | 1/400 | 24 h | 山羊抗兔 AF488 | 1/200 | 1 h |
| BrdU/NeuN | BrdU | 绵羊多抗 IgG | 1/400 | 20 h | 驴抗绵羊 AF594 | 1/200 | 1 h |
| | NeuN | 小鼠单抗 IgG | 1/100 | 20 h | 山羊抗小鼠 AF488 | 1/200 | 1 h |
| BrdU/GFAP | BrdU | 小鼠单抗 IgG | 1/400 | 20 h | 山羊抗小鼠 AF555 | 1/200 | 1 h |
| | GFAP | 兔多抗 IgG | 1/1000 | 18 h | 山羊抗兔 AF488 | 1/200 | 1 h |

表 2 3 组大鼠不同时间点 mNSS 量表总评分比较(分, $\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 只数 | 治疗前 | 治疗第 1 天 | 治疗第 3 天 | 治疗第 7 天 | 治疗第 14 天 |
|-------|----|-----------|-----------|-----------|------------------------|------------------------|
| 对照组 | 36 | 9.2 ± 2.4 | 8.9 ± 1.0 | 8.3 ± 2.1 | 7.4 ± 1.9 ^a | 6.5 ± 1.3 ^a |
| 假刺激组 | 36 | 9.3 ± 1.3 | 8.9 ± 1.8 | 8.2 ± 1.8 | 7.6 ± 1.0 ^a | 6.0 ± 1.0 ^a |
| FES 组 | 36 | 9.2 ± 2.1 | 9.0 ± 2.0 | 7.8 ± 1.5 | 6.0 ± 1.7 | 3.5 ± 1.5 |

注:与 FES 组同时时间点比较,^a $P < 0.05$

表 3 3 组大鼠不同时间点 mNSS 量表运动实验分项的评分比较(分, $\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 只数 | 治疗前 | 治疗第 1 天 | 治疗第 3 天 | 治疗第 7 天 | 治疗第 14 天 |
|-------|----|-----------|-----------|-----------|-----------|------------------------|
| 对照组 | 36 | 4.2 ± 1.4 | 4.1 ± 1.5 | 4.0 ± 1.1 | 3.8 ± 1.8 | 3.5 ± 2.1 ^a |
| 假刺激组 | 36 | 4.3 ± 1.3 | 4.1 ± 1.7 | 4.1 ± 1.5 | 3.9 ± 2.3 | 3.4 ± 1.5 ^a |
| FES 组 | 36 | 4.2 ± 1.1 | 4.2 ± 2.0 | 3.8 ± 1.5 | 2.7 ± 1.9 | 1.3 ± 1.3 |

注:与 FES 组同时时间点比较,^a $P < 0.05$

结 果

一、各组脑梗死大鼠各时间点 mNSS 评定

造模成功 SD 大鼠出现不同程度的神经功能缺损症状,分为 3 组后分别给予不同的治疗手段,治疗前 mNSS 量表总评分组间差异无明显统计学意义($P > 0.05$),组间具有可比性;治疗第 1 天和第 3 天,3 组大鼠 mNSS 量表总评分比较,组间差异无统计学意义($P > 0.05$);治疗第 7 天和第 14 天,可见 FES 组评分明显低于其它 2 组,且组间差异有统计学意义($P < 0.05$),详见表 2。

单独进行 mNSS 量表运动实验分项的评分比较,治疗前评分差异无明显统计学意义($P > 0.05$),组间具有可比性;治疗第 1、3 和 7 天,3 组大鼠运动实验分项评分比较,组间差异无统计学意义($P > 0.05$);治疗第 14 天 FES 组运动实验分项评分明显低于其它 2 组,且组间差异有统计学意义($P < 0.05$),详见表 3。

单独进行 mNSS 量表感觉实验分项的评分比较、平衡实验分项的评分比较以及反射丧失和异常运动实验分项的评分比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

二、各组大鼠各时间点脑梗死侧 SVZ 的 BrdU⁺ 及双标阳性细胞数

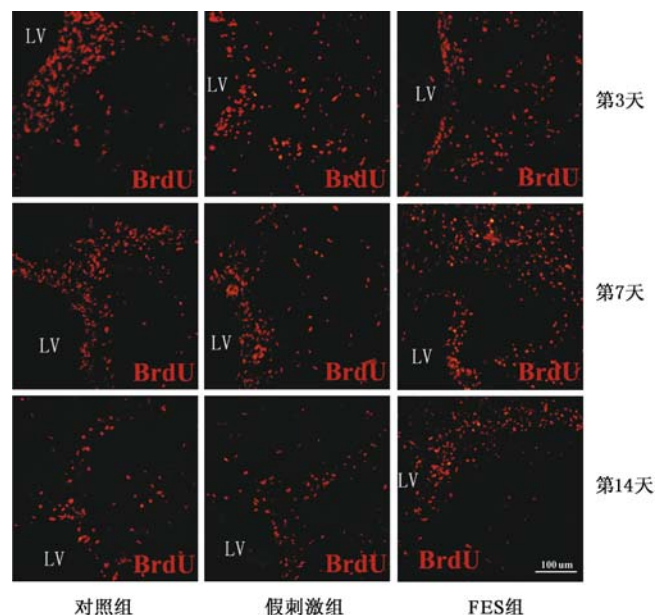
1. BrdU⁺ 细胞数目比较:各组 SVZ 的 BrdU 阳性细胞数在治疗第 3 天时已开始增高,第 7 天时达到增殖高峰,第 14 天时有所下降。治疗第 1 天,FES 组 BrdU 阳性细胞数目与其余 2 组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),但治疗第 3、7 和 14 天时,FES 组 BrdU 阳性细胞数目均较对照组和假刺激组增殖细胞数多(图 2),且差异有统计学意义($P < 0.05$),详见表 4。

2. BrdU⁺/GFAP⁺ 双标细胞数目比较:各组 SVZ 的 BrdU⁺/GFAP⁺ 阳性细胞数在治疗第 3 天时已开始增高,第 7 天时达到增殖高峰,第 14 天时已有下降。治疗第 1 天,FES 组 BrdU⁺/GFAP⁺ 阳性细胞数较与其余

表 4 3 组大鼠不同时间点 SVZ 的 BrdU⁺ 及双标阳性细胞数比较(个/HP, $\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 只数 | BrdU ⁺ | BrdU ⁺ /GFAP ⁺ | BrdU ⁺ /DCX ⁺ |
|----------|----|---------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|
| 对照组 | | | | |
| 治疗第 1 天 | 9 | 21.2 ± 6.7 | 15.2 ± 1.2 | 5.4 ± 0.2 |
| 治疗第 3 天 | 9 | 66.2 ± 3.1 ^a | 21.6 ± 5.6 ^a | 10.1 ± 0.6 |
| 治疗第 7 天 | 9 | 100.7 ± 14.5 ^a | 30.2 ± 9.9 ^a | 12.1 ± 0.9 |
| 治疗第 14 天 | 9 | 54.7 ± 8.2 ^a | 23.9 ± 10.1 ^a | 16.5 ± 1.1 ^a |
| 假刺激组 | | | | |
| 治疗第 1 天 | 9 | 21.1 ± 6.2 | 16.3 ± 1.9 | 6.4 ± 1.0 |
| 治疗第 3 天 | 9 | 65.8 ± 5.0 ^a | 19.5 ± 5.6 ^a | 10.6 ± 1.6 |
| 治疗第 7 天 | 9 | 102.5 ± 4.5 ^a | 32.4 ± 10.4 ^a | 12.2 ± 1.4 |
| 治疗第 14 天 | 9 | 51.8 ± 4.8 ^a | 24.8 ± 17.4 ^a | 15.7 ± 1.4 ^a |
| FES 组 | | | | |
| 治疗第 1 天 | 9 | 20.4 ± 9.2 | 15.6 ± 1.7 | 6.7 ± 0.7 |
| 治疗第 3 天 | 9 | 83.1 ± 2.6 | 32.2 ± 2.7 | 11.7 ± 1.7 |
| 治疗第 7 天 | 9 | 120.5 ± 10.6 | 46.7 ± 12.2 | 14.4 ± 1.2 |
| 治疗第 14 天 | 9 | 73.8 ± 7.5 | 32.4 ± 13.4 | 23.8 ± 1.4 |

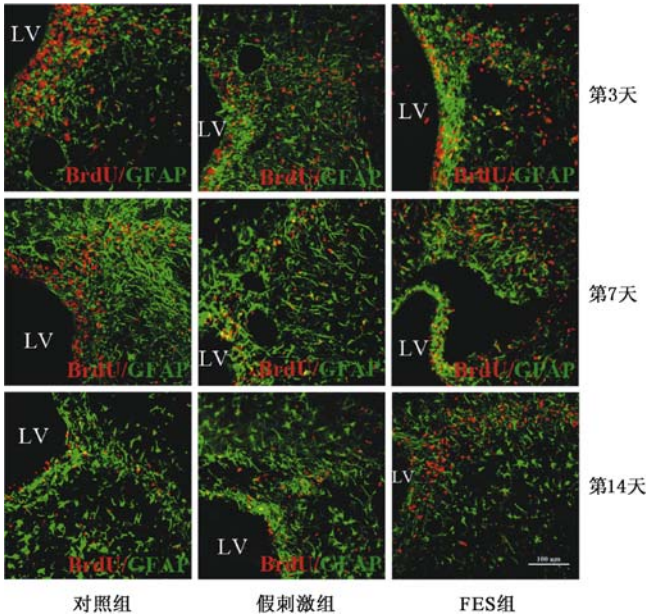
注:与 FES 组同时时间点比较,^a $P < 0.05$



注:红色荧光标记

图 2 各组大鼠治疗不同时间点 SVZ 的 BrdU 表达(免疫荧光染色, ×200)

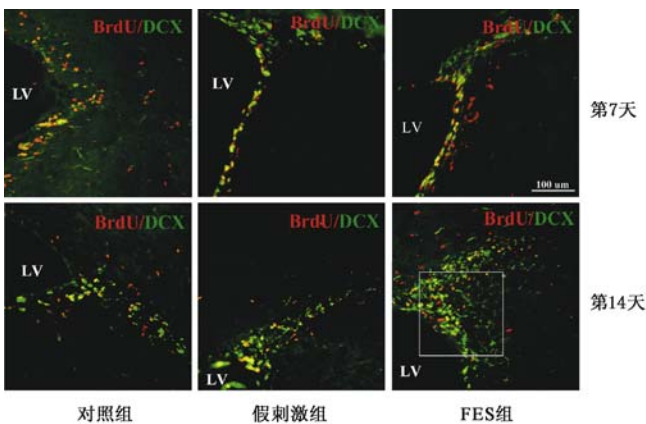
2 组比较,组间差异无统计学意义($P > 0.05$),而在治疗第 3、7 和 14 天时,FES 组的 BrdU⁺/GFAP⁺ 阳性细胞数均较对照组和假刺激组增殖细胞数多(图 3),且组间差异有统计学意义($P < 0.05$),详见表 4。



注:图中红色荧光为 BrdU,绿色荧光为 GFAP

图 3 3 组大鼠治疗不同时间点患侧 SVZ 的 BrdU⁺/GFAP⁺ 表达(免疫荧光染色, ×200)

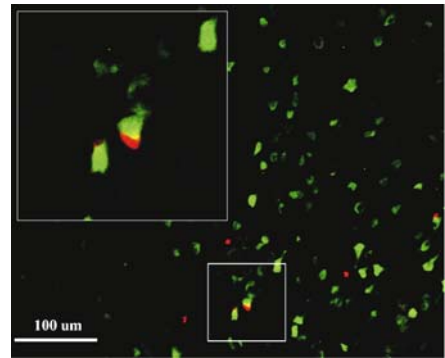
3. BrdU⁺/DCX⁺ 双标细胞数目比较:各组 SVZ 的 BrdU⁺/DCX⁺ 阳性细胞数随时间推移逐渐增高。治疗第 1、3 和 7 天时,FES 组大鼠的 BrdU⁺/DCX⁺ 阳性细胞数与其余 2 组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),治疗第 14 天时,FES 组较对照组和假刺激组的 BrdU⁺/DCX⁺ 细胞数多(图 4),且组间差异有统计学意义($P < 0.05$),详见表 4。



注:红色荧光为 BrdU,绿色荧光为 DCX,白色方框可见更多的 DCX 阳性细胞已向损伤纹状体迁移

图 4 不同时间点患侧 SVZ 的 BrdU⁺/DCX⁺ 表达(免疫荧光染色, ×200)

4. BrdU⁺/NeuN⁺ 双标细胞数目比较:在 FES 组大鼠治疗 14 d 内的各观察时间段内并未见明显的 BrdU⁺/NeuN⁺ 双标细胞,仅在治疗第 14 天时,在缺血侧纹状体及梗死周围皮质可见散在的 BrdU⁺/NeuN⁺ 双标细胞(图 5)。



注:图中红色荧光为 BrdU,绿色荧光为 NeuN

图 5 FES 组大鼠治疗第 14 天大鼠脑梗死周围皮质的 BrdU⁺/NeuN⁺ 双标细胞(免疫荧光染色, ×200)

讨 论

一、FES 治疗对急性脑梗死大鼠行为学的影响

mNSS 属于综合性的评定量表,包括运动(肌力及异常运动模式)、感觉(视觉、触觉及本体感觉)、平衡和反射的评定^[13],被广泛应用于 MCAO 模型大鼠神经功能的评估^[15-16]。不论是干细胞移植的研究还是脑梗死模型的其它研究,mNSS 量表用于神经功能评估不仅能够显示运动功能的改善,亦可体现整体功能的改善状况^[17]。

本研究结果显示,FES 组梗死大鼠 mNSS 量表总体评分在治疗第 7 天和第 14 天的时间点明显低于假刺激组和对照组($P < 0.05$),运动功能单项评估在治疗第 14 天时亦明显低于假刺激组和对照组($P < 0.05$)。这不仅与以前 FES 基础研究的行为学评定结果一致^[7-9],亦与临床急性脑梗死患者 FES 治疗 2~3 周可明显改善患者运动功能的研究报道基本相符^[5-6]。

本研究中,脑梗死后给予 FES 治疗的大鼠,虽然平衡、感觉、反射评估方面也显示出改善的趋势,但差异并无统计学意义($P > 0.05$);对于 3 组实验脑梗死大鼠在感觉、平衡及反射实验项目方面各时间点评分差异无明显统计学意义,究其原因可能为:①本实验采用的 FES 刺激部位为前肢,平衡功能评定更多的是体现整体功能的改善情况,因此实验本身对于改善平衡功能有局限性;②实验初始,模型大鼠的入选标准为 mNSS 的评分为 7~12 分,实验中发现,平衡功能的评分在 4 分及以上,反射实验评分在 2 分及以上的大鼠往往整体评分不符合入选标准,即入选大鼠平衡功能评分一

一般为 2~3 分,反射实验评分 0~1 分,这也限制了平衡功能恢复及异常反射减少的程度变化,使得组间差异不明显;而感觉实验的评分为 0~2 分,由于评分级别不够细致,也很难观察到细微的变化;③观察时间只有 2 周,也进一步限制了观察到功能变化的时间。尽管如此,本研究还是可以从评分结果的图表中观察到 FES 治疗对此 3 项功能的恢复有一定的促进作用;也正是由于 FES 在此 3 项功能的恢复方面具有促进作用,使得 FES 组梗死大鼠 mNSS 量表总体评分在治疗第 7 天时已明显低于假刺激组和对照组($P < 0.05$)。

假刺激组和对照组虽然未给予治疗,但其 mNSS 评分随着时间也有逐步好转。究其原因,一方面与脑梗死后的自然恢复有关;另一方面,本研究并未完全限制假刺激组和对照组脑梗死大鼠的活动,它们仍然可以自由饮水、进食与活动,且大鼠生性好动,这也有利于其肢体功能的逐步恢复。

二、FES 治疗对急性脑梗死大鼠内源性神经干细胞的影响

BrdU 是 NSCs 增殖的标记物,可在细胞分裂的 S 期嵌入细胞核 DNA 内^[18]。DCX 是一种微管相关蛋白,仅在迁移和分化的神经元中表达,可作为迁移中未成熟神经元细胞的标记物^[18]。NeuN 是一种可溶性核蛋白,其免疫反应性在神经元分化成熟后开始出现,因此可以作为成熟神经元的标记蛋白^[18]。GFAP 表达于胞浆,是星形神经胶质细胞的标记物,在 SVZ 亦是神经前体细胞的标记物^[18-19]。

SVZ 是目前公认的成年哺乳动物神经系统中神经干细胞最为集中的部位^[19],已有研究显示 SVZ 至少包含迁移神经祖细胞(A 型细胞)、星形细胞(B 型细胞)、不成熟的前体细胞(C 型细胞)和室管膜细胞(D 型细胞)四种细胞^[20]。其中数量最多的 GFAP 阳性的 B 型细胞,也是诸多学者认为可能存在于 SVZ 的 NSCs;B 型细胞可产生 C 型转运增殖细胞,进而产生 A 型迁移神经祖细胞(DCX 阳性细胞)。生理状态下,SVZ 的 NSCs 长期处于缓慢增殖状态^[21],脑缺血 2~14 d 后 SVZ 增殖细胞显著增多,快速扩增为大量的神经祖细胞,7~10 d 达高峰,并迅速向神经母细胞和不成熟的神经元转化^[21],从 SVZ 到同侧缺血纹状体呈梯度状排列,可深入纹状体约 2 mm。

本研究结果显示,梗死侧 SVZ 的 BrdU 阳性细胞数在治疗第 3 天时已明显增高,第 7 天时达到增殖高峰,第 14 天时有下降(表 4);治疗第 3、7 和 14 天时,FES 组比对照组和假刺激组增殖细胞数明显增多($P < 0.05$);由于 GFAP 阳性细胞在 SVZ 更能代表 NSCs/神经前体细胞^[22],因此本研究行梗死侧 SVZ BrdU⁺/GFAP⁺ 双标荧光染色,其表达在治疗第 3 天时已开始

增高,第 7 天时达到增殖高峰,第 14 天时已有下降;治疗第 3、7 和 14 天时,FES 组亦较其余 2 组增殖细胞数多($P < 0.05$)。各时间点梗死侧脑组织 SVZ 的 NSCs 表达变化均证明缺血本身可刺激脑内源性 NSCs 的增殖,其机制可能是梗死后损伤局部存在可促进 NSCs 原位增殖的信号物质、神经生长因子及诱导 NSCs 迁移分化的因子,使得损伤局部的微环境适宜 NSCs 的增殖分化。FES 有可能刺激了缺血情况下微环境内各种因子的表达变化,进一步促进 NSCs 新生细胞的生长增殖^[23];已有研究显示,FES 治疗可上调梗死侧大脑纹状体及 SVZ 的脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)和碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)表达^[12],而 BDNF 和 bFGF 已被证实可促进 NSCs 增殖分化。

本研究中,各组大鼠 SVZ 的 BrdU⁺/DCX⁺ 阳性细胞数随时间推移逐渐增高,治疗第 14 天时,FES 组比其余 2 组增殖细胞数多,治疗第 14 天的 FES 组可见更多的 DCX 阳性细胞已向损伤的纹状体迁移(图 4);治疗第 3 天时,DCX 阳性细胞呈团状,主要位于 SVZ;治疗第 14 天时,DCX 阳性细胞呈链状迁移状。本研究中,FSE 组大鼠治疗 14 d 内并未见明显的 BrdU⁺/NeuN⁺ 双标细胞,仅在治疗第 14 天时,在缺血侧纹状体及梗死周围皮质发现散在的 BrdU⁺/NeuN⁺ 双标细胞(图 5)。究其原因,主要是因为 SVZ 增殖细胞最终分化表达 NeuN 最少需要 18~20 d,所以本研究的观察期(梗死后 17 d,治疗 14 d)内难以观察到 BrdU⁺/NeuN⁺ 双标阳性细胞。尽管如此,本研究大鼠缺血侧纹状体及梗死周围皮质散在的 BrdU⁺/NeuN⁺ 双标细胞不仅说明梗死后有 NSCs 分化形成新的神经元细胞,也说明了梗死后大脑 NSCs 的增殖分化是多部位的,更加复杂。

综上所述,FES 具有促进内源性 NSCs 增殖、迁移、分化的作用,这与其改善大脑兴奋性,刺激中枢神经系统内部微环境改变等有关。已有研究报道,FES 治疗可上调梗死侧大脑纹状体及 SVZ 的 BDNF 和 FGF 表达,神经营养因子可通过调节与 NSCs 增殖分化相关的信号通路起作用。FES 治疗可促进 SVZ 的 NSCs 的增殖和迁移,而上调梗死侧大脑纹状体及 SVZ 的 BDNF 和 FGF 表达是否促进了与 NSCs 增殖分化相关的信号通路改变还有待于进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Parent JM, Vexler ZS, Gong C, et al. Rat forebrain neurogenesis and striatal neuron replacement after focal stroke[J]. *Ann Neurol*, 2002, 52 (6): 802-813.
- [2] Leker RR, Soldner F, Velasco I, et al. Long-lasting regeneration after ischemia in the cerebral cortex[J]. *Stroke*, 2007, 38 (1): 153-161.

- [3] Joseph D'Ercole A, Ye P. Expanding the mind: insulin-like growth factor I and brain development [J]. *Endocrinology*, 2008, 149 (12): 5958-5962.
- [4] 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 [J]. *Neurosci Lett*, 2006, 397 (1-2): 135-139.
- [5] Lin Z, Yan T. Long-term effectiveness of neuromuscular electrical stimulation for promoting motor recovery of the upper extremity after stroke [J]. *J Rehabil Med*, 2011, 43 (6): 506-510.
- [6] 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 [J]. *Stroke*, 2005, 36 (1): 80-85.
- [7] 郑修元, 李胜活, 燕铁斌, 等. 功能性电刺激对急性脑梗死大鼠神经功能及梗死侧皮层蛋白表达的影响 [J]. *中华物理医学与康复杂志*, 2011, 33 (5): 325-328.
- [8] 向云, 燕铁斌, 庄志强, 等. 功能性电刺激促进急性脑梗死大鼠脑内源性神经干细胞增殖的研究 [J]. *中华神经医学杂志*, 2009, 8 (12): 1197-1202.
- [9] 金冬梅, 庄志强, 燕铁斌, 等. 功能性电刺激对急性脑梗死大鼠运动功能和缺血半影区与镜区突触素表达的影响 [J]. *中国康复医学杂志*, 2009, 24 (12): 1061-1064.
- [10] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20 (1): 84-91.
- [11] Wang CX, Yang Y, Yang T, et al. A focal embolic model of cerebral ischemia in rats: introduction and evaluation [J]. *Brain Res Brain Res Protoc*, 2001, 7 (2): 115-120.
- [12] Ke Z, Yip SP, Li L, et al. The effects of voluntary, involuntary, and forced exercises on brain-derived neurotrophic factor and motor function recovery: a rat brain ischemia model [J]. *PLoS One*, 2011, 6 (2): e16643.
- [13] Jensen MB, Han DY, Sawaf AA, et al. Behavioral outcome measures used for human neural stem cell transplantation in rat stroke models [J]. *Neurol Int*, 2011, 3 (2): 35-39.
- [14] Wojtowicz JM, Kee N. BrdU assay for neurogenesis in rodents [J]. *Nat Protoc*, 2006, 1 (3): 1399-1405.
- [15] Zhang P, Li J, Liu Y, et al. Human neural stem cell transplantation attenuates apoptosis and improves neurological functions after cerebral ischemia in rats [J]. *Acta Anaesthesiol Scand*, 2009, 53 (9): 1184-1191.
- [16] Kim SS, Yoo SW, Park TS, et al. Neural induction with neurogenin1 increases the therapeutic effects of mesenchymal stem cells in the ischemic brain [J]. *Stem Cells*, 2008, 26 (9): 2217-2228.
- [17] Lee TH, Yoon JG. Intracerebral transplantation of human adipose tissue stromal cells after middle cerebral artery occlusion in rats [J]. *J Clin Neurosci*, 2008, 15 (8): 907-912.
- [18] Okano H, Sawamoto K. Neural stem cells: involvement in adult neurogenesis and CNS repair [J]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2008, 363 (1500): 2111-2122.
- [19] Gould E, Gross CG. Neurogenesis in adult mammals: some progress and problems [J]. *J Neurosci*, 2002, 22 (3): 619-623.
- [20] Doetsch F, Caillé I, Lim DA, et al. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain [J]. *Cell*, 1999, 97 (6): 703-716.
- [21] Minger SL, Ekonomou A, Carta EM, et al. Endogenous neurogenesis in the human brain following cerebral infarction [J]. *Regen Med*, 2007, 2 (1): 69-74.
- [22] Wang DD, Bordey A. The astrocyte odyssey [J]. *Prog Neurobiol*, 2008, 86 (4): 342-367.
- [23] 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 [J]. *Stroke*, 2005, 36 (6): 1278-1282.

(修回日期:2015-07-13)

(本文编辑:汪玲)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

新闻报道中的部分禁用词

1. 对有身体伤残的人士不使用“残废人”、“瞎子”、“聋子”、“傻子”、“弱智”等蔑称,而应使用“残疾人”、“盲人”、“聋人”、“智力障碍者”等词语。
2. 报道各种事实特别是产品、商品时不使用“最佳”、“最好”、“最著名”等具有强烈评价色彩的词语。
3. 医药报道中不得含有“疗效最佳”、“根治”、“安全预防”、“安全无副作用”等词语,药品报道中不得含有“药到病除”、“无效退款”、“保险公司保险”、“最新技术”、“最先进制法”、“药之王”、“国家级新药”等词语。
4. 对各民族,不得使用旧社会流传的带有污辱性的称呼。不能使用“回回”、“蛮子”等,而应使用“回族”等。也不能随意使用简称,如“蒙古族”不能简称为“蒙族”,“维吾尔族”不能简称为“维族”。
5. “穆斯林”是伊斯兰教信徒的通称,不能把宗教和民族混为一谈。不能说“回族就是伊斯兰教”、“伊斯兰教就是回族”。报道中遇到“阿拉伯人”等提法,不要改称“穆斯林”。
6. 香港、澳门是中国的特别行政区,台湾是中国的一个省。在任何文字、地图、图表中都要特别注意不要将其称作“国家”。尤其是多个国家和地区各称连用时,应格外注意不要漏写“国家(和地区)”字样。不得将海峡两岸和香港并称为“两岸三地”。
7. “台湾”与“祖国大陆”或“大陆”为对应概念,“香港、澳门”与“内地”为对应概念,不得弄混。不得将台湾、香港、澳门与中国并列提及,如“中台”、“中港”、“中澳”等。可以使用“内地与香港”、“大陆与台湾”或“京港”、“沪港”、“闽台”等。

[摘编自《编辑学报》2011, 23 (4): 334]