

• 实验研究 •

针刺联合丰富康复训练对脑缺血损伤大鼠神经功能 及 NGF、BDNF 表达的影响*

刘 启¹, 李梦醒², 刘 芳³, 唐 巍^{2△}

(1. 合肥职业技术学院, 安徽 合肥 238000; 2. 安徽中医药大学, 安徽 合肥 230012;

3. 安庆医药高等专科学校, 安徽 安庆 246052)

摘要: **目的** 观察针刺联合丰富康复训练对脑缺血损伤大鼠神经功能及损伤侧皮质 NGF、BDNF 表达的影响。**方法** 线栓法制作急性局灶性脑缺血损伤动物模型, 动物随机分为假手术组、模型组、针刺组、丰富康复训练组及针康组(针刺+丰富康复训练)5 组, 每组进行神经缺损体征评分和感觉、运动能力评分, 应用免疫组织化学技术进行 NGF、BDNF 显色, 分析比较各组大鼠脑组织中阳性细胞的表达情况。**结果** 治疗前行为学功能评分各组无明显差异($P>0.05$), 行为学功能评分针康组与模型组比较有极显著性差异($P<0.01$), 与针刺组及丰富康复训练组比较有显著性差异($P<0.05$); 与假手术组比较, 模型组大鼠皮质 NGF、BDNF 的表达显著升高($P<0.01$); 与模型组比较, 治疗组大鼠皮质 NGF、BDNF 的表达均显著升高($P<0.01$); 与针刺组及丰富康复训练组相比, 针康组效果显著($P<0.05$)。**结论** 针刺联合丰富康复训练对脑缺血损伤大鼠神经功能有保护和修复作用, 疗效优于针刺法及丰富康复训练法, 其效应可能上调大鼠 NGF、BDNF 蛋白的表达有关。

关键词: 针刺; 丰富康复训练; 脑缺血损伤; 脑源性神经营养因子; 神经生长因子

中图分类号: R246.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2723(2016)01-0001-05

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2016.01.001

缺血性脑卒中具有高发病率、高患病率及高致残率等特点, 年青脑梗死发病率不断上升, 其中 45 岁以下患者已占缺血性卒中 14%^[1]。神经营养因子(Neurotrophic factors, NTFs)可促进突触的重塑, 诱导轴突再生, 促进神经功能重组^[2]。神经生长因子(Nerve growth factor, NGF)和脑源性神经营养因子(Brain derived neurotrophic factor, BDNF)作为 NTFs 典型代表可刺激和促进神经元生长及分化, 维持神经元的存活及修复受损神经元作用^[3]。针刺疗法治疗中风历史悠久, 具有确切且肯定的临床疗效。丰富康复训练可促进脑缺血损伤大鼠行为、认知等功能改善^[4-6]。观察针刺联合丰富康复训练对脑缺血损伤大鼠神经功能恢复及 NGF 和 BDNF 表达的影响, 进一步揭示针刺联合丰富康复训练的脑缺血损伤保护作用机制, 为临床治疗缺血性脑卒中提供思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物及模型建立

1.1.1 实验动物

清洁级雄性 SD 大鼠[安徽省实验动物中心, 许可证号 SCXK(皖)2011_002], 初始体质量(230±25)g, 适应性喂养一周后体质量达(250±25)g 进行研究。用随机数字表法随机将动物分为 5 组: 假手术组, 模型组, 针刺组, 丰富康复训练组及针康组(针刺+丰富康复训练)。

1.1.2 模型建立及成功评定标准

运用大脑中动脉线栓阻塞法制作永久性脑缺血损伤模型大鼠; 假手术组大鼠仅做颈总动脉分离, 不做线栓手术。每组大鼠各 24 只, 每组再分为术后 3d、7d、14d 3 个亚组, 每个小组 8 只。术后 4 h 参考 Zea Longa^[7]及 Bederson^[8]等, 设 5 分制评分标准, 对大鼠进行神经功能缺损评分。0 分: 自主活动

* 基金项目: 国家自然科学基金(30873293, 81373711, 81102547)

收稿日期: 2015-11-21

作者简介: 刘启(1984-), 男, 安徽芜湖人, 助教, 主要研究方向: 脑血管病及筋伤病防治与康复。

△通信作者: 唐巍, E-mail: tangwei2633@163.com

无异常;1 分:不能完全伸展患侧前爪;2 分:自主运动时,身体向患侧转圈;3 分:大鼠自主运动时,身体向患侧倾倒;4 分:大鼠不能自发行走,意识丧失;将评分达到 1-3 分大鼠纳入本次实验。

1.2 主要试剂

兔抗鼠 BDNF 多克隆抗体 (BA0515);兔抗鼠 NGF 多克隆抗体 (BA0611);SABC 试剂盒 (SA1022);DAB 显色试剂盒 (753223A)均购自于武汉博士德生物公司。

1.3 治疗方法

1.3.1 丰富环境设置

本实验丰富环境设置为四色球、婴儿玩具、大中小滚筒各一个及积木,环境设置每天变换 1 次;术后 4 h 用软毛刷从头至尾均匀刷动大鼠进行早期触摸刺激,每次 15min。丰富环境笼为 20cm×35cm×50cm,每笼为 4 只大鼠;标准环境笼为 20cm×30cm×40cm,每笼 4 只大鼠,仅放置水、食物及垫料。

1.3.2 康复训练设计

本实验康复训练及评定器材^[9]:转棒训练取长为 150 cm、直径为 4.5 cm 的木棒 1 根,以 3 r/min 速度进行转动训练,分别交替向左右转动。平衡木训练取长为 150 cm,宽为 2 cm 方木棒 1 根,在距地面 7 cm 处平放,两头固定,作为平衡木让大鼠在上行走。网屏训练取长为 50 cm,宽为 40 cm 的网带,网眼为 1cm×1cm 的训练器,网板上方和左右都用 15 cm 高的木板框边,训练器距地面高度为 80 cm,下方铺以 10 cm 度的海绵,将网屏水平放置后,把老鼠放在其上,然后缓慢将其一端抬高,在 2 s 内将网屏由水平位变成垂直位,保持 5 s,观察大鼠是否会从网屏上掉下来或用前抓握住网屏。自制滚筒式网状训练器取长为 1.0 m,直径为 60 cm 的圆形网状训练器,被分为 4 个小格,可同时训练 4 只大鼠,以 5 r/min 速度进行转动训练。

1.3.3 动物治疗方法

A 组为假手术组,置于标准环境笼中饲养。B 组为模型组,置于标准环境笼中饲养。C 组为针刺组,取穴百会、风府,参照《实验针灸学》附录“大鼠的常用针灸穴位”^[10],用 0.30*25mm 毫针刺入相应穴位后,以平补平泻手法捻转行针,以大鼠局部轻颤为度,留针时间 20 min/次,每 10 min 行针 1 次,术后 4 h 开始治疗,每天治疗 1 次。D 组为丰富康复训练组,术后 4 h 用软毛刷从头至尾均匀刷动大鼠进行

早期触摸刺激,每次 15 min。术后 24 h 后进行康复训练,每天置于滚筒式网状训练器内转动训练、网屏训练、平衡木、转棒上行走训练,每次 10 min,共 40 min。E 组为针康组,针刺方法同针刺组,丰富康复训练同丰富康复训练组。先给予针刺治疗,后给予丰富康复训练,治疗结束后,置于丰富环境笼中饲养。

1.4 组织固定及石蜡切片

各组动物在相应时间点进行功能评定后,用 10%水合氯醛腹腔注射,麻醉大鼠,快速剪开胸腔,钝圆针头从左心室心尖处插至主动脉弓,右心耳部剪开右心耳部一小口,随即快速注向主动脉内 0.9%生理盐水,待右心房流出液变为无色清亮时,随即给予 4%多聚甲醛灌注固定,待大鼠四肢和尾巴僵直。随即断头取脑,后用 4%多聚甲醛溶液固定 1 周取出,经脱水、浸蜡、包埋、切片、摊片、烤片及脱蜡,采用免疫组织化学 SABC 法对脑组织中 NGF、BDNF 蛋白表达进行检测,严格按照试剂盒说明书步骤操作进行。

1.5 图像采集及统计学分析

取大鼠大脑标本,连续做冠状切片,选取损伤侧额顶叶皮质切片,每只大鼠取 5 张切片,每张切片在上述部位均选取同倍 (40×10) 的 5 个不同视野,取平均光密度平均值。数据统计采用 SPSS18.0 for windows 软件包处理,采用均数±标准差表示,神经缺损体征评分采用多个独立样本非参数检验;组间均数的两两比较采用 *t* 检验法;各组间均数比较采用单因素方差分析;*P*<0.05 表示有显著性差异,*P*<0.01 表示有极显著性差异。

2 结果

2.1 神经功能缺损体征评分

表 1 术后 4h、3d、7d 和 14d 时神经功能缺损评分 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	4h	3d	7d	14d
A 组	0	0	0	0
B 组	2.75±0.46	2.50±0.53	2.38±0.52	2.13±0.64
C 组	2.63±0.52	2.25±0.46	1.63±0.52*	1.25±0.46**
D 组	2.63±0.52	2.38±0.52	1.75±0.74*	1.38±0.52**
E 组	2.75±0.46	2.00±0.53	1.13±0.35***	0.63±0.52***

注:C 组、D 组及 E 组与 B 组相比,**P*<0.05,***P*<0.01;E 组与 C、D 组相比

由表 1 可见,术后 7 d 时,与模型组比较,治疗

组评分降低,针刺组和丰富康复训练组有显著性差异($P<0.05$),针康组有非常显著性差异($P<0.01$);术后 14 d 时,神经功能评分,与模型组比较,治疗组评分降低,都有非常显著性差异($P<0.01$);术后 7 d 时,针康组有显著性差异($P<0.05$),术后 14 d 时,针康组有显著性差异($P<0.05$)。

2.2 感觉、运动功能评分

表 2 各组转棒、平衡木、网屏评定结果($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别		4h	3d	7d	14d
转棒训练	B 组	2.63±0.52	2.50±0.53	2.12±0.35	1.75±0.46
	C 组	2.75±0.46	2.25±0.46	1.50±0.53 [*]	1.25±0.46 [*]
	D 组	2.88±0.35	2.13±0.35	1.63±0.52 [*]	1.25±0.46 [*]
	E 组	2.88±0.35	2.25±0.46	1.25±0.46 ^{**}	0.75±0.46 ^{***}
平衡木训练	B 组	4.75±0.46	3.88±0.64	2.63±0.52	2.13±0.64
	C 组	4.63±0.52	3.13±0.35	1.88±0.35 [*]	1.25±0.46 ^{**}
	D 组	4.63±0.52	3.63±0.52	2.00±0.53 [*]	1.38±0.52 [*]
	E 组	4.75±0.46	3.50±0.53	1.38±0.52 ^{***}	0.50±0.53 ^{***}
网屏训练	B 组	2.63±0.52	2.25±0.46	1.88±0.35	1.25±0.46
	C 组	2.75±0.46	2.00±0.53	1.38±0.52 [*]	0.75±0.46 [*]
	D 组	2.75±0.46	1.88±0.35	1.25±0.46 [*]	0.63±0.52 [*]
	E 组	2.63±0.52	1.63±0.52	1.00±0.53 ^{**}	0.38±0.52 ^{**}

注: C 组、D 组及 E 组与 B 组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; E 组与 C、D 组相比, # $P<0.05$, ## $P<0.01$

由表 2 可见,术后 7 d 时,与模型组比较,治疗组评分降低,针刺组和丰富康复训练组转棒、平衡木和网屏评分都有显著性差异($P<0.05$),针康组转棒、平衡木和网屏评分都有非常显著性差异($P<0.01$),术后 14 d 时,与模型组比较,治疗组评分降低,针刺组和丰富康复训练组转棒、网屏及丰富康复训练组平衡木评分都有显著性差异($P<0.05$),针康组转棒、平衡木和网屏及针刺组平衡木评分都有非常显著性差异($P<0.01$),治疗组之间评分比较;术后 7d 时,与针刺组、丰富康复训练组比较,针康组平衡木评分有显著性差异($P<0.05$);术后 14 d 时,与针刺组与丰富康复训练组比较,针康组有转棒评分有显著性差异($P<0.05$),针康组平衡木评分有非常显著性差异($P<0.01$)。

2.3 针刺联合丰富康复训练对大鼠脑组织 NGF、BDNF 蛋白表达影响

假手术组 NGF、BDNF 阳性表达数目较少,染色较淡,提示表达微弱。脑缺血损伤后模型组与治疗

组 NGF 与 BDNF 表达规律大体一致:术后 3 d 时表达达到峰值,7 d 时表达下降,14 d 时表达回到低水平。NGF 表达细胞数目、密度及反应都强于 BDNF (见图 1-4,图 5-8)。

表 3 不同组 NGF 阳性细胞平均光密度比较($\bar{x}\pm s$)

组别	3d	7d	14d
A 组	0.180±0.029	0.177±0.029	0.169±0.034
B 组	0.486±0.032**	0.363±0.043**	0.258±0.041**
C 组	0.527±0.033***	0.411±0.032***	0.303±0.030***
D 组	0.518±0.034***	0.399±0.030***	0.298±0.036***
E 组	0.571±0.069***△	0.430±0.035***△	0.334±0.039***△

注: B、C、D 及 E 组与 A 组相比, ** $P<0.01$; C、D 及 E 组与 B 组相比, # $P<0.05$, ## $P<0.01$; E 组与 C、D 组相比, △ $P<0.05$

表 4 不同组 BDNF 阳性细胞平均光密度比较($\bar{x}\pm s$)

组别	3d	7d	14d
A 组	0.140±0.023	0.140±0.028	0.137±0.028
B 组	0.387±0.042**	0.305±0.035**	0.214±0.032**
C 组	0.419±0.024***	0.333±0.024***	0.243±0.020***
D 组	0.423±0.016***	0.335±0.025***	0.242±0.026***
E 组	0.457±0.049***△	0.350±0.040***△	0.269±0.016***△

注: B、C、D 及 E 组与 A 组相比, ** $P<0.01$; C、D 及 E 组与 B 组相比, # $P<0.05$, ## $P<0.01$; E 组与 C、D 组相比, △ $P<0.05$

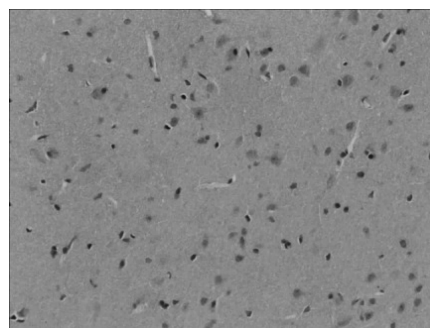


图 1 假手术组 3d NGF 染色($\times 400$)

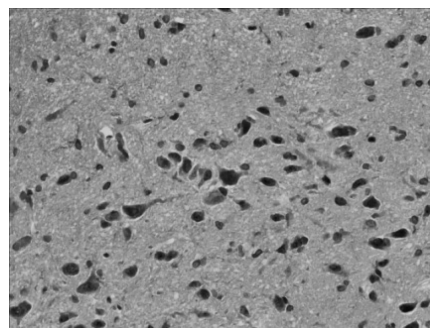
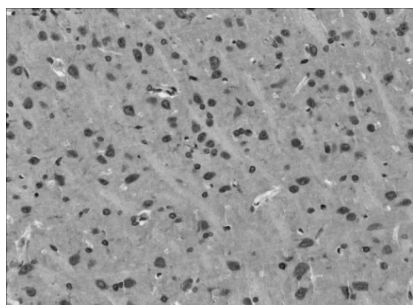
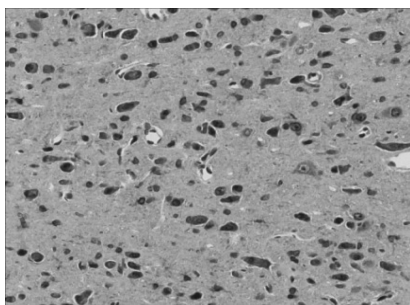
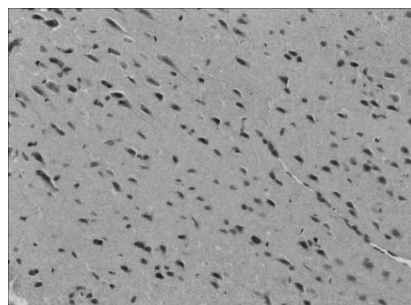
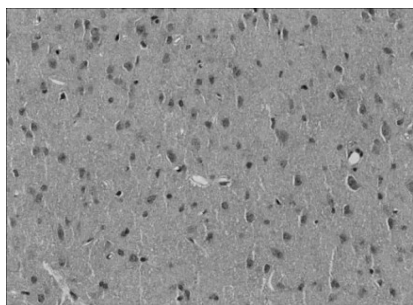
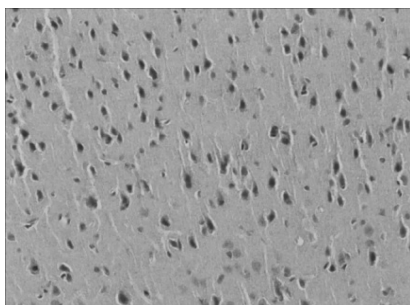
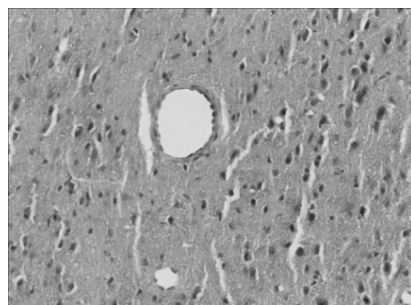


图 2 模型组 3d NGF 染色($\times 400$)

图 3 针刺组 3d NGF 染色($\times 400$)图 4 针康组 3d NGF 染色($\times 400$)图 5 假手术组 3d BDNF 染色($\times 400$)图 6 模型组 3d 染色 BDNF($\times 400$)图 7 康复组 3d BDNF 染色($\times 400$)图 8 针康组 3dBDNF 染色($\times 400$)

与模型组比较,术后 3 d、7 d 和 14 d 时,治疗组损伤侧皮质的 NGF、BDNF 阳性细胞数目均有显著性差异($P<0.01$)。与针刺组和丰富康复训练组比较,针康组三时间点阳性细胞数目表达较多($P<0.05$)。

3 讨论

NGF、BDNF 作为 NTFs 家族典型代表,源自于同一基因家族,氨基酸序列同源性约为 50%^[11]。NGF、BDNF 具有保护和修复脑缺血后受损神经元的作用。本实验显示模型组 NGF、BDNF 表达水平较假手术组高,可能是由于脑缺血损伤后机体启动内源性自发修复机制,对脑缺血损伤起到保护和修复作用。相关实验研究显示:脑缺血损伤后可自发上调 NGF、BDNF 表达水平^[12-13],保护和修复受损神经元,这与本实验结果基本符合。此自发修复机制上调 NGF 及 BDNF 表达有限、作用短暂,很难对脑缺血损伤神经元产生全面、持久保护,其效应有限,所以寻找适合、安全及有效干预手段上调 NGF、BDNF 表达来保护和修复受损神经元。

术后 3 d 时,治疗组 NGF、BDNF 表达较模型组有极显著性差异($P<0.01$),而治疗组与模型组行为学评分无显著性差异($P>0.05$)。NGF、BDNF 表达的增加已为随后的神经功能重组及功能恢复提供必要的物质基础。与同时模型组比较,治疗组均有极显著性差异($P<0.01$)。提示针刺及康复训练均可

增加 NGF、BDNF 表达,保护和修复脑内受损神经元。针康组表达明显多于同时时间点针刺组及丰富康复训练组,比较有显著性差异($P<0.05$)。提示针刺联合丰富康复训练促进 NGF、BDNF 表达的效应更为明显,改善神经缺损功能,提高感觉、运动能力的作用也更强,针刺联合丰富康复训练对神经功能恢复和感觉、运动功能的改善优于丰富康复训练组及针刺组,可能是由于针刺联合丰富康复训练可更多、更持续促进 NGF 和 BDNF 表达相关。

脑缺血后的功能恢复与脑损害后的干预措施有着密切的联系。合理综合地应用各种康复治疗方法可更好的提高临床疗效^[14]。针刺联合丰富康复训练正是基于以上考虑将各种不同积极影响因素有效结合起来,运用于脑缺血损伤康复治疗。本次研究结果提示针刺联合丰富康复训练综合疗法较单一疗法效果更佳。这即符合中医学“杂合以治”思想,又符合现代康复医学理论指导思想—综合疗法,为传统中医疗法与现代康复手段的临床选择性运用或有机结合运用提供实验依据,并丰富完善脑血管病的有效康复手段。相关实验研究发现:针刺结合康复训练可抑制神经元凋亡,保护受损神经元,促进大脑发生可塑性改变,促使大鼠功能的恢复^[15-17]。以上研究表明针刺及丰富康复训练可促进脑缺血再灌注大鼠神经系统发生可塑性的改变,从而促使神经功能恢复。这都与本实验结果基本符合。

参考文献:

- [1] 郭伟莉. 45 岁以下年青人脑梗死危险因素研究现状. 吉林医学[J]. 2010,31(33):6108-6109.
- [2] Yang JP,Liu HJ,Yang H,et al. Therapeutic time window for the neuroprotective effects of NGF when administered after focal cerebral ischemia[J]. Neurol Sci,2011,32(3):433-441.
- [3] Mitchell JJ,Paiva M,Walker DW,et al. BDNF and NGF afford in vitro neuroprotection against ethanol combined with acute ischemia and chronic hypoglycemia[J]. Dev Neurosci. 1999,21(1):68-75.
- [4] 江城,廖维靖,杨万同,等. 丰富康复训练对脑缺血大鼠行为功能表现的影响. [J]. 中国康复医学杂志,2006,21(3):210-213.
- [5] 程明高,廖维靖,杨万同,等. 丰富康复训练对大鼠脑缺血再灌注后功能恢复及神经元树突生长的影响 [J]. 中国康复理论与实践,2006,12(3):203-206.
- [6] Soderstrom I,Strand M,Ingridsson AC,et al. 17 beta-estradiol and enriched environment accelerate cognitive recovery after focal brain ischemia [J]. Eur J Neurosci,2009,29(6):1215-1224.
- [7] Longa EZ,Weinstein PR,Carlson S,et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. Stroke,1989,20(1):84-91.
- [8] Bederson JB,Pitts LH,Tsuiji M,et al. Rat middle cerebral artery occlusion:evaluation of the model and development of a neurologic examination[J]. Stroke,1986,17(3):472-476.
- [9] 徐莉,李玲,陈景藻,等. 康复训练对大鼠脑梗死神经功能恢复的影响 [J]. 中华物理医学与康复杂志,2000,22(2):86-88.
- [10] 郭义. 实验针灸学 [M]. 北京: 中国中医药出版社,2008:414-417.
- [11] Hohn A,Leibrock J,Bailey K,et al. Identification and characterization of a novel member of the nerve growth factor/brain-derived neurotrophic factor family[J]. Nature, 1990,344(6264):339-441.
- [12] 李红玲,王马魁,任力,等. 运动训练对大鼠出血性脑损伤 BDNF 基因及其蛋白表达的影响[J]. 中国康复医学杂志,2008,23(9):782-785.
- [13] 石秋艳,何俊芳,孙惠芳,等. 脑出血大鼠脑内 NGF 和 BDNF 蛋白表达变化的研究 [J]. 中国医药指南,2010,8(7):8-10.
- [14] 倪朝民. 脑卒中的康复研究 [J]. 中国康复医学杂志, 2005,20(1):3-5.
- [15] 唐强,刘宏光,王艳,等. 针康法对局灶性脑缺血大鼠前肢运动功能及缺血区突触素和生长相关蛋白-43 表达的影响[J]. 中国康复理论与实践,2011,17(10):973-976.
- [16] 孔妍. 针康法对脑缺血大鼠 Caspase-3 mRNA 和蛋白表达的影响[J]. 针灸临床杂志,2013,29(5):63-65.
- [17] 唐强,朱路文,邢艳丽,等. 针康法对脑缺血大鼠运动功能及 GAP-43、Nogo-A 表达的影响 [J]. 针灸临床杂志, 2015,31(1):54-57.

(编辑:杨阳)

Effects of Acupuncture Combined with Enriched Rehabilitation Training on Neural Function and Expression of NGF and BDNF in Rats after Cerebral Ischemia Injury

LIU Qi¹, LI Mengxing², LIU Fang³, TANG Wei²(1. Hefei Technology College, Hefei 238000, China; 2. Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China;
3. Anqing Medical College, Hefei 246052, China)

ABSTRACT: Objective To observe the effects of acupuncture combined with enriched rehabilitation training on neural function and expression of cortical nerve growth factor (NGF) and brain derived neurotrophic factor (BDNF) in rats after focal cerebral ischemia injury. **Methods** Rat models of local cerebral ischemia were established by thread-occluding the middle cerebral artery (MCAO). Rats were randomly divided into sham operated, model, acupuncture, enriched rehabilitation training and acupuncture combined enriched rehabilitation training groups. Marks of neural function defect, sensory and motor ability were noted down separately. The immunohistochemistry staining was applied to observe the expression of NGF and BDNF cells in rats. The expression of NGF and BDNF were analyzed after cerebral ischemia among the above groups. **Results** Behavior medicine scopes of rats in every group had no obvious difference before therapy ($P>0.05$). The improvement of acupuncture combined enriched rehabilitation training group was significant ($P<0.01$), while the difference in comparison with acupuncture group and enriched rehabilitation training group were remarkable ($P<0.05$). Compared with the sham operation group, cortical NGF and BDNF expressions increased significantly in the model group ($P<0.01$). Compared with the model group, cortical NGF and BDNF expressions increased significantly in the treatment groups ($P<0.01$). Compared with the acupuncture group and enriched rehabilitation training group, the effect of acupuncture combined enriched rehabilitation training group was marked in the treatment group ($P<0.05$). **Conclusion** The therapy of acupuncture combined enriched rehabilitation training can promote recovery of behavior in rats after focal cerebral ischemia and it was better the therapy of simple enriched rehabilitation training and acupuncture. the mechanism may be related to increasing the expression of NGF and BDNF in cortex.

KEY WORDS: acupuncture; enriched rehabilitation training; cerebral ischemia injury; brain derived neurotrophic factor; nerve growth factor