

针刺对脑性瘫痪模型大鼠神经细胞凋亡的影响

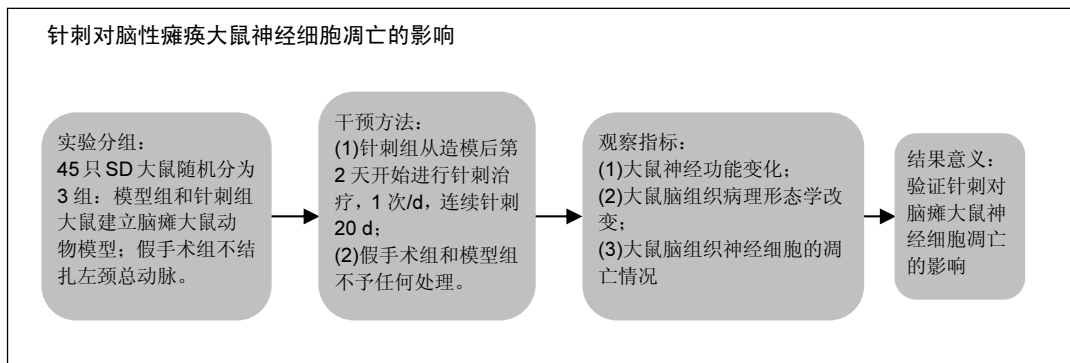
介小素, 侯玉晋(河南中医院第二附属医院儿童康复科, 河南省郑州市 450002)

引用本文: 介小素, 侯玉晋. 针刺对脑性瘫痪模型大鼠神经细胞凋亡的影响[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(27): 4036-4042.

DOI: 10.3969/j.issn.2095-4344.2016.27.012

ORCID: 0000-0002-9490-7636(介小素)

文章快速阅读:



介小素,女,1977年生,河南省漯河市人,汉族,硕士,主治医师,主要从事儿童脑病康复的研究。

中图分类号:R318

文献标识码:B

文章编号:2095-4344

(2016)27-04036-07

稿件接受:2016-04-07

文题释义:

小儿脑性瘫痪: 俗称小儿脑瘫。是指从出生后1个月内脑发育尚未成熟阶段,由于非进行性脑损伤所致的以姿势各运动功能障碍为主的综合征。是小儿时期常见的中枢神经障碍综合征,病变部位在脑,累及四肢,常伴有智力缺陷、癫痫、行为异常、精神障碍及视、听觉、语言障碍等症状。

针刺治疗脑性瘫痪的作用及机制: 改善脑血流量,恢复大脑组织形态,减轻大脑萎缩,减少氧自由基的形成,影响突触结构,影响神经递质的含量,影响神经营养因子的表达,减少大脑神经细胞凋亡,在多个环节上发挥作用。

摘要

背景: 研究表明针刺可以影响脑瘫动物的脑血流量、减轻大脑组织水肿、改善大脑微循环、减少神经细胞凋亡。

目的: 进一步验证针刺对脑瘫大鼠神经细胞凋亡的影响。

方法: SD大鼠45只,随机分为3组:假手术组、模型组、针刺组,每组15只大鼠。模型组和针刺组大鼠结扎左侧颈总动脉建立脑瘫大鼠动物模型;假手术组找到左颈总动脉后不结扎。针刺组从造模后第2天开始进行针刺治疗,1次/d,连续针刺20d,假手术组和模型组不予任何处理。手术后第21天观察大鼠治疗后的神经功能变化;取大鼠脑组织病理形态学改变,以及神经细胞的凋亡情况。

结果与结论: ①运动功能评分:模型组大鼠的均明显低于假手术组($P < 0.05$),针刺组在第21天时的运动功能评分明显高于模型组($P < 0.05$)。②苏木精-伊红染色结果:模型组大鼠大脑显示细胞排列紊乱,局部有炎症细胞浸润,见囊性变,神经细胞数量减少,并有变性坏死,胶质细胞增生,细胞核固缩,部分神经细胞有空腔形成,胞体缩小,结构模糊或者消失;假手术组大鼠大脑神经细胞形态和结构正常;针刺组大鼠大脑神经细胞的形态和结构改变介于假手术组和模型组之间。③细胞凋亡数目:模型组的神经细胞凋亡明显高于假手术组($P < 0.05$);针刺组的神经细胞凋亡数目也明显高于假手术组($P < 0.05$),但明显低于模型组($P < 0.05$)。④结果表明:针刺治疗可以改善脑性瘫痪大鼠的神经功能,减少脑性瘫痪大鼠的神经细胞凋亡,对脑性瘫痪大鼠的神经细胞有保护作用。

关键词:

实验动物;神经损伤与修复动物模型;针刺;脑性瘫痪;神经细胞;凋亡

主题词:

针刺;脑瘫;细胞凋亡;组织工程

基金资助:

河南中医学院苗圃工程项目(MP2011-16)

Jie Xiao-su, Master,
Attending physician,
Department of Children
Rehabilitation, Second
Affiliated Hospital, Henan
Hospital of Traditional
Chinese Medicine,
Zhengzhou 450002, Henan
Province, China

Effect of acupuncture on neural cell apoptosis of cerebral palsy rats

Jie Xiao-su, Hou Yu-jin (Department of Children Rehabilitation, Second Affiliated Hospital, Henan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450002, Henan Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Acupuncture has been shown to impact cerebral blood flow, relieve cerebral edema, improve microcirculation and reduce neural cell apoptosis in animals with cerebral palsy.

OBJECTIVE: To further verify the effect of acupuncture on neuronal apoptosis in cerebral palsy rats.

METHODS: Forty-five Sprague-Dawley rats were randomly divided into sham group, model group and the acupuncture group, with 15 rats in each group. In the model and acupuncture groups, rat models of cerebral palsy were established by ligating the left common carotid artery. In the sham surgery group, the left common carotid artery was not ligated. Rats in the acupuncture group received acupuncture from 2 days after model induction, once a day, for 20 consecutive days. Rats in the sham surgery and model groups were left intact. At 21 days after surgery, neurological functions, pathomorphological changes and neuronal apoptosis were observed.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) Motor function score was significantly lower in the model group than in the sham surgery group ($P < 0.05$). Motor function score was significantly higher in the acupuncture group than in the model group at 21 days ($P < 0.05$). (2) Hematoxylin-eosin staining: In the model group, cells were scattered. Inflammatory cell infiltration and cystic degeneration were found. The number of nerve cells was reduced. Degeneration, necrosis, gliosis and karyopyknosis were detected. Cavitation was visible in some cells. Cell bodies became small. The structure was not distinct or disappeared. In the sham surgery group, the morphology and structure of nerve cells were normal. In the acupuncture group, the changes in morphology and structure of nerve cells were found between the sham surgery and model groups. (3) The number of apoptotic cells was significantly greater in the model group than in the sham surgery group ($P < 0.05$). The number of apoptotic nerve cells was significantly higher in the acupuncture group than in the sham surgery group ($P < 0.05$), but significantly lower than in the model group ($P < 0.05$). (4) Results confirmed that acupuncture therapy can improve neurological function, reduce nerve cell apoptosis, and play a protective effect on nerve cells of rats with cerebral palsy.

Subject headings: Acupuncture; Cerebral Palsy; Apoptosis; Tissue Engineering

Funding: the Nursery Engineering Project of Henan University of Chinese Medicine, No. MP2011-16

Cite this article: Jie XS, Hou YJ. Effect of acupuncture on neural cell apoptosis of cerebral palsy rats. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2016;20(27):4036-4042.

0 引言 Introduction

脑性瘫痪(简称脑瘫)是儿童常见的神经系统疾病,主要表现为姿势异常和运动障碍。脑瘫的诊断包括:临床症状发生在婴儿期,病变部位在脑部,脑损伤为非进行性损伤,常合并有癫痫、智力障碍、感知觉障碍以及其他方面异常,排除其他疾病引起的中枢性运动障碍及发育迟缓。脑瘫的发生率有增高趋势,脑瘫的防治主要在于一级预防,降低脑瘫的发生率,早期干预,减少脑瘫的致残率。

针刺在脑瘫的治疗方面取得了巨大突破,针刺可以影响脑瘫动物的脑血流量、减轻大脑组织水肿、改善大脑微循环、减少神经细胞的变形坏死、恢复大脑组织形态、增加大脑质量、减轻大脑萎缩、提高APT酶的活性、减少氧自由基的形成、减少神经细胞凋亡、影响突触结构和神经递质的含量、影响神经营养因子的表达等多多个环节治疗脑瘫。针刺治疗越早,治疗

效果越好。

实验通过建立脑瘫大鼠动物模型,对其进行针刺治疗,观察大鼠治疗后的神经功能变化,并对脑瘫大鼠的大脑组织进行苏木精-伊红染色,观察脑瘫大鼠的大脑组织病理形态学改变,以及神经细胞的凋亡情况,结果发现针刺治疗可以改善脑瘫大鼠的神经功能,减少脑瘫大鼠的神经细胞凋亡,对脑瘫大鼠的神经细胞有保护作用。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 造模动物及材料 实验于2014年5至2015年6月在河南省中医院第二附属医院实验室完成。

实验动物: 健康、清洁级、7 d龄雄性SD大鼠45只,体质量11-19 g,实验动物由河南实验动物中心提供。饲养相对湿度为60%-80%,温度在22-26 °C,按照清洁级实验动物标准进行进食和饮水。实验大鼠符合卫生

部一级动物标准, 经动物伦理学委员会批准。

主要试剂: 多聚甲醛(天津市化学试剂研究所), 95%乙醇(北京博奥森生物技术有限公司), 无水乙醇(北京博奥森生物技术有限公司), PBS磷酸盐缓冲液粉末(武汉博士德生物工程有限公司), 凋亡试剂盒(瑞士Roche公司), 抗体稀释液(武汉博士德生物工程有限公司), 苏木素(美国Novocastra), BCIP/NBT显色液(福州迈新生物技术开发有限公司中国), 柠檬酸盐缓冲液粉末(武汉博士德生物工程有限公司), GVA水溶性封片胶(北京中杉金桥生物技术有限公司中国等)。

主要设备和仪器: 生物组织显微镜(日本OLYMPUS), 纯水仪(美国Millipore公司), 移液器(大龙), 电热恒温箱(上海精宏公司), 眼科用手术剪(北京中兴名业科技发展有限公司), 幸福牌不锈钢压力锅18 cm(广州兴福金属制品有限公司), 石蜡包埋机(德国Leica公司), 石蜡切片机(德国SLEE公司), 美的电磁炉(美的), 冰箱(海尔公司), 华佗牌针灸针(苏州医疗用品有限公司)等。

主要试剂配制: ①PBS: 1包PBS磷酸盐缓冲液粉+2 000 mL蒸馏水溶解, pH值调为7.2, 保持备用。②TritonX100: 将PBS稀释成0.1%稀释液。③标记混合物和转换液: 凋亡试剂盒中自带。④体积分数75%乙醇: 17份的无水乙醇和3份蒸馏水混合配制。⑤体积分数85%乙醇: 17份的无水乙醇和5份蒸馏水混合配制。

1.2 造模方法 将45只大鼠随机分为3组: 假手术组、模型组、针刺组, 每组15只大鼠。采用改良式的建模方法建立脑瘫大鼠动物模型^[1]。大鼠用乙醚吸入麻醉后, 固定于手术台上, 常规消毒, 切开颈正中皮肤, 分离出左侧颈总动脉并结扎, 缝合切口后放回母鼠笼中恢复2 h, 然后放入封闭的缺氧箱内, 向缺氧箱内通入低氧气体(氧气体积分数8%, 氮气体积分数92%), 2.5 h将大鼠取出, 保温2 h后测定大鼠的行为, 左旋、不能翻身、平衡异常视为造模成功。假手术组按照上述手术操作, 找到左颈总动脉后不结扎, 直接缝合切口, 不予低氧处理。

1.3 造模成功的检测标准 建模后2 h测定大鼠的行为, 左旋、不能翻身、平衡异常视为造模成功。

1.4 处理方法 针刺组从手术后第2天开始进行针刺治疗, 每天针刺1次, 连续针刺20 d, 假手术组和模型组不予任何处理, 所有大鼠均与正常饮食饮食, 自由活动。手术后第21天处死大鼠取材。

1.5 针刺处理 穴位选取参照《实验针灸学》^[2], 选择

内关、涌泉、曲池、足三里、百会以及患侧颞肌进行针刺, 针刺方法: 先针刺涌泉穴和内关穴, 然后针刺四肢穴位和头部穴位。

1.6 大鼠运动功能评估 各组大鼠在建模后第7天、第14天和第21天, 根据BBB功能评分进行运动功能评估^[1], 实验环境安静、光线好, 实验中对大鼠的步态、趾爪、足部持重、后肢运动、躯干运动及肢体运动协调等进行评分。

1.7 标本取材 大鼠造模成功后第21天, 将大鼠固定到手术台上, 麻醉后逐层开腹暴露心脏, 向大鼠左心室内注射生理盐水至大鼠右心耳逐渐鼓起, 剪开右心耳, 待右心耳流出液体为无色透明时, 用多聚甲醛固定, 待大鼠颈部变硬后, 剪开大鼠颅骨, 取出大脑, 清洗干净后, 在多聚甲醛中固定, 石蜡包埋脑组织, 进行切片, 切片后5 μm 。

1.8 各组大鼠大脑组织苏木精-伊红染色 二甲苯脱蜡, 乙醇洗脱二甲苯, 自来水和蒸馏水浸洗, 苏木精染色, 自来水洗涤, 盐酸分化, 蒸馏水洗涤, 稀氨水返蓝, 蒸馏水洗涤, 伊红染色, 蒸馏水洗涤, 乙醇脱水, 中性树胶封固。镜下观察各组大鼠的脑组织病理学变化, 镜下细胞核呈蓝色, 细胞浆呈红色。

1.9 各组大鼠脑皮质神经细胞凋亡的检测 将大鼠脑组织经体积分数4%甲醛固定, 脱水, 石蜡包埋, 切成5 μm 厚切片, 二甲苯脱蜡, 乙醇洗涤二甲苯, 蒸馏水和PBS洗涤, 浸入TritonX100液中8 min, 蒸馏水和PBS洗涤, 加入标记混合物进行标记, 其中一张切片加入稀释液做对照, 滴加转换液, PBS洗涤, BCIP-NBT显色液显色, 蒸馏水和PBS洗涤, GVA封片剂封固。镜下观察8个不同视野, 计算8个视野内神经细胞凋亡数目, 计算平均值, 镜下凋亡细胞呈紫蓝色或者黑色, 细胞体缩小, 细胞核消失, 细胞膜光滑。

1.10 主要观察指标 ①各组大鼠运动功能评分。②各组大鼠大脑组织苏木精-伊红染色结果。③各组大鼠大脑组织神经细胞凋亡数目。

1.11 统计学分析 所有数据输入SPSS 18.0软件进行处理, 计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 组间比较采用方差分析, 多组计量资料均数比较采用随机区组方差分析。取 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 造模成功动物数量及过程 造模动物流程表见图1。

2.2 模型更接近人类 新生鼠缺血缺氧后出现的神经

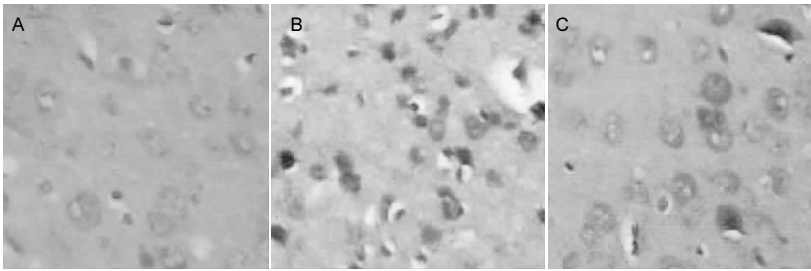


图2 各组大鼠大脑组织苏木精-伊红染色结果($\times 400$)

Figure 2 Hematoxylin-eosin staining results of the rat brain tissue in each group ($\times 400$)

图注: 图A为假手术组; B为模型组; C为针刺组。针刺组大鼠细胞形态和结构较模型组清晰, 细胞变性坏死减轻。

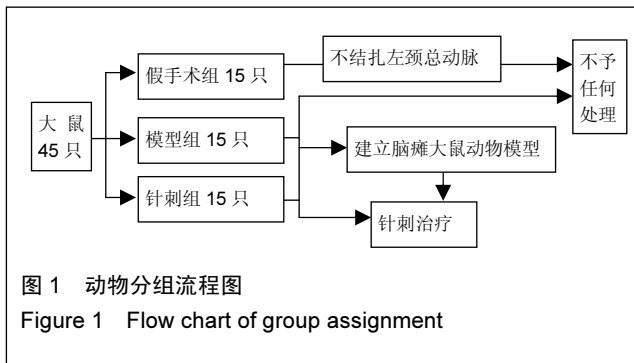


图1 动物分组流程图

Figure 1 Flow chart of group assignment

病理特征与人类的表现类似。此类模型制作的方法之一是将动物置于极度缺氧环境中一定时间制成脑瘫模型。单纯结扎单侧颈总动脉后同侧大脑半球的血流量并不减少, 然而在联合缺氧条件下该侧半球血流量明显减少并造成缺血性病理损害。此类模型制作方法相对简单, 实验条件较容易控制重复性好, 研究结果发现该模型动物脑室周围白质损伤与人类早产儿脑白质病理损伤相似^[3]。

2.3 各组大鼠运动功能评分情况比较 由表1可以看出: 模型组大鼠第7天、第14天和第21天的运动功能评分均明显低于假手术组($P < 0.05$), 表明大鼠脑瘫模型制作成功。针刺组大鼠第7天、第14天和第21天的运动功能评分也明显低于假手术组($P < 0.05$)。假手术组的运动功能评分随着时间的延长没有明显变化, 模型组和针刺组随着时间的延长运动功能评分有所增加, 其中模型组增加不明显, 针刺组第21天时运动功能评分增加比较明显, 表明针刺治疗可以改善大鼠的运动功能评分, 针刺组在第7天时的运动功能评分和模型组没有差别($P > 0.05$), 针刺组在第14天时的运动功能评分高于模型组, 但两者之间比较差异无显著性意义($P > 0.05$), 针刺组在第21天时的运动功能评分明显高于模型组, 两者比较差异有显著性意义($P < 0.05$)。表明针刺治疗可以改善脑瘫大鼠的运动功能评分。

2.4 各组大鼠大脑组织苏木精-伊红染色结果 结果显示模型组大鼠大脑组织细胞排列紊乱, 局部有炎症细胞浸润, 见囊性变, 神经细胞数量减少, 并有变性坏死,

胶质细胞增生, 细胞核固缩, 部分神经细胞有空腔形成, 胞体缩小, 结构模糊或者消失; 假手术组大鼠大脑组织细胞排列整齐, 层次清楚, 细胞形态和结构正常, 细胞染色深, 密度大; 针刺组大鼠大脑组织细胞形态和结构比较清晰, 细胞变性坏死减轻, 偶见有细胞核固缩。见图2。

2.5 各组大鼠大脑组织神经细胞凋亡数目 由表2可以看出 在手术后第21天时, 模型组的神经细胞凋亡数目明显高于假手术组($P < 0.05$); 针刺组的神经细胞凋亡数目也明显高于假手术组($P < 0.05$); 但针刺组的神经细胞凋亡数目明显低于模型组, 两者比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。表明针刺治疗可以减少大鼠神经细胞的凋亡。

表1 各组大鼠运动功能评分比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=15$, 分)
Table 1 Comparison of motor function score in rats of each group

| 时间 | 假手术组 | 模型组 | 针刺组 |
|------|----------------|----------------------------|------------------------------|
| 7 d | 20.8 \pm 0.1 | 5.7 \pm 0.3 ^a | 5.9 \pm 0.2 ^a |
| 14 d | 21.3 \pm 0.1 | 5.8 \pm 0.2 ^a | 6.5 \pm 0.5 ^a |
| 21 d | 21.9 \pm 0.1 | 8.9 \pm 0.6 ^a | 13.4 \pm 0.2 ^{ab} |

表注: 与假手术组比较, ^a $P < 0.05$; 与模型组比较, ^b $P < 0.05$ 。

表2 各组大鼠大脑组织神经细胞凋亡数目 ($\bar{x} \pm s$, $n=15$, 细胞凋亡数)
Table 2 Number of neural cell apoptosis in the rat brain tissue of each group

| 组别 | 28 d |
|------|--------------------------------|
| 假手术组 | 17.54 \pm 3.23 |
| 模型组 | 24.47 \pm 4.34 ^a |
| 针刺组 | 20.63 \pm 3.78 ^{ab} |

表注: 与假手术组比较, ^a $P < 0.05$; 与模型组比较, ^b $P < 0.05$ 。

3 讨论 Discussion

研究表明, 设计幼鼠脑池内注射脂多糖, 联合颈内动脉结扎和低氧环境制作脑瘫模型, 结果明显加重缺血缺氧所致的幼鼠脑组织损伤; 在孕鼠体内注射脂多糖致宫内感染联合出生后缺血缺氧的造模方法复制脑瘫模

型, 结果大鼠运动功能明显异常(包括自主性和强迫性运动), 并且造成双侧大脑半球的皮质、皮质下及其附近白质, 豆状核、黑质损伤。此类模型相对其他类模型制作方法更为全面的体现脑瘫的多病因联合治病的特点, 从病因学角度能更全面的反映脑瘫的病理生理过程^[3-4]。

针刺在脑瘫治疗中有广泛应用, 脑瘫大鼠的运动功能评估方法包括斜坡实验^[5-6], 触觉刺激实验、悬吊实验 Y 迷宫实验以及水迷宫实验等^[7-8]。脑瘫大鼠的神经功能低下, 针刺治疗可以明显增加脑瘫动物的神经功能, 针刺治疗联合其他治疗方法也可以更好的改善脑瘫动物的神经功能^[9-10]。

针刺可以影响脑瘫动物的脑血流量, 增加脑血流量, 并且可以减轻大脑组织水肿^[11]。

研究表明针刺治疗可以改善脑瘫的大脑微循环。脑瘫动物经过缺血缺氧损伤后, 有部分细胞发生变形坏死, 出现细胞凋亡, 经过针刺治疗脑瘫动物的神经病细胞的变形坏死以及细胞凋亡有减轻趋势^[12], 大脑组织形态也不断恢复^[13], 大脑质量增加, 萎缩减轻^[14]。

针刺治疗可以提高 APT 酶的活性, 减轻大脑的病理变化。大脑缺血缺氧后氧自由基的产生和清除失衡, 产生大量氧自由基, 引起大脑组织损伤, 针刺治疗后脑组织中的氧自由基下降, 可以减少对脑组织的损伤^[15-16]。

脑缺血缺氧后, 大脑组织发生细胞凋亡, 损伤神经细胞, 参与神经细胞凋亡的有 Bcl-2 家族以及 Caspase 家族, Bcl-2 家族包括促进细胞凋亡成员、抑制细胞凋亡成员以及死亡蛋白, 其中促进细胞凋亡成员和抑制细胞凋亡成员的比例失衡是影响神经细胞凋亡的主要因素, 脑瘫时促进细胞凋亡成员增加, 抑制细胞凋亡成员减少^[17], 针刺可以提高抑制细胞凋亡成员的表达, 同时降低促进细胞凋亡成员的表达, 可以有效减少脑瘫神经细胞的凋亡。另外针刺可以影响突触结构^[18]、影响神经递质的含量^[19-20]、影响神经营养因子的表达等^[21]。总之针刺可以从细胞凋亡、自由基代谢、病理形态学改变等多个环节治疗脑瘫。

细胞凋亡是一个复杂的生理生化过程, 在疾病的发生发展过程中起着重要作用, 机体细胞凋亡受多种因素调控^[22], 过多或者过少的细胞凋亡对人体都是有害的, 如何控制或者加速细胞凋亡是治疗疾病的新的方法^[23]。

细胞凋亡的检测技术有 ELISA 法、形态学检测法、线粒体膜电位检测法、电泳法、流式细胞术检测法、电化学法等多种方法, 其中比较常用的有: ①形态学检测

法: 形态学检测法是检测细胞凋亡的金标准, 主要在光学显微镜、电镜以及原位末端缺口标记法(TUNEL)下观察细胞形态, 光学显微镜借助细胞染色进行观察, 电镜可以看到细胞结构的变化, 是最经典的方法, 是判断细胞凋亡的金标准^[24], 电镜可以区分细胞凋亡和坏死^[25], 细胞凋亡表现为核裂解、浓缩, 染色体凝聚、胞浆收缩, 可以见到凋亡小体。光镜和电镜只能定性, 不能够进行定量。TUNEL 将分子生物学与免疫组化相结合检测细胞凋亡, 可以对细胞凋亡进行定量检测。②流式细胞仪检测法: 流式细胞仪检测法能够区分凋亡早期细胞、凋亡晚期细胞和坏死细胞, 除了可以对凋亡细胞定性, 还可以对凋亡细胞定量, 并且操作简单, 但该方法使用仪器昂贵, 实验比较麻烦, 需要获得细胞悬液才能检测^[26]。

细胞凋亡检测技术在针刺治疗中有广泛应用, 在针刺治疗神经系统疾病中, 用 TUNEL 法检测脑缺血再灌注大鼠模型中神经元的凋亡, 发现针刺可以减少神经元凋亡, 对神经元有保护作用^[27-28], TUNEL 法检测大脑中动脉梗死模型中神经元的凋亡情况, 发现针灸可以减少海马区细胞凋亡, 改善大鼠的学习记忆能力^[29], 在大脑中动脉栓塞大鼠模型中, 针刺督脉可以减少神经细胞凋亡, 改善大脑缺血缺氧损伤^[30], TUNEL 法检测脑挫伤大鼠模型发现针刺能够减少大脑神经细胞凋亡, 减少大脑坏死面积^[31]。

吴至凤等^[32]发现针刺可以减少宫内窘迫脑损伤大鼠的伸进细胞凋亡。

刘振寰等^[33]发现针刺可以减少脑瘫大鼠模型海马区和做大脑额叶皮质的神经细胞凋亡数量, 增强神经生长因子表达, 保护脑瘫大鼠的脑组织。

杨俊等^[34]发现针刺可以减少癫痫大鼠模型的海马区神经元的凋亡。

刘忠锦等^[35]和朱晶等^[36]发现电针能够改善阿尔茨海默病大鼠的神经功能, 可能和抑制细胞凋亡有关。

陆征宇等^[37]发现针刺可以减少帕金森病小鼠模型的纹状体神经元细胞凋亡, 改善帕金森病的症状, 针刺还可以抑制帕金森大鼠旋转模型黑质神经细胞凋亡^[38-39]、抑制海洛因成瘾大鼠模型的脑海马神经细胞和 VTA 神经细胞的凋亡, 保护神经组织的损伤^[40-43]。在细胞凋亡的多种检测方法中, 对针刺作用的研究中 TUNEL 检测法应用的最多。

研究通过建立脑瘫大鼠动物模型, 对其进行针刺治疗, 观察大鼠治疗后的神经功能变化, 并对脑瘫大鼠的大脑组织进行苏木精-伊红染色, 观察脑瘫大鼠的大脑

组织病理形态学改变, 以及神经细胞的凋亡情况, 结果发现: 模型组大鼠各时间段的运动功能评分均明显低于假手术组($P < 0.05$), 表明大鼠脑瘫模型制作成功。针刺组大鼠各时间段的运动功能评分也明显低于假手术组($P < 0.05$)。假手术组的运动功能评分随着时间的延长没有明显变化, 模型组和针刺组随着时间的延长运动功能评分有所增加, 其中模型组增加不明显, 针刺组第 21 天时运动功能评分增加比较明显, 表明针刺治疗可以改善大鼠的运动功能评分, 针刺组在第 7 天和第 14 天时的运动功能评分和模型组没有差别($P > 0.05$), 针刺组在第 21 天时的运动功能评分明显高于模型组($P < 0.05$)。表明针刺治疗可以改善脑瘫大鼠的运动功能评分。模型组大鼠大脑苏木精-伊红染色结果显示细胞排列紊乱, 局部有炎症细胞浸润, 见囊性变, 神经细胞数量减少, 并有变性坏死, 胶质细胞增生, 细胞核固缩, 部分神经细胞有空腔形成, 胞体缩小, 结构模糊或者消失; 假手术组大鼠大脑苏木精-伊红染色结果显示细胞的形态和结构均未见异常; 针刺组大鼠大脑苏木精-伊红染色结果显示细胞形态和结构变化介于假手术组和模型组之间。在神经细胞凋亡方面, 模型组的神经细胞凋亡数目明显高于假手术组($P < 0.05$); 针刺组的神经细胞凋亡数目也明显高于假手术组($P < 0.05$); 但针刺组的神经细胞凋亡数目明显低于模型组, 两者比较差异有显著性意义($P < 0.05$)。

由此可见, 针刺治疗可以改善脑瘫大鼠的神经功能, 减少脑瘫大鼠的神经细胞凋亡, 对脑瘫大鼠的神经细胞有保护作用。

作者贡献: 设计、评估为第一作者, 实施为全体作者。

利益冲突: 所有作者共同认可文章内容不涉及相关利益冲突。

伦理问题: 实验动物在戊巴妥钠麻醉下进行所有的手术, 并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。

文章查重: 文章出版前已经过 CNKI 反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审: 文章经国内小同行外审专家双盲外审, 符合本刊发稿宗旨。

作者声明: 第一作者对研究和撰写的论文中出现的不良行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁, 可接受核查。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署

了版权相关协议。

4 参考文献 References

- [1] Rice, et al. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. *Ann Neurol.* 1981; 9(2):131-141.
- [2] 李忠仁. 实验针灸学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2003: 329.
- [3] 李登宇, 李洪涛, 潘志华, 等. 脑瘫动物模型研究进展[J]. 中国康复, 2010, 25(3): 227-229.
- [4] Tan JL, Zheng XR, Zhang SS, et al. Response of the sensorimotor cortex of cerebral palsy rats receiving transplantation of vascular endothelial growth factor 165-transfected neural stem cells. *Neural Regen Res.* 2014; 9 (19): 1763-1769.
- [5] 付强, 祁岩超, 唐纯志, 等. 针刺和神经干细胞联合治疗脑瘫幼鼠的效果评价[J]. 湖南中医药大学学报, 2011, 31(6): 51-53.
- [6] 刘颖, 邹丽萍. 电针对缺氧缺血性脑损伤幼鼠大脑皮质血流的影响[J]. 实用儿科临床杂志, 2011, 26(3): 198-200.
- [7] 迟瑛娇, 李晓捷, 李莹. 针刺对宫内感染致脑损伤仔鼠脑组织胶质纤维酸性蛋白表达的影响[J]. 实用儿科临床杂志, 2007, 22(15): 1168-1169.
- [8] 孔妍, 唐强, 朱路文, 等. 缺氧缺血性脑损伤后针康法对幼鼠学习记忆能力及海马微管相关蛋白-2 表达的影响[J]. 中国康复理论与实践, 2011, 17(4): 310-312.
- [9] 闫丙川, 刘合玉, 贾天明, 等. 针刺对缺氧缺血性脑损伤大鼠保护作用的实验研究[J]. 神经疾病与精神卫生, 2005, 5(1): 33-35.
- [10] Liu Y, Zou LP, Du JB, et al. Electro-acupuncture protects against hypoxic-ischemic brain-damaged immature rat via hydrogen sulfide as a possible mediator. *Neurosci Lett.* 2010; 485(1): 74-78.
- [11] 丁春华, 刘焕荣, 张少丹, 等. 针灸治疗幼鼠缺血缺氧性脑病的实验研究[J]. 中国应用生理学杂志, 2005, 21(4): 400-401.
- [12] 吴至凤, 温恩懿, 赵聪敏, 等. 针刺对发育期脑损伤大鼠脑组织细胞凋亡及 Bcl-2、Bax 蛋白表达的影响[J]. 重庆医学, 2010, 39(21): 2898-2900.
- [13] 黄雄昂, 刘继明, 唐绍灿. 电针对窒息脑瘫幼鼠海马、纹状体和运动皮质 GAP-43 表达的影响[J]. 山东大学学报: 医学版, 2009, 47(9): 44-48.
- [14] 祁岩超, 刘振寰, 柴铁劬, 等. 针刺抑制幼鼠 HIBD 脑组织神经细胞凋亡的实验研究[J]. 中国实用神经疾病杂志, 2011, 14(15): 1-4.
- [15] Li MK, Li YJ, Zhang CF, et al. Acupuncture for ischemic stroke: cerebellar activation may be a central mechanism following Deqi. *Neural Regen Res.* 2015; 10 (12): 1997-2003
- [16] Zou W, Chen QX, Sun XW, et al. Acupuncture inhibits Notch1 and Hes1 protein expression in the basal ganglia of rats with cerebral hemorrhage. *Neural Regen Res.* 2015; 10(3): 457-462.

- [17] 马晓丽,张丽华,张士岭,等. EP对HIBD 新生大鼠脑组织 BCL-2及BAX 表达的影响[J].中国伤残医学, 2012, 20(1): 24-25.
- [18] 刘波,唐强,邢艳丽,等. 头穴丛刺结合环境刺激对缺氧缺血性脑损伤新生大鼠海MAP-2和p38 表达影响的实验研究[J].针灸临床杂志, 2011, 27(2): 63-65.
- [19] 刘振寰,潘佩光,赵勇,等. 电针对脑性瘫痪幼鼠脑组织单胺类神经递质的影响[J].中国中医基础医学杂志, 2007, 13(8):619-620.
- [20] 杨进廉,宋军,杨金蓉.不同针刺部位对痉挛大鼠模型脑及脊髓内神经递质含量的影响[J]. 针灸临床杂志, 2008, 24(2): 37-39.
- [21] 王风波,李晓捷,唐明薇. 电针对先天性脑损伤仔鼠脑组织脑源性神经生长因子表达的影响[J].中国中西医结合儿科学,2011,3(3): 213-215.
- [22] Hengarter M O.The biochemistry of apoptosis. Nature. 2000;407:770-776.
- [23] Cho SH,Chung KS,Choi JH,et al. Compound K, a metabolite of ginseng saponin,induces apoptosis via caspase-8-dependent pathway in HL-60 human leukemia cells.BMC Cancer.2009;449.
- [24] 佟俊杰,张广耘,袁晓.细胞凋亡检测方法的研究进展[J].口腔医学,2010,30(7):437-439.
- [25] HuertaS,GouletEJ,Huerta-YePezS,LivingstonEH.Sere ning and detection of apoptosis.JSurg Res.2007;139(I):143-56.
- [26] 李春丰,江清林,庄树文,等.白毒鹅膏菌毒素诱导小鼠肝细胞凋亡的DNA凝胶电泳分析[J].信息科技, 2010,18(11): 5,19.
- [27] 王占奎,张连城,赵淑华,等. “调神通络” 针法对脑缺血大鼠大脑皮层蛋白激酶表达的影响[J].针刺研究, 2012, 37(4): 312-317.
- [28] 张晓明,瞿涛,左朝,等. 电针对局灶性脑缺血再灌注大鼠迟发性细胞凋亡的影响[J].湖北中医药大学学报, 2012, 14(4):3-5.
- [29] 彭兴甫,彭英,朱德军,等. 针灸对脑梗死大鼠患侧海马 CA1 区 Bcl-2 的影响及其与学习记忆的关系[J].西部医学,2010,22(12):2204-2206.
- [30] 罗文舒,吴永刚,杨卓欣,等. 针刺督脉对局灶性脑缺血大鼠脑组织 TNF-amRNA表达的影响[J].中国中医急症,2012, 21(4):572-573.
- [31] 张毅敏,唐纯志,程少冰,等. 针刺对脑挫伤大鼠脑组织坏死面积及脑细胞凋亡的影响[J].中医杂志,2010,51(6): 528-530.
- [32] 吴至凤,温恩懿,赵聪敏,等. 针刺对发育期脑损伤大鼠脑组织细胞凋亡及Bcl-2、Bax 蛋白表达的影响[J].重庆医学, 2010,39(21):2898-2900.
- [33] 刘振寰,潘佩光,祁岩超,等. 通督醒神针刺法对脑性瘫痪幼鼠脑组织神经细胞凋亡及神经生长因子蛋白表达的影响[J].中医药临床杂志,2010,22(1):36-40.
- [34] 杨俊,黄远桂,徐江涛.电针预处理抑制癫痫持续状态诱发的海马区神经元凋亡研究[J].辽宁中医药大学学报, 2011, 13(3):104-106.
- [35] 刘忠锦,刘丹阳,张海燕,等.电针对阿尔茨海默病大鼠学习记忆及海马基质金属蛋白酶-2,9 的影响[J].中国当代医药,2013,20(13):15-16.
- [36] 朱晶,邵水金,崔国红,等.电针血清对 β 淀粉样蛋白损伤原代培养大鼠海马神经元的保护作用[J].中国中医药信息杂志,2013,20(10):38-40.
- [37] 陆征宇,赵虹,汪涛,等. 针刺对帕金森病小鼠行为学及纹状体神经元凋亡的影响[J].针刺研究,2012,37(3):187-190.
- [38] 王彦春,程宇核,马骏,等. 电针对帕金森病大鼠黑质细胞形态及凋亡的影响[J].针刺研究,2010,35(6):415-421.
- [39] 赵宇辉,孙忠人,黄亮,等. 针灸对震颤麻痹大鼠行为学和细胞的凋亡的影响[J]. 世界中西医结合杂志,2010,5(3): 209-211.
- [40] 蔡兴慧,宋小鸽,张荣军,等. 针刺对海洛因复吸大鼠脑神经元超微结构变化的影响[J].中国药物依赖性杂志, 2012, 21(1):26-29.
- [41] 王念,张荣军,宋小鸽,等. 针刺对海洛因复吸大鼠脑神经细胞凋亡的影响[J].安徽中医学院学报,2013,32(5): 44-48.
- [42] 潘贵书、金寰.电针对海洛因成瘾大鼠海马细胞凋亡的影响[J].遵义医学院学报,2011,34(3):230-232.
- [43] 金寰,潘贵书,许家洲.电针对海洛因成瘾大鼠 PAG 内细胞凋亡和 caspase-3表达的影响[J].神经解剖学杂志, 2010,26(6):647-651.