

电针干预面神经压榨模型大鼠促进面神经的再生

https://doi.org/10.12307/2022.358

费静¹, 陶美惠², 李雷激¹

投稿日期: 2020-11-10

送审日期: 2020-11-13

采用日期: 2021-03-18

在线日期: 2021-09-15

中图分类号:

R459.9; R318; R245

文章编号:

2095-4344(2022)11-01728-06

文献标识码: B

文章快速阅读:

SD大鼠随机分为3组:

- (1) 正常组: 不做处理;
- (2) 模型组: 制作面神经压榨损伤模型;
- (3) 电针组: 造模后进行电针治疗。

术后4, 14, 28 d检测相关指标:

- (1) 大鼠面瘫症状并评分;
- (2) 大鼠面神经元形态及尼氏体变化;
- (3) 大鼠面神经元中血管内皮生长因子的表达部位、强度;
- (4) 大鼠面神经元中血管内皮生长因子、ERK、p-ERK蛋白表达水平。

文章描述—

△电针可上调血管内皮生长因子在面神经元中的表达, 促进压榨损伤所致周围性面瘫症状的恢复, 其机制可能与激活MAPK/ERK信号通路, 发挥面神经元的保护作用有关。

文题释义:

血管内皮生长因子: 又称血管通透因子, 是一种高度特异性的促血管内皮细胞生长因子, 具有促进血管通透性增加、细胞外基质变性、血管内皮细胞迁移、增殖和血管形成等作用, 在缺血性中枢病变以及周围神经损伤修复过程中发挥着重要作用。

MAPK信号通路: 丝裂原活化蛋白激酶是细胞内的一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 能被多种外环境所激活, 通过三级酶促级联反应进行信号转导, 参与细胞增殖、分化、转化及凋亡等细胞生物学反应。

摘要

背景: 电针可促进面神经再生, 但其机制不明。血管内皮生长因子是一类可促进血管再生、增加血管通透性的细胞因子。

目的: 观察电针对SD大鼠面神经颊支压榨损伤所致周围性面瘫的治疗效果, 探究血管内皮生长因子/MAPK/ERK信号通路在上述过程中的作用。

方法: 56只SD大鼠随机分成正常组(8只)、模型组(24只)、电针组(24只)。模型组和电针组均制作右侧面神经颊支压榨损伤模型, 电针组术后每日于右侧“颊车”“地仓”穴行电针治疗, 术后4, 14, 28 d, 记录各组大鼠面瘫症状并评分, 观察面神经元的形态及尼氏体变化, 血管内皮生长因子的表达部位、强度以及血管内皮生长因子、ERK、p-ERK蛋白在面神经组织中的表达水平。

结果与结论: ①模型组面瘫症状改善不如电针组明显, 行为学评分在各时间点均低于电针组; ②电针组面神经元尼氏体的形态恢复较模型组早且完全; ③在术后各时间点电针组血管内皮生长因子的表达均高于模型组及正常组, p-ERK蛋白的表达均高于模型组, 自术后14 d开始高于正常组; ④结果表明, 电针可上调血管内皮生长因子在面神经元中的表达, 促进压榨损伤所致的周围性面瘫的恢复, 其机制可能与激活MAPK/ERK信号通路, 发挥面神经元的保护作用有关。

关键词: 电针; 面神经元; 颊车; 地仓; 血管内皮生长因子; 信号通路; 大鼠

Electroacupuncture promotes facial nerve regeneration in a rat model of facial nerve crush

Fei Jing¹, Tao Meihui², Li Leiji¹

¹Department of Otorhinolaryngology, Head and Neck Surgery, The Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, Sichuan Province, China;

²Department of Otolaryngology, Chengdu Shuangliu District First People's Hospital, Chengdu 610200, Sichuan Province, China

Fei Jing, Master, Attending physician, Department of Otorhinolaryngology, Head and Neck Surgery, The Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, Sichuan Province, China

Corresponding author: Li Leiji, Master, Chief physician, Department of Otorhinolaryngology, Head and Neck Surgery, The Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, Sichuan Province, China

Abstract

BACKGROUND: The mechanism of electroacupuncture to promote facial nerve regeneration is unknown. Vascular endothelial growth factors (VEGF) are a type of cytokines that can promote revascularization and increase vascular permeability.

OBJECTIVE: To observe the therapeutic effect of electroacupuncture on peripheral facial paralysis induced by crush injury of the buccal facial nerve in Sprague-Dawley rats, and to explore the role of VEGF/mitogen-activated protein kinase (MAPK)/extracellular signal-regulated kinase (ERK) signaling pathway in the above process.

¹西南医科大学附属医院耳鼻咽喉头颈外科, 四川省泸州市 646000; ²成都市双流区第一人民医院耳鼻咽喉科, 四川省成都市 610200

第一作者: 费静, 女, 1989年生, 四川省成都市人, 汉族, 2017年西南医科大学毕业, 硕士, 主治医师, 主要从事面神经疾病的基础与临床研究。

通讯作者: 李雷激, 硕士, 主任医师, 西南医科大学附属医院耳鼻咽喉头颈外科, 四川省泸州市 646000

https://orcid.org/0000-0002-9531-7400 (李雷激)

基金资助: 泸州-西南医大合作项目基金资助(2017LZXNYD-J34), 项目负责人: 李雷激

引用本文: 费静, 陶美惠, 李雷激. 电针干预面神经压榨模型大鼠促进面神经的再生[J]. 中国组织工程研究, 2022, 26(11):

1728-1733.



METHODS: Sprague-Dawley rats were randomly divided into a normal group (8 rats), a model group (24 rats) and an electroacupuncture group (24 rats). The facial nerve crush injury models were established in the model and the electroacupuncture groups. Rats in the electroacupuncture group then received electroacupuncture treatment at the right "Jiache" and "Dicang" acupoints every day after the operation. At 4, 14, and 28 days after the operation, the symptoms of facial paralysis in the rats of each group were recorded and scored. The morphology and Nissl body changes of facial motoneurons were observed. The expression site and intensity of VEGF as well as the expression levels of VEGF, ERK, and p-ERK proteins in facial motoneurons were measured.

RESULTS AND CONCLUSION: The improvement of facial paralysis in the model group was not as obvious as that in the electroacupuncture group, and the behavioral scores were lower than those in the electroacupuncture group at all time points. The morphological recovery of facial motoneurons and Nissl bodies in the electroacupuncture group was earlier and more complete than that in the model group. The protein expressions of VEGF at all time points in the electroacupuncture group were higher than those in the normal and model groups. The expression of p-ERK in the electroacupuncture group was higher than that in the model group, and began to be higher than that in the normal group at 14 days after operation. To conclude, electroacupuncture can up-regulate the expression of VEGF in facial motoneurons and promote the recovery of peripheral facial paralysis caused by crush injury. The mechanism may be related to the activation of MAPK/ERK signaling pathway and the protective effect on facial motoneurons.

Key words: electroacupuncture; facial motoneuron; Jiache; Dicang; vascular endothelial growth factor; signaling pathway; rat

Funding: the Luzhou-Southwestern Medical University Cooperative Project, No. 2017LZXNYD-J34 (to LLJ)

How to cite this article: FEI J, TAO MH, LI LJ. Electroacupuncture promotes facial nerve regeneration in a rat model of facial nerve crush. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu.* 2022;26(11):1728-1733.

0 引言 Introduction

面神经损伤导致的周围性面瘫可影响患者的容貌，对其身心健康、工作及生活质量造成较大的威胁。对于神经连续性未中断的患者，除外科治疗外，目前多采用激素类、营养神经类、活血化瘀类等中西药治疗，虽可缓解症状，但临床效果并不理想，预后较差^[1]。神经再生的血供以及被修复神经的组织床血运情况，都直接影响神经再生的质量^[2]。面神经压榨损伤会导致神经缺血缺氧，因而，恢复面神经的血运供应，可恢复面神经元活性，从而促进面神经再生。

血管内皮生长因子是由 SENER 等^[3]发现的一类细胞因子，可促进血管再生，在缺血性中枢病变以及周围神经损伤的发病和修复过程中发挥着重要作用^[4]。缺血或低氧是诱导血管内皮生长因子表达的最主要因素^[5]，但对其信号传导的下游机制尚未达成共识，AKT 及 ERK 途径均起到重要作用^[6]。ERK 为 MAPK 信号通路之一，目前研究血管内皮生长因子 /MAPK/ERK 信号通路与周围面神经损伤的文献较少。针灸尤其是电针治疗周围面神经损伤有一定优势，但机制尚不清楚^[7]。既往研究已经表明电针可以通过上调神经营养因子、神经黏附分子在面神经元的表达来促进面神经修复^[8-9]。电针促进局部血供的机制研究尚属空白。该研究通过建立 SD 大鼠右侧面神经颊支压榨损伤模型，探讨电针在损伤面神经修复过程中对血管内皮生长因子介导的 MAPK/ERK 信号通路的影响。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机分组对照动物实验。

1.2 时间及地点 实验于 2018 年 1 月至 2019 年 2 月在西南医科大学实验动物中心以及西南医科大学附属医院中心实验室完成。

1.3 材料 由西南医科大学实验动物中心提供 56 只成年雄性 SD 大鼠，体质量 200–250 g，喂养条件：每笼 6 只，55%–65% 相对湿度，室温 21–22 °C，12 h 光照循环，专用动物饲料喂养，除术前禁饮禁食 6–8 h，其余进食与及饮水量不受限制。实验动物操作得到西南医科大学伦理协会的批准 (批

准号：201909-5)，并根据《实验动物管理和使用指导建议》执行。

1.4 实验方法

1.4.1 动物分组 将 SD 大鼠随机分为 3 组：正常组 ($n=8$)、模型组 ($n=24$)、电针组 ($n=24$)。模型组和电针组实验动物按术后取材时间 (4, 14, 28 d) 再分为 3 个组，每个时间点 8 只。

1.4.2 模型制作 参考牙祖蒙等^[10]面神经压榨损伤方法造模：2% 戊巴比妥钠按 50 mg/kg 用量对模型组和电针组 SD 大鼠进行腹腔注射麻醉，右侧面部备皮，体积分数 75% 乙醇常规消毒，铺巾，在右侧耳屏前与嘴角连线、瞳孔正下方约 1 cm 位置，做一长约 2 cm “弧形”切口，止血钳钝性分离，暴露长 1.0–2.0 cm 面神经颊支，以蚊氏钳满扣夹持，长度约 1 cm，持续 30 s，松开 30 s，再夹持 30 s，逐层缝合皮肤。所有操作均由同一人完成。术后 3 d 在饮水中加入罗红霉素预防感染。

组织工程实验动物造模过程的相关问题

造模目的	制造面神经压榨性损伤模型
选择动物的基本资料	西南医科大学实验动物中心提供成年雄性 SD 大鼠
动物数量及分组方法	56 只 SD 大鼠，随机分为 3 组：正常组 ($n=8$)、模型组 ($n=24$)、电针组 ($n=24$)。模型组和电针组实验动物按术后取材时间 (4, 14, 28 d) 再分为 3 个组，每个时间点 8 只
造模技术描述	模型组和电针组 SD 大鼠进行腹腔注射麻醉，右侧面部备皮，体积分数 75% 乙醇常规消毒，铺巾，在右侧耳屏前与嘴角连线、瞳孔正下方约 1 cm 位置，做一长约 2 cm “弧形”切口，止血钳钝性分离，暴露长 1.0–2.0 cm 面神经颊支，以蚊氏钳满扣夹持，长度约 1 cm，持续 30 s，松开 30 s，再夹持 30 s，逐层缝合皮肤
造模成功评价指标	通过瞬目反射、触须运动和鼻尖位置进行面瘫评价，3 项总分为 0 为完全性面瘫，总分 ≤ 3 为不完全性面瘫
造模后取材及观察指标	取面神经元组织，苏木精-伊红染色观察神经元形态，尼氏染色观察尼氏小体变化，免疫组化测定血管内皮生长因子的表达，Western blot 检测血管内皮生长因子、ERK、p-ERK 蛋白的表达水平
伦理委员会批准	该实验经西南医科大学伦理协会批准 (批准号：201909-5)

1.4.3 电针干预 电针组大鼠在造模当天开始进行电针治疗, 1次/d, 每次30 min。根据中医所提倡的辨经配穴, 选用与面神经研究较多的穴位(“地仓”: 口角外侧1.0 cm; “颊车”: 下颌角前上方咬肌最丰隆处中心点)。穴位定位参照《动物针灸穴位图谱》, 命名则根据国际标准“腧穴名称与定位”GB/T12346-2006^[11]。采用青岛鑫升G6805-1A型电针治疗仪, 华佗牌0.19 mm×10 mm针灸针, 斜刺约5 mm。治疗参数: 电流40-50 μA, 电压2 V, 频率18-20 Hz, 疏密波, 强度以颊肌轻微颤动为宜。

1.4.4 大鼠面瘫症状评分 术后4, 14, 28 d, 通过瞬目反射、触须运动和鼻尖位置对各组大鼠进行面瘫评价^[12]。①瞬目反射: 距大鼠右眼2 cm处, 用5 mL注射器针头向右眼迅速吹入空气, 观察眼睑闭合情况(0分: 患侧眼睑不能闭合; 1分: 患侧眼睑较对侧延迟闭合; 2分: 双侧眼睑闭合大致对称, 无明显差异); ②触须运动: 大鼠双侧触须运动连续计数30 s(0分: 患侧触须主动运动消失, 并出现抖动; 1分: 患侧触须运动较对侧明显减弱; 2分: 双侧触须运动无明显差异); ③鼻尖位置(0分: 鼻尖偏向对侧; 1分: 鼻尖居中)。3项总分为0为完全性面瘫, 总分≤3为不完全性面瘫。

1.4.5 取材 正常组直接取材, 模型组和电针组分别于术后4, 14, 28 d取材。动物腹腔麻醉后, 固定、备皮、消毒, 沿腹部正中剪开皮肤、腹膜, 寻找腹主动脉, 丝线缝扎; 剪开胸部皮肤和胸骨、心脏包膜, 输液针通过左心室尖插入主动脉, 剪开大鼠的右心耳, 快速灌注约300 mL生理盐水, 40 g/L多聚甲醛继续灌注预固定。根据《大鼠脑立体定位图谱》^[12-14], 横断颈椎, 剪开颈后皮肤、皮下和肌肉, 咬骨钳咬除颅骨、颞骨, 去除大小脑及颅神经根, 将脑干、延髓放于显微镜下, 自小脑中脚处横切脑干, 修去两侧椎体, 切取向后延伸约3 mm区段包含面神经核团的脑干区段, 一部分置于40 g/L多聚甲醛固定, 制备石蜡切片, 从连续切片中每间隔5张取1张进行切片染色, 另一部分含有面神经元的脑组织快速分装于冻存管内, 于超低温冰箱(-80℃)冻存, 用于Western blot实验。

1.4.6 苏木精-伊红染色 切片常规脱蜡水化, 苏木精染液(苏木精-伊红染色试剂盒, 北京索莱宝)染色10 min, 自来水冲洗, 分化液分化30 s, 50℃温水浸泡5 min, 伊红染液染色1 min, 自来水冲洗、浸泡3 min, 脱水, 透明, 封固, 显微镜下观察面神经元的位置及形态变化。

1.4.7 尼氏染色 切片常规脱蜡水化, 将切片置于甲酚紫染色液(尼氏染色液试剂盒, 北京索莱宝), 56℃浸染1 h, 去离子水冲洗, 置于尼氏分化液中分化15 s, 无水乙醇迅速脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封固, 镜下观察面神经元尼氏体变化。

1.4.8 免疫组化染色 将切片置于67℃烤片1 h后常规脱蜡至水, 高压抗原热修复后0.01 mol/L PBS洗涤, 体积分数3% H₂O₂ 孵育10 min 灭活内源性酶, 双蒸水及0.01 mol/L PBS冲洗, 滴加5%BSA封闭液室温孵育30 min进行抗原封闭, 滴加血管

内皮生长因子抗体(碧云天, 上海, 稀释至1:200), 4℃过夜, 0.01 mol/L PBS冲洗3次, 滴加二抗(辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠IgG, 碧云天, 上海), 37℃孵育30 min, 0.01 mol/L PBS洗3次, DAB显色, 滴加苏木精染液, 0.5%氨水返蓝10 s, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封固, 显微镜下观察面神经元的位置和神经元的染色情况。每只大鼠取3张切片在同等条件下进行图像采集, 使用Image-Pro Plus 6.0进行分析、计算平均吸光度值。

1.4.9 Western blot 检测 取面神经元组织与混合蛋白裂解液按100 mg:1 000 μL的比例匀浆, 4℃, 12 000 r/min离心30 min, 取上清液, BCA法测定蛋白浓度(BCA试剂盒, 碧云天, 上海), 调整蛋白上样浓度为5 g/L, 10%SDS-PAGE凝胶电泳分离蛋白, 每条泳道上样量为40 μg, 浓缩胶80 V电泳30 min, 分离胶120 V电泳60 min, 恒定电压进行电泳, 电泳后采用半干转电转印仪转膜, 0.3 A恒定电流转膜45 min, 5%脱脂奶粉室温封闭2 h, TBST漂洗3次, 5 min/次, 加入一抗(血管内皮生长因子兔多克隆抗体、p-ERK1/2兔多克隆抗体、ERK1/2兔多克隆抗体), 4℃孵育过夜, TBST漂洗3次, 加入辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG(碧云天, 上海, 稀释比例为1:5 000), 室温孵育1 h, TBST洗膜, 置于ECL混合液中, 曝光, 显影、定影。以GAPDH(碧云天, 上海)为内参, Image J图像处理软件对目的条带进行灰度分析。以目的基因的灰度值/内参基因的灰度值得出目的基因相对表达量, 再进行相应的统计学分析。

1.5 主要观察指标 ①大鼠面瘫症状评分; ②苏木精-伊红染色观察面神经元形态; ③尼氏染色观察面神经元尼氏小体变化; ④免疫组化观察面神经元组织中血管内皮生长因子的阳性表达; ⑤Western blot检测面神经元组织中血管内皮生长因子、ERK、p-ERK的蛋白表达。

1.6 统计学分析 所有数据采用SPSS 19.0进行统计分析, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 实验所用56只SD大鼠均进入最终的结果分析。

2.2 动物面瘫症状观察及评分 正常组大鼠无周围性面瘫表现, 评分为5分; 电针组和模型组大鼠造模后均呈现不同程度的周围性面瘫表现, 如鼻尖歪斜、口角下垂、眼睑闭合不全、触须拂动及瞬目反射减弱等。术后4 d, 电针组与模型组周围性面瘫表现无明显差别, 面瘫评分均显著降低, 之后两组评分逐渐上升, 电针组均较模型组高($P < 0.001$), 至术后28 d, 电针组基本接近正常组, 评分与正常组差异无显著性意义($P > 0.05$), 而模型组触须拂动不明显, 大鼠鼻尖歪斜、眼睑闭合不全、瞬目反射较前有所改善, 但改善程度不及电针组, 见图1。

2.3 面神经元定位及尼氏体变化 苏木精-伊红染色用于定位面神经元。正常面神经元位于脑桥中下部,低倍镜下呈大多角形细胞聚集,高倍镜下可见胞质淡红色,胞核蓝色居中,见图2。尼氏染色显示:正常组面神经元胞质染色均匀,尼氏体呈紫色“虎斑”样,胞核居中。术后4 d,模型组和电针组均出现神经元胞体皱缩,胞内染色不均,尼氏体减少、模糊甚至消失;术后14 d,电针组尼氏体再现,呈细颗粒状,模型组大部分细胞内仍有结构模糊;术后28 d,电针组胞体大小及尼氏体形态基本恢复至术前,模型组逐渐恢复,可见部分细胞出现细颗粒状尼氏体,见图3。

2.4 面神经元中血管内皮生长因子的表达部位及强度 免疫组化染色血管内皮生长因子阳性表达于面神经元的胞浆中,正常组大鼠面神经元中血管内皮生长因子表达呈低水平。术后模型组和电针组血管内皮生长因子的表达呈逐渐增加然后维持高水平,各时间点电针组均高于模型组,3组大鼠面神经元中血管内皮生长因子的平均吸光度值差异有显著性意义($P < 0.001$),见图4。

2.5 面神经元中血管内皮生长因子、ERK、p-ERK 蛋白表达 面神经损伤后,模型组与电针组血管内皮生长因子蛋白表达逐渐增强,均明显高于正常组。术后各时间点,电针组血管内皮生长因子蛋白表达均高于模型组,差异有显著性意义($P < 0.001$)。ERK 蛋白表达在3组之间差异无显著性意义($P > 0.05$)。术后4 d,模型组与电针组 p-ERK 蛋白表达稍低于正常组,但电针组高于模型组;术后14 d,电针组与模型组 p-ERK 蛋白表达均明显高于正常组,且电针组高于模型组;术后28 d,两组 p-ERK 蛋白表达下降,但电针组仍然维持在一个高于正常表达的水平($P < 0.001$),见图5。

3 讨论 Discussion

卡压是周围神经常见、多发的损伤方式,如何最大程度地减轻卡压神经继发性损害,重建神经传导,目前尚未能很好解决。近年来,运用物理疗法治疗周围神经损伤已多有报道^[15]。该实验采取压榨损伤方式进行周围性面瘫模型制作,取针刺治疗面瘫的常用穴位,即“颊车”“地仓”,进行疏密波刺激,促进血液循环及局部运出代谢废物,消除组织的炎性水肿及调节组织的营养供应^[16-17]。观察期内各时间点,电针组大鼠面瘫评分均高于模型组,至术后28 d,电针组大鼠的面瘫评分与正常组无差异,提示电针作为干预手段,可促进神经功能迅速康复,这与既往的研究一致^[18-19]。电针虽是周围面神经损伤的有效治疗方法,但作用机制尚未得到证实^[20]。有证据表明电针可通过促进相关分子的表达^[21],如神经生长因子^[22]、脑源性神经营养因子^[23]、胶质源性神经营养生长因子^[7]、上皮钙黏素和钙调素等^[24],激活多种信号通路,改善面部血液循环,调节患者面部肌肉的营养状况^[25],从而加速面神经损伤的修复。李欢欢等^[26]提出面神经损伤后出现不同程度的血流量减少及血液黏稠度增高,针

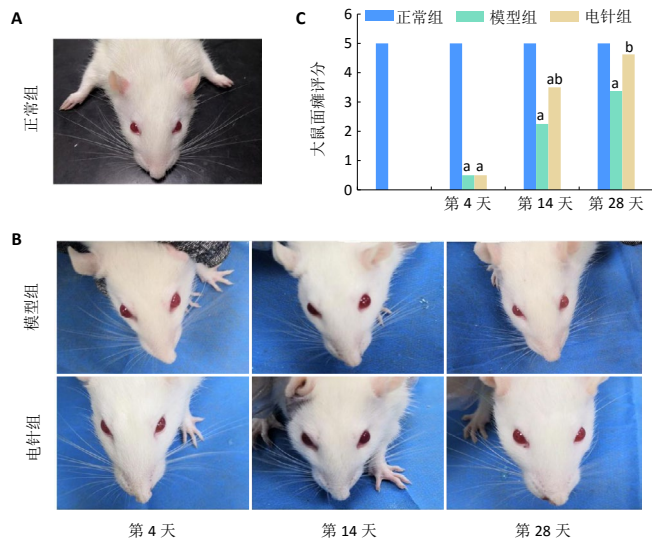
刺可促进其恢复至正常,这可能是针刺干预促进面神经损伤修复的血流动力学机制。

中枢神经元的存活是神经再生和修复的基础。尼氏体可作为观察神经元功能状态的灵敏指标。压榨术后两组均出现胞体收缩,胞内结构模糊,尼氏体减少、模糊甚至消失的病理变化,观察期内电针组尼氏体恢复较模型组早且完全,可见电针治疗发挥了面神经元保护的作用。神经元胞体的存活亦依靠轴突功能的完整,卡压所致的神经局部缺血可使其轴浆运输减慢或停止,使神经细胞胞体与靶器官之间的信息和物质传递受阻,从而产生逆行性胞体变性^[27]。因而,充足的血液供应是形成神经再生最佳微环境的关键因素^[28]。

血管内皮生长因子是血管生成过程中的重要调节因子,可增加血管通透性,刺激血管内皮细胞表达,诱导血管生成^[29]。王薇等^[30]在大鼠脑缺血模型中发现电针组神经细胞存活数较模型组显著增加,其中血管内皮生长因子免疫染色显著增强。该实验中,正常组大鼠面神经元中血管内皮生长因子表达量少,模型组大鼠面神经元中血管内皮生长因子呈现出逐渐增加的趋势,高于正常组,说明血管内皮生长因子通过某种途径发挥神经营养作用,促进新生血管生成。这与钟树志等^[31]对于大鼠坐骨神经损伤的研究结果相似,电针组术后各时间点血管内皮生长因子的蛋白表达逐渐增强,且高于模型组,与免疫组化结果契合,说明电针对面神经元的保护作用可能与上调面神经组织中血管内皮生长因子的表达有关,可能是通过上调神经元自分泌或者影响其旁分泌,也可能是电针促进周围轴突的损伤修复,靶组织来源的血管内皮生长因子通过修复的轴突运输到神经元。

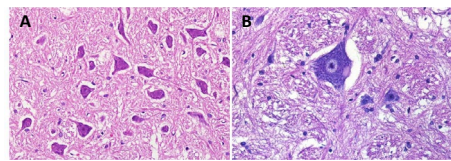
血管内皮生长因子表达上调可激活下游的 MAPK/ERK 信号通路^[32],在周围神经损伤再生中起重要作用,不仅可促进神经再生,还可抑制神经元凋亡及局部炎症反应^[33]。因此,作者推测电针治疗能够通过上调血管内皮生长因子的表达活化 MAPK/ERK 通路,发挥面神经元保护作用。该研究结果支持上述观点,模型组与电针组 MAPK/ERK 通路标志蛋白 p-ERK 在术后4 d 出现少量下降,与面神经颊支受压榨后轴浆逆行性转运受阻有关,随后模型组亦出现 p-ERK 蛋白表达增强,提示面神经损伤后面神经元具有自我恢复神经功能的能力,电针治疗后 p-ERK 蛋白表达量在每个时间点均强于模型组,至术后28 d,仍维持在一个高于正常组表达的水平,且大鼠行为学表明术后28 d 时大鼠周围性面瘫症状恢复优于模型组。

综上,电针可促进压榨损伤所致的周围性面瘫的恢复,其可能是激活血管内皮生长因子介导的 MAPK/ERK 信号通路,从而发挥神经元保护作用。但是,电针对面神经元微环境的具体调节机制,例如是直接作用于血管内皮生长因子分子还是间接作用于其他的信号通路,尚需进一步探讨。



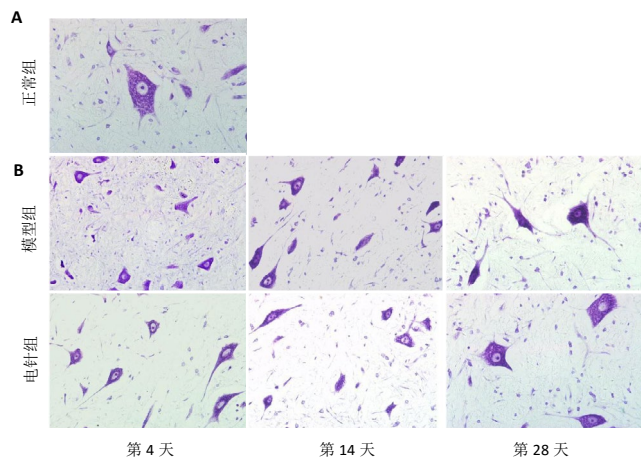
图注：图中 A 为正常大鼠，无面瘫症状；B 为模型组和电针组大鼠在术后 4, 14, 28 d 的面瘫表现（鼻尖位置）；C 为大鼠的面瘫症状评分：正常大鼠无面瘫，评分为 5 分；术后 4 d，模型组和电针组面瘫评分均显著降低，与正常组比较， $^aP < 0.001$ ；之后两组评分逐渐上升，电针组均较模型组高（ $^bP < 0.001$ ），至术后 28 d，电针组与正常组无差异（ $P > 0.05$ ）

图 1 | 各组大鼠行为学表现
Figure 1 | Rat behavior assessment



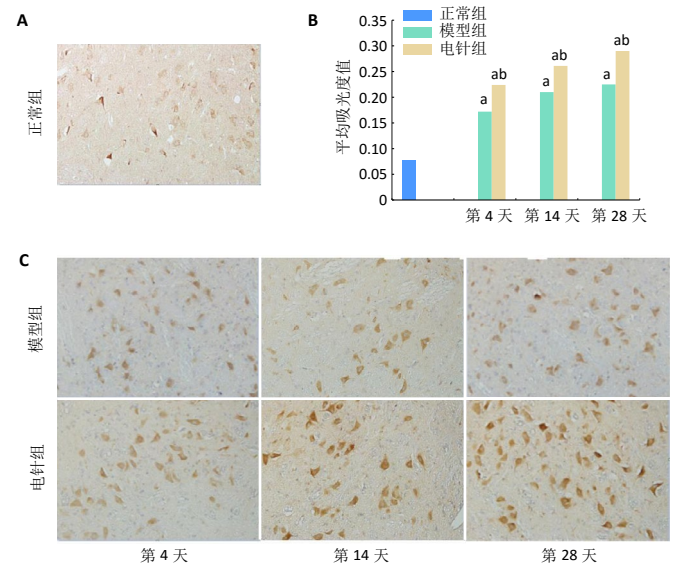
图注：图中 A 为低倍镜下正常面神经元的形态（ $\times 200$ ），可见多角形神经元成团聚集；B 为高倍镜下正常面神经元的形态（ $\times 400$ ），可见面神经元胞质淡红色，胞核蓝色居中

图 2 | 苏木精-伊红染色定位面神经元
Figure 2 | Location of facial motoneurons with hematoxylin-eosin staining



图注：图中 A 为正常组面神经元呈大多角形，胞质染色均匀，尼氏体呈紫色“虎斑”样，胞核居中；B 为术后 4 d，模型组和电针组均出现神经元胞体皱缩，胞内染色不均，尼氏体减少、模糊甚至消失；术后 14 d，电针组尼氏体再现，呈细颗粒状，模型组大部分细胞内仍有结构模糊；术后 28 d，电针组胞体大小及尼氏体形态基本恢复至术前，模型组逐渐恢复，可见部分细胞出现细颗粒状尼氏体

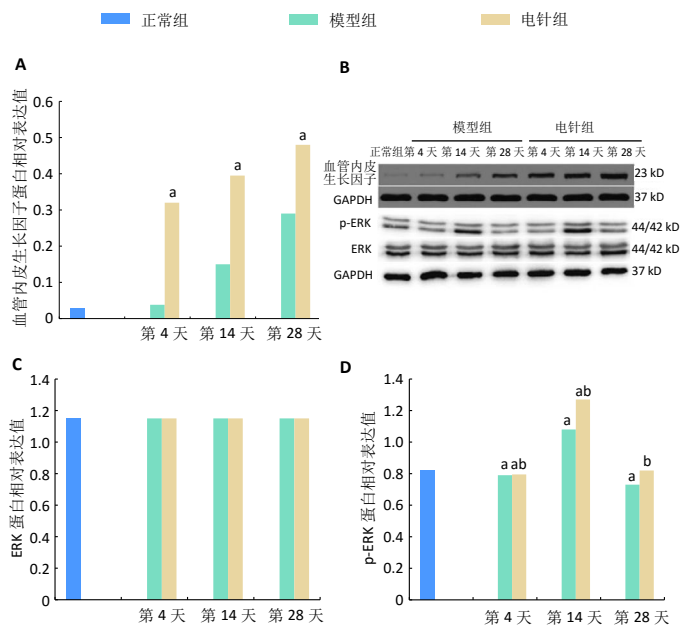
图 3 | 各组大鼠面神经元尼氏体变化（尼氏染色， $\times 400$ ）
Figure 3 | Nissl staining of rat facial motoneurons and Nissl bodies ($\times 400$)



图注：图中 A, C 为正常组、模型组和电针组大鼠面神经血管内皮生长因子免疫组化染色；B 为 3 组大鼠面神经中血管内皮生长因子的平均吸光度值，模型组血管内皮生长因子的平均吸光度值高于正常组（ $^aP < 0.001$ ），电针组血管内皮生长因子的平均吸光度值逐渐增高，且在每个时间点均高于模型组（ $^bP < 0.001$ ）

图 4 | 各组大鼠面神经中血管内皮生长因子的表达（免疫组化染色， $\times 200$ ）

Figure 4 | Immunohistochemical analysis of vascular endothelial growth factor expression in rat facial motoneurons ($\times 200$)



图注：图中 A 为血管内皮生长因子的蛋白表达，可见电针组面神经组织中血管内皮生长因子的蛋白表达呈上升趋势，与模型组和正常组比较， $^aP < 0.001$ ；B 为 3 组各时间点血管内皮生长因子、ERK、P-ERK 及内参 GAPDH 的表达条带；C 为 ERK 的蛋白表达，可见 3 组术后各个时间点 ERK 蛋白表达无明显差异（ $P > 0.05$ ）；D 为 p-ERK 的蛋白表达，与正常组比较， $^aP < 0.001$ ，与模型组比较， $^bP < 0.001$

图 5 | 各组大鼠面神经组织中血管内皮生长因子、ERK、p-ERK 的蛋白表达

Figure 5 | The expression of vascular endothelial growth factor, extracellular signal-regulated kinase, and phosphorylated extracellular signal-regulated kinase proteins in rat facial motoneurons

作者贡献: 实验设计及评估为李雷激、费静, 实验实施为陶美惠、费静, 文章资料收集为费静, 由费静成文, 李雷激审核并对文章负责。

经费支持: 该文章接受“泸州-西南医大合作项目(2017LZXNYD-J34)”的资助。所有作者声明, 经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突: 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

机构伦理问题: 动物实验获西南医科大学动物实验伦理委员会批准, 批准号为 201909-5。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。实验动物在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。

写作指南: 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

文章查重: 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审: 文章经小同行外审专家双盲外审, 同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

生物统计学声明: 文章统计学方法已经通过西南医科大学生物统计学专家审核。

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。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- [1] 吴芳. 复方甘露醇联合糖皮质激素类药物对重度面神经炎疗效及对面神经功能的影响 [J]. 当代医学, 2020, 26(29): 98-100.
- [2] 姜国华, 张玉瑶, 王吉锡, 等. 面神经损伤的针刺效应与面神经核胆碱乙酰转移酶的关系 [J]. 解剖学杂志, 2007, 30(4): 465-467.
- [3] SENGER DR, VAN DE WATER L, BROWN LF, et al. Vascular permeability factor (VPF, VEGF) in tumor biology. *Cancer Metastasis Rev.* 1993; 12(3-4): 303-324.
- [4] ZHANG N, CHEN J, FERRARO GB, et al. Anti-VEGF treatment improves neurological function in tumors of the nervous system. *Exp Neurol.* 2018; 299(Pt B): 326-333.
- [5] 王朋朋, 李志娟, 邢适颖, 等. VEGF 对小鼠急性心肌梗死后心肌细胞缺血损伤的保护作用 [J]. 中国循证心血管医学杂志, 2020, 12(9): 1071-1074.
- [6] 周经霞, 陈琳, 陈攀璨, 等. 血管内皮生长因子通过 PI3K-Akt 和 MAPK-ERK 通路促进脑梗死大鼠血管新生机制 [J]. 中国老年学杂志, 2019, 39(15): 3749-3752.
- [7] 童威, 何剑波, 张文岐, 等. 电针对面神经损伤兔面神经核中 GDNF、CHAT 表达的影响 [J]. 现代中西医结合杂志, 2018, 27(12): 1278-1282.
- [8] 李雷激, 徐超然, 覃纲, 等. 面神经损伤后面神经核中神经型钙黏附分子及胎盘型钙黏附分子的表达 [J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(37): 5978-5982.
- [9] 费静, 郑红弟, 余莉亚, 等. 胶质细胞源性神经营养因子 /PI3K/AKT 通路参与电针促进面神经压榨损伤模型兔的面神经再生 [J]. 中国组织工程研究, 2020, 24(7): 1094-1100.
- [10] 牙祖蒙, 王建华, 周渝, 等. 穴位针刺对面神经再生影响的动物模型制作 [J]. 实验动物科学与管理, 1999, 16(1): 15-17.
- [11] 谭亚芹, 马昕婷, 王琦, 等. 国家标准《腧穴名称与定位》(GB/T 12346-2006) 使用情况调查研究 [J]. 中国针灸, 2016, 36(8): 871-874.
- [12] 张丽丽. 丙戊酸对面神经切断伤后面运动神经元凋亡的影响及机制研究 [D]. 济南: 山东大学, 2018.
- [13] 徐进旺, 李爱民, 刘希光, 等. 米诺环素对大鼠面神经缺血损伤模型面运动神经元细胞凋亡及 Bcl-2、Bax 表达的影响 [J]. 实用医学杂志, 2015, 31(23): 3826-3830.
- [14] 朱翥. 面神经离断伤后核团微环境中 NG2 蛋白表达和 NG2 阳性细胞反应的研究 [D]. 上海: 第二军医大学, 2010.
- [15] 张珊珊, 杜震生, 陈峰, 等. 电针联合康复训练对大鼠受压坐骨神经微血管生成的影响 [J]. 针灸临床杂志, 2015, 31(8): 65-67.
- [16] CHA MH, NAM TS, KWAK Y, et al. Changes in cytokine expression after electroacupuncture in neuropathic rats. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2012; 2012: 792765.
- [17] 周浪. 电针联合梅花针治疗周围性面瘫的临床观察 [J]. 中国医疗器械信息, 2020, 26(16): 164-165.
- [18] 胡慧, 冯同忠. 针灸推拿结合中药汤剂牵正散加减治疗面瘫临床观察 [J]. 临床医药文献电子杂志, 2018, 5(42): 170-171.
- [19] 胡立丹, 吴林. 针灸穴位注射结合中药熏蒸治疗顽固性面瘫观察 [J]. 中华中医药学刊, 2018, 36(12): 3032-3035.
- [20] 王照钦. 电针介入治疗周围性面瘫时机的临床与机制研究 [D]. 济南: 山东中医药大学, 2017.
- [21] 王丹丹, 谯凤英. 拔罐法与针灸疗法结合治疗周围性面瘫的研究进展 [J]. 湖南中医杂志, 2018, 34(1): 188-190.
- [22] 牙祖蒙, 王建华, 李忠禹, 等. 穴位电针刺激对面神经再生过程中表情肌组织神经生长因子 mRNA 表达的影响 [J]. 中华物理医学与康复杂志, 2000, 22(3): 157-159.
- [23] 姜国华, 卫彦, 单丽莉, 等. 穴位电刺激对周围性面神经损伤兔面神经核中 BDNF 的影响 [J]. 针灸临床杂志, 2006, 22(1): 44-46.
- [24] 费静, 王长黎, 李雷激. 电针对面神经损伤后上皮钙黏素和钙调素在面神经元中表达的影响 [J]. 实用医学杂志, 2019, 35(1): 51-55.
- [25] 李小娟, 赵中亭, 朱田田, 等. 针刺促进面神经损伤修复的机制研究进展 [J]. 针刺研究, 2018, 43(1): 60-62.
- [26] 李欢欢, 侯书伟. 针刺“髓会穴组”治疗面瘫后遗症的临床观察 [J]. 针灸临床杂志, 2014, 31(8): 12-14.
- [27] 薛景凤, 李健, 王笑茹. 面神经局部缺血对其超微结构的影响 [J]. 解剖学杂志, 2008, 31(6): 838-840.
- [28] 刘春影, 周延民. 血小板浓缩物促进周围神经再生的研究进展 [J]. 口腔医学研究, 2020, 36(6): 509-511.
- [29] PARK SA, JEONG MS, HA KT, et al. Structure and function of vascular endothelial growth factor and its receptor system. *BMB Rep.* 2018; 51(2): 73-78.
- [30] 王薇, 缪化春, 吴锋, 等. 天麻多糖结合电针抑制脑缺血大鼠 Meynert 基底核神经元损伤和上调 BDNF、SCF 及 VEGF 表达 [J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2017, 26(2): 122-128.
- [31] 钟树志, 晁杲, 周静, 等. 复元活血汤对大鼠损伤坐骨神经组织 VEGF、TGF-β1 表达的影响 [J]. 中药药理与临床, 2016, 32(5): 4-8.
- [32] CERVELLINI I, GALINO J, ZHU N, et al. Sustained MAPK/ERK Activation in Adult Schwann Cells Impairs Nerve Repair. *J Neurosci.* 2018; 38(3): 679-690.
- [33] HUANG F, CAO J, LIU Q, et al. MAPK/ERK signal pathway involved expression of COX-2 and VEGF by IL-1β induced in human endometriosis stromal cells in vitro. *Int J Clin Exp Pathol.* 2013; 6(10): 2129-2136.

(责任编辑: MZH, ZN, SX)