

电针对高血压大鼠皮层脑梗死延髓与脊髓 NgR 表达的影响

谭 峰 陈 杰 梁艳桂 李雁萍 王学文 蒙 迪 程南方

摘要 **目的** 观察电针对易卒中型肾性高血压大鼠(stroke-prone renovascular hypertensive rats, RHRSP)大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)后缺血再灌注(ischemia-reperfusion, I/R)不同时间点脑皮层、延髓、脊髓勿动蛋白受体(nogo receptor, NgR)蛋白表达的影响,探讨电针对急性脑梗死(acute cerebral infarction, ACI)远隔损害的可能机制。**方法** 雄性 SPF 级 SD 大鼠行双肾双夹术复制 RHRSP,再用线栓法制作 MCAO 模型,用随机数字表法分为高血压组 60 只、假手术组 60 只、脑梗死组 60 只、电针组 60 只、假针刺组 60 只。脑梗死组仅作 MCAO 缺血再灌注处理;假手术组仅做手术创伤;电针组选取督脉“百会”和“大椎”穴进行电针治疗,每天 1 次,共 28 天。假针刺组选“大椎”、“百会”穴处给予针灸针贴肤治疗。治疗后第 1、7、14、28 天各组分别处死 6 只大鼠,分离出右侧大脑、延髓和左侧脊髓,用尼氏染色法检测脑梗死体积,用 Western blot 法检测 NgR 表达。**结果** (1)皮层区:与高血压组比较,MCAO 术后第 1、7、14、28 天,脑梗死组 NgR 表达升高($P < 0.05$);与脑梗死组比较,MCAO 术后第 1 天,电针组和假针刺组 NgR 表达与其相当($P > 0.05$);第 7、14、28 天,电针组 NgR 表达降低($P < 0.05$),假针刺组 NgR 表达与其相当($P > 0.05$)。(2)延髓区:与高血压组比较,MCAO 术后第 1 天,假手术组、脑梗死组、电针组、假针刺组 NgR 表达与其相当($P > 0.05$);第 7、14、28 天脑梗死组 NgR 表达升高($P < 0.05$);与脑梗死组比较,第 7、14、28 天电针组 NgR 表达降低($P < 0.05$);假针刺组 NgR 表达与其相当($P > 0.05$)。(3)脊髓区:与高血压组比较,MCAO 术后第 1、7 天,假手术组、脑梗死组、电针组、假针刺组 NgR 表达与其相当($P > 0.05$);第 14、28 天脑梗死组 NgR 表达升高($P < 0.05$)。与脑梗死组比较,第 14、28 天电针组 NgR 表达降低($P < 0.05$);假针刺组 NgR 表达与其相当($P > 0.05$)。**结论** 大鼠脑梗死后皮层、延髓、脊髓区 NgR 表达增高是参与 ACI 远隔损害的一个重要原因,电针对高血压大鼠 I/R 脑损伤的保护作用可能与其下调中枢神经髓鞘生长抑制介导因子 Nogo-A 受体 NgR 蛋白表达等机制密切相关。

关键词 高血压大鼠;脑梗死;远隔损害;勿动蛋白受体;电针

Effect of Electric Acupuncture on the Expression of NgR in the Cerebral Cortex, the Medulla Oblongata, and the Spinal Cord of Hypertensive Rats after Cerebral Infarction TAN Feng, CHEN Jie, LIANG Yan-gui, LI Yan-ping, WANG Xue-wen, MENG Di, and CHENG Nan-fang *Department of Neurology, Foshan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangdong (528000), China*

ABSTRACT **Objective** To observe the effect of electric acupuncture (EA) on the Nogo receptors (NgR) protein expression in the cerebral cortex, the medulla oblongata, and the spinal cord of cerebral ischemia-reperfusion (I/R) stroke-prone renovascular hypertensive rats (RHRSP) with middle cerebral artery occlusion (MCAO) at different time points, and to investigate its possible mechanisms for remote-organ injury of acute cerebral infarction (ACI). **Methods** The RHRSP model was duplicated in male SPF grade SD rats. Then the MCAO model was prepared by a thread stringing method. Rats were divided into the hypertension group, the sham-operation group, the MCAO group, the EA group, and the sham-acupoint group by random number table method, 60 in each group. Rats in the MCAO group only received

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81072947);广东省自然科学基金资助项目(No.8152800007000001)

作者单位:广东省佛山市中医院神经内科(广东 528000)

通讯作者:谭 峰, Tel: 0757-83061223, E-mail: tanfeng8208@163.com

DOI: 10.7661/CJIM.2014.03.0334

MCAO reperfusion treatment. Those in the sham-operation group only received surgical trauma. Baihui (DU20) and Dazhui (DU14) were needled in the EA group, once daily for a total of 28 days. The needles were acupunctured at the skin one cun distant from Baihui (DU20) and Dazhui (DU14) and then the same EA treatment was performed in the sham-acupoint group. At day 1, 7, 14, 28 after treatment, six rats were executed from each group, and their right cortex and medulla oblongata, and the left spinal cord were isolated. The infarct volume was detected by Nissl's staining method. The NgR expression was detected by Western blot. Results (1) In the cortex area: compared with the hypertension group, the NgR expression increased in the MCAO group at day 1, 7, 14, and 28 after MCAO ($P < 0.05$). Compared with the MCAO group, the NgR expression of the EA group and the sham-acupoint group were equivalent at 1 day after MCAO ($P > 0.05$). At day 7, 14, and 28 after MCAO, the NgR expression decreased in the EA group ($P < 0.05$), it was quite similar to that in the sham-acupoint group ($P > 0.05$). (2) In the medulla oblongata area: compared with the hypertension group, the NgR expression was equivalent in the sham-operation group, the MCAO group, the EA group, and the sham-acupoint group at 1 day after MCAO ($P > 0.05$). At day 7, 14, and 28 after MCAO, the NgR expression increased in the MCAO group ($P < 0.05$). Compared with the MCAO group, the NgR expression decreased in the EA group at day 7, 14, and 28 after MCAO ($P < 0.05$), whereas it was similar in the sham-acupoint group ($P > 0.05$). (3) In the spinal cord area: compared with the hypertension group, the NgR expression was equivalent in the sham-operation group, the MCAO group, the EA group, and the sham-acupoint group at day 1 and 7 after MCAO ($P > 0.05$). At day 14 and 28 after MCAO, the NgR expression increased in the MCAO group ($P < 0.05$). Compared with the MCAO group, the NgR expression decreased in the EA group at day 14 and 28 after MCAO ($P < 0.05$), whereas it was equivalent in the sham-acupoint group ($P > 0.05$). Conclusions Increased NgR expression in the cerebral cortex, the medulla oblongata, and the spinal cord of cerebral infarct rats was an important reason for involving remote-organ injury of ACI. The protective effect of EA on hypertensive I/R cerebral injury rats might be closely related to down-regulating central nervous system myelin growth inhibition mediated factors Nogo-A receptor NgR protein expression.

KEYWORDS hypertensive rat; cerebral infarction; remote-organ injury; Nogo receptor; electric acupuncture

最近研究证实,急性脑梗死造成的损害并不限于梗死灶局部,还会导致与梗死区域有神经纤维联系的远隔部位(丘脑、延髓、脊髓等)的损害^[1-4],这是导致脑梗死病损严重、致残率高、恢复困难的重要原因。勿动蛋白-A(neurite outgrowth inhibitor-A, Nogo-A)是新近发现最为强烈的神经纤维再生抑制因子,通过与其受体 NgR 等结合,介导跨膜信号激活(Ras homolog gene family member A, RhoA)胞内信号和抑制 Ras 相关的 C3 肉毒毒素底物 1(Ras-related C3 botulinum toxin substrate1, Rac1)信号传导,参与 ACI 远隔损害,抑制轴突的生长、细胞的扩增和诱导生长锥的塌陷,最终阻碍神经修复和再生^[5-7]。我们前期研究发现,电针对高血压脑缺血的保护作用可能与其下调 Nogo-A、neurocan-mRNA 表达等有关^[8,9],但电针对 Nogo-A 的 NgR 受体蛋白有何作用?能否通过调控此受体通路蛋白起到减轻脑梗死远隔损害、促进神经功能恢复?这些问题目前国内外尚

未见报道。因此,在前期基础上,本实验通过观察电针对易卒中型肾性高血压大鼠(stroke-prone-renal-vascular hypertensive rats, RHRSP)一侧大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)脑缺血再灌注(ischemia reperfusion, IR)第 1、7、14、28 天脑皮层、延髓、脊髓 NgR 表达的影响,探讨电针对脑梗死远隔损害作用的可能获益机制。

材料与方法

1 动物 封闭群纯种 SPF 级 Sprague-Dawley (SD)雄性大鼠 480 只,体重(70 ± 20)g,鼠龄 30d 左右[合格证号:scxk(粤)2008-0020],由广州中医药大学实验动物中心提供。在安静环境下分笼饲养,室温(23 ± 1)℃,相对湿度 60%,光线自动控制,明(07:00-19:00)、暗(19:00-07:00)交替,统一用颗粒型普通大鼠饲料喂养,饮用凉开水,自由摄食条件下适应性喂养 7 天。

2 药物及试剂 10%水合氯醛;10%福尔马林;40%丙烯酰胺/甲叉双丙烯酰胺(Acr/Bis),5 mmol/L Tris-HCl (pH 8.8),1.0 mmol/L Tris-HCl (pH 6.8),均购自 Bio-Rad 公司;Temed:购自德国,为 Sigma 分装;TBST 缓冲液[100 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5,含 0.9% (w/v) NaCl 和 0.1% Tween-20]:购自 BioRad(1706435);2%的氯化-2,3,5-三苯四唑(2,3,5 triphenyltetrazolium chloride, T TC)(美国 Sigma 公司);100 mmol/L PMSF(苯甲基磺酰氟,北京诺博莱德科技有限公司)。

3 仪器 DP-1 型大鼠心率血压计(中日友好医院研制);G68051 型电针仪(青岛鑫升公司);Leica 全自动脱水机(江苏爱择实验设备有限公司);Kontron IBAS 2.0 全自动图像分析系统(德国 KONTRON 公司);JVC ky-F30b 3-CCD 彩色图像摄录输入仪(日本胜利公司)。

4 实验方法

4.1 RHRSP 模型制作 将 480 只体重 70 ~ 90 g 的雄性 SD 大鼠参照双肾双夹法复制成 RHRSP 模型^[10,11]。具体步骤如下:术前 12 h 禁食,不禁水,用 10%水合氯醛(3 mL/kg,腹腔注射)麻醉后,将大鼠仰卧固定,常规腹部备皮、消毒、铺巾,取腹部正中纵形切口,长约 2.0 cm,打开腹腔,以肾静脉为标记,依次钝性分离出双侧肾动脉,用内径为 0.3 mm 的环形银夹钳夹肾动脉起始部,并确认肾动脉置于银夹的环形结构内。为预防感染,予腹腔内注射青霉素钠盐 4 万 U,然后逐层关腹并再次消毒切口。术中避免损伤肾动脉、肾静脉、腹主动脉和内脏器官。术后注意保温,待麻醉清醒后即恢复正常饮食,密切观察大鼠腹部切口、肢体活动、呼吸、饮食及尿液颜色等情况。

使用 SDP-1 型大鼠心率血压计进行血压监测,术前测量 1 次作为基础血压,术后第 1、2、4、6、8、10、12 周各监测血压 1 次。测量前使用风筒给大鼠尾巴预热 5 min,然后将大鼠归于笼中,尾巴置入测压橡胶圈,待大鼠安静后测量清醒状态下大鼠尾动脉的收缩压,重复测量 3 次,取其平均值作为大鼠的血压值。术后 12 周,将收缩压高于 180 mmHg,且无自发卒中征象的大鼠作为成功的 RHRSP 模型^[10,11],共 370 只。

4.2 MCAO 术复制脑梗死模型 将符合制作 MCAO 模型的 RHRSP 参照 Zea Longa 方法^[12,13]加以改进,制备右侧大脑 MCAO 模型:即术前 12 h 禁食,10%水合氯醛(0.3 mL/kg)腹腔注射麻醉,仰卧位固定,作颈正中切口,沿胸锁乳突肌内缘分离肌肉

和筋膜,分离右侧颈总动脉(CCA)、颈外动脉(ECA)和颈内动脉(ICA),在 CCA 远心端和近心端及 ECA 处挂线备用。用微动脉夹暂时夹闭 ICA,然后近心端结扎 CCA、ECA。在距 CCA 分叉部 2 mm 处剪一小口,插入直径为 0.28 mm 的栓线,开放动脉夹,将栓线插入到 ICA,插入深度以颈外动脉分叉处开始计算为(18.0 ± 0.5)mm,用绕在 CCA 远心端的细线轻轻系牢栓线,缝合伤口,清理血迹。将栓线外留 2 cm 以备拔线时使用,于栓线插入 2 h 后拔出。

模型成功标准:参考 Zea Longa 的 5 分制法^[14],在动物麻醉清醒后进行评分。0 分:无神经损伤症状;1 分:不能完全伸展对侧前爪;2 分:向对侧转圈;3 分:向对侧倾倒;4 分:不能自发行走,意识丧失。分值越高,说明动物行为障碍越严重。其中 1 ~ 3 分纳入,共有 190 只。

T TC 染色:从纳入研究的 MCAO 大鼠中随机抽取 10 只行 T TC 染色确定梗死部位:MCAO 术后 24 h,用 10%水合氯醛过量麻醉大鼠后,立即断头取脑,放入 -20 °C 冰箱中冷冻 5 min,在冰盘上从前向后行冠状切,厚约 2 mm,立即置于 2%的 T TC 溶液中,37 °C 避光温育 30 min,10% 福尔马林固定,24 h 后数码相机拍照。

4.3 分组及处理方法 用随机数字表分为高血压组 60 只、假手术组 60 只、脑梗死组 60 只、电针组 60 只、假针刺组 60 只。高血压组:60 只大鼠仅复制 RHRSP 模型;自由进食、饮水,喂饲大鼠标准饲料;不予任何治疗。假手术组:60 只大鼠复制 RHRSP 模型,于 MCAO 术当天行颈部正中切口,沿胸锁乳突肌内缘分离肌肉和筋膜,分离右侧颈总动脉(CCA)、颈外动脉(ECA)和颈内动脉(ICA),但不进行 MCAO 术后期操作;自由进食、饮水,喂饲大鼠标准饲料;不予任何治疗。脑梗死组:60 只大鼠复制 RHRSP 基础上的 MCAO 模型;自由进食、饮水,喂饲大鼠标准饲料;不予任何治疗。电针组:60 只大鼠复制 RHRSP 基础上的 MCAO 模型;自由进食、饮水,喂饲大鼠标准饲料;按文献^[15]方法定位大鼠“百会”、“大椎”穴位。刺法:用 30 号 1 寸毫针,沿皮斜刺“大椎”、“百会”两穴,进针深度 2 ~ 3 mm。针柄接至 G68051 型电针仪电极上,强度为 3 V,频率为 3 Hz 连续波,以肌肉轻微抽动、动物不挣扎嘶叫为度,时间持续 15 min。电针组于造模当天动物清醒后开始治疗,每天 1 次,共 28 天。假针刺组:60 只大鼠复制 RHRSP 基础上的 MCAO 模型;自由进食、饮水,喂饲大鼠标准饲料;假针刺组只是将针灸针贴于大鼠相应穴位的皮肤上,后

通相同电流。

5 检测指标及方法

5.1 大鼠神经功能评分 于 MCAO 术后动物清醒时、MCAO 术后第 1、7、14、28 天进行评分,评分标准参考 Zea Longa 的 5 分制法^[14]进行。

5.2 梗死体积

5.2.1 大鼠脑和脊髓组织取材 各组大鼠在 MCAO 术后第 1、7、14、28 天进行神经功能评分后,随机抽取每个时间点大鼠 6 只,用 10% 水合氯醛腹腔注射深度麻醉后(0.4 mL/kg),快速开胸,经左心室向主动脉插管,剪开右心耳,先快速灌注生理盐水约 200 mL,待右心房流出清亮液体后再换用 10% 福尔马林灌注固定脑组织,约 300 mL 后断头取脑和脊髓,将脑和脊髓标本置于 10% 福尔马林中固定 24 h,移入 Leica 全自动脱水机脱水。

取出脑组织块,常规石蜡包埋,选取每只大鼠从前囟 +4.7 ~ -5.2 mm 的石蜡切片,进行冠状连续切片,每隔 10 片取 1 片,片厚 4 μ m,硅烷化防脱玻片捞片,60 $^{\circ}$ C 烤片 30 min,4 $^{\circ}$ C 保存备用。同时取延髓锥体交叉上右侧和左侧脊髓组织,常规石蜡包埋,进行冠状连续切片,片厚 4 μ m,硅烷化防脱玻片捞片,60 $^{\circ}$ C 烤片 30 min,4 $^{\circ}$ C 保存备用。

5.2.2 尼氏染色 选取每只大鼠从前囟 +4.7 ~ -5.2 mm 的石蜡切片,每隔 10 片取 1 片,尼氏染色检测大鼠脑梗死体积。

5.2.3 梗死灶体积分析 采用数字彩色显微图像分析系统计算每只受试大鼠梗死灶体积(mm^3)占同侧总体积(mm^3)的百分比(%)。梗死灶体积百分比(%) = (健侧大脑半球总体积 - 患侧未梗死体积) / 健侧大脑半球总体积 $\times$ 100%。

5.3 NgR 表达

5.3.1 大鼠脑和脊髓组织取材 各组大鼠在 MCAO 术后第 1、7、14、28 天进行神经功能评分后,随机抽取每个时间点大鼠 6 只,用 10% 水合氯醛腹腔注射深度麻醉后(0.4 mL/kg),快速断头开颅取脑和脊髓,除去嗅球及小脑,然后迅速分离出右侧大脑、延髓和左侧脊髓,用生理盐水洗涤后立即放入 1.5 mL 离心管中,-80 $^{\circ}$ C 保存。

5.3.2 蛋白提取及定量 在每 1 mL 冷 Lysis Buffer 加入 10 μ L 磷酸酶抑制剂,1 μ L 蛋白酶抑制剂和 5 μ L 100 mmol/L PMSF,混匀。冰上保存数分钟待用;将取材的大鼠组织转移到 1.5 mL 预冷的离心管,按 1 mL/100 mg 的量加入 Lysis Buffer,于冰上剪碎,超声破冰上碎细胞,每次 2 s,间隔 5 s,至少 60 次;离

心 10 000 r/min,4 $^{\circ}$ C 离心 5 min;取上清转移至新的预冷的离心管中,即为全蛋白提取物;分装保存于 -80 $^{\circ}$ C,避免反复冻融(因为蛋白的提取和定量使用不同的两个试剂盒,所以将其分开,使得实验步骤更清晰);配置 BCA 工作液:根据标准品和样品数量,将 Reagent A 和 Reagent B 按照 50:1 的比例配置,充分混匀(该工作液室温下 24 h 内稳定);绘制标准曲线 混匀,在 37 $^{\circ}$ C 放置 30 min,冷却到室温,测定 A560 的吸光度,根据标准曲计算出蛋白浓度。

5.3.3 蛋白样品 SDS-PAGE 电泳、转膜及蛋白印迹 (1) 蛋白样品 SDS-PAGE 电泳:采用 SDS-PAGE 垂直板电泳法^[16]。凝胶电泳前,每孔均用 1 $\times$ 电泳缓冲液清洗。内、外层电泳槽中加入 1 $\times$ 电泳缓冲液,内层槽中缓冲液液面需超过上样孔顶端 1 ~ 2 cm。蛋白样品与 SDS-PAGE loading buffer (2 $\times$) 以 1:1 混匀,100 $^{\circ}$ C 沸水浴 5 min,4 $^{\circ}$ C,13 000 r/min 离心 8 min,取上清。每个样品加样 80 μ g,Marker 上样 5 μ L。室温下,80 V 恒压电泳 100 min 左右(溴酚蓝将到胶底部停止电泳)。(2) 蛋白质转移:蛋白经过 SDS-PAGE 后,将凝胶于转膜缓冲液中浸泡 5 min,根据预染 Marker 的条带和各目的蛋白的大小,将胶切开,根据凝胶大小剪取合适大小的 0.45 μ m PVDF 膜(先用无水甲醇浸泡 5 min)、滤纸和海绵在使用前均用转膜缓冲液浸泡 30 min。按从负极到正极为海绵、2 层滤纸、凝胶、PVDF 膜、2 层滤纸、海绵的顺序做成“三明治”状,此操作必须避免气泡的产生。夹入转移槽中,灌满转移缓冲液后,低温条件下内参 β -actin 目的蛋白 100 V 恒压电转移 55 min,各目的蛋白恒压 100 V 转移,时间根据其大小进行调节。(3) 蛋白免疫印记:取出杂交膜,用 TBST 浸泡。膜用 5% 脱脂奶粉溶液室温震荡封闭 60 min。用抗体缓冲液将一抗稀释, β -actin 以 1:1 000 稀释,各目的蛋白的一抗根据其抗体说明书进行稀释。将膜分别置于一抗稀释液中 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。在摇床上用 TBST 洗膜 3 次,每次 5 min。按 1:2 500 比例稀释二抗,将膜置于二抗稀释液中室温震荡结合 50 min。TBST 洗膜 3 次,每次 5 min。膜垂直置于吸水纸上尽量吸去洗液。将膜非吸附蛋白的一面铺在玻璃板上。以 1:1 比例混合显色基质 B 液和 A 液,均匀滴加膜上,避免产生气泡,静置温育 1 min。用保鲜膜将膜拼接包好,轻轻挤出多余显色基质,放入暗盒,曝光 3、5、10 min 冲片,观察各蛋白的表达情况。(4) 图像分析 以 β -actin(43 kD)蛋白条带为参照,分别分析各组大鼠各蛋白分子量相对于 β -actin 各蛋白条

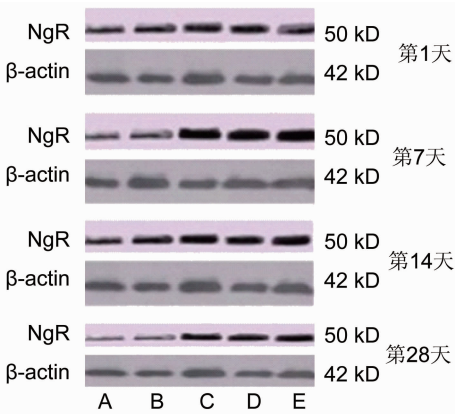
带的相对密度。全部图像采用计算机辅助软件分析系统(ImageJ)专业图像处理软件进行分析。

6 统计学方法 采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间同期比较采用单因素方差分析,两两比较行 LSD 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组大鼠不同时间点脑组织梗死体积比较(表1) 与高血压组比较,脑梗死组术后第1~7天大鼠脑梗死灶体积均逐渐增大,两组差异亦有统计学意义($P < 0.05$);与假手术组比较,脑梗死组术后第1~7天大鼠脑梗死灶体积均逐渐增大,两组差异有统计学意义($P < 0.05$);与脑梗死组比较,电针组和假针刺组术后第1~7天大鼠脑梗死灶体积均逐渐增大,第14、28天大鼠脑梗死灶体积均逐渐缩小,但各个时间点3组间差异无统计学意义($P > 0.05$);与电针组比较,假针刺组各时间点大鼠脑梗死灶体积差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2 各组大鼠不同时间点大脑皮层 NgR 蛋白含量比较(表2,图1) 与高血压组比较,MCAO 术后第1、7、14、28天脑梗死组 NgR 表达升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。与脑梗死组比较,第1天电针组和假针刺组 NgR 表达与其相当($P > 0.05$);第7、14、28天电针组 NgR 表达降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。



注:A 为高血压组;B 为假手术组;C 为脑梗死组;D 为电针组;E 为假针刺组

图1 各组大鼠不同时间点大脑皮层 NgR 含量电泳图

3 各组大鼠不同时间点延髓 NgR 蛋白含量比较(表3,图2) 与高血压组比较,第1天假手术组、脑梗死组 NgR 表达与其相当($P > 0.05$);第7、14、28天脑梗死组 NgR 表达升高($P < 0.05$)。与脑梗死组比较,第7、14、28天电针组 NgR 表达降低($P < 0.05$);假针刺组 NgR 的表达与其相当($P > 0.05$)。

4 各组大鼠不同时间点脊髓 NgR 蛋白含量比较(表4,图3) 与高血压组比较,第1、7天脑梗死组 NgR 表达与其相当($P > 0.05$);第14、28天脑梗死组 NgR 表达升高($P < 0.05$)。与脑梗死组比较,电针组第14、28天 NgR 表达降低($P < 0.05$)。

表1 各组大鼠不同时间点脑组织梗死体积比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	梗死体积(%)			
		第1天	第7天	第14天	第28天
高血压	24	0	0	0	0
假手术	24	0	0	0	0
脑梗死	24	12.36 ± 0.11 *△	20.01 ± 0.24 *△	17.18 ± 0.23 *△	14.38 ± 0.21 *△
电针	24	12.19 ± 0.15	19.54 ± 0.61	16.96 ± 0.11	13.95 ± 0.46
假针刺	24	12.24 ± 0.16	19.77 ± 0.25	17.08 ± 0.62	14.29 ± 0.37

注:与高血压组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.05$;与假手术组比较,△ $P < 0.05$,△△ $P < 0.01$

表2 各组大鼠不同时间点大脑皮层 NgR 蛋白含量比较 (%, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	皮层 NgR 蛋白含量			
		第1天	第7天	第14天	第28天
高血压	24	1.441 ± 0.270	1.499 ± 0.308	1.444 ± 0.296	1.421 ± 0.236
假手术	24	1.511 ± 0.368	1.516 ± 0.204	1.480 ± 0.243	1.450 ± 0.196
脑梗死	24	1.826 ± 0.371 *	3.825 ± 0.273 *	3.411 ± 0.198 *	2.567 ± 0.280 *
电针	24	1.807 ± 0.296	3.410 ± 0.232 △	2.881 ± 0.322 △	1.989 ± 0.274 △
假针刺	24	1.784 ± 0.228	3.660 ± 0.275	3.332 ± 0.235	2.478 ± 0.247

注:与高血压组同期比较,* $P < 0.05$;与脑梗死组比较,△ $P < 0.05$

表 3 各组大鼠不同时间点延髓 NgR 蛋白含量比较 (%, $\bar{x}\pm s$)

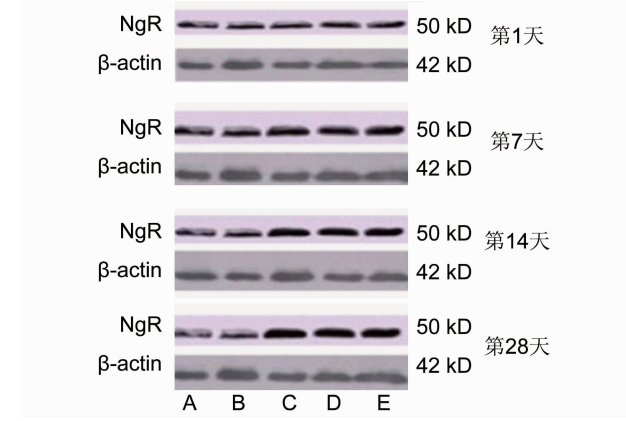
组别	n	延髓 NgR 蛋白含量			
		第 1 天	第 7 天	第 14 天	第 28 天
高血压	24	1.383 ± 0.169	1.386 ± 0.374	1.371 ± 0.281	1.379 ± 0.348
假手术	24	1.376 ± 0.283	1.394 ± 0.183	1.383 ± 0.259	1.393 ± 0.318
脑梗死	24	1.391 ± 0.278	1.538 ± 0.379 *	1.695 ± 0.270 *	1.637 ± 0.250 *
电针	24	1.388 ± 0.274	1.483 ± 0.203 Δ	1.59 ± 0.239 Δ	1.553 ± 0.345 Δ
假针刺	24	1.394 ± 0.172	1.530 ± 0.372	1.681 ± 0.331	1.628 ± 0.228

注:与高血压组比较,* $P < 0.05$;与脑梗死组比较, $\Delta P < 0.05$

表 4 各组大鼠不同时间点脊髓 NgR 蛋白含量比较 (%, $\bar{x}\pm s$)

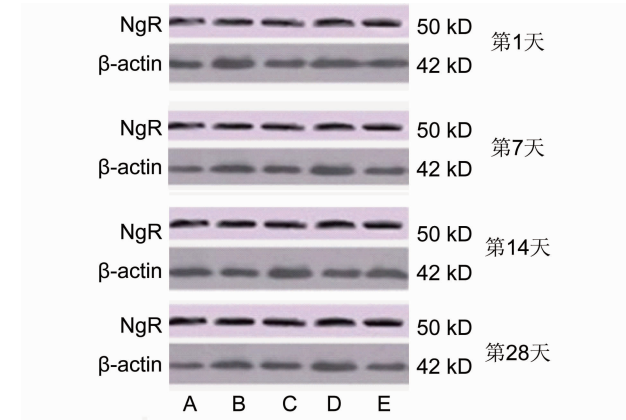
组别	n	脊髓 NgR 蛋白含量			
		第 1 天	第 7 天	第 14 天	第 28 天
高血压	24	1.239 ± 0.270	1.253 ± 0.285	1.246 ± 0.375	1.273 ± 0.263
假手术	24	1.228 ± 0.388	1.229 ± 0.229	1.235 ± 0.211	1.265 ± 0.294
脑梗死	24	1.236 ± 0.280	1.226 ± 0.321	1.325 ± 0.239 *	1.358 ± 0.274 *
电针	24	1.244 ± 0.375	1.234 ± 0.279	1.294 ± 0.293 Δ	1.315 ± 0.227 Δ
假针刺	24	1.241 ± 0.295	1.238 ± 0.204	1.311 ± 0.370	1.344 ± 0.311

注:与高血压组比较,* $P < 0.05$;与脑梗死组比较, $\Delta P < 0.05$



注:A 为高血压组;B 为假手术组;C 为脑梗死组;D 为电针组;E 为假针刺组

图 2 各组大鼠不同时间点延髓 NgR 蛋白含量电泳图



注:A 为高血压组;B 为假手术组;C 为脑梗死组;D 为电针组;E 为假针刺组

图 3 各组大鼠不同时间点脊髓 NgR 蛋白含量电泳图

讨 论

长期以来,脑梗死的临床和实验研究主要集中于梗死灶局部及其周边缺血半暗带进行,围绕着如何减少局部神经组织损伤和增强相关脑组织代偿能力展开^[17,18]。在此基础上的治疗,效果始终难以满意,究其原因,与对脑梗死后神经损伤和恢复的多重机制了解不够全面不无关系。研究证实,脑梗死治疗困难、致残率高不仅和梗死局部的神经损伤有关,还与远隔部位的继发神经损伤及再生抑制有关。新近发现,NgR 是最为强烈的神经纤维再生抑制因子,通过与受体 NgR 等结合传导抑制信号 RohA,阻碍神经再生,是造成 ACI 后遗症的重要原因^[19]。其机制为 Nogo-A 与受体 NgR 结合,通过神经元细胞膜上的糖基磷脂酰肌醇 (glycosylphosphatidylinositol, GPI) 激活其协同受体 p75 NTR、LINGO-1、TAJ (TROY) 等一种或多种分子形成受体复合物,介导神经轴索生长抑制的跨膜信号。最终胞内信号通过激活 RhoA 和抑制 Rac1 信号途径,干扰肌动蛋白排列而使生长锥塌陷,从而完成神经轴索生长抑制。实验表明大鼠实验性脑梗死在恢复期刺激梗死灶周围组织中 Nogo-A 及 NgR 表达增加,可能与脑梗死后神经再生障碍有关^[10]。Teng FY^[11]证实 Nogo-66 的受体 NgR 的拮抗剂能促进轴突再生。Li S 等^[12]研究体外使用 NgR 竞争性拮抗剂 NEP1240 (Nogo 细胞外多肽,1~40 残基)后也取得了相似的结果,并且对亚急性 CNS 损伤也有治疗效果。Lee DH 等^[13]认为以调控 NgR 为目标,可大大促进 CNS 损伤后神经元的功能恢复,逆

转其灾难性的后果。NgR 不仅是 Nogo-A 的受体,还是其他抑制性髓鞘相关蛋白的受体,在 CNS 损伤后表达明显升高,脑梗死后局部使用特异性 NgR 受体封闭治疗可明显提高神经修复,促进功能恢复。可见,NgR 似乎是 CNS 髓磷脂中各种轴突生长抑制性蛋白发挥作用的集中点^[20],这为以后 CNS 再生修复的研究提供了新的思路。

临床实践及研究进一步证实,百会、大椎穴是电针治疗脑梗死的重要穴位。李成永等^[21]针刺百会穴治疗 62 例脑中风患者,ADL 量表评分明显高于治疗前 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。纪中^[22]电针百会穴能增强局灶性脑缺血大鼠脑组织的 NGF 的表达,阻止神经细胞内 Ca^{2+} 超载。李宛青等^[23]电针百会、大椎穴后,缺血缺氧新生大鼠病灶侧海马神经元内尼氏体脱失现象较对照组明显减轻。许能贵等^[24,25]电针大椎、百会穴可直接刺激双侧大脑皮层脑干束,反射性刺激延髓麻痹部位,改善中风失语等症状,增加 bFGF 表达。我们前期研究发现^[26],早期电针督脉百会、大椎二穴可改善脑梗死大鼠神经行为学评分,缩小脑梗死面积,减轻脑水肿与缺血区神经元和血管壁超微结构损害,下调神经抑制因子 neurocan 表达,但电针对 Nogo-A 受体 NgR 表达有何影响,能否通过抑制 NgR 的表达起到减轻脑梗死远隔损害和促进 CNS 神经再生的作用?这些问题尚不清楚,国内外目前也未见翔实报道。

本研究从解剖学角度选取几个有联系的远隔损害部位(皮质、延髓、脊髓),通过观察电针对 NgR 抑制信号表达的影响,探讨脑梗死远隔损害的发生机理以及电针的治疗作用。结果发现,MCAO 术后第 1 天到第 7 天,MCAO 3 组(脑梗死组、电针组和假针刺组)大鼠脑梗死灶体积均逐渐增大,3 组间的差异无统计学意义 ($P > 0.05$),第 14、28 天,MCAO 3 组大鼠脑梗死灶体积均逐渐缩小,3 组间的差异无统计学意义 ($P > 0.05$),提示 ACI 皮层局灶损害在 MCAO 术后 1 周左右即达到顶峰,电针对 ACI 神经损伤的影响或许并非主要作用于皮层梗死灶局部,此与 Wissner C 等的研究相符^[27]。MCAO 后 4 周内,MCAO 3 组随着时间的延长,脑梗死区(右侧皮层)和远离梗死灶部位(右侧延髓和左侧脊髓前角)轴突损伤相继发生,NgR 表达的升高-回降趋势呈现出时间上、空间上(由局灶到远隔损害)相继性的改变;伴随 NgR 表达的波动,电针组 NgR 表达随时间点较脑梗死组表现为降低 ($P < 0.05$),假针刺组 NgR 表达随时间点较脑梗死组表现为相当 ($P > 0.05$)。以上提示大鼠脑梗死后,远离梗死灶的延髓和脊髓发生了继发性的损害,

NgR 表达的升高是参与 ACI 远隔损害的一个重要原因,电针对高血压大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用可能与其下调中枢神经轴突相关生长抑制因子 NgR 的表达等机制密切相关。

参 考 文 献

- [1] Rodriguez-Grande B, Blackabey V, Gittens B, et al. Loss of substance P and inflammation precede delayed neurodegeneration in the substantia nigra after cerebral ischemia[J]. Brain Behav Immun, 2013, 3(29): 51-61.
- [2] Chew DJ, Fawcett JW, Andrews MR. The challenges of long-distance axon regeneration in the injured CNS [J]. Prog Brain Res, 2012, 20(1): 253-294.
- [3] Block F, Dihne M, Loos M. Inflammation in areas of remote changes following focal brain lesion[J]. Prog Neurobiol, 2005, 7(5): 342-365.
- [4] 梁艳桂, 谭峰, 陈杰, 等. MCAO 大鼠梗死灶对侧皮层 Nogo-A 的动态变化及电针干预[J]. 中风与神经疾病杂志, 2012, 29(12): 1073-1076.
- [5] Peng XM, Zhou ZG, Hu J, et al. Soluble Nogo receptor down-regulates expression of neuronal Nogo-A to enhance axonal regeneration[J]. J Biol Chem, 2010, 28(5): 2783-2795.
- [6] Takei Y. Phosphorylation of Nogo receptors suppresses Nogo signaling, allowing neurite regeneration[J]. Sci Signal, 2009, 2(64): 14.
- [7] 谭峰, 霍绮雯, 陈强. 中枢神经系统轴突再生抑制因子 Nogo-A 的研究进展[J]. 中华神经医学杂志, 2008, 3(7): 319-321.
- [8] 梁艳桂, 谭峰, 陈杰, 等. 电针对脑缺血再灌注大鼠脑皮层超微结构及 Nogo-A 表达影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2012, 32(2): 209-213.
- [9] Tan F, Wan SY, Wu HK, et al. Expression of neurocan mRNA and ultrastructure of brain tissue after cerebral ischemia and reperfusion in stroke-prone renovascular hypertensive rats treated by electroacupuncture[J]. Neural Regenerat Res, 2011, 6(36): 2834-2838.
- [10] 葛颂. 定量检测神经生长抑制因子及受体在脑梗死大鼠脑组织中的表达[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2007, 9(9): 626-629.
- [11] Teng FY, Tang BL. Why do Nogo/Nogo-66 receptor gene knockouts result in inferior regeneration compared to treatment with neutralizing agents [J]. J Neurochem, 2005, 94(4): 865-874.
- [12] Li S, Strittmatter SM. Delayed systemic Nogo-266

- receptor antagonist promotes recovery from spinal cord injury [J]. J Neurosci, 2003, 23 (10): 4219 - 4227.
- [13] Lee DH, Strittmatter SM, Sah DW. Targeting the Nogo receptor to treat central nervous system injuries [J]. Nat Rev Drug Discov, 2003, 2(11): 872 - 878.
- [14] Zea Longa EL, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. Stroke, 1989, 20 (1): 84 - 87.
- [15] 李忠仁. 实验针灸学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2004: 327 - 329.
- [16] Bianchi-Bosisio A, Gaboardi F, Gianazza E, et al. Sodium dodecyl sulphate electrophoresis of urinary proteins [J]. J Chromatogr, 1991, 569 (1 - 2): 243 - 260.
- [17] 曾进胜. 重视脑局部损伤后继发远隔部位损害的研究 [J]. 中国神经精神疾病杂志, 2007, 33(12): 507 - 508.
- [18] 熊丽, 曾进胜. 大脑中动脉供血区梗死后远隔部位继发性损害的研究进展 [J]. 国外医学脑血管疾病分册, 2005, 13(11): 835 - 838.
- [19] Cheatwood JL, Emerick AJ, Kartje GL. Neuronal plasticity and functional recovery after ischemic stroke [J]. Top Stroke Rehabil, 2008, 15(1): 42 - 50.
- [20] Woolf CJ, Bloechlinger S. It takes more than two to Nogo [J]. Science, 2002, 297(5584): 1132 - 1134.
- [21] 李成永, 樊永珍, 薛文海, 等. 针刺百会穴治疗脑梗塞的临床研究 [J]. 上海中医药杂志, 2006, 40(6): 19 - 20.
- [22] 纪中. 电针百会穴对大鼠缺血区脑组织神经生长因子影响的研究 [J]. 浙江中医学院学报, 2005, 29 (3): 67 - 68.
- [23] 李宛青, 吴爱群, 刘伟, 等. 电针治疗缺血缺氧新生大鼠对海马神经元尼氏体的影响 [J]. 郑州大学学报 (医学版), 2005, 40(2): 271 - 273.
- [24] 易玮, 许能贵, 靳瑞. 针刺对局灶性脑缺血大鼠脑血流量的影响 [J]. 新中医, 2001, 30(10): 75 - 76.
- [25] 许能贵, 周逸平, 许冠荪, 等. 电针大椎、百会穴对局灶性脑缺血大鼠脑血流量和自发脑电的影响 [J]. 中国中医药科技, 2001, 8(1): 3 - 4.
- [26] 谭峰, 顾卫, 万赛英, 等. 电针对高血压大鼠脑缺血后神经黏蛋白表达和行为学的影响 [J]. 中华老年医学杂志, 2007, 26(9): 693 - 696.
- [27] Wissner C, Bareyre FM, Allegrini PR, et al. Anti-Nogo-A antibody infusion 24 hours after experimental stroke improved behavioral outcome and corticospinal plasticity in normotensive and spontaneously hypertensive rats [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2003, 23: 154 - 165.

(收稿: 2013 - 09 - 18 修回: 2013 - 11 - 25)

中国中西医结合学会生殖医学专业委员会成立暨学术交流会征文通知

为了促进中医药与现代生殖医学的交流和合作, 充分发挥中西医结合生殖医学的优势, 积极推动国内生殖医学的进步和繁荣, 定于 2014 年 6 月 20—22 日在上海市召开中国中西医结合学会生殖医学专业委员会成立暨学术交流会。本次会议为国内同道加强沟通与合作搭建平台, 也为您提供与本领域著名专家面对面的交流机会。诚挚地邀请各位生殖医学同道踊跃投稿并参加会议。现将征文有关事项通知如下。

征文内容 生殖健康与生殖障碍的中西医研究进展。

征文要求 未公开发表的论文, 以论文摘要形式投稿, 摘要应包括: 题目、作者、单位及地址、邮编、目的、方法、结果及结论, 字数 800 - 1200 字, 不含图标。会议采用网上投稿, 投稿邮箱: zsy007@163.com, 请注明会议投稿。大会收到投稿后, 将回复邮件确认 (为方便反馈信息, 请在稿件最后注明联系地址、电子信箱和联系电话)。请自留底稿, 恕不退稿。

截稿时间 2014 年 4 月 30 日。

联系方式 通讯地址: 温州市梧慈路 481 号 (邮编 325014), 联系人: 周国栋, 电话: 0577 - 86726120, 13506668895, 传真: 0577 - 56895859; 负责人: 程泾, 电话: 0577 - 86722522, 13017889992。