

电针“百会、风府”穴对脑 I/R 损伤大鼠海马区 CPG15 表达影响的实验研究[※]

● 唐晓敏 秦正玉 何宗宝 王家琳 吴生兵 汪克明

摘 要 目的:探讨电针对局灶性脑缺血再灌注大鼠神经功能的恢复及海马区 CPG15 表达影响的情况。方法:60 只 SD 大鼠,雌雄各半,随机分为正常对照组、模型组、电针经穴组、电针非经穴组、西药对照组。采用线栓法制备局灶性脑缺血再灌注模型,电针经穴组电针“百会、风府”穴,电针非经穴组电针大鼠臀部非经穴位置,电针以疏波 2Hz,强度 3~5mA,持续电针 30min,每天 1 次,连续治疗 2 周。西药对照组以尼莫地平 20mg/kg·d 灌胃,每日 2 次,连续灌胃 2 周。2 周后采用 long5 分法对大鼠神经功能缺损评分,并取材,运用免疫组化法检测大鼠缺血侧海马区 CPG15 表达情况。结果:模型组大鼠神经功能缺损评分及缺血侧海马区 CPG15 表达显著高于正常对照组, $P < 0.01$;电针经穴组与西药治疗组大鼠神经功能评分及海马区 CPG15 表达差异不显著, $P > 0.05$,而较模型组两者均有显著性差异, $P < 0.01$;电针非经穴组大鼠神经功能缺损评分及缺血侧海马区 CPG15 表达与模型组比较差异不明显, $P > 0.05$ 。结论:电针可改善脑缺血再灌注大鼠神经功能并提高海马区 CPG15 的表达,电针对脑缺血再灌注后脑细胞的神经可塑性有促进作用。

关键词 脑缺血再灌注 电针 神经功能缺损评分 CPG15 表达 神经可塑性

缺血性脑卒中是由于脑部血液供应障碍,缺血、缺氧而引起的局限性脑组织的坏死或脑软化。本病属中医学“中风”的范畴,源于《内经》对中风病因病机的认识。针灸在治疗缺血性脑卒中恢复期的治疗中具有优势,一定程度上提高了缺血性脑卒中患者的神经功能恢复^[1,2]。电针治疗对缺血再灌注大鼠模型神经功能恢复及海马区神经可塑性相关基因 15 (CPG15, candidate plasticity-related gene 15) 表达会产生怎样影响,CPG15 在针刺抗脑缺血损伤中枢神经重塑过程中的作用机制是怎样的,本实验对此进行了探讨。

1 材料

1.1 动物 健康成年 SD 大鼠 60 只,雌雄各半,体重为 220 ± 20 g,购自南京安立默实验动物有限公司,实验动物生产许可证号:SCXK(苏)2009-0007 号。

※基金项目 针灸基础与技术安徽省重点实验室培育基地开放基金资助(No:2009zjkf006C)

• 作者单位 河北省合肥市第一人民医院中医针灸科(230036)

同等条件下适应性喂养 1 周。按照随机分组方法,将 60 只 SD 大鼠分为正常对照组、脑缺血再灌注模型组、电针“百会、风府”组、电针非经穴组、尼莫地平治疗组,每组各 12 只。

1.2 药品 水合氯醛,批号:W20091022,生产企业:中国医药集团上海化学试剂公司;80 万单位青霉素,批号:20100627,生产企业:哈药集团制药总厂;尼莫地平,批号:20100509,生产企业:上海信谊嘉华药业有限公司;多聚甲醛,批号:091020,生产企业:中国医药(集团)上海化学试剂公司。

1.3 主要试剂及仪器 CPG15 单克隆抗体(BS-2464R),生产批号:909881W,购自北京博奥森生物技术有限公司;SP-9000,生产批号 812257A,购自北京中杉金桥生物技术有限公司;3-二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)显色试剂盒,购自北京中杉金桥生物技术有限公司;一抗稀释液,购自碧云生物技术研究所;抗原修复液,购自北京中杉金桥生物技术有限公司;L734 型冷光立式四孔手术无影灯,上海医疗器械股份有限公司医疗器械五厂;PCE-A 型程控电针

治疗仪,安徽天恒有限公司制;932 型电热烧灼器,上海医疗器械八厂;TB-718 自动包埋机,泰维电子设备有限公司;LEICA RM2135 自动切片机,LEICA 公司;TK2218I 恒温摊片烤片机,泰维电子设备有限公司;OLYMPUS VANOX 显微镜,日本 OLYMPUS 光学工业株式会社;LEICA ASP200 自动脱水机,LEICA 公司;南京捷达 JD2801 形态学显微图像分析系统,南京捷达科技发展有限公司。

1.4 实验条件 动物于安静的环境下分笼饲养,饲养室温控制在 $(24 \pm 1)^\circ\text{C}$ 的范围、相对湿度 $(55 \pm 5)\%$ 的环境中,12h 明暗交替,塑料笼内以无菌木屑做垫料,食水自取。

2 方法

2.1 模型制作方法 参照 Zea Longa 方法^[3],使用一端涂抹硅树脂尼龙丝,将尼龙丝插入右侧颈内动脉,闭塞大脑中动脉(MCA),阻断 MCA 的血流 2 小时,后将尼龙丝轻轻拔出,从而复制脑缺血再灌注(BI/R)大鼠模型,模型复制成功的标志为大鼠出现右侧 Horner 综合征(左侧瞳孔缩小),麻醉清醒时出现左前肢或左前后肢瘫痪,线栓拔出后颈内动脉、Willis 环无血栓及出血为标准。术后伤口部碘伏消毒,术后 3 天连续腹腔注射青霉素钠(8 万 U/d)预防感染。

2.2 神经功能缺损评分 采用 Longa 5 分法标准^[3],在大鼠脑缺血 2h 再灌注动物苏醒时和治疗 2 周后进行神经功能缺损评分:0 分,无神经损伤症状;1 分,不能伸展对侧前爪;2 分,向外侧划圈;3 分,向对侧倾倒;4 分,不能自发行走,意识丧失。

2.3 治疗方法 电针经穴组选择“百会”、“风府”穴,具体定位:“百会”穴位于大鼠顶骨与顶间骨之间凹陷处;“风府”穴位于枕骨下方正中凹陷处。针刺方法:穴位处常规消毒后,以 30 号 1 寸毫针斜刺入“百会”穴、“风府”穴约 0.5 寸,将针柄分别连接至电针仪上,“百会”穴接阴极,“风府”穴接阳极,电针频率 2Hz,疏波,强度以大鼠安静耐受为度,一般 3~5mA,时间 30min,每天 1 次,均在上午 10 点左右进行,连续治疗 2 周。电针非经穴组统一选择右臀部非经非穴位置针刺,接电针刺激,刺激参数同电针经穴组。西药治疗组以尼莫地平混悬液,按 20mg/kg·d 量灌胃,每日 2 次(上午 8 点,下午 4 点),连续灌胃治疗 2 周。

2.4 标本取材 于造模后 2 周各个相应的时间位点以 10% 水合氯醛麻醉(3.6mL/kg)大鼠,打开胸腔,于

右心耳部剪一小口,从左心室插入导管至主动脉,向内快速注入 37℃ 肝素化生理盐水 250mL,至右心耳流出液变清亮,然后注入 4% 多聚甲醛磷酸盐缓冲液 250mL,灌注固定 30min 后断头取脑,除去小脑和脑干,取大脑,放入 4% 多聚甲醛磷酸盐缓冲液中固定 1d,脱水、透明、浸蜡,在视交叉前后连续制作脑部冠状切片。

2.5 指标检测 SP 染色: I 抗 CPG15 稀释浓度为 1:100,阴性对照组采用正常山羊血清替代 I 抗进行, DAB2H₂O₂ 显色液显色,苏木精轻度复染。

2.6 数据处理与统计学处理 根据大鼠脑缺血半暗带的定位方法,相近部位同倍 10×40,7 个不同视野,采用南京捷达 JD-801 图像分析系统,统计海马区 CPG15 阳性细胞总面积单位和平均光密度值。所得数据经 SPSS13.0 统计软件进行数据分析。统计数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,各组间均数比较采用单因素方差分析,组间均数的两两比较采用 LSD 法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 神经功能缺损评分对比 见表 1。由表 1 可以看出模型组大鼠神经功能缺损显著差于正常对照组, $P < 0.01$ 。电针经穴组与西药治疗组大鼠神经功能评分差异不显著, $P > 0.05$;而较模型组两者均有显著性差异, $P < 0.01$;较正常对照组有一定差异性, $P < 0.05$ 。电针非经穴组大鼠神经功能缺损评分与模型组比较差异不明显, $P > 0.05$,且显著弱于电针经穴组和西药对照组, $P < 0.01$ 。

表 1 各组实验大鼠神经功能缺损评分治疗前后对比(分, $\bar{x} \pm s$)

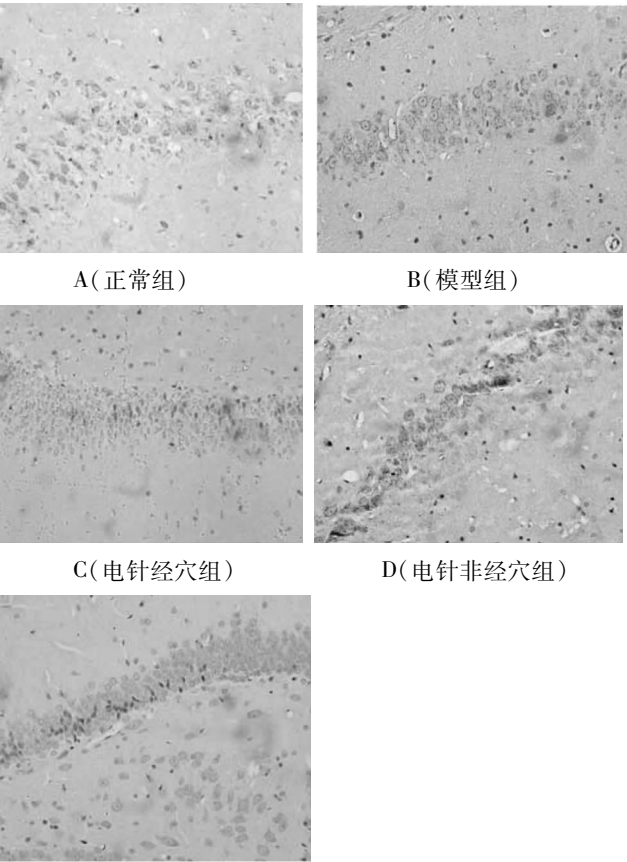
| 组别 | 数量(只) | 治疗前 | 2 周后 |
|--------|-------|---------------|--------------------------------|
| 正常对照组 | 12 | 0 | 0 ^{*****} |
| 模型组 | 12 | 2.796 ± 0.186 | 2.524 ± 0.482 ^{▲▲◆◆} |
| 电针经穴组 | 12 | 2.652 ± 0.224 | 0.794 ± 0.156 ^{▲****} |
| 电针非经穴组 | 12 | 2.787 ± 0.253 | 1.986 ± 0.269 ^{▲▲◆◆} |
| 西药治疗组 | 12 | 2.543 ± 0.149 | 0.788 ± 0.346 ^{▲****} |

注:与正常对照组比较,▲▲ $P < 0.01$,▲ $P < 0.05$;与脑缺血再灌注模型组比较,* $P < 0.01$,* $P < 0.05$;与电针“百会、风府”组比较,## $P < 0.01$,# $P < 0.05$;与电针非经穴组比较,★★ $P < 0.01$,★ $P < 0.05$;与尼莫地平治疗组比较,◆◆ $P < 0.01$,◆ $P < 0.05$ 。

3.2 光镜下观察结果 光镜下,正常组只见极少量

棕褐色的 CPG15 阳性细胞表达,而 BI/R 模型组、电针经穴组、电针非经穴组、药物治疗组脑中均可见不同程度的棕褐色的 CPG15 阳性细胞,以海马区阳性细胞密度增加为显著。呈卵圆形或圆形,阳性细胞胞浆染色较深,多为星形胶质细胞。以正常羊血清代替 CPG15 一抗孵育对照组的切片,结果为阴性,见图 1。从各组照片可以看出正常组大鼠海马区 CPG15 阳性细胞胞浆染色极浅,量少,而其余四组大鼠海马区 CPG15 阳性细胞胞浆染色明显变深,量多,其中以电针经穴组与西药治疗组 CPG15 阳性细胞胞浆染色最为显著,而电针非经穴组大鼠海马区 CPG15 阳性细胞胞浆染色相对较浅,与模型组差异不明显。

图 1 免疫组化方法检测各组大鼠缺血再灌注海马区 CPG15 蛋白表达情况



E(尼莫地平治疗组)
注:免疫组化(10×40)

3.3 免疫组织化学方法检测海马组织 CPG15 见表 2。由表 2 可以看出正常组 CPG15 阳性细胞表达不显著,平均光密度值低,较其他各组均有显著性差异, $P < 0.01$;其他各组 CPG15 阳性细胞表达及平均光密度值均有提高,且电针经穴组与尼莫地平组表达最明显,此两组之间比较差异性不显著, $P >$

0.05,但较模型组和电针非经穴组有显著性差异, $P < 0.01$,而模型组与电针非经穴组 CPG15 阳性细胞表达及平均光密度值比较,差异性不大, $P > 0.05$ 。说明电针和西药尼莫地平对于增强 CPG15 的表达起到明显促进作用。

表 2 各组缺血 2h 再灌注 CPG15 表达阳性细胞单位面积和平均光密度值治疗后对比

| 组别 | 数量 | 阳性细胞单位面积 ($\times 10^2$) | 平均光密度值 |
|---------|----|-------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|
| | | 2 周后 | 2 周后 |
| 正常组 | 12 | $3.29 \pm 2.58^{***\blacklozenge\blacklozenge}$ | $0.0225 \pm 0.0192^{***\blacklozenge\blacklozenge}$ |
| 模型组 | 12 | $10.73 \pm 4.64^{\blacktriangle\blacktriangle\blacklozenge}$ | $0.1104 \pm 0.0319^{\blacktriangle\blacktriangle\blacklozenge}$ |
| 电针经穴组 | 12 | $34.52 \pm 1.60^{\blacktriangle\blacktriangle\blackstar\blackstar\blackstar}$ | $0.2996 \pm 0.0284^{\blacktriangle\blacktriangle\blackstar\blackstar\blackstar}$ |
| 电针非经穴组 | 12 | $12.95 \pm 3.38^{\blacktriangle\blacktriangle\blacklozenge}$ | $0.1261 \pm 0.0347^{\blacktriangle\blacktriangle\blacklozenge}$ |
| 尼莫地平治疗组 | 12 | $31.43 \pm 6.27^{\blacktriangle\blacktriangle\blackstar\blackstar}$ | $0.2763 \pm 0.0264^{\blacktriangle\blacktriangle\blackstar\blackstar}$ |

注:与正常对照组比较, $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$, $\blacktriangle P < 0.05$;与脑缺血再灌注模型组比较, $** P < 0.01$, $* P < 0.05$;与电针“百会、风府”组比较, $## P < 0.01$, $\# P < 0.05$;与电针非经穴组比较, $\blackstar\blackstar P < 0.01$, $\blackstar P < 0.05$;与尼莫地平治疗组比较, $\blacklozenge\blacklozenge P < 0.01$, $\blacklozenge P < 0.05$ 。

4 讨论

CPG15 是以色列科学家 Nedivi 等于 1993 年通过构建谷氨酸类似物海人藻酸(KA,kainic acid)激活型大鼠海马齿状回 cDNA 文库得到的一个基因^[4]。1996 年,Nedivi^[5]从 KA 激活型大鼠海马齿状回 cDNA 文库和人类皮质 cDNA 文库筛选、鉴定得到 CPG15,并进行了初步的功能研究发现 CPG15 能促进神经突起的快速生长,故又将其命名为 Neuritin。CPG15 是一个在神经系统高度表达的基因^[6],在神经系统发育过程中主要在海马、嗅球中表达;而在成年后,表达限制在那些发生结构改变并与神经活动密切相关的组织^[7]。CPG15 蛋白能促进神经突起的生长及其分支和突触的发育成熟,调节突触回路的形成;其表达主要局限于神经系统以及神经可塑性相关的区域,且神经活动和神经营养素(neurotrophines,NTs)均能诱导其表达,提示 CPG15 可能与神经活动及 NTs 促进神经突起生长的作用有关^[8]。这些特点使 CPG15 成为神经系统的发育成熟及创伤修复中重要候选因子。CPG15 在促进突触成熟、防止神经细胞凋亡、保护神经元等方面有重要作用^[9]。并且介导神经生长因子(NGF)促进成人感觉神经元轴突的生长^[10]。

神经细胞之间通过特异的通讯结构——“突触”形成功能性神经环路来传递和存储信息。突触在神经细胞持续活动影响下可发生特异性的结构和功能变化,这称之为“突触可塑性”。它在神经系统发育和学习记忆中起着至关重要的作用。电针治疗脑梗塞的生物学基础是通过多种机制影响神经元可塑性,目前关于针灸对脑神经可塑性研究已见部分报道,卢圣锋等^[11]以 SAMP8 小鼠作为老年痴呆(AD)动物模型,电针“百会”、“涌泉”穴,发现电针能有效调整海马神经元突触形态,使突触后致密物增厚,突触间隙宽度变窄,促进突触形态可塑性的发挥。徐虹等^[12]观察到,电针能够抑制损伤相关的血管内皮细胞信号表达,促进修复相关的神经元和神经胶质细胞表达,认为针刺可能通过上调损伤-修复网络功能,促进梗死区神经功能的恢复。高剑锋等^[13]研究发现局灶脑缺血再灌注可激活老龄大鼠海马角回(dentate gyrus, DG)区域的神经干细胞发生增殖、迁移,针刺穴位能使局灶脑缺血再灌注后海马 DG 区域的神经干细胞发生明显增殖,有效提高神经干细胞的神经元分化,合理调控胶质细胞反应,从而发挥拮抗脑缺血再灌注损伤作用。赵丹等^[14]研究多巴胺 D1、D2 受体在脑缺血后神经可塑性中的作用及电针的影响,发现电针可以对脑缺血后多巴胺 D1、D2 受体的数量和功能进行调节,减轻其损害作用,促进其达到平衡状态,从而对神经功能进行保护和修复。

我们的实验结果提示针刺对促进大鼠缺血再灌注损伤区 CPG15 阳性细胞含量的表达起到显著促进作用,同时神经功能得到明显改善,说明针刺对脑神经可塑性具有促进意义。据此我们认为针灸治疗脑梗塞,促进脑神经可塑性的机制可能是通过上调 CPG15 而发挥作用。CPG15 基因参与了脑缺血损伤后神经再生的调控。

百会、风府均为督脉经穴,督脉又归属于脑。此外,根据《灵枢·卫气》中“气街”理论,“头气有街”、“气在头者,止之于脑”,即经气到头部的都联系于脑。又根据“四海”理论,“脑为髓海”,杨上善注说“胃流津液渗入骨空,变而为髓,头中最多,故为海也,是肾所生,其气上输脑盖百会穴,下输风府也”。可见,百会穴、风府穴与脑密切联系,是调节大脑功能的要穴。针刺百会、风府穴,具有醒脑开窍、健脑补髓、疏风通络的功效,因此选取此二穴作为电针治疗脑缺血再灌

注损伤模型的处理穴位。本次实验证实了针刺“百会”、“风府”可以促进大鼠受损神经功能恢复,能提高大鼠海马区 CPG15 表达,说明电针对脑缺血再灌注后脑细胞的神经可塑性有促进作用。这为临床针灸治疗脑梗塞提供了理论依据。

参考文献

- [1] 杨福霞,杨卓欣,于海波,等. 调任通督针法治疗脑梗塞恢复期患者的临床观察[J]. 针灸临床杂志,2011,27(4):47-48.
- [2] 倪丽伟,申鹏飞,张智龙,等. “醒脑开窍”与非经非穴针刺对脑梗塞急性期神经功能影响的多中心随机对照研究[J]. 中华中医药杂志,2011,26(5):894-897.
- [3] Zea Longa E L, Weinstein P R, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery: occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, (20):84-91.
- [4] Nedivi E, Hevroni D, Naot D, et al. Numerous candidate plasticity-related genes revealed by differential cDNA cloning[J]. Nature, 1993, 363(6431):718-722.
- [5] Nedivi E, Fiedust S, Theill LE, et al. A set of genes expressed in response to light in the adult cerebral cortex and regulated during development[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(5):2048-2053.
- [6] 黄瑾,杨磊,应康,等. 人类 Neuritin cDNA 的克隆与表达[J]. 复旦大学学报(自然科学版), 2001, 40:521-524.
- [7] Yamagata K, Sugiura H, Suzuki K. Structure and function of neural plasticity-related gene products[J]. Neurobiol Learn Mem, 1998, 7037-43.
- [8] Putz U, Harwell C, Nedivi E. Soluble CPG15 expressed during early development rescues cortical progenitors from apoptosis[J]. Nat Neurosci, 2005, 8(3):322-331.
- [9] Fujino T, Wu Z, Lin WC, et al. Cpg15 and cpg15-2 constitute a family of activity-regulated ligands expressed differentially in the nervous system to promote neurite growth and neuronal survival. Comp Neuro[J]. 2008, 507(5):1831-1845.
- [10] Karamoysoy E, Burnand RC, Tomlinson DR, et al. Neuritin Mediates Nerve Growth Factor-Induced Axonal Regeneration and Is Deficient in Experimental Diabetic Neuropathy[J]. Diabetes, 2008, 57(1):181-189.
- [11] 卢圣锋,邵欣,唐勇,等. 电针促进阿尔茨海默病模型小鼠(SAMP8)海马神经元突触可塑性的神经细胞黏附机制[J]. 中国康复医学杂志,2008,23(12):1057-1060.
- [12] 徐虹,洪礼传,黄艳秋,等. 针刺对脑缺血再灌注模型大鼠脑组织基质金属蛋白酶、细胞间黏附分子表达的影响[J]. 基础医学与临床,2010,30(7):37-42.
- [13] 高剑峰,吕风华,朱长连,等. 电针干预对老龄大鼠脑缺血再灌注海马内源性神经干细胞增殖分化的影响[J]. 中华中医药杂志,2010,25(7):1075-1079.
- [14] 赵丹,雷慧,葛林宝,等. 多巴胺 D1、D2 受体在脑缺血后神经可塑性中的作用及电针的影响[J]. 山东医药,2010,50(80):109-110.