

通督调神电针法对脑梗死模型大鼠 GAP-43 表达的影响*

丁义侠, 陈亮亮[△], 储浩然

(安徽中医药大学第二附属医院, 安徽 合肥 230061)

摘要:目的 观察通督调神电针法对脑梗死模型大鼠 GAP-43 表达的影响, 探索其对神经功能再塑的影响机制, 为临床运用通督调神电针法治疗脑梗死提供实验依据。方法 SPF 级雄性大鼠 64 只, 体质量 250~280g, 采用随机数字法随机分为 4 个大组, 每组 16 只大鼠。每个大组再随机分为 2 个亚组, 选取 7d 和 14d 两个时间点, 每组 8 只。用电凝法制备脑梗死模型。电针组针刺主穴为百会、水沟、大椎、神庭, 每天针刺 1 次, 留针 30min。模型组、假手术组、正常对照组予以同一时间捆绑固定不予针刺处理。最后免疫组化法观察每组大鼠 7d、14d 两个时间点梗死灶周围 GAP-43 阳性细胞的表达, 采用 JD801 形态学图像分析系统进行分析, 并对结果进行统计学分析。结果 正常对照组和假手术组中无 GAP-43 阳性细胞, 模型组在 7d 和 14d 两个时间点与假手术组比较有极显著意义 ($P < 0.01$); 模型组与电针治疗组比较, 在 7d 和 14d 两个时间点电针组的 GAP-43 的阳性细胞均较模型组多, 且两组差别有极显著意义 ($P < 0.01$)。结论 通督调神电针法可促进各时间点脑梗死大鼠脑组织内 GAP-43 的表达。

关键词: 通督调神; 电针; 脑梗死; GAP-43

中图分类号: R246.6 文献标志码: A 文章编号: 1000-2723(2016)06-0021-05

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2016.06.006

脑梗死是临床多发病、常见病, 在临床治疗中发现针灸治疗脑梗死疗效明确, 并得到了世界卫生组织的推荐^[1]。目前针对针灸治疗脑血管疾病的机理研究, 仍主要集中在针灸改善脑血管的血液状态及脑电活动等方面^[2]。然而关于针刺对脑缺血后神经功能的恢复的研究甚少, 近年来随着神经可塑性理论的研究日渐受到重视, 我们对于通督调神电针法与脑神经可塑性的关联亦进行了深入研究^[3]。本课题旨在研究通督调神电针法对脑梗死大鼠模型梗死灶周围生长相关蛋白 (growth associated protein, GAP-43) 表达的影响, 并为深入研究其对脑神经功能恢复的机理研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

选择 SPF 级雄性大鼠, 体质量 250~280g (由安徽中医药大学实验动物中心提供), 普通饲养在相对湿度 45%~65%, 温度 24~28℃ 的环境内。由专人、

专职负责。

1.1.2 试剂和设备

免疫组化染色试剂盒、浓缩型 DAB 试剂盒、GAP-43 抗体、多聚甲醛; 生物组织自动脱水机、轮转式切片机、生物组织包埋机、Olympus BX51 显微镜、电针治疗仪、一次性针灸针。

1.2 实验方法

1.2.1 实验分组

采用随机数字法将大鼠随机分为电针组、对照组、假手术组、模型组 4 个大组, 每组 16 只。每个大组再选取 7d 和 14d 两个时间点, 随机分为 2 个亚组, 每组 8 只大鼠。

1.2.2 造模

首先腹腔注射 6% 水合氯醛, 用量 0.5mL/100g, 麻醉, 让大鼠按右侧卧位固定在手术台上, 去毛后用酒精和碘伏在左侧颞顶部行局部皮肤消毒。切开大鼠左眼与左耳之间皮肤, 分离颞肌, 用牙钻小心经颞骨翼板钻至硬脑膜, 使大脑动脉近端充分暴

* 基金项目: 安徽中医药大学青年科研研究基金 (2014qn032)

收稿日期: 2016-11-10

作者简介: 丁义侠 (1985-), 女, 安徽旌德人, 医学硕士, 主治医师, 研究方向: 神经系统疾病的针灸治疗。

通信作者: 陈亮亮, E-mail: Chenliangliang0082@126.com

露,使用电凝器夹闭嗅束近端与大脑下静脉之间的一段大脑中动脉,依次缝合皮肤后,为预防感染可在腹腔内注射 0.4mL 硫酸庆大霉素注射液^[4]。造模成功表现:提尾时右前肢内收屈曲,不能伸展右侧前爪;左侧 Horner 征。

1.2.3 治疗方法

①电针组:成功造模后 3h 后进行针刺,固定大鼠,无需麻醉。主穴选取百会、神庭、水沟、大椎。针刺后将各针柄与电针仪连接,选择疏密波,频率 2/100Hz,电压 2V,逐渐加大强度至针刺部位轻微抖动为佳,留针 30min,每日上午 9:30 时左右针刺 1 次,7d 一个疗程。②假手术组:常规分离大鼠颞肌,暴露颞骨翼板,去除部分颅骨,不凝闭大脑中动脉,正常缝合后,养在笼内,不进行任何治疗。③模型组:成功造模后的大鼠常规饲养,不进行任何治疗。④正常对照组:普通大鼠常规饲养于笼内,不进行任何干预。

1.2.4 脑组织免疫组化检测

每组大鼠分别于造模结束后 7d、14d 用 10%水合氯醛腹腔注射麻醉,打开胸腔,使心脏暴露,于心尖处剪一切口,用 9 号针头插入左心室,灌注 0.9%生理盐水,剪开右心耳,直至右心耳处流出无色透明液体时,改用 4%多聚甲醛灌注固定。然后断头取脑,在视交叉处切开,冠状切取厚 5mm 脑片浸于 4%多聚甲醛中再固定,常规脱水、透明、浸蜡、包埋,连续冠状切片(厚 5 μ m),石蜡切片脱蜡至水,水洗, PBS 浸泡,采用高压修复,3% H_2O_2 室温孵育 6min, PBS 洗 3 次,加兔抗鼠一抗(1:100),4 $^{\circ}$ C 过夜, PBS 洗 3 次,滴加二抗工作液, DAB 显色,苏木素复染,脱水、透明、封片。免疫组化染色后,胞核中有棕黄色颗粒为阳性表达细胞。用 Olympus BX51 显微镜观察,并进行形态学图像分析。

1.3 针刺治疗

1.3.1 取穴

参照《实验针灸穴》取大鼠百会、水沟、神庭、大椎。

百会:定位在顶骨正中,向前斜刺 2mm;

水沟:定位在鼻尖下 1mm,鼻唇沟正中处,直刺 1mm;

神庭:定位在前正中线上,额顶骨缝交界线的前方处,向上平刺 2mm;

大椎:定位在第 7 颈椎与第 1 胸椎间,背部正中,直刺 5mm。

1.3.2 操作

电针组按以上方法针刺取穴后,将电针仪与各针柄连接,选择疏密波,电压 2V,频率 2/100Hz,逐渐增加强度至针刺部位轻微抖动为佳,留针 30min,每日上午 9:30 时左右针刺 1 次,7d 一个疗程。

1.3.3 针具

选用华陀牌一次性使用无菌针灸针,中国苏州医疗用品厂有限公司出品,规格 $\phi 0.25\text{mm} \times 13\text{mm}$ 。

1.4 数据和统计处理

选取免疫组化切片在 400 倍光镜下观察其视野内 GAP-43 阳性细胞的数目。数据统计结果,由统计软件 SPSS13.0 计算完成,所有数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,各组间比较用 t 检验。 $P < 0.01$ 表示极显著性意义, $P < 0.05$ 表示显著性意义, $P > 0.05$ 无显著性意义。

2 结果

通督调神电针刺刺激对脑梗死模型大鼠脑内 GAP-43 阳性细胞表达的影响,如表 1 所示:正常对照组和假手术组中无 GAP-43 阳性细胞,脑梗死模型大鼠建立 7d 时,模型组缺血区可见 GAP-43 阳性细胞,然至 14d 时渐减少,其两个亚组时间点与假手术组比较有极显著意义($P < 0.01$);模型组与电针治疗组比较,在 7d 和 14d 两个时间点电针组的 GAP-43 的阳性细胞均较模型组多,且两组差别有极显著意义($P < 0.01$)。

表 1 各组大鼠大脑内 GAP-43 的表达

组别	n	脑缺血时间	
		7d	14d
正常对照组	8	1.26 \pm 0.09	1.30 \pm 0.11
假手术组	7	1.36 \pm 0.12	1.58 \pm 0.22
模型组	8	30.37 \pm 3.25 [#]	22.35 \pm 3.70 [#]
电针治疗组	8	66.27 \pm 4.69 [*]	51.68 \pm 3.88 [*]

注:与假手术组相比,[#] $P < 0.01$;与模型组相比,^{*} $P < 0.01$ 。

3 讨论

脑梗死当属中医“中风”范畴,是指由于脑动脉粥样硬化,血管内膜损伤致使脑动脉管腔狭窄,进而因多种因素使局部血栓形成,使动脉狭窄加重或完全闭塞,导致脑组织缺血、缺氧、坏死,神经功能

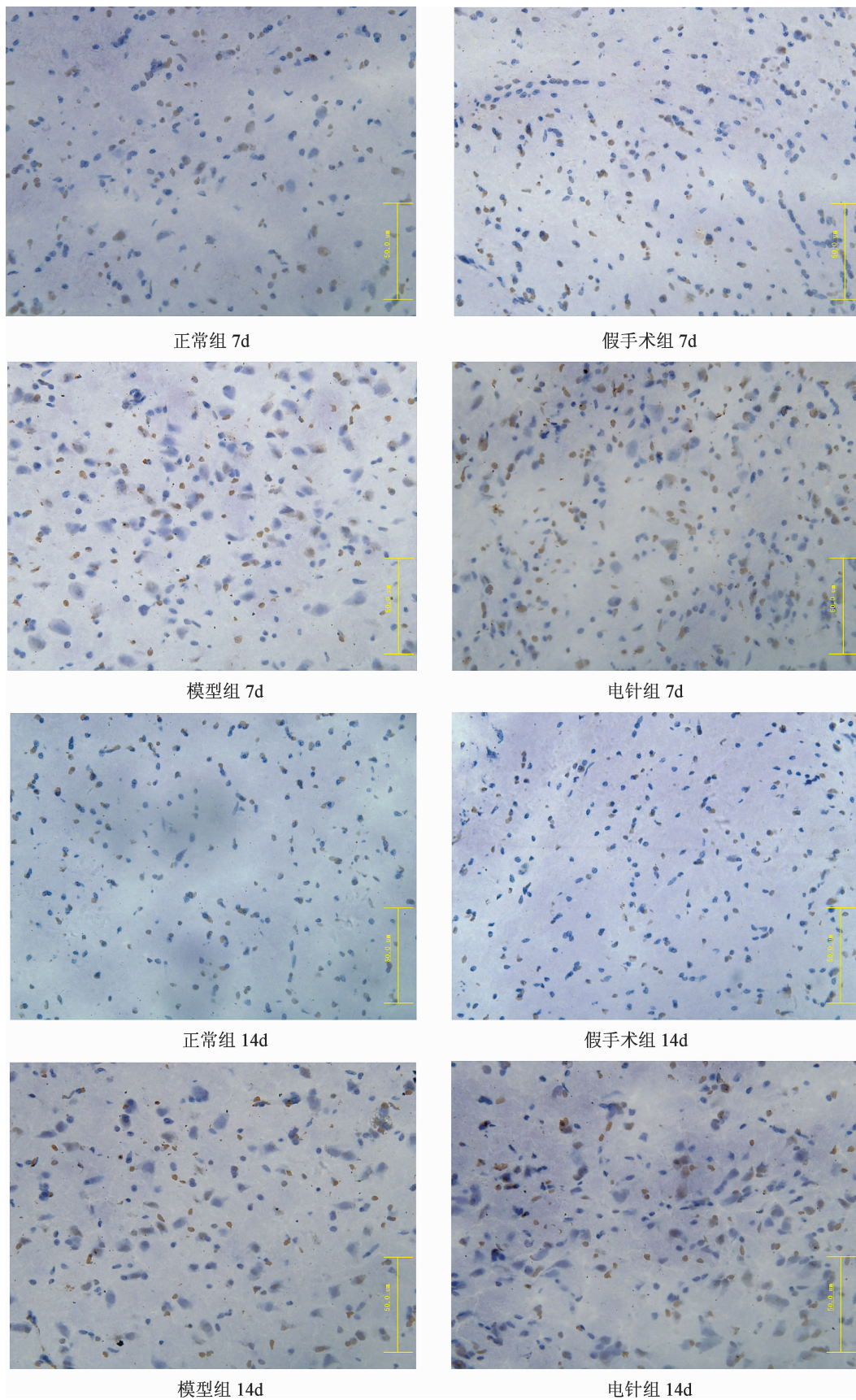


图 1 各组大鼠脑组织 GAP-43 阳性细胞表达(免疫组织染色,×400)

障碍的一种脑血管疾病^[5]。近年来,随着脑中风的发病率及致残、致死率日益增高,给社会和家庭带来了沉重的经济及心理负担^[6]。相关研究发现脑缺血发生后,其相关区域神经细胞的转归包括死亡和凋亡两种情况^[7]。对神经元凋亡及神经细胞的再生性已成为目前神经科学领域的一项重要研究,并迫切需要被应用于临床医学。“通督调神针法”是在我院长期开展针刺督脉经穴为主防治中风病的基础上发展起来的,以针刺督脉达到醒神养脑功用的针刺方法。该针法是在中医基础理论的指导下,遵从整体观念,结合现代康复医学的相关理论,形成的针刺原则和取穴处方。督者,为总督之意,督脉为“阳脉之海”,能通调一身之阳气,且其循行“抵于风府,入属于脑”,因此督脉诸穴对脑卒中尤其是缺血性脑卒中有较好的治疗作用。百会居头之巅顶,为百脉聚会之处,能鼓舞阳气,升阳举陷,醒脑开窍,为醒神益智之要穴;水沟即人中穴,正居口鼻之间,刺之可接通天地之气,通督脉之闭阻,畅达神机,为调神要穴;神庭,督脉经穴,位于额中线上,是元神所藏之所,针刺神庭具有宁神醒脑之功效;大椎穴乃诸阳之会,为手足三阳经之脉气交汇之处,针刺具有畅气机、调神志之功;故诸穴相配,能调一身之元神。

督脉具有统调全身阳经经气的作用,其直接络入脑府。《难经·二十八难》云:“督脉者,起于下极之输,并于脊里,上至风府,入属于脑。”说明它与脑、脊髓和肾紧密相关。督脉的循行包括一条主干和三条分支,分别与诸阳、诸阴经相交关联。因督脉直接入脑,主要治疗神经系统相关疾病;同时因督脉亦与心、肾等重要脏器联系密切,亦可治疗精神神志类疾病,临床上遇此类病变均可循督脉论治,督脉与脑功能的关系在现代研究中亦得到进一步证实。针刺督脉相关经穴,可总调经气,通达诸经阴阳之气,充元气,行营血,则瘀血祛,新血生;肾精足,则髓海充,上于脑,则元神得养,功能易复。

生长相关蛋白43 (growth associated protein, GAP-43)是一种胞膜磷酸蛋白,与神经突触形成、神经发育及可塑性,特别是与神经再生密切相关。周围神经损伤后,GAP-43的含量可递增20~100倍^[8]。GAP-43是神经元生长发育的标志性蛋白质,在神经损伤后的修复及再生过程中起着至关重要

的作用,日前相关领域对其的研究亦日渐增多。GAP-43可促进神经元的生长、发育、神经再生及突触重建^[9-10]。因此本实验选择GAP-43作为观察指标,实验显示在7d内无任何干预治疗的模型组大鼠梗死灶周围GAP-43阳性细胞表达逐渐增加,提示早期脑缺血神经损伤有自我修复的功能,此即为神经细胞的可塑性。

本研究发现电针治疗组GAP-43阳性细胞的表达明显高于其他各组,提示“通督调神法”电针法可刺激梗死灶周围GAP-43的表达,此作用不能单纯的用缺血性损伤的减轻来解释,更可能是因为针刺刺激能迅速调节缺血区脑细胞内离子通道和离子含量有关^[11-12]。同时研究还发现脑梗死大鼠脑组织GAP-43在脑缺血早期明显增多,但随着时间推移及神经自我修复的进一步发展,GAP-43的表达却逐渐减少,说明机体内源性的自我修复是有限制的,而缺血损伤刺激产生的GAP-43并不能完全代偿神经功能的损伤^[13]。脑梗死后梗死灶神经元的死亡,促进了轴突和树突侧支形成、分支建立,利于形成新的突触,但是GAP-43的表达亦随着新突触的形成而逐渐下降^[14-15]。

综上所述,“通督调神”电针法刺激可以促进梗死灶周边GAP-43阳性细胞的表达,进而改善脑梗死大鼠神经功能,促进梗死区的组织修复和神经元的再造。其机制尚不明确,可能与电针刺激促进梗死灶周围的神经元侧支建立或调节脑组织内的相关离子的浓度或通道,从而促进脑神经的重塑^[16]。“通督调神”法电针治疗缺血性脑卒中在临床上疗效确切,然具体机制仍不明确,在该实验的基础上,下一步我们将继续深入研究“通督调神”电针法针刺治疗脑梗死的蛋白组学机制。

参考文献:

- [1] 于金栋. 针刺治疗脑梗死临床研究进展 [J]. 河北中医, 2011, 33(9): 1411-1413.
- [2] 王琳, 许能贵. 针刺对脑缺血后大脑可塑性促进作用的研究进展 [J]. 中华中医药杂志, 2014, 29(8): 2548-2550.
- [3] 李钦潘, 韩永升, 韩咏竹, 等. “醒脑开窍”针刺法对脑缺血再灌注大鼠模型早期脑内血管内皮生长因子与胶质纤维酸性蛋白表达的影响 [J]. 中国康复医学杂志, 2015, 7(30): 645-650.
- [4] 李忠仁. 实验针灸学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2007: 327-328.

- [5] 李敏,周俊宇. 脑梗死的治疗进展及相关问题探讨[J]. 实用临床医药杂志, 2013, 17(19):184-186.
- [6] Gupta SK, Mishra R, Kusum S, et al. GAP-43 is essential for the neurotrophic effects of BDNF and positive AMPA receptor modulator S18986 [J]. Cell Death Differ, 2009, 16(4):624-637.
- [7] 韩永升,徐银,韩咏竹,等. 电针对局灶性脑缺血再灌注大鼠运动功能及神经可塑性的影响 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2013, 15(8):92-96.
- [8] 邓志云. GAP-43 的研究进展及其与周围神经再生的关系[J]. 南昌大学学报(医学版), 2012, 52(6):94-97.
- [9] 钱芳,李燕,朱榆红,等. Nogo-A、生长相关蛋白-43 及缺血后适应对脑白质保护的研究进展 [J]. 国际神经病学神经外科学杂志, 2012, 39(1):76-79.
- [10] 栾永昕,张剑涛,付双林. 神经系统相关蛋白的研究进展 [J]. 中国老年学杂志, 2009, 29(16):2129-2132.
- [11] 张秋霞,赵晖,王蕾,等. 经方侯氏黑散对脑缺血损伤大鼠神经可塑性相关蛋白的影响 [J]. 首都医科大学学报, 2009, 30(3):341-346.
- [12] 朱春雷,孙晓旭. 大鼠坐骨神经切断后相应脊髓节段中 GAP-43 表达的变化[J]. 当代医学, 2012, 18(15):34-35.
- [13] 施颖菡,龙莉. 神经损伤后 GAP-43 表达的研究进展[J]. 中国实用医药, 2011, 6(33):246.
- [14] 卿鹏,柴铁劬,丁红梅,等. 双侧电针结合康复训练对局灶性脑缺血/再灌注损伤大鼠海马 CA3 区神经生长相关蛋白 43 及突触素表达的影响 [J]. 针刺研究, 2016, 41(4):314-320.
- [15] 郭敏,李刚. 突触可塑性相关蛋白的研究进展[J]. 神经药理学报, 2013, 3(6):57-64.
- [16] 张运康,陶连方. 经颅磁刺激对脑出血大鼠学习记忆能力及 GAP-43 表达的影响 [J]. 神经损伤与功能重建, 2014, 9(3):246-248.

(编辑:徐建平)

Effect of Tongdu Adjustable God Electroacupuncture on Expressions of GAP-43 in Cerebral Infarction Model Rats

DING Yixia, CHEN Liangliang, CHU Haoran

(The Second Affiliated Hospital of Anhui TCM University, Hefei 230061, China)

ABSTRACT: Objective To observe the tongdu adjustable god electroacupuncture on the neural plasticity in rats with cerebral infarction and explore its mechanism, and to provide experimental evidence for the treatment of ischemic cerebrovascular disease. **Methods** Choose SPF male 64 rats, weight 250~280g rats. The experimental rats were divided into four groups, 16 rats in every group. Each group were randomly divided into 7d, 14d two sub group, 8 rats in each sub group. Cerebral infarction model was prepared by electric coagulation method. electroacupuncture group acupuncture GV20, GV26, GV14 and GV24, 30 minutes for each time. Model group, sham operation group and normal control group were given the same time bound and fixed not acupuncture treatment. The immune group of method to detect GAP-43 expression, by JD801 morphological image analysis system were analyzed and the results were statistically analyzed. **Results** No GAP-43 positive cells in normal control group and sham operation group, Model group at 7 and 14 days two time points compared with the sham operation group had significant meaning ($P<0.01$); Compared with electric acupuncture treatment group, model group at 7 d and 14 d two time points GAP-43 positive cells in electric acupuncture group were compared with model group, and the difference between the two groups have significant meaning ($P<0.01$). **Conclusion** The expression of GAP-43 in brain tissue of rats with cerebral infarction was promoted by the regulation of the tongdu adjustable god electroacupuncture.

KEY WORDS: tongdu adjustable god; electroacupuncture; cerebral infarction; GAP-43