论著

文章编号:1000-5404(2013)03-0228-05

电针对局灶性脑梗死大鼠 Nogo-A 及其受体 NgR 和运动诱发电位的影响

伍 芳,龚 标,李学智,黄思琴,王 力,方 毅,李 凤,吕 凯 (401331 重庆,重庆医科大学中医药学院)

[摘要] **目的** 观察电针对局灶性脑梗死大鼠运动诱发电位和梗死周围组织神经抑制因子 Nogo-A 及其受体 NgR 等的影响,探讨电针治疗脑梗死的机制。**方法** 将 36 只成年 SD 大鼠,分为正常对照组、模型组和电针组(每组 12 只)。电针组和模型组按照改进后的 Longa 的方法制作大脑中动脉闭塞模型。正常组和模型组不做任何治疗,电针组在造模成功后第 1 天进行电针治疗。3 组均在造模后 1 d 和 14 d 进行运动诱发电位(MEP)检测,14 d 时进行 HE 染色和 Nissl 染色观察大鼠脑组织病理变化,免疫组化染色和 Western blot 法检测 Nogo-A 和 NgR 在脑组织内的表达。**结果** 14 d 时,电针组 MEP N1 波的潜伏期(15.38 ± 1.58)ms 和 N2 波的潜伏期(33.60 ± 3.58)ms 较模型组 N1 波的潜伏期(21.28 ± 4.00)ms 和 N2 波的潜伏期(41.78 ± 3.07)ms 明显好转($P<0.01$);HE 染色结果显示,电针组脑组织较模型组梗死区域的神经细胞病变程度明显改善;Nissl 染色结果显示,电针组的 Nissl 小体数目较模型组增多,肿胀的神经细胞内可见 Nissl 小体分布;免疫组化检测结果显示,电针组的 Nogo-A 和 NgR 的表达较模型组明显减少($P<0.05$,$P<0.01$);Western blot 检测结果显示,电针组 Nogo-A 蛋白(22.45 ± 0.95)% 和 NgR 蛋白(26.76 ± 1.14)% 较模型组[Nogo-A 蛋白(43.75 ± 6.21)%,NgR 蛋白(54.50 ± 5.00)%]明显减少($P<0.01$)。**结论** 电针能明显改善急性脑梗死大鼠的神经传导通路,改善梗死区组织病理表现,减少 Nogo-A 和 NgR 在脑组织内的表达,促进神经功能缺失症状的恢复。

[关键词] 电针;脑梗死;运动诱发电位;Nogo-A;NgR
[中图法分类号] R246; R363; R743.33 [文献标志码] A

Effect of electroacupuncture on motor evoked potential and expression of Nogo-A and its receptor NgR in rats with focal cerebral ischemia

Wu Fang, Gong Biao, Li Xuezhi, Huang Siqin, Wang Li, Fang Yi, Li Feng, Lu Kai (College of Traditional Chinese Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing, 401331, China)

[**Abstract**] **Objective** To observe the effect of electroacupuncture (EA) on motor evoked potential (MEP) and expression of Nogo-A and Nogo receptor (NgR) in brain tissues of rats with focal cerebral ischemia, and to investigate the mechanism of EA in treatment of focal cerebral ischemia. **Methods** Thirty-six adult SD rats were divided into a normal group, a model group and an EA group. Rat models of middle cerebral artery occlusion were successfully established by improved Longa procedures in the model group and EA group. The rats of the normal group and model group were not given any treatment, while those of the EA group were given EA treatment on the 1st day after operation for 14 d. The latency of MEP was examined on the 1st day and 14th day after operation. HE staining and Nissl staining were used to observe the pathological changes of brain tissues, and immunohistochemistry and Western blotting were used to detect the expression of Nogo-A and NgR on the 14th day after operation. **Results** After 14 d, the latency of MEP N1 waves [(15.38 ± 1.58) ms] and N2 waves [(33.60 ± 3.58) ms] in the EA group was significantly shorter than that [N1 waves (21.28 ± 4.0) ms and N2 waves (41.78 ± 3.07) ms] in the model group ($P<0.01$). There was significant difference in brain pathology between the model group and EA group. Immunohistochemical staining and Western blotting results indicated that the expression levels of Nogo-A and NgR in the EA group were significantly lower than those in the model group ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusion** EA is an effective method to improve the neural pathways and cerebral histopathological status, decrease the expression of Nogo-A and NgR, and promote the recovery from neurological deficits after focal cerebral ischemia.

[**Key words**] electroacupuncture; cerebral infarction; motor evoked potential; Nogo-A; NgR

Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing(CSTC2010BB5380). Corresponding author: Gong Biao, Tel: 86-23-65712062, E-mail:bill.tcm@163.com

[基金项目] 重庆市科委自然科学基金(CSTC2010BB5380)
[通信作者] 龚 标,电话:(023)65712062,E-mail:bill.tcm@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20121128.0911.003.html(2012-11-28)

脑卒中是严重危害人类生命的三大疾病之一,具有发病率高,致残率高和病死率高的特点,是中老年人的常见病和多发病,而脑缺血性脑梗死则占脑卒中的70%以上。与西医学限制脑梗死体积和挽救缺血组织的超早期治疗不同,针刺作为中国传统的脑梗死康复手段,不仅临床疗效肯定,而且治疗时间窗长,在脑梗死后数小时、数天、数周、甚至数月仍然有效。近年来许多研究表明,针刺对于人及动物模型的大脑缺血性损伤具有显著保护和治疗作用[1-2],但其具体作用机制不完全清楚。有研究显示电刺激能够阻止神经抑制因子Nogo-A及其受体NgR的表达而促进神经轴突的生长和连接[3]。在此基础上,本研究主要观察电针对脑梗死大鼠脑诱发电位、脑组织病理学和神经抑制因子Nogo-A及其受体NgR表达的影响,旨在为探讨电针治疗脑梗死的可能作用机制提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物分组和造模

清洁级成年SD大鼠36只,体质量为250~300 g,由第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供。将36只大鼠分为正常对照组、模型组和电针组(每组12只)。在自然条件下,喂以固定饲料,自由饮水。

用10%水合氯醛(0.35 mL/100 g)腹腔注射麻醉大鼠,仰卧固定。切开颈部正中偏右约1.5 cm长的皮肤,先找到颈总动脉,用玻璃分针分离干净,注意仔细分离迷走神经,然后在颈总动脉近心处挂线以便于继续分离。然后依次分离右侧颈总动脉(CCA)、颈外动脉(ECA)和颈内动脉(ICA)。在颈外动脉距分叉约5 mm处挂线并结扎颈外动脉。牵拉颈外动脉断端进一步分离清楚颈内动脉,用大鼠动脉夹夹住颈总动脉近心端和颈内动脉靠近颈总动脉分叉处,然后在颈总动脉上剪一小口,将制好的线栓经切口插入颈内动脉,穿过颈总动脉分叉处时将预先挂于颈总动脉的挂线打1个单结,然后移去夹在颈内动脉上的动脉夹,将线栓缓慢地向颈内动脉的方向推进19~21 mm,微遇阻力时停止,此时即停止插线。2 h后定时实行再灌注,最后清理并缝合切口。造模后,参照Longa评价的方法,评分为1~3分者为成功模型,进行实验。

1.2 主要试剂和仪器

神经抑制因子Nogo-A和NgR抗体(北京博奥森生物技术有限公司),HRP标记的二抗(北京康为生物试剂公司),即用型S-P试剂盒和DAB显色剂(北京中杉金桥生物试剂公司),胶片(柯达公司),神经电生理检测仪(POWER/lab/16 SP,澳大利亚),电生理图像分析系统(Scope v3.7.1,澳大利亚),脑立体定向仪(st-7,日本),石蜡切片机(Leica SM2000R),数码显微照相系统(Leica DMLB2),牙科钻、电子天平、双蒸水仪器、电泳仪、离心机等(由第三军医大学大坪医院野战外科研究所提供)。电针综合治疗仪(四川医疗器械厂),毫针(32号1寸,华佗牌)。

1.3 电针治疗

造模成功后,电针组参照《实验针灸学》刺激功能缺失侧"合谷"、"曲池"穴,1次/d,每次30 min,共14 d;正常组和模型组不做任何治疗。刺激参数:选用频率5~10 Hz,强度为2 mA,疏密波。强度以老鼠肢体轻微颤动,不出现强烈挣扎嘶叫为宜。

1.4 运动诱发电位检测

脑运动诱发电位(motor evoked potential,MEP)检测:检测时间为造模成功后第1天和治疗14 d时。检测前用10%水合氯醛(0.35 mL/100 g)腹腔注射麻醉大鼠,仰卧固定于脑立体定向仪上,进行常规消毒,剪开缺血侧头部皮肤约1 cm,暴露颅骨,用牙科电钻行颅骨钻孔(前囟后2 mm,旁开2 mm脑膜处)。钻孔成功后,将刺激电极放置于钻孔部位的运动皮质脑膜表面,参考电极夹住大鼠头部切口皮肤处;将两个银针电极插入对侧腓肠肌肌腹,作为记录电极,且两电极相距约1 cm;地线固定于大鼠的尾部。选择应用直流电极方波电脉冲刺激,根据预实验的结果,刺激参数选为:强度5 mA,波宽2 ms,频率4次/s,然后进行刺激和检测。

1.5 HE及Nissl染色

各组大鼠在预定时间经10%水合氯醛(0.35 mL/100 g)深度麻醉,迅速打开胸腔,暴露心脏,自左心室插管至主动脉,剪开右心耳,注入PBS 200 mL,待冲洗完血液,液体变清亮后,再以4%多聚甲醛200 mL灌注固定。待固定好后,断头取脑,将所取脑组织放在多聚甲醛中固定48 h。固定好后,取缺血侧顶叶梗死区,进行常规脱水、透明、石蜡包埋、连续冠状切片,切片厚度5 μm,进行HE染色和Nissl染色。

1.6 免疫组织化学染色

各组大鼠经灌注取脑部组织后,按上述方法制作石蜡切片,切片厚度5 μm,常规脱蜡,脱水,滴加3% H_2O_2室温静置10 min,置于枸橼酸钠溶液中进行微波高温抗原修复,冷却至室温;滴加正常山羊血清封闭液,室温静置15 min,然后去掉封闭液;分别滴加一抗(浓度均为1∶100)4 ℃孵育过夜,阴性对照组以PBS替代一抗;滴加生物素标记的二抗工作液,37 ℃孵育15 min;滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液,37 ℃孵育15 min;DAB显色,自来水冲洗后,苏木精复染,脱水,透明,中性树胶封片。显微镜下观察,棕黄色颗粒为阳性细胞。免疫组化结果用IPP 6.0专用软件分析平均光密度值和累积光密度值。

1.7 Western blot检测

取冰冻脑组织顶叶梗死区用生理盐水匀浆后,加入蛋白裂解液,离心后取上清液定量,上样量为20 μg,以10% SDS凝胶进行电泳分离,然后将蛋白转移至PVDF膜上。5%的脱脂牛奶封闭1 h,加入一抗(1∶100),4 ℃孵育过夜,TBST溶液充分洗膜3次后,加入辣根过氧化物酶标记的二抗(1∶10 000),37 ℃孵育1 h,TBST溶液洗膜。ECL法发光,放入X线夹片中曝光,显影,然后进行拍照;用Quantity One软件分析各组蛋白相对比值。

1.8 统计学处理

采用SPSS 18.0统计软件,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,行单因素方差分析。

2 结果

2.1 各组大鼠的MEP潜伏期比较

建模成功后1 d时,模型组MEP的N1波和N2波的潜伏期和电针组相比,无统计学意义($P>0.05$)。治疗14 d时,电针组MEP N1波和N2波的潜伏期和模型组相比,差异有统计学意义($P<0.01$)。见表1。

表1 各组大鼠不同时间MEP比较(ms,$n=6$, $\bar{x}\pm s$)

组别	1 d		14 d	
	N1	N2	N1	N2
正常组	7.65±0.64	15.10±2.29	7.13±1.33	15.96± 3.33
模型组	12.55±1.48[a]	29.70±1.87[a]	21.28±4.00[a]	41.78 ±3.07[a]
电针组	13.56±1.65[a]	28.78±1.72[a]	15.38±1.58[ab]	33.60±3.58[ab]

a:$P<0.01$,与正常组比较; b:$P<0.01$,与模型组比较

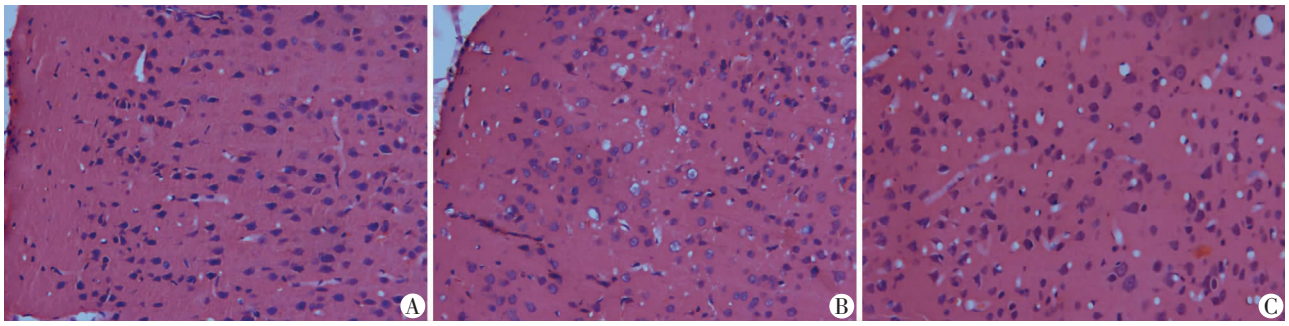
2.2 各组大鼠的HE和Nissl染色比较

2.2.1 HE染色 正常组神经元细胞呈三角形或多角形,核仁清晰,排列较整齐,体积大小较均匀一致。模型组可见神经元细胞肿胀,坏死,神经元密度减少,细胞周围间隙扩大。电针组较模型组明显改善,虽可见细胞有水肿,但梗死区域的神经细胞病变程度较模型组已有明显改善。见图1。

2.2.2 Nissl染色 Nissl小体对缺血损伤所产生的反应非常敏感,当受到缺血损害时,神经细胞内的Nissl小体就会弥漫性消失,减少。正常组的神经细胞形态完好,细胞内的Nissl小体含量丰富,分布均匀。模型组的神经细胞内的Nissl小体已消失,仅在少量细胞可见残留的Nissl小体。电针组的Nissl小体数目较模型组增多,肿胀的神经细胞内可见Nissl小体分布。见图2。

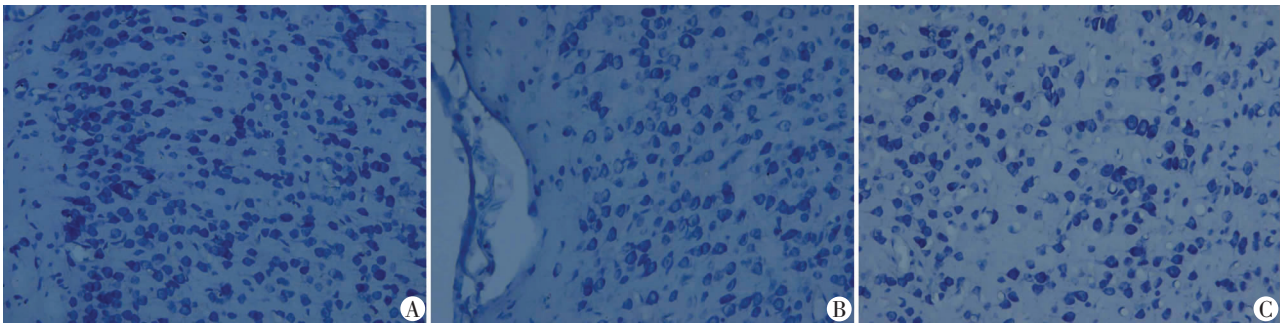
2.3 免疫组化检测大鼠脑组织Nogo-A和NgR的表达

由图3、4可见,阳性细胞呈棕黄色,椭圆形或梭形。神经抑制因子Nogo-A及其受体NgR在正常组皮质神经细胞、模型组和电针组梗死区边缘皮质神经细胞内的表达程度不同,模型组Nogo-A和NgR的表达显著高于正常组($P<0.01$);电针组Nogo-A和NgR的表达低于模型组($P<0.05$,$P<0.01$)。见表2。



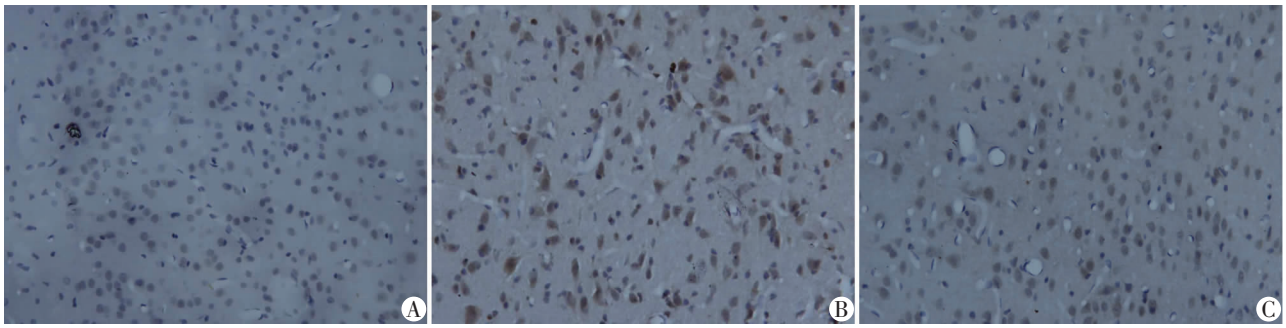
A:正常组;B:模型组;C:电针组

图1 各组大鼠脑组织皮层病理学变化 (HE ×200)



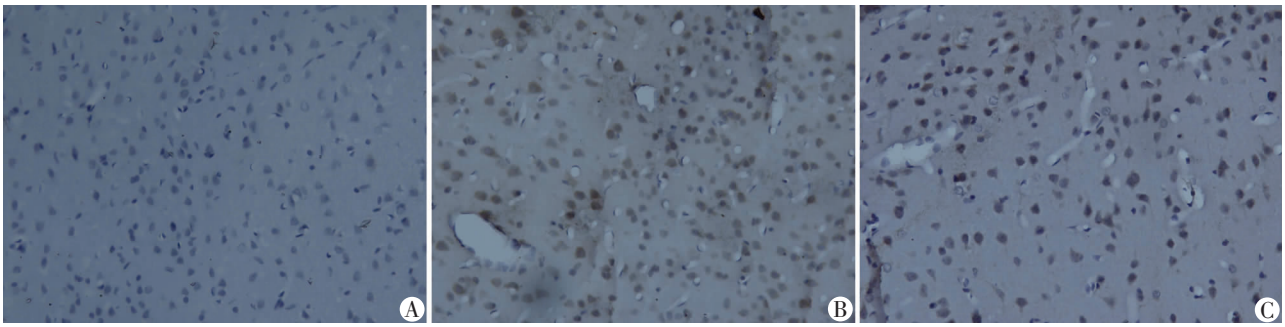
A:正常组;B:模型组;C:电针组

图2 各组大鼠脑组织皮层Nissl染色变化 (×200)



A:正常组;B:模型组;C:电针组

图3 免疫组化检测各组大鼠脑组织皮层Nogo-A的表达 (S-P ×200)



A:正常组;B:模型组;C:电针组

图4 免疫组化检测各组大鼠脑组织皮层NgR的表达 (S-P ×200)

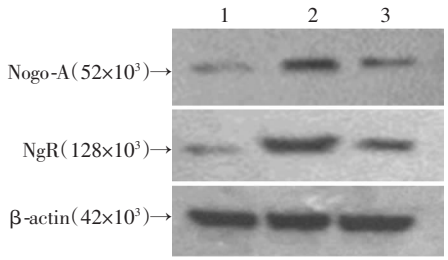
表2 电针对脑梗死大鼠脑组织皮层Nogo-A及其受体NgR表达的影响($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

组别	Nogo-A		NgR	
	平均光密度	累积光密度	平均光密度	累积光密度
正常组	234.14±37.74	22 612.60±6 845.84	246.80±70.37	25 697.70±3 732.41
模型组	477.11±78.73[a]	48 674.87±8 275.89[a]	529.69±36.42[a]	48 576.85±2 139.59[a]
电针组	370.45±42.38[ac]	38 189.78±6 259.68[ab]	451.72±66.18[ab]	40 101.63±5 645.12[ac]

a:$P<0.01$,与正常组比较;b:$P<0.05$,c: $P<0.01$ 与模型组比较

2.4 Western blot检测大鼠脑组织Nogo-A和NgR蛋白的表达

与模型组[Nogo-A蛋白(43.75±6.21)%,NgR蛋白(54.50±5.00)%]相比,电针组Nogo-A蛋白(22.45±0.95)%和NgR蛋白(26.76±1.14)%明显减少($P<0.01$)。见图5。



1:正常组; 2:模型组; 3:电针组

图5 Western blot检测各组大鼠脑组织皮层Nogo-A和NgR蛋白的表达

3 讨论

“合谷”、“曲池”二穴属手阳明大肠经,阳明经多气多血,主润宗筋。选此二穴,即《内经》“治痿独取阳明”之意,在临床中也是治疗中风的要穴,临床和动物实验也均证实其可靠性[4-5]。另外,动物实验与临床略有不同,因脑缺血大鼠的瘫痪后肢功能有很好的自身恢复机能[6],所以没有选用后肢的穴位,包括足阳明经穴位。同时为避免因电刺激梗死区域导致神经再生从而干扰实验的准确性,也不选用头部穴位[3]。

针刺治疗脑梗死临床疗效确切,主要表现为肢体功能的改善,但缺乏实验室依据,神经电生理为其研究提供了可能。MEP能反映运动神经功能状况,其波幅反映放电神经元的数量、潜伏期的长短反映神经传导速度。MEP的波幅和潜伏期的异常程度不仅与神经损伤密切相关[7-8],而且与临床体征严重程度呈正相关[9]。因此,MEP波幅和潜伏期的改善程度可以用于康复评估和预测治疗效果。正常且稳定的MEP波形呈“M”形,主要有两个正向波(N1和N2),异常的MEP主要变现为波形变异和潜伏期的延长。在本实验中,大鼠脑组织缺血后,N1和N2波的潜伏期都相对延长,波形发生变异,N1和N2波形甚至消失,与文献[10-11]报道一致。电针组治疗前后比较没有明显差异,提示我们后期的研究还应延长治疗时间,充分说明电针的治疗效果。但是与模型组比较,电针组治疗后的MEP潜伏期明显缩短,说明电针能够使MCAO大鼠受损的神经元功能得到部分恢复,神经传导速度增加,运动功能得到改善。

成熟的中枢神经系统受中枢内外因素的影响,有很低的再生能力[12-13]。中枢神经系统神经元自身的再生能力为其内因,而中枢神经系统各种神经生长促进和抑制性因子的影响为其外因,目前普遍认为神经抑制因子的影响起主导作用[14-15]。因此,通过干预降低抑制因子对神经再生的影响,增强存活脑区神经元的修复再生,可以部分重建丧失的神经功能。目前已知的中枢神经抑制因子有3个,即Nogo-A、髓鞘相关糖蛋白(MAG)和少突胶质髓鞘糖蛋白(OMgp)[16-17]。3种抑制因子都通过1个共同的受体NgR发挥其阻止中枢神经恢复再生的重要作用[18]。其中Nogo-A是最

重要的抑制因子,Nogo-A 具有细胞外的 Nogo66 和细胞内的 amino-Nogo 两个完全独立的具有抑制活性的结构域,位于细胞膜表面的 NgR 能够和 Nogo-A 的 Nogo66 特异性蛋白结合。Nogo-A 主要存在于神经元和少突胶质细胞中,当实验性大鼠脑组织缺血损伤时,少突胶质细胞也大量死亡,Nogo-A 表达增加并大量释放,与大量再生轴突生长锥表面存在的特异性受体 NgR 结合,从而抑制神经细胞轴突的再生和延长。本实验结果表明正常大鼠脑组织内存在少量的 Nogo-A 和 NgR 蛋白表达,脑缺血大鼠脑组织皮层的 Nogo-A 和 NgR 蛋白的表达与正常大鼠相比显著升高,说明在脑梗死后,Nogo-A 和 NgR 的高表达可能发挥着重要的抑制神经再生作用。电针组的 Nogo-A 和 NgR 的表达较模型组减少,说明电针后脑梗死大鼠梗死区域周围的神经抑制因子 Nogo-A 及其受体 NgR 蛋白的表达明显下降。

本实验结果证实,通过电针干预脑梗死大鼠梗死周围组织神经细胞病变程度减轻,Nissl 小体数量增加,并使其 MEP 传导速度明显增加,瘫痪前肢功能明显改善,梗死区域周围的 Nogo-A 及其受体 NgR 蛋白的表达明显下降,生长抑制因素减弱,梗死区域的神经细胞再生机制得以部分恢复。有研究显示,使用 Nogo-A 和 NgR 抗体治疗脑缺血大鼠,能促进皮质区域新的轴突连接,使其瘫痪肢体运动功能恢复[19-20]。针刺是否是通过降低相关神经生长抑制因子的表达,来促进神经轴突的生长,并使中枢神经系统部分神经功能得到恢复,其机制尚不明确,值得进一步研究。

参考文献:

[1] 张珊珊, 罗勇, 武磊. PI3K/AKT 通路在电针促进局灶性脑缺血再灌注大鼠脑内血管再生中的作用[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(23): 2488-2491.

[2] 张保球, 老锦雄, 潘清洁. 电温针治疗急性脑梗死患者运动功能障碍疗效观察[J]. 上海针灸杂志, 2012, 31(5): 305-307.

[3] 杨冰, 张秀清, 唐吉友, 等. 电刺激对脑梗死大鼠运动功能恢复及 Nogo-A, NgR 表达的影响[J]. 山东大学学报: 医学版, 2008, 46(10): 931-935.

[4] 蔡玉颖, 刘志顺, 王顺, 等. 电针曲池、足三里穴对脑缺血再灌注损伤大鼠神经功能缺损的影响[J]. 上海中医药大学学报, 2009, 23(6): 64-66.

[5] 王可博, 庞国军, 方智松. 针刺合谷透后溪治疗中风偏瘫后手指拘挛127例[J]. 上海针灸杂志, 2008, 27(1): 35.

[6] 黄红云, 陈琳. 神经修复学——21世纪新学科、新理念、新领域[J]. 中国修复重建外科杂志, 2008, 22(4): 439-445.

[7] 姚文平, 王舒, 韩林, 等. 电针水沟穴对脑梗死大鼠运动诱发电位的影响[J]. 中西医结合学报, 2010, 8(10): 979-984.

[8] 李晓光,杨朝阳,杨怡. 成年大鼠胸髓损伤修复后的形态学和电生理学研究[J]. 科学通报,2006, 51(9): 1058-1064.

[9] Schabitz W R, Schade H, Heiland S, *et al*. Neuroprotection by hyperbaric oxygenation after experimental focal cerebral ischemia monitored by MRI[J]. Stroke, 2004, 35(5): 1175-1179.

[10] Gao J, Wang Y T, Wang L L,*et al*. Changes of evoked potential and expression of nestin in subventricular zones in rats after focal cerebral ischemia[J]. Journal of Medical Colleges of PLA, 2007, 22(3): 131-136.

[11] 邵阳, 高洁, 杨期东. 诱发电位评价缺血性中风后脑功能的实验研究[J]. 中国医学物理学杂志, 2009, 26(4): 1324-1326, 1334.

[12] Pernet V, Schwab M E. The role of Nogo-A in axonal plasticity, regrowth and repair [J]. Cell Tissue Res, 2012, 349(1): 97-104.

[13] Huebner E A, Strittmatter S M. Axon regeneration in the peripheral and central nervous systems[J]. Results Probl Cell Differ, 2009 (48): 339-351.

[14] Su Z, Cao L, Zhu Y, *et al*. Nogo enhances the adhesion of olfactory ensheathing cells and inhibits their migration[J]. J Cell Sci, 2007, 120(Pt 11): 1877-1887.

[15] GrandPré T,Li S,Strittmatter S M. Nogo-66 receptor antagonist peptide promotes axonal regeneration[J]. Nature, 2002, 417(6888): 547-551.

[16] Richard M, Sacquet J, Jourdan F, *et al*. Spatio-temporal expression pattern of receptors for myelin-associated inhibitors in the developing rat olfactory system[J]. Brain Res, 2009(1252): 52-65.

[17] Giger R J,Venkatesh K,Chivatakarn O,*et al*. Mechanisms of CNS myelin inhibition:evidence for distinct and neuronal cell type specific receptor systems[J]. Restor Neurol Neurosci, 2008, 26(2/3): 97-115.

[18] Schimmele B,Plückthun A. Identification of a functional epitope of the Nogo receptor by a combinatorial approach using ribosome display [J]. J Mol Biol, 2005, 352(1): 229-241.

[19] Gillani R L , Tsai S Y , Wallace D G, *et al*. Cognitive recovery in the aged rat after stroke and anti-Nogo-A immunotherapy[J]. Behav Brain Res, 2010, 208(2): 415-424.

[20] Tsai S Y, Papadopoulos C M , Schwab M E, *et al*. Delayed anti-Nogo-A therapy improves function after chronic stroke in adult rats[J]. Stroke, 2011, 42(1): 186-190.

(**收稿**:2012-08-27;**修回**:2012-10-20)

(编辑 王小寒)