基础研究 文章编号:0253-3626(2011)01-0038-04

不同穴位电针对局灶性脑梗死大鼠梗死灶周围皮质 GAP-43 表达的影响

马冉冉,李光勤,王进平,黄浩然,付 敏,赖智勇
(重庆医科大学附属第一医院神经内科,重庆 400016)

【摘 要】目的:比较督脉取穴法("人中"、"百会"穴)和背俞穴取穴法("肝俞"、"肾俞"穴)抗急性脑缺血损伤的效果。方法:成年健康雄性 SD 大鼠 80 只,采用线栓法造成右侧大脑中动脉阻断(Middle cerebral artery occlusion,MCAO)模型后,随机分为假手术组(n=5)、模型组(n=25)、电针人中 + 百会组(n=25)、电针肝俞 + 肾俞组(n=25)。选取 24 h、3 、7、14、21 d 5 个时间点。通过 Longa 评分评价神经功能恢复情况,应用免疫组化染色、RT-PCR 方法检测各组大鼠生长相关蛋白 -43(Growth associate protein-43,GAP-43)及 mRNA 的表达情况。结果:假手术组无神经功能障碍,2 电针组 Longa 评分明显优于模型组;GAP-43 在假手术组不表达,缺血 2 h 再灌注 24 h 模型组出现 GAP-43 阳性表达细胞,并且呈先递增后减少的趋势。再灌注后 7 d,模型组的 GAP-43 阳性细胞及其 mRNA 表达达到高峰,14 d 时接近初始水平;而电针人中 + 百会组及肝俞 +肾俞组的 GAP-43 表达仍维持较高水平(P<0.01),但 2 电针组之间差异无统计学意义(P>0.05)。结论:电针人中 +百会组和肝俞 +肾俞组可以促进 MCAO 大鼠脑损伤区轴突再生,2 组针刺效果相近。

【关键词】电针;脑梗死;生长相关蛋白 -43;轴突再生
【中国图书分类法分类号】R743.3 【文献标志码】A 【收稿日期】2010-11-03

Effect of electroacupuncture of different acupoints on GAP-43 expression after focal cerebral infarction in rats

MA Ran-ran, et al
(*Department of Neurology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effect of electroacupuncture (EA) of "Renzhong+Baihui" (RB), "Ganshu+Shenshu" (GS) resisting Acute cerebral ischemia(CI). *Methods*: 80 healthy adult male SD rats were randomly divided into sham-operated group (n=5), model group(n=25), RB group(n=25), GS group(n=25). MCAO was made by nylon monofilament suture, The rats in the EA group received EA treatment at the acupoints RB and GS after MCAO.The rats were randomly divided into different time points (24 h, 3, 7, 14, 21 d after reperfusion).The neural functional recovery was evaluated by Longa's score.Imunohistochemistry and RT-PCR were used to detect the expression of GAP-43 in the ischemic cortex. *Results*: Sham-operated group had no neurological dysfunction, the Longa scores were better in both of the electroacupuncture (EA) groups than in model group.No positive GAP-43 cells were detected in sham-operated group.After 2 hour ischemia and 24 h reperfusion, positive GAP-43 cells were detected in the model group, and their expression showed increased first and then decreased.GAP-43 positive cells and mRNA expression in model group reached the peak on seventh day after MCAO, dropping to incipient level after 14 d.While the expression of GAP-43 in the two EA groups retained higher than model group (P<0.01). No significant differences were found between two EA groups(P>0.05).Inclusions: The electroacupuncture of "Renzhong+Baihui" and "Ganshu+ Shenshu" may play an important role in the process of axonal regeneration after cerebral infarction, and the effect of acupuncture were similar in both groups.

【Key words】electroacupuncture; cerebral ischemia; GAP-43; axon regeneration

脑血管疾病已为我国第一位的死亡原因,其中缺血性脑血管疾病发病率在我国高达 70%,国外高达 80%以上。由于脑缺血造成中枢神经系统(Central nervous system,CNS)损伤后轴突不能有效再生,往往造成不可逆性功能丧失,遗留后遗症。针刺疗法是治疗该病的有效手段之一,目前临床上多选用醒脑开窍的"督脉取穴法"(人中、百会穴),以及与缺血性卒中中医病理机制相关的特定穴中的 "背俞穴取穴法"

作者介绍:马冉冉(1984-),女,硕士,
研究方向:脑血管病研究。
通信作者:李光勤,男,教授,Email:liguangqin@tom.com。

（肝俞、肾俞穴）。但穴位与穴位之间治疗脑损害是否有差异，目前未见研究。

故本研究选取与中枢神经再生、轴突生长、功能重建等密切相关的生长相关蛋白 -43（Growth associate protein-43，GAP-43）[1]为观察指标，比较 2 种取穴法的针刺效应，并探讨电针抗脑缺血损伤的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 清洁级健康雄性 SD 大鼠 80 只，体重为 180~250 g，由重庆医科大学动物中心提供。

1.1.2 主要仪器与试剂 SDZ-Ⅱ型电子针疗仪（华佗牌，苏州医疗用品厂有限公司），兔抗大鼠 GAP-43 单克隆抗体、链霉菌抗生物素蛋白 - 过氧化物酶（SP）免疫组化试剂盒（北京中山生物技术有限公司提供）、DAB 显色试剂盒（武汉博世德生物工程有限公司提供）。

1.2 实验方法

1.2.1 大脑中动脉阻断（Middle cerebral artery occlusion，MCAO）模型制备 参照 Zea Longa[2]方法加以改进。在右侧颈总动脉分叉部近端 2 mm 处剪一小口，将直径为 0.25 mm 的尼龙线沿切口轻轻插入颈内动脉，结扎起始处备线，于栓线插入 2 h 后拔出，制成大鼠右侧 MCAO 模型。假手术组除不插入线栓外其余步骤同模型组。待大鼠清醒后进行神经功能评分，Longa 评分≥1 分者为造模成功，对造模不成功的动物剔出实验，如致各实验动物数不足预定数额者则通过随机抽样原则补齐动物并重新造模。术后动物分组分笼饲养，不禁食水。

1.2.2 动物分组 用抽签法随机分为假手术组 5 只、模型组 25 只、电针人中 + 百会组（电针 1 组）25 只、电针肝俞 + 肾俞组（电针 2 组）25 只，2 电针组与模型组根据脑缺血 2 h 后再灌注 1、3、7、14、21 d 分为 5 个亚组，每亚组 5 只。假手术组只作手术暴露大鼠大脑中动脉，不插线栓。治疗组在造模成功 90 min 后进行电针干预，30 min/d，共进行 21 d。

1.2.3 神经功能评分 参考 Zea Longa[2]5 分制评分标准评分。术后第 1、3、7、14、21 d 分别对各组大鼠进行 Longa 神经功能评分，并对评分进行统计学分析。Longa 评分神经学检查分 5 个等级。（1）0 分：未见神经病学征象，即无神经功能缺损症状。（2）1 分：轻微的神经功能缺损，即大鼠被提尾悬空时病灶左侧前肢呈屈曲、抬高、肩内收、肘关节伸直。（3）2 分：中度局灶性神经功能缺损，有向瘫痪侧旋转征象，即行走向左侧转圈。（4）3 分：重度局灶性神经功能缺损，有向病灶对侧跌倒征象，即行走困难，并向左侧倾倒。（5）4 分：无自发活动及意识水平下降。

1.2.4 穴位选择 督脉取穴“人中”“百会”及背俞取穴“肝俞”（双）、“肾俞（双）。其定位是参照《实验针灸学》[3]常见的大鼠针灸穴位，以 30 号 1 寸毫针刺入穴位。人中：唇裂鼻尖下 1 mm 正中处，向上刺 2 mm；百会：顶骨正中，向后斜刺 2 mm；肝俞：第 9 胸椎下两旁肋间，直刺 6 mm；肾俞：第 2 腰椎下两旁，直刺 6 mm。将针柄分别连接至电针仪上，同一输出电极接同侧两穴，采用频率为 20 ~ 100 Hz 的混频，波宽为 1 ms 的疏密波，刺激强度以大鼠局部肌肉轻微抖动，安静耐受为度。时间 30 min，每天 1 次，均在上午 11 点进行。

1.3 指标检测

1.3.1 免疫组织化学染色 兔抗大鼠 GAP-43 单克隆抗体由武汉博士德生物工程有限公司提供，链霉菌抗生物素蛋白及过氧化物酶免疫组化试剂盒由北京中山生物技术有限公司提供。标本切片常规脱蜡、水化，按试剂盒提供的实验步骤进行操作，DAB 显色，光镜下观察，胞浆出现棕色颗粒为阳性着色。在 200 倍光镜下选取缺血区及周围 5 个互不重叠的视野，每个时间点共计 15 个视野，用 JVCky-F30B3-CCD 高清晰彩色病理图文分析系统，统计在 200 倍光镜下计算每个视野的单位面积阳性细胞数，将所得均数作为各组每个时间点的阳性细胞数作为统计资料。

1.3.2 RT-PCR 检测 总 RNA 提取按 TRIZO 试剂盒（购自 Takara 公司）说明书进行。紫外分光光度计检测 RNA 纯度。逆转录反应采用反转录试剂盒将总 RNA 逆转录成 cDNA 第一链，反应体积 10 μl，37℃孵育 15 min，85℃ 5 s 终止反应，灭活反转录酶。各引物均由上海生工公司设计合成。GAP-43 上游引物序列：5'-TGCTGTGCTGTATGAGAAGAACC-3'，下游引物序列：5'-GGCAACGTGGAAAGCCGTTTCTTAAAGT-3'，产物片段长度 708 bp；GAPDH 上游引物序列：5'-CCATGTTCGTCATGGGTGTGAACCA-3'，下游引物序列：5'-GCCAGTAGAGGCAGGGATGATGTTC-3'，产物片段长度 251 bp。PCR 扩增：反应体系 20 μl，cDNA 2 μl，引物各 1 μl，Master Mix 10 μl，加入 PCR 反应体系中扩增。反应条件为：94℃ 预变性 3 min，94℃变性 30 s，60℃退火 30 s、72℃ 延伸 45 s，共进行 30 个循环，最后 72℃延伸 5 min。PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳，Quantity-one 凝胶自动成像仪成像，以看家基因 GAPDH 为内对照进行质控和标化，获得的条带进行灰度值分析，以目的/内参比值来比较 GAP-43 表达量的差异。

1.4 统计学分析

所有计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示，用 SPSS17.0 软件包对数据进行统计分析。组间差异用单因素方差分析，2 组间比较方差齐者用 LSD 法和 SNK 法。$P \leq 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 神经行为学改变

假手术组无神经功能缺损症状。2 电针组和模型组比较，脑缺血再灌注后 7 d，Longa 评分间差异无统计学意义（$P>0.05$），14 d 至 21 d 有明显差异，提示 2 电针组大鼠神经功能恢复优于模型组（$P<0.05$），2 电针组之间 Longa 评分差异无统计学意义（$P>0.05$）（见表 1 ）。

2.2　各组大鼠脑缺血区皮质 GAP-43 蛋白检测结果

如表 1 所示，GAP-43 在假手术组未见阳性细胞；缺血再灌注后 24 h 模型组缺血区出现 GAP-43 阳性细胞，3 d 逐渐增多，7 d 达高峰，14 d 减少，21 d 明显减少，各时间点表达差异有统计学意义，尤其在 3～14 d 内（$P<0.01$）。电针 1 组及电针 2 组与模型组比较，GAP-43 阳性细胞表达在 7 d 以后明显升高，差异有统计学意义（$P<0.01$）。而 2 电针组之间比较，GAP-43 阳性细胞表达差异无统计学意义（$P>0.05$），提示 2 组效应相当（见表 2，图 1~3）。

2.3　各组大鼠脑缺血区皮质 GAP-43mRNA 的表达变化

PCR 电泳见 GAP-43 与 GAPDH 分别位于 708 bp 和 251 bp，其基因水平与蛋白表达规律一致，通过凝胶图像分析仪扫描 GAP-43 与 GAPDH条带的灰度值，并计算两者的比值。以 GAP-43 表达高峰值 7 d 为例，假手术组为 0.35 ± 0.09，GAP-43 呈低水平表达，模型组为 1.39 ± 0.144，较假手术组提高明显（$P<0.05$）。电针 1 组为 1.73 ± 0.05，电针 2 组为 1.69 ± 0.13，经电针治疗 7 d 后，GAP-43 表达均较模型组增加，差异有统计学意义（$P<0.01$），而 2 电针组比较，差异无统计学意义（$P>0.05$）（见图 4）。

3　讨　论

GAP-43 是一种膜磷酸蛋白质，是再生相关基因（Regeneration-associated gene，RAG）表达的产物蛋白，它不均匀地存

表 1　各组大鼠缺血再灌注后神经症状评分比较（$\bar{x} \pm s$）

组别	24 h	3 d	7 d	14 d	21 d
假手术组	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
模型组	2.40 ± 0.89△	2.40 ± 0.55△	2.80 ± 0.45△	3.00 ± 0.71△	3.40 ± 0.55△
电针 1 组	2.00 ± 0.00	2.20 ± 0.45	2.20 ± 0.45	1.20 ± 0.84*	0.60 ± 0.55*
电针 2 组	2.00 ± 0.71	2.20 ± 0.45	2.20 ± 0.45	1.40 ± 0.89*	1.00 ± 0.71*

注：△：与假手术组相比，$P<0.05$；*：与模型组相同时间点比，$P<0.05$（电针 1 组即电针人中 + 百会组；电针 2 组即电针肝俞 + 肾俞组）

表 2　各组大鼠缺血再灌注后脑内 GAP-43 阳性细胞数量比较（$\bar{x} \pm s$）

组别	24 h	3 d	7 d	14 d	21 d
假手术组	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
模型组	42.95 ± 3.57△	72.75 ± 3.77△	120.00 ± 3.46△	55.45 ± 7.01△	37.60 ± 2.74△
电针 1 组	66.40 ± 0.77	93.45 ± 8.03	175.55 ± 5.96*	92.70 ± 2.49*	70.25 ± 5.24*
电针 2 组	61.86 ± 4.73	87.58 ± 6.00	158.14 ± 6.23*	85.36 ± 4.95*	65.85 ± 6.97*

注：△：与假手术组相比，$P<0.01$；*：与模型组相同时间点比，$P<0.01$（电针 1 组即电针人中 + 百会组；电针 2 组即电针肝俞 + 肾俞组）



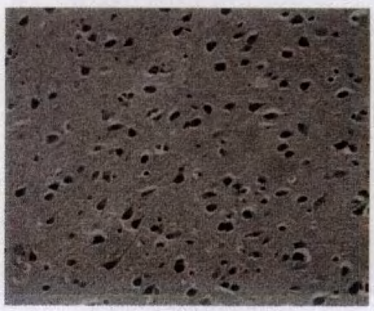
（ABC × 200）（第 7 天）

图 1　模型组 GAP-43 表达



（ABC × 200）（第 7 天）

图 2　电针 1 组 GAP-43 表达



（ABC × 200）（第 7 天）

图 3　电针 2 组 GAP-43 表达

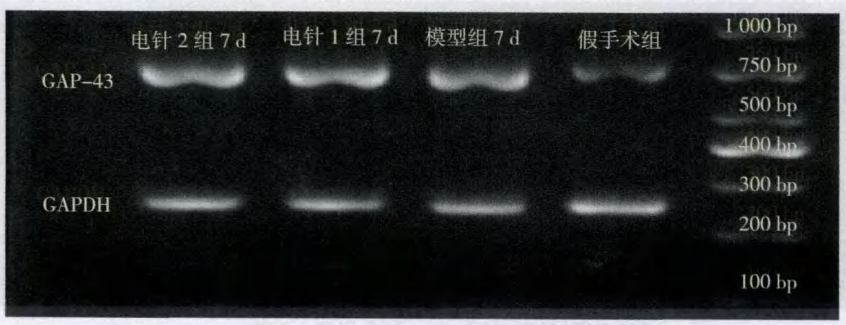


图 4　各组 GAP-43 mRNA 表达（第 7 天）

在于脑组织中。特别是在生长、再生的轴突末端含量极高，在指导轴突生长和调控新的突触连接中发挥关键作用。所以GAP-43 被认为是神经元生长期的内在决定因子，可作为神经生长与再生的分子标志物[4]。

Casoli 等[5]用原位 RT-PCR 技术证实 GAP-43 mRNA 在小神经胶质细胞、浦肯野细胞、海马 CA1 及 CA3 区椎体细胞、CA4 门区、齿状回颗粒层等多种细胞中广泛表达，并且与突触可塑性密切相关。国内研究，大鼠缺血再灌注 2h，皮质区、海马及纹状体区神经元 GAP-43 呈基础表达，6 h 后表达逐渐增高，7 d 达高峰，14 d 开始降低[6]。本文结果显示，在缺血－再灌注后前 3 d，缺血区 GAP-43 阳性细胞呈基础表达，随着缺血再灌注时间的延长，GAP-43 阳性细胞逐渐增多，7 d 达高峰，14 d 减少，21 d 明显减少。与前述文献结果相一致。其机制可能是中枢神经受损后，随着再灌注损伤时间窗的延长，新生轴突末梢 GAP-43 被激活，进入高表达代偿期，从而促使纤维发芽和神经突触的连接重建，进而使神经元可塑性增高。可见，GAP-43 是随突触重建出现，重建完成后逐渐下降并消失的。

此外，GAP-43 还参与生长锥形态的调节、细胞骨架结构的变化及与其相对应钙调蛋白的结合，以及神经递质释放的调节[7]。国外学者认为神经元内在生长程序的启动以GAP-43 的生物学效应与 cAMP-PKC 通路有关[8]。那么，电针促进脑缺血再灌注后 GAP-43 高表达的信号通路机制有可能是在 cAMP-PKC 等信号途径的调控下，参与了轴突再生，其确切信号机制尚待进一步探索。

本实验发现电针治疗 7 d 后，各个时间点 GAP-43 mRNA 的表达均高于对照组，其下降与回升在时程上与模型组是同步的，提示电针可以促进 MCAO 模型大鼠缺血损伤区轴突的延伸及再生，对神经的恢复有一定的效果，此可能是电针促进脑缺血损伤区中枢神经修复的重要机制之一。

本研究又通过比较 2 种不同穴位针刺对急性脑梗死的影响，结果显示：电针人中＋百会组与电针肝俞＋肾俞组针刺效应相近，说明 2 组对脑缺血损伤区中枢神经修复均有一定促进作用。临床上督脉取穴法常见，而背俞穴取穴法治疗急性脑血管病的报道较少，且对其机制探讨也甚少，因此取背俞穴法的临床意义值得重视。

参 考 文 献

[1] Carmichael S T, Archibeque I, Luke L, et al. Growth-associated gene expression after stroke: evidence for a growth-promoting region in periinfarct cortex[J].Exp Neurol, 2005, 193(2): 291-311.

[2] Zea L E, Weistein P R, Calson S, et al.Reversible middle cerebral Artery occlusion without craniectomy in rats[J].Stroke, 1989, 20(1): 84-91.

[3] 林文注，王 佩.实验针灸学[M].上海：上海科学技术出版社，1994.286-290.

[4] Denny J B.Molecular mechanisms, biological actions, and neuropharmacology of the growth-associated protein GAP-43[J].Curr Neuropharmacol, 2006, 4(4): 293-304.

[5] Casoli T, Di Stefano G, Gracciotti N, et al. Cellular distribution of GAP-43 mRNA in hippocampus and cerebellum of adult rat brain by in situ RT-PCR [J].J Histochem Cytochem, 2001, 49(9): 1195-1196.

[6] 刘广义.大鼠脑缺血再灌注损伤后 GAP-43 及 IGF-1 在神经系统中的表达[J].中华神经外科疾病研究杂志，2008，7(3)：223-226.

[7] Nozumi M, Togano T, Takahashi-Niki K, et al.Identification of functional marker proteins in the mammalian growth cone[J].Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106(40): 17211-17216.

[8] Krueger D D, Nairn A C.Expression of PKC substrate proteins, GAP-43 and neurogranin, is downregulated by cAMP signaling and alterations in synaptic activity[J].Eur J Neurosci, 2007, 26(11): 3043-3053.

（责任编辑：张学颖）