

早期强化运动训练与电针治疗对脑缺血再灌注后大鼠神经功能恢复的作用^{*}

西安市第九医院 马冉冉 李健瑞¹ 伏亚红 袁博博 李燕青 高军宪^{*}, 西安 710054

摘要 目的:观察早期强化运动训练与电针治疗对局部脑缺血大鼠再灌注后神经功能恢复的疗效并探讨其机制。方法:将 65 只健康成年 SD 雄性大鼠随机分为假手术组(5 只)、大脑中动脉闭塞再灌注(MCAO)模型组(20 只)、电针组(20 只)、强化运动训练组(20 只)。用线栓法建立右侧 MCAO 模型,电针组选取人中、百会穴给予电针刺激。强化运动训练组采用跑笼运动试验,观察 4 组大鼠的运动功能。选取 24 h、3 d、7 d、14 d 4 个时间点,应用免疫组化方法检测脑缺血区皮层 GAP-43 及 Neurocan 阳性细胞的表达情况。采用神经症状评分评价造模情况及神经功能的恢复情况,TTC(2,3,5-三苯基氯化四氮唑)染色观察大鼠局部脑缺血再灌注后梗死体积的大小。结果:2 周后,强化运动训练组及电针组的神经症状评分明显低于模型组($P < 0.05$),并高于假手术组($P < 0.05$);强化运动训练组及电针组的脑梗死体积明显小于模型组($P < 0.05$),电针组与运动训练组比较差异无统计学意义。结论:脑缺血再灌注后早期强化运动训练或电针刺激能够减小脑梗死体积,促进脑缺血大鼠神经功能的恢复。早期康复治疗可上调脑缺血区 GAP-43 表达与下调 Neurocan 表达,可能是其促进脑损伤区中枢神经修复的重要机制之一。

关键词 脑卒中; 康复; 电针; 轴突再生; GAP-43; Neurocan

中图分类号 R743.3

文献标识码 A

DOI 10.11768/nkjwzzzz20190316

A comparative study on neural functional recovery between early intensive training and electroacupuncture treatment after cerebral ischemia reperfusion in rats MA Ranran, LI Jian-rui¹, FU Ya-hong, YUAN Bo-bo, LI Yan-qing, GAO Jun-xian^{*}. Ninth Hospital of Xi'an, Xi'an 710054, China

Abstract Objective: To compare the effects of the early intensive training (EIT) and electroacupuncture (EA) therapy on the nerve functional recovery and infarction volume after local cerebral ischemia reperfusion in rats, and investigate the mechanism of promoting the functional recovery. Methods: Sixty-five healthy adult male SD rats were randomly divided into sham-operated group ($n = 5$), MCAO group ($n = 20$), EA group ($n = 20$), and EIT group ($n = 20$). MCAO was made by nylon monofilament suture. The rats in the EA group received EA treatment at the acupoints Renzhong + Baihui after MCAO. The animals in the EIT group received treadmill running to observe the recovery of motor function. The rats were randomly fallen into different time points (24 h, 3 days, 7 days, and 14 days after reperfusion). The successful establishment of models and the neural functional recovery were evaluated by Longa's score. TTC staining was used to observe the size of the infarct volume after local cerebral ischemia reperfusion in rats. Immunohistochemistry was used to detect the expression of GAP-43 and Neurocan in the ischemic cortex. Results: The Longa scores were significantly lower in both EIT group and EA group than in model group ($P < 0.05$), but significantly higher than in sham-operated group ($P < 0.05$). The infarct volume in EIT group and EA group was significantly smaller than in model group ($P < 0.05$), but there was no significant difference between EA group and EIT group. Conclusion: The EIT or EA therapy can reduce the size of the infarct volume and promote the recovery of neurological function after local cerebral ischemia reperfusion in rats. Early rehabilitation treatment could up-regulate the expression of GAP-43, and down-regulate the Neurocan expression, which may be one of the important mechanisms of promoting the axon regeneration in the cerebral injured area after cerebral infarction.

Key words Stroke; Rehabilitation; Electroacupuncture; Axon regeneration; GAP - 43; Neurocan

脑缺血致中枢神经系统损伤后,引起轴突不能有效再生,往往造成不可逆性神经功能丧失。目前针刺及运动康复治疗在临床治疗脑缺血方面已取得公认的疗效,本实验研究早期电针及运动锻炼对脑

缺血再灌注后大鼠脑生长相关蛋白-43(GAP-43)和神经蛋白聚糖(Neurocan)的影响及其神经功能恢复状态,为缺血性脑血管疾病及其后遗症的早期康复治疗提供客观的理论依据。

材料与方法

^{*}基金项目:西安市科技计划项目[No:SF1319(4)]

¹兵器工业 521 医院

^{*}通信作者:高军宪, E-mail: junxiangao45266@sohu.com

实验动物 清洁级健康雄性 SD 大鼠 65 只,体重为 180 ~ 250 g,由西安交通大学动物中心提供。

主要仪器与试剂 华佗牌 SDZ-II 型电子针疗仪(苏州医疗用品厂有限公司),兔抗大鼠 GAP-43 单克隆抗体(武汉博士德生物工程有限公司),小鼠抗大鼠 Neurocan 单克隆抗体(Chemicon 公司),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)、DAB 显色试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司)。

实验方法

MCAO 模型制备 参照 Zea Longa^[1] 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,制成大鼠右侧大脑中动脉栓塞模型(middle cerebral artery occlusion, MCAO)。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,剔出造模不成功的大鼠,造模成功大鼠数量须达到实验预定要求。术后动物分组分笼饲养,不禁食水。

动物分组 用抽签法随机分为假手术组(5 只)、大脑中动脉闭塞再灌注(MCAO)模型组(20 只)、电针组(20 只)、强化运动训练组(20 只)。电针组与模型组根据脑缺血 2 h 后再灌注 1、3、7、14 d 分为 4 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。

神经症状评分 参考 Zea Longa^[1] 5 分制评分标准评分。术后第 1、3、7、14 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。

穴位选择 督脉取穴“人中”“百会”。其定位是参照《实验针灸学》^[2] 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。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,14 次/d,均在上午 11 点进行。

强化运动训练 运动训练组于造模术后 24 h 开始每天给予跑笼运动训练^[3],运动训练采用国际上常用的跑笼训练方法:将大鼠放在一个直径 20 cm,长度 40 cm 的滚笼中,由马达带动滚笼旋转,方向和转速均可自行调节。跑笼直径 20 cm,长度 40 cm,由电动马达带动。每天训练 1 次,每次 20 min,每周 6 次,共训练 2 周。强度循序渐进,其中前 4 d,5 r/min,中间 4 d,10 r/min,后 4 d,15 r/min。模型组与假手术组大鼠则置于普通笼内饲养,除自由饮水、进食、活动外,不予以任何针对性训练。

2,3,5-三苯基氯化四氮唑(TTC)染色 采用 TTC 染色作为模型制作是否成功和梗死范围的确认指标。TTC 是线粒体呼吸链中吡啶-核苷结构酶系统的质子受体,是一种脂溶性光敏感的复合物。它能与活细胞线粒体内的脱氢酶反应,生成深红色脂溶性物质,而死亡细胞由于线粒体脱氢酶失活而不显色,即 TTC 染色正常组织呈红色,而缺血组织显示苍白色。其主要步骤为:将大鼠 MCAO 2h 再灌注 24 h 后断头取脑,置于 -20℃ 以下 10 min,连续冠状切片(片厚约 2 mm)。然后将脑片置于 2% TTC (pH 7.2) 37℃ 孵育 30 min,用 0.1 MPBS 溶液冲洗 2~3 次,然后拍照将图片保存。

GAP-43 免疫组织化学染色 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。

统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件包。计量资料用($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较方差齐者用 LSD 法和 SNK 法,组间差异用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

TTC 染色 假手术组呈红色,模型组、电针组及运动训练组 3 组可见明显梗死灶。缺血累及顶叶、额叶、颞叶皮质及基底节区等深部组织,均符合 MCA 供血范围,见图 1。



图1 TTC 染色结果

HE 染色 光镜下,可见假手术组大脑皮质细胞排列有序,组织结构完整、间隙无异常,胞膜完整、胞浆着色均匀、细胞核清楚、核仁明显;MCAO 后 1 d 缺血坏死区组织疏松、水肿,呈海绵状,有炎性细胞(包括中性粒细胞、)浸润,表示模型制备成功,并可用于后续实验。MCAO 后 7 d 镜下可见细胞排列紊乱,出现坏死液化腔甚至组织结构缺如,见图 2;MCAO 后 14 d 坏死区胶质细胞广泛增生,被瘢痕组织取代;电针组与模型组比较,MCAO 后 1 d 组织水肿减轻,MCAO 后 7 d 坏死面积减少,再灌注 14 d 缺血区周围毛细血管数量增多。

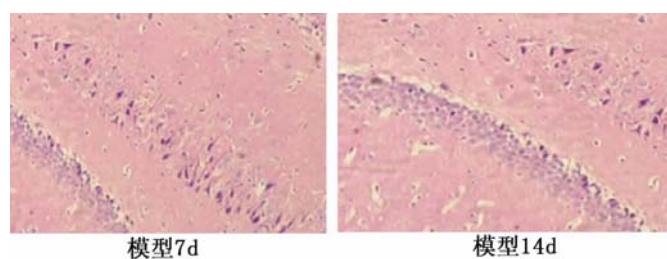


图2 HE 染色光镜下脑组织表现

神经行为学改变 假手术组无神经功能缺损症状。脑缺血再灌注后 7 d,Longa 评分电针组及强化运动训练组与模型组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),14 d 有明显差异,提示两治疗组大鼠神经功能恢复优于模型组($P < 0.05$),两治疗组之间 Longa 评分无明显差异($P > 0.05$),见表 1。

各组大鼠脑缺血区皮质 GAP-43 蛋白水平 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,7 d 达高峰,14 d 减少,各时间点表达有显著性差异,尤其在 3 ~ 14 d 内($P < 0.01$)。强化运动训练组及电针组 GAP-43 阳性细胞表达在 7 d 以后明显升高,与模型组比较,差异有显著意义($P < 0.01$)。而两治疗组之间,GAP-43 阳性细胞表达无明显差异($P > 0.05$),见表 2,图 3。

各组大鼠脑缺血区皮质 Neurocan 蛋白水平 在再灌注后 24 h,强化运动训练组及电针组 Neurocan 阳性表达细胞虽低于模型组,但差异无统计学意义($P > 0.05$);在再灌注后 3 ~ 14 d 较模型组明显减少($P < 0.01$)。而两治疗组之间比较,Neurocan 阳性细胞表达无明显差异($P > 0.05$),见表 3,图 4。

讨 论

缺血性脑血管病是危害人类健康的主要疾病之一,脑缺血继而导致神经功能的损伤^[4]。神经生长相关蛋白 43 (GAP-43) 是一种膜磷酸蛋白质,是神经再生相关基因 (regeneration related genes, RAGs)

表1 4 组大鼠缺血再灌注后神经症状评分比较

(分, $\bar{x} \pm s$)

组别	24h	3d	7d	14d
假手术组	0	0	0	0
模型组	$2.40 \pm 0.89^{\Delta}$	$2.40 \pm 0.55^{\Delta}$	$2.80 \pm 0.45^{\Delta}$	$3.00 \pm 0.71^{\Delta}$
训练组	$2.00 \pm 0.71^{\Delta}$	$2.20 \pm 0.45^{\Delta}$	$2.20 \pm 0.45^{\Delta}$	$1.40 \pm 0.89^{* \Delta}$
电针组	$2.00 \pm 0.00^{\Delta}$	$2.20 \pm 0.45^{\Delta}$	$2.20 \pm 0.45^{\Delta}$	$1.20 \pm 0.84^{* \Delta}$

注:与假手术组比较, $^{\Delta}P < 0.05$;与模型组同时时间点比较, $^{*}P < 0.05$

表2 4 组大鼠缺血再灌注后脑内 GAP-43 阳性细胞数量比较

(个, $\bar{x} \pm s$)

组别	24h	3d	7d	14d
假手术组	0	0	0	0
模型组	$42.95 \pm 3.57^{\Delta}$	$72.75 \pm 3.77^{\Delta}$	$120.00 \pm 3.46^{\Delta}$	$55.45 \pm 7.01^{\Delta}$
训练组	$61.86 \pm 4.73^{\Delta}$	$87.58 \pm 6.00^{\Delta}$	$158.14 \pm 6.23^{* \Delta}$	$85.36 \pm 4.95^{* \Delta}$
电针组	$66.40 \pm 0.77^{\Delta}$	$93.45 \pm 8.03^{\Delta}$	$175.55 \pm 5.96^{* \Delta}$	$92.70 \pm 2.49^{* \Delta}$

注:与假手术组比较, $^{\Delta}P < 0.01$;与模型组同时时间点比较, $^{*}P < 0.01$

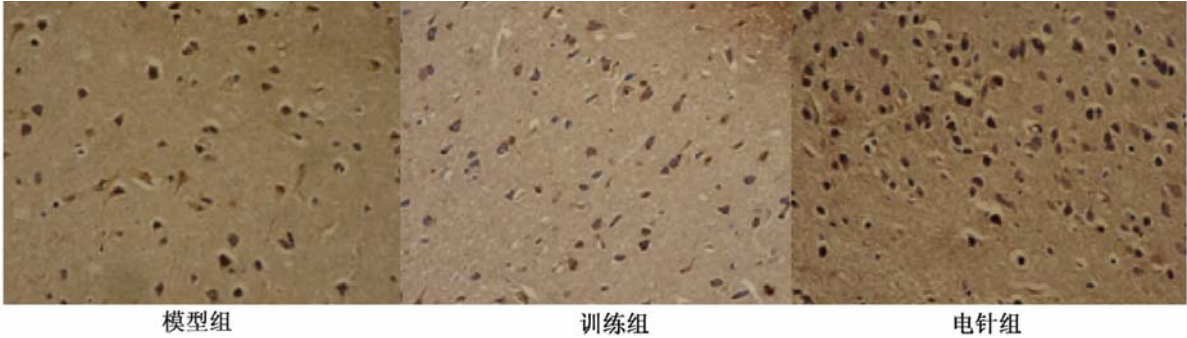


图3 第7天 GAP-43 免疫组织化学染色×200

表3 4组大鼠缺血再灌注后脑内 Neurocan 阳性细胞数量比较 (个, $\bar{x} \pm s$)

组别	24h	3d	7d	14d
模型组	25.60 ± 3.36	44.00 ± 2.74	66.00 ± 2.92	93.60 ± 2.70
训练组	23.15 ± 1.57	23.85 ± 3.05 *	27.87 ± 2.95 *	41.26 ± 1.58 *
电针组	22.00 ± 1.46	22.10 ± 3.38 *	28.75 ± 3.03 *	42.30 ± 1.87 *

注:与模型组同时间点比较, * $P < 0.01$

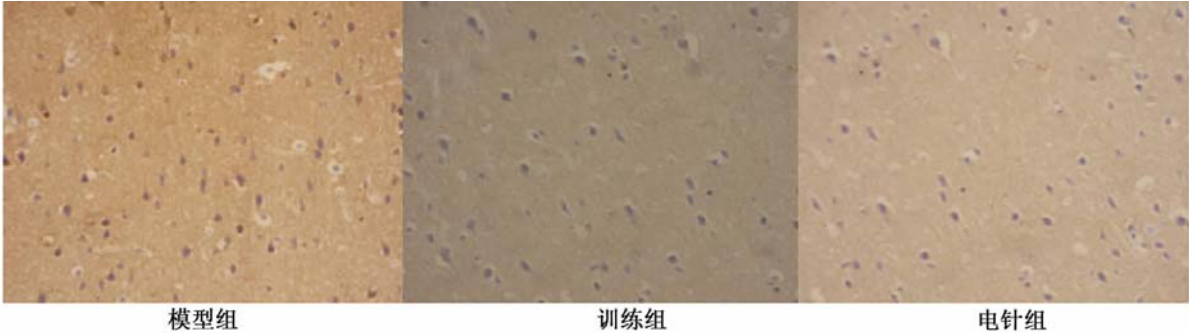


图4 第14天 Neurocan 免疫组织化学染色×200

表达的产物蛋白,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。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^[5]。早期国内研究,大鼠缺血再灌注 2 h,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]。本文中在缺血-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。与前述文献结果相一致。其机制可能是随着脑缺血再灌注损伤时间窗的延长,新生轴突末梢 GAP-43 被激活,逐渐高表达,从而促使轴突出芽和神经突触的连接重建,进而使神经元可塑性增强。本实验发现早期运动训练与电针治疗 7 d 后,各个时间点 GAP-43 阳性细胞的表达均高于模型组,提示早期康复治疗可以促进 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效果,且两组康复方法之间疗效相当,无明显差异。

Neurocan 是神经组织里的一种特异性硫酸软骨素蛋白聚糖,是伴随胶质细胞增生而生成的调节因子,目前认为其与胶质瘢痕形成和轴突生长等生理和病理过程有关^[7]。正常成熟鼠脑中无法检测到全长 Neurocan,但其在成熟的鼠中枢神经系统损伤后分泌会明显增强,脑损伤会刺激星型胶质细胞、小胶质细胞等细胞的增殖与迁移分化,形成胶质瘢痕组织,Neurocan 表达上调,抑制轴突延伸生长^[8]。研究发现 Neurocan 的表达在缺血后明显增高,2 周出现表达高峰,这证实了脑梗死可以激活梗死灶周围反应性星形胶质细胞 Neurocan 的表达。亦有国内学者研究发现,采用其他穴位组电针治疗脑梗死大鼠可以下调 neurocan 的表达^[9]。本实验结果显示,电针与运动训练治疗 3 d 后各时间点 Neurocan 较模型组显著降低,与前述结果一致,提示 Neurocan 对中枢神经系统神经元存活与轴突生长的抑制周期较长,从而阻碍神经再生,影响神经功能恢复。由此看来,电针与运动训练均可减少 Neurocan 的表达,且疗效相当,其信号机制有待于进一步探索。

早期研究已证实,大鼠局灶性脑缺血后进行各种康复治疗,如运动训练、针灸或置于丰富环境中均有利于其神经功能恢复^[10]。多数学者认为,脑梗死后康复治疗介入时间越早,神经功能恢复越好,后遗症、并发症越少。研究发现,大鼠脑缺血后 24 h 开始运动训练,其神经功能较模型组明显恢复^[11,12]。本实验说明早期强化运动训练、电针治疗能够改善脑梗死大鼠的神经功能,训练疗程达到 14 d 时有显著效果,要尽早启动康复治疗,且疗程不能低于 7 d。

参考文献

- Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. *Stroke*, 1989, 20(1):84-91.
- 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.
- 郑海清,胡普权,方杰,等. 运动训练对脑梗死大鼠梗死边缘区突触可塑性的影响[J]. *中华医学杂志*, 2012, 92(9):628-633.
- 颜因,谷依雪,刘多,冯桂波. 大鼠局灶性脑缺血/再灌注中星形胶质细胞的反应和 NF- κ Bp65、ICAM-1 在星形胶质细胞中的表达[J]. *内科急危重症杂志*, 2016, 22(03):219-224.
- Denny JB. Molecular mechanisms, biological actions, and Neuro-

pharmacology of the growth-associated protein GAP-43[J]. *Curr Neuropharmacol*, 2006, 4(4):293-304.

- 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.
- Shen LH, Li Y, Gao Q, et al. Down-regulation of neurocan expression in reactive astrocytes promotes axonal regeneration and facilitates the neurorestorative effects of bone marrow stromal cells in the ischemic rat brain[J]. *Glia*, 2008, 56(16):1747-1754.
- Carulli D, Rhodes KE, Brown DJ, et al. Composition of perineuronal nets in the adult rat cerebellum and the cellular origin of their components[J]. *J Comp Neurol*, 2006, 494(4):559-577.
- 张爱武,方燕南,王雪晶,姜涛. 电针对急性脑梗死大鼠皮层神经蛋白聚糖表达的影响. *中华神经医学杂志*, 2009, 2(8):140-144.
- Chen J, Sanberg PR, Li Y, et al. Intravenous administration of human umbilical cord blood reduces behavioral deficits after stroke in rats[J]. *Stroke*, 2001, 32(11):2682-2688.
- Matsuda F, Sakakima H, Yoshida Y. The effects of early exercise on brain damage and recovery after focal cerebral infarction in rats[J]. *Acta Physiol (Oxf)*, 2011, 201(2):275-287.
- Zhang P, Zhang Q, Pu H, et al. Very early initiated physical rehabilitation protects against ischemic brain injury[J]. *Front Biosci (Elite Ed)*, 2012, 4:2476-2489.

(2017-10-20 收稿 2018-09-14 修回)

(上接第 215 页)

- Ke L, Tong ZH, Li WQ, et al. Predictors of critical acute pancreatitis: a prospective cohort study [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2014, 93(21):e108.
- Boskovic A, Pasic S, Soldatovic I, et al. The role of D-dimer in prediction of the course and outcome in pediatric acute pancreatitis [J]. *Pancreatol*, 2014, 14(5):330-334.
- Wang HL, Yu KJ. Sequential blood purification therapy for critical patients with hyperlipidemic severe acute pancreatitis [J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21(20):6304-6309.
- Chang YT, Chang MC, Tung CC, et al. Distinctive roles of unsaturated and saturated fatty acids in hyperlipidemic pancreatitis [J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21(32):9534-9543.
- Li MQ, Shi ZX, Xu JY. Hemodiafiltration combined with resin-mediated adsorption as a therapy for hyperlipidemic acute pancreatitis [J]. *Cell Biochem Biophys*, 2014, 69(3):699-702.
- Talukdar R, Nageshwar Reddy D. Predictors of adverse outcomes in acute pancreatitis: new horizons [J]. *Indian J Gastroenterol*, 2013, 32(3):143-151.
- Badhal SS, Sharma S, Saraya A, et al. Prognostic significance of D-dimer, natural anticoagulants and routine coagulation parameters in acute pancreatitis [J]. *Trop Gastroenterol*, 2012, 33(3):193-199.
- 许春阳,叶宏伟,陈波. 凉膈散联合西医综合疗法对 ICU 急性胰腺炎的疗效观察[J]. *内科急危重症杂志*, 2018, 24(1):28-30.
- Derevianko A, D'Amico R, Simms H. Polymorphonuclear leucocyte (pmn) derived inflammatory cytokines regulation by oxygen tension

and extracellular matrix [J]. *Clin Exp Immunol*, 1996, 106(3):560-567.

- Raraty M, Ward J, Erdemli G, et al. Calcium dependent enzyme activation and vacuole formation in the apical granular region of pancreatic acinar cell[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(24):13126-13131.
- Niederau C, Luthen R. Events inside the pancreatic acinar cell in acute pancreatitis: role of secretory blockade, Calcium release, And dehydration in the initiation of trypsinogen activation and autodigestion. In: Iankisch PG, Dimagno EP, Eds. *Pancreatic disease, state of the art and future aspects of research*[J]. Berlin: Springer Ed, 1999, 47(13):14-23.
- AA, Gutierrez jimenez E, Castro jimenez R, et al. Total serum calcium and corrected calcium as severity predictors in acute pancreatitis[J]. *Revista de Gastroenterologia de Mexico*, 2014, 157(3):13-21.
- Izquierdo R, Jr BE, Sandberg L, et al. Serum calcium metabolism in acute experimental pancreatitis. *Surgery*, 1985, 98(6):1031-1037.
- Imrie CW, Allam BF, Ferguson JC, et al. Hypocalcaemia of acute pancreatitis: the effect of hypoalbuminemia. *Curr Med Res Opin*, 1976, 4(2):101-116.
- Paloyan E, Paloyan D, Harper PV, et al. The role of glucagon hypersecretion in the relationship of pancreatitis and hyperparathyroidism. *Surgery*, 1967, 62(1):167-173.
- 黄海兵 钟谊堂 廖永生, 等. 吡格列酮对急性胰腺炎肝损伤的保护作用研究[J]. *内科急危重症杂志*, 2018, 24(1):60-61.

(2017-07-07 收稿 2019-04-09 修回)