

· 基础研究 ·

头针配合康复训练对脑缺血再灌注损伤沙鼠模型神经可塑性相关蛋白 MAP-2 的调节作用

郭效德 周莹 王睿 周翔 郭银丰 唐君 高山

【摘要】目的 观测头针配合康复训练对脑缺血再灌注损伤沙鼠模型神经可塑性相关蛋白 MAP-2 调节作用。**方法** 使用 SPSS 19.0 版统计软件生成的随机数字表将 36 只成功造模的脑缺血再灌注损伤模型雄性沙鼠随机分为模型组、康复训练组和头针配合康复训练组,每组 12 只。模型组不作任何干预措施,康复训练组采用康复训练治疗,头针配合康复训练组给予头部穴位电针刺激配合康复训练治疗;1 日 1 次,共治疗 14 d。分别于术后 24 h、第 7 天和第 14 天,对各组沙鼠采用 Bederson 评分评定其神经功能,14 d 后行缺血灶 MAP-2 表达检测,并进行统计学分析比较。**结果** 术后第 7 天,头针配合康复训练组的 Bederson 评分为 (1.81 ± 0.52) 分,与模型组 (2.13 ± 0.49) 分和康复训练组 (2.00 ± 0.31) 分比较,组间差异均无统计学意义 $(P > 0.05)$;但第 14 天头针配合康复训练组的 Bederson 评分为 (0.47 ± 0.31) 分,与模型组 (1.46 ± 0.72) 分和康复训练组 (1.04 ± 0.63) 分比较,头针配合康复训练组明显优于其余两组 $(P < 0.05)$,且康复训练组亦优于模型组 $(P < 0.05)$ 。MAP-2 蛋白表达水平定量分析,头针配合康复训练组为 (0.91 ± 0.18) ,与模型组的 (0.43 ± 0.21) 及康复训练组的 (0.67 ± 0.24) 比较,组间差异均有统计学意义 $(P < 0.05)$,康复训练组较模型组也有一定优势 $(P < 0.05)$ 。**结论** 头针配合康复训练能更好地促进神经运动功能的恢复,并增加脑缺血再灌注损伤沙鼠缺血灶神经可塑性相关蛋白 MAP-2 的表达。

【关键词】 脑缺血再灌注损伤; 头针; MAP-2; 沙鼠; 针灸

The effect of scalp acupuncture combined with rehabilitation training on the regulation of neuro-plasticity-associated protein MAP-2 in gerbils modelling cerebral ischemia and reperfusion Guo Xiaode*, Zhou Ying, Wang Rui, Zhou Xiang, Guo Yinfeng, Tang Jun, Gao Shan. * Department of Acupuncture and Massage, Laiwu Hospital of Taishan Medical College, Laiwu 271100, China

Corresponding author: Wang Rui, Email: wowosha1234@126.com

【Abstract】 Objective To observe the effect of scalp acupuncture and rehabilitation training on the regulation of neuro-plasticity-associated protein MAP-2 in gerbils modelling cerebral ischemia and reperfusion. **Methods** Cerebral ischemia and reperfusion were modelled into thirty-six male gerbils. They were then randomly divided into a model group (A), a scalp acupuncture and rehabilitation training group (B) and a rehabilitation training group (C), each of 12 cases. The scalp acupuncture and rehabilitation training were administered daily to the gerbils in group B beginning 24 h after modeling, for 14 d. Any changes in Bederson scores were observed after one, 7 and 14 days. On the 14th day the expression of MAP-2 around the infarct focus was detected using western blotting in all 3 groups. **Results** On the 7th day the average Bederson score in group B (1.81 ± 0.52) was not significantly different from that in group A (2.13 ± 0.49) or group C (2.00 ± 0.31) $(P > 0.05)$. At the end of the treatment, however, there were significant differences between the groups, with group B (0.47 ± 0.31) scoring significantly better than groups C (1.04 ± 0.63) and A (1.46 ± 0.72) $(P < 0.05)$. Group C was also significantly better than group A $(P < 0.05)$. The expression of MAP-2 as measured as integrated optical intensity (IOD) in group B (0.91 ± 0.18) was significantly higher than that in group A (0.43 ± 0.21) and group C (0.67 ± 0.24) $(P < 0.05)$; so was group C compared to group A $(P < 0.05)$. **Conclusion** The scalp acupuncture combined with rehabilitation training can improve the recovery of motor function and enhance the expression of neuro-plasticity-associated protein MAP-2 in gerbils with after cerebral ischemia and reperfusion.

【Key words】 Cerebral ischemia-reperfusion; Scalp acupuncture; Microtubule-associated protein 2; Gerbil; Acupuncture

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2015.01.002

作者单位:271199 莱芜,山东泰山医学院附属莱芜医院针灸推拿科(郭效德),康复理疗科(周莹);杭州市中医院推拿科(王睿、周翔、郭银丰、唐君、高山)

通信作者:王睿,Email:wowosha1234@126.com

脑缺血再灌注可加重缺血性脑损伤,会引发迟发性神经元凋亡,其治疗与后遗症的功能康复一直是目前研究的热点及难题^[1]。神经可塑性是神经康复的基础,神经可塑性特异性蛋白微管相关蛋白-2(microtubule-associated protein 2, MAP-2)是其信号传导通路的底物,在神经功能缺损改善上起重要作用^[2]。头针是在传统针灸经络基础上,结合现代大脑皮质功能定位原理及生物全息理论形成的,临床疗效确切^[3]。本研究拟从神经功能评定和 MAP-2 测定两方面着手,通过使用头针配合康复训练疗法治疗脑缺血再灌注损伤模型沙鼠,旨在探讨可塑性蛋白 MAP-2 的调节作用,为临床治疗提供基础实验依据。

材料与方 法

一、实验动物

选取雄性长爪沙鼠进行造模,体重(70±5)g,2月龄,采用小鼠普通饲料喂养,自由进食和饮水,饲养于浙江中医药大学实验动物中心清洁级动物实验室,自然采光,通风良好,环境温度 18~22℃,相对湿度 40%~70%。

二、脑缺血再灌注损伤沙鼠模型制作及筛选

据改良后的颈总动脉阻断法^[4]制作沙鼠右脑半球缺血再损伤模型:10%水合氯醛(4 mg/kg)腹腔注射麻醉,固定动物,消毒,颈正中切开皮肤 1.5 cm,钝性分离皮下组织,分离双侧颈总动脉,用小动脉夹夹闭双侧血管阻断血流 20 min 后,先去除左侧动脉夹,直视下观察颈总动脉血流再通后,缝合颈部切口,2 h 后去除右侧动脉夹,依前法操作。监控记录术后 24 h 内实验动物的行为变化,采用 Longa 法进行行为学评分^[4],筛选出 1~3 分的沙鼠纳入本研究。

三、实验分组

使用 SPSS 19.0 版统计软件生成的随机数字表将造模成功的 36 只沙鼠分为 3 组:模型组、康复训练组及头针配合康复训练组,每组 12 只。3 组实验动物在同等环境下进行饲养。

四、实验仪器与试剂

低温离心机(3K18,德国 Sigma 公司);恒温烘箱(CS501 型,重庆设备厂);电子天平、眼科剪、动脉夹等均由浙江中医药大学动物实验中心统一购买提供。抗微管相关蛋白-2 抗体神经标志物(anti-MAP2 antibody-neuronal marker); β -肌动蛋白(β -actin)鼠单抗;蛋白抽提试剂;二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)蛋白定量试剂盒;2 mg/ml 牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)标准品等,Western Blot 测试用试剂及耗材均由浙江普康生物技术有限公司提供。

五、治疗方法

头针配合康复训练组:造模 24 h 后将非麻醉状态下的沙鼠头部及四肢捆绑固定,参照大鼠穴位图谱^[5]选取右侧脑区对应头穴,即百会穴及双侧旁开 1 寸(约 5 mm)处四神聪穴进针,针尖向后。进针深度约 3 mm,进针后接上海产 G6805-I 型电针仪,采用疏密波,频率 5~10 Hz,强度 2 mA,输出电压 2~4 V,以局部轻颤为度,留针 30 min。然后行康复训练,使用长 100 cm、直径 60 cm 的滚筒式网状训练器,将沙鼠放入后,实验人员手握两侧端部,滚动训练器,以训练沙鼠抓握、旋转、行走等运动,每次 30 min。

康复训练组捆绑固定相同时间后,再行康复训练,具体操作同头针配合康复训练组。

模型组捆绑固定及在滚筒式网状训练器放置相同时间,但不作干预。

所有治疗均每日 1 次,连续治疗 14 d。

六、检测指标

1. Bederson 评分:按 Bederson 等^[6]制订的标准评分,即 0 分——正常,无神经功能缺损;1 分——左侧前爪不能完全伸展(提尾悬空实验阳性),轻度神经功能缺损;2 分——左肩部侧推抵抗力下降(侧向推力实验阳性),伴左前肢屈曲,中度神经功能缺损;3 分——同 2 分表现,伴自发性旋转(自由活动向左侧划圈),重度神经功能缺损;4 分——不能自发行走,有意识丧失。分别于术后 24 h、7 d 及 14 d 由 2 名医师盲法进行神经功能评定,取其平均值。

2. 动物处死取材及 Western Blot 实验^[7]:治疗结束后各组沙鼠进行断髓处死,断头,用手术镊暴露被覆蛛网膜的脑组织,分离右侧大脑半球,冰盐水冲洗后,冰上拭去蛛网膜及表面血管。称重后加入裂解液进行组织匀浆,4℃下离心 20 min,取上清,-20℃分装保存。48 h 后抽提细胞总蛋白,BCA 法测蛋白浓度,取 20 μ g 样品经 SDS-PAGE 电泳,经转膜、脱脂奶粉封闭,一抗使用抗 MAP2(1:3000), β -actin 鼠单抗作为内参照,显色用 ECL 试剂盒。用 bio-rad 数字化凝胶成像分析仪进行杂交带扫描,Gel Pro4.0 版凝胶光密度分析软件对条带灰度进行定量分析。

七、统计学分析

非实验操作人员第三者盲法评价最终数据,使用 SPSS 19.0 版软件进行分析。本研究计量数据用($\bar{x} \pm s$)表示,资料均采用单因素多变量方差分析, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

结 果

一、对急性脑缺血沙鼠神经功能缺损评分的影响
正态检验符合正态性后使用单因素方差分析,造

模 24 h 后头针配合康复训练组、康复训练组及模型组评分比较,组间差别均无统计学意义 ($F = 0.183, P > 0.05$),具有可比性。第 7 天 3 组间评分差异无统计学意义 ($F = 1.937, P > 0.05$);第 14 天发现 3 组间评分差异有统计学意义 ($F = 6.481, P < 0.05$),头针配合康复训练组明显优于康复训练组和模型组,而康复训练组则较模型组有优势,组间差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。详见表 1。

表 1 各组沙鼠各治疗时间点 Bederson 神经功能评分比较 (分, $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	24 h	7 d	14 d
头针配合康复训练组	12	2.50 ± 0.55	1.81 ± 0.52	0.47 ± 0.31 ^{ab}
康复训练组	12	2.37 ± 0.61	2.00 ± 0.31	1.04 ± 0.63 ^c
模型组	12	2.67 ± 0.59	2.13 ± 0.49	1.46 ± 0.72

注:与康复训练组同时时间点比较,^a $P < 0.05$;与模型组同时时间点比较,^b $P < 0.01$,^c $P < 0.05$

二、对急性脑缺血沙鼠缺血灶 MAP-2 表达的影响

组间 MAP-2 显影条比较发现 14 d 后头针配合康复训练组 MAP-2 表达明显升高。正态检验符合正态性后使用单因素方差分析,14 d 后头针配合康复训练组、康复训练组及模型组 MAP-2 表达水平比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);多重比较结果提示,头针配合康复训练组 MAP-2 表达水平优于康复训练组及模型组,而康复训练组则优于模型组,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。详见表 2 和图 1。

表 2 各组沙鼠治疗第 14 天时的 MAP-2 蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	MAP-2 蛋白表达水平
头针配合康复训练组	12	0.91 ± 0.18 ^{ab}
康复训练组	12	0.67 ± 0.24 ^c
模型组	12	0.43 ± 0.21

注:与康复训练组比较,^a $P < 0.01$,与模型组比较,^b $P < 0.01$,^c $P < 0.05$

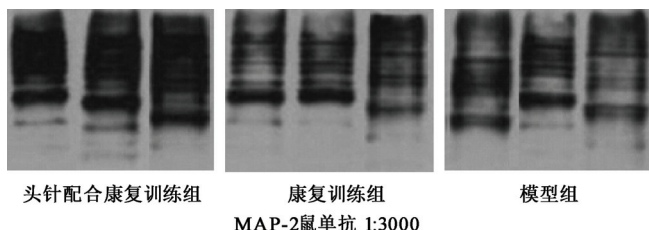


图 1 头针配合康复训练组和康复训练组及模型组的 MAP-2 表达

讨 论

研究证明缺血再灌注后 7 d 内均可能造成迟发性神经元损伤,从而造成神经功能缺损的加重^[8]。故研究缺血性脑卒中及脑缺血后再灌注损伤的治疗及功能康复具有重要意义。神经可塑性是指神经系统在结构

和功能上的自身修复能力,急性缺血性脑卒中后缺血再灌注引起的中枢系统损伤造成的神经功能丧失,可以由结构与功能上具有重新组织能力的其它脑组织重塑,神经可塑性特异性相关蛋白 MAP-2 表达在促进神经发育、轴突再生、突触生长、结构与功能重建等方面发挥重要作用^[9]。相关研究证实,通过 MAP-2 水平反映突触的数量与密度是表现突触可塑性的可靠指标,且其水平在脑卒中后第 14 天左右明显升高^[10],故本实验选择术后第 14 天检测 MAP-2 水平可有效反映脑卒中后脑可塑性的改变。

头针是在传统针灸经络基础上,结合现代大脑皮质功能定位原理及生物全息理论形成的,临床研究证实其疗效确切^[11-12]。其不仅通过大脑皮质功能定位在头皮部投影区,直接对相应的大脑皮质具有调节作用,还通过经络调节气血、阴阳的综合作用,以达到治疗的目的^[13]。

本研究造模所选长爪沙鼠的脑底动脉 Willis 环存在不同程度的缺失,缺少联系颈内动脉和椎-基底动脉系统的后交通支,用简单的结扎方法即可获得较大鼠或小鼠更典型的半脑缺血及缺血后再灌注损伤的动物模型,可以很好地模拟人类脑缺血卒中的过程。本研究制模及模型筛选后使用 Bederson 评分进行评价,证实 3 组实验动物均有明显神经功能缺损症状,说明脑缺血模型制备良好。

本研究使用 Longa 评分法评价脑缺血再灌注损伤模型沙鼠,3 组沙鼠的 Bederson 神经功能评分在术后分值差异均无统计学意义 ($P > 0.05$),具有可比性。模型组在治疗第 7 天时神经功能评分与制模术后比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$),可能因存在缺血后再灌注造成的迟发性神经损伤;第 14 天时神经功能评分逐渐减小,神经功能缺损出现一定程度自发性恢复,可能与脑水肿减轻及部分神经重塑有关。本研究在治疗第 7 天时 3 组神经功能评分比较,3 组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$);第 14 天头针配合康复训练组与康复训练组和模型组的神经功能评分比较,组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$),且头针配合康复训练组较其余两组具有明显优势 ($P < 0.05$),而康复训练组亦优于模型组 ($P < 0.05$)。这提示在第 14 天时单纯康复训练已可恢复沙鼠部分运动功能,配合头针后处理则能更明显地减轻迟发性神经损伤症状,这可能与头针配合康复训练干预后 MAP-2 蛋白水平增高有关。

既往研究证实,大鼠正常脑组织内可见 MAP-2 的表达,且 MAP-2 水平在脑缺血后自发性升高^[14]。脑缺血造成的供血障碍、神经元退变可引起神经元细胞去极化,使钙激活中性蛋白酶激活,其作用于细胞骨架的 MAP-2,导致细胞骨架蛋白降解、破坏、丢失,造成神

经功能障碍;但 12 h 后 MAP-2 表达水平随时间逐渐上升,于 14 d 达到高峰,提示微管结构在这一时期已部分修复,其修复机制尚不十分清楚,可能是损伤后存活神经元微管结构组装和解聚处于动态过程^[15]。本研究在 14 d 后进行检测发现,康复训练组与模型组 MAP-2 蛋白水平均值均小于头针配合康复训练组 ($P < 0.05$),而康复训练组优于模型组 ($P < 0.05$)。提示头针配合康复训练能明显促进急性脑缺血再灌注损伤后病灶侧 MAP-2 阳性信号表达,提高脑缺血组织的神经可塑性。

参 考 文 献

[1] 刘成勇,徐鸣曙,葛林宝. 脑缺血再灌注后神经可塑性的研究进展[J]. 中国卒中杂志,2012,7(11):902-906.
 [2] Park D, Joo SS, Lee HJ, et al. Microtubule-associated protein 2, an early blood marker of ischemic brain injury[J]. J Neurosci Res, 2012, 90(2):461-467.
 [3] 于学平,孙晓伟,邹伟. 头针对脑缺血再灌注大鼠脑微血管 IV 型胶原蛋白影响的动态研究[J]. 针灸临床杂志,2012,28(4):60-62.
 [4] 杜小燕,杨慧,王钜. 长爪沙鼠脑缺血模型的建立及脑组织中超氧化物歧化酶和丙二醛含量的测定[J]. 中国比较医学杂志,2006,16(11):664-667.
 [5] 余曙光,郭义. 实验针灸学[M]. 上海:上海科学技术出版社,2009:150-151.
 [6] Lay CC, Davis MF, Chen-Bee CH, et al. Mild sensory stimulation protects the aged rodent from cortical ischemic stroke after permanent

middle cerebral artery occlusion[J]. J Am Heart Assoc, 2012, 1(4):1255-1266.
 [7] 孙明,赵育梅,徐超. 蛋白激酶抑制剂 H-7 降低局灶性脑缺血半暗带和核心区半胱氨酸蛋白酶活化[J]. 中风与神经疾病杂志,2009,26(2):152-154.
 [8] 时应路,葛圣林,张成鑫. 尼可地尔后处理对大鼠肺缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 安徽医科大学学报,2013,48(7):775-779.
 [9] 邵丽,赵永波. 脑卒中康复与神经可塑性[J]. 中风与神经疾病杂志,2006,23(1):126.
 [10] 朱文增,倪金霞,唐强. 头穴丛刺法对局灶性脑缺血大鼠可塑性蛋白 MAP-2 的影响[J]. 中国针灸,2010,30(1):46-50.
 [11] 孟庆良,孟凡辉. 头针治疗短暂性脑缺血发作 71 例[J]. 上海针灸杂志,2010,29(11):730.
 [12] 张长河,段大航. 头针联合注射用血栓通治疗短暂脑缺血发作 150 例临床观察[J]. 中国中医急症,2009,18(8):1273.
 [13] 王春霞,王东岩,王雅青,等. 头穴丛刺法对慢性脑缺血大鼠海马 VEGF 表达的影响[J]. 上海针灸杂志,2012,31(8):609-612.
 [14] Li Y, Jiang N, Powers C, et al. Neuronal damage and plasticity identified by microtubule-associated protein 2, growth-associated protein 43, and cyclin D1 immunoreactivity after focal cerebral ischemia in rats[J]. Stroke, 1998, 29(9):1972-1981.
 [15] Choi DH, Lee KH, Kim JH, et al. Effect of 710nm visible light irradiation on neurite outgrowth in primary rat cortical neurons following ischemic insult[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2012, 422(2):274-279.

(修回日期:2014-09-10)
(本文编辑:汪 玲)

《中华物理医学与康复杂志》第七届编辑委员会组成名单

顾 问: 许云影(加拿大) 吴宗耀 连倚南(中国台湾) 陈安民 南登崑 谭维溢

名誉总编辑: 郭正成

总 编 辑: 黄晓琳

副总编辑: 吴 毅 李 玲 郭铁成 顾 新 窦祖林 燕铁斌

编辑委员: (按姓氏笔画排序)

- 尤春景 尹 平 毛容秋 王 伟 王 刚 王 彤 王 强 王宁华 王冰水 王茂斌
 王亭贵(中国台湾) 王颐和(中国台湾) 邓复旦(中国台湾) 冉春风 冯 珍 卢成皆(澳大利亚)
 刘宏亮 华桂茹 孙福成 朱珊珊 汤晓芙 牟 翔 纪树荣 许晓冬 闫金玉 何成奇
 何成松 励建安 吴 华 吴 毅 宋为群 张长杰 张光宇 张志强 张继荣 张盘德
 李 玲 李兴志 李红玲 李建军 李建华 李胜利 李晓捷 李常威(中国香港)
 朱 愈(美国) 杨渝珍 肖 农 陆再英 陈启明(中国香港) 周士枋 周谋望 岳寿伟
 林 伟 范建中 郑光新 恽晓平 洪章仁(中国台湾) 倪国新 倪朝民 徐 军 徐永健
 敖丽娟 袁 华 贾子善 郭钢花 郭铁成 顾 新 顾旭东 高晓平 梁 英 梅元武
 黄 真 黄东锋 黄晓琳 谢 青 谢 荣 谢欲晓 窦祖林 廖维靖 燕铁斌
 Bryan O'Young(美国) Sheila Purves(加拿大)