

视黄酸受体 β 在针灸提高脑损伤幼鼠运动功能中的作用*张礼萍¹ 邹丽萍^{2,4} 白丽敏³ 吕忠礼¹

摘要 目的: 本实验以围生期缺血缺氧性脑损伤幼鼠为模型, 采用电针灸干预, 从神经再生的角度入手, 探讨视黄酸受体 β 在电针灸对于脑损伤幼鼠运动功能恢复中的作用。方法: 首先建立围生期缺血缺氧性脑损伤幼鼠模型, 共分 3 组: 假手术组、缺血缺氧性脑损伤组和脑损伤后针灸组。采用电针灸仪针刺百会穴和大椎穴 2 周, 在 21 天对幼鼠的运动功能进行评价。通过免疫组化法和免疫印迹法检测视黄酸受体 β (RAR β) 在大鼠脑内定量定位的表达变化。结果: ① 生后 21 天进行的神经行为学评定表明, 缺血缺氧性脑损伤削弱了幼鼠的运动功能, 而 2 周的电针灸使其运动功能得到改善 ($P < 0.05$)。② 免疫组化和免疫印迹结果显示: 脑损伤后 RAR β 表达明显降低, 而电针灸后 RAR β 表达升高 ($P < 0.05$)。结论: 2 周的电针灸提高了缺血缺氧性脑损伤幼鼠的运动功能。RAR β 表达的变化从新的角度解释了电针灸有益于脑损伤幼鼠康复的神经再生机制。

关键词 缺血缺氧性脑损伤; 针灸; 视黄酸受体 β

中图分类号: R246, R49 **文献标识码:** B **文章编号:** 1001-1242(2009)-09-021-03

脑性瘫痪(cerebral palsy)是由于尚未发育成熟的大脑受到损害或损伤所引起的以运动障碍和姿势异常为主要表现的综合征, 常伴有癫痫、智力低下、语言障碍等表现。该病与脑缺血缺氧、感染、外伤等有直接关系。围生期的脑损伤可造成脑室周围的髓鞘减少、形成延迟^[1]、轴突的损伤^[2]以及突触数量的减少^[3-4]等神经纤维结构的损害, 并且损伤的位置和程度与运动功能的恢复密切相关^[5]。早诊断、早治疗可使脑瘫患者的运动功能得到一定程度的恢复。临床研究表明, 针灸能够明显改善患儿的运动功能, 但是机制不明。本研究是以视黄酸受体 β (retinoic acid receptor β , RAR β) 蛋白作为标记, 观察脑损伤以及针灸治疗后运动功能和上述蛋白标记物表达的变化, 推断其关系, 以期进一步揭示针灸治疗小儿脑瘫的作用机制, 为针灸推广运用提供实验依据。

1 材料与方

1.1 材料

SD 大鼠来自北京维通利华实验动物技术有限公司。兔抗 RAR β 多克隆抗体来自 Santa Cruz Biotechnology, Inc。

1.2 缺血缺氧性脑损伤幼鼠模型

生后 7 天的 SD 幼鼠随机分为假手术组、缺血缺氧性脑损伤组、缺血缺氧性脑损伤后电针灸组, 每组 8 只。首先用 2.5% 的氟烷麻醉动物后, 行颈正中切口, 剥离甲状腺及静脉、神经等组织, 暴露左侧的颈总动脉, 脑损伤组和针灸组的幼鼠以 5—0 的外科手术线结扎。假手术组动物的颈总动脉仅暴露, 不予结扎。缝合伤口后, 幼鼠被送回窝里, 母鼠哺乳并休息 2h。休息后的脑损伤组和针灸组幼鼠被放入一个玻璃容器内, 容器置于 36℃ 水浴箱中以维持适当的环境温度。容器内持续通以湿润的 8% 氧气和 92% 氮气的混合气体。低氧处理 2.5h 后, 幼鼠被送回笼中^[6-8]。

1.3 电针灸刺激

低氧处理 24h 后, 针灸组的幼鼠给予电针灸刺激。选择 2 个刺激穴位: 百会穴位于颅骨前后径与两耳之间连线的交点; 大椎穴位于末节颈椎棘突的正下方。刺激采用起伏 AM 2—100Hz, 电流为 3—5mA, 交流变频。针灸时幼鼠被固定在

桌子上不麻醉, 脑损伤组动物仅固定不针灸。电针灸刺激每天 1 次, 每次 30min, 共持续 2 周。电针灸的开始和持续时间、针灸穴位的选择, 以及电针灸仪刺激条件的设定参考国内的一些动物电针灸实验^[9-10]。

1.4 运动行为评价

在针灸 2 周结束时, 即幼鼠生后 21 天, 对 3 组动物进行运动功能的评价。选用长约 50cm 的木板, 固定成 30° 和 45° 角斜坡。1 分: 在木板上停顿不动; 2 分: 转身走下板; 3 分: 能够走上木板而不滑倒; 4 分: 跑上木板^[11]。每只幼鼠检测 4 次。

1.5 免疫组化

运动行为评价后大鼠被麻醉固定, 以 0.9% 生理盐水经左心室灌注, 续以 4% 多聚甲醛约 30min 固定标本。移出鼠脑, 4% 多聚甲醛后固定 72h, 30% 蔗糖置换, 标本于 -70℃ 储存备用。幼鼠大脑冠状面切片, 每片约 5 μ m 厚度, 贴于表面经多聚赖氨酸涂过的载玻片上。切片经丙酮固定、0.3% H₂O₂ 去除内源性过氧化酶、复合消化液室温消化 10min、以 5% 胎牛血清封闭非特异性抗原。加入抗 RAR β I 抗 (1:50), 湿盒内 4℃ 冰箱中过夜。生物素标记的 II 抗、辣根过氧化物酶标记的链亲和素 (III 抗) 分别于 37℃ 孵育 45min, 以 DAB 显色, 苏木素复染。每组大鼠取 6 只计算, 每只鼠脑随机选取 5 张脑片。400 倍镜下以阳性信号占显微镜视野比例为计分标准: +: <50%; ++: 50%—75%; +++: >75%。

1.6 免疫印迹

大鼠断髓处死, 立即将头切下, 取出大脑, 剥离海马。用锡箔纸包起, 置于液氮中快速冷冻, 然后放于 -70℃ 冰箱中保存。取低温保存的断头处死的大鼠脑海马标本, 加入组织裂解液, 用玻璃匀浆器在冰上匀浆, 4℃, 10000 转/min 离心

* 基金项目: 国家科委国际合作项目 (2008DFA31850); 北京市科委国际合作项目 (2007G05); 北京市中医药科技项目 (JJ2005-17)

1 首都医科大学附属北京儿童医院神经内科, 西城区南礼士路 56 号, 100045

2 中国人民解放军总医院儿童医学中心

3 北京中医药大学解剖教研室

4 通讯作者

作者简介: 张礼萍, 女, 住院医师

收稿日期: 2008-11-29

20min。取上清液,小部分用 Beckman 紫外分光光度计测定蛋白浓度(考马斯亮蓝法)。取上述制备的上清液样品,加 2×溴酚蓝上样缓冲液,于 100℃煮沸 5min,使蛋白变性。在电泳槽中分别灌注分离胶和压缩胶,梳子用 10μm。取样本 50μg 上样,进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳:条件为 120V 稳压,直至溴酚蓝指示剂跑至胶底。将切下压缩胶的分离胶置于硝酸纤维素膜上,全湿式电转法将分离胶上的蛋白转移到硝酸纤维素膜上;条件为 100mA 稳流。含 1%奶粉的 TTBS 液封闭非特异抗原,常温下 1h。TTBS 溶 I 抗(兔抗大鼠多抗),4℃冰箱中过夜。TTBS 洗 3 次,室温,摇床,每次 10min。TTBS 溶 II 抗,II 抗为辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 1:200;TTBS 洗 3 次,室温,摇床,每次 10min。信号用发光剂显影于感光胶片上。

1.7 统计学分析

采用统计软件为 SPSS11.0。数据以均数±标准差表示。组间差异以单因素方差分析法计算。



图 1 免疫组化显示海马 RARβ 表达的变化

表 1 免疫印迹显示 RARβ 在海马和皮质表达的相对强度

组别	表达的相对强度	
	海马	皮质
假手术组	93.1±6.8	110.7±18.5
缺血缺氧性脑损伤组	73.5±6.5 ^①	85.2±10.9 ^①
脑损伤后针灸组	91.3±10.5	100.0±11.9

①与假手术组和针灸组比较 $P<0.05$

3 讨论

脑瘫在各国儿童中患病率都很高,世界范围内大约有 1500 万脑瘫患儿,其中 50%以上合并智力低下,30%合并癫痫。2007 年上海小儿脑瘫康复国际研讨会指出全国 2—13 岁脑瘫患儿有 400 多万人,每年新增脑瘫病例 4—5 万人。该疾病导致大量儿童长期或终身残疾,给家庭和社会带来沉重的损失和负担,使社会丧失了大量的劳动力。因此,寻求确实有效的康复手段显得尤为重要^[1]。在儿童脑瘫的康复手段中,针灸一直占据着不可替代的位置。针灸最大的优越性就在于安全无副作用,且可以发挥持久的积累治疗作用,能够集预防与治疗于一身,易于普及,特别是它的很低的经济成本受到各国的重视。

神经结构的重塑是运动功能恢复的物质基础,脑损伤后髓鞘再生^[2],轴突生长以及新突触形成等过程^[3]一直伴随神经运动功能的恢复过程。神经元由胞体、突起(树突和轴突)和轴突终末组成,轴突终末与其他神经元通过突触连接的方式传递信息。VitA 活性代谢产物视黄酸(retinoic acid, RA)是神经生长重要的调节物质,在哺乳动物的大脑生长发育过程,视黄酸信号系统在脊椎动物神经系统的重塑与再生过程

2 结果

2.1 大鼠的运动能力得到提高

假手术组的大鼠可以顺利地爬上 30°和 45°的斜坡,评分分别为 3.56±0.32 和 3.34±0.29;脑损伤组的大鼠爬上斜坡明显缓慢且艰难,评分分别为 2.06±0.37 和 1.47±0.36;而损伤后针灸组的大鼠可以爬上两个斜坡,评分分别为 2.97±0.43 和 2.45±0.48。与脑损伤组相比,针灸组评分明显升高 ($P<0.05$),但仍低于假手术组($P<0.05$)。

2.2 免疫组化显示海马 RARβ 表达的变化

见图 1。RARβ 在大鼠海马中广泛表达(图 1A),缺血缺氧性脑损伤组大鼠的海马中 RARβ 的表达明显降低(图 1B),而在损伤后针灸组海马中 MBP 表达与脑损伤组相比明显增加(图 1C)。

2.3 免疫印迹显示皮质 RARβ 定量表达变化

见图 2,表 1。

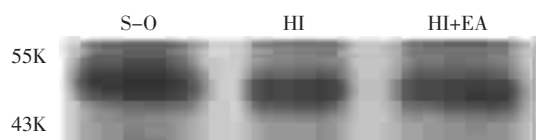


图 2 免疫印迹显示 RAR β 表达的变化

中发挥重要作用^[4]。视黄酸是一种脂溶性的激素类调解物质,在神经元培养试验中发现,神经生长因子通过诱导 RA 合成来发挥促神经生长作用^[5]。视黄酸通过诱导细胞核转录增加神经突的数量和长度^[6],还能指引神经突的生长方向^[7]。RARβ 是介导视黄酸作用最重要的受体,其表达量与视黄酸促神经生长作用相一致^[8]。

我们的实验发现,围生期缺血缺氧性脑损伤使得幼鼠的运动功能明显下降,同时引起视黄酸受体表达的下降。针灸治疗提高了幼鼠的运动功能,同时发现与神经结构重塑有关的蛋白指标也发生了相应的变化,推测针灸治疗是通过神经重塑提高了脑损伤幼鼠的运动功能,这可能是针灸治疗促进小儿脑瘫运动功能康复的机制^[9]。Wong LF 等^[20]利用慢载体将 RARβ 送入脊髓未受伤实验小鼠的感应神经元中,结果发现,这些小鼠在脊髓受伤后各种运动功能表现出一定程度的恢复,认为这与受伤神经轴突的再生有直接关系,RAR β 能够促进成年老鼠脊髓神经轴突的再生。本实验发现,脑损伤后皮质和海马部位的 RARβ 表达减少。说明脑损伤抑制了 RARβ 的表达,这将阻碍内源性神经生长因子发挥促神经生长作用^[14-15],神经发育障碍导致运动功能低下。而针灸后

RAR β 的表达基本接近于正常水平(假手术组),说明针灸通过上调 RAR 的表达,强化了神经生长因子的促神经生长作用,使缺血缺氧性脑损伤造成的神经结构的损伤得到修复,从而改善运动功能。我们与 Wong 使用的模型不同,但同时证明 RAR β 的增高与神经轴突的再生成正相关。

4 结论

针灸治疗通过 RAR β 的调节,提高缺血缺氧性脑损伤幼鼠的运动功能,这可能是针灸治疗促进脑瘫运动功能康复的新机制。RAR β 表达的变化是从新的角度解释了电针灸有益于脑损伤幼鼠康复的神经再生机制。

参考文献

- [1] Petersson KH, Pinar H, Stopa EG, et al. White matter injury after cerebral ischemia in ovine fetuses [J]. *Pediatr Res*, 2002, 51(6): 768—776.
- [2] Dammann O, Hagberg H, Leviton A. Is periventricular leukomalacia an axonopathy as well as an oligopathy[J]? *Pediatr Res*, 2001, 49(4): 453—457.
- [3] Tuor UI, Hudzik TJ, Maliszka K, et al. Long-term deficits following cerebral hypoxia-ischemia in four-week-old rats: correspondence between behavioral, histological, and magnetic resonance imaging assessments [J]. *Exp Neurol*, 2001, 167(2): 272—281.
- [4] Follett PL, Rosenberg PA, Volpe JJ, et al. NBQX attenuates excitotoxic injury in developing white matter [J]. *J Neurosci*, 2000, 20(24): 9235—9241.
- [5] 王兴林, 蒋天裕, 郭燕梅, 等. 侧脑室旁脑软化位置及大小与康复后运动功能恢复的关系[J]. *中国康复医学杂志*, 2007, 22(7): 622—625.
- [6] van der Kooij MA, Groenendaal F, Kavelaars A, et al. Combination of deferoxamine and erythropoietin: Therapy for hypoxia-ischemia-induced brain injury in the neonatal rat [J]? *Neurosci Lett*, 2009, 451(2): 109—113.
- [7] Taniguchi H, Andreasson K. The hypoxic-ischemic encephalopathy model of perinatal ischemia[J]. *J Vis Exp*, 2008, (21): pii: 955.
- [8] 李江, 陈刚. 脑瘫动物模型的研究现状[J]. *中国康复医学杂志*, 2007, 22(12): 1134—1136.
- [9] 李宛青, 吴爱群, 刘伟, 等. 电针治疗缺血缺氧新生大鼠对海马神经元尼氏体的影响[J]. *郑州大学学报(医学版)*, 2005, 40(2): 271—272.
- [10] 王琴玉, 孙砚辉, 靳瑞. 不同时窗针刺对窒息脑瘫幼鼠脑组织 bFGF 表达的影响[J]. *中国康复*, 2005, 20(4): 195—197.
- [11] 陈才, 洪芳芳. 脑瘫患儿运动功能的康复治疗进展[J]. *中国康复医学杂志*, 2008, 23(10): 957—959.
- [12] Dasari VR, Spomar DG, Gondi CS, et al. Axonal remyelination by cord blood stem cells after spinal cord injury [J]. *J Neurotrauma*, 2007, 24(2): 391—410.
- [13] Wolpaw JR. Spinal cord plasticity in acquisition and maintenance of motor skills [J]. *Acta Physiol (Oxf)*, 2007, 189(2): 115—169.
- [14] Mey J, McCaffery P. Retinoic acid signaling in the nervous system of adult vertebrates[J]. *Neuroscientist*, 2004, 10(5): 409—421.
- [15] Corcoran J, Maden M. Nerve growth factor acts via retinoic acid synthesis to stimulate neurite outgrowth [J]. *Nat Neurosci*, 1999, 2(4): 307—308.
- [16] Mazarakis ND, Azzouz M, Rohll JB, et al. Rabies virus glycoprotein pseudotyping of lentiviral vectors enables retrograde axonal transport and access to the nervous system after peripheral delivery [J]. *Human Mol Genet*, 2001, 10(19): 2109—2121.
- [17] Maden M, Keen G, Jones GE. Retinoic acid as a chemotactic molecule in neuronal development [J]. *Int J Dev Neurosci*, 1998, 16(5): 317—322.
- [18] Corcoran J, Shroot B, Pizzey J, et al. The role of retinoic acid receptors in neurite outgrowth from different populations of embryonic mouse dorsal root ganglia[J]. *J Cell Sci*, 2000, 113(Pt 14): 2567—2574.
- [19] Zhang LP, Zou LP. Altered protein markers related to neural plasticity and motor function following electro-acupuncture treatment in a rat model of ischemic-hypoxic brain injury[J]. *Neural Regeneration Research*, 2008, 3(9): 945—947.
- [20] Wong LF, Yip PK, Battaglia A, et al. Retinoic acid receptor beta2 promotes functional regeneration of sensory axons in the spinal cord[J]. *Nat Neurosci*, 2006, 9(2): 243—250.