

电针联合运动训练对脑梗死大鼠运动能力的影响及相关机制分析*

赵晓红¹ 严会荣^{2,4} 任 钰² 牛相来³

摘要

目的:观察电针联合运动训练对脑梗死大鼠运动能力的影响,并探讨其对Wnt/ β -catenin信号通路的影响。

方法:将大鼠随机分为假手术组(SC)、模型组(IC)、跑台组(T)、跑台+电针组(T+EA)、跑台+电针非穴位组(T+ENA),各18只,SC组及IC组抓取后不予任何治疗。T组术后24h予匀速跑台训练,运动强度为10m/min,每天运动30min,每天1次,T+EA组在电针曲池、足三里穴后再予跑台训练,方法同跑台组,T+ENA组在电针非经穴点后再予跑台训练,方法同跑台组,各组均干预7天。观察各组大鼠神经行为学评分、步态、行为活动、脑梗死体积、病理学结构变化、脑细胞凋亡率,Western Blot及RT-PCR法检测脑组织Wnt-1/ β -catenin信号通路关键分子蛋白及mRNA表达变化。

结果:神经行为学检测显示T+EA组脑梗死大鼠的神经缺损评分下调,大鼠的步态及行为活动改善。TTC染色、HE染色、透射电镜显示与其他组相比,T+EA组大鼠的脑梗死体积明显缩小,病理学形态及超微结构明显改善,Western Blot及RT-PCR显示T+EA可明显上调大鼠脑组织中Wnt-1、 β -catenin、Bcl-2的蛋白及mRNA水平,下调GSK-3 β 、Bax的蛋白及mRNA水平($P < 0.05$)。

结论:电针联合运动训练可明显改善脑梗死大鼠运动能力,其作用机制可能与激活Wnt/ β -catenin信号通路有关。

关键词 脑梗死;运动能力;电针;运动训练;Wnt/ β -catenin信号通路

中图分类号:R743.3,R493,R245 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2021)-07-0779-08

Effects of electroacupuncture combined with exercise training on exercise ability of rats with cerebral infarction and analysis of related mechanism/ZHAO Xiaohong, YAN Huirong, REN Yu, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2021, 36(7): 779—786

Abstract

Objective: To observe the effect of electroacupuncture combined with exercise training on motor ability of rats with cerebral infarction and to explore its effect on Wnt/ β -catenin signal pathway.

Method: Rats were randomly divided into sham operation group (SC), model group (IC), treadmill group (T), treadmill plus electroacupuncture group (T+EA) and treadmill plus electroacupuncture non-acupoint group (T+ENA) with 18 rats in each group. SC group and IC group did not receive any treatment. T group was given uniform treadmill training 24 hours after operation, and exercise intensity was 10m/min, 30 minutes a day, once a day. T+EA group was given treadmill training after electroacupuncture at Quchi and Zusanli points. The method was the same as treadmill group, and T+ENA group was given treadmill training after electroacupuncture at non-acupoints. All groups were intervened for 7 days. The changes of neurobehavior, gait, activities, cerebral infarction volume, pathological structure, apoptosis rate of brain cells, and the expression of key molecular proteins and mRNA of Wnt-1/ β -catenin signal pathway in brain tissue were detected by

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2021.07.003

*基金项目:新疆维吾尔自治区自然科学基金资助项目(2017D01C307)

1 新疆维吾尔自治区中医医院康复理疗科,新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市,830099; 2 新疆医科大学第一附属医院康复科; 3 新疆医科大学第一附属医院针灸推拿科; 4 通讯作者

第一作者简介:赵晓红,女,主管技师; 收稿日期:2020-05-28

Western Blot and RT-PCR.

Result: Neuroethology showed that T+EA could down-regulate the neurological deficit score and improve the gait and activities of rats with cerebral infarction. TTC staining, HE staining and transmission electron microscope showed that the volume of cerebral infarction in T+EA group was significantly smaller than that in other groups. Pathological morphology and ultrastructure significantly improved, Western Blot and RT-PCR showed that T+EA could significantly up-regulate the protein and mRNA, of Wnt-1, β -catenin, Bcl-2 and mRNA, in brain tissue of rats, and down-regulate the protein and mRNA levels of GSK-3 β , Bax($P < 0.05$).

Conclusion: Electroacupuncture combined with exercise training can significantly improve the motor ability of rats with cerebral infarction, and its mechanism may be related to the activation of Wnt/ β -catenin signal pathway.

Author's address Xinjiang Uygur Autonomous Region Hospital of Traditional Chinese Medicine Rehabilitation Physiotherapy, Xinjiang, Urumqi, 830099

Key word cerebral infarction; motor ability; electroacupuncture; exercise training; Wnt/ β -catenin signal pathway

脑梗死是临床常见脑血管疾病。随着现代医疗水平提高,虽然血管介入、溶栓等手段可在一定程度上对脑组织进行再灌注,有效减少脑组织缺血缺氧程度,但由于神经细胞对缺血缺氧耐受性差,超过75%的脑梗死患者即使在脑组织恢复灌注后仍遗留不同程度的功能障碍^[1-2]。运动训练对脑梗死后运动功能障碍有积极康复作用,大量临床资料显示^[3-4],运动训练可大幅度提高脑梗死患者的运动能力及日常生活能力。电针是脑血管疾病重要的补充/替代治疗手段,广泛应用于临床。电针通过刺激穴位调节阴阳两经,以阴阳互济方式实现阴阳平衡。大量临床数据证实^[5-6],电针联合运动训练在治疗脑梗死后运动功能障碍方面有显著的协同效应,但其作用机制目前尚不明了。

Wnt/ β -catenin 信号通路是机体经典的抗凋亡通路,有研究显示激活 Wnt/ β -catenin 信号通路是改善脑组织缺血缺氧损伤的靶向^[7]。由此我们提出设想:针灸联合运动训练改善脑梗死大鼠的运动功能的作用机制是否通过 Wnt/ β -catenin 信号通路进行桥接?故我们进行了本实验研究,旨在进一步探讨电针联合早期运动训练改善脑梗死的作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物及分组

选用 SPF 级成年(8—10月龄)雄性 SD 大鼠[初始体质量(230±20g)]93只,由中国上海 SLAC 实验动物有限责任公司提供[合格证号:SCXK(沪)2017—0001],于新疆医科大学实验动物中心适应性喂养,体质量达(300±20)g 进行实验研究。实验动

物在整个实验过程中自由索取食物和水。实验经新疆医科大学动物管理制度和使用委员会批准而进行,实验过程中动物的处理均严格按照国际道德准则和国家健康指南关于维护和使用实验动物先关条例进行。大鼠分3组,将SD大鼠进行两次随机,第一次分组:以1:2的比例用随机数字表法随机分配假手术组(SC)18只和造模组75只;第二次分组:根据神经行为学评估,将脑缺血造模失败大鼠剔除(本实验造模成功72只大鼠,成功率96%),将其余大鼠用随机数字表法随机分配分为模型组(IC)18只、跑台组(T)18只、跑台+电针组(T+EA)18只、跑台+电针穴位组(T+ENA)18只,分别于干预后7d留取标本。

1.2 主要实验试剂

TTC 染液(Sigma公司,美国),PMSF(碧云天,中国),SDS-PAGE 电泳胶(碧云天,中国),BCA 工作液(碧云天,中国),TUNNE 试剂盒(Promega公司,美国),DAPI 染色液(CST公司,美国),逆转录试剂盒(Promega公司,美国),聚丙烯酰胺凝胶(碧云天公司,中国),Trizol 试剂(Invitrogen公司,美国),Wnt-1、 β -catenin、GSK-3 β 、Bcl-2、Bax 及 β -actin 一抗和碱性磷酸酶标记山羊抗兔(CST公司,美国),Wnt-1、 β -catenin、GSK-3 β 、Bcl-2、Bax 及 β -actin 引物(CST公司,美国)等。

1.3 主要设备和仪器

电针仪(G6805,中国上海医疗仪器厂出品),电子分析天平(Leica,德国),Catwalk 动物步态分析系统(诺达思,中国),小动物跑台(软隆科技,中国),高速冷冻离心机(Thermo Fisher,美国),切片机(Leica,德国),激光共聚焦荧光显微镜(Bio-rad,美国),

酶标仪(Leica,德国),电泳槽(Bio-rad,美国),转膜仪(Bio-rad,美国),脱色摇床(Leica,德国),凝胶成像系统(Bio-rad,美国),PCR扩增仪(Bio-rad,美国),HomeCageScanTM3.0动物行为实时监测系统(Clever Sys,美国)等。

1.4 模型制备及筛查

模型制备^[8]:实验大鼠在术前12h禁食,但不禁水。10%水合氯醛(0.3ml/100g)经腹腔注射对实验动物进行麻醉。参考Zea Longa方法并加以改进,行左侧大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)手术:备皮后颈前正中切开皮肤,钝性分离后暴露左侧颈总、颈内、颈外动脉。尼龙线结扎颈总动脉分叉处的颈外动脉,并用动脉夹夹闭颈总动脉的近心端和颈内动脉的远心端;在距颈总动脉分叉约0.5—0.8mm处剪一小口,将直径为0.3mm涂有石蜡的渔线一端沿切口插入颈总动脉,撤去颈内动脉远心端的动脉夹,缓慢推动渔线沿颈内动脉入颅脑内,直至感觉有少许阻力为止(从颈外动脉与颈内动脉分叉处起约插入18—22mm),缝合伤口。缺血2h后拔出栓线,形成缺血再灌注模型。假手术组只分离动脉,不结扎、不插线栓。动物放置于室温(24℃)环境下苏醒,苏醒后自由饮食及饮水。

模型筛查:被造模的动物自然条件下苏醒后2h由一不知晓分组情况的实验者按Zealona 5分评价方法观察、评估、记录神经行为学评分,具体如下:0分:正常,无神经损伤症状;1分:右前爪部分屈曲或完全屈曲;2分:自发行走时向右偏瘫侧转圈;3分:身体向右侧倾倒;4分:不能自发行走,意识丧失。剔除神经行为学评分0分及4分大鼠,1—3分说明造模成功,纳入实验研究。

1.5 干预方法

假手术(SC)组:造模后回笼饲养7天,每次抓取后不予任何治疗。

模型(IC)组:造模后回笼饲养7天,每次抓取后不予任何治疗。

跑台(T)组:术后24h,开始实施1周规律性运动。运动方式为匀速跑台训练,运动强度为10m/min,每天运动30min,每天1次,干预7天,训练时间安排在每天9:00—11:00。

跑台+电针(T+EA)组:术后24h,取左侧曲池、

足三里穴(大鼠穴位定位参考《实验针灸学》中的定位方法),适当行针后接以华佗牌G6805电针仪。电针参数:疏密波,疏波频率4Hz,密波频率20Hz,输出电压2V,输出电流0.5mA,强度以大鼠针体出现节律的轻微抖动为度,30min/次/天,电针治疗后行跑台训练,方法同跑台组,干预7天。

跑台+电针非穴(T+ENA)组:术后24h,取左侧曲池、足三里穴向外侧平开5mm(非经穴点),适当行针后接以华佗牌G6805电针仪,电针参数及方法同电针组,电针非穴干预后行跑台训练,方法同跑台组,干预7天。

1.6 观察指标及方法

1.6.1 神经行为学评分:各组大鼠分别于干预前、干预第7天进行神经功能缺损评分,方法同前。

1.6.2 Catwalk分析:术前对所有大鼠于暗室中进行Catwalk系统适应性训练,每天1次,连续训练3天,每次大鼠须流畅通过玻璃板至少3次,每次至少要采集10步,记录10步内的步行速度及时间。将适应性训练的数据采集作为基线。在治疗第干预第7天行CatWalk步态检测,方法同前。根据每只大鼠每次经过玻璃平台时每只爪印所留下的痕迹间的相互关系计算出与步态相关的动态参数与静态参数。

1.6.3 Home Cage系统观察大鼠行为活动:采用Home Cage Scan™3.0动物行为实时监测系统检测不同组别大鼠在干预前、干预第7天时各组大鼠进食、饮水、行走等多种行为的变化。

1.6.4 脑梗死体积检测:采用TTC(2,3,5-triphenyl-tetrazolium chloride, TTC)染色法检测各组大鼠脑组织脑梗死体积。每组大鼠常规麻醉、灌注、取材,新鲜脑组织于-20℃冰箱暂存10—20min后取出,切除脑干、小脑,将脑组织置于大鼠脑切片模具中,脑片厚度2mm,共5片;提前配好2%TTC染色液,在暗室中将脑片放入染色液中浸泡,注意锡箔纸避光,37℃温箱中孵育20min,期间需不定时翻动脑片使染色均匀;可见脑缺血部分脑组织呈现白色,无缺血部分则现红色,将染色后脑片整齐放置于可有刻度的标尺上,拍照,应用Image-ProPlus图像分析处理系统(Motic Med 6.0 System)计算每片脑组织脑梗死的体积,最后计算梗死总体积占整个大脑体积的百分比。

1.6.5 脑组织HE染色:每组大鼠予麻醉,先后经左

心室依次用0.9%氯化钠溶液及4%多聚甲醛溶液灌注固定后取脑。常规脱水、包埋、切片、烘片、脱蜡。将切片放入苏木精水溶液中染色3min,入酸水及氨水中,各数秒钟用以分色;流水冲洗1h后分别放入70%及90%乙醇溶液各10min进行脱水;最后放入酒精伊红溶液染色3min;透明、分片。采用光学显微镜(400×)观察每张脑组织切片的形态学特征。每组各有4张切片标本,每张标本随机选取5个视野进行观察。

1.6.6 脑组织超微结构观察(透射电镜):每组大鼠麻醉后灌流固定,迅速分离大鼠左侧大脑,将样品切成约1mm3的小块放入4%戊二醛中前固定,后经3%戊二醛/1.5%多聚甲醛前固定4h(4℃),1%锇酸,1.5%亚铁氰化钾后固定2h,PBS漂洗,酒精—丙酮梯度脱水,环氧树脂618包埋剂包埋,聚合(80℃,10h),常规修块、切片,染色:醋酸铀—枸橼酸铅双重染色,透射电镜观察、拍照,图像处理软件测量指标。

1.6.7 TUNEL染色检测凋亡细胞:每组大鼠脑组织进行常规脱水、包埋、切片、烘片、脱蜡。根据TUNEL检测试剂盒的说明书,对凋亡神经细胞进行检测,应用激光共聚焦荧光显微镜进行观察,其中呈现蓝色荧光为细胞核,绿色荧光为凋亡神经细胞。每组任选5个视野,通过Image ProPlus图像分析处理系统计算凋亡细胞数,结果以凋亡细胞率表示[凋亡细胞率=(绿色荧光的凋亡细胞数/总细胞数)×100%]。

1.6.8 Western Blot法测定脑组织Wnt-1/β-catenin信号通路关键分子蛋白表达:取成年大鼠脑组织200mg加1ml裂解缓冲液,4℃,离心(15000r/min),冰浴中超声,取上清。BCA法测蛋白浓度,用凝胶加样缓冲液将各管蛋白浓度调为一致(2mg/ml),蛋白变性。电泳(5%浓缩胶,12%分离胶,60V,40mA,2.5h)结,转膜(100V,250mA)时间依据各指标分子量大小而定。5%脱脂奶粉封闭2h,TBST洗3次,每次5min,分别加入抗Wnt-1、β-catenin、GSK-3β及β-actin一抗抗体孵育,4℃过夜TBST洗2次,每次5min,加入辣根过氧化物酶标记与一抗相抗的二抗IgG(1:2000)室温50min,TBST洗3次,每次5min。将滤膜放入配好的显色液中反应1min,计算机扫描图像,并由生物图像分析系统(Bio-Rad公司,Mod-

el Gel Doc 2000,美国)分析处理。

1.6.9 逆转录-多聚酶链反应(RT-PCR)法检测脑组织Wnt-1/β-catenin信号通路关键分子mRNA表达:取200mg脑组织,加入1ml Trizol提取RNA,检测RNA浓度;根据Fermatas试剂盒操作说明逆转录为cDNA,用所得的cDNA检测大脑Wnt-1、β-catenin、Bcl-2、Bax mRNA的mRNA表达。取5μl PCR产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳(90V 30min),凝胶成像所得DNA条带用凝胶成像系统(Bio-Rad公司, Model Gel Doc 2000,美国)分析,读取条带ID值。β-actin作为内部参照。引物的序列如表1。

表1 RT-PCR引物序列

引物	正向序列	反向序列
β-actin	5'-actgcattgtgatggactc-3'	5'-cagcactgtggcataga-3'
Bcl-2	5'-gggtggaggaaactctca-3'	5'-gagcagcgtcttcagagaca-3'
Bax	5'-gagcagcgtcttcagagaca-3'	5'-tcacggaggaagtccagtgt-3'
Wnt-1	5'-cagtggtggagagacttca-3'	5'-gagcg'cattacttcagagaca-3'
β-catenin	5'-gtactgtgagagacttca-3'	5'-gatacagatcttcatactagaca-3'
GSK-3β	5'-gatactgtgaccgctctca-3'	5'-gaaggcagcgtcttcagagaca-3'

1.7 统计学分析

用SPSS 22.0软件进行统计分析,数据以均值±标准差表示。数据符合正态分布,采用单因素方差分析;数据不符合正态分布,采用非参数检验。 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 各组大鼠神经行为学评分的比较

术后2h,除SC组外,其余4组大鼠神经行为学评分均升高($P < 0.05$),且4组间差异无显著性意义($P > 0.05$),说明本研究的造模是成功的。经治疗7天,T组、T+EA组、T+ENA组的神经行为学评分均较治疗前及IC组有所下降($P < 0.05$),且T+EA组下降程度明显大于T组、T+EA组($P < 0.05$)。见表2。

2.2 各组大鼠Catwalk步行速度及时间的比较

表2 各组大鼠神经行为学评分比较 ($\bar{x} \pm s$,分)

组别	例数	术后2h	治疗第7d
SC组	18	0	0
IC组	18	2.18±0.43 ^①	1.91±0.27 ^{①④}
T组	18	2.19±0.47 ^①	1.59±0.36 ^{①②③④}
T+EA组	18	2.25±0.38 ^①	1.25±0.24 ^{①②④}
T+ENA组	18	2.12±0.41 ^①	1.61±0.31 ^{①②③④}

注:与SC组比较,① $P < 0.05$;与IC组比较,② $P < 0.05$;与T+EA组比较,③ $P < 0.05$;与干预前比较,④ $P < 0.05$

术后2h,除SC组外,其余4组大鼠的步行速度均明显下降($P < 0.05$),10步内的步行时间均明显延长($P < 0.05$),且4组间差异均无显著性意义($P > 0.05$)。经治疗7天,T组、T+EA组、T+ENA组大鼠的步行速度和时间均较治疗前及IC组改善($P < 0.05$),且T+EA组明显优于T组、T+EA组($P < 0.05$)。见表3。

2.3 Homecage系统观察各组大鼠行为活动的变化

术后2h,除SC组外,其余4组大鼠的行走总路程、舔毛、进食等活动均明显下降($P < 0.05$),且4组间差异均无显著性意义($P > 0.05$)。经治疗7天,T组、T+EA组、T+ENA组大鼠的总路程、舔毛、进食均较治疗前及IC组改善($P < 0.05$),且T+EA组明显优于T组、T+EA组($P < 0.05$)。见表4。

2.4 各组大鼠脑梗死体积的比较

治疗第7d,与SC组比较,IC组、T组、T+EA组、T+ENA组大鼠的脑组织均出现不同程度的梗死灶($P < 0.05$);脑梗死体积百分比分别是 $32\% \pm 1.25\%$ 、 $24\% \pm 1.13\%$ 、 $16\% \pm 1.02\%$ 及 $26\% \pm 1.15\%$,与IC组比较,T组、T+EA组、T+ENA组的脑梗死体积百分比下降($P < 0.05$),且T+EA组下降程度大于T组、T+EA组($P < 0.05$)。

2.5 各组大鼠脑组织形态学改变

HE染色结果提示SC组大鼠脑组织形态、结构正常,未见炎性细胞。与之相比较,IC组大鼠脑缺血梗死区神经元及胶质细胞明显减少,残存神经元

固缩,间质高度水肿,见大量炎性细胞浸润。经治疗7天,T组、T+EA组、T+ENA组大鼠脑组织损伤程度及炎细胞浸润数量均有减少,且T+EA组改善更为明显。见图1。

2.6 各组大鼠脑组织超微结构变化

通过透射电镜可见假手术大鼠神经元细胞整齐排列于视野内,细胞膜结构完整,细胞核饱满,细胞器完整,模型组大鼠脑组织神经元排列紊乱,细胞器溶解,甚至无法识别,与模型组比较,T+ENA组大鼠神经元结构较模型组明显改善,细胞膜完整度明显改善,且优于T组及T+EA组,见图2。

2.7 各组大鼠神经细胞凋亡情况的比较

除SC组外,其余4组大鼠的脑组织均可见明显的凋亡细胞。其中IC组凋亡率为 $(70.28 \pm 0.09)\%$,T组凋亡率 $(38.28 \pm 0.07)\%$,T+EA组凋亡率 $(26.76 \pm 0.06)\%$,T+ENA组凋亡率 $(37.19 \pm 0.06)\%$,与SC组比较,IC组、T组、T+EA组、T+ENA组脑组织的神经凋亡细胞率显著性增高($P < 0.05$)。经治疗跑台训练、电针治疗7天,T组、T+EA组、T+ENA组大鼠的神经凋亡细胞率IC组减少($P < 0.05$),且T+EA组更为显著($P < 0.05$)。见图3。

2.8 各组大鼠脑组织 Wnt-1/ β -catenin 信号通路 mRNA 及蛋白表达的比较

与SC组比较,IC组大鼠脑组织中 Wnt-1、 β -catenin、Bcl-2 的蛋白及 mRNA 的表达下降($P < 0.05$),GSK-3 β 、Bax 的蛋白及 mRNA 的表达增高

表3 各组大鼠步行速度及时间比较

($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	步行速度(cm/s)		步行时间(s)	
		术后2h	治疗第7d	术后2h	治疗第7d
SC组	18	18.82±1.23	18.56±1.17	3.43±0.24	3.65±0.18
IC组	18	7.36±0.91 ^①	8.71±1.66 ^{①④}	10.08±0.86 ^①	9.12±0.93 ^{①④}
T组	18	7.47±0.58 ^①	12.36±1.07 ^{①②③④}	9.81±0.91 ^①	7.21±0.93 ^{①②③④}
T+EA组	18	7.51±0.71 ^①	14.83±1.20 ^{①②④}	10.06±1.11 ^①	5.37±0.68 ^{①②④}
T+ENA组	18	7.62±0.60 ^①	12.71±0.98 ^{①②③④}	9.88±1.07 ^①	6.78±1.07 ^{①②③④}

注:与SC组比较,① $P < 0.05$;与IC组比较,② $P < 0.05$;与T+EA组比较,③ $P < 0.05$;与干预前比较,④ $P < 0.05$

表4 各组大鼠行为活动的变化

($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	总路程(m)		舔毛(s)		进食(s)	
		术后2h	治疗第7d	术后2h	治疗第7d	术后2h	治疗第7d
SC组	18	308.45±1.23	310.31±52.38	16893.56±1678.24	17067.02±2302.59	593.45±72.20	586.35±103.59
IC组	18	77.76±7.51 ^①	158.86±23.21 ^{①④}	639.41±57.16 ^①	11878.42±2879.38 ^{①④}	186.81±16.96 ^①	245.96±85.64 ^{①④}
T组	18	71.41±6.18 ^①	219.43±47.40 ^{①②③④}	645.82±68.73 ^①	12231.63±2264.75 ^{①②③④}	191.16±20.41 ^①	368.51±107.56 ^{①②③④}
T+EA组	18	77.51±4.62 ^①	276.83±32.18 ^{①②④}	652.30±8.52 ^①	15783.27±2637.14 ^{①②④}	190.46±17.18 ^①	487.21±92.26 ^{①②④}
T+ENA组	18	79.66±7.36 ^①	213.45±37.53 ^{①②③④}	649.38±61.80 ^①	12256.78±1897.32 ^{①②③④}	189.58±18.77 ^①	371.60±109.82 ^{①②③④}

注:与SC组比较,① $P < 0.05$;与IC组比较,② $P < 0.05$;与T+EA组比较,③ $P < 0.05$;与干预前比较,④ $P < 0.05$

图1 各组大鼠脑组织HE染色比较

(×400)

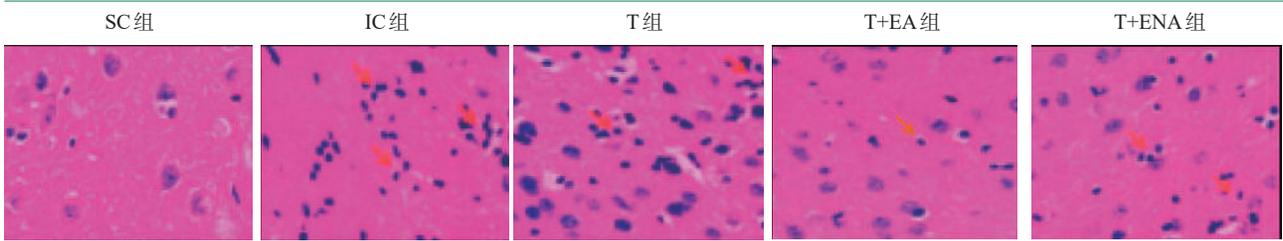


图2 各组大鼠脑组织电镜结果比较

(×15000)

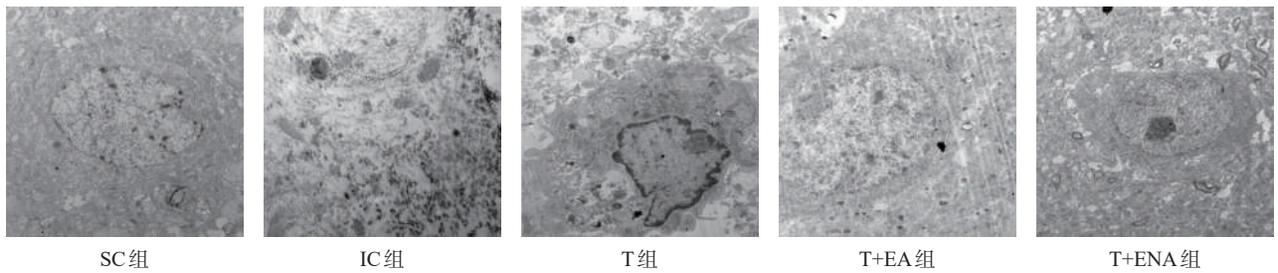
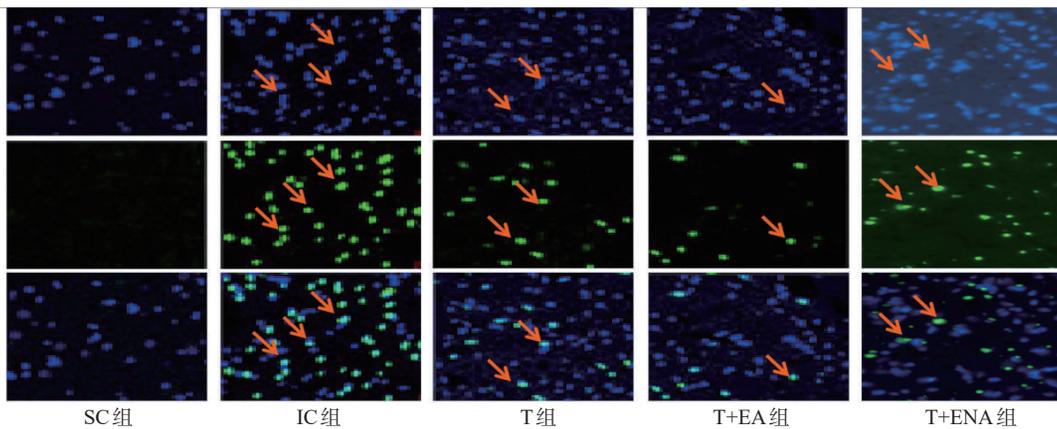


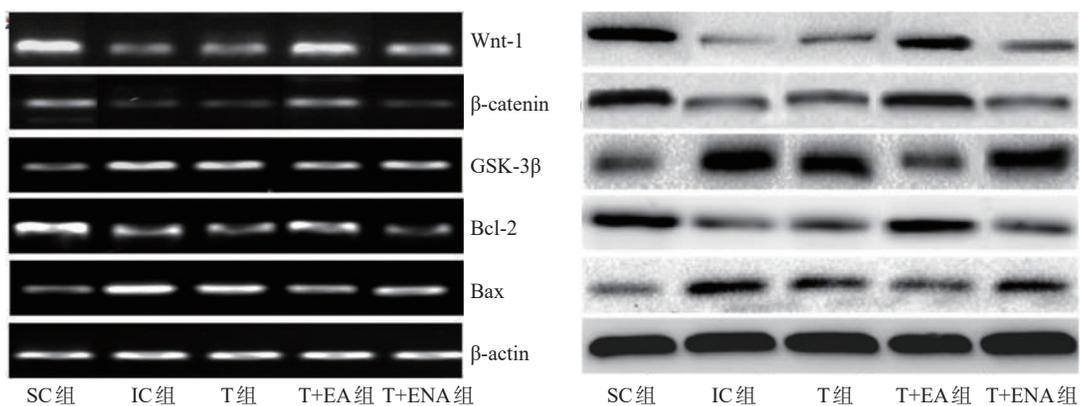
图3 各组大鼠神经细胞凋亡情况比较

(Tunel染色, ×200)



注:各组大鼠神经细胞凋亡情况(n=4)

图4 各组大鼠脑组织 Wnt-1/β-catenin 信号通路关键分子 mRNA 及蛋白表达



($P < 0.05$)。经治疗跑台训练联合电针治疗7天,与IC组、T组、T+ENA组比较,T+EA组大鼠脑组织的Wnt-1、 β -catenin、Bcl-2的蛋白及mRNA的表达增多($P < 0.05$),GSK-3 β 、Bax的蛋白及mRNA的表达减少($P < 0.05$)。单一的跑台训练或电针干预虽亦有促进Wnt-1、 β -catenin、Bcl-2表达,抑制GSK-3 β 、Bax表达,但效果无联合治疗显著及稳定。见图4,表5—6。

表5 各组大鼠脑组织 Wnt-1/ β -catenin 信号通路关键分子 mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	β -catenin/ β -actin	β -catenin/ β -actin	GSK-3 β / β -actin	Bcl-2/Bax
SC组	6	1.88±0.23	0.54±0.05	0.38±0.03	2.10±0.28
IC组	6	0.55±0.11 ^①	0.15±0.02 ^①	0.96±0.17 ^①	0.31±0.02 ^①
T组	6	0.67±0.07 ^{①②③}	0.14±0.01 ^{①③}	0.81±0.16 ^{①②③}	0.49±0.09 ^{①②③}
T+EA组	6	1.15±0.18 ^{①②}	0.41±0.04 ^{①②}	0.55±0.14 ^{①②}	1.22±0.16 ^{①②}
T+ENA组	6	0.71±0.06 ^{①②③}	0.13±0.02 ^{①③}	0.79±0.13 ^{①②③}	0.51±0.07 ^{①②③}

注:与SC组比较,① $P < 0.05$;与IC组比较,② $P < 0.05$;与T+EA组比较,③ $P < 0.05$

表6 各组大鼠脑组织 Wnt-1/ β -catenin 信号通路关键分子蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	Wnt-1/ β -actin	β -catenin/ β -actin	GSK-3 β / β -actin	Bcl-2/Bax
SC组	6	0.77±0.06	0.83±0.12	0.24±0.01	3.21±0.25
IC组	6	0.11±0.02 ^①	0.16±0.02 ^①	1.18±0.19 ^①	0.41±0.08 ^①
T组	6	0.27±0.17 ^{①②③}	0.33±0.04 ^{①②③}	0.88±0.11 ^{①②③}	0.79±1.19 ^{①②③}
T+EA组	6	1.53±0.16 ^{①②}	0.56±0.09 ^{①②}	0.35±0.05 ^{①②}	2.52±0.36 ^{①②}
T+ENA组	6	0.28±0.17 ^{①②③}	0.23±0.04 ^{①③}	0.92±0.14 ^{①②③}	0.83±0.12 ^{①②③}

注:与SC组比较,① $P < 0.05$;与IC组比较,② $P < 0.05$;与T+EA组比较,③ $P < 0.05$

3 讨论

脑血管疾病具有发病率高、致死率高、致残率高的特点,成为威胁人类生命健康的重要疾病。其中脑梗死是脑血管疾病的主要类型,其发病率有逐年升高的趋势^[9]。尽管目前现代医学手段在一定程度上提高了脑梗死的生存率,但由于脑组织对缺血缺氧耐受力差,多数脑梗死患者即使在接受再灌注治疗后仍存在不可逆转的神经缺损^[10]。因此,如何更有效地保护脑组织,修复受损神经是目前临床研究的重要课题。

古代医家认为“内属于府藏,外络于支节”是经络重要特性,刺激特定的穴位可将全身上下、内外、前后、左右形成一个有机整体,其中合穴是经气深入机体合于脏腑的部位。有资料显示刺激合穴是激发经络抵御病邪的重要途径。曲池、足三里是手阳明

大肠经及足阳明胃经的合穴。《医宗金鉴》云“曲池主治是脑卒中”;《针灸资生经》记载:“曲池,疗偏风半身不遂,刺风疹疼痛冷缓,捉物不得,挽弓不开,屈身难隐,脉风臂肘细无力”;罗天益《卫生宝鉴》亦有云:“凡觉手足麻痹或疼痛,良久乃已,此将中腑之候,宜灸此七穴(百会、发际、肩髃、曲池、风市、足三里、绝骨)”。由此可见曲池、足三里是治疗脑卒中之要穴,国内亦有团队^[11-12]通过大量脑卒中相关文献检索得出曲池、足三里是历代医家用于治疗脑卒中频率最高的穴位,故本研究取阳明经多气多血之曲池和足三里穴对脑梗死后运动功能障碍大鼠进行治疗。运动训练作为可以促进脑梗死后神经修复的治疗方法已被大量临床研究资料证实,通过运动训练不但可以改善脑梗死患者的运动功能,并且可以在一定程度改善患者的语言、认知、日常生活自理等方面的能力,从而促进功能重建,重返社会。本研究对MCAO大鼠进行跑台训练,跑台训练作为重要的动物运动训练方法被广泛关注,本研究结果显示跑台训练可明显改善大鼠的神经行为学评分,并且通过Catwalk系统我们发现大鼠步态亦有了显著改善,Homeage系统显示大鼠的进食、舔毛、活动总路程等日常生活能力有所提升。且我们还发现大鼠在进行运动训练基础上加用电针干预不论在步态改善或者日常生活能力改善方面均有进一步提升,与单纯接受跑台训练大鼠相比,改善更为明显,由此可见电针联合运动训练对脑梗死后运动功能障碍的改善确有协同效应。

线粒体途径介导的神经细胞凋亡激活是脑梗死后神经受损的重要病理变化机制之一。据研究^[13]Bcl-2家族与Caspase家族是共同参与此过程的“内源性途径”。Bax与Bcl-2均是线粒体膜上介导线粒体途径凋亡的重要因子,二者的表达强弱决定神经元细胞的存亡,当Bax表达占优势时细胞凋亡程度加剧,反之则阻止细胞凋亡^[14]。Bax参与细胞色素C孔道形成过程,促进线粒体内细胞色素C进入胞浆,激活了Caspase的联级反应,由此促进Caspase-3的活化,促进细胞凋亡。本研究以MCAO模型鼠为媒介,发现运动训练可降低大鼠的神经行为学评分,缩小大鼠的脑梗死体积,并且通过TUNEL染色发现大鼠脑组织的神经元细胞凋亡率下降,且HE染色

及透射电镜方法证实该治疗方法可改善脑梗死导致的脑组织病理变化。同时我们发现大鼠在进行运动训练基础上加用电针干预后大鼠神经行为学评分以及脑梗死体积的减少程度均明显高于单纯运动训练组,且大鼠的神经元细胞凋亡率下降更显著,病理改善更明显。于此同时我们发现模型组大鼠脑组织的Bcl-2水平下降,Bax表达升高,接受运动训练干预后Bcl-2水平上调,Bax表达下降,在进行运动训练基础上加用电针干预大鼠Bcl-2水平上调及Bax表达下降的趋势更明显,由此可说明电针联合运动训练抑制脑梗死引起的神经元细胞凋亡的确通过线粒体途径进行介导。

Wnt/ β -catenin信号通路广泛参与细胞生理病理过程,其中调节细胞凋亡的是该通路的重要作用之一^[15-16]。Wnt是该通路的上游因子,活化后可促进细胞内的 β -catenin、GSK-3 β 形成的复合物发生解离,随着复合物的解离,GSK-3 β 在胞内的浓度越来越高。GSK-3 β 是一种糖原代谢相关调节蛋白,它的表达增加或活性增强可抑制微管聚集,阻断神经元突触形成,GSK-3 β 还可对 β -catenin产生一定的水解效应,随后促进 β -catenin在胞浆内大量堆积后逐渐产生核移位。 β -catenin进入细胞后对胞内的Bax、Bcl-2基因的表达产生调控,调节线粒体途径介导的神经细胞凋亡过程^[17]。本研究通过PCR及Western Blot检测发现模型组大鼠Wnt-1、 β -catenin水平下降,GSK-3 β 表达增加,大鼠在接受运动训练后脑组织Wnt-1、 β -catenin水平上调,GSK-3 β 表达被抑制,并且在运动训练基础上加用电针干预后上述指标改善得更为显著,由此可见电针联合运动训练可激活脑组织Wnt/ β -catenin信号通路,抑制神经元的凋亡,实现脑保护效应。

参考文献

[1] 游咏梅. 电针干预对大鼠脑缺血再灌注损伤的神经保护作用及其与PI3K/Akt信号转导通路的关系[D]. 福州:福建中医药大学,2014.

[2] 耿广琴,邵晶,谢晓蓉,等. 红芪总多糖对脑缺血再灌注损伤大鼠海马组织的保护作用研究[J]. 中国临床药理学杂志,2020,36(09):1107—1109+1113.

[3] 张峰,董芳,董国栋,等. 运动训练诱发脑缺血耐受的机制研究进展[J]. 中华老年骨科与康复电子杂志,2018,4(4):247—251.

[4] 王强. 强化训练对脑缺血再灌注大鼠脑神经可塑性及脑卒中患者功能恢复的影响[D]. 济南:山东大学,2017.

[5] 程爱芳,张英杰,陶苗苗,等. 电针预处理对MCAO大鼠脑保护机制的研究进展[J]. 上海针灸杂志,2020,4(13):1—7.

[6] 卢荣,杜小正. 针刺治疗急性脑梗死后弛缓性瘫痪研究进展[J]. 河南中医,2020,40(4):637—640.

[7] 耿武军,陈成宇,莫云长,等. Wnt/ β -catenin信号通路介导参麦注射液对脑缺血再灌注损伤大鼠的脑保护作用[J]. 中国动脉硬化杂志,2018,26(2):109—114.

[8] 江一静,林志诚,游咏梅,等. 巨刺法对脑缺血再灌注损伤大鼠运动功能、脑影像结构及PI3K/AKT信号通路的影响[J]. 中国康复医学杂志,2019,34(9):1014—1020.

[9] 孙红娟. 脑梗死患者的治疗进展[J]. 医疗装备,2020,33(6):199—201.

[10] 李平. 右美托咪定对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用及机制[D]. 大连:中国医科大学,2019.

[11] 张胜行,陶静,陈立典. 电针治疗对缺血再灌注损伤大鼠Nrg-1/ErbB4信号通路抑制细胞凋亡的影响[J]. 医学研究生学报,2018,31(12):1246—1253.

[12] 林云娇,王露露,吴洁,等. 电针“曲池”“足三里”穴对缺血再灌注损伤大鼠纹状体DARPP-32磷酸化的影响[J]. 中国中医急症,2016,25(9):1645—1648+1739.

[13] 王传杰,吴毅,陶峰,等. 丰富环境对缺血性脑卒中小鼠海马区Bcl-2和Bax蛋白表达和认知功能的效果[J]. 中国康复理论与实践,2020,3(5):539—543.

[14] 刘王波,彭禹,马瑞,等. 地黄饮子汤对rt-PA溶栓后急性脑梗死大鼠神经细胞凋亡及Bcl-2、Caspase-3表达的影响[J]. 中国中医急症,2019,28(8):1366—1369.

[15] 相建峰,陈亮,王征,等. 奥拉西坦通过Wnt/ β -catenin减轻大鼠脑缺血再灌注损伤的实验研究[J]. 疑难病杂志,2019,18(10):1051—1055+1081.

[16] 杨国防,刘向哲,王彦华,等. 1,25-(OH)₂-D₃对脑梗死大鼠神经功能、脑组织内细胞凋亡及Wnt/ β -catenin通路的调节作用[J]. 中国合理用药探索,2019,16(4):1—4+9.

[17] 刘佳玲,黄林生,叶星宇,等. 失巢凋亡效应分子bcl-2转录抑制因子1的研究进展[J]. 肿瘤研究与临床,2020(2)133—136.