

· 基础研究 ·

电针治疗对大鼠缺血脑组织中 Na(v)1.1 表达的影响

任丽 方燕南 李宪亮 王晓娟 苗佳音 尹昭

【摘要】目的 观察电针治疗对大鼠缺血脑组织中 Na(v)1.1 表达的影响,探讨电针治疗作用的可能机制。**方法** 180 只 SD 大鼠采用线栓法制作脑缺血模型,分为假手术组、缺血对照组、真穴位电针组、假穴位电针组,每组 45 只。在缺血后 6 h、1 d、2 d、3 d、7 d 5 个时间点进行神经功能评分、缺血脑组织 Na(v)1.1 表达和脑梗死体积的检测。**结果** 在相同时间点,真穴位电针组神经功能评分最低、脑梗死体积最小,缺血对照组神经功能评分最高、脑梗死体积最大。假手术组大鼠脑组织中 Na(v)1.1 表达无变化。缺血后 Na(v)1.1 表达明显上调,缺血后 1 d 表达下调至最低;真穴位电针组下调与缺血对照组差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。假穴位电针组下调与缺血对照组相比,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。真穴位电针组与假穴位电针组的差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** 电针治疗可以调控 Na(v)1.1 的表达,缩小脑梗死体积,促进神经功能恢复。电针治疗在缺血后的保护作用可能是通过调控 Na(v)1.1 的表达来实现。

【关键词】 电针; 脑缺血; 穴位; 大鼠; Na(v)1.1

The effect of electro-acupuncture on sodium channel Na(v)1.1 in rats after acute cerebral ischemia REN Li, FANG Yan-nan, LI Xian-liang, WANG Xiao-juan, MIAO Jia-yin, YIN Zhao. Department of Neurology, First Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510080, China

Corresponding author: FANG Yan-nan, Email: fangyv@yahoo.com.cn

【Abstract】 Objective To observe the effect of electro-acupuncture therapy (ET) on the expression of sodium channel Na(v)1.1 in rats after acute cerebral ischemia and the mechanism of any protective function of ET. **Methods** A model of focal acute cerebral ischemia was established by occluding the right middle cerebral artery. One hundred and eighty healthy SD rats were randomly divided into a sham operation control (SC) group, an ischemia control (IC) group, a real ET group and a false ET group, with 45 in each group. Immunohistochemistry and real-time polymerase chain reaction (PCR) methods were used to detect Na(v)1.1 expression. 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride (TTC) staining was used to detect infarct volume. Neurological examination and grading was carried out at 6 hours and then 1, 2, 3 and 7 days after inducing ischemia. **Results** The gradings and infarction volume ratios of the rats in the IC group were the most serious, while in the real ET group the severity was much less at each time point. Compared with the SC group, the expression of Na(v)1.1 was significantly up-regulated in the IC group. The expression of Na(v)1.1 was increased at the 6th hour, then down-regulated to the lowest level at day 1, then from the 2nd to the 7th day was up-regulated again. The expression of Na(v)1.1 in the real ET group was significantly lower than in the IC group. Although the expression of Na(v)1.1 in the false ET group was low compared with the IC group, the difference was not significant. The difference between the real ET group and the false ET group was significant, however. **Conclusions** ET can reduce damage from cerebral ischemia and benefit the recovery of neural function. ET can also could regulate the expression of Na(v)1.1 after acute cerebral ischemia, which may be an important mechanism for neural function recovery.

【Key words】 Electro-acupuncture; Cerebral ischemia; Acupoints; Rats; Na(v)1.1

电针可以改善缺血脑组织的氧代谢,增加脑血流量,减轻缺血后脑损伤^[1]。针刺某些特定的穴位可以起到类似激活肢体运动功能区的作用,这为选用穴位

治疗脑卒中后偏瘫提供了科学证据^[2-3]。

电针治疗被认为是脑缺血后非药物治疗的重要方法之一,不仅用于恢复期的治疗,也逐渐用于急性期。但电针治疗的具体作用机制目前尚不清楚。研究发现,电刺激可以引起钠通道表达改变^[4],Na(v)1.1 在缺血损伤和修复中具有重要作用^[5-6]。本研究通过对脑缺血大鼠模型进行电针治疗,观察缺血后 Na(v)1.1 的表达变化及电针治疗对其的影响,探讨电针治疗发

挥脑保护作用的可能机制。

材料与方法

一、动物模型建立及分组

SPF 级雄性 SD 大鼠 180 只, 体重 250 ~ 300 g, 由中山大学北校区动物实验中心提供, 符合国家卫生部颁发的实验动物清洁级标准[实验动物质量合格证许可证号: SCXK(粤)2004-0011 粤监证号 2008A010]。所有模型制备均在本校实验动物中心完成, 手术场所及所用器具严格消毒, 全部操作在无菌条件下进行。实验期间所用动物饲养于中山大学北校区动物实验中心, 动物房温度控制在 20 ℃ 左右, 光暗周期 12 h。

大鼠术前 12 h 禁食、6 h 禁水, 采用线栓法制作大鼠脑缺血模型^[7]。根据随机原则分为缺血对照组、真穴位电针组、假穴位电针组和假手术组, 每组 45 只, 每组又分为缺血后 6 h、1 d、2 d、3 d、7 d 共 5 个时间点, 每一时间点每一种检测方法 3 只。大鼠清醒后回笼自由进饮食, 分别于缺血后 6 h、1 d、2 d、3 d、7 d 取材进行观察。

假手术组除不插鱼线外, 其余操作与其它 3 组相同。

二、动物模型评分

按 Joshua 等^[8] 评分评价模型鼠的神经功能缺损情况。

三、电针治疗

1. 真穴位电针组: 大鼠脑缺血清醒后(约术后 60 min), 开始给予电针治疗。选取内关、外关、足三里、三阴交穴, 以毫针直刺穴位^[9]。针刺后接 G6805-2B 低频电子脉冲治疗仪(上海产), 刺激参数设置: 疏密波 20 ~ 30 Hz, 强度 1 ~ 2 mA, 以大鼠肢体轻轻抖动并耐受为度, 留针时间 30 min, 每天 1 次。

2. 假穴位电针组: 选取上述四穴位旁开 5 mm 处进行电针治疗, 刺激参数设置同真穴位电针组。

3. 缺血对照组和假手术组: 未进行任何治疗, 在相应时间点取材进行观察。

四、免疫组织化学检测

大鼠灌注固定后, 开颅取出大脑经梯度蔗糖脱水后, 置冰冻切片机中行冠状位切片, 片厚 10 μm, 然后进行免疫荧光染色。一抗采用兔抗 Na(v)1.1 多克隆抗体(1:200), 鼠抗神经元核抗原(neuronal nuclei, NeuN)单克隆抗体(1:800), 二抗用 FITC 标记羊抗鼠抗体(1:200)和 Cy3 标记羊抗兔抗体(1:800)(所用抗体为 Chemicon 产品)。Olympus DP-70 荧光生物显微镜(日本)观察纹状体、大脑皮质运动区 Na(v)1.1 表达分布。每张切片观察 6 个 200 μm × 200 μm 区域 Na(v)1.1 表达阳性细胞平均荧光信

号, 进行图像分析。

五、实时定量聚合酶链式反应(real-time polymerase chain reaction, RT-PCR)

过量麻醉大鼠, 快速取纹状体、大脑皮质运动区约 50 ~ 100 mg 脑组织块, 液氮中速冻, -80 ℃ 保存。Primer express 2.0 software 设计引物, ABI3900 high-flux DNA synthesizer 合成标记探针。序列如下: Sequence Name: R-scN 1a(91 bp) Na(v)1.1。Forward Primer: 5'-GCGATTATGTGACAAGCATTTC-3'。Reverse Primer: 5'-CGGAGGGAGATGAGCTTCAG-3'。Probe: 5'-FAM-TCATTGTGCTGTTCACCGGC-TAMRA-3'。内参序列: 134 bp。R-GAPDH F 5'-TGCTCTACATGTTCCAGTATGACT-3'。R-GAPDH R 5'-CCATTGATGTTAGCGGGATCTC-3'。R-GAPDH Probe 5'-FAM-CCACGGCAAGTTCAACGGCACAGT-TAMRA-3'。

用 Trizol 法提取脑组织总 RNA, 进行逆转录反应。用 T-A 载体克隆法将 Na(v)1.1 和 GAPDH 扩增产物克隆至 pGEM-Teasy 载体, 筛选含有插入片段的载体, 用质粒 DNA 提取试剂盒(QIAGEN 公司)提取质粒 DNA, 稀释成不同浓度梯度作为制备标准曲线模板。进行 RT-PCR 反应。每个样本均做 3 个平行管, PCR 反应结束后, 根据标准曲线仪器自动进行分析。

六、氯化三苯四唑(triphenyl tetrazolium chloride, TTC)染色计算脑梗死体积

过量麻醉大鼠, 快速取脑组织放入 -20 ℃ 冰箱, 待组织冻硬后, 进行冠状位切片(片厚 2 mm)。放入 2% TTC(避光)染色 30 min(37 ℃), 然后在 4% PFA 固定 24 h 后拍照。用图像分析软件测定每张脑片的面积和脑梗死面积, 脑梗死面积 × 切片厚度 = 脑梗死灶体积, 全脑面积 × 切片厚度 = 全脑体积, 以脑梗死体积百分比(脑梗死体积百分比 = 脑梗死灶体积/全脑体积 × 100%)表示脑损伤的严重程度。

七、统计学分析

各组数据以($\bar{x} \pm s$)表示, 全部数据均采用 SPSS 16.0 版统计软件分析, 多组数据的显著性比较用单因素方差分析; 两样本的显著性比较用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、动物模型评分

假手术组大鼠术后无神经功能缺损的表现, 评分为 0 分; 其余 3 组大鼠术后出现轻至重度局灶性神经功能缺损表现; 相同时间点相比较, 缺血对照组大鼠表现最严重, 其次是假穴位电针组, 真穴位电针组大鼠表现最轻。各组在缺血 2 ~ 3 d 时神经缺损症状最明显。见表 1。

二、Na(v)1.1 表达变化

NeuN 是神经元核的特异标记物。免疫荧光检测显示,Na(v)1.1 表达阳性的细胞同时显示 NeuN 表达阳性,说明 Na(v)1.1 主要在神经元表达。缺血对照组的缺血侧 Na(v)1.1 荧光信号比非缺血侧和假手术对照组明显增强,缺血后 6 h 最强,缺血 1 d 明显减弱,缺血 2~7 d 又增强,但比缺血 6 h 稍弱。真穴位电针组和假穴位电针组具有同样变化趋势,但是相同时间点,真穴位电针组 Na(v)1.1 阳性细胞荧光信号最弱,其次是假穴位电针组。真穴位电针组与缺血对照组、真穴位电针组与假穴位电针组的差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。假穴位电针组与缺血对照组的差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 1~2。

RT-PCR 结果显示,Na(v)1.1 mRNA 也在缺血 1 d 表达下调至最低,2~7 d 表达逐渐上调。相同时间点,真穴位电针组和假穴位电针组 Na(v)1.1 mRNA 表达下调比缺血对照组明显,但假穴位电针组与真穴位电针组相比,表达下调较弱 ($P < 0.05$),与缺血对照组相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 2。

三、TTC 染色结果

假手术组无脑梗死出现。缺血对照组在缺血后脑梗死体积百分比逐渐增大,在缺血后 3 d 脑梗死体积百分比最大,一直持续至缺血后 7 d;真穴位电针组和假穴位电针组的脑梗死体积百分比在治疗后 3 d 也是最大,但与缺血对照组相比,各时间点脑梗死体积百分

比明显减少 ($P < 0.05$)。真穴位电针组脑梗死体积比假穴位电针组明显减小 ($P < 0.05$)。见表 3。

讨 论

在目前发现的 9 种钠通道中,脑缺血损伤时表达下调最明显的是 Na(v)1.1^[6]。钠通道阻滞剂可明显逆转 Na(v)1.1 表达的下调,使脑梗死体积缩小^[5],所以 Na(v)1.1 可能在缺血脑损伤和修复中起重要作用。

研究表明,Na(v)1.1 在成年大鼠的脑干、皮质、黑质和尾状核中呈高表达^[10]。大脑中动脉闭塞导致的梗死主要在纹状体和皮质。所以实验中我们观察纹状体和大脑皮质运动区 Na(v)1.1 的表达变化。

实验中我们观察到,假手术组 Na(v)1.1 的表达无明显变化。与之相比,脑缺血后缺血对照组 Na(v)1.1 表达先上调,然后下调,缺血后 1 d 表达最低,缺血 2 d 后 Na(v)1.1 表达又逐渐上调。Yao 等^[6]发现,Na(v)1.1 在缺血后 6 h 和 48 h 均有下调,缺血 48 h 下调更明显,但其选用的是缺血再灌注的缺血模型。

脑缺氧时,细胞能量代谢障碍,膜电位下降,激活了被称为钠通道的电压感受器的 S4 片段,激活门打开,通道开放,Na⁺内流,导致继发性 Ca²⁺超载、兴奋性氨基酸毒性效应、神经细胞的水肿等缺血损伤。因此缺血后 6 h Na(v)1.1 的表达上调,比非缺血侧和假手术组表达明显。缺血后 1 d Na(v)1.1 的低表达状态,

表 1 各组不同时间点神经功能评分比较(分, $\bar{x} \pm s$)

组 别	只数	6 h	1 d	2 d	3 d	7 d
假手术组	15	0	0	0	0	0
缺血对照组	15	2.35 ± 0.16	3.24 ± 0.16	3.56 ± 0.21	3.12 ± 0.31	2.53 ± 0.47
假穴位电针组	15	2.19 ± 0.26 ^c	2.83 ± 0.15 ^c	3.29 ± 0.24 ^c	3.08 ± 0.35 ^c	2.41 ± 0.28 ^c
真穴位电针组	15	2.00 ± 0.00 ^{ab}	2.64 ± 0.23 ^{ab}	3.02 ± 0.17 ^{ab}	2.73 ± 0.18 ^{ab}	2.24 ± 0.36 ^{ab}

注:与缺血对照组比较,^a $P < 0.05$;与假穴位电针组比较,^b $P < 0.05$;与缺血对照组比较,^c $P > 0.05$

表 2 RT-PCR 检测各组 Scn1a 数值($\bar{x} \pm s$)

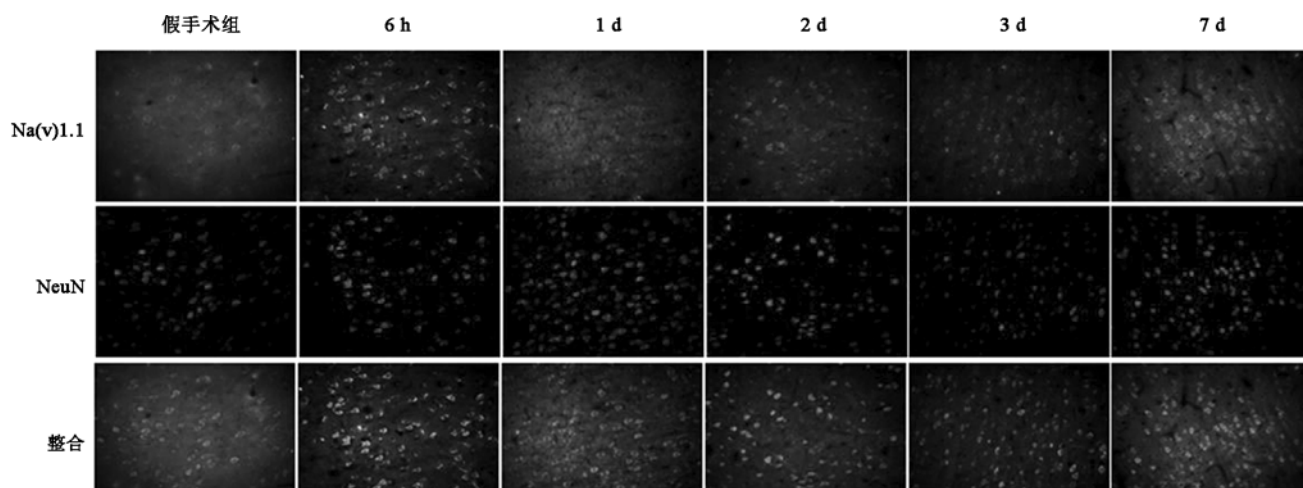
组 别	只数	6 h	1 d	2 d	3 d	7 d
假手术组	15	0.133 ± 0.032	0.141 ± 0.028	0.129 ± 0.019	0.132 ± 0.026	0.136 ± 0.030
缺血对照组	15	0.493 ± 0.034	0.369 ± 0.021	0.414 ± 0.026	0.429 ± 0.024	0.437 ± 0.028
假穴位电针组	15	0.460 ± 0.026 ^c	0.349 ± 0.014 ^c	0.391 ± 0.028 ^c	0.415 ± 0.031 ^c	0.423 ± 0.016 ^c
真穴位电针组	15	0.405 ± 0.019 ^{ab}	0.305 ± 0.048 ^a	0.357 ± 0.034 ^{ab}	0.377 ± 0.023 ^{ab}	0.389 ± 0.031 ^{ab}

注:与缺血对照组比较,^a $P < 0.05$;与假穴位电针组比较,^b $P < 0.05$;与缺血对照组比较,^c $P > 0.05$

表 3 各组梗死体积比较(% , $\bar{x} \pm s$)

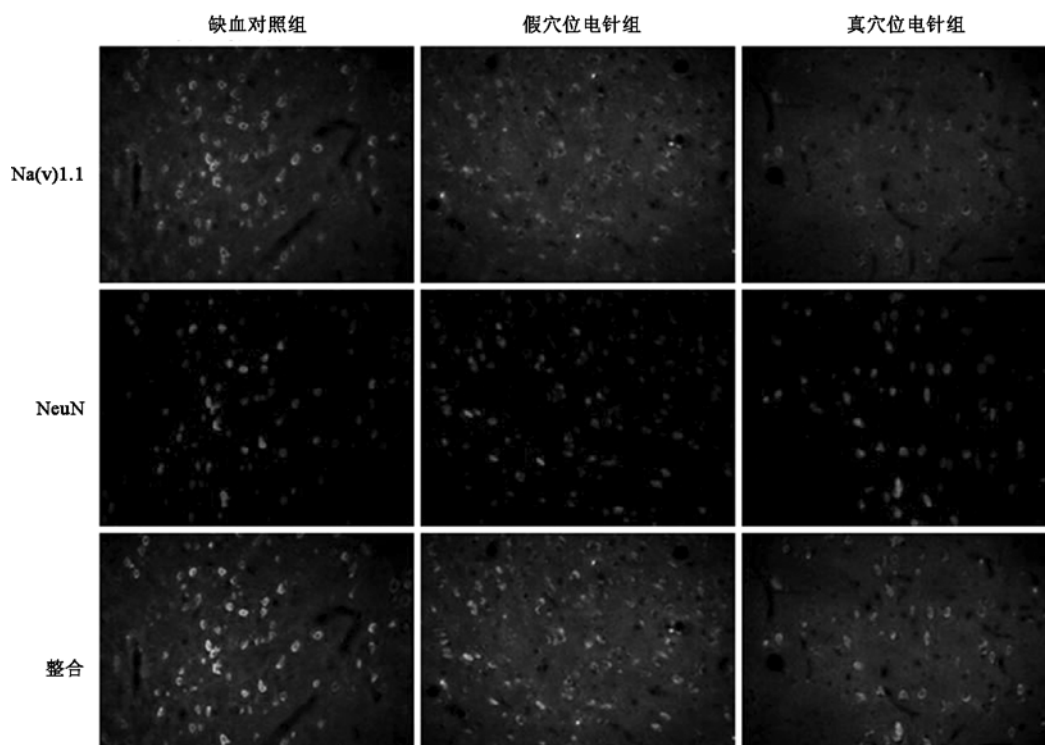
组 别	只数	6 h	1 d	2 d	3 d	7 d
缺血对照组	15	17.62 ± 1.69	22.24 ± 2.06	26.45 ± 1.18	27.13 ± 1.90	25.69 ± 2.32
假穴位电针组	15	16.93 ± 1.42 ^c	21.64 ± 2.09 ^c	24.93 ± 1.72 ^c	25.17 ± 1.17 ^c	23.85 ± 1.73 ^c
真穴位电针组	15	15.15 ± 1.33 ^{ab}	18.68 ± 1.87 ^{ab}	21.34 ± 2.03 ^{ab}	22.67 ± 1.58 ^{ab}	21.52 ± 1.36 ^{ab}

注:与缺血对照组比较,^a $P < 0.05$;与假穴位电针组比较,^b $P < 0.05$;与缺血对照组比较,^c $P > 0.05$



注:脑缺血后 Na(v)1.1 阳性细胞的荧光信号明显比假手术组增强;缺血后 6 h 最强,随后降低,在脑缺血后 1 d 下降至最低,但仍比假手术对照组强,缺血后 2~7 d 又增强,但比缺血 6 h 荧光信号弱。(Scale = 100 μ m)

图 1 缺血对照组大鼠皮质不同时间 Na(v)1.1 表达变化



注:假穴位电针组 Na(v)1.1 阳性细胞的荧光信号比缺血对照组弱,但比真穴位电针组强。(Scale = 100 μ m)

图 2 缺血后 2 d 缺血对照组、真穴位电针组和假穴位电针组 Na(v)1.1 表达对比

可能是神经细胞对缺血缺氧的保护性反应:急性缺血后应激性钠通道关闭、瞬时 Na^+ 内流减少,降低神经元的兴奋性、减轻细胞的损伤。由于缺血后细胞代谢、功能和能量障碍,膜内外离子梯度失衡, Na^+ 内流进一步增加,因此再次上调,细胞内 Na^+ 浓度增加,加重细胞缺血缺氧、水肿等缺血损伤。神经功能评分显示,缺血 2~3 d 神经功能缺损症状最严重;TTC 染色提示缺血 2~3 d 脑梗死体积比最大。这些结果提示 Na(v)1.1 的表达变化与脑缺血后神经损伤相关,参与缺血性脑损伤。这与文献报道的结果一致^[5]。

真穴位电针组缺血组织中 Na(v)1.1 表达比缺血

对照组明显下调,说明真穴位电针组缺血后 Na^+ 内流明显减少,缺血损伤减轻。我们的结果显示,真穴位电针组的脑梗死体积明显比缺血对照组缩小;神经功能评分也比缺血对照组降低,证实真穴位电针可以减轻缺血损伤,对缺血脑有保护作用。假穴位电针组缺血组织中 Na(v)1.1 表达虽然比缺血对照组下调,脑梗死体积比缺血对照组缩小,神经功能评分也比缺血对照组降低,但这些差异无统计学意义,而假穴位电针组与真穴位电针组的差异有统计学意义。说明真穴位电针能够调节 Na(v)1.1 的表达,减轻缺血脑损伤,发挥脑保护作用。电针治疗对缺血脑组织的保护作用可能是

通过调节 Na(v)1.1 的表达来实现的。

吴瑛和马海峰^[11]认为,穴位刺激可能改变了神经细胞钠通道膜的结构,加快 Na⁺ 内流速度,从而加快神经纤维动作电位的传导速度;而非穴位的刺激,除了对神经纤维的刺激作用小,还可能抑制了神经细胞钠通道的开放,减慢了传导速度。故认为穴位和非穴位电针刺激对钠通道的影响是不同的。

针刺起效的因素是多方面的,取穴是否精确、操作是否正确、刺激强度是否相同都成为影响实验结果的因素。一个理想的假穴是与已知的真穴相距一定距离的皮肤区域,真穴上施针能产生比假穴位更强的针感,更大的皮质激活效应。因此,穴位的准确定位可能是影响电针疗效的重要因素^[12]。

虽然目前关于真假穴位电针疗效的研究还存在争议^[13-14],但本实验结果显示,Na(v)1.1 表达在脑缺血后出现明显变化,可能参与脑缺血损伤;真穴位电针治疗在缺血后对 Na(v)1.1 的表达具有调控作用。电针治疗对缺血脑组织的保护作用可能是通过调节 Na(v)1.1 的表达来实现的。假穴位治疗虽然也具有一定的作用,但这种作用明显减弱。关于穴位电针治疗的具体作用机制,尚需大量研究论证。

参 考 文 献

- [1] Siu FK, Lo SC, Leung MC. Electro-acupuncture potentiates the disulfide-reducing activities of thioredoxin system by increasing thioredoxin expression in ischemia-reperfused rat brains. *Life Sci*, 2005, 77: 386-399.
- [2] 王苇,朱芳,漆剑频,等. 人脑对针刺与对指反应的实时动态功能 MRI 的对比研究. *中华放射学杂志*, 2002, 36: 211-213.
- [3] Wu MT, Hsieh JC, Xiong J, et al. Central nervous pathway for acupuncture stimulation: localization of processing with functional MR imaging of the brain-preliminary experience. *Radiology*, 2005, 212: 133-141.
- [4] Klein JP, Tendi EA, Dib-Hajj SD, et al. Patterned electrical activity modulates sodium channel expression in sensory neurons. *J Neurosci Res*, 2003, 74: 192-198.
- [5] Yao C, Williams AJ, Lu XC, et al. The sodium channel blocker RS100642 reverses down-regulation of the sodium channel alpha-subunit Na(v) 1.1 expression caused by transient ischemic brain injury in rats. *Neurotoxic Res*, 2003, 5: 245-253.
- [6] Yao C, Williams AJ, Hartings JA, et al. Nav1 Down-regulation of the sodium channel Nav1.1 α -subunit following focal ischemic brain injury in rats In situ hybridization and immunohistochemical analysis. *Life Sci*, 2005, 77: 1116-1129.
- [7] Belayev L, Alonso OF, Busto R, et al. Middle cerebral artery occlusion in the rat by intraluminal suture. *Stroke*, 1996, 27: 1616-1622.
- [8] Joshua B, Bederson MD, Lawrence H, et al. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke*, 1986, 17:472-476.
- [9] 华兴邦,李辞蓉,宋大鲁,等. 大鼠穴位图谱的研制. *实验动物与动物实验*, 1991, 1: 1-4.
- [10] Gong B, Rhodes KJ, Bekele-Arcuri Z, et al. Type I and type II Na (+) channel alpha-subunit polypeptides exhibit distinct spatial and temporal patterning, and association with auxiliary subunits in rat brain. *J Comp Neurol*, 1999, 412: 342-352.
- [11] 吴瑛,马海峰. 穴位和非穴位对下肢运动神经传导速度的差异的研究. *上海体育学院学报*, 2008, 32:46-49.
- [12] 张俊海,冯晓源,李霖,等. 穴位和非穴位电针镇痛的脑功能磁共振对照研究. *中国医学计算机成像杂志*, 2005, 11: 10-16.
- [13] 方继良, Timo K, Juergen W, 等. 捻针时真假学不同中枢激活效应的脑功能 MRI. *中华放射学杂志*, 2004, 38: 1281-1284.
- [14] Linde K, Streng A, Hoppe A, et al. Randomized trial vs observational study of acupuncture for migraine found that patient characteristics differed but outcomes were similar. *J Clin Epidemiol*, 2007, 60: 280-287.

(修回日期:2009-12-15)

(本文编辑:松 明)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

《中华物理医学与康复杂志》投稿途径

最近常有作者致电编辑部询问投稿事宜,现正式告知如下:

本刊投稿途径有纸质稿件投稿和网络投稿两种,请任选一种,切勿重复投稿。

1. 网络投稿:请登陆本刊网站 www.cjpmr.cn, 进入“作者投稿”通道,按步骤操作即可顺利投稿。不熟悉投稿操作方法的作者请查询主页上“投稿指南”,有详细说明。

2. 纸质稿件投稿:需通过邮局寄送一式三份打印稿,并请同时附上单位介绍信,电子稿件通过 email 发送至编辑部电子信箱。审稿费务必通过邮局汇款。

为提高稿件处理效率,也方便作者随时查询稿件情况,推荐作者采用网络投稿方式踊跃投稿。不熟悉电脑操作的作者建议采用纸质稿件投稿。