

· 基础研究 ·

亚低温对局灶性脑缺血再灌注大鼠 Dickkopf-1 表达的影响

刘建丰 苏志强 孙伟 张丽

【摘要】 目的 研究亚低温对局灶性脑缺血再灌注大鼠 Dickkopf-1 (Dkk-1) 表达的影响, 进一步探讨亚低温脑保护作用的机制。**方法** 线栓法建立大鼠大脑中动脉阻塞再灌注模型, 分假手术组、假手术 + 亚低温组、模型组及模型 + 亚低温组。应用逆转录聚合酶链式反应 (RT-PCR)、Western blotting 和免疫组化技术分别检测再灌注后不同时相缺血侧皮质 Dkk-1 mRNA 和蛋白水平的表达。**结果** 假手术组、假手术 + 亚低温组 Dkk-1 mRNA 及蛋白有少量表达。脑缺血 2 h 再灌注 3 h, Dkk-1 mRNA 和蛋白表达开始增加, 随再灌注时间的延长表达量逐渐增加, 至再灌注 24 h 达高峰, 然后明显减少, 再灌注 72 h 时仍高于假手术组的水平。每一相同再灌注时间点, 模型 + 亚低温组 Dkk-1 mRNA 和蛋白表达量均明显低于模型组。**结论** Dkk-1 可能参与了局灶性脑缺血再灌注损伤的病理过程。亚低温可通过抑制 Dkk-1 的表达而发挥一定程度的脑保护作用。

【关键词】 亚低温; 脑缺血; 再灌注; Dickkopf-1

Effects of mild hypothermia on the expression of Dickkopf-1 in rats' brains after focal cerebral ischemia and reperfusion LIU Jian-feng, SU Zhi-qiang, SUN Wei, ZHANG Li. Department of Neurology, The First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, China

【Abstract】 Objective To investigate the effects of mild hypothermia on the expression of Dickkopf-1 (Dkk-1) in rats' brains after focal cerebral ischemia and reperfusion and to explore the molecular mechanism of any neuroprotective effects of mild hypothermia. **Methods** A focal cerebral ischemia and reperfusion model was established in rats by intraluminal filament occlusion of the middle cerebral artery. The adult rats were randomly divided into four groups: a sham-operation group, a sham-operation plus mild hypothermia group, a model group, and a model plus mild hypothermia group. The expression of Dkk-1 mRNA and protein in the ischemic cortex at different phases after reperfusion were assessed using a reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), Western blotting and immunohistochemical staining. **Results** There was little expression of Dkk-1 mRNA or its protein in the sham-operation group or in the sham-operation plus mild hypothermia group. Expression of Dkk-1 mRNA and its protein began to increase after 2 h of cerebral ischemia and 3 h of reperfusion, with expression peaking at the 24th h after the start of reperfusion and then decreasing markedly. But expression was still stronger than in the sham-operation group at the 72nd h. At every reperfusion time point, expression of Dkk-1 mRNA and its protein were markedly less in the model plus mild hypothermia group than in the model group. **Conclusion** Dkk-1 probably participates in the pathologic process of injury caused by focal cerebral ischemia and reperfusion. Inhibiting the expression of Dkk-1 after focal cerebral ischemia and reperfusion is partly responsible for the neuroprotective effects of mild hypothermia.

【Key words】 Mild hypothermia; Cerebral ischemia; Reperfusion; Dickkopf-1

近年来, 脑缺血再灌注损伤的分子机制一直是神经科学领域的研究热点。以往研究表明, 神经细胞凋亡路径包括 caspase 依赖性途径和凋亡诱导因子介导的 caspase 非依赖性途径。Wnt 基因家族编码了一组富含半胱氨酸的糖基化蛋白质, 属于分泌型生长因子, 该家族参与了细胞增殖、分化、凋亡和细胞定位控制等

过程。最近研究发现, Dickkopf-1 (Dkk-1) 是一种特异性对经典 Wnt 信号传导通路起抑制作用的蛋白质^[1]。Wnt 可抑制神经细胞损伤后的凋亡, 而 Dkk-1 的诱导表达则意味着激活了一系列诱导神经元死亡的通路^[2-4]。但是 Dkk-1 在脑缺血再灌注损伤中的作用鲜有报道。近年的研究表明, 亚低温 (33 ~ 35℃) 对脑缺血再灌注损伤是一种有效、可行的脑保护措施^[5]。亚低温脑保护作用的机制尚未完全清楚, 其中涉及复杂的生物学级联反应过程, 且亚低温对脑缺血再灌注后 Dkk-1 表达的影响鲜见报道。

本研究旨在通过观察大鼠局灶性脑缺血再灌注后, 不同时间段 Dkk-1 的表达变化及亚低温对其的影

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2009.09.006

基金项目: 黑龙江省自然科学基金资助项目 (D2007-73), 黑龙江省教育厅基金资助项目 (11521083), 哈尔滨医科大学附属第一医院科研基金 (B08-021)

作者单位: 150001 哈尔滨, 哈尔滨医科大学附属第一医院神经内科

响,进一步探讨局灶性脑缺血再灌注损伤的分子病理机制和亚低温脑保护作用的机制。

材料与方法

一、实验动物分组

健康成年雄性 Wistar 大鼠 100 只(由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所小动物室提供),2~3 月龄,体重(250 ± 30)g。随机分成假手术组($n=10$),假手术+亚低温组($n=10$),模型组(常温条件下缺血 2 h 后分别再灌注 3,12,24,72 h,根据再灌注时间分为 4 个亚组,每个亚组 10 只大鼠),模型+亚低温组(亚低温条件下缺血 2 h 后分别再灌注 3,12,24,72 h,根据再灌注时间分为 4 个亚组,每个亚组 10 只大鼠)。

二、大鼠局灶脑缺血再灌注模型的制作及标本制备 模型组和模型+亚低温组采用改良的 Longa 线栓法^[6]建立大鼠右侧大脑中动脉阻塞再灌注模型,均于缺血 2 h 后抽出栓线使血流再通。假手术组和假手术+亚低温组造模方法除不插线栓外,其余步骤同模型组。参照 Longa 神经功能缺失评分标准^[6],以大鼠麻醉清醒后 1~4 分为有效模型。排除开颅后蛛网膜下腔出血的大鼠。每组 10 只大鼠中,5 只用于逆转录聚合酶链式反应(reverse transcription polymerase chain reaction,RT-PCR)和蛋白免疫印迹(Western blotting)检测,5 只用于免疫组化。于缺血再灌注各相应时间点,深度麻醉处死大鼠,取缺血侧视交叉前 2 mm 皮质脑组织用于 RT-PCR 检测、视交叉后 2 mm 皮质脑组织用于 Western blotting 检测,置入液氮中备用。

免疫组化染色的标本制备:在相应的时间点,各组大鼠深度麻醉,用 4% 多聚甲醛溶液经左心室进行心脏灌流固定,断头取脑。取视交叉前 2 mm 至视交叉后 2 mm 脑组织,置于 4℃ 冰箱 4% 多聚甲醛后固定 24 h。常规石蜡包埋、切片,片厚 4 μm。

三、局部亚低温的实施方法和温度的控制

亚低温采用 RDZL 686A 型局部亚低温治疗仪(专利号:ZL98236936.0,哈尔滨工业大学热工教研室研制)实现。大鼠于脑缺血后立即将缺血侧头颅与局部亚低温治疗仪的探头紧密接触,设定制冷器温度为 8℃。给予亚低温 10 min 后测脑温,采用 SL-4 点针型温度传感器(同济医科大学研制)监测大鼠鼓膜温度(脑温平均高于鼓膜温度 0.6 ± 0.08 ℃),证实脑温可以降至(33.0 ± 0.5)℃^[7],同时监测大鼠的直肠温度于(37.0 ± 0.5)℃。然后亚低温干预持续时间为 3 h,亚低温结束后将大鼠置于室温(25℃)下自然复温。

四、RT-PCR 方法

取 50 mg 待测脑组织,按照 Trizol RNA 提取试剂盒(美国 Invitrogen 公司)说明提取总 RNA,测定 RNA

浓度。采用 Promega A3500 逆转录试剂盒,按操作说明进行逆转录合成 cDNA,逆转录反应条件为 42℃,40 min。以逆转录所得的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。Dkk-1 的引物序列(Genbank XM_219804)^[8]: sense-5'-AATCTGCCTGGCTTGCCGAA-3'(351-370),antisense-5'-GTGGAGCCTGGAAGAATTGC-3'(791-810),扩增产物长度 421 bp。内参照 β-肌动蛋白(β-actin)的引物序列(GenBank NM_031144)^[9]: sense-5'-TCATGAAGTGTGACGTTGACATCCGT-3'(926-951),antisense-5'-CCTAGAAGCATTTGCGGTGCACGATG-3'(1185-1210),扩增产物长度 234 bp,引物由加拿大上海生工生物工程公司合成。PCR 反应体系为 20 μl,PCR 扩增条件:94℃ 预变性 5 min,94℃ 变性 30 s,55℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 45 s,35 个循环后,72℃ 再延伸 5 min。PCR 产物在含溴化乙锭的 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳,紫外透射仪观察照相。用光密度扫描分析软件 QuantiScan 3.0(英国 Biosoft 公司)测定每条带的光密度值(OD)。以 β-actin 为内参照,通过 Dkk-1/β-actin 的光密度比值做相对定量分析。

五、Western blotting 检测

取 50 mg 脑组织剪成碎块,加入 0.2 ml 裂解液(美国 Pierce 公司),加液氮研磨成匀浆,超声波细胞破碎 15 s,4℃ 放置 1 h。4℃ 12 000 r/min、离心 10 min,取上清分装 50 μl/管,用 Bradford 蛋白染色法检测蛋白含量。2×上样缓冲液 30 μl+30 μl 样品上清裂解液,混匀后沸水浴上煮沸 5 min。制备 12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶,每孔加变性后的总蛋白含量皆为 50 μg。在 100 V 下电泳,至溴酚兰到凝胶底部。电压 80 V 恒压,1.5 h 将蛋白电转移到 PVDF 膜(美国 Amresco 公司)上。用含 5% 脱脂奶粉的封闭缓冲液室温封闭 1 h。加入羊抗大鼠 Dkk-1 多克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司,1:200)4℃ 孵育过夜,加入辣根酶标记抗的抗羊 IgG 二抗(北京中山生物技术有限公司,1:2 000),室温震荡孵育 1 h。用 ECL 试剂盒(美国 Pierce 公司)显色,在暗室中用 X 线胶片曝光,显影,定影。胶片经扫描后,用光密度扫描分析软件 QuantiScan 3.0 测定每条带的光密度值。以三磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)为内参照。将相对光密度值 Dkk-1/GAPDH 作为统计学分析的原始数据,去除蛋白不均降解造成的误差。

六、免疫组化染色

按过氧化物酶标记的链霉卵白素(streptavidin, SP)试剂盒(北京中山生物技术有限公司)的操作说明,进行 SP 三步法免疫组化染色。一抗为羊抗大鼠 Dkk-1 多克隆抗体(1:50),阴性对照以 0.01 mol/L 磷

酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)代替一抗。

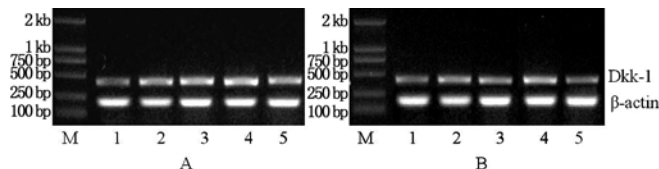
七、统计学分析

采用 SPSS 15.0 统计软件包对数据进行处理,实验数据用($\bar{x} \pm s$)表示,采用两样本 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、RT-PCR 检测 Dkk-1 mRNA 的相对含量

RT-PCR 所扩增的 Dkk-1 和 β -actin 基因的片段大小分别约为 421 bp 和 234 bp,与目标片段大小一致,提示均为特异性扩增(图 1)。假手术组和假手术 + 亚低温组可见 Dkk-1 mRNA 少量表达。与假手术组相比,模型组 Dkk-1 mRNA 的表达量于再灌注 3 h 开始明显增加,随再灌注时间的延长,表达量逐渐增加,于再灌注后 24 h 达高峰(平均 Dkk-1/ β -actin 为假手术组的 2.33 倍),然后明显减少,再灌注 72 h 时仍高于假手术组的水平。模型 + 亚低温组 Dkk-1 mRNA 表达的时间变化趋势与模型组基本相同。在各相同再灌注时间点,模型 + 亚低温组的 Dkk-1 mRNA 表达量与模型组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与模型组相比,模型 + 亚低温组在各相同再灌注时间点 Dkk-1 mRNA 表达量均明显减少($P < 0.05$),详见表 1。



注:图 A 中 1~5 分别代表假手术组、模型组再灌注 3,12,24,72 h 组;图 B 中 1~5 分别代表假手术 + 亚低温组、模型 + 亚低温组再灌注 3,12,24,72 h 组

图 1 各组大鼠大脑皮质 Dkk-1 mRNA 的表达

表 1 各组大鼠大脑皮质 Dkk-1 mRNA 的相对光密度

(Dkk-1/ β -actin, $\bar{x} \pm s$)

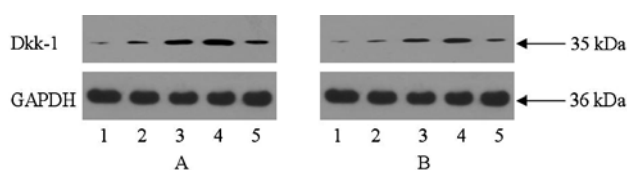
组 别	n	假手术	再灌注 3 h	再灌注 12 h	再灌注 24 h	再灌注 72 h
假手术组	5	0.36 ± 0.02	—	—	—	—
假手术 + 亚低温	5	0.35 ± 0.01 ^a	—	—	—	—
模型组	5	—	0.69 ± 0.08	0.77 ± 0.04	0.84 ± 0.04	0.64 ± 0.04
模型 + 亚低温组	5	—	0.56 ± 0.06 ^b	0.65 ± 0.05 ^c	0.72 ± 0.03 ^c	0.52 ± 0.06 ^c

注:与假手术组比较,^a $P > 0.05$;与模型组同时段比较,^b $P < 0.05$,^c $P < 0.01$

二、Western blotting 检测 Dkk-1 蛋白的相对含量

Dkk-1 蛋白的相对分子量为 35 kDa,聚丙烯酰胺凝胶电泳显示 Dkk-1 蛋白与我们预期的分子量大小相符,提示为特异性杂交带,作为内参的 GAPDH 蛋白在

各组均表达恒定(图 2)。假手术组和假手术 + 亚低温组可见 Dkk-1 蛋白少量表达。与假手术组相比,模型组 Dkk-1 蛋白的表达量于脑缺血再灌注后 3 h 开始略有增加,但差异无统计学意义($P > 0.05$),随再灌注时间的延长,表达量逐渐增加,于再灌注后 24 h 达高峰(平均 Dkk-1/GAPDH 为假手术组的 4.37 倍),然后明显减少,再灌注 72 h 时仍高于假手术组的水平。与假手术 + 亚低温组相比,模型 + 亚低温组再灌注后 3 h Dkk-1 蛋白表达基本无变化。在其他各相同再灌注时间点,模型 + 亚低温 Dkk-1 蛋白表达量均少于模型组($P < 0.05$),尤其以再灌注 24 h 最为明显($P < 0.01$)(表 2)。



注:图 A 中 1~5 分别代表假手术组、模型组再灌注 3,12,24,72 h 组;图 B 中 1~5 分别代表假手术 + 亚低温组、模型 + 亚低温组再灌注 3,12,24,72 h 组

图 2 各组大鼠大脑皮质 Dkk-1 蛋白的表达

表 2 各组大鼠大脑皮质 Dkk-1 蛋白的相对光密度

(Dkk-1/GAPDH, $\bar{x} \pm s$)

组 别	n	假手术	再灌注 3 h	再灌注 12 h	再灌注 24 h	再灌注 72 h
假手术组	5	0.19 ± 0.01	—	—	—	—
假手术 + 亚低温	5	0.18 ± 0.02	—	—	—	—
模型组	5	—	0.27 ± 0.04	0.58 ± 0.05 ^a	0.83 ± 0.06 ^a	0.44 ± 0.04 ^a
模型 + 亚低温组	5	—	0.23 ± 0.02	0.50 ± 0.05 ^b	0.66 ± 0.05 ^c	0.34 ± 0.05 ^b

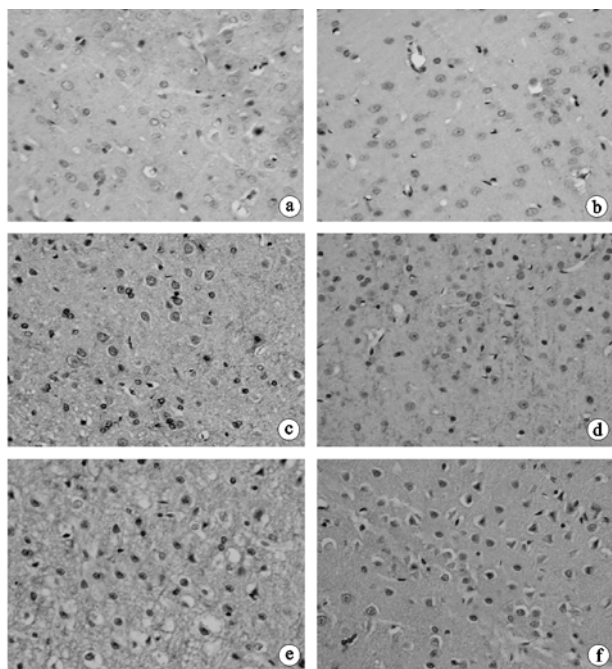
注:模型组各时间点与前一个时间点相比,^a $P < 0.01$;模型 + 亚低温组各时间点与前一个时间点相比,^b $P < 0.01$,^c $P < 0.05$

三、Dkk-1 蛋白的免疫组化染色

Dkk-1 蛋白免疫组化阳性染色见于细胞浆。Dkk-1 蛋白在假手术组、假手术 + 亚低温组及缺血对侧半球为阴性,Dkk-1 蛋白阳性细胞主要是分布于缺血侧基底节区和额顶叶皮质下部的缺血核心区的神经元,梗死周围区阳性神经元较少。脑缺血 2 h 再灌注 3 h 可见 Dkk-1 蛋白少量表达,于再灌注后 24 h 达到高峰,然后明显减弱,再灌注 72 h 仍可检测到 Dkk-1 蛋白弱阳性表达。在模型 + 亚低温各亚组,Dkk-1 阳性细胞数及免疫反应强度较模型组减弱(图 3)。

讨 论

经典 Wnt 通路的激活是细胞外 Wnt 结合到细胞膜的低密度脂蛋白受体相关蛋白(LRP)5/6 及 Frizzled 受体上,形成 LRP5/6-Wnt-Frizzled 功能性连接受体复



注:a. 假手术组 Dkk-1 阴性细胞表达情况;b. 假手术 + 亚低温组 Dkk-1 阴性细胞表达情况;c. 模型组再灌注 3 h Dkk-1 阳性细胞表达情况;d. 模型 + 亚低温组再灌注 3 h Dkk-1 阳性细胞表达情况;e. 模型组再灌注 24 h Dkk-1 阳性细胞表达情况;f. 模型 + 亚低温组再灌注 24 h Dkk-1 阳性细胞表达情况

图 3 各组大鼠大脑皮质 Dkk-1 蛋白表达的免疫组化染色(S-P 法, $\times 400$)

合体。该复合体形成后,激活了散乱蛋白(Dsh),Dsh 能够抑制糖原合成激酶-3 β (GSK-3 β),即 Dsh 能使 GSK-3 β 磷酸化,从而使“多蛋白复合体激酶”失活, β -连环蛋白(β -catenin)不能被降解。大量游离的 β -catenin 在胞浆中聚集并进入细胞核内,与转录因子家族 T 细胞因子(TCF)/淋巴样增强因子(LEF)形成 β -catenin/TCF/LEF 复合体,特异性地启动、激活下游靶基因的转录。经典 Wnt 通路可促进肌肉、神经等多种前体细胞的发育,如果组成 Wnt 通路的蛋白、转录因子或基因破坏,可造成该通路关闭,一部分前体细胞将不能生成。因此, β -catenin 是脑神经细胞发育的关键,起分化、增殖、维持细胞存活的作用^[10-12]。

Cappuccio 等^[8]报道,在沙土鼠可逆性全脑缺血模型和 SD 大鼠四血管阻断全脑缺血模型中,假手术组有 Dkk-1 少量弱表达。Dkk-1 的表达在缺血大鼠海马 CA1 区于再灌注 6 h 开始增加,24 h 和 48 h Dkk-1 表达明显增加,24 h 达高峰,再灌注 3 d 消失。Dkk-1 的表达首先选择性出现在缺血严重的海马 CA1 区,随着时间的延长才扩展至 CA3 区和齿状回。在体外小鼠皮质神经元和星形胶质细胞混合培养 NMDA 兴奋性毒性损伤模型中,在给予 NMDA 后 6 h 和 24 h Dkk-1 表

达增加。本实验结果显示:Dkk-1 的表达随再灌注时间的延长而逐渐增加,于再灌注后 24 h 达到高峰,然后明显减少,再灌注 72 h 时仍高于假手术组水平。本研究通过 HE 染色发现大量神经元死亡出现在脑缺血再灌注后 48 h ~ 72 h,说明 Dkk-1 的表达高峰出现在大量神经元死亡之前;再灌注 72 h 时 Dkk-1 表达的明显减少与此时缺血核心区神经元大量死亡有关。因此,在局灶性脑缺血再灌注模型中,Dkk-1 的 mRNA 和蛋白含量的表达变化有一定的时间趋势,这种时间趋势与神经元的死亡密切相关,Dkk-1 可能参与了脑缺血再灌注过程中的神经元死亡,这与文献报道的全脑缺血模型的结果类似。

局灶性脑缺血后神经元的死亡存在坏死和凋亡两种方式,在梗死中心以坏死为主,在半暗带以凋亡为主。本研究的免疫组化结果显示:在假手术组及缺血对侧半球 Dkk-1 蛋白为阴性,而在局灶性脑缺血再灌注大鼠的缺血侧外侧尾状核和壳核和额顶叶皮质下部的缺血核心区,可见 Dkk-1 蛋白的阳性神经元数量和免疫反应强度均明显增加,而梗死周围区阳性神经元较少。这提示,在局灶性脑缺血再灌注模型中,Dkk-1 蛋白的表达被诱导出来,Dkk-1 蛋白的表达区域与神经元的死亡有关。Dkk-1 的表达主要出现在缺血严重的梗死中心区,随再灌注时间的延长才少量扩展至梗死周围的半暗带。因此,Dkk-1 蛋白的诱导表达可能参与了梗死中心区缺血神经元的坏死和半暗带的神经元迟发性凋亡这两个损伤过程。

局灶性脑缺血再灌注后 Dkk-1 参与神经元死亡过程的机制在于 Dkk-1 能够抑制经典 Wnt 信号通路。Dkk-1 与其受体 LRP6 和 Kremen1/2 形成三重复合物,诱导快速内吞作用,抑制 LRP6-Wnt-Frizzled 功能性连接受体复合体的形成,从而使 GSK-3 β 脱抑制,导致 β -catenin 降解增加,这样使由 β -catenin 触发的下游靶基因提供给缺血神经元的营养支持丧失,从而促进缺血神经元的死亡^[13,14]。

在给予亚低温后,缺血再灌注各时间点 Dkk-1 的表达皆有减弱,尤其是缺血再灌注 24 h 时最为明显。这意味着亚低温能在一定程度上抑制 Dkk-1 的表达,从而起到保护局灶性脑缺血再灌注后神经元的作用。Zhao 及 Kelly 等^[15,16]报道,虽然亚低温不能促进 GSK-3 β 的磷酸化,但是亚低温能使脑缺血区的 GSK-3 β 表达明显减少,并能阻止 GSK-3 β 下游的磷酸化 β -catenin 由胞浆向细胞核内的转移,亚低温可能通过以上机制发挥脑保护作用。因此,亚低温可能是通过作用于 Dkk-1 抑制经典 Wnt 信号通路的下游分子来抑制 Dkk-1 的表达,同时解除 Dkk-1 对经典 Wnt 信号通路的抑制。但 Dkk-1 对经典 Wnt/ β -catenin 通路

抑制后,影响其下游哪些靶基因的转录和后续作用的具体方式如何,以及亚低温抑制 Dkk-1 表达的具体机制,都还不清楚,有待于进一步研究。

综上所述,本研究提示:局灶性脑缺血再灌注后 Dkk-1 的表达明显增加,Dkk-1 的表达时间和区域与神经元的死亡有关。Dkk-1 参与了局灶性脑缺血再灌注损伤的病理过程。亚低温可通过抑制 Dkk-1 的表达而发挥脑保护作用。

参 考 文 献

- [1] Niehrs C. Function and biological roles of the Dickkopf family of Wnt modulators. *Oncogene*, 2006, 25: 7469-7481.
- [2] Verani R, Cappuccio I, Spinsanti P, et al. Expression of the Wnt inhibitor Dickkopf-1 is required for the induction of neural markers in mouse embryonic stem cells differentiating in response to retinoic acid. *J Neurochem*, 2007, 100: 242-250.
- [3] Caricasole A, Copani A, Caraci F, et al. Induction of Dickkopf-1, a negative modulator of the Wnt pathway, is associated with neuronal degeneration in Alzheimer's brain. *J Neurosci*, 2004, 24: 6021-6027.
- [4] Scali C, Caraci F, Gianfriddo M, et al. Inhibition of Wnt signaling, modulation of Tau phosphorylation and induction of neuronal cell death by DKK1. *Neurobiol Dis*, 2006, 24: 254-265.
- [5] Chong ZZ, Maiese K. Targeting WNT, protein kinase B, and mitochondrial membrane integrity to foster cellular survival in the nervous system. *Histol Histopathol*, 2004, 19: 495-504.
- [6] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*, 1989, 20: 84-91.
- [7] 苏志强, 张丽. 亚低温对局灶性脑缺血再灌注大鼠细胞骨架蛋白 spectrin α II 及相关蛋白酶的影响. *中华物理医学与康复杂志*, 2007, 29: 240-243.
- [8] Cappuccio I, Calderone A, Busceti CL, et al. Induction of Dickkopf-1, a negative modulator of the Wnt pathway, is required for the development of ischemic neuronal death. *J Neurosci*, 2005, 25: 2647-2657.
- [9] Komati H, Naro F, Mebarek S, et al. Phospholipase D is involved in myogenic differentiation through remodeling of actin cytoskeleton. *Mol Biol Cell*, 2005, 16: 1232-1244.
- [10] Bejsovec A. Wnt pathway activation: new relations and locations. *Cell*, 2005, 120: 11-14.
- [11] Nusse R. Wnt signaling in disease and in development. *Cell Res*, 2005, 15: 28-32.
- [12] Bhat BM, Allen KM, Liu W, et al. Structure-based mutation analysis shows the importance of LRP5 beta-propeller 1 in modulating Dkk1-mediated inhibition of Wnt signaling. *Gene*, 2007, 391: 103-112.
- [13] Kawano Y, Kypta R. Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. *J Cell Sci*, 2003, 116: 2627-2634.
- [14] Li F, Chong ZZ, Maiese K. Vital elements of the Wnt-Frizzled signaling pathway in the nervous system. *Curr Neurovasc Res*, 2005, 2: 331-340.
- [15] Zhao H, Shimohata T, Wang JQ, et al. Akt contributes to neuroprotection by hypothermia against cerebral ischemia in rats. *J Neurosci*, 2005, 25: 9794-9806.
- [16] Kelly S, Cheng D, Steinberg GK, et al. Mild hypothermia decreases GSK3 β expression following global cerebral ischemia. *Neurocrit Care*, 2005, 2: 212-217.

(修回日期:2009-08-20)

(本文编辑:阮仕衡)

· 短篇论著 ·

推拿疗法配合运动训练对脑卒中偏瘫患者运动功能的影响

周亚 李加斌 徐洪

近年来,脑卒中患者的病死率大为降低,生存下来的患者大多存在不同程度的功能障碍,而运动功能障碍是脑卒中患者最常见的后遗症之一,严重影响患者的日常生活活动能力和生活质量,本研究旨在探讨推拿疗法对脑卒中患者运动功能的影响,现报道如下。

一、资料与方法

(一)研究对象

选取 2005 年 1 月至 2008 年 3 月间我院神经内科收治的脑卒中患者 120 例,入选标准:①临床诊断符合脑卒中的诊断标准^[1],并经头颅 CT 或 MRI 证实;②年龄为 35~80 岁。排除标准:①复发性脑卒中或短暂性脑缺血发作;②脑卒中病程 ≥ 3 个月;③合并心肌梗死、心绞痛发作、严重肺气肿等合并症;④合并老年性痴呆或严重认知功能障碍。

将 120 例患者随机分为对照组、推拿组及易化组,每组 40 例。对照组 40 例中,男 23 例,女 17 例;年龄为 (54.9 ± 11.0) 岁;病程为 (13.2 ± 10.0) d;脑梗死 31 例,脑出血 9 例;左侧偏瘫 18 例,右侧偏瘫 22 例。推拿组 40 例中,男 22 例,女 18 例;年龄为 (55.7 ± 10.0) 岁;病程为 (12.6 ± 9.0) d;脑梗死 30 例,脑出血 10 例;左侧偏瘫 19 例,右侧偏瘫 21 例。易化组 40 例中,男 24 例,女 16 例;年龄为 (56.6 ± 10.0) 岁;病程为 (13.5 ± 9.0) d;脑梗死 32 例,脑出血 8 例;左侧偏瘫 18 例,右侧偏瘫 22 例。治疗前各组间在性别、年龄、病变性质及病程等方面比较,差异均无统计学意义 ($P > 0.05$),具有可比性。

(二)治疗方法

3 组患者均接受神经内科常规药物治疗;推拿组患者在生命体征平稳 72 h 后即接受推拿疗法和运动训练;易化组患者在生命体征平稳 72 h 后即采用易化技术治疗和运动训练。

1. 推拿疗法:患者健侧卧于床上,医者施滚法于偏瘫侧肌肉丰厚处,施以拿揉法于肌肉浅薄部位,待患者完全放松后,先