

· 基础研究 ·

早期穴位电针治疗对局灶性脑缺血大鼠脑缺血皮质胰岛素样生长因子-1 表达的影响

肖娜 向珩 黄力平 周石 张健琦 徐纳新

【摘要】目的 观察健肢或患肢早期穴位电针治疗对局灶性脑缺血大鼠脑缺血皮质胰岛素样生长因子-1(IGF-1)mRNA 和蛋白的时序性变化,探讨穴位电针治疗脑卒中效果的可能相关机制。**方法** 采用线栓法建立局灶性脑缺血模型,将 54 只建模成功 SD 大鼠按随机数字表法分为健肢治疗组、患肢治疗组和对照组,每组 18 只,每组再按实验观察时间随机分为 7、14 和 21 d 三个时间点亚组,每个时间点 6 只大鼠。造模成功 24 h 后对治疗组给予浅麻醉行穴位电针治疗,每组各时间点结束 24 h 内分离脑缺血皮质,采用实时荧光定量反转录酶-聚合酶链锁反应(RT-PCR)和蛋白质印迹(Western blot)法测定 IGF-1 mRNA 表达和蛋白含量。**结果** ①脑缺血后,对照组大鼠脑缺血皮质 IGF-1 蛋白表达在缺血后第 7 天、第 14 天和第 21 天逐渐下降,各时间点亚组间比较,差异均有统计学意义($P < 0.01$);患肢治疗组蛋白表达趋势与对照组相同,且高于同时间点对照组($P < 0.01$);健肢治疗组在第 14 天的 IGF-1 蛋白含量显著高于同时间点患肢治疗组和对照组($P < 0.01$),而在第 21 天时低于同时间点患肢治疗组,但仍高于同时间点对照组($P < 0.01$)。②健肢治疗组脑缺血皮质 IGF-1 mRNA 表达在第 7 天、第 14 天和第 21 天逐渐降低,各时间点亚组间差异均有统计学意义($P < 0.01$);且健肢治疗组第 7 天的基因表达量显著高于同时间点患肢治疗组($P < 0.01$),健肢和患肢治疗组分别为同时间点对照组的 6.8 倍和 3.0 倍;健肢治疗组在第 14 天时的基因表达量低于同时间点患肢治疗组($P < 0.01$),健肢和患肢治疗组分别为同时间点对照组的 3.3 倍和 5.7 倍;健肢治疗组和患肢治疗组的第 21 天脑缺血皮质的 IGF-1 mRNA 表达均低于同时间点的对照组($P < 0.01$)。**结论** 早期穴位电针治疗能增加局灶性脑缺血大鼠缺血脑皮质 IGF-1 mRNA 表达及蛋白含量。健肢穴位电针干预能更早且更大程度地诱发 IGF-1 mRNA 表达增高及蛋白含量增高持续时间较长;脑卒中早期健肢穴位电针干预效果可能优于患肢。

【关键词】 电针; 脑卒中; 胰岛素样生长因子; 交叉迁移

Effects of electroacupuncture on IGF-1 in the ischemic cortex after cerebral ischemia Xiao Na^{*}, Xiang Heng, Huang Liping, Zhou Shi, Zhang Jianqi, Xu Naxing. ^{*}Department of Rehabilitation Medicine, The Second Hospital of Beijing, Beijing 100031, China

Corresponding author: Huang Liping, Email: 1330994263@qq.com

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of electroacupuncture (EA) on affected and healthy limbs and on the regulation of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) mRNA and proteins in the cerebral cortex early after focal ischemic. **Methods** A model of focal cerebral ischemia was established in 54 SD rats using the suture occlusion method. They were then randomly divided into an affected limb therapy group (ALTG, $n = 18$), an unaffected limb therapy group (UALTG, $n = 18$), and a control group (CG, $n = 18$). Each group had a 7-day subgroup, a 14-day subgroup and a 21-day subgroup with 6 rats in each. Rats in the experimental groups received EA beginning 24h after the occlusion. Rats in each subgroup were sacrificed in a random order on the 7th, 14th and 21st days and the ischemic cerebral cortices were quickly dissected. The specimens were frozen in liquid nitrogen before being analysed for IGF-1 mRNA expression by RT-PCR and for IGF-1 protein by Western blotting. **Results** ①After occlusion, IGF-1 protein levels in the ischemic cortices of the CG declined from the 7th through the 21st day. Rats in the ALTG had significantly higher levels compared with the CG at all time points. The UALTG had the highest values on the 14th day, but was lower than the ALTG and higher than the CG at the 21st day. ②IGF-1 mRNA levels in the ischemic cortices of the UALTG declined from the 7th through the 21st day. At day 7 the results of the UALTG were 6.8 times higher than the CG, and the ALTG was 3.0 times higher. At day 14 levels in the UALTG were significantly lower

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2014.01.005

基金项目:天津市高等学校科技发展基金计划项目(2006ZX02)

作者单位:300381 天津,天津体育学院,天津市运动生理学与运动医学重点实验室,天津市康复医学研究所(肖娜、向珩、黄力平、周石、张健琦);北京市第二医院康复医学科(肖娜);银川市中医医院(徐纳新)

通信作者:黄力平,Email: 1330994263@qq.com

than those in the ALTG. At that point the results of the UALTG rats were 3.3 times higher than those of the CG and the ALTG was 5.7 times higher. On day 21 levels in both the UALTG and ALTG were significantly lower than in the CG. **Conclusions** EA intervention at an early stage of focal cerebral ischemia can improve the expression of IGF-1 mRNA and protein levels in the ischemic cortex. Treating the unaffected limb can evoke more IGF-1 mRNA expression earlier and with relatively longer duration, and generate relatively longer protein increases. EA administered to the unaffected limb was more effective in the early stage of stroke.

[Key words] Electroacupuncture; Stroke; Insulin-like growth factor-1; Cross-migration

胰岛素样生长因子-1 (insulin-like growth factor, IGF-1) 是一种与促进机体生长、分化和存活相关的重要因子, 在调节神经生长、分化、再生、营养及抗凋亡方面也是一种关键性的生物活性物质。本课题组前期研究^[1]结果显示, 脑卒中后健侧肢体穴位电针治疗较患侧穴位电针治疗能够更好地促进局灶性脑缺血大鼠神经功能恢复, 本实验拟在此基础上通过对神经营养因子 IGF-1 mRNA 和蛋白含量时序性变化的研究, 继续深入探讨其可能的机制, 为早期穴位电针治疗提供理论依据。

材料与方法

一、实验动物及模型制备

实验选用健康雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 60 只, 8 周龄, 体重 275~320 g (中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心提供), 实验前先进行 1 周的适应性饲养, 建立大脑中动脉栓塞 (middle cerebral artery occlusion, MCAO) 模型。

MCAO 模型制备: 参照改良的 Longa 法制备 MCAO 模型, 先将 SD 大鼠称重后用 10% 水合氯醛 (0.3 ml/100 g 体重) 腹腔注射麻醉, 仰卧位固定于小动物手术台上, 剃去颈前正中线偏左侧鼠毛, 常规消毒, 铺巾, 巾洞口偏向左侧, 在颈前正中线中点左侧旁开 1 cm 处切开约 1.5 cm 小口, 依次剥离皮肤、筋膜、胸骨锁骨肌、颈前外侧肌, 分离颈动脉壳, 轻轻剥离颈总动脉, 在颈总动脉的近心端和远心端分别挂线, 结扎颈总动脉的远心端后再次挂线, 一根提拉血管, 一根轻栓动脉备用, 在结扎口附近剪一 T 字形小口, 提拉血管, 将鱼线和硅胶做成的线栓由小孔插进, 顺颈内动脉走行, 避开翼腭动脉, 穿过颈内动脉口入颅, 当感觉到阻力, 大约距颈内外动脉分叉处 17~22 cm, 结扎线栓, 用庆大霉素冲洗伤口后, 依次缝合伤口。待大鼠清醒后放干净清洁笼中约术后 1 h 行建模成功情况评分。手术完成后 1 h 采用 Longa 评分法评定^[2], 评分为 2~4 分则视为建模成功。

二、实验动物分组

将建模成功的 54 只大鼠按随机数字表法分为健肢治疗组、患肢治疗组和模型对照组, 每组 18 只, 每组再按实验观察时间点随机分为 7、14 和 21 d 三个时间

点亚组, 每个时间点 6 只大鼠。建模成功 24 h 后开始将 2 个治疗组大鼠浅麻醉后行穴位电针治疗。

三、治疗方法

治疗组大鼠给予浅麻醉 (10% 水合氯醛, 0.2 ml/100 g 体重) 后俯卧位固定于自制训练架上, 电针穴位及解剖部位参考华兴邦《大鼠穴位图谱的研制》, 选取曲池、外关、足三里、下巨虚四个穴位 (按中医理论, 偏枯者取手足阳明经穴为主), 治疗频率 10 Hz, 50 Hz/5 s, 疏密波, 以见到骨骼肌轻微收缩为宜, 每日治疗时间 15 min, 每周 7 次。

模型对照组大鼠同样方法进行浅麻醉固定, 但不给予穴位电针治疗。

四、组织处理

将各组大鼠在治疗结束后 24 h 腹腔注射 10% 水合氯醛 (0.3 ml/100 g 体重) 麻醉, 冰冻生理盐水经左心室灌注处死, 迅速开颅分离脑组织, 依据大鼠脑组织立体定位图谱^[3], 去除前囟 (bregma) 线前 2.7 mm, 耳间 (interaural) 线前 11.70 mm 和前囟线后 -8.30 mm, 耳间线前 0.70 mm 两个层面, 分离中间脑缺血皮质, 迅速置于液氮中过夜, 之后于 -80℃ 冰箱中保存用于基因和蛋白检测。

五、主要仪器和试剂

经皮神经电刺激仪 (北京); 渔线 D0.235 mm (日本); ChampGel 2000 型凝胶成像仪 (上海); 荧光分光度计 (美国 Beckman 公司); PE-9600PCR 扩增仪 (美国 Varian 公司); 7900HP 荧光定量 PCR 仪 (美国 PE-Cetus 公司); 引物; 反转录试剂盒 (美国 Fermentas 公司); 实时荧光定量试剂盒 (Sigma 公司); 低温高速离心机 (美国 Beckman 公司); IGF-1 一抗 (兔抗鼠多克隆抗体) (UPSTATE 公司); β-微管蛋白 (β-Tubulin) 一抗 (小鼠抗大鼠多克隆抗体) (Amresco 公司); 蛋白酶抑制剂 (Amresco 公司); 预染标记蛋白 (Ferment 公司)。

六、荧光定量试验

取冰冻缺血脑皮质样本 50 mg, 加入 1 ml Trizol (Invitrogen 公司) 匀浆, 抽提总 RNA。总 RNA 质量由紫外分光光度计 A260/280 比值和 0.8% 琼脂糖凝胶电泳确定。按照反转录试剂盒说明书进行反转录反应, 将反转录产物稀释 10 倍后冻置 -20℃ 保存备用; 实时荧光定量反转录酶-聚合酶链反应 (reverse tran-

scription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 按照荧光定量试剂盒说明书操作, 应用 PE 公司的 7900HP 荧光定量 PCR 仪进行。引物序列为: IGF-1 上游 CAT TCG GAG GGC ACC ACA GA, 下游 CAC TTG ATG CCC AAG ACT CAG(154 bp); 内参基因: 18S rRNA 上游 TGA GGT TTC CCG TGT TGA G, 下游 GAC CAT AAA CGA TGC CGA CT(190 bp)。扩增条件: 预变性 95 °C 2 min; 变性 95 °C 5 s, 退火 54.0 ~ 55.5 °C(根据不同引物的退火温度)20 s, 共 40 个循环。溶解曲线温度为 55 ~ 95 °C(每 10 s 升高 0.5 °C), 扩增完毕进行溶解曲线分析, 并读取各管中 CT 值。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法^[4] 进行数据分析: ΔCt 值由目标基因的 Ct 值减去 18 s 的 Ct 值得到, 每组目标基因的 ΔCt 都与对照组的平均 ΔCt 相减得到 $\Delta\Delta Ct$, 然后用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 来表示其相对表达量。

七、Western Blot 法测定 IGF-1 蛋白

将 50 mg 冰冻脑皮质样本液氮研磨, 待完全研碎后, 按组织净重: 裂解液为 1:6 的比例加入相应体积的裂解液, 4 °C, 15 000 r/min(离心半径 8 cm) 离心 20 min, 去上清液。在紫外分光光度计下用考马斯亮蓝测定总蛋白浓度, 分装, -80 °C 下保存备用。根据蛋白质丰度, 选择合适的上样量。蛋白样品在上样前(以体积比为 4:1)加入 2 × 十二烷基磺酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS) 上样缓冲液, 95 ~ 100 °C 处理 5 min, 冰浴冷却。配制 15% 分离胶, 5% 基层胶, 按照预定顺序使用微量加样器将蛋白样品缓慢加入样品孔, 并于凝胶一侧加入预染标记蛋白。电泳参数: 积层胶 80 V, 30 min, 分离胶 120 V, 1.5 h。电泳完毕后, 采用湿法将蛋白质转印至聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜上, 恒流电 300 mA, 1 h 40 min。根据 PVDF 膜上预染标记蛋白转移情况, 判断蛋白转移位置。将转移上样品蛋白的 PVDF 膜放入封闭液中, 室温振荡 1 h。用磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)洗涤 PVDF 膜, 5 min, 3 次, 将膜放入微型培养皿中, 加入一抗(抗体稀释液按照 1:1000 稀释), 以 0.1 ml/cm² 的量加入稀释的一抗, 置于恒温振荡器上 4 °C 过夜。用 PBS 洗涤 PVDF 膜, 5 min, 3 次, 将膜放入微型培养皿中, 用抗体稀释液按照 1:15 000 稀释二抗, 以 0.1 ml/cm² 的量加入稀释的二抗, 室温温育 1 h。将化学发光反应液按照 1:1 比例混合, 以 0.02 ml/cm² 均匀涂于 PVDF 膜的蛋白面上, 在暗室用 X 线片曝光, 显影、定影后观察结果。使用凝胶定量分析软件对目的蛋白进行光密度分析, 以 β-微管蛋白为内参蛋白。按公式计算目的蛋白相对含量:

$$\text{目的蛋白相对含量} = \frac{\text{目的蛋白灰度值}}{\beta\text{-微管蛋白灰度值}}$$

八、统计学处理

所有实验数据使用 SPSS 13.0 版统计软件进行统

计学处理, 计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 组间差异用重复方差分析检验, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

结 果

一、穴位电针治疗对脑缺血皮质 IGF-1 蛋白表达的影响

脑缺血后第 7 天、第 14 天和第 21 天, 对照组各时间点大鼠脑皮质 IGF-1 蛋白表达逐渐下降, 各时间点亚组间比较, 差异均有统计学意义($P < 0.01$)。患肢治疗组蛋白表达趋势与对照组相同, 且高于同时间点对照组, 差异均有统计学意义($P < 0.01$)。健肢治疗组大鼠缺血脑皮质 IGF-1 蛋白含量第 7 天与同时间点的对照组相比, 差异无统计学意义($P > 0.05$), 但在第 14 天显著高于同时间点的患肢治疗组和对照组, 差异有统计学意义($P < 0.01$), 在第 21 天低于同时间点的患肢治疗组, 差异亦有统计学意义($P < 0.01$), 但仍高于同时间点的对照组($P < 0.01$)。详见表 1 和图 1。

表 1 各组大鼠不同时间点脑缺血皮质 IGF-1 蛋白相对含量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	第 7 天	第 14 天	第 21 天
健肢治疗组	18	0.45 ± 0.07	1.34 ± 0.12^{abc}	0.19 ± 0.02^{abcd}
患肢治疗组	18	1.33 ± 0.14^a	1.07 ± 0.24^{ac}	0.72 ± 0.16^{acd}
对照组	18	0.49 ± 0.02	0.11 ± 0.01^c	0.00 ± 0.00^{cd}

注: 与对照组同时间点比较,^a $P < 0.01$; 与患肢治疗组同时间点比较,^b $P < 0.01$; 与组内治疗第 7 天比较,^c $P < 0.01$; 与组内治疗第 14 天比较,^d $P < 0.01$

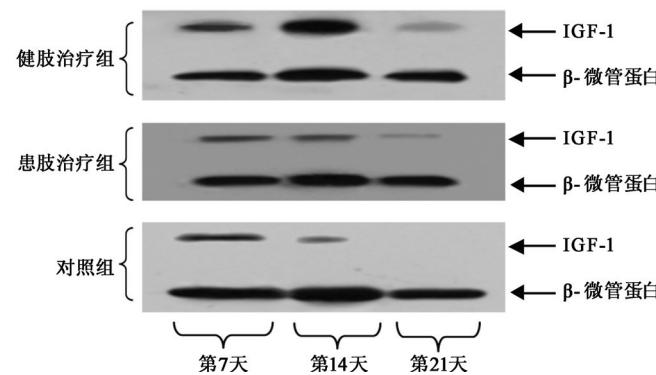


图 1 各组大鼠不同时间点缺血脑皮质 IGF-1 蛋白和 β-微管蛋白的表达

二、穴位电针治疗对脑缺血皮质 IGF-1 mRNA 表达的影响

健肢治疗组脑缺血皮质 IGF-1 mRNA 表达在脑缺血后第 7 天、第 14 天和第 21 天逐渐降低, 各时间点亚组间比较, 差异均有统计学意义($P < 0.01$)。健肢治疗组脑缺血第 7 天大鼠脑缺血皮质 IGF-1 mRNA 表达显著高于同时间点患肢治疗组($P < 0.01$), 第 14 天低于同时间点患肢治疗组($P < 0.01$), 第 21 天健肢治疗

组和患肢治疗组的 IGF-1 mRNA 表达均低于同时间点对照组,且差异有统计学意义($P < 0.01$)。详见表 2。

表 2 各组大鼠不同时间点脑缺血皮质 IGF-1 mRNA 的表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	第 7 天	第 14 天	第 21 天
健肢治疗组	18	6.81 ± 0.78^{ab}	3.25 ± 0.80^{abc}	0.09 ± 0.02^{abcd}
患肢治疗组	18	2.96 ± 0.44^a	5.67 ± 0.10^{ac}	0.01 ± 0.00^{acd}
对照组	18	1.00 ± 0.05	1.02 ± 0.19	1.01 ± 0.17

注:与对照组同时间点比较,^a $P < 0.01$;与患肢治疗组同时间点比较,^b $P < 0.01$;与组内治疗第 7 天比较,^c $P < 0.01$;与组内治疗第 14 天比较,^d $P < 0.01$

讨 论

众所周知,脑缺血发生后,神经元会出现一系列损伤性改变,与此同时脑损伤作为一种刺激也诱导抗损伤因子的表达从而启动相应的修复机制^[5],在机体中存在的大量抗损伤修复因子中,胰岛素样生长因子是非常重要的一类。研究发现,IGF-1 及其受体在中枢神经系统的不同区域有合成,在缺血缺氧性脑损伤等多种病理状态下发挥重要的保护作用^[6-8]。血清中高水平的 IGF-1 还可以抑制卒中后肌肉萎缩的发生^[9],更好地促进神经及功能恢复^[10-11]。

本课题前期研究发现^[1],穴位电针治疗组大鼠在运动、感觉、平衡和反射等多方面综合功能评定中的恢复优于自然恢复的对照组,而健肢治疗组的恢复时间更早,且与患肢治疗相比,能更大程度减少脑梗死体积。提示穴位电针治疗的早期介入在脑缺血抗损伤保护中起了重要的作用,健肢穴位电针治疗也是一种有效的康复方式。本实验蛋白印迹法结果显示,IGF-1 蛋白表达在对照组脑缺血皮质表现为第 7 天、第 14 天和第 21 天呈逐渐降低的趋势,提示损伤早期,缺血诱导了自然恢复(对照组)脑缺血皮质的抗损伤及功能重塑的发生^[12],作为一种保护性细胞因子 IGF-1 在脑组织含量迅速升高。但随着恢复时间的延长,IGF-1 含量逐渐下降表明内源性的耗竭^[13],提示早期自然恢复的脑缺血皮质对抗损伤存在时间局限性。患肢治疗组表达趋势与对照组相同,但各时间点有更高水平的上调,健肢穴位电针治疗对脑缺血皮质 IGF-1 蛋白含量的上调作用,在第 14 天时间点达到最高,到第 21 天仍处于较高水平。因此可以认为,缺血性脑损伤后穴位电针治疗对神经功能恢复的促进作用与 IGF-1 蛋白的上调有关。患肢治疗组 IGF-1 蛋白表达在各时间点的上调可能不仅与增强外周肌肉生长修复有关^[14],还与通过交叉上行引起对侧脑缺血皮质躯体感觉区、辅助运动区等的兴奋^[15-16]而迅速增强脑组织自身抗损伤保护机制^[17]的发生有关。运动生理学研究发现,单

侧肢体的运动训练增加对侧肢体的肌肉力量,即交叉迁移现象。这种迁移不仅发生力量的增加,技术技能的学习上也出现增强,而且只出现对侧同源肌肉的增长,与肢体优势、性别、年龄都无关。Zhou 等^[18]对单侧肢体的电针刺激训练和抗阻训练进行比较发现,2 种方式都能使对侧肢体力量增加,其机制尚不清楚。本课题组还观察发现早期健肢穴位电针治疗对肢体功能有优于患肢治疗更早的恢复,考虑可能与其通过本体感觉传入作用于更广泛的大脑皮质,诱导对 IGF-1 蛋白超过患肢治疗组高水平上调有关,从而促使早期脑缺血皮质脑血流量增加、细胞凋亡发生减少,血管重建,神经修复等功能重塑的发挥更大化,即启动了交叉迁移机制的发生。

基因的表达往往需要一系列多水平信号传导才能出现,本研究通过 RT-PCR 对脑缺血皮质 IGF-1 mRNA 研究发现,与对照组相比,患肢穴位电针治疗能迅速增加脑缺血皮质 IGF-1 mRNA 表达水平,并随治疗时间的延长在第 14 天时达到高峰,而健肢穴位电针治疗更迅速地诱导 IGF-1 mRNA 高水平的表达,考虑基因的早期表达可能为蛋白持续高水平上调并发挥其抗损伤作用奠定基础,更有利与肢体功能的恢复^[11]。但本实验两治疗组 IGF-1 mRNA 表达水平第 21 天时均较对照组减低,考虑主要原因为:①随着时间的延长,脑组织损伤修复趋于稳定,穴位电针治疗的效果趋于缓慢;②治疗过程中,脑组织的功能支配及内环境发生了变化,穴位电针治疗对脑缺血后的抗损伤保护作用随肢体功能的恢复存在不同的机制。本实验的不足之处在于对穴位电针治疗早期介入的机制研究只涉及一类保护性因子,不排除其它与功能重组相关机制的研究^[19-20]。

总之,在损伤早期,穴位电针治疗能增加 MCAO 模型大鼠脑缺血皮质 IGF-1 mRNA 表达及蛋白含量。健肢穴位电针干预能更早更大程度地诱发 IGF-1 mRNA 表达增高及蛋白含量增高持续时间较长,由此推断脑卒中在早期健肢穴位电针干预效果可能优于患肢。但穴位电针治疗的机制研究尚需进一步的深入研究。

参 考 文 献

- [1] 黄力平,向玲,肖娜,等.早期电针刺激局灶性脑缺血大鼠健侧肢体的康复效果[J].中国康复医学杂志,2012,27(9):808-812.
- [2] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20(1):84-91.
- [3] George P, Charles W. The rat brainin stereotaxic coordinates[M]. 3rd ed. San Diego: Academic Press, 1997:9-51.
- [4] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data u-

