

张游, 靳子言, 尹亚龙, 等. 电针足三里、内关穴对大鼠缺血性损伤后神经可塑性相关因子 GAP-43 和 SYN 的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(6): 16-23.

Zhang Y, Jin ZY, Yin YL, et al. Effects of electroacupuncture at Zusanli and Neiguan points on neuroplasticity-related factors GAP-43 and SYN after ischemic injury in rats [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(6): 16-23.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.06.003

电针足三里、内关穴对大鼠缺血性损伤后神经可塑性相关因子 GAP-43 和 SYN 的影响

张游, 靳子言, 尹亚龙, 王嘉仪, 吴新贵*

(广西医科大学第一附属医院中医科, 南宁 530021)

【摘要】 目的 探讨电针 (electroacupuncture, EA) 治疗足三里、内关穴对脑缺血大鼠神经可塑性因子 GAP-43、SYN 和 MAP-2 的影响。方法 将 80 只大鼠按随机数字表法分为假手术组 (Sham) 组、EA 3 d 组、大脑中动脉阻塞 (middle cerebral artery occlusion, MCAO) 3 d 组、EA 14 d 组、MCAO 14 d 组, 每组 16 只。除 Sham 组外, 其余组采用 Longa 线栓法构建 MCAO 大鼠模型, EA 组术后每日治疗“足三里”和“内关”穴 20 min。平衡木试验评估大鼠运动功能, Western blot 法检测梗死对侧大脑皮层中神经可塑性因子 GAP-43、SYN 蛋白的表达, 实时荧光定量 PCR 法检测 GAP-43、SYN mRNA 的表达, 免疫荧光法检测 GAP-43/MAP-2、SYN/MAP-2 的共定位表达。结果 与 Sham 组相比, MCAO 组在各时间点平衡木试验评分显著升高 ($P < 0.05$), MCAO 3 d 组 ($P < 0.05$) 和 14 d 组 ($P < 0.05$) 的 GAP-43、SYN mRNA 表达均显著降低, MCAO 14 d 组 ($P < 0.05$) 的 SYN/MAP-2 共定位平均光密度表达显著减少, GAP-43 和 SYN 蛋白表达在 MCAO 3 d 组和 14 d 组均未见明显差异; 与 MCAO 组相比, EA 组在 1 d、3 d、7 d 时平衡木试验评分未见明显差异, 14 d 时平衡木试验评分显著降低 ($P < 0.05$), 与 MCAO 3 d 组相比, EA 3 d 组 GAP-43、SYN mRNA 的表达均显著升高 ($P < 0.05$), 与 MCAO 14 d 组相比, EA 14 d 组的 GAP-43、SYN mRNA 表达均显著增加 ($P < 0.05$), 以及 GAP-43 和 SYN 蛋白表达均显著增加 ($P < 0.05$), GAP-43/MAP-2、SYN/MAP-2 的共定位平均光密度均显著增加 ($P < 0.05$)。结论 EA 刺激“足三里”和“内关”穴可改善缺血性损伤后运动功能, 其机制可能与促进神经可塑性因子的表达来诱导轴突萌发, 进而激活损伤后的神经可塑性有关。

【关键词】 缺血性卒中; 电针; 神经可塑性; 运动功能

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 06-0016-08

Effects of electroacupuncture at Zusanli and Neiguan points on neuroplasticity-related factors GAP-43 and SYN after ischemic injury in rats

ZHANG You, JIN Ziyan, YIN Yalong, WANG Jiayi, WU Xingui*

(Department of Traditional Chinese Medicine, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of electroacupuncture (EA) at Zusanli and Neiguan points on neuroplasticity factors GAP-43, SYN and MAP-2 in cerebral ischemic rats. **Methods** Eighty rats were divided into Sham, EA 3 d, middle cerebral artery occlusion (MCAO) 3 d, EA 14 d, and MCAO 14 d groups by a random number table with 16

【基金项目】 国家自然科学基金 (81760885); 广西自然科学基金 (2017GXNSFDA198011)。

【作者简介】 张游 (1995—), 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 脑血管病的针灸治疗与研究。E-mail: 843757818@qq.com

【通信作者】 吴新贵 (1965—), 男, 主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向: 脑血管病的针灸治疗与研究。E-mail: wxingui200061@aliyun.com

rats per group. Except for the Sham group, a permanent MCAO rat model was established using the Longa thread embolization method. The EA group was treated at Neiguan and Zusanli points for 20 min daily after surgery. The motor function of rats was assessed by the balance beam test, and protein expression of neuroplasticity factors GAP-43 and SYN in the cerebral cortex contralateral to the infarct was assessed by Western blot. mRNA expression of GAP-43 and SYN was assessed by Real-time quantitative PCR, and colocalized expression of GAP-43/MAP-2 and SYN/MAP-2 was determined by immunofluorescence. **Results** Compared with the Sham group, the MCAO group had significantly higher balance beam test scores at each time point ($P < 0.05$), GAP-43 and SYN mRNA expression was significantly lower in MCAO 3 d ($P < 0.05$) and 14 d ($P < 0.05$) groups, a significantly reduced SYN/MAP-2 colocalized mean optical density was found in the MCAO 14 d group ($P < 0.05$), and GAP-43 and SYN protein expression was not significantly different in MCAO 3 d and 14 d groups. Compared with the MCAO group, no significant differences were seen in balance beam test scores at 1, 3, and 7 days in the EA group, and the balance beam test scores were significantly lower at 14 days ($P < 0.05$). Compared with the MCAO 3 d group, GAP-43 and SYN mRNA expression was significantly increased in the EA 3 d group ($P < 0.05$). Compared with the MCAO 14 d group, GAP-43 and SYN mRNA expression was significantly increased ($P < 0.05$) GAP-43 and SYN protein expression was significantly increased in the EA 14 d group ($P < 0.05$), and the colocalized mean optical density of GAP-43/MAP-2 and SYN/MAP-2 were significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusions** EA stimulation of Zusanli and Neiguan points improves motor functions after ischemic injury, and the mechanism may be related to promoting expression of neuroplasticity factors to induce axon sprouting and activating neuroplasticity after injury.

【Keywords】 ischemic stroke; electroacupuncture; neuroplasticity; motion function

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

从全球范围来看,脑卒中是造成死亡和残疾的主要原因,每年都需要花费大量的医疗费用用于护理与治疗^[1]。缺血性卒中是最常见的脑卒中类型,占脑卒中的 87%,出血性卒中仅占 13%^[2]。在缺血性卒中时,可以观察到多种病理生理变化,包括脑水肿、神经元丢失和神经可塑性改变等^[3]。神经可塑性在改善神经功能障碍中起着重要作用,已成为缺血性脑卒中治疗的重要靶点^[4]。神经可塑性是指在未受损神经元和变性神经元之间,通过功能重组和重建新的神经连接来补偿损伤,包括关键生长因子的表达、突触和树突的生长、轴突重塑和血管新生^[5]。生长相关蛋白 43 (GAP-43) 和突触素 (SYN) 是两类典型的神经可塑性蛋白^[6]。GAP-43 是脊椎动物轴突生长与再生的经典分子标记,上调后可以促进神经元的生长、发育、神经再生和突触重建^[7]。SYN 可作为突触发生的可靠指标,其表达水平可以反映突触的密度^[8]。此外,微管相关蛋白 2 (MAP-2) 与缺血性脑损伤有密切关系,可作为损伤后剩余神经元中轴突和树突代偿性重建的指标^[9]。电针 (electroacupuncture, EA) 是我国中医学的重要组成部分之一,其治疗缺血性卒中有一定的积极作用,可改善神经功能障碍^[10],但其作用机制尚不明确。本研究旨在探讨 EA 对脑缺血大鼠神经可塑性因子 GAP-43、SYN 和 MAP-2 的影响,以期对缺血性卒中的治疗提供参考。

1 材料和方法

1.1 实验动物

挑选 SPF 级健康雄性 SD 大鼠 80 只,8~9 周龄,平均体重 (280±50)g,购自广西医科大学实验动物中心 [SCXK(桂)2020-0002],均饲养于广西医科大学动物实验中心动物房 [SYXK(桂)2020-0003],规律饮水、摄食,环境温度 (24±4)℃,平均相对湿度 55%,明暗交替 12 h/12 h。实验方案得到广西医科大学动物伦理委员会的许可 (202103020),并按 3R 原则给予人道的关怀。

1.2 主要试剂与仪器

兔抗 GAP-43 抗体、小鼠抗 SYN 抗体 (Sigma 公司,批号:3510861、128097);抗 MAP-2 抗体 (武汉塞维尔生物科技有限公司,批号,39317041205);山羊抗兔二抗、山羊抗小鼠二抗 (Elabscience 公司,批号:N2IJ8QLTCV、FZSPC3WQFI);GAP-43、SYN 和 β -actin 引物 (武汉塞维尔生物科技有限公司);Alexa Fluor 594 偶联驴抗兔抗体、Alexa Fluor 488 偶联山羊抗兔抗体、Alexa Fluor 488 偶联山羊抗小鼠抗体 (invitrogen 公司,批号:2313074、2284595、2379467);Alexa Fluor 594 偶联山羊抗小鼠抗体 (武汉塞维尔生物科技有限公司,批号:157633)。针灸针 (苏州市华佗医疗用品有限公司,规格:0.25 mm×1.3 mm、0.25 mm×2.5 mm);电子针疗仪 (中国苏州医疗用

品厂有限公司,型号:SDZ-II);垂直电泳系统(bio-rad 公司,货号:1645052);荧光定量 PCR 仪(bio-rad 公司,型号:CFX);荧光显微镜(日本 Olympus 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 实验分组

将 80 只大鼠按随机数字表法分为假手术(Sham)组、电针(EA)3 d 组、大脑中动脉阻塞(MCAO)3 d 组、EA 14 d 组、MCAO 14 d 组,每组 16 只。整个实验分组如图 1 所示。

1.3.2 造模方法

根据之前的研究,通过改良 Longa 线栓法诱导^[11]建立大鼠 MCAO 模型。每只大鼠在手术前禁食不禁水 12 h,随后麻醉方式选用腹腔注射氯胺酮(60 mg/kg)和甲苯噻嗪(8 mg/kg);使用线栓阻塞右侧大脑中动脉(MCA),固定线栓后逐层缝合切口。术后使用电烤灯照射大鼠,维持体温在 35~37℃之间。对于 Sham 组,仅切开颈前皮肤,随后缝合切口。在大鼠手术苏醒后 24 h 内,参考改进 Bederson 4 分 5 级法^[12]:0 分,无神经功能缺损症状;1 分,左侧肢体疼痛刺激后收缩现象消失,轻度神经功能缺损;2 分,向左倾倒或转圈,中度神经功能缺损;3 分,向病灶对侧跌倒,提尾时左上肢屈曲抱胸,不能向前伸直,重度神经功能缺损;4 分,不能自行行走、意识水平下降。选择 Bederson 评分为 1~3 分的大鼠入组,剔除评分为 0 分、4 分的 SD 大鼠。

1.3.3 干预方法

在 MCAO 术后 24 h 行 EA 治疗,使用异氟烷气

体麻醉大鼠,随后将大鼠固定于鼠架上,使用电子针疗仪刺激大鼠双侧肢体的足三里(ST36)和内关(PC6)穴,电流强度为 1~2 mA,疏密波频率为 2/10 Hz,每天 20 min。Sham 组、MCAO 组的大鼠仅被麻醉后固定,不进行 EA 治疗。

1.3.4 样本采集

MCAO 组和 EA 组分别在 3 d 和 14 d 处死大鼠,Sham 组在 14 d 时处死取材。使用 1%戊巴比妥钠(0.35 mL/100 g)过量麻醉处死大鼠,随后按随机数字表法抽取大鼠:11 只大鼠用 0.01 mol/L PBS 从心尖处灌注,见右心房流出清亮液体后,立即开颅取梗死对侧大脑皮层,并置于-80℃冰箱保存,6 只用于 Western blot 检测,5 只用于实时荧光定量 PCR 检测;5 只大鼠用 0.01 mol/L PBS 行心脏灌注,见流出液体未见明显血液,随后用 4%多聚甲醛灌注 400 mL,迅速断头后取梗死对侧大脑皮层,浸泡于 4%多聚甲醛中 12 h 以上,蔗糖梯度脱水后常规 OCT 包埋,每片切片厚度为 10 μm,置于 4%冰箱中保存,用于免疫荧光法检测。

1.3.5 观察指标及检测方法

(1)平衡木试验

平衡木测试,也称为行走测试,大鼠被训练在一根长 1750 mm、宽 19 mm 的木质横梁上行走,横梁高出地面 1 m,用于评估精细运动的协调。在 MCAO 诱导后,根据以下评分系统^[13]评估木梁行走的表现:0 分,稳定平衡姿势并通过横梁;1 分,紧抓平衡木边缘后通过横梁;2 分,紧抱平衡木,一肢体从平衡木垂落,随后通过横梁;3 分,紧抱平衡木,二肢体从平衡木垂落或在平衡木上旋转(>60 s);

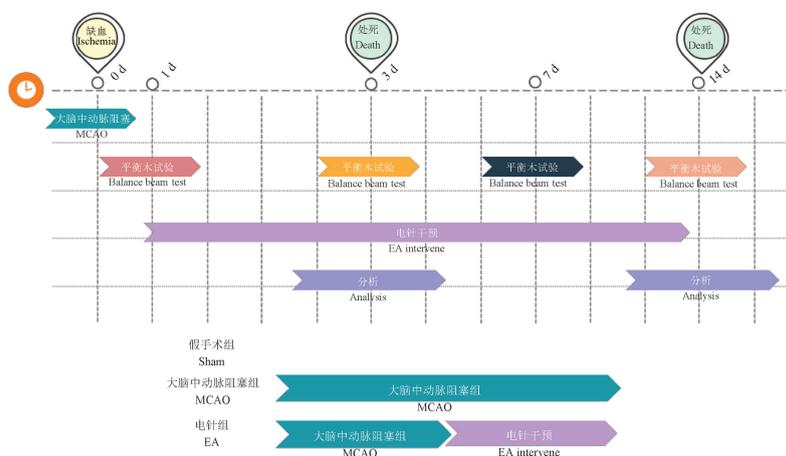


图 1 实验分组和干预方案

Figure 1 Experimental grouping and intervention protocol

4 分,试图在平衡木上平衡但跌落(>40 s);5 分,试图在平衡木上平衡但跌落(>20 s);6 分,跌落,未尝试在平衡木上平衡(<20 s)。每只老鼠的行为在每个时间点被评估,并记录得分。

(2) Western blot 法

蛋白质印迹检测突触可塑性相关蛋白。从 -80℃ 冰箱取出脑组织样本,将脑组织切成合适大小后与蛋白裂解液混匀,并研磨成匀浆状,随后放置于 4℃ 低温离心机中 12 000 r/min, 30 min, 收集蛋白上清液;各组的蛋白浓度使用 BCA 法进行检测,然后将等量的蛋白质上样至 10% 凝胶中进行电泳、转膜,5% BSA 溶液中室温封闭 1 h, 4℃ 冰箱中孵育一抗过夜(12~14 h),一抗为 GAP-43(1:500), SYN(1:500), GADPH(1:1000), β -actin(1:1000), 隔日取出条带浸泡于 TBST 中漂洗 3 次,加入相对应的二抗:山羊抗兔(1:2000)、山羊抗小鼠(1:5000)二抗,在 37℃ 下孵育 1 h,使用化学发光法检测条带,通过 Image J 软件分析蛋白条带的灰度值,GAP-43 蛋白以 GADPH 为内参,SYN 以 β -actin 为内参,计算相对表达量。

(3) 实时荧光定量 PCR

取出 1.3.4 中脑组织,按试剂盒说明书步骤提取总 RNA,随后使用分光光度计测定浓度,将各组 RNA 使用试剂盒反转录为 cDNA,随后设置 PCR 扩增程序。热循环条件为:95℃ 预变性 30 s;95℃ 15 s, 60℃ 30 s 循环 40 次。根据以上测得 Ct 值后,再以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算每组样品中 mRNA 相对表达量。引物序列详见表 1。

(4) 免疫荧光法

从 4% 冰箱中取出切片,将切片在 85℃ 柠檬酸盐缓冲液(0.01 mol/L, pH=6.0)中预热 5 min,以进行抗原修复。然后用 5% 的牛血清白蛋白(BSA)在室温下封闭 1 h。将切片与一抗在 4℃ 下孵育过夜:兔抗 GAP-43 和小鼠抗 MAP-2 的混合物(1:400);以及小鼠抗 SYN 和兔抗 MAP-2 的混合物(1:400)。第二天取出切片,用 TBST 洗 3 次,每次 5 min。然

后与相对应的二抗在室温下孵育 1 h; Alexa Fluor 594 结合的驴抗兔 IgG(1:500)和 Alexa Fluor 488 结合的山羊抗兔 IgG(1:500)的混合物;以及 Alexa Fluor 594 结合的驴抗小鼠 IgG(1:500)和 Alexa Fluor 488 结合的山羊抗小鼠 IgG(1:500)的混合物。阴性对照用 0.01M PBS 孵化以替代一抗。然后用 40,6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)在室温下孵育 15 min,封片后使用荧光显微镜检测共定位平均光密度,每张切片采集三个视野,并取平均值。

1.4 统计学方法

所有数据均采用 SPSS 23.0 软件进行处理,计量数据用平均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。多组间的差异比较通过单因素方差分析(ANOVA)进行,然后组间多重比较采用 LSD-*t* 法检验,若不满足正态分布,采用 Tamhane 的多重比较检验。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠平衡木试验评分的比较

与 Sham 组相比,MCAO 术后各时间点平衡木试验评分均显著升高($P<0.05$),MCAO 模型制备成功;MCAO 组和 EA 组在术后 1 d、3 d 和 7 d 时平衡木试验评分差异无统计学意义,但术后 14 d 时,EA 组平衡木试验评分较 MCAO 组显著降低($P<0.05$),见图 2A、2B。

2.2 神经可塑性相关蛋白 GAP-43 和 SYN 的表达

如图 3A、3C 所示,与 MCAO 14 d 组相比,EA 14 d 组的 GAP-43 蛋白表达水平显著增加($P<0.05$),其余各组未见明显差异。如图 3B、3D 所示,EA 14 d 组的 SYN 蛋白表达水平显著高于 MCAO 14 d 组($P<0.05$),其余各组未见明显差异。

2.3 GAP-43 和 SYN mRNA 的表达

如图 4A 所示,与 Sham 组相比,MCAO 3 d 组($P<0.05$)和 MCAO 14 d 组($P<0.05$)的 GAP-43 蛋白表达均显著降低;EA 组的 GAP-43 蛋白表达在 3 d ($P<0.05$)和 14 d ($P<0.001$)时均显著高于 MCAO 组。如图 4B 所示,与 Sham 组相比,MCAO 3 d 组($P<0.001$)和 14 d 组($P<0.001$)的 SYN 蛋白表达均显著降低,与 MCAO 组相比,EA 3 d 组的 SYN 蛋白表达显著高于 MCAO 3 d 组($P<0.01$),EA 14 d 组的 SYN 蛋白表达显著高于 MCAO 14 d 组($P<0.001$)。

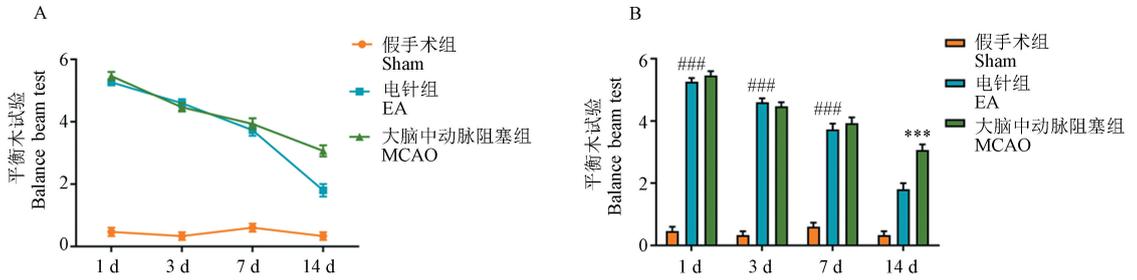
2.4 GAP-43 和 SYN 蛋白与轴突发芽的关系

如图 5 所示,EA 14 d 组的 GAP-43/MAP-2 共定

表 1 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences for PCR

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence
GAP-43	F:ATGCTGTGCTGTATGAGAAGAACC R:CATCAGCAACGGGAGCATC
SYN	F:GGATGGGCAAGGTCAAGGTA R:TCTGGACACGCACATCGTATTT
β -actin	F:TGCTATGTTGCCCTAGACTTCG R:GTTGGCATAGAGTCTTTACGG

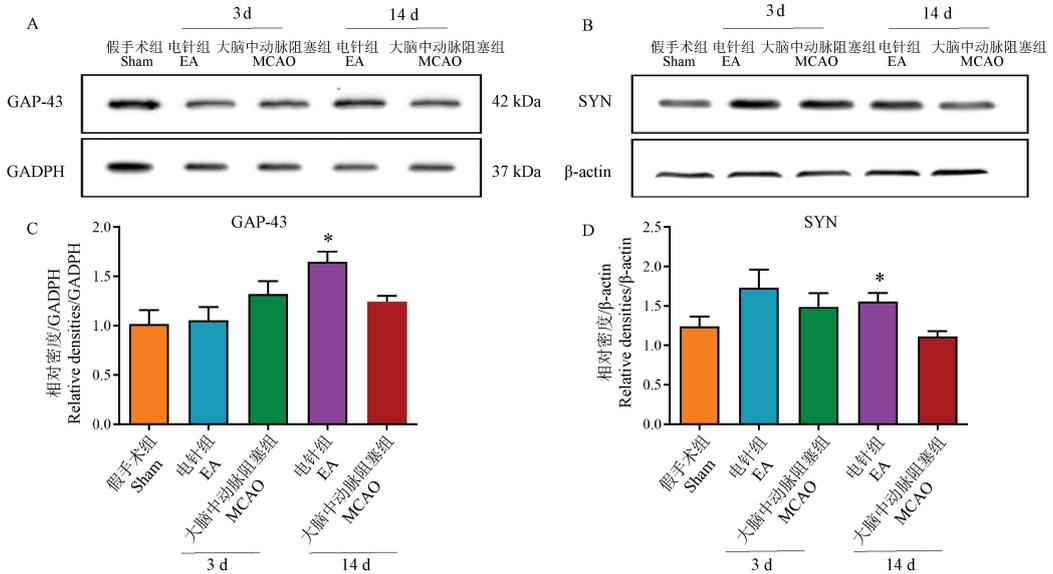


注:与 Sham 组比较,### $P<0.001$;与 MCAO 组比较,*** $P<0.001$ 。

图 2 脑缺血损伤后各组不同时间点平衡木试验评分比较($\bar{x}\pm s, n=16$)

Note. Compared with Sham group,### $P<0.001$. Compared with MCAO group,*** $P<0.001$.

Figure 2 Comparison of balance beam test scores between groups at different time points after cerebral ischemic injury

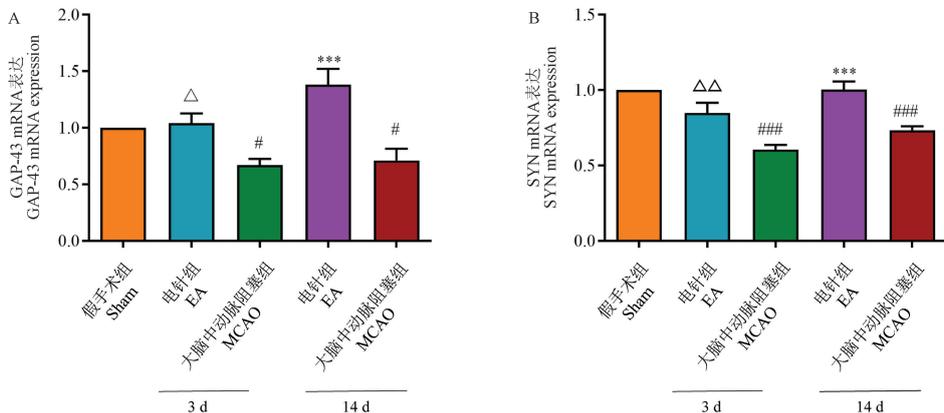


注:与 MCAO 14 d 组比较,* $P<0.05$ 。

图 3 各组大鼠梗死对侧皮层神经可塑性蛋白表达比较($\bar{x}\pm s, n=6$)

Note. Compared with MCAO 14 d group,* $P<0.05$.

Figure 3 Comparison of neuroplasticity-related protein expression in the contralateral cortical layers of infarcts in various groups of rats

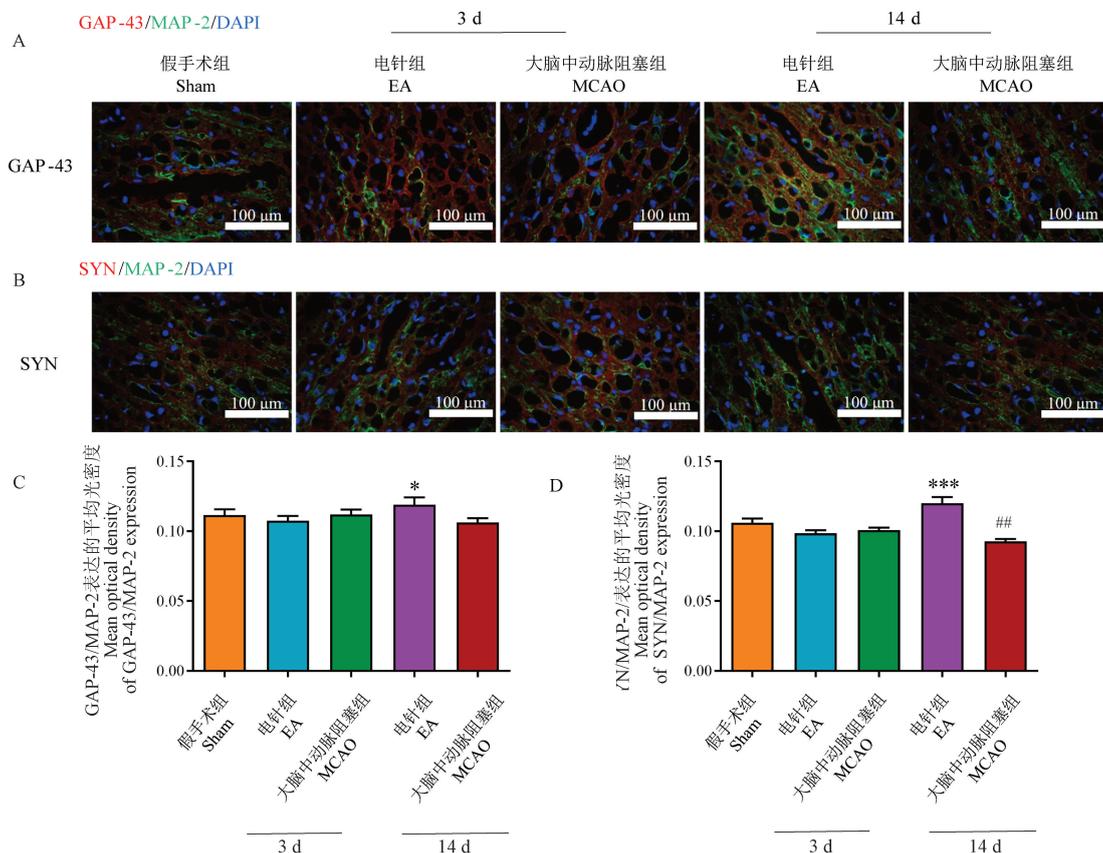


注:与 Sham 组比较,# $P<0.05$,### $P<0.001$;与 MCAO 3 d 组比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$;与 MCAO 14 d 组比较,*** $P<0.001$ 。

图 4 各组大鼠 GAP-43 和 SYN mRNA 表达比较($\bar{x}\pm s, n=5$)

Note. Compared with Sham group,# $P<0.05$,### $P<0.001$. Compared with MCAO 3 d group, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$. Compared with MCAO 14 d group,*** $P<0.001$.

Figure 4 Comparison of GAP-43 and SYN mRNA expression in various groups of rats



注:与 Sham 组比较, ## $P < 0.01$;与 MCAO 14 d 组比较, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ 。

图 5 各组大鼠 GAP-43/MAP-2 和 SYN/MAP-2 共定位平均光密度比较($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Note. Compared with Sham group, ## $P < 0.01$. Compared with MCAO 14 d group, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$.

Figure 5 Comparison of mean optical density of GAP-43/MAP-2 and SYN/MAP-2 co-localization in various groups of rats

位平均光密度显著高于 MCAO 14 d 组 ($P < 0.05$)。与 Sham 组相比, MCAO 14 d 组的 SYN/MAP 共定位平均光密度显著降低 ($P < 0.01$), 而 EA 干预逆转了这种变化, EA 14 d 组的 SYN/MAP 共定位平均光密度显著高于 MCAO 14 d 组 ($P < 0.001$)。

3 讨论

缺血性卒中开始于大脑某一个区域的急性缺血, 进而影响所有细胞因子, 如血管(内皮细胞、周细胞)、神经元、星形胶质细胞、少突胶质细胞、小胶质细胞和室管膜细胞, 并诱导发生不同程度的损伤反应^[14]。在缺血性脑卒中治疗中, 快速恢复脑血流是治疗的首要目标和前提。组织型纤溶酶原激活剂(t-PA)是美国食品和药物管理局批准的唯一治疗急性缺血性脑卒中的药物, 但由于 t-PA 治疗窗口狭窄, 仅能在发病后 4.5 h 内使用, 且 t-PA 可能导致卒中后再灌注损伤^[15]。因此, 寻求改善缺血性卒中的治疗方法已成为人们关注的焦点。

中医认为缺血性脑卒中属于“中风”“眩晕”的范畴, 现代中医认为, 由于“情志失调、饮食失节、劳逸失度”等原因, 导致风、火、痰、毒等致瘀因素侵犯脑室, 阻滞血络或气血虚损不能上荣脑窍而导致中风^[16]。EA 是传统针灸和现代科技结合起来的一种治疗方法, 它具有操作简便、适用范围广、无明显副作用等优点。多项研究表明, EA 能明显减轻缺血性脑卒中患者的炎症水肿、继发性疼痛, 增加脑血流和改善日常生活能力, 并与其他康复治疗相配合可取得较好的疗效^[17]。足三里穴归足阳明胃经, 为下合穴、胃经合穴, 脾胃为气血生化之源、气机升降之枢纽, 胃经为多气多血之经, 该穴具有调和气血及强健脾胃的作用, 临床上常用于治疗包含现代脑梗死概念下的中风、痿证、痹证、厥证等疾病^[18]; 内关穴为八脉交会穴、手厥阴心包经之络穴, 络手少阳三焦经, 故刺之可疏通两经经气, 通调三焦之气, 调理气血, 疏布津液, 宁心安神, 理气止痛^[19]。《针灸甲乙经》言:“人失智, 内关主之”。两个穴位一阴

一阳,一升一降,为调节气机、醒神开窍之要穴。本研究特选用“足三里”与“内关”穴结合,观察 EA 对缺血性脑卒中后的神经保护作用。

实验结果显示, MCAO 模型大鼠经电针刺激足三里穴后可显著改善神经功能障碍,如提高瘫痪肢体运动功能^[20],以及在大脑内的神经恢复上表现出了明显的效果,如促进神经再生、激活神经营养因子释放等^[21];在临床治疗上,电针治疗中风后肢体痉挛^[22]和弛缓性瘫痪^[23],有明显的改善作用。本研究采用平衡木试验对缺血性卒中大鼠运动功能进行评估,发现 EA 组与 MCAO 组在 1 d、3 d、7 d 时间点均无显著性差异,直至 EA 治疗 14 d 时,平衡木试验评分显著低于 MCAO 组,说明 EA 治疗的疗效能随着缺血性卒中病程的延长而逐渐提高,其中恢复期疗效最显著。此外,有研究发现,中风后的肢体痉挛及运动恢复可能与神经可塑性有关^[24]。

众所周知,大脑运动皮层包含直接投射至脊髓的神经元,可刺激躯体运动神经元并控制相关肢体肌肉运动。以前的研究显示脑缺血后神经功能恢复与神经可塑性有关,包括轴突的萌发和重塑、轴突生长、突触蛋白增加以及皮质脊髓束侧支形成^[25]。对 MCAO 大鼠运动功能恢复的研究表明,运动功能的改善归因于神经突触的可塑性,突触的增加对运动功能的恢复起着至关重要的作用^[26]。GAP-43、SYN 在缺血性卒中后梗死对侧皮质的表达与突触、突触传递及神经可塑性激活有关^[27]。GAP-43 是神经营养素依赖性膜结合磷酸化蛋白,广泛分布于脑、小脑、海马、脊髓、背根神经节、自主神经系统以及中枢神经系统损伤后可塑性区域的轴突。研究表明,GAP-43 的浓度升高可能与神经轴突可塑性有关^[7]。HDAC 抑制剂促进组蛋白乙酰化,诱导 GAP-43 表达增加,梗死区轴突再生增加^[28]。SYN 是突触小泡内的蛋白质,它能诱导突触小泡激活,并在胞吐过程中形成融合孔。SYN 的分布及密度可间接反映突触数量及传递效率,以及缺血性脑损伤后神经可塑性的激活^[8]。在本研究中,与 Sham 组相比, MCAO 组的 GAP-43 和 SYN mRNA 表达在 3 d 和 14 d 时均显著下降,但 EA 干预可逆转这种改变,与 MCAO 相比, EA 组的 GAP-43 和 SYN mRNA 表达在 3 d 和 14 d 时均显著增加,同时, EA 14 d 组的 GAP-43 和 SYN 蛋白的表达显著高于 MCAO 14 d 组。提示 EA 治疗可通过促进突触可塑性相关因子 GAP-43 和 SYN 的表达改善缺血性卒中的神经功能

障碍,为后续的神经再生创造良好的环境。

神经可塑性是指神经系统因环境变化而发生结构和功能改变的能力,如脑缺血损伤后突触重组和轴突萌发等,这与神经功能恢复密切相关^[5]。轴突再生在缺血性卒中后神经元再生过程中起着重要作用,如萌芽、生长、延伸、再联系等^[29]。缺血性卒中后轴突萌发部位及其在神经功能恢复中的作用可能与梗死灶的大小有关,在中小型梗死中,在梗死周围皮质中,从运动区到躯体感觉区、运动前区、前额叶区和关联区可见新生神经细胞数量显著增加^[30];在较大的梗死中,梗死侧大脑皮质有大量神经细胞缺失,而梗死对侧的皮质出现轴突萌发^[31]。研究还显示,大脑健侧皮质的神经元可以把轴突延伸至受损区域,从而有助于恢复运动功能^[32]。在 MCAO 模型大鼠中,健侧前肢对患侧前肢有代偿性作用,并发现梗死对侧同部位的大脑皮质出现大量轴突萌芽、树突生长及突触增殖^[33]。MAP-2 选择性地集中在神经元和树突中,在维持细胞分化、轴突运输以及神经结构和功能可塑性方面发挥着关键作用^[9]。研究表明,缺血性脑损伤后,氨基胍可通过提高 MAP-2 的表达促进神经元树突和轴突发芽^[34]。在本研究中,通过免疫荧光分析发现, EA 在干预 14 d 后, GAP-43/MAP-2 和 SYN/MAP-2 的共定位平均光密度均显著高于 MCAO 14 d 组,提示 GAP-43 和 SYN 蛋白可能参与了损伤后代偿性轴突发芽反应。

综上所述, EA 刺激“足三里”和“内关穴”对脑缺血性损伤大鼠神经功能障碍有明显的改善作用,这与我们先前的研究相稳合^[35],通过进一步研究发现其作用机制可能是通过上调神经可塑性因子 GAP-43 和 SYN 的表达促进轴突萌芽,激活损伤后代偿性神经重塑。

参考文献:

- [1] Rajsic S, Gothe H, Borba HH, et al. Economic burden of stroke: a systematic review on post-stroke care [J]. *Eur J Health Econ*, 2019, 20(1): 107-134.
- [2] Virani SS, Alonso A, Benjamin EJ, et al. Heart disease and stroke statistics-2020 update: a report from the American heart association [J]. *Circulation*, 2020, 141(9): e139-e596.
- [3] Bazan NG, Marcheselli VL, Cole-Edwards K. Brain response to injury and neurodegeneration: endogenous neuroprotective signaling [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2005, 1053: 137-147.
- [4] Xie Q, Cheng J, Pan G, et al. Treadmill exercise ameliorates focal cerebral ischemia/reperfusion-induced neurological deficit by promoting dendritic modification and synaptic plasticity via

- upregulating caveolin-1/VEGF signaling pathways [J]. *Exp Neurol*, 2019, 313: 60-78.
- [5] Cramer SC. Treatments to promote neural repair after stroke [J]. *J Stroke*, 2018, 20(1): 57-70.
- [6] Sadigh-Eteghad S, Geranmayeh MH, Majidi A, et al. Intranasal cerebrolysin improves cognitive function and structural synaptic plasticity in photothrombotic mouse model of medial prefrontal cortex ischemia [J]. *Neuropeptides*, 2018, 71: 61-69.
- [7] Williams KR, McAninch DS, Stefanovic S, et al. hnRNP-Q1 represses nascent axon growth in cortical neurons by inhibiting Gap-43 mRNA translation [J]. *Mol Biol Cell*, 2016, 27(3): 518-534.
- [8] Hami J, Vafaei-Nezhad S, Sadeghi A, et al. Synaptogenesis in the cerebellum of offspring born to diabetic mothers [J]. *J Pediatr Neurosci*, 2017, 12(3): 215-221.
- [9] Zhou Q, Zhang Q, Zhao X, et al. Cortical electrical stimulation alone enhances functional recovery and dendritic structures after focal cerebral ischemia in rats [J]. *Brain Res*, 2010, 1311: 148-157.
- [10] Yang Y, Eisner I, Chen S, et al. Neuroplasticity changes on human motor cortex induced by acupuncture therapy: a preliminary study [J]. *Neural Plast*, 2017, 2017: 4716792.
- [11] Koizumi J, Yoshida Y, Nakazawa T, et al. Experimental studies of ischemic brain edema. I. A new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area [J]. *Nosotchu*, 1986, 8: 1-7.
- [12] Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, et al. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination [J]. *Stroke*, 1986, 17(3): 472-476.
- [13] Feeney DM, Gonzalez A, Law WA. Amphetamine, haloperidol, and experience interact to affect rate of recovery after motor cortex injury [J]. *Science*, 1982, 217(4562): 855-857.
- [14] Liu Z, Chopp M. Astrocytes, therapeutic targets for neuroprotection and neurorestoration in ischemic stroke [J]. *Prog Neurobiol*, 2016, 144: 103-120.
- [15] Vidale S, Agostoni E. Thrombolysis in acute ischaemic stroke [J]. *Brain*, 2014, 137(Pt 6): e281.
- [16] 郭绮华, 崔苑真, 李梦真, 等. 从“虚-瘀-毒”探讨出血中风的核心病机 [J]. *中国中医急症*, 2022, 31(2): 242-246.
- [17] 张游, 尹亚龙, 吴新贵. 基于电针疗法对脑梗死后神经功能恢复的研究进展 [J]. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2022, 49(1): 79-86.
- [18] 葛云鹏, 嵇波, 苏杭, 等. 艾灸足三里穴的现代研究进展 [J]. *中医药导报*, 2019, 25(22): 95-99.
- [19] 向丽莉, 黄伟, 张小蕾, 等. 探意内关 [J]. *中华中医药杂志*, 2021, 36(7): 3890-3892.
- [20] Xing Y, Yang SD, Wang MM, et al. Electroacupuncture alleviated neuronal apoptosis following ischemic stroke in rats via midkine and ERK/JNK/p38 signaling pathway [J]. *J Mol Neurosci*, 2018, 66(1): 26-36.
- [21] Shariffar S, Shuster JJ, Bishop MD. Adding electrical stimulation during standard rehabilitation after stroke to improve motor function. A systematic review and meta-analysis [J]. *Ann Phys Rehabil Med*, 2018, 61(5): 339-344.
- [22] Cai Y, Zhang CS, Liu S, et al. Electroacupuncture for poststroke spasticity: a systematic review and meta-analysis [J]. *Arch Phys Med Rehabil*, 2017, 98(12): 2578-2589.
- [23] Lin YF, Liu XH, Cui ZY, et al. Weakened effective connectivity related to electroacupuncture in stroke patients with prolonged flaccid paralysis: an EEG pilot study [J]. *Neural Plast*, 2021, 2021: 6641506.
- [24] Li S. Spasticity, motor recovery, and neural plasticity after stroke [J]. *Front Neurol*, 2017, 8: 120.
- [25] Liu Z, Chopp M, Ding X, et al. Axonal remodeling of the corticospinal tract in the spinal cord contributes to voluntary motor recovery after stroke in adult mice [J]. *Stroke*, 2013, 44(7): 1951-1956.
- [26] Murphy TH, Corbett D. Plasticity during stroke recovery: from synapse to behaviour [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2009, 10(12): 861-872.
- [27] Huang X, Wang X, Yang M, et al. Spontaneous neuronal plasticity in the contralateral motor cortex and corticospinal tract after focal cortical infarction in hypertensive rats [J]. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 2020, 29(12): 105235.
- [28] Tedeschi A, Nguyen T, Puttagunta R, et al. A p53-CBP/p300 transcription module is required for GAP-43 expression, axon outgrowth, and regeneration [J]. *Cell Death Differ*, 2009, 16(4): 543-554.
- [29] Wiersma AM, Fouad K, Winship IR. Enhancing spinal plasticity amplifies the benefits of rehabilitative training and improves recovery from stroke [J]. *J Neurosci*, 2017, 37(45): 10983-10997.
- [30] Clarkson AN, López-Valdés HE, Overman JJ, et al. Multimodal examination of structural and functional remapping in the mouse photothrombotic stroke model [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2013, 33(5): 716-723.
- [31] Wahl AS, Omlor W, Rubio JC, et al. Neuronal repair. Asynchronous therapy restores motor control by rewiring of the rat corticospinal tract after stroke [J]. *Science*, 2014, 344(6189): 1250-1255.
- [32] Lee JK, Kim JE, Sivula M, et al. Nogo receptor antagonism promotes stroke recovery by enhancing axonal plasticity [J]. *J Neurosci*, 2004, 24(27): 6209-6217.
- [33] Jones TA. Multiple synapse formation in the motor cortex opposite unilateral sensorimotor cortex lesions in adult rats [J]. *J Comp Neurol*, 1999, 414(1): 57-66.
- [34] Sun M, Zhao Y, Gu Y, et al. Neuroprotective actions of aminoguanidine involve reduced the activation of calpain and caspase-3 in a rat model of stroke [J]. *Neurochem Int*, 2010, 56(4): 634-641.
- [35] 张游, 靳子言, 尹亚龙, 等. 电针足三里、内关穴抑制 mTOR 信号通路缓解大鼠脑缺血损伤作用的研究 [J]. *天津医药*, 2022, 50(11): 1146-1152.