

尼莫地平联合电针治疗脑缺血再灌注损伤的机理

吴登俊 杨万同 田峻 邓子牛 廖维靖

[摘要] 目的 研究尼莫地平联合电针疗法对大鼠脑缺血再灌注的保护作用机理。方法 60 大鼠随机分为 3 组,治疗组(24 只)、对照组(24 只)、正常组(12 只),前两组制作脑缺血再灌注模型,治疗组给予尼莫地平联合电针处理,对照组给予生理盐水,正常组不治疗。再灌注 1 d、3 d 后检测脑组织过氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)的含量,以及生长相关蛋白-43(GAP-43)、微管相关蛋白-2(MAP-2)和细胞周期蛋白(cyclin-D1)的表达情况。结果 缺血再灌注后 SOD 活性降低,MDA 含量增高,缺血灶周围 GAP-43、MAP-2 和 cyclin-D1 表达增高,治疗可减轻脑损害,增强 GAP-43 和 MAP-2 表达,抑制 cyclin-D1 表达。结论 尼莫地平联合电针疗法可清除自由基,抑制细胞凋亡和蛋白水解,并促进损伤神经组织的再生和修复。

[关键词] 脑缺血;再灌注损伤;电针;尼莫地平;大鼠

Therapeutic mechanism of nimodipine combined with electroacupuncture treating cerebral ischemia and reperfusion injury GUO Deng-jun, YANG Wan-tong, TIAN Jun, et al. Rehabilitation Department, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, Hubei, China

[Abstract] **Objective** To study the mechanism of nimodipine combined with electroacupuncture therapeutics protecting rats from cerebral ischemia and reperfusion injury. **Methods** 60 rats were divided randomly into 3 groups, 24 rats in treatment group that accepted nimodipine combined with electroacupuncture therapy after middle cerebral artery occlusion (MCAO) for one hour, and 24 in control group, which accepted normal saline after ischemia and reperfusion injury, and 12 rats in normal group. One or three days later, all rats were decapitated and their brains were extracted for superoxide dismutase (SOD) activity and malonaldehyde (MDA) concentration assay. And immunohistochemistry was used to detect the expression of growth-associated protein 43 (GAP-43), microtubule-associated protein 2 (MAP-2) and cyclin-D1 protein. **Results** After ischemia and reperfusion injury, SOD activity markedly decreased in both treatment and control group while MDA concentration increased, compared with normal group ($P < 0.01$). Level of MAP-2 expression in treatment and control group was markedly lower than normal group ($P < 0.01$), while levels of GAP-43 and cyclin-D1 expression were higher ($P < 0.01$). Contrasted to control group, SOD activity was higher and MDA concentration was lower in treatment group. Level of GAP-43 and MAP-2 expression in treatment group were higher than those in control group, while level of cyclin-D1 lower. Differences between treatment group and control group were significant ($P < 0.01$). **Conclusions** Nimodipine combined with electroacupuncture therapeutics can prevent brains from ischemia and reperfusion injury. Its actions of wiping free radicals out, inhibiting apoptosis and protein hydrolysis and promoting nerve regeneration are involved in the mechanism.

[Keywords] cerebral ischemia; reperfusion injury; electroacupuncture; nimodipine; rats

中图分类号: R743.3, R245.31 文献标识码: A 文章编号: 1006-9771(2003)03-0141-03

作者单位: 430071 湖北武汉市, 武汉大学中南医院神经康复科。作者简介: 吴登俊(1976-), 男, 医学硕士, 研究方向: 脑血管病的康复治疗。

1 材料和方法

1.1 动物造模 60 只雄性 Wistar 大鼠,体重 180—200g,随机分为 3 组:治疗组(24 只)、对照组(24 只)、正常组(12 只)。前两组参考 Longa 的线栓法,经右颈外动脉向右颈内动脉插入末端涂以硅酮的 4-0 单丝尼龙线,线栓直径 0.2cm,插入深度(18.0±0.5)mm,以阻断大脑中动脉入口,制作大脑中动脉阻断模型,缺血 1h 后拔出线栓恢复再灌注。正常组不手术。

1.2 治疗 治疗组在恢复再灌注后经尾静脉缓慢静注尼莫地平 15mg/kg,并行电针治疗,取穴“水沟”和双“内关”,强度 3.5mA,频率 100Hz,持续 1h。每天治疗 1 次。对照组滴注 5ml 生理盐水,正常组不治疗。

1.3 取材和切片 治疗组和对照组动物在再灌注后 1d、3d 两个时间点处死,每个时间点各 12 只。常规麻醉动物后经心脏快速灌注 100ml 生理盐水,断头取出脑组织。取前囟后 5—7mm 处脑组织,加入冷的匀浆介质(pH7.5, 0.25mol/L 蔗糖, 0.005mol/L TrisHCL, 0.0001mol/L EDTA)低温下充分匀浆 6—8min,制成 10%的脑组织匀浆液。取前囟后 1—4mm 处脑组织,4%多聚甲醛 4℃固定 24h,常规浸蜡包埋,连续冠切制作石蜡切片,片厚 4μm。

1.4 SOD/MDA 测定 将所制成 10%的脑组织匀浆液 4℃ 4000 转/分离心 15min,取 5μl 上清液为最佳取样量测定过氧化物歧化酶(SOD)活性,取 0.1ml 上清液测定丙二醛(MDA)含量。按 SOD 和 MDA 测定试剂盒方法(南京建成生物工程研究所生产)配制样品测定管,分别在波长 550nm 处比色,比色结果按相应公式计算出脑组织 SOD 活力(nU/ml)、MDA 含量(nM/ml)。检测两次,取平均值。

1.5 HE 染色 切片常规脱蜡至水,苏木素室温下染色 1min,1%盐酸酒精分色 3s,1%氨水返蓝 5min,伊红室温下复染 5min,常规封片。镜下观察组织形态学变化。

1.6 免疫组织化学检测(SP 法) 主要试剂:生长相关蛋白 43(growth associated protein 43, GAP-43)鼠源单克隆抗体(浓缩型,购于 SIGMA 试剂公司);微管相关蛋白(microtubule-associated protein 2, MAP-2)鼠源单克隆抗体(即用型,购于福州迈新试剂公司);细胞周期蛋白(cyclin)-D1 鼠源单克隆抗体(浓缩型,购于 SIGMA 试剂公司);SP、DAB 试剂盒(即用型,购于北京中山试剂公司)。

按试剂说明书操作,切片常规脱蜡、入水,3% H₂O₂ 室温孵育 15min,柠檬酸盐缓冲液微波修复 95—98℃ 15min,冷却至室温(25℃),正常封闭血清室温下孵育 15min,甩干后不洗, GAP-43、MAP-2 或 cyclin-D1 一抗 37℃下孵育 2h, PBS 漂洗后,二抗 37℃下孵育 15—20min, SABC 复合物 37℃下孵育 15—20min, PBS 漂洗,

DAB 室温下显色,镜控反应时间(GAP-43 反应 1min, MAP-2 反应 3min, cyclin-D1 反应 8min),充分冲洗中止反应,苏木素复染胞核,常规脱水、透明、封片。GAP-43 和 MAP-2 免疫组织化学结果用 SCION IMAGE 软件进行图像分析,免疫反应阳性物标记强度用平均光密度(O.D.值)来表示。显微镜下测缺血周围皮质区的 O.D.值,并测同一切片胼胝体 O.D.值作为背景,两者相减得到校正 O.D.值(O.D.′)。每只动物标本作 4 张切片,每张切片取缺血侧缺血周围皮质区 5 个高倍镜视野进行 O.D.′检测,取平均值。cyclin-D1 每只动物 4 张切片,在显微镜下计数 5 个高倍视野内阳性着染细胞数目,取平均值。

1.7 统计分析 各组结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,并用 SPSS 软件进行单因素方差检验。

2 结果

2.1 HE 染色 对照组顶叶皮质为缺血中心区,组织结构紊乱疏松,细胞境界不清,核浓缩深染或溶解,胞浆呈深伊红染色,可见红色神经元和鬼影神经元,缺血边缘区皮质神经元大多形态正常,部分胞浆肿胀,组织水肿。治疗组缺血中心区同对照组;缺血边缘区肿胀的神经元数量减少,组织水肿程度减轻。正常组各脑区形态结构正常。

2.2 脑组织 SOD/MDA 测定结果 缺血再灌注后, SOD 酶活性降低。在再灌注后各时间点,治疗组 SOD 活性高于对照组,两者之间有高度显著性差异($P < 0.01$)。治疗组和对照组 MDA 水平均高于正常组,而在各时间点,治疗组 MDA 水平低于对照组。结果见表 1、2。

表 1 脑组织匀浆 SOD 活性(nU/ml)测定结果

组别	再灌注 1d	再灌注 3d
对照组	91.02±5.89 ^a	80.16±5.13 ^a
治疗组	99.38±5.65 ^{a,b}	88.30±4.65 ^{a,b}
正常组	114.00±5.61	

注:a:与正常组相比, $P < 0.01$; b:与对照组相应时间点相比, $P < 0.01$ 。

表 2 脑组织匀浆 MDA 含量(nmol/mg)测定结果

组别	再灌注 1d	再灌注 3d
对照组	13.55±0.64 ^a	17.02±0.57 ^a
治疗组	12.43±0.55 ^{a,b}	15.03±0.62 ^{a,b}
正常组	8.67±0.68	

注:a:与正常组相比, $P < 0.01$; b:与对照组相应时间点相比, $P < 0.01$ 。

2.3 免疫组织化学检测结果 在正常组,皮层、纹状体和海马区 GAP-43 弱阳性表达,胼胝体处为阴性表达; MAP-2 蛋白表达于神经元的核周胞体和树突,胞核和轴突为阴性表达,胼胝体为阴性表达,皮质各区 MAP-2 广泛表达,阳性染色的树突呈条索状分布; cyclin-D1 阳性染色散在分布于皮质 II、III、IV 层。在对照组,缺血

中心皮质区 GAP-43 弱表达,结构紊乱,周围皮质区阳性表达。在治疗组,缺血中心区 GAP-43 染色情况与对照组相似,缺血周围的皮质及海马各区 GAP-43 阳性强度更加升高。MAP-2 在缺血再灌注 1 d 和 3 d 中等阳性表达,治疗组表达强度高于对照组($P < 0.01$)。缺血再灌注后 cyclin D1 的表达呈递增趋势,再灌注 3 d 时达到高峰,对照组高于治疗组($P < 0.01$)。具体见表 3—5。

表 3 脑组织切片 GAP-43 检测结果

组别	再灌注 1 d	再灌注 3 d
对照组	20.64 ± 0.70 ^a	28.87 ± 0.59 ^a
治疗组	26.35 ± 1.12 ^{a,b}	32.71 ± 0.76 ^{a,b}
正常组	8.92 ± 0.73	

注:a:与正常组相比, $P < 0.01$;b:与对照组相应时间点相比, $P < 0.01$ 。

表 4 脑组织切片 MAP-2 检测结果

组别	再灌注 1 d	再灌注 3 d
对照组	63.08 ± 0.78 ^a	62.76 ± 1.41 ^a
治疗组	65.86 ± 1.32 ^{a,b}	66.02 ± 1.62 ^{a,b}
正常组	82.96 ± 0.87	

注:a:与正常组相比, $P < 0.01$;b:与对照组相应时间点相比, $P < 0.01$ 。

表 5 脑组织切片 cyclin D1 检测结果

组别	再灌注 1 d	再灌注 3 d
对照组	9.44 ± 0.64 ^a	12.15 ± 0.52 ^a
治疗组	8.42 ± 0.64 ^{a,b}	10.99 ± 0.74 ^{a,b}
正常组	6.73 ± 0.65	

注:a:与正常组相比, $P < 0.01$;b:与对照组相应时间点相比, $P < 0.01$ 。

3 讨论

自由基的作用和细胞内钙超负荷是缺血-再灌注损伤的重要发病学环节^[1]。最近研究表明,钙还在缺血性神经元死亡中起关键作用,神经元凋亡与钙内流过度增加有关^[2]。cyclin D1 正常表达于细胞核内,是决定细胞周期能否开始的启动因子。成熟的神经细胞是失去分裂增殖能力的高度分化细胞,进入细胞周期后向细胞发出错误的增殖信号,可通过某种机制诱导自身的凋亡^[3]。GAP-43 和 MAP-2 是细胞生长和修复相关蛋白。GAP-43 是一种钙离子依赖性钙调素结合蛋白,在神经系统发育期高水平表达于神经元的核周胞体和轴突,以轴突生长锥的含量最为丰富。在成熟神经组织低水平表达或不表达,受到损伤时 GAP-43 一过性高表达,介导轴突出芽生长和突触形成。一旦轴突生长锥到达相应的靶位并建立突触联系后,GAP-43 的表达迅速下降。因而 GAP-43 被视为神经可塑性的分子标志物^[4]。MAP-2 正常表达于神经元胞浆和树突,

是构成树突的结构蛋白。MAP-2 具有促进管蛋白 tubulin 聚合成微管的能力,是 cAMP、Ca²⁺/钙调蛋白及其它效应物的作用底物。MAP-2 对蛋白水解酶敏感,脑缺血时被 Ca²⁺ 活化的蛋白质酶迅速水解,被认为是缺血性脑损伤早期形态学检测的最敏感、最有效的蛋白分子^[5]。

尼莫地平属于电压依赖式钙通道拮抗剂,对神经元钙通道有特别高的亲和力。可抑制钙的过度内流,并扩张脑血管,消除“无复流现象”,改善脑血供;还有认知激活作用,可增强短期记忆^[2]。电针刺激“水沟”和“内关”,乃是石学敏院士所创“醒脑开窍”针法的主穴。研究表明,“醒脑开窍”针法可改善缺血区血供,提高 SOD 活性,抗自由基损伤,促进组织修复。

尼莫地平联合电针治疗后,SOD 活性明显升高,MDA 含量明显降低,组织水肿减轻。缺血再灌注后,cyclin D1 表达水平上升,提示凋亡的发生。治疗组 cyclin D1 表达水平低于对照组,提示治疗可以抑制 cyclin D1 蛋白的表达及其介导的细胞凋亡,促进受损神经元的存活。治疗组和对照组 MAP-2 的水平低于正常组提示缺血再灌注后神经元蛋白质发生水解,细胞骨架被破坏。治疗组 MAP-2 水平高于对照组,是该治疗可抑制蛋白质水解的证据。治疗组 GAP-43 表达水平高于对照组,则提示治疗可促进神经组织的结构重塑。

综上所述,尼莫地平联合电针治疗可对抗再灌注损伤的两大环节——自由基和钙负荷,减轻组织水肿和过氧化破坏,并抑制细胞内钙超载所介导细胞凋亡和蛋白质水解,促进组织修复。

[参考文献]

[1]金惠铭.病理生理学[M].第4版.北京:人民卫生出版社,1998.145—157.
[2]董为伟.神经保护的基础与临床[M].北京:科学出版社,2002.14—22.
[3]Freeman RS,Estus S,Johnson EM Jr. Analysis of cell cycle-related gene expression in postmitotic neurons:selective induction of cyclin D1 during programmed cell death[J]. Neuron,1994,12(2):343—355.
[4]Benowitz LI, Routtenberg A. GAP-43: an intrinsic determinant of neuronal development and plasticity[J]. Trends Neurosci,1997,20(2):84—91.
[5]Kitagawa K,Matsumoto M,Mikoshiha K,et al. Microtubule-associated protein 2 as a sensitive marker for cerebral ischemia damage immunohistochemical investigation of dendritic damage[J]. Neurosci,1989,31(2):401—411.

(收稿日期:2002-12-24)