

针刺介入时机对缺血性中风大鼠神经功能评分和 Bcl-2、Bax 表达的影响

刘勇 王洪 赵军 付强

【摘要】 目的 研究不同时间点介入针刺治疗对缺血性中风大鼠神经功能评分和对缺血脑组织中 B 细胞淋巴瘤/白血病-2 (B cell lymphoma/leukemia-2, Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2 associated X protein, Bax) 阳性表达的细胞数量的影响,探讨针刺治疗机制及介入时机。**方法** 将 200 只雄性 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组、2 小时针刺组、72 小时针刺组和 168 小时针刺组 5 组,除假手术组外,均采用线栓法制备大鼠局灶性永久性脑缺血模型,在术后 1、3、7、14 天,4 个时间点采用 Garcia 复合评分法评价大鼠神经功能,用酶联免疫分析法探查缺血脑组织中的 Bcl-2、Bax 蛋白表达情况,并在显微镜下记录阳性细胞数目进行比较。**结果** 针刺各组缺血性中风大鼠神经功能评分得到明显改善,优于模型组 ($P < 0.001$);2 小时针刺组分别优于 72 小时、168 小时组 ($P < 0.01$),差异有统计学意义。缺血性中风大鼠术后不同时间点脑组织中的 Bcl-2、Bax 表达均增高,1 天达到高峰,随后下降,与假手术组比较有统计学意义 ($P < 0.001, P < 0.01$)。术后 2 小时与模型组、72 小时、168 小时针刺组比较,可明显提高 Bcl-2 蛋白的表达、抑制 Bax 蛋白的表达,差异有统计学意义 ($P < 0.001$);72 小时与 168 小时针刺组比较可明显提高 Bcl-2 蛋白的表达、抑制 Bax 蛋白的表达,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。**结论** 针刺可明显提高缺血性中风大鼠的 Garcia 评分,改善其运动、感觉和协调功能;针刺可通过调节 Bcl-2、Bax 蛋白表达来抑制神经细胞凋亡,挽救缺血半暗带神经细胞的功能,而且在缺血性中风后越早介入针刺治疗疗效越好,存在一个最佳治疗时间窗。

【关键词】 缺血性中风; 针刺; 神经功能评分; B 细胞淋巴瘤/白血病-2; Bcl-2 相关 X 蛋白; 大鼠

【中图分类号】 R245 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2014.08.001

Influence of acupuncture intervention time on neurological function damage of and expression of Bcl-2, Bax protein in rats after ischemic stroke LIU Yong, WANG Hong, ZHAO Jun, et al. Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China

Corresponding author: LIU Yong, E-mail: 24680190@qq.com

【Abstract】 Objective To study the impact of acupuncture treatment at different time points on neurological function score, positive expression cell number of B-cell lymphoma/leukemia-2 (Bcl-2), Bcl-2 associated X protein (Bax) in ischemic brain tissue of ischemic stroke in rats, and to investigate the mechanism and intervention timing of acupuncture treatment. **Methods** 200 male SD rats were randomly divided into 5 groups: sham operation group, model group, 2 hours acupuncture group, 72 hours acupuncture group and 168 hours acupuncture group. Except the sham group, the rats of all the other groups were prepared into permanent focal cerebral ischemia model by suture-occluded method. 1, 3, 7, 14 days after sur-

基金项目:黑龙江省博士后资助项目(LBH-Z11011);黑龙江省科技攻关项目(GC08T302)

作者单位:150040 哈尔滨,黑龙江中医药大学中西医结合博士后流动站(刘勇),研究生院[王洪(硕士研究生)、付强(硕士研究生)];黑龙江中医药大学附属第一医院针灸一科(刘勇、赵军)

作者简介:刘勇(1975-),女,博士,副主任医师,在站博士后。研究方向:针刺治疗缺血性中风的实验研究,针刺治疗延髓麻痹。E-mail: 24680190@qq.com

gergy, Garcia composite score method was used to evaluate the neural function of the rats at these four time points. Enzyme league immune analysis method was used to probe the Bcl-2 and Bax protein expression in brain tissue, and the number of positive cells under a microscope was recorded for comparison. **Results** Neurological function score of ischemic stroke rats was significantly improved in acupuncture groups, better than the model group ($P < 0.001$); 2 hours acupuncture group was better than that of 72 hours, 168 hours respectively ($P < 0.01$), and the difference was statistically significant. Bcl-2 and Bax expression in brain tissue at different time points after surgery were increased in ischemic stroke rats, one day reached a peak and then declined, and the difference was statistically significant compared with the model group ($P < 0.001$, $P < 0.01$). Acupuncture treatment at 2 hours after surgery can significantly increase the expression of Bcl-2 protein, inhibit the expression of Bax protein. Compared with the model group, 72 hours acupuncture group and 168 hours acupuncture group, the difference was statistically significant ($P < 0.001$). Compared with 168 hours acupuncture group, 72 hours acupuncture group can significantly increase the expression of Bcl-2 protein, inhibit the expression of Bax protein, the difference was statistically significant ($P < 0.01$). **Conclusions** Acupuncture can significantly improve the Garcia score in ischemic stroke rats, improve their motor, sensory and coordination functions; acupuncture can suppress neural cell apoptosis by regulating Bcl-2, Bax protein expression, save the function of the nerve cells in ischemic penumbra, and there is an optimal therapeutic time window of acupuncture treatment for ischemic stroke, the sooner acupuncture treatment is adopted, the better curative effect can be achieved.

【Key Words】 Ischemic stroke; Acupuncture; Neural function score; B-cell lymphoma/leukemia -2; Bcl-2 associated X protein; Rats

缺血性中风是神经系统常见疾病,具有发病率高、死亡率高、致残率高的特点,其造成的神经功能损害往往很严重,在发病后一定时间窗内,对损伤的脑组织进行有效的保护,将对患者的预后产生积极影响。针刺作为有效非药物疗法之一,已经广泛地应用于缺血性中风的临床治疗,具有疏通经脉、活血化瘀的作用,可以扩张血管,改善脑及肢体的血液循环,激活神经细胞,使上下运动神经元的功能恢复。大量临床研究表明,针刺可促进中风患者神经功能的康复,而且越早开始治疗越好,但具体的最佳时间点尚无定论^[1]。本研究采用颈内动脉线栓法制备大鼠局灶性永久性大脑中动脉阻塞模型(permanent middle cerebral artery occlusion, pM-CAO),依据缺血性中风后病理动态变化的规律,设立不同时间点开始针刺治疗,观察脑梗死后 1 天、3 天、7 天、14 天,4 个时间点各组大鼠神经功能 Garcia 评分及测定缺血脑组织中 B 细胞淋巴瘤/白血病-2 基因(B cell lymphoma/leukemia-2, Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax)蛋白的表达,讨论不同时间点介入针刺治疗对改善缺血性中风大鼠运动、感觉和协调功能及其对细胞凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax 表达的影响,寻找针刺治疗的最佳介入时机,为针刺治疗缺血性中风更加规范化的在临床推广应用,提供重要的实验室依据。

1 材料与方法

1.1 动物及分组

选用 SPF 级健康雄性 SD(Sprague-Dawley)大鼠 260 只,2 月龄,体重 280~300 g,2013 年 10 月 21 日购于黑龙江中医药大学实验动物中心,许可证号:SCXK 黑 2008004。将大鼠随机分为假手术组、模型组、2 小时针刺组、72 小时针刺组和 168 小时针刺组 5 组,每组各 40 只,各组根据取材时间点,在 1、3、7、14 天各随机选取 10 只大鼠。

1.2 动物模型的制备

采用颈内动脉线栓法制备大鼠局灶性永久性脑缺血模型^[2]。雄性 SD 大鼠麻醉后仰位固定,行颈前正中纵行切口,钝性分离皮下组织和肌肉,暴露分离左侧颈总动脉(common carotid artery, CCA)、颈外动脉(external carotid artery, ECA)、颈内动脉(internal carotid artery, ICA),游离并保护迷走神经,在 CCA 近心端和远心端及 ECA 挂线备用,用微动脉夹暂时夹闭 ICA,然后在近心端结扎 CCA、ECA。在距离 CCA 分叉处 4 mm 处剪一小切口,将栓线轻轻插入 ICA,将绕在 CCA 远端的细线轻轻系紧,将栓线向 ICA 方向轻推,从 ICA 分叉处计算,插入深度在 18 mm 时,牢牢系紧 CCA 远心端的细线,缝合肌肉和皮肤。假手术组除不栓塞大脑中动脉

外,余处理同缺血组。手术后大鼠出现右侧肢体的瘫痪,提尾悬空时出现右侧上肢的屈曲,或行进时向右侧转圈、倾斜,则提示造模成功,入选试验。

1.3 动物干预方法

2 小时针刺组、72 小时针刺组、168 小时针刺组,分别于大鼠造模完成后 2 小时、72 小时、168 小时开始予以针刺治疗。取穴:参照《实验针灸学》^[3],取患侧百会透曲鬓穴,进针约 0.8 mm,留针 30 分钟,期间捻转 3 次,每次 1 分钟,捻转速度 200 r/min。双侧风池穴、患肢的内关穴、足三里穴,进针约 0.5 mm,留针 30 分钟,期间行提插捻转 3 次,每次 1 分钟,每天 1 次。针刺各组分别于术后的 1 天、3 天、7 天、14 天 4 个时间点,随机选取 10 只大鼠(若需针刺,则在完成当天针刺后再选取),在进行神经功能测定后,断头法处死大鼠,取材。

假手术组、模型组大鼠每天在于针刺组相同时间不针刺,但要抓取并捆绑、固定,时间、条件同针刺各组。神经功能测定、取材操作与针刺组各组相同。

1.4 主要仪器与试剂

大鼠凋亡因子 Bcl-2、Bax 酶联免疫分析(ELISA)试剂盒(上海博谷生物科技有限公司,货号:REB002、REB003)。0.3 mm×13 mm 华佗牌毫针(苏州医疗器械厂)。

1.5 主要指标的测定

1.5.1 神经功能评分测定 采取 Garcia 18 分的复合评分法^[4],在 4 个时间点对大鼠进行神经功能评分测定。

1.5.2 脑组织标本采集及指标的测定 在神经功能评分测试完成后,将大鼠断头处死,按试验要求处理后,切取缺血区脑组织标本,按要求称取重量,加入磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS),用匀浆器将标本匀浆,3500 r/min 离心 20 分钟,收集上清进行检测。高倍镜下随机选取 5 个视野,观察 Bcl-2、Bax 阳性细胞总数,将其均数用于统计分析。

1.6 统计方法

运用 SPSS 13.0 软件进行数据统计分析,结果采用($\bar{x} \pm s$)表示,正态分布定量数据多组间均值比较采用单因素方差分析,两两比较用 LSD 法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。假手术组大鼠不存在神经功能缺损,数据不符合正态分布,在 4 个时间点的评分均假设为 18 分满分恒定量。除假手术组的

各组数据的置信区间与假手术组进行比较,假手术组数据不落于其他各组数据的置信区间,则差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 不同针刺介入时机对缺血性中风模型大鼠神经功能损伤 Garcia 复合评分的影响

假手术组大鼠不存在神经功能缺损,假设在 4 个时间点的评分均为 18 分(满分)。除假手术组,对其他数据进行 K-S 正态分布测试, P 值分别为 0.45,0.39,0.35,0.33,均大于 0.05,所以各组数据均呈现正态性。采用 F -检验法进行等方差性测试, F 值为 2.37,相对性的 P 值为 0.43,所以数据呈现等方差性。可以采用单因素方差分析对除假手术组的各组 Garcia 复合评分进行比较,采用 LSD 法对两两数据进行比较。采用置信区间,比较假手术组和其他各组数据。见表 1,结果表明:

模型组在 1 天、3 天、7 天、14 天的 95% 置信区间分别为(4.5168, 8.1232)、(5.1492, 8.9908)、(7.1408, 11.1392)、(7.0172, 14.5828)。2 小时针刺组在 1 天、3 天、7 天、14 天的 95% 置信区间分别为(6.1016, 10.1784)、(9.4364, 13.0036)、(10.1156, 14.5844)、(13.4068, 17.0132)。72 小时针刺组在 1 天、3 天、7 天、14 天的 95% 置信区间分别为(4.6432, 7.8968)、(8.6652, 12.1148)、(9.664, 12.996)、(11.1808, 16.1592)。168 小时针刺组在 1 天、3 天、7 天、14 天的 95% 置信区间分别为(4.7396, 7.6404)、(5.6988, 8.5212)、(8.8364, 12.4036)、(10.0208, 14.0192)。假手术组评 18 分均不落于所有 95% 的置信区间,所以差异有统计学意义。

(1) 1 天时比较:采用 LSD 法 2 小时针刺组分别与模型组、72 小时、168 小时针刺组比较(P 值分别为 0.0087, 0.0077, 0.0069),差异有统计学意义($P < 0.01$);72 小时、168 小时针刺组分别与模型组比较,(P 值 0.79, 0.74),因此差异无统计学意义($P > 0.05$)。

(2) 3 天时比较:采用 LSD 法,2 小时针刺组分别与模型组、168 小时针刺组比较,(P 值 0.0013, 0.001),差异显著,有统计学意义($P < 0.01$);2 小时与 72 小时针刺组比较(P 值 0.55),差异无统计学意义($P > 0.05$);72 小时针刺组分别与模型组、168 小时针刺组比较(P 值 0.005, 0.0047),差异有

表 1 不同针刺介入时机对各组大鼠神经功能评分的影响(分, $\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	1 天	3 天	7 天	14 天
假手术组	18.00 \pm 0.00	18.00 \pm 0.00	18.00 \pm 0.00	18.00 \pm 0.00
模型组	6.32 \pm 0.92	7.07 \pm 0.98	9.14 \pm 1.02	10.8 \pm 1.93
2 小时针刺组	8.14 \pm 1.04	11.22 \pm 0.91	12.35 \pm 1.14	15.21 \pm 0.92
72 小时针刺组	6.27 \pm 0.83	10.39 \pm 0.88	11.33 \pm 0.85	13.67 \pm 1.27
168 小时针刺组	6.19 \pm 0.74	7.11 \pm 0.72	10.62 \pm 0.91	12.02 \pm 1.02

统计学意义($P < 0.05$);168 小时针刺组与模型组比较(P 值 0.67),差异不显著,无统计学意义($P > 0.05$)。

(3) 7 天时比较:采用 LSD 法,2 小时针刺组与模型组、168 小时针刺组比较(P 值 0.003, 0.001),差异有统计学意义($P < 0.01$);2 小时组与 72 小时针刺组比较(P 值 0.047),差异有统计学意义($P < 0.05$);72 小时组与模型组、168 小时针刺组比较(P 值 0.022, 0.03)差异有统计学意义($P < 0.05$);168 小时针刺组与模型组比较(P 值 0.23),差异无统计学意义($P > 0.05$)。

(4) 14 天时比较:采用 LSD 法进行两两比较,2 小时针刺组分别与模型组、168 小时针刺组比较(P 值 0.001 和 0.003),差异有统计学意义($P < 0.01$);2 小时与 72 小时针刺组比较(P 值 0.032),差异有统计学意义($P < 0.05$);72 小时、168 小时针刺组分别与模型组比较(P 值 0.0013 和 0.002),差异有统计学意义($P < 0.01$);72 小时组与 168 小时针刺组比较(P 值为 0.042),差异有统计学意义($P < 0.05$)。

针刺能明显提高缺血性脑卒中大鼠神经功能 Garcia 复合评分,改善缺血性脑卒中大鼠的运动、感觉和协调功能;提示脑卒中后 2 小时开始针刺改善其神经功能效果好。

2.2 不同针刺介入时机对缺血性中风模型大鼠 Bcl-2、Bax 蛋白表达的影响

采用单因素方差分析对各组大鼠的 Bcl-2、Bax 蛋白表达进行比较,两两比较采用 LSD 法,见表 2、3。对各组数据进行 K-S 正态分布测试, P 值分别为 0.47、0.43、0.31、0.29、0.24,均大于 0.05,所以各组数据均呈现正态性。采用 F -检验法进行等方差性测试, F 值为 6.78,相对性的 P 值为 0.13,大于 0.05,所以不能认为各组数据方差不等。采用单因素方差分析对各组大鼠的 Bcl-2、Bax 蛋白表达进行比较,两两比较采用 LSD 法。结果表明:假手术组

Bcl-2、Bax 蛋白表达均呈低水平。采用单因素方差分析,模型组、3 个针刺组在术后 1 天、3 天、7 天、14 天 4 个时间点的 Bcl-2、Bax 蛋白表达明显增多,与假手术组比较, F 值为 47.3, P 值为 0.0002,有显著性差异($P < 0.001$)。3 个针刺组与模型组比较: F 值为 37.8, P 值为 0.023。Bcl-2 蛋白表达呈增高趋势,Bax 蛋白表达呈减少的趋势。

模型组、三个针刺组在 4 个时间点 Bcl-2、Bax 蛋白表达分别进行组间比较:

(1) 1 天时比较:采用 LSD 法,Bcl-2 蛋白表达:2 小时针刺组分别与模型组、72 小时和 168 小时针刺组比较(P 值 0.0005, 0.0003, 0.0005),差异有统计学意义($P < 0.001$);72 小时、168 小时针刺组与模型组比较(P 值 0.17, 0.25),差异无统计学意义($P > 0.05$)。

Bax 蛋白表达:2 小时针刺组分别与模型组、72 小时和 168 小时针刺组比较(P 值 0.0002, 0.0001, 0.0003),差异有统计学意义($P < 0.001$);72 小时、168 小时针刺组与模型组比较(P 值 0.16, 0.10),差异无统计学意义($P > 0.05$)。

1 天时 2 小时针刺组可提高 Bcl-2 蛋白表达,降低 Bax 蛋白表达,优于模型组、72 小时和 168 小时针刺组。

(2) 3 天时比较:采用 LSD 法,Bcl-2 蛋白表达:2 小时针刺组分别与模型组、72 小时、168 小时针刺组比较(P 值 0.0002, 0.0009, 0.0007),差异有统计学意义($P < 0.001$);72 小时针刺组分别与模型组、168 小时针刺组比较(P 值 0.0003, 0.039),差异有统计学意义($P < 0.001, P < 0.05$),168 小时针刺组与模型组比较(P 值 0.67),差异无统计学意义($P > 0.05$)。

Bax 蛋白表达:2 小时针刺组分别与模型组、72 小时、168 小时针刺组比较(P 值 0.0008, 0.016, 0.007),差异有统计学意义($P < 0.001, P < 0.05, P < 0.01$);72 小时针刺组分别与模型组、168 小时针刺组比较(P 值 0.042, 0.043),差异有统计学意

表 2 不同针刺介入时机对各组大鼠 Bcl-2 表达的影响(个/视野, $\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	1 天	3 天	7 天	14 天
假手术组	4.34 ± 0.23	4.20 ± 0.71	4.11 ± 0.67	3.98 ± 0.35
模型组	42.45 ± 2.13	13.20 ± 1.11	9.96 ± 2.10	5.06 ± 1.07
2 小时针刺组	56.08 ± 4.16	42.25 ± 2.49	22.78 ± 2.75	14.12 ± 1.53
72 小时针刺组	40.99 ± 2.01	15.20 ± 1.11	13.19 ± 1.25	10.11 ± 0.99
168 小时针刺组	41.85 ± 2.61	13.09 ± 1.11	10.16 ± 0.10	8.22 ± 0.87

 表 3 不同针刺介入时机对各组大鼠 Bax 表达的影响(个/视野, $\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	1 天	3 天	7 天	14 天
假手术组	3.43 ± 0.23	3.49 ± 0.28	4.17 ± 0.17	3.96 ± 0.95
模型组	62.95 ± 4.73	17.20 ± 2.11	6.75 ± 0.10	5.43 ± 0.07
2 小时针刺组	45.57 ± 3.68	14.25 ± 1.09	4.98 ± 0.36	4.03 ± 0.22
72 小时针刺组	63.17 ± 3.68	15.99 ± 1.11	5.17 ± 0.25	4.39 ± 0.35
168 小时针刺组	59.97 ± 5.01	17.20 ± 1.11	6.36 ± 0.33	5.19 ± 0.16

义($P < 0.05$);168 小时针刺组与模型组比较(P 值 0.92),差异无统计学意义($P > 0.05$)。

3 天时 2 小时、72 小时针刺组均可不同程度提高 Bcl-2 蛋白表达,降低 Bax 蛋白表达,优于 168 小时针刺组和模型组;2 小时针刺组优于 72 小时针刺组。

(3) 7 天时比较:采用 LSD 法,Bcl-2 蛋白表达:2 小时针刺组分别与模型组、72 小时、168 小时针刺组比较(P 值 0.0001,0.0005,0.0002),差异有统计学意义($P < 0.001$);72 小时针刺组分别与模型组、168 小时针刺组比较(P 值 0.0003,0.0041),差异有统计学意义($P < 0.001, P < 0.01$);168 小时针刺组与模型组比较(P 值 0.53),差异无统计学意义($P > 0.05$)。

Bax 蛋白表达:2 小时针刺组分别与模型组、72 小时针刺组、168 小时针刺组比较(P 值 0.0006,0.037,0.0005),差异有统计学意义($P < 0.001, P > 0.05, P < 0.001$);72 小时针刺组分别与模型组、168 小时针刺组比较(P 值 0.0008,0.016),差异有统计学意义($P < 0.001, P < 0.05$);168 小时针刺组与模型组比较(P 值 0.83),差异无统计学意义($P > 0.05$)。

在 7 天时 2 小时、72 小时针刺组均可不同程度提高 Bcl-2 蛋白表达,降低 Bax 蛋白表达,优于 168 小时针刺组和模型组;2 小时针刺组优于 72 小时针刺组。

(4) 14 天时比较:采用 LSD 法,Bcl-2 蛋白表达:2 小时针刺组分别与模型组、72 小时、168 小时

针刺组比较(P 值 0.0007,0.003,0.0006),差异均有统计学意义($P < 0.001, P < 0.01$);72 小时针刺组分别与模型组、168 小时针刺组比较(P 值 0.0002,0.006),差异有统计学意义($P < 0.001, P < 0.01$);168 小时针刺组与模型组比较(P 值 0.007),差异有统计学意义($P < 0.01$)。

Bax 蛋白表达:2 小时针刺组分别与模型组、168 小时针刺组比较(P 值 0.005,0.016),差异均有统计学意义($P < 0.001, P < 0.05$);2 小时与 72 小时针刺组比较(P 值 0.57),差异无统计学意义($P > 0.05$);72 小时针刺组分别与模型组、168 小时针刺组比较(P 值 0.008,0.034),差异有统计学意义($P < 0.001, P < 0.05$);168 小时针刺组与模型组比较(P 值 0.0091),差异有统计学意义($P < 0.05$)。

14 天时:2 小时、72 小时、168 小时针刺组均可不同程度提高 Bcl-2 蛋白表达,优于模型组。2 小时针刺组优于 72 小时针刺组优于 168 小时针刺组。三个针刺组均可不同程度降低 Bax 蛋白表达,优于模型组,2 小时针刺组和 72 小时针刺组水平相当,都优于 168 小时针刺组。

3 讨论

针刺能够有效改善缺血性中风大鼠的神经功能,已经在临床中得到了有效的证实。Garcia 复合评分法,从大鼠自主运动、体态对称性、前肢伸展功能、网屏实验、身体双侧触觉、双侧胡须反射等 6 个

方面评定大鼠神经功能损伤的程度^[4],避免单一评价方法的片面及主观性,评价指标相对固定和客观,且可操作性好。通过大量的临床观察,笔者及团队发现不同的时间点开始针刺治疗对缺血性中风患者神经功能评分有统计学意义的差异,由此推断缺血性中风可能存在着一个时间窗效应,在某一特定时间窗内介入针刺治疗可获得最大的临床疗效。在本研究中采用了 Garcia 复合评分法,在大鼠脑缺血后 2 小时、72 小时、168 小时三个时间分别开始针刺,在 1、3、7、14 天做动态观察,从多角度评价神经功能缺损程度,证实针刺可明显提高缺血性中风大鼠的 Garcia 评分,改善其运动、感觉和协调功能。分析针刺介入时机对缺血性中风大鼠神经功能的影响,研究结果证明中风后 2 小时开始介入针刺治疗疗效最好,优于 72 小时、168 小时针刺组。

缺血性中风发生的神经细胞死亡形式分为坏死和细胞凋亡(programmed cell death, PCD)两大类^[5],PCD 是缺血过程中神经元损伤的一种形式,在缺血性中风急性期,缺血中心区脑血流急剧下降,神经细胞死亡以坏死为主;而缺血中心区周围(缺血半暗带)的神经细胞仍具有代谢活力,其后续的死亡形式以凋亡为主,通过挽救缺血半暗带的神经细胞,干扰细胞死亡的通路是治疗缺血性中风的新途径。神经细胞发生 PCD 的基因学说认为,许多基因可诱发或抑制细胞的 PCD。Bcl-2 基因,是与缺血性中风神经元凋亡关系最密切的内源性凋亡抑制基因,是原癌基因的一种,其蛋白产物主要位于细胞线粒体外膜、内质网和核周膜上,其突出作用是通过抑制细胞凋亡来促进细胞存活。Bax 是 Bcl-2 功能相对的同源基因,二者的蛋白产物形成异源二聚体能调节膜的通透性,达到抑制凋亡的目的。正常细胞中,Bcl-2 和 Bax 形成二聚体处于平衡状态,脑缺血后 Bcl-2 的过量表达可抑制由于谷氨酸释放、生长因子缺乏和自由基等刺激诱导的中枢神经细胞的死亡,Bcl-2 表达水平增高可通过抑制 Bax 表达来阻断细胞凋亡^[6]。Bcl-2 基因对缺血性中风有明显治疗作用,是保护神经细胞在遭受损伤后免于死亡的一种积极的生存机制。而 Bax 表达过度,形成同源二聚体增多,可拮抗 Bcl-2 的保护效应而使细胞趋于凋亡。

本实验结果表明,缺血性中风大鼠术后不同时间点缺血半暗带内的 Bcl-2、Bax 蛋白表达均有不同程度的增高,在 1 天时达到高峰,随后下降,与假手术组在 4 个时间点比较差异均有统计学意义。3 个针刺组与模型组比较,Bcl-2 蛋白表达呈增高趋势,Bax 蛋白表达呈减少的趋势,术后 2 小时针刺组与模型组、72 小时针刺组、168 小时针刺组比较均能明显提高 Bcl-2 蛋白的表达,抑制 Bax 蛋白表达,差异有统计学意义;72 小时与 168 小时针刺组比较也同样明显提高 Bcl-2 的表达,抑制 Bax 蛋白表达,差异均有统计学意义。提示在缺血性中风大鼠模型中,内源性 Bcl-2 蛋白对神经细胞缺血非常敏感,早期即参与大脑缺血缺氧的病理过程,其表达水平随缺血时间呈动态变化。不同实验^[7]中 Bcl-2 表达的高峰和持续的时间窗不同,这可能与试验标本、部位、缺血的类型程度等不同有关。针刺可通过调节 Bcl-2、Bax 蛋白表达来抑制缺血性中风大鼠神经细胞凋亡;可以挽救因缺血受损的神经细胞功能,从而降低缺血性中风的致残率,而且在缺血性中风后越早介入针刺疗效越好,存在一个最佳治疗时间窗,通过本研究为针刺治疗缺血性中风在临床的规范化推广应用提供了新的实验室依据。

参 考 文 献

- [1] 李曼,方媛.不同时间窗电针治疗对脑梗死大鼠 Bcl-2 和 BDNF 表达的影响[J].中风与神经疾病杂志,2009,26(5):603-605.
- [2] 温浩,侯月梅.人类疾病动物模型研究和实验动物管理[M].北京:科学出版社,2012:137-138.
- [3] 李忠仁.实验针灸学[M].北京:中国中医药出版社,2007:219-253.
- [4] 乔琳,胡彬,刘勇.两种神经功能评分评价大鼠局灶性脑缺血模型的初步研究[J].山西医科大学学报,2012,43(12):893-895.
- [5] 赵建国.脑梗死[M].北京:人民卫生出版社,2012:14-15.
- [6] 孙世晓,刘泓雨.电针对局灶性脑缺血大鼠半暗带神经细胞凋亡及凋亡相关基因 Bcl-2、Bax、c-Fos 蛋白表达的影响[J].中医药学报,2011,39(1):69-72.
- [7] 张迪,邓俏.电针百会、风府穴对学习记忆障碍大鼠 Bcl-2/Bax 基因表达的影响[J].中医药信息,2013,30(1):73-74.

(收稿日期:2014-04-09)

(本文编辑:黄凡)