

实验研究

通利枢机针刺法对脑缺血大鼠 Notch1 的影响及机制*

惠建荣^{1**} 吕瑶² 李永峰¹ 张瑞³

(1. 陕西中医药大学第二附属医院, 陕西 咸阳 712000;

2. 铜川市人民医院, 陕西 铜川 727031; 3. 安康市中医医院, 陕西 安康 725000)

摘要:目的 探讨通利枢机针刺法对脑缺血大鼠神经功能修复作用及对 Notch1 蛋白表达的影响及机制。
方法 60 只雄性 SD 大鼠随机选取 10 只作为假手术组, 余 50 只线栓法 MCAO 造模后将造模成功者随机分为模型对照组、利枢针刺组、普通针刺组及西药灌胃组, 予以各组造模后 1 天、3 天、7 天、14 天时间点进行神经功能评分; 14d 后处死大鼠部分测定脑梗死体积百分比, 部分检测 Notch1 蛋白的表达水平。**结果** 术后 7 天及 14d 时, 利枢针刺法神经缺损情况较其他组明显改善 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$); 与其他组相比较, 利枢针刺法可明显降低脑梗死体积 ($P < 0.01$); 与其他组相比较, 利枢针刺法可促进脑缺血后 Notch1 蛋白的表达, 其效果优于普通针刺法及西药灌胃法 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。**结论** 利枢针刺法能有效改善脑缺血大鼠神经功能评分和脑梗死体积, 并促进 Notch1 蛋白的表达, 其作用机制可能与 Notch 信号通路相关。

关键词: 利枢针刺法; 缺血性脑中风; Notch 信号通路; Notch1 蛋白

中图分类号: R289.51 **文献标识码:** A **文章编号:** 2096-1340(2020)01-0062-07

DOI: 10.13424/j.cnki.jsctcm.2020.01.017

Effect and Mechanism of Pivot Function Promoting Acupuncture on Notch1 in Rats with Cerebral Ischemia

Hui Jianrong¹, Lv Yao², Li Yongfeng¹, Zhang Rui³

(1. The Second Affiliated Hospital of Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang China, 712000;

2. People's Hospital of Tongchuan, Tongchuan China, 727031; 3. Ankang TCM Hospital, Ankang China, 725000)

Abstract: Objective To investigate the effect of Pivot Function Promoting Acupuncture on neurological function repair and Notch 1 protein expression in rats with cerebral ischemia. **Methods** 10 out of the 60 male SD rats were randomly selected as the sham operation group. The remaining 50 rats were randomly divided into model control group, Lishu Acupuncture (Pivot Function Promoting Acupuncture) group, ordinary acupuncture group and Western medicine lavage group after MCAO modeling by suture method. Neurological function scores were obtained at the first day, third days, seventh day, and fourteenth day after modeling. The rats were sacrificed after 14 days to determine the percentage of cerebral infarction volume and the expression of Notch1 protein partially. **Results** On the 7th and 14th day after operation, compared with other groups, the nerve defect by Lishu Acupuncture was significantly improved ($P < 0.01$); Lishu Acupuncture

* **基金项目:** 国家重点研发计划项目(2018YFC1704606); 陕西省科技厅科技计划项目(2016JQ8020); 陕西省教育厅科技计划项目(14JK1211); 咸阳市科技局项目(2017k-02-101); 陕西省中医药管理局科研项目(LCPT103)

** **作者简介:** 惠建荣(1978-), 女, 副教授, 研究方向: 中医、针灸防治疑难疾病的机理与临床研究。E-mail: 157600958@qq.com

could significantly reduce the volume of cerebral infarction ($P < 0.01$); it could promote the expression of Notch-1 protein after cerebral ischemia, and its effect was better than that of common acupuncture and Western medicine of lavage ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** Lishu Acupuncture can effectively improve the neurological function score and cerebral infarction volume in rats with cerebral ischemia, and promote the expression of Notch1 protein. The mechanism may be related to the Notch signaling pathway.

Keywords: Pivot Function Promoting Acupuncture; ischemic cerebral apoplexy; Notch signaling pathway; Notch1 protein

脑中风是神经系统的临床常见病及多发病, 又称脑血管意外或脑卒中。随着社会人口老龄化程度加速, 该病目前已然成为仅次于心脏病和癌症的全球第三大致死原因^[1], 在我国居民死亡和成人致残病因中居于首位^[2], 其中 80% 左右属缺血性脑中风^[3]。主要是从参与调节神经干细胞 (neural stem cells, 简称 NSCs) 分化, 从而有效改善神经功能缺损情况。相关研究表明: 在缺血性脑中风过程中, 激活 Notch 信号通路可通过调节内源性 NSCs 增殖分化^[4], 促进血管新生、参与炎症反应三方面进行调控^[5], 进而加强缺血性脑中风后神经再生及修复^[6], 从而在一定程度上改善神经功能的缺损。此外, 还有研究发现^[7] 针刺治疗可通过刺激调控凋亡通道的关闭与开放, 从而抑制损伤神经细胞的凋亡以及通过对局部神经生长微环境产生有效刺激, 双重提高神经营养因子的水平对脑血管再生及神经元产生脑保护的作用, 以达到对缺血性脑中风的的治疗目的。由此提示, 针刺对缺血性脑中风病的神经保护作用, 可能与 Notch 信号通路存在着某种关联性。

基于中医学“少阳枢”“少阳枢机不利”理论, 课题组提出“通利枢机针刺法”以治疗缺血性中风, 在前期临床研究中初步发现该方法可明显提高该病患者的肢体运动功能^[8], 但其作用机制尚未明确且缺乏实验数据支持。利枢针刺法对实验动物神经系统的作用如何? 是否与 Notch 信号通路也存在着某种联系? 以上种种疑问尚有待挖掘及探讨。

因此, 本研究在建立稳定的雄性 SD 大鼠右侧大脑中动脉闭塞 (middle cerebral artery occlusion, 简称 MCAO) 模型基础上, 选择 Notch 信号通路作为切入点, 通过对缺血性脑中风大鼠进行神经功能缺损评分、脑梗死百分比体积的测定及蛋白质

印迹法 (western blot 法) 检测 Notch1 蛋白的表达水平三方面进行分析, 以探究利枢针刺法对缺血性脑中风的影响及可能作用机制, 为进一步建立利枢针刺法防治缺血性脑中风病提供确切的方法和实验依据。

1 材料与方法

1.1 药物、主要试剂及仪器 胞磷胆碱钠胶囊: 齐鲁制药有限公司, 批号: 7B0331E20 [HRP-羊抗兔 IgG, 批号: BSTI2H24C54 (由武汉博士德公司提供) [兔抗鼠多克隆 Notch1 抗体: 批号: AG08166820、Rabbit Anti- β -Actin: 批号: AG07197903 (由北京博奥森公司提供) [眼科剪、眼科镊、华佗牌 0.25 × 13mm 无菌针灸针、强力钓鱼线 (直径 0.26mm) [Western Blot 电泳设备: 美国 BIO-RAD 公司 [酶标仪: EON-1211161, 美国伯腾仪器有限公司等。

1.2 动物、分组及造模 健康雄性 SD 大鼠 60 只 (由西安交大医学部实验动物中心提供), 体质量均控制在 (200 ~ 250) g 范围内, 动物合格证号为 SCXK (陕) 2012-003。购回后于陕西中医药大学十楼实验动物中心适应性喂养 1 周, 造模前体质量控制在 (250 ~ 300) g。所有对大鼠进行的操作及饲养流程均遵循人道原则且符合实验动物管理饲养条例。随机选取 10 只大鼠不结扎且不放入线栓, 仅游离相关血管作为假手术组 (简称“Sham 组”), 余 50 只参考 Longa 等^[9] 的方法制备右侧大脑中动脉阻塞 (MCAO) 局灶性脑缺血模型, 参考 Zea Longa^[9] 的 5 分制法, 舍弃 0 分无症状以及 4 分症状过重者, 筛选出 1 ~ 3 分为造模成功者, 将其随机分为模型对照组 (简称“MCAO 组”)、利枢针刺组 (简称“LS 组”)、普通针刺组 (简称“CA 组”)、西药灌胃组 (简称“ig 组”), 共 5 组。

1.3 干预方法 MCAO 组及 Sham 组: 每日抓拿 1

次,75%酒精消毒相应治疗穴位(阳陵泉、外关)LS组选取少阳经穴位:阳陵泉、外关,CA组选取穴位:百会、大椎(两组针刺组的取穴及操作标准均参照《实验针灸学》^[10]);ig组给予胞磷胆碱钠胶囊(4mg/kg)灌胃,日1次。各组均于造模后24h开始干预治疗,以24小时为周期,每日治疗1次,直到大鼠处死。针刺干预各组均选用规格为0.25×13mm华佗牌针灸针,75%酒精消毒后进行针刺治疗,四肢穴位仅针患侧(即左侧),留针15min,期间施平补平泻手法1次。

1.4 检测方法

1.4.1 神经功能评分 以Zea Longa EL^[9]的5分制法为参考,剔除0分无症状及4分症状过重者,将1-3分者视为造模成功,分别以造模后1d、3d、7d、14d为时间点,评定实验动物的神经功能缺损情况,并作以对比。

1.4.2 TTC染色法测脑梗死体积百分比 14d评分结束后,每组随机选出部分大鼠取出脑组织后用新鲜配制的1% TTC溶液37℃条件下孵育30min后进行染色,4%多聚甲醛4℃条件下固定24h后数码相机拍照,Adobe Photoshop 7.0图像处理软件分析系统分析图片。采用测定每一个脑片梗死面积的方法,缺血侧脑组织损伤程度依据对侧与缺血侧侧脑组织体积比值来反应。计算用校正损伤脑水肿的方法,如下:校正后梗死体积百分比=(对侧脑组织体积-缺血侧正常脑组织体积)÷对侧脑组织体积×100%。

1.4.3 Western blot法测Notch1蛋白表达水平 取20μg待测样品及标准蛋白于SDS-PAGE电泳(浓缩胶与分离胶电压分别设置为70V、110V,时

间分别设置为40min、2h)。电泳分离后转膜至PVDF膜上(转膜电流380mA,时间2h),用TBST溶液配置的5%脱脂牛奶封闭1h,兔抗鼠多克隆Notch1抗体(1:2000比例稀释)11.4℃孵育过夜,辣根过氧化物酶标记羊抗兔二抗(1:5000比例稀释)室温摇床孵育1h,洗膜后,采用ECL化学发光法显色。设β-actin为内参对照,凝胶图像处理分析系统分析处理相对灰度值后进行统计分析。

1.5 统计学方法 采用SPSS 19.0进行统计分析,计量资料均采用“均数±标准差”表示,采用单因素方差分析(one-way ANOVA),组间采用配对样本t检验进行比较。(P<0.05为有差异,P<0.01为显著性差异)。

2 结果

2.1 利枢针刺法改善缺血性脑中风大鼠神经功能缺损评分 任何时间点下Sham组大鼠均无神经功能缺损表现,而进行线栓法造模的四组大鼠均出现了不同程度的神经功能缺损症状,提示造模成功。LS组、CA组及ig组在术后1d、3d时与MCAO组相比神经功能缺损症状均无明显改善,各组间不存在统计学差异(P>0.05);术后7d与MCAO组进行比较,LS组、CA组改善较大,评分明显降低,存在统计学差异(P<0.05);ig组改善不明显,不存在差异(P>0.05);术后14d与MCAO组进行比较,LS组、CA组及ig组评分继续下降,神经功能明显改善,均具有差异(P<0.05),其中LS组、CA组神经功能缺损改善非常明显,与MCAO组及ig组相比均存在显著差异(P<0.01),LS组、CA组之间存在差异(P<0.05)(表1,图1)。

表1 不同时间点神经功能缺损评分(̄x±s)

分组	n	术后 1d	术后 3d	术后 7d	术后 14d
假手术组	10	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
模型对照组	7	2.57±0.54	2.43±0.54	2.29±0.49	2.14±0.38
利枢针刺组	8	2.50±0.54	2.25±0.46	1.88±0.35*	0.75±0.46*■▲
普通针刺组	8	2.38±0.52	2.13±0.35	1.88±0.35*	1.13±0.35*■△
西药灌胃组	7	2.43±0.54	2.29±0.49	2.00±0.00	1.71±0.49*

注:P<0.05*,P<0.01■,与模型对照组对比(vs model group);P<0.01△,与西药灌胃组对比(vs gavage group);P<0.05▲,与普通针刺组对比(vs Common-Acu group)

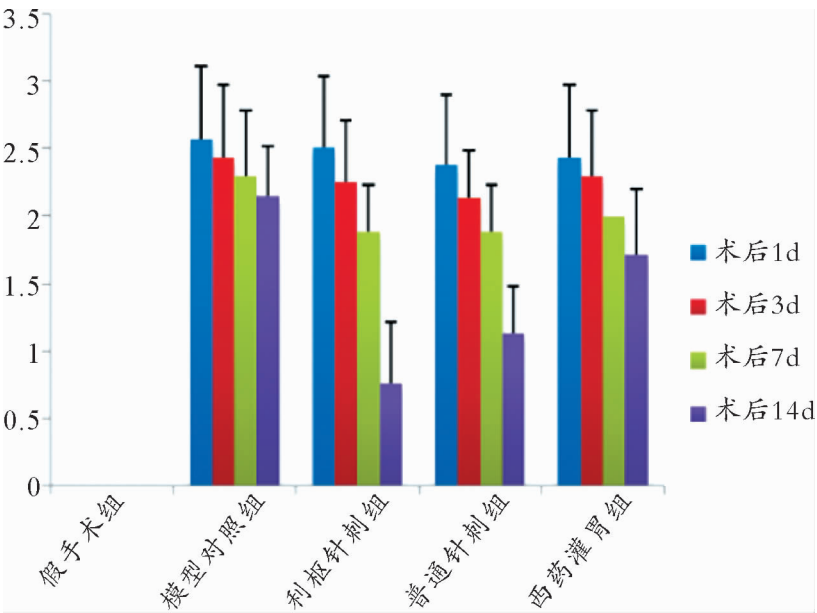


图 1 不同时间点神经功能缺损评分直方图

2.2 利枢针刺法可有效降低缺血性脑中风大鼠脑梗死体积 14d 时, Sham 组大鼠脑切片全部呈现红染, 未见苍白梗死灶形成; 而进行线栓法造模的四组大鼠脑切片中均可见明显苍白色梗死灶, 提示本次造模成功, 缺血后脑梗死体积分别占整个脑组织体积的 18. 12%、10. 83%、13. 82%、14. 97%, 均具有非常显著的差异 ($P < 0. 01$); 与 MCAO 组比较, LS 组、CA 组及 ig 组缺血梗死区域明显缩小, 梗死区域体积百分比值明显走低 ($P < 0. 01$); 与 ig 组比较, LS 组、CA 组梗死区域明显缩小 ($P < 0. 01$); LS 组与 CA 组间缺血梗死区域亦有显著差异 ($P < 0. 01$) (表 2、图 2、图 3)。

表 2 脑梗死体积百分比 (%) , $\bar{x} \pm s$

分组	n	脑梗死体积百分比 (%)
假手术组	5	0. 000 ± 0. 000
模型对照组	3	18. 123 ± 0. 282 *
利枢针刺组	4	10. 828 ± 0. 415 * △ ▲ ■
普通针刺组	4	13. 815 ± 0. 429 * △ ▲
西药灌胃组	3	14. 967 ± 0. 323 * △

注: $P < 0. 01$ *, 与假手术组对比; $P < 0. 01$ △, 与模型对照组对比; $P < 0. 01$ ▲, 与西药灌胃组对比; $P < 0. 01$ ■, 与普通针刺组对比。

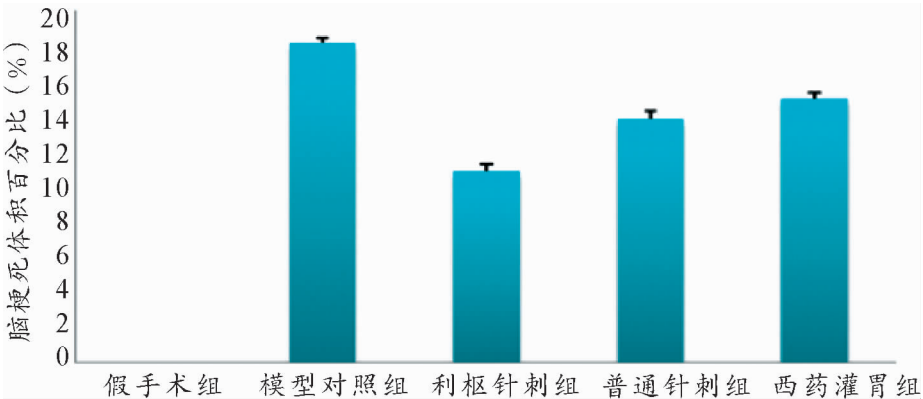


图 2 脑梗死体积百分比直方图

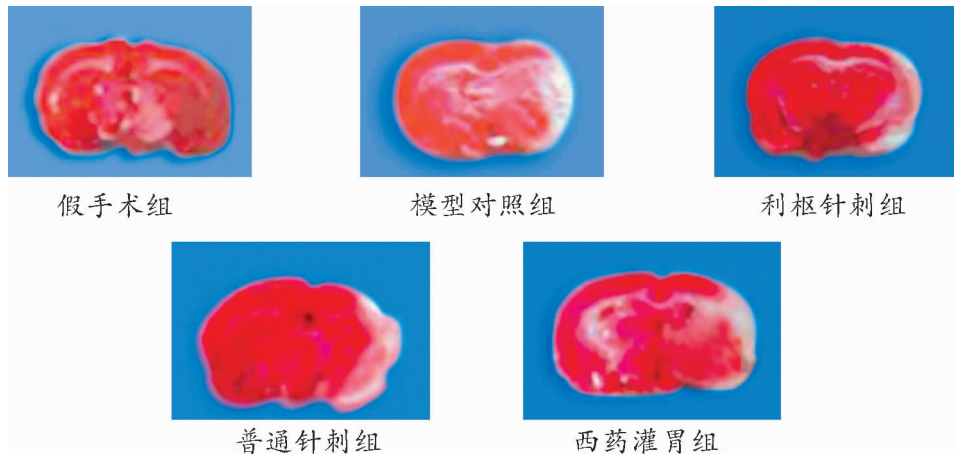


图 3 脑组织 TTC 染色结果

2.3 利枢针刺法可促进 Notch1 蛋白的表达 各组大鼠 14d 时 Notch1 蛋白均有不同程度的表达, Sham 组大鼠脑内 Notch1 蛋白表达较弱, MCAO 组、LS 组、CA 组及 ig 组大鼠脑内 Notch1 蛋白表达均有所增强 ($P < 0.05$), 其中三组治疗组与 Sham 组相比有显著差异 ($P < 0.01$); 与 MCAO 组相比,

LS 组、CA 组大鼠脑内 Notch1 蛋白表达明显增强 ($P < 0.01$), 与 ig 组相比亦有显著差异 ($P < 0.01$); ig 组与 MCAO 组相比有显著差异 ($P < 0.01$); 两组针刺组之间比较有统计学上的差异 ($P < 0.05$) (表 3, 图 4, 图 5)。

表 3 Notch1 蛋白的表达水平 ($\bar{x} \pm s$)

分组	n	Notch1 蛋白的表达水平
假手术组	5	0.071 ± 0.007
模型对照组	4	0.131 ± 0.022 ■
利枢针刺组	4	0.643 ± 0.050 * ▲ ■ ○
普通针刺组	4	0.587 ± 0.020 * ▲ ■
西药灌胃组	4	0.201 ± 0.045 * ▲ △

注: $P < 0.05$ *, $P < 0.01$ ▲, 与假手术组对比; $P < 0.01$ △, 与模型对照组对比; $P < 0.01$ ■, 与西药灌胃组对比; $P < 0.05$ ○, 与普通针刺组对比

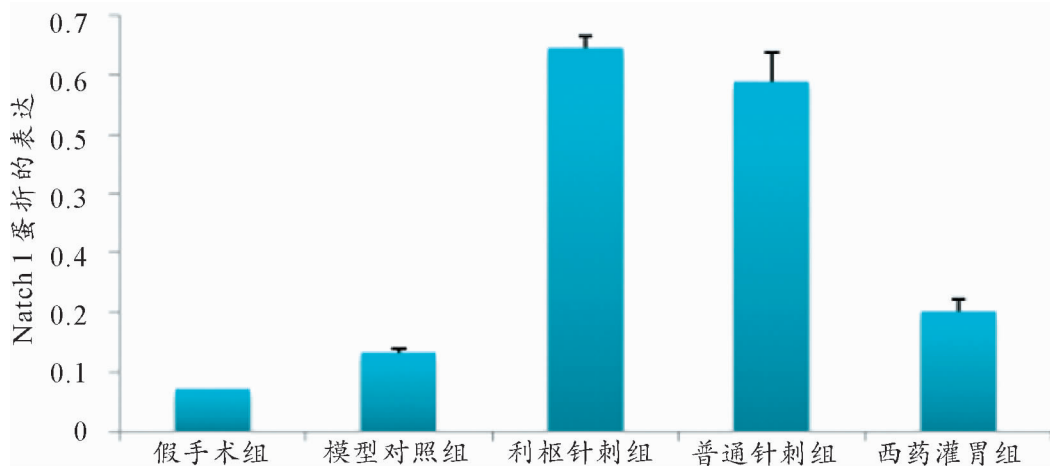


图 4 Notch1 蛋白表达情况直方图

Notch 1

β -Actin

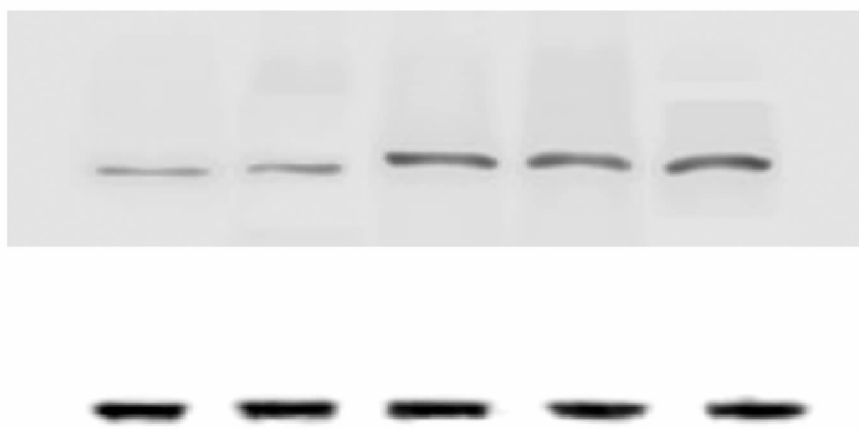


图5 各组 Notch1 蛋白表达情况

注:A 假手术组;B 模型对照组;C 利枢针刺组;D 普通针刺组;E 西药灌胃组

3 讨论

“少阳主枢”理论源于《素问·阴阳离合论》中所提及“三阳之离合也,太阳为开,阳明为阖,少阳为枢”^[11]。结合缺血性脑中风脏腑气血阴阳失调,直冲犯脑,所致脑脉痹阻的病机特点,课题组提出设想,枢转气机,使气机开阖有度,调节阴阳消长,则一切类似中风之现象,自然可得以消除。

本实验所选外关、阳陵泉二穴配伍应用,属“同名经配穴”,为求“同气相通”,能更大程度上发挥通利枢机、调节一身气血阴阳的作用。有研究表明:针刺阳陵泉可促进偏瘫患者重塑脑功能,而这一作用是通过调节运动感觉相关脑区活动达到的^[13]。外关穴为三焦经之络穴,亦通于阳维脉,别走心主厥阴,有“外来之物如被关卡不得入于三焦经”之意,蔺耐荣^[14]等基于频数统计的方法总结出外关穴有止血、疏胁理肋、疏理上肢、清头健脑等多重作用。张贵锋等^[15]进行研究后提出对缺血性脑卒中一病针刺外关穴后起效机制可能依靠对外关穴主治作用相关的脑区进行激活与负激活,对构成脑默认模式网络的脑区进行负激活从而共同发挥作用。有学者对手足少阳经同名经穴配伍进行 fMRI 脑功能成像研究表明,该法具有加强对运动、平衡以及感觉等障碍治疗的作用^[16]。综上所述,选择阳陵泉、外关二穴,以期奏“通利枢机,使其条达,以致平和”之功。

大量临床及实验研究发现:内源性 NSCs 具有

一定的自我更新能力^[17]。因此促进中枢神经系统内源性 NSCs 的分化,从而修复受损神经元是提高缺血性中风临床疗效的关键点。研究发现,缺血性脑中风后激活 Notch 信号通路会促进内源性 NSCs 增殖,并向缺血损伤部位进行迁移,从而促进神经再生和修复^[18]。针刺可对 Notch 信号通路产生一定影响,从而扩增内源性 NSCs 增殖,进而修复缺血后相关神经功能。

从本次实验 Western blot 结果来看,进行线栓法造模的各组 Notch - 1 蛋白表达均明显增多,提示脑缺血可激活 Notch 信号通路,增强其中 Notch - 1 蛋白的表达。与模型对照组比较,通过针刺及西药灌胃治疗的大鼠 Notch - 1 蛋白表达水平更高,提示通过药物或针刺干预可进一步活化 Notch 信号通路,从而提高 Notch1 蛋白表达水平。与西药灌胃组及普通针刺组相比,利枢针刺法更能促进大鼠缺血性中风后海马区域 Notch - 1 蛋白的表达。

综上所述,利枢针刺法可改善缺血后神经功能缺损情况及降低梗死体积,促进缺血后 Notch - 1 蛋白的表达,其机制可能通过激活与调节 Notch 信号通路,促进内源性神经干细胞的增殖,从而促进缺血后神经系统的修复与再生,达到治疗目的,但鉴于本次实验样本量较小,所选指标较单一,二者之间具体联系仍需后续实验反复验证。

参考文献

[1] Roger VL, Go AS, Lloyd - Jones DM, et al. American Heart

- Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee, Heart disease and stroke statistics – 2011 update: a report from the American Heart Association [J]. *Circulation*, 2011, 123(4): e18 – e209.
- [2] Johnston S C, Mendis S, Mathers C D, et al. Global variation in stroke burden and mortality: estimates from monitoring, surveillance, and modelling [J]. *Lancet Neurol*, 2009, 8(4): 345 – 354.
- [3] 温少红, 吴迪, 刘向荣, 等. 缺血性脑血管病后小胶质细胞极化的研究进展 [J]. *中国脑血管病杂志*, 2017, 14(3): 159 – 163.
- [4] Oya S, Yoshikawa G, Takai K, et al. Attenuation of Notch Signaling Promotes the Differentiation of Neural Progenitors into Neurons in the Hippocampal CA1 Region after Ischemic Injury [J]. *Neuroscience*, 2009, 158: 683 – 692.
- [5] 周强, 李朝晖. Notch 信号通路在脑缺血的研究进展 [J]. *临床与病理杂志*, 2015, 35(3): 449 – 454.
- [6] 何金婷. Notch 通路在脑缺血损伤中的作用及信号转导机制研究 [D]. 吉林: 吉林大学, 2012.
- [7] 张利达, 高永龙, 蔡兴慧, 等. 近 5 年针刺保护神经作用研究概况 [J]. *陕西中医药大学学报*, 2017, 40(4): 137 – 138.
- [8] 惠建荣, 庞苗苗, 赵娟, 等. 通利枢机针刺法辅助治疗缺血性脑血管病 31 例临床观察 [J]. *中医杂志*, 2016, 57(12): 1037 – 1040.
- [9] Zea Longa EL, Weinstein P R, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84 – 91.
- [10] 邓春雷, 殷克敬. 实验针灸学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1998: 100 – 150.
- [11] 高士宗. 素问直解 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2014: 28 – 29.
- [12] 魏书航. 针刺阳陵泉穴治疗痉挛瘫痪 40 例临床观察 [J]. *中国实用神经疾病杂志*, 2014, 17(4): 73 – 74.
- [13] 付彩红, 李匡时, 邹忆怀. 针刺阳陵泉对中风偏瘫患者感觉运动网络影响的 fMRI 研究 [J]. *天津中医药*, 2016, 33(5): 260 – 264.
- [14] 蔺耐荣, 黄银兰, 李洋洋, 等. 基于频数统计方法的环跳、手三里、外关穴主治病症的古代文献研究 [J]. *陕西中医药大学学报*, 2018, 41(2): 71 – 73.
- [15] 张贵锋, 黄泳, 唐纯志, 等. 基于功能性磁共振成像在正常与病理状态下针刺外关穴时脑负激活的脑区定位研究 [J]. *中国全科医学*, 2017, 20(9): 1098 – 1103.
- [16] 黄泳, 李天乐, 赖新生, 等. 针刺外关与外关配伍阳陵泉穴的脑部功能性磁共振成像 [J]. *中西医结合学报*, 2009, 7(6): 527 – 531.
- [17] Okano H. Neural stem cells and strategies for the regeneration of the central nervous system [J]. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, 2010, 86(4): 438 – 450.
- [18] Johnson EA. HIF takes it up a notch [J]. *Sci Signal*, 2011, 4(181): 1126 – 1128.

(收稿日期: 2018-08-01 编辑: 文颖娟)