

银杏叶提取物缓释剂穴位埋药线对局灶性脑缺血再灌注大鼠脑组织损伤及 Nrf2/HO-1 信号通路的影响

杨 静^{1*}, 吴凤芝², 李瑜霞³, 张冬森³

¹唐山市工人医院中医科, 唐山 063003; ²北京中医药大学, 北京 100029; ³唐山市工人医院神经内科, 唐山 063003

摘要: 银杏叶提取物缓释剂穴位埋药线对局灶性脑缺血再灌注损伤大鼠脑组织损伤及其对 Nrf2/HO-1 信号通路的影响。采用改良线栓法制备脑缺血再灌注大鼠模型, 银杏叶提取物缓释剂穴位埋药线后进行神经缺失症状评分, 测定神经细胞病理学, 检测丙二醛(MDA)、一氧化氮(NO)、超氧化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽(GSH)及脑组织 Nrf2 和 HO-1 mRNA 和蛋白的表达。结果表明银杏叶提取物缓释剂穴位埋药线可显著改善脑缺血再灌注模型动物的神经功能, 提高神经细胞存活率, 显著降低 MDA、NO 含量, 升高总 SOD 活性和 GSH 含量, 调节 Nrf2/HO-1 mRNA 和蛋白的表达水平。银杏叶提取物缓释剂穴位埋药线具有抗脑缺血再灌注损伤作用, 其机制可能与与激活 Nrf2/HO-1 途径, 促进了 Nrf2 的核转位, 使 HO-1 等抗氧化物质表达上调, 提高了机体对氧化损伤的抗性有关。

关键词: 脑缺血; 再灌注损伤; 银杏叶提取物; 穴位埋线; Nrf2; HO-1

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.1.005

Ginkgo biloba Extract Release Agent Acupoint Embedding Therapy Attenuates the Injury of Cerebral Ischemia/Reperfusion through Nrf2/HO-1 Signal Pathway

YANG Jing^{1*}, WU Feng-zhi², LI Yu-xia³, ZHANG Dong-sen³

¹Department of traditional Chinese medicine, The workers' hospital of Tangshan, Tangshan 063003, China;

²Beijing university of Chinese medicine, Beijing 100029, China;

³Department of neurology, The workers' hospital of Tangshan, Tangshan 063003, China

Abstract: The aim of this study was to observe the effects of *Ginkgo biloba* extract release agent acupoint embedding (GBER) therapy on brain injury and Nrf2/HO-1 signal pathway after cerebral ischemia/reperfusion in rats. Cerebral ischemia/reperfusion rat model was induced by the modified middle cerebral artery occlusion model (MCAO) method. The neurological deficit score and histopathological examination of hippocampal CA1 were performed. The levels of malondialdehyde (MDA), nitric oxide (NO), superoxide superoxide dismutase (SOD) and glutathione (GSH) were assayed. Nrf2/HO-1 mRNA and protein expressions of brain tissue were detected. The results showed that *G. biloba* extract sustained-release agent significantly increased the neurological deficit score, the number of neurons. GBER not only reduced the content of MDA and NO, but also augmented the activity of SOD and the content of GSH. The mRNA and protein of Nrf2/HO-1 in GBER group enhanced. These findings showed that GBER therapy attenuated the injury of cerebral ischemia/reperfusion via regulating Nrf2/HO-1 signal pathway.

Key words: cerebral ischemia; reperfusion injury; *Ginkgo biloba* extract; acupoint embedding; Nrf2; HO-1

研究表明, 银杏叶提取物具有扩张血管、改善微循环、抗氧化及抗衰老和抗痴呆的药理作用, 已被广泛应用于缺血性脑卒中的临床治疗中。穴位埋线疗法是在传统中医针灸的基础上发展而来的一种现代

疗法, 通过将药线埋入相应穴位而达到长时间刺激穴位的目的。研究证实^[1,2], 穴位埋线在治疗脑血管意外偏瘫后遗症方面的疗效与针灸相当, 且具有简便易行、痛苦小、作用持久的特点。但其在缺血性脑卒中急性期的中的应用研究报道较少。本研究采用胶原和银杏叶提取物制备缓释剂, 采用穴位埋药线的方式作用于局灶性脑缺血再灌注损伤大鼠, 观察了其对于脑组织损伤的修复作用及其对 Nrf2/HO-1

收稿日期: 2016-09-13 接受日期: 2016-11-22

基金项目: 河北省中医药管理局计划(2016130)

* 通讯作者 Tel: 86-315-6160046; E-mail: yangjingsy@yeah.net

途径的影响,旨在探讨银杏叶提取物缓释剂穴位埋药线对局灶性脑缺血再灌注损伤大鼠脑组织损伤的疗效及其初步作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

清洁级 SD 大鼠 80 只,雄性,体重(200 ± 20) g,由河北医科大学实验动物中心提供。大鼠饲养于 SPF 级动物实验室,湿度保持在 45% 左右,室温保持在 25 °C 左右。

1.2 银杏叶提取物缓释剂的制备

采用酸溶解法提取鼠尾肌腱胶原蛋白,银杏叶提取物注射液(由悦康药业集团有限公司生产,生产批号:20150612),每支含有银杏叶提取物 17.5 mg,其中银杏黄酮苷 4.2 mg,经液相色谱检测,纯度在 95% 以上,根据实验动物用药与人用剂量换算比例进行药物剂量的换算,按照 1:2 的比例配置银杏叶提取物胶原蛋白溶液,制成缓释剂药线,长度约 0.5 cm,其中含银杏叶提取物约 0.2 mg,干燥成型后,紫外灯照射消毒备用。

1.3 大鼠局灶性脑缺血再灌注模型的制备及筛选

所有大鼠均于术前 12 h 禁食,不禁水。采用 Zea-Longa 改良线栓法,10% 水合氯醛腹腔麻醉大鼠,制备大鼠大脑中动脉栓塞再灌注模型。大鼠手术后清醒半小时后,采用 Zea Long 法进行神经功能缺失症状评分,若大鼠清醒后提尾时左前肢内收屈曲,不能伸直,或爬行时向左侧转圈,严重时一侧肢体可完全瘫痪,行进时可出现身体向左跌倒为模型复制成功。造模过程中,5 只大鼠造模后死亡或不成功,采用备用大鼠补充且全部造模成功。

1.4 动物分组及给药方法

采用随机数字表法将大鼠随机分为 4 组:假手术组、模型组、穴位埋线组和电针组,每组 20 只。假手术组:参照模型组手术方法,麻醉大鼠并分离出颈总、颈内及颈外动脉,但不进行结扎及剪口,缝合伤口。并观察 5 天后取材备用。模型组:成功复制模型后,处理方法同假手术组。穴位埋药线组:造模成功后,大鼠清醒活动半小时后,给予穴位埋药线治疗。参照实验动物穴位图谱选取大椎、百会穴,将 28 号针灸针剪去针尖并磨平穿入 7 号注射针头制成埋药线工具,酒精浸泡消毒后,取大椎和百会穴备皮消毒,将银杏叶提取物缓释剂药线装入注射针头尖端,以 30° ~ 45° 的角度向前刺入百会穴深约 3

mm,轻柔推针灸针针柄,埋入药线,缓慢退出注射针头,大椎穴直刺 3 mm 埋药线,埋线后常规消毒。穴位埋药后处理方法同假手术组。电针组:造模成功后,采用 0.5 寸华佗牌无菌毫针刺大椎、百会及缺血侧内关穴,同时接通电针治疗仪,以频率 120 次/min 的连续波刺激穴位,强度 1 mA,以局部肌肉轻微抖动为度。每次治疗 30 min。实验过程中若出现动物死亡及时补充。各治疗组均在缺血再灌注后 1 h 治疗 1 次,后每日 1 次,共治疗 5 d 后取材,每组随机选取 6 只大鼠进行组织切片及 HE 染色分析,每组剩余 14 只大鼠断头取脑,在冰上分离留取视交叉前皮层脑组织,分成三部分,分别进行氧化应激指标、mRNA 和蛋白等相关指标的检测。

1.5 神经缺失症状评分方法

分别于再灌注 6 h 及治疗 5 d 后 2 个时间点采用文献报道的评分标准^[3]进行神经缺失症状评分,评分标准:①若提尾将大鼠悬空,手术对侧前肢无屈曲者计为 0 分,前肢腕屈者为 1 分,同时出现腕屈与肘屈者计为 2 分;②观察大鼠行走路径,向手术对侧无偏移者计为 0 分,出现偏移者计为 1 分,出现偏移呈圆形,甚至原地旋转者计为 2 分;③观察刺激大鼠手术对侧颊须的反应,反应灵敏者计为 0 分,不灵敏者计为 1 分,无反应者计为 2 分;④观察大鼠躯体向手术对侧的扭转情况,无扭转者计为 0 分,偶尔扭转者计为 1 分,频繁扭转者计为 2 分。总分共 8 分。以 2 次评分的平均值作为最终的神经学评分。

1.6 组织切片及 HE 染色

于造模结束并观察 5 d 后,每组大鼠随机选取的 6 只经 10% 的水合氯醛麻醉后并使其仰卧固定,经升主动脉插管,注入 4% 多聚甲醛 200 mL 内固定 30 min 后,迅速开颅取出脑组织,留取视交叉平面前后 2 mm 处脑冠状切面的中间部分在 4% 多聚甲醛固定液中过夜。常规 HE 染色后,观察神经细胞损伤情况,每张切片在 ×400 视野下取 5 个视野观察海马 CA1 区神经细胞染色情况,计算神经细胞存活率,即正常细胞占细胞总数的百分比,以 5 个视野的平均值作为最终的神经细胞存活率。

1.7 氧化应激指标的检测

将分离出的大鼠脑组织运用 PBS 均浆制成 10% 的匀浆液,4 °C 离心留取上清液,严格按照试剂盒说明书检测丙二醛(MDA)、一氧化氮(NO)、超氧化物歧化酶(SOD)及谷胱甘肽(GSH)的含量(试剂盒均购自南京建成生物工程研究所,批号分别为:

20150726,20150613,20150607)。

1.8 RT-PCR 法检测脑组织 Nrf2 和 HO-1 mRNA 的表达

将分离出的脑组织采用 Trizol 法提取脑组织总 mRNA,紫外分光光度计测定 A_{260}/A_{280} 的比值,以 1.8~2.0 为纯度合格的 RNA,并以 TAKARA 反转录试剂盒进行 cDNA 的反转录,同时以此为模板进行 PCR 扩增。运用 Primer Premier5.0 及 Oligo6 软件进行引物设计,Nrf2 上游引物:5'-TTCCTCTGCTGCTGCCATTAGTCAGTC-3',下游引物:5'-GCTCTTCATTTCCGAGTCACTG-3';HO-1 上游引物:5'-ACA-GAAGAGGCTAAGACCG-3',下游引物:5'-CAGGCATCTCCTTCCATT-3'。严格按照 PCR 试剂盒操作流程进行操作,共 20 μ L 的反应体系,扩增条件为 95 $^{\circ}$ C 2 min,94 $^{\circ}$ C 45 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 2 min,35 个循环,72 $^{\circ}$ C 10 min。扩增完成后,进行 1% 琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像系统成像后采用 Image-ProPlus 图像分析系统分析目的条带的相对强度(A),通过目的基因条带的 A 与 $A_{\beta\text{-actin}}$ 的比值作为目的基因表达的相对强度,运用相对表达强度作为值进行各组指标的表达情况进行比较。

1.9 Western-blot 法检测 Nrf2 和 HO-1 蛋白的表达

将分离出的脑组织采用全蛋白提取试剂盒(购自南京凯基生物科技发展有限公司,批号:20150114)提取全细胞、胞核及胞浆的蛋白。BCA 蛋白定量法进行蛋白定量后,全细胞蛋白质每孔加样量为 110 μ g,细胞浆蛋白质每孔加样量为 110 μ g,细胞核蛋白质每孔加样量为 50 μ g。上样后进行 8% 的 SDS-PAGE 凝胶电泳,后进行转膜,封闭,

表 1 银杏叶提取物缓释剂穴位埋药线对脑缺血再灌注大鼠神经评分和神经细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 20$)

Table 1 Effects of *G. biloba* extract release agent acupoint embedding therapy on the neuronal score and neuron cell survival rate in rats with cerebral ischemia/reperfusion injury ($\bar{x} \pm s, n = 20$)

组别 Group	神经缺失症状评分 Neurological deficit symptom scores	神经细胞存活率 Nerve cell survival
假手术组 Sham operation group	0.00 \pm 0.00	93.05 \pm 4.76
模型组 Model group	1.86 \pm 0.47 $\Delta\Delta$	50.23 \pm 8.92 $\Delta\Delta$
穴位埋药线组 Acupoint embedding group	0.69 \pm 0.15** \blacktriangle	87.65 \pm 6.03** \blacktriangle
电针组 Electroacupuncture group	0.98 \pm 0.32**	77.59 \pm 7.22**

注:模型组与假手术组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$;与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与电针组比较, $\blacktriangle P < 0.05$, $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$ 。下同。
Note:Model group vs sham operation group, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$;vs model group,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;vs electroacupuncture group, $\blacktriangle P < 0.05$, $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$. Same as below.

2.2 脑组织神经细胞损伤情况

经 HE 染色显示,假手术组大鼠脑组织结构清晰,形态正常,胞膜完整,核仁清晰,细胞染色均匀,

分别加入浓度为 1:1000 的兔抗小鼠 β -actin 抗体(购自 Santa Cruz 生物科技公司,批号:60019-1-1g)、1:500 的兔抗小鼠 Nrf2 抗体(购自 Santa Cruz 生物科技公司,批号:sc-10619)、1:500 的兔抗小鼠的 HO-1 抗体(购自 Santa Cruz 生物科技公司,批号:sc-745),4 $^{\circ}$ C 过夜,TBST 洗膜 3 次后,加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的浓度为 1:1000 的羊抗兔 IgG 二抗(购自北京中杉生物技术有限公司,批号:20150917)孵育,HRP-DAB 底物显色试剂盒进行显影发光,通过 Image Pro-Plus 6.0 图像分析软件进行目的条带的累积吸光度(IA)的检测,以总蛋白中的 β -actin 作为内参照,计算目的条带 IA 值与总蛋白 β -actinIA 值的比值,该比值即为目的蛋白的相对密度。

1.10 统计学分析

采用 SPSS 19.0 统计软件包进行数据分析。计量资料采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间均数比较采用单因素方差分析,两两比较方差齐采用 LSD 法,方差不齐采用 Dennett T3 法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 实验结果

2.1 神经缺失症状评分

模型组神经缺失症状评分显著高于假手术组,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。穴位埋线组和电针组神经缺失症状评分显著降低,与模型组相比,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。穴位埋药线组神经缺损症状评分低于电针组,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

未经神经细胞损伤。模型组脑组织细胞排列紊乱,结构不清,部分细胞肿胀明显,胞核固缩或溶解,胞浆出现“嗜伊红”染色,部分正常细胞结构消失,出

现空泡变化。穴位埋药线组神经细胞损伤情况明显减轻。穴位埋药线组和电针组神经细胞存活率显著高于模型组,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。穴

位埋药线组神经细胞存活率高于电针组,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。见图1、表2。

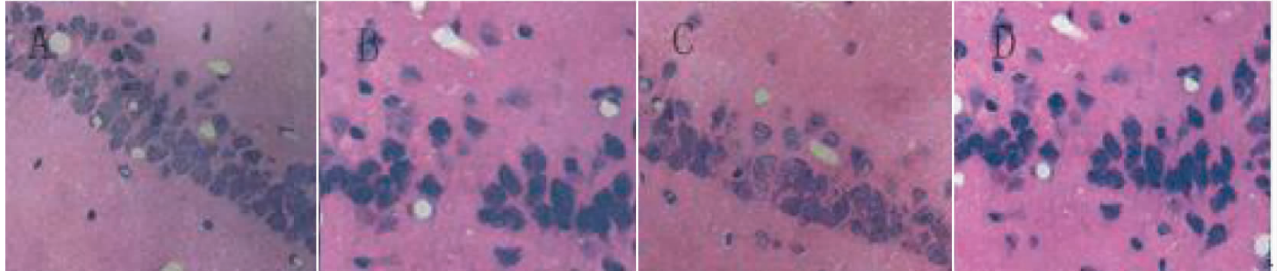


图1 银杏叶提取物缓释剂穴位埋药线对脑缺血再灌注大鼠海马CA1区神经细胞损伤情况的影响

Fig. 1 Effects of *G. biloba* extract release agent acupoint embedding therapy on neuronal injury in hippocampal CA1 region of rats with cerebral ischemia/reperfusion injury

注:A:假手术组;B:模型组;C:穴位埋药线组;D:电针组

Note: A: Sham operation group; B: Model group; C: Acupoint embedding group; D: Electroacupuncture group

2.3 氧化应激指标水平

模型组脑组织MDA、NO含量显著高于假手术组,总SOD活性和GSH含量显著低于假手术组,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。穴位埋药线组和电针组MDA、NO含量显著降低,总SOD活性和GSH

含量显著升高,与模型组相比,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。穴位埋药线组MDA和NO含量低于,总SOD活性和GSH含量高于电针组($P < 0.05$)。见表2。

表2 银杏叶提取物缓释剂穴位埋药线对脑缺血再灌注大鼠氧化应激指标的影响($\bar{x} \pm s, n = 20$)

Table 2 Effects of *G. biloba* extract release agent acupoint embedding therapy on oxidative stress indicators in rats with cerebral ischemia/reperfusion injury ($\bar{x} \pm s, n = 20$)

组别 Group	MDA ($\mu\text{mol/L}$)	NO ($\mu\text{mol/L}$)	SOD (kU/L)	GSH (mg/L)
假手术组 Sham operation group	29.13 ± 2.02	66.72 ± 11.47	25.79 ± 3.14	15.62 ± 1.88
模型组 Model group	$41.55 \pm 2.41^{\Delta\Delta}$	$89.55 \pm 9.06^{\Delta\Delta}$	$16.59 \pm 3.27^{\Delta\Delta}$	$7.97 \pm 1.32^{\Delta\Delta}$
穴位埋药线组 Acupoint embedding group	$32.17 \pm 3.09^{**\blacktriangle}$	$63.65 \pm 7.02^{**\blacktriangle}$	$20.87 \pm 2.45^{**\blacktriangle}$	$11.22 \pm 2.34^{**\blacktriangle}$
电针组 Electroacupuncture group	$37.64 \pm 2.91^{**}$	$75.42 \pm 8.19^{**}$	$19.22 \pm 4.11^{**}$	$9.02 \pm 2.16^{**}$

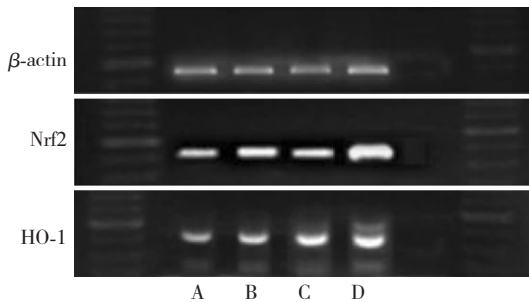


图2 银杏叶提取物缓释剂穴位埋药线对脑缺血再灌注大鼠脑组织Nrf2和HO-1 mRNA表达的影响

Fig. 2 Effects of *G. biloba* extract release agent acupoint embedding therapy on neuronal injury in Nrf2 and HO-1 mRNA of rats with cerebral ischemia/reperfusion injury

表3 银杏叶提取物缓释剂穴位埋药线对脑缺血再灌注大鼠脑组织Nrf2和HO-1 mRNA的相对表达量的影响($\bar{x} \pm s, n = 20$)

Table 3 Effects of *G. biloba* extract release agent acupoint embedding therapy on Nrf2 and HO-1 mRNA in brain tissue of Rats with cerebral ischemia/reperfusion injury ($\bar{x} \pm s, n = 20$)

组别 Group	Nrf2 mRNA	HO-1 mRNA
假手术组 Sham operation group	0.386 ± 0.011	0.153 ± 0.055
模型组 Model group	$0.524 \pm 0.062^{\Delta}$	$0.299 \pm 0.095^{\Delta}$
穴位埋药线组 Acupoint embedding group	0.579 ± 0.064	$0.615 \pm 0.087^{*\blacktriangle}$
电针组 Electroacupuncture group	0.546 ± 0.048	$0.447 \pm 0.075^{*}$

2.4 脑组织 Nrf2 和 HO-1 mRNA 的表达

模型组和穴位埋药线组 Nrf2 和 HO-1 mRNA 表达均显著高于假手术组,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。穴位埋药线组和电针组 Nrf2 mRNA 表达与模型组相比无显著性差异($P > 0.05$)。而穴位埋药线组和电针组 HO-1 mRNA 表达均显著高于模型组,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。穴位埋药线组 HO-1 mRNA 表达显著高于电针组,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。见图 2、表 3。

2.5 脑组织 Nrf2 和 HO-1 蛋白的表达

模型组胞浆和胞核 Nrf2 蛋白表达显著高于假手术组($P < 0.05$)。模型组 Nrf2 的核转位率显著增加,与假手术组相比,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。穴位埋药线组和电针组胞浆 Nrf2 蛋白表达显著低于模型组($P < 0.05$),胞核 Nrf2 蛋白表达显著高于模型组($P < 0.05$)。Nrf2 核转位率显著增加,与模型组相比,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。穴位埋药线组胞浆 Nrf2 蛋白表达显著低于电针组($P < 0.05$);胞核 Nrf2 蛋白表达显著高于电针组($P < 0.05$);Nrf2 的核转位率显著高于电针组

($P < 0.05$)。模型组 HO-1 蛋白表达显著高于假手术组($P < 0.05$)。穴位埋药线组和电针组 HO-1 蛋白表达显著高于模型组($P < 0.05$)。穴位埋药线组 HO-1 蛋白表达显著高于电针组($P < 0.05$)。见图 3、表 4。

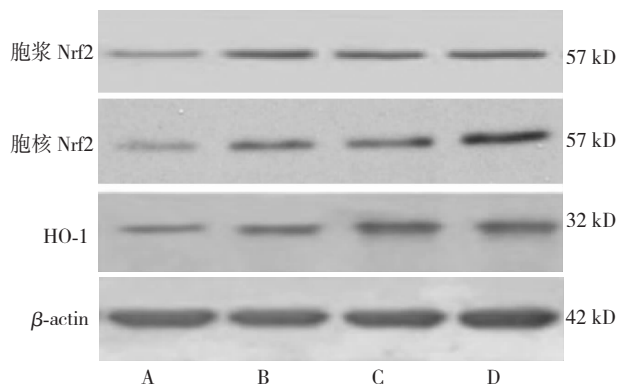


图 3 银杏叶提取物缓释剂穴位埋药线对脑缺血再灌注大鼠脑组织 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达的影响

Fig. 3 Effects of *G. biloba* extract release agent acupoint embedding therapy on neuronal injury in Nrf2 and HO-1 protein of rats with Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury

表 4 银杏叶提取物缓释剂穴位埋药线对脑缺血再灌注大鼠脑组织 Nrf2 和 HO-1 蛋白相对表达量的影响($\bar{x} \pm s, n = 20$)

Table 4 Effects of Ginkgo Biloba Extract Release Agent Acupoint Embedding Therapy on Nrf2 and HO-1 protein in the brain tissue of Rats with cerebral ischemia/reperfusion injury ($\bar{x} \pm s, n = 20$)

组别 Group	Nrf2			HO-1 蛋白 HO-1 protein
	胞质 Cytoplasm	胞核 Nucleus	核转位率 Nuclear translocation rate (%)	
假手术组 Sham operation group	0.163 ± 0.019	0.072 ± 0.035	28.56 ± 4.71	0.279 ± 0.034
模型组 Model group	0.297 ± 0.035	0.145 ± 0.026	32.17 ± 5.14	0.393 ± 0.067
穴位埋药线组 Acupoint embedding group	0.179 ± 0.044	0.297 ± 0.037	72.35 ± 6.17	0.636 ± 0.048
电针组 Electroacupuncture group	0.199 ± 0.067	0.215 ± 0.026	54.21 ± 4.97	0.518 ± 0.055

3 讨论

银杏叶提取物为银杏科植物银杏 *Ginkgo biloba* L. 的干燥叶提取物,具有活血、化瘀、通络的功效,临床用于治疗用于瘀血阻络引起的胸痹心痛、中风、半身不遂、舌强语蹇等证,具有良好的临床疗效,现代药理研究发现其对脑缺血及再灌注后神经细胞功能有良好的保护作用,同时还具有强大的抗氧化与清除自由基能力。本研究运用胶原制成的缓释剂,具有长效作用和恒释作用。通过药线将银杏叶提取物缓释剂植入大椎、双侧内关穴,可达到调节调节全

身经气、健脑补髓、聪明益智、疏通脑络和活血化瘀的目的。同时,穴位埋药线可长时间持续刺激穴位,药物缓释剂持续发挥作用,更有利于药物的吸收。

Zea-Longa 改良线栓法^[4]大鼠脑缺血再灌注损伤模型是由经颅内动脉注射栓子闭塞脑动脉模型改良而来,且通过线栓法造成大鼠脑缺血状态,通过线栓法可阻断脑动脉的绝大部分血流,且可通过定位栓线定向闭塞与基底节区皮质层血流,其与临床缺血性脑卒中的发病机理十分相似,而且线栓法操作简单,重复性好,创伤小,定位准确,已成为较为成熟的研究全脑缺血的动物模型。本研究通过改良线栓

法复制大鼠脑缺血模型,结果显示,模型组神经缺失症状评分显著高于假手术组,且经 HE 染色显示,模型组脑组织细胞脑缺血损伤后的病理表现。说明我们成功复制了大鼠脑缺血模型。而经治疗后,穴位埋药线组神经缺失症状评分和神经细胞存活率均显著改善,且各指标均优于电针组。说明穴位埋药线可显著改善脑缺血再灌注损伤大鼠的神经缺失症状,促进神经细胞恢复,疗效优于电针治疗组。

研究发现^[5,6]氧自由基的生成及其引起的脂质过氧化反应在脑缺血再灌注损伤中发挥重要作用。当患者发生缺血性脑卒中时,脑组织可发生严重的缺血缺氧,导致神经细胞的缺血损伤,当脑血流再灌注时,可产生大量的氧自由基,广泛攻击缺血损伤区的不饱和脂肪酸双链结构的生物膜,导致脂质过氧化反应呈“瀑布状”扩大,使细胞膜结构和功能受到广泛性的破坏,诱发或加重患者脑组织缺氧损伤。MDA 作为脂质过氧化最终产物,可间接反映机体氧自由基的代谢情况及组织受自由基攻击的严重程度^[7]。NO 是机体常见的一种氧自由基,正常情况下对脑组织具有保护作用,而过量的 NO 却可对脑组织产生神经毒性^[8]。正常情况下,机体存在着天然的自由基清除系统(如 GSH 和 SOD),可将机体所产生的少量自由基迅速清除,使组织细胞免于自由基的损伤。而在脑缺血再灌注时,机体的自由基生成增加,导致抗氧化物质被广泛消耗。本研究结果显示,模型组脑组织 MDA、NO 含量显著高于假手术组,总 SOD 活性和 GSH 含量显著低于假手术组。说明脑缺血再灌注时确实存在着氧化应激反应增加的状态。而经治疗后,穴位埋药线组和电针组 MDA、NO 含量较模型组显著降低,总 SOD 活性和 GSH 含量显著升高。且穴位埋药线组 MDA 和 NO 含量低于,总 SOD 活性和 GSH 含量高于电针组。说明穴位埋药线组可显著降低脑缺血再灌注损伤大鼠脑组织中的 MDA 和 NO 的过多积聚,提高了 SOD 和 GSH 活性,提高机体清除氧自由基能力,减轻脑组织损伤,疗效优于电针治疗组。

Nrf2/HO-1 途径是调节机体抗氧化应激反应的重要信号通路^[9]。Nrf2 属于亮氨酸拉链家族,是其中的重要转录因子之一。在正常机体中,Nrf2 多存在于细胞质内,与其特异性受体 Kelch 样 ECH 相关蛋白 1(Keap1)相结合而处于失活状态,且其半衰期较短,一旦激活可迅速经泛素蛋白酶体途径降解。当机体发生氧化应激反应时,Nrf2 可从 Keap1/Nrf2

复合物中迅速解离,并发生核转位,进入细胞核,形成半衰期较长的稳态 Nrf2,可与抗氧化反应元件(ARE)特异性位点结合,从而达到启动 ARE 所调控的第 II 相酶及抗氧化酶的基因表达的目的,增强细胞对氧化应激反应的抗性。而 ARE 调控的抗氧化基因包括 HO-1 等,可进一步激活并表达增加,促进失衡的氧化还原反应恢复到平衡状态,减轻自由基损伤。研究显示^[10],HO-1 作为诱导型酶,广泛表达于脑组织中,在脑缺血时呈高表达状态,可增强机体的抗氧化能力,减轻缺血再灌注损伤。本研究结果显示,模型组 Nrf2 和 HO-1 mRNA 表达均显著高于假手术组,胞浆和胞核 Nrf2 蛋白表达显著高于假手术组。而 Nrf2 的核转位率亦显著增加。模型组 HO-1 蛋白表达显著高于假手术组。提示脑组织发生缺血再灌注损伤后,一系列缺血缺氧的应激刺激,使脑组织 Nrf2 基因和蛋白表达上调,Nrf2 被激活并转位进入细胞核,激活 Nrf2/HO-1 途径,并启动了下游抗氧化蛋白 HO-1 基因的表达,使 HO-1 蛋白表达增加,从而增强了机体对抗缺血缺氧损伤的能力,减轻了氧自由基对脑组织的损伤,这与文献报道相一致。同时,经治疗后,穴位埋药线和电针疗法均使胞浆 Nrf2 蛋白表达降低,而胞核含量升高,核转位率增加,HO-1 蛋白表达亦增加。且穴位埋药线组各指标优于电针组,提示两种疗法的抗缺血性脑损伤的作用可能与激活 Nrf2/HO-1 途径密切相关,由于通过促进了 Nrf2 的核转位,使 HO-1 等抗氧化物质表达上调,提高了机体对氧化损伤的抗性,从而发挥了抗氧化应激反应的作用,减轻了缺血缺氧对脑组织的损伤。

参考文献

- 1 Tang ZS(唐中生),Xie GY(谢高宇),Lu Y(陆莹),et al. Effect of acupoint catgut embedding on learning and memory ability and expression of serum interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α in rats with vascular dementia. *Chin J Gerontology* (中国老年学杂志),2014,34:6407-6409.
- 2 Che WJ(车伟军),Yan AZ(闫爱珍). Effect of cerebral hemodynamics by acupoint catgut implantation treatment on vertebrobasilar transient Ischemic attack patients. *Int Med Health Guidance News* (国际医药卫生导报),2012,18:3585-3587.
- 3 Jiang T,Li T,Li J,et al. Cerebroside analogues from marine-derived fungus *Aspergillus flavipes*. *J Asian Nat Prod Res*, 2004,6:249-257.

- 4 Zhang XC (张小冲), Zhao H(赵浩), Ma JH (马建华), *et al.* Experimental study on the model of focal cerebral ischemia in rats with suture-occluded method. *J Med Res* (医学研究杂志), 2013, 42:55-58.
- 5 Yan F (闫峰), Zhao YM (赵咏梅), Luo YM (罗玉敏), *et al.* The dynamic changes of reactive oxygen species expression in rat brain tissue following focal cerebral ischemia/reperfusion. *J Capital Med Univ* (首都医科大学学报), 2015, 36:694-698.
- 6 Wang HX (王红霞), Li SY (李世英). Hypoxia-inducible factor-1 α , survivin and cerebral ischemic tolerance. *J Clin Neurol* (临床神经病学杂志), 2014, 11:237-238.
- 7 Xiao AJ (肖爱娇), Chen RX(陈日新), Kang MF(康明非), *et al.* Effects of Heat-Sensitive moxibustion on antioxidative capacity in rat model of focal cerebral ischemia-reperfusion injury. *Tianjin Med J* (天津医药), 2014, 6:51-53.
- 8 He F (贺芳), Ye B (叶蓓), Chen JZ(陈建珍), *et al.* Effects of HGF on iNOS, NO and IL-1 β in brain of rats with cerebral ischemia/reperfusion injury. *J Central South Univ (Med Sci)* (中南大学学报, 医学版), 2014, 39:23-29.
- 9 Li Y (李媛), Xie KL (谢克亮), Chen HG(陈红光), *et al.* The role of Nrf2 in the hydrogen treatment for intestinal injury caused by severe sepsis. *Chin Crit Care Med* (中华危重病急救医学), 2014, 26:415-419.
- 10 Zhao LY (赵林岩), Li F (李芳), Wang SP (王苏平), *et al.* Changes of heme oxygenase-1 and apoptosis as well as the relationship between them following carbon monoxide poisoning delayed encephalopathy in mice. *Chin J Clin Anatomy* (中国临床解剖学杂志), 2014, 32:711-715.

(上接第 26 页)

- 10 Piao CL (朴春雨), Nan HM (南红梅), Jiang Z(姜喆), *et al.* Discussion on thoughts and methods for treatment of diabetic nephropathy by TCM according to inflammatory pathogenesis. *Chin J Integr Tradit West Med* (中国中西医结合杂志), 2005, 25:365-367.
- 11 Xu J (徐晶), Ma EW (马二卫), Bai L(白璐), *et al.* Verification of Stasis-blocking-collaterals Syndrome in Rat Model with Diabetic Nephropathy. *Chin J Integr Tradit West Nephrol* (中国中西医结合肾病杂志), 2014, 15(1):12-15.
- 12 Chen ZQ (陈志强), Fang J (方敬), Wang YH (王月华), *et al.* Clinical comparative study of early diabetic nephropathy treated with Yiqi Yangyin Xiaozheng Tongluo Recipe. *Chin J Integr Tradit West Nephrol* (中国中西医结合肾病杂志), 2015, 16:962-964.