

◆实验研究论著◆

电针对肾性高血压大鼠脑梗死 Rho- A 表达的影响

谭峰, 陈杰, 梁艳桂, 李雁萍, 王学文, 蒙迪, 程南方, 徐丽红

广州中医药大学附属医院佛山中医院, 广东 佛山 528000

[摘要] 目的: 观察电针对易卒中型肾性高血压大鼠 (RHRSP) 大脑中动脉闭塞 (MCAO) 后第 1、7、14、28 天脑梗死灶皮层 Rho- A 表达的影响。方法: SD 大鼠行双肾双夹术复制 RHRSP, 再用线栓法制作 MCAO 模型。用随机数字表法分为模型组、电针组、假针刺组、假手术组与高血压组。电针组选取百会、大椎进行电针治疗, 每天 1 次, 共 28 天。假针刺组将针灸针贴于大鼠“百会”和“大椎”穴处皮肤。用尼氏染色检测神经元数目, Western blot 检测 Rho- A 表达。结果: MCAO 术后第 7、14、28 天, 电针组神经元数量高于模型组与假针刺组, 差异有显著性意义 ($P < 0.05$), 电针组 Rho- A 表达低于模型组、假针刺组, 差异有显著性意义 ($P < 0.05$)。观察第 7、14、28 天, 模型组、电针组、假针刺组 Rho- A 的表达高于高血压组与假手术组, 模型组、电针组、假针刺组神经元数量低于高血压组与假手术组, 差异均有显著性意义 ($P < 0.05$)。结论: 电针对脑梗死中枢神经损伤的保护作用可能与其下调中枢神经生长抑制因子 Rho- A 表达等机制密切相关。

[关键词] 肾性高血压; 电针; 脑梗死皮层; Rho- A 表达; 动物实验; 大鼠

[中图分类号] R544.1⁺4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2014) 01-0160-05

Effects of Electroacupuncture on Cerebral Rho-A Expressions in Renal Hypertension Rats with Cerebral Infarction

TAN Feng, CHEN Jie, LIANG Yangui, et al

Abstract: Objective: To observe the effect of electro-acupuncture (EA) on the expression of Rho- A in cerebral infarction cortex of stroke-prone-renal-hypertensive rats (RHRSP) at the 1st 7th, 14th and 21st day after middle cerebral artery occlusion (MCAO). Methods: SD rat model of RHRSP was established by bilateral occlusion of bilateral kidney and then by ligation with the thread. The MCAO models were randomly divided into model group, EA group, sham EA group, sham operation group and hypertension group. EA group was given EA on governor meridian acupoints once a day for 28 days. Sham EA group was given external application of acupuncture needles on *Baihui* and *Dazhui* acupoints. Nissl staining was used to examine the number of neurons and Western blot method was used to detect Rho- A expression. Results: At the 7th, 14th and 21st day after MCAO, the neuron count of EA group was higher and Rho- A expression level was lower than those of model group and sham EA group, and the differences were significant ($P < 0.05$). Model group, EA group and sham EA group had higher Rho- A expression level than hypertension group and sham operation group ($P < 0.05$). Conclusion: The protective effect of EA on central nerve system injury of cerebral infarction rats may be closely related to the decrease of Rho- A expression.

[收稿日期] 2013-10-25

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (编号: 81072947); 广东省自然科学基金项目 (编号: 8152800007000001)

[作者简介] 谭峰 (1959-), 男, 医学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事脑血管病基础与临床研究。

Keywords : Renal hypertension ; Electro- acupuncture ; Infarction cortex ; Rho- A expression ; Hypertension ; Experimental animals ; Rats

Rho- A 是 Rho (ras homo logus oncogenes) GTPases 亚家族中最重要的一种 Ras 同源性蛋白, 分子质量约为 20~30Kd, 是中枢神经系统(CNS)轴突再生抑制性因子作用的重要靶点。电针是促进急性脑梗死(ACI)神经功能恢复的有效方法, 但其机制尚未完全阐明。笔者曾发现电针对大鼠脑缺血区皮层损伤的保护作用, 与其下调中枢神经轴突再生抑制因子 neurocan- mRNA 与 Nogo- A 表达等机制密切相关^[1~2]。但电针对 ACI Rho- A 表达有何影响? 能否通过调控 Rho- A 表达来减轻 ACI 脑损害, 促进 CNS 功能修复? 这些问题还不清楚, 国内外亦鲜见报道。因此, 本研究在前期基础上, 复制易卒中型肾血管性高血压大鼠(stroke- prone- renovascular hypertensive rats, RHRSP)一侧大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型, 观察电针对脑缺血再灌注(ischemia- reperfusion, I/R)第 1、7、14、28 天不同时间点脑梗死皮层 Rho- A 表达的影响, 探讨电针对脑梗死中枢神经损伤的保护作用的可能机理。

1 材料与方法

1.1 动物与分组 封闭群纯种 SPF 级 Sprague-Dawley(SD)雄性大鼠 480 只, 体重(70±20)g, 鼠龄 30 天左右[合格证号: scxk(粤)2008- 0020], 由广州中医药大学实验动物中心提供。在安静环境下分笼饲养, 自由摄食条件下适应性喂养 7 天。行双肾双夹术复制 RHRSP, 采取尾动脉测压术筛选造模成功大鼠 370 只, 按随机数字表分为高血压组 60 只, 假手术组 60 只, 拟造 MCAO 模型组 250 只, 采用 Longa 的 5 分制法, 在动物麻醉清醒后进行神经功能缺损评分, 分值在 1~3 分的大鼠纳入, 共 190 只 MCAO 造模成功, 从中随机抽取 10 只大鼠行 TTC 染色确定梗死范围, 剩余 180 只 MCAO 大鼠随机分为模型组 60 只, 电针组 60 只, 假针刺组 60 只。

1.2 动物模型制作

1.2.1 双肾双夹术复制 RHRSP 模型 体重 70~90 g 的雄性 SD 大鼠 480 只, 按双肾双夹法复制成 RHRSP 模型^[3~4]。使用 SDP- 1 型大鼠血压计进行血压监测。

1.2.2 MCAO 术复制脑梗死模型 制作 MCAO 模型的 RHRSP: (1)双侧肾动脉狭窄术后 12 周; (2)血压≥180 mmHg; (3)未出现卒中的症状和体征。MCAO 模型的复制: 参照 Zea Longa 的线栓法加以改进^[5~6]。模型成功标准: 神经功能缺损评分参考 Longa 的 5 分制法在动物麻醉清醒后进行评分。0 分: 无神经损伤症状; 1 分: 不能完全伸展对侧前爪; 2 分: 向对侧转圈; 3 分: 向对侧倾倒; 4 分: 不能自行行走, 意识丧失。分值越高, 说明动物行为障碍越严重。评分 1~3 分者纳入研究。

1.3 实验方法

1.3.1 高血压组 只复制 RHRSP 模型, 不予任何处理。

1.3.2 假手术组 复制 RHRSP 模型, 只作颈部正中切口, 沿胸锁乳突肌内缘分离肌肉、筋膜与颈动脉, 不予其他处理。

1.3.3 模型组 在 RHRSP 基础上制作 MCAO 模型。

1.3.4 电针组 复制 RHRSP 基础上的 MCAO 模型。按文献^[5~6]方法定位大鼠“百会”、“大椎”穴位。刺法: 用 30 号 1 寸毫针, 沿皮斜刺“大椎”、“百会”两穴, 进针深度 2~3 mm。针柄接至 G68051 A 型电针仪电极上, 强度为 3V, 频率为 3Hz 连续波, 以肌肉轻微抽动、动物不挣扎嘶叫为度, 时间持续 15 min。电针组于造模当天动物清醒后开始治疗, 每天 1 次, 共 28 天。

1.3.5 假针刺组 仅将针灸针贴于 MCAO 模型大鼠相应穴位的皮肤上。

1.4 检测指标与方法

1.4.1 大鼠神经功能评分 (1)评分时间点: MCAO 术后动物清醒时, MCAO 术后第 1、7、14、28 天。(2)评分标准: 参考 Longa 的 5 分制法进行评分。

1.4.2 尼氏染色检测神经元数目 (1)脑和脊髓组织取材。各组大鼠在 MCAO 术后第 1、7、14 和 28 天进行神经功能评分后, 随机抽取每个时间点大鼠 6 只, 用 10% 水合氯醛腹腔注射深度麻醉后(0.4 mL/kg), 断头取脑, 将脑标本置于 10% 福尔马林中固定 24 h, 移入 Leica 自动脱水机脱水。取出脑组织

块，常规石蜡包埋，冠状切片，每隔10片取1片，厚4 μm，硅烷化防脱玻片捞片，烤片备用。(2)尼氏染色：选取每只大鼠从前囟+4.7 mm到-5.2 mm的石蜡切片，每隔10片取1片，尼氏染色检测大鼠神经元数目，用BX51系统生物显微镜和AZ100型体视光学显微镜下观察、计数与拍照。

1.4.3 Western blot 检测 Rho- A 表达 各组大鼠在MCAO 术后第1、7、14 和 28 天，随机抽取每个时间点大鼠 6 只，用 10% 水合氯醛腹腔注射深度麻醉后(0.4 mL/kg)，快速断头开颅取脑，经蛋白提取及定量，SDS- PAGE 电泳、转膜及蛋白印迹等操作，观察各蛋白的表达情况，以 β- Actin(43 Kd)蛋白条带为参照，分别分析各组大鼠各蛋白分子量相对于 β- Actin 各蛋白条带的相对密度。采用 Image J 计算机专业图像处理软件进行图像分析。

2 统计学方法

采用 SPSS13.0 软件进行统计分析，计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示，两样本均数间的比较采用独立样本 *t* 检验；不同时间点各均数间的比较行单因素方差分析，两两比较行 LSD 检验。

3 结果

3.1 大鼠不同时间点皮层神经元数目比较 见表 1。MCAO 术后第 1 天，各组间皮层神经元数目比较，差异无显著性意义 ($P > 0.05$)；第 7、14、28 天，高血压组、假手术组皮层神经元数目比较，差异无显著性意义 ($P > 0.05$)；高血压组与假手术组皮层神经元数高于模型组、电针组与假针刺组，差异有显著性意义 ($P < 0.05$)。电针组神经元数量高于模型组与假针刺组，差异均有显著性意义 ($P < 0.05$)。

表 1 大鼠不同时间点皮层神经元数目比较 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	第1天	第7天	第14天	第28天
高血压组	86.50 ± 1.68	84.50 ± 2.42	82.53 ± 1.96	83.15 ± 2.11
假手术组	86.82 ± 1.97	84.32 ± 2.10	84.43 ± 2.11	84.10 ± 2.28
模型组	88.78 ± 1.41	68.78 ± 1.42 ^①	48.78 ± 1.41 ^①	28.78 ± 1.21 ^①
电针组	87.15 ± 3.65	75.48 ± 2.41 ^②	61.32 ± 2.6 ^②	53.65 ± 1.46 ^②
假针刺组	88.58 ± 1.21	67.75 ± 1.43 ^①	47.5 ± 1.25 ^①	27.50 ± 1.25 ^①

与高血压组、假手术组比较，^① $P < 0.05$ ；与模型组比较，^② $P < 0.05$

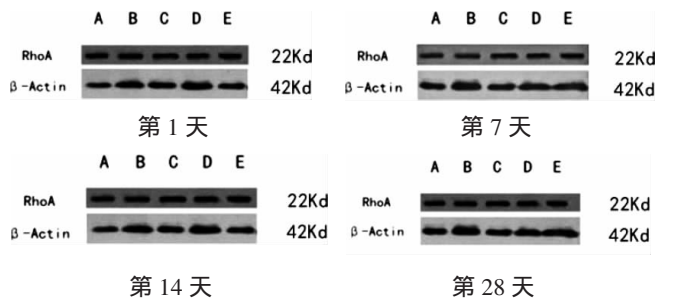
3.2 大鼠不同时间点皮层 Rho- A 的表达 见表 2，图 1。MCAO 术后第 1 天，高血压组、假手术组、模型组、电针组、假针刺组 Rho- A 的表达比较，差

异无显著性意义 ($P > 0.05$)；第 7、14、28 天，模型组、电针组、假针刺组 Rho- A 的表达高于高血压组与假手术组，差异均有显著性意义 ($P < 0.05$)。MCAO 术后第 1 天，电针组和假针刺组 Rho- A 的表达与模型组比较，差异均无显著性意义 ($P > 0.05$)；第 7、14、28 天，电针组 Rho- A 的表达低于模型组与假针刺组，差异均有显著性意义 ($P < 0.05$)。

表 2 大鼠不同时间点皮层 Rho-A 的表达 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	第1天	第7天	第14天	第28天
高血压组	0.880 ± 0.187	0.867 ± 0.296	0.870 ± 0.107	0.872 ± 0.286
假手术组	0.869 ± 0.384	0.863 ± 0.184	0.874 ± 0.352	0.877 ± 0.172
模型组	0.881 ± 0.125	0.913 ± 0.371 ^①	0.979 ± 0.241 ^①	0.963 ± 0.331 ^①
电针组	0.870 ± 0.298	0.887 ± 0.444 ^②	0.920 ± 0.236 ^②	0.912 ± 0.176 ^②
假针刺组	0.873 ± 0.075	0.898 ± 0.267 ^①	0.965 ± 0.173 ^①	0.948 ± 0.376 ^①

与高血压组、假手术组比较，^① $P < 0.05$ ；与模型组比较，^② $P < 0.05$



(A：高血压组；B：假手术组；C：模型组；D：电针组；E：假针刺组)

图 1 大鼠不同时间点皮层 Rho- A 的表达

4 讨论

Rho- A 是 CNS 轴突抑制重要的信号传导物质，在抑制成熟 CNS 神经元轴突再生中发挥重要作用^[7~8]。CNS 轴突再生抑制因子 Nogo- A 等通过与其受体 NgR 等结合，经 Rho- A 介导将抑制信号从胞外跨膜传递至胞内，启动胞内 Rho/ROCK 信号通路，激活下游的 Rho 激酶，直接引起肌球蛋白轻链(MLC)磷酸化，形成 MLC- P(myosin light chain phosphatase)，导致神经生长锥胞体回缩并最终崩溃，使轴突再生、细胞扩增受到抑制，阻碍神经修复^[9~10]。在 Rho- A V_{14} 转染的神经元细胞中，多数细胞只有光秃秃的树突主干，树突棘的密度明显降低甚至缺如，长度明显缩短。而在使用 Rho 蛋白激酶的特异性抑制剂 Y- 27632 后，神经元异常的形态学变化有所逆转，

表明 Rho- A 信号转导通路在神经元树突分支方面发挥重要作用^[11]。研究证实, Y- 27632 等 ROCK 抑制因子, 可使 Rho- A 激酶特异性失活, 促进神经轴突再生; 大鼠脊髓损伤后鞘内注射 Y- 27632, 可以观察到背侧脊髓轴突生长, 且大鼠后肢功能可以得到明显改善^[12~13]。阻断 RhoA/ROCK 的活性能够抑制 Nogo- A 对轴突生长的抑制作用, 促进轴突再生^[14]。RhoA/ROCK 通路抑制剂还能够减少神经元丢失, 减轻神经组织损伤程度, 促进轴突再生和功能恢复^[15]。本研究显示, 高血压大鼠 MCAO 术后第 7、14、28 天, 模型组皮层神经元数目较高血压组、假手术组减少, 差异均有显著性意义($P < 0.05$), Rho- A 表达较高血压组、假手术组升高, 差异均有显著性意义($P < 0.05$), 提示 Rho- A 参与 RHRSP 脑缺血的病理损害过程。

大量研究表明, 电针是促进 ACI 神经功能恢复的有效方法。针刺百会穴可提高脑中风患者 ADL 量表评分^[16], 增强脑缺血大鼠 NGF 表达, 阻止 Ca^{2+} 超载, 电针大椎、百会穴能促进大鼠脑梗死肢体神经功能恢复, 减少缺血缺氧大鼠病灶侧海马神经元内尼氏体脱失现象, 减轻 SD 大鼠局灶性 I/R 大鼠皮层超微结构形态学损伤^[17]。尽管电针治疗 ACI 的研究已取得长足进展, 但在 CNS 抑制信号传导通路领域的报道甚少。前期实验中, 笔者发现电针对大鼠脑缺血区皮层损伤的保护作用, 与其下调中枢神经轴突再生抑制因子 neurocan- mRNA 与 Nogo- A 表达等机制密切相关^[5~6, 18]。但电针对 Rho- A 有何作用尚不清楚, 目前国内外尚未见翔实的报道。

本研究观察电针对 Rho- A 抑制信号表达的影响, 结果显示, 电针组皮层神经元数目高于模型组, 差异有显著性意义($P < 0.05$); MCAO 术后第 7、14、28 天, 电针组 Rho- A 表达较模型组降低, 差异有显著性意义($P < 0.05$)。提示电针对高血压大鼠脑缺血损伤的保护作用可能与其下调中枢神经轴突相关生长抑制因子 Rho- A 的表达等机制密切相关。此为电针减轻 ACI 脑损害的机理研究和临床应用提供新的参考线索。

[参考文献]

[1] 梁艳桂, 谭峰, 陈杰, 等. 电针对脑缺血再灌注大鼠脑皮层超微结构及 Nogo- A 表达的影响[J]. 中国中西医结合

杂志, 2012, 32(2): 209- 213.

- [2] Feng Tan, Saiying Wan, Haik Wu, et al. Expression of neurocan mRNA and ultrastructure of brain tissue after cerebral ischemia and reperfusion in stroke-prone renovascular hypertensive rats treated by electroacupuncture [J]. *Neural Regeneration Research*, 2011, 6(36): 2834- 2838.
- [3] 谭峰, 顾卫, 吴海科, 等. 脑缺血再灌注高血压大鼠神经肽 Y 和超微结构变化[J]. 国外医学: 脑血管疾病分册, 2005, 13(7): 492- 495.
- [4] 谭峰, 顾卫, 吴海科, 等. 环维黄杨星 D 对高血压大鼠脑缺血损伤的保护作用[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2005, 12(3): 97- 100.
- [5] 谭峰, 万赛英, 顾卫, 等. 电针对高血压大鼠脑缺血后神经黏蛋白表达和行为学的影响[J]. 中华老年医学杂志, 2007, 26(9): 53- 56.
- [6] 谭峰, 万赛英, 吴海科, 等. 电针对脑缺血大鼠神经黏蛋白 mRNA 表达与细胞超微结构的影响[J]. 中国神经精神疾病杂志, 2008, 34(12): 720- 723.
- [7] Liu BP, Fournier A, GrandPre T, et al. Myelin-associated glycoproteins a functional ligand for the Nogo-66 receptor [J]. *Science*, 2002, 297(5584): 1190- 1193.
- [8] Wang KC, Koprivica V, Kim JA, et al. Oligodendrocyte myelin glycoprotein is a Nogo receptor ligand that inhibits neurite outgrowth [J]. *Nature*, 2002, 417(6892): 941- 944.
- [9] Amano M, Nakayama M, Kaibuchi K. Rho- Kinase/ROCK: A Key regulator of the cytoskeleton and cell polarity [J]. *Cytoskeleton (Hoboken)*, 2010, 67(9): 545- 554.
- [10] Yang P, Wen HZ, Zhang JH. Expression of a dominant-negative Rho- kinase promotes neurite outgrowth in a microenvironment-mimicking injured central nervous system [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2010, 31(5): 531- 539.
- [11] Zhang Y, Zhang H, Yuan X, et al. Differential effects of phenylalanine on Rac1, Cdc42, and RhoA expression and activity in cultured cortical neurons [J]. *Pediatric Research*, 2007, 62(1): 8- 13.
- [12] Chiba Y, Kuroda S, Shichinohe H, et al. Synergistic effects of bone marrow stromal cells and a Rho kinase (ROCK) inhibitor, fasudil on axon regeneration in rat spinal cord injury [J]. *Neuropathology*, 2010, 30(3): 241- 250.

- [13] Bertrand J, Di Polo A, McKerracher L. Enhanced survival and regeneration of axotomized retinal neurons by repeated delivery of cell-permeable C3-like Rho antagonists[J]. *Neurobiol Dis*, 2007, 25(1): 65-72.
- [14] Schwab ME. Functions of Nogo proteins and their receptors in the nervous system[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2010, 11(12): 799-811.
- [15] Kubo T, Hata K, Yamaguchi A, et al. Rho-ROCK inhibitors as emerging strategies to promote nerve regeneration[J]. *Curr Pharm Des*, 2007, 13(24): 2493-2499.
- [16] 李成永, 樊永珍, 薛文海, 等. 针刺百会穴治疗脑梗塞的临床研究[J]. *上海中医药杂志*, 2006, 40(6): 19-20.
- [17] 许能贵, 周逸平, 许冠荪, 等. 电针大椎、百会穴对局灶性脑缺血大鼠脑血流量和自发脑电的影响[J]. *中国中医药科技*, 2001, 8(1): 3-4.
- [18] 梁艳桂, 谭峰, 陈杰, 等. MCAO 大鼠梗死灶对侧皮层 Nogo-A 的动态变化及电针干预[J]. *中风与神经疾病杂志*, 2012, 29(12): 1073-1076.

(责任编辑: 刘淑婷)

高糖诱导的人近端肾小管上皮细胞损伤及机制的研究

邓茜, 孙惠力, 曾又佳, 徐华, 龚永慧, 李顺民

深圳市中医院, 广东 深圳 518033

[摘要] 目的: 观察高糖诱导人近端肾小管上皮细胞 (HK-2) 损伤及机制。方法: 细胞生长融合至约 80% 时, 用 DMEM 低糖培养基无血清同步化 48 h, 然后分为以下 7 组。①正常糖对照组 (5.5 mM 低糖 DMEM 培养基, NG); ②高糖 1 组 (15 mM 高糖 DMEM 培养基, HG1); ③高糖 2 组 (30 mM 高糖 DMEM 培养基, HG2); ④高糖 3 组 (45 mM 高糖 DMEM 培养基, HG3); ⑤高糖 4 组 (60 mM 高糖 DMEM 培养基, HG4); ⑥等渗 1 组 (30 mM 甘露醇 DMEM 培养基, HM1); ⑦等渗 2 组 (45 mM 甘露醇 DMEM 培养基, HM2)。观察不同糖浓度 (5.5~45 mM) 刺激 HK-2 细胞 24 h, 观察 I κ B α 和 p65 蛋白表达规律。MTT 比色法检测细胞活力。Western blot 法检测 I κ B α 和 p65 蛋白表达。结果: 高糖 2 组、高糖 3 组、高糖 4 组浓度呈依赖性对 HK-2 活力存在显著的抑制作用 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 高糖 2 组、高糖 3 组浓度的甘露醇对 HK-2 活力没有明显的抑制作用 ($P > 0.05$)。I κ B α 蛋白表达随着葡萄糖浓度的升高而依次降低, 而 p65 蛋白表达呈浓度依赖性升高, 高糖 2 组、高糖 3 组的葡萄糖与正常糖对照组比较, 差异有显著性或非常显著性意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结论: 高糖诱导的 HK-2 毒性损伤呈一定的浓度依赖关系, 其机制与 NF- κ B 通路的激活有关, 与渗透压作用无明显关联。

[关键词] 糖尿病肾病; 近端肾小管上皮细胞 (HK-2); I κ B α ; p65; 高糖诱导

[中图分类号] R692.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2014) 01-0164-04

Study on High Glucose-induced Human Proximal Renal Tubular Epithelial Cell Injury and Its Mechanism

DENG Qian, SUN Huili, ZENG Youjia, et al

Abstract: Objective: To investigate the toxic effects of high glucose on HK-2 cells and to explore its mechanism. Methods: When the cell fusion of HK-2 cells reached 80%, HK-2 cells were incubated with

[收稿日期] 2013-09-22

[基金项目] 广东省科技计划项目 (编号: 20110316); 深圳市科技计划项目 (编号: 20110421152)

[作者简介] 邓茜 (1981-), 女, 博士研究生, 主治医师, 研究方向: 肾病诊治与研究。

[通讯作者] 李顺民, E-mail: zyylishunmin@126.com。