

文章编号: 1005-0957(2022)01-0083-07

• 动物实验 •

电针“水沟”对脑梗死大鼠脑动脉血管平滑肌中 Ca^{2+} -ATP 酶及钠钙交换体表达的影响

徐彦龙¹, 徐秀梅¹, 郭茂娟², 姜希娟²

(1. 甘肃省中医院, 兰州 730050; 2. 天津中医药大学, 天津 300193)

【摘要】 目的 观察电针“水沟”穴对脑梗死大鼠脑动脉血管平滑肌 Ca^{2+} -ATP 酶及钠钙交换体表达变化的动态调节规律。**方法** 130 只雄性 Wistar 大鼠随机分为空白组、模型组、电针组、假手术组, 后 3 组在造模后又分为 3 h、6 h、12 h、24 h 4 个时相组, 每组 10 只。采用线栓法复制大鼠大脑中动脉阻塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型, 假手术组除不插入线栓外, 其余操作同模型组。电针组在造模后即刻针刺“水沟”穴, 电针刺激 20 min。应用激光多普勒血流仪检测梗死侧血流量的变化, 然后各组动物均按时相处死, 分别分离和剪取梗死侧的大脑前动脉、中动脉和后动脉各 8 mm。应用 Western blot 法检测血管中 Ca^{2+} -ATP 酶的相对表达量; 应用 RT-qPCR 法检测血管中钠钙交换体 1(sodium calcium exchanger 1, NCX1)及钠钙交换体 3(sodium calcium exchanger 3, NCX3) mRNA 的相对表达量。**结果** 大鼠脑梗死后 24 h 内, 与假手术组比较, 模型组和电针组各时项血流量均明显下降($P < 0.01$); 电针组大鼠在 3 h、6 h、12 h 时脑血流量高于模型组($P < 0.05$)。与空白组和假手术组比较, 模型组 3 h 时 Ca^{2+} -ATP 酶下调($P < 0.05$), 各时项 NCX1 及 NCX3 mRNA 表达量下调($P < 0.05$); 与模型组比较, 电针组 3 h 时项 Ca^{2+} -ATP 酶表达量的表达水平上调($P < 0.05$), 3 h、6 h 时项 NCX1 mRNA 的表达水平上调($P < 0.05$), 3 h 时项 NCX3 mRNA 表达水平上调($P < 0.05$)。**结论** 电针干预能增加脑梗死及其周边区域血供, 明显抑制脑动脉血管平滑肌上 Ca^{2+} -ATP 酶表达量及 NCX1 和 NCX3 mRNA 表达的下调, 从而达到减轻脑动脉血管平滑肌内 Ca^{2+} 超载, 进而维持细胞内外 Na^+ 、 Ca^{2+} 稳态, 这对于抑制缺血后血管平滑肌痉挛, 保持血管功能和状态的正常, 从而增加脑梗死区周围血流灌注具有重要作用, 但电针的干预具有一定的时效性。

【关键词】 电针; 脑梗死; 穴, 水沟; 血管平滑肌; Ca^{2+} -ATP 酶; 钠钙交换体; 大鼠

【中图分类号】 R2-03 **【文献标志码】** A

DOI: 10.13460/j.issn.1005-0957.2021.13.2008

Effects of Electroacupuncture at Shuigou (GV26) on the Expression of Ca^{2+} -ATPase and Sodium-calcium Exchanger in Cerebral Artery Smooth Muscles in Cerebral Infarction Rats XU Yanlong¹, XU Xiumei¹, GUO Maojuan², JIANG Xijuan². 1.Gansu Provincial Hospital of TCM, Lanzhou 730050, China; 2.Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

[Abstract] Objective To observe the rule of electroacupuncture at Shuigou (GV26) in dynamically regulating the expression of Ca^{2+} -ATPase and sodium-calcium exchanger (NCX) in cerebral artery smooth muscles in cerebral infarction rats. **Method** A total of 130 male Wistar rats were randomly divided into a control group, a model group, an electroacupuncture group, and a sham operation group; the latter three groups were further divided into four subgroups of 3 h, 6 h, 12 h, and 24 h after modeling, with 10 rats in each group. The middle cerebral artery occlusion (MCAO) model was established using the suture-occlusion method. The operation in the sham operation group was as same as that in the other groups except that no suture was inserted. The electroacupuncture group received acupuncture

基金项目: 国家自然科学基金青年项目 (81560794)

作者简介: 徐彦龙 (1982—), 男, 副主任医师, 博士, Email: xuyanlong2000@163.com

at Shuigou point right after modeling with electroacupuncture stimulation for 20 min. The volume of blood flow of the infarcted side was detected using a laser Doppler flowmeter. Afterward, the rats were sacrificed according to the requirement of timing, and the anterior, middle, and posterior cerebral arteries were separated and collected from the infarction side, 8 mm each. The Western blot (WB) method was used to determine the relative expression level of Ca^{2+} -ATPase in the vessels; the RT-qPCR method was adopted to detect the relative expression levels of NCX1 and NCX3 mRNAs. **Result** Within 24 h after cerebral infarction, the blood flow volume significantly dropped in the model and electroacupuncture groups at every time point compared with the sham operation group ($P < 0.01$); the cerebral blood flow volume was larger in the electroacupuncture group than in the model group at 3 h, 6 h, and 12 h ($P < 0.05$). Compared with the control and sham operation groups, the level of Ca^{2+} -ATPase decreased at 3 h ($P < 0.05$), and the expression levels of NCX1 and NCX3 mRNAs decreased at every time point ($P < 0.05$) in the model group. Compared with the model group, the expression level of Ca^{2+} -ATPase increased at 3 h ($P < 0.05$), the expression level of NCX1 mRNA increased at 3 h and 6 h ($P < 0.05$), and the level of NCX3 mRNA increased at 3 h ($P < 0.05$) in the electroacupuncture group. **Conclusion** Electroacupuncture intervention can increase the blood supply to the infarction and its surrounding brain areas, significantly inhibit the decreases of the expression of Ca^{2+} -ATPase and NCX and NCX3 mRNAs in cerebral artery smooth muscles to lessen the overload of Ca^{2+} and maintain the homeostasis of Na^+ and Ca^{2+} inside and outside of cells, which plays an essential role in inhibiting vascular smooth muscle spasms, maintaining the normal function and status of vessels, and increasing the blood perfusion in the infarction areas after cerebral infarction. However, the intervention of electroacupuncture has certain timeliness.

[Key words] Electroacupuncture; Cerebral infarction; Point, Shuigou (GV26); Vascular smooth muscle; Ca^{2+} -ATPase; Sodium-calcium exchanger; Rats

针刺治疗脑梗死疗效肯定,已普遍应用于临床。近年来,国内外学者从多个角度阐述了针刺作用的机制,包括减轻患者的颅内炎症反应^[1];保护血脑屏障、抑制脑细胞凋亡、减轻脑水肿,改善缺血再灌注损伤,改善脑血流,改善神经功能缺损^[2-3];刺激脑皮质运动中枢,改善损伤部位血液循环,促进神经功能恢复,改善日常生活能力,降低致残率^[4];促进神经元兴奋,促进新的神经传导通路的建立^[5];增加脑血流,促进微血管内皮细胞增生,促进颅内血管新生,减少脑缺血损伤,保护脑组织^[6]等。脑梗死应及时恢复血液循环,尽量减少缺血所致神经细胞变性程度及范围,尽管再灌注可能产生损伤,但再灌注利大于弊,改善脑循环是治疗脑梗死的关键环节之一^[7]。研究表明动脉血管平滑肌细胞胞内 Ca^{2+} 浓度升高是导致血管收缩的关键因素,虽然胞质内 Ca^{2+} 浓度的调节机制十分复杂,但 Ca^{2+} 浓度上升后的降低过程,主要由内质网、质膜上的 Ca^{2+} -ATP酶和钠钙交换体两种机制介导^[8]。因此,本实验以脑动脉血管平滑肌中 Ca^{2+} -ATP酶及钠钙交换体中存在于脑动脉血管中的NCX1、NCX3两种亚基的表达为切入点,探讨电针“水沟”穴对脑梗死大鼠改善脑循环的可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

SPF级健康雄性Wistar大鼠130只,体质量(200±20)g,许可证号为SCXK(京)2016-0006,购于北京维通利华实验动物技术有限公司。于安静环境下分笼饲养,室温21~27℃,相对湿度(50±5)%,自然光照,空气流通。适应性饲养1周后,在SPSS 23.0统计软件中生成随机数字表,通过查阅随机数字表随机分为空白组10只,模型组、电针组和假手术组各40只,后3组按术后3 h、6 h、12 h、24 h共4个时相分为4组,每个时相10只。实验过程中对动物的处置符合中华人民共和国科技部颁布的《关于善待实验动物的指导意见》^[9]。

1.2 主要试剂与仪器

逆转录试剂盒(美国Fermentas公司,K1622),引物(上海生工公司),荧光定量试剂盒(美国Fermentas公司,T2210),DEPC(美国Amresco公司,E476-100 ML),抗 Ca^{2+} -ATP酶抗体(Abcam公司,ab2825),羊抗小鼠IgG-H&L(HRP)抗体(Abcam公司,ab6789),硝酸纤维素膜(美国Millipore公司,HATF00010),ECL发光试剂盒(美国Millipore公司,WBKLS0050),内参(Santa公司,

sc-81178); LH202H 型韩氏电针仪(北京华运安特科技公司); 激光多普勒血流仪(北京吉安得尔科技有限公司); Micro21R 台式高速冷冻离心机(美国 BECKMAN 公司); DYY-11B 型电泳仪(北京六一生物科技有限公司); ZDP-A2050A 恒温孵育箱(上海智城分析仪器制造有限公司); GIS-2008 数码凝胶图像分析处理系统(上海天能科技有限公司); 7500FAST 荧光定量 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司)。

1.3 造模方法

参照 LONGA E Z 等^[10]造模方法, 建立大鼠 MCAO 模型。动物适应性喂养 1 周, 术前 12 h 禁食, 自由饮水。用 10% 的水合氯醛溶液(每 100 g 体质量注射 0.3 mL)腹腔注射, 将麻醉后的大鼠四肢用皮筋牵拉固定, 仰卧位放置于手术板上, 用烤灯将大鼠体温维持在 $(37.0 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 。在大鼠颈前均匀涂抹肥皂水后, 用刀片轻轻刮剔颈前的鼠毛, 碘伏消毒, 沿颈部正中偏左侧切口, 依次分离出左侧颈总动脉、颈外动脉和颈内动脉, 然后结扎颈总动脉近心端、颈外动脉和分叉处放置动脉夹。在两动脉夹之间用 1 mL 注射器扎一个小孔, 选择直径为 0.204 mm 的尼龙线栓插入小孔, 插入尼龙线栓后放开颈总动脉分叉处动脉夹, 接着继续插入线栓总计长度为 18~22 mm, 线栓进入颈内动脉至稍遇阻力即停止进线, 结扎线栓。用 0.9% 的生理盐水冲洗手术切口, 再用棉球擦拭干净切口后, 注入适量庆大霉素, 然后缝合皮肤。用碘伏擦拭缝合后的伤口, 重复 2 次。假手术组依次分离出左侧颈总动脉、颈外动脉、颈内动脉, 牵拉颈总动脉和颈内动脉后, 缝合皮肤, 并不插入线栓。

以大鼠颅骨冠状缝与矢状缝结合点为原点, 冠状缝向后 4 mm、矢状缝旁开 3 mm 的位置固定激光多普勒探头, 监测局部脑血流量。以大鼠麻醉 5 min 后局部脑血流量为基值, MCAO 后即刻再次测定局部脑血流量, 造模后局部脑血流量下降至基值血流量的 25%~30% 时视为造模成功^[11]。若实验过程中大鼠死亡, 或在取脑时见有蛛网膜下腔出血或颈内动脉分叉部出血则排除。

1.4 干预方法

电针组造模后即刻针刺大鼠“水沟”穴, 定位参照华兴邦等主编的《大鼠穴位图谱的研制》^[12], 在大鼠鼻中隔下用 0.25 mm×13 mm 毫针方向向上斜刺 2 mm, 并在该部位下约 2 mm 处刺入另一毫针作为参考电极, “水沟”穴接正极, 参考电极接负极, 用 15 Hz、2 mA 的连续波刺激 20 min^[13]。空白组、假手术组和模型组均同样

抓取固定, 但不做任何治疗。电针组、模型组、假手术组动物均按时相断头处死, 空白对照组动物在第 1 次抓取后 6 h 内断头处死。

1.5 样本制备

为了研究样本更加准确, 本次实验采用分跟分离法^[14]。大鼠断头后, 迅速剥离大脑, 用 4℃ 生理盐水冲洗, 置于冰袋上, 在外科显微镜下分别分离和剪取梗死侧的大脑前动脉、中动脉和后动脉各 8 mm (以各动脉从 Willis 环分出处为起点, 沿各动脉循行 8 mm 处为终点)。然后将脑动脉血管迅速置于液氮中保存备用。

1.6 观察指标

1.6.1 脑梗死半球脑血流的监测^[11]

各组经水合氯醛溶液麻醉后, 仰卧位固定, 手术常规操作, 沿头皮正中纵向切口约 2 cm, 分离皮下组织, 剥离骨膜, 暴露冠状缝及矢状缝(此手术操作模型组、电针组、假手术组同造模一起进行, 空白组不进行), 多普勒激光探头固定部位以冠状缝与矢状缝结合点为原点, 冠状缝向后 4 mm, 矢状缝旁开 3 mm, 定位后用牙科钻将颅骨磨薄, 固定激光多普勒探头, 每只大鼠测定 1 min, 取 1 min 内平均血流值作为检测所需数值。依次记录大鼠麻醉后线栓要阻塞侧大脑局部脑血流量(将此时脑血流量定为基值 100), 造模后 5 min 线栓阻塞侧大脑局部脑血流量(regional cerebral blood flow, rCBF)和术后 3 h、6 h、12 h、24 h 阻塞侧局部脑血流量, 并和基值对比, 得出相应的脑血流数值。

1.6.2 Western blot 法检测血管组织中 Ca^{2+} -ATP 酶的相对表达量

从液氮中取出脑动脉血管, 用 RIPA 裂解液抽提蛋白, 采用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒进行蛋白浓度测定后, 各样品取 20 μg , 加等量样本处理液后, 100℃ 煮沸 5 min, 进行 10% SDS-PAGE 变性电泳, 经电转移方式转置硝酸纤维素膜上, 用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 溶液封闭 2 h, 而后加入含一抗的封闭液(1:3000) 4℃ 恒温室摇床孵育过夜, 洗去抗体后加入含二抗的封闭液(1:2000), 室温摇床作用 2 h。洗去抗体后按 ECL 发光试剂盒说明依次进行化学显影。将胶片进行扫描或拍照, 用凝胶图像处理系统分析目标条带和内参条带的净吸光度值, 最终计算出目标条带与内参条带的比值。

1.6.3 RT-qPCR 法检测血管中 NCX1 及 NCX3 的表达量

将大鼠处死后剥离脑动脉血管, 加入 1 mL 裂解液充分裂解组织, 按照 RNA 提取试剂盒说明书操作, 提取

总RNA。测量RNA的浓度和纯度。然后再进行一步法荧光定量RT-qPCR反应。条件为预变性95℃持续2 min;变性95℃持续15 s;扩增60℃持续60 s;退火72℃持续45 s,变性和延伸设置为40个循环扩增(约50 min)。通过CFX manager 3.1软件读取Ct值,计算平均值。mRNA相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行计算分析。引物序列见表1。

表1 各检测指标引物序列

基因名称	引物序列	产物长度
NCX1	F GCCCTGTTATTGAATGAGCTTG	168 bp
	R TTCCTCTTTGCTGGTCAGTG	
NCX3	F AAGACTACGGTGGACAACTG	140 bp
	R GATTCATCCTCATCCTCATCCC	
GAPDH	F GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT	104 bp
	R GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG	

表2 各时相大鼠相对脑血流量对比

组别	n	3 h	6 h	12 h	24 h
假手术组	10	105.619±7.681	105.620±7.679	105.621±7.681	105.620±7.679
模型组	10	79.001±7.560 ¹⁾	71.501±9.790 ¹⁾	60.171±8.660 ¹⁾	68.411±16.221 ¹⁾
电针组	10	88.549±6.921 ¹⁾²⁾	83.531±5.330 ¹⁾²⁾	72.001±8.669 ¹⁾²⁾	72.910±6.990 ¹⁾

注:与假手术组比较¹⁾ $P<0.01$;与模型组比较²⁾ $P<0.05$

2.2 电针对MCAO模型大鼠脑动脉血管平滑肌中Ca²⁺-ATP酶表达的影响

与空白组和假手术组比较,模型组各时项Ca²⁺-ATP酶表达量的表达水平均有下调,但仅3 h时项下调差异具有统计学意义($P<0.05$);与同时项模型组比较,电针组3 h时项Ca²⁺-ATP酶表达量的表达水平上调,差异具有统计学意义($P<0.05$)。详见图1、表3。

2.3 电针对MCAO模型大鼠脑动脉血管平滑肌中NCX1和NCX3 mRNA表达的影响

2.3.1 电针对MCAO模型大鼠脑动脉血管平滑肌中NCX1 mRNA表达的影响

与空白组和假手术组比较,模型组各时项NCX1 mRNA的表达水平均下调,差异有统计学意义($P<0.05$);与同时项模型组比较,电针组3 h、6 h时项NCX1 mRNA的表达水平上调,差异有统计学意义($P<0.05$)。详见表4。

1.7 统计学方法

采用SPSS 23.0软件对各组数据进行统计分析。符合正态分布的计量资料用均数±标准差表示,重复测量资料比较选用重复测量方差分析,根据球形检验结果采用Sphericity Assumed法分析组间差异,后选用Bonferroni法进行两两比较;多组数据比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD法;方差不齐则采用Games-Howell法。若数据不符合正态分布,采用Cruskal Wallis秩和检验进行分析。以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 电针对MCAO模型大鼠脑血流量的影响

与假手术组比较,模型组和电针组各时项血流量均明显下降,差异具有统计学意义($P<0.01$)。电针干预后,电针组大鼠脑血流量均高于模型组,其中在3 h、6 h、12 h时差异具有统计学意义($P<0.05$)。详见表2。

($\bar{x} \pm s$)

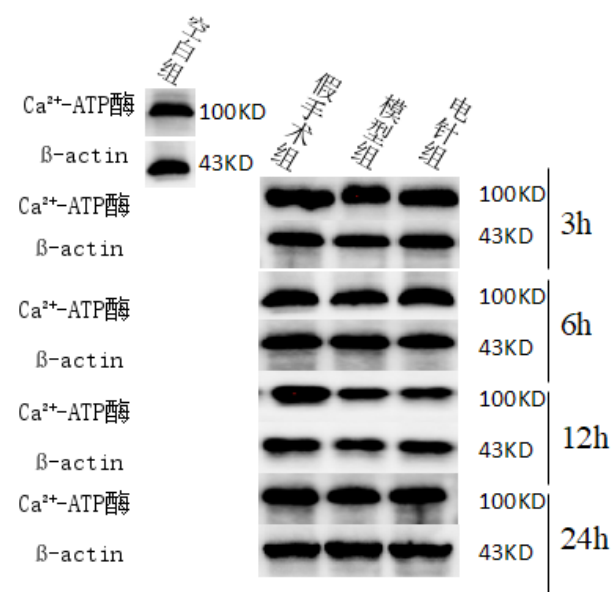


图1 各组大鼠脑动脉血管平滑肌中Ca²⁺-ATP酶免疫印迹实验结果

表3 4组不同时项脑动脉血管平滑肌中Ca²⁺-ATP酶表达的比较

(x̄ ± s)

组别	n	3 h	6 h	12 h	24 h
空白组	10	1.206±0.302 ¹⁾	—	—	—
假手术组	10	1.323±0.197 ¹⁾	1.234±0.086	1.556±0.539	1.355±0.205
模型组	10	0.827±0.279	1.056±0.154	1.205±0.296	1.094±0.189
电针组	10	1.174±0.145 ¹⁾	1.185±0.126	1.218±0.324	1.119±0.199

注:与模型组比较¹⁾P<0.05

表4 4组不同时项脑动脉血管平滑肌中NCX1 mRNA表达的比较

(x̄ ± s)

组别	n	3 h	6 h	12 h	24 h
空白组	10	1.056±0.073 ¹⁾	—	—	—
假手术组	10	1.075±0.101 ¹⁾	1.003±0.091 ¹⁾	1.000±0.034 ¹⁾	1.001±0.049 ¹⁾
模型组	10	0.744±0.232	0.775±0.045	0.768±0.211	0.923±0.017
电针组	10	1.014±0.085 ¹⁾	0.967±0.176 ¹⁾	0.883±0.068	0.939±0.043

注:与模型组比较¹⁾P<0.05

2.3.2 电针对MCAO模型大鼠脑动脉血管平滑肌中NCX3 mRNA表达的影响

与空白组和假手术组比较,模型组各时项NCX3 mRNA的表达水平均下调,差异有统计学意义(P<

0.05);与同时项模型组比较,电针组3 h时项,NCX3 mRNA含量的表达水平上调,差异有统计学意义(P<0.05)。详见表5。

表5 4组不同时项脑动脉血管平滑肌中NCX3 mRNA表达量的比较

(x̄ ± s)

组别	n	3 h	6 h	12 h	24 h
空白组	10	1.011±0.072 ¹⁾	—	—	—
假手术组	10	1.007±0.138 ¹⁾	1.001±0.056 ¹⁾	1.013±0.192 ¹⁾	1.036±0.047 ¹⁾
模型组	10	0.719±0.163	0.832±0.135	0.615±0.072	0.660±0.267
电针组	10	0.950±0.038 ¹⁾	0.973±0.088	0.999±0.369	0.792±0.108

注:与模型组比较¹⁾P<0.05

3 讨论

3.1 水沟的选穴依据及“脑表面动脉血管枢纽学说”

水沟是石学敏院士创立的醒脑开窍针刺法治疗中风的主穴之一,治疗脑梗死的疗效已经被临床所证实,并被国家科技部和中医药管理局确立为中医药科技成果在全国进行推广。前期研究证实针刺MCAO大鼠“水沟”穴可缓解大脑中动脉平滑肌痉挛^[15],促进缺血半暗带的血管舒张^[16],并能促进血管新生及侧支循环的建立^[17]。通过系列研究,导师杜元灏教授初步提出了脑梗死侧支循环发生发展的“脑表面动脉血管枢纽学说”,即当脑梗死急性发生后,脑表面侧支血管系统犹如一个“闸门”,决定着脑缺血区能否及时有效地接受来自非缺血区的侧支循环血流,并压送这些代偿血流进入微细血管,以营养缺血神经元组织,“闸门”的机能状态决定着缺血细胞的命运。急性脑梗死发生后,造成“闸门”的阻力增大,血管自律运动出现高频率低振幅,

其流质、流场的动态耦合发生障碍,表现为“高速低效震荡”,成为缺血脑组织获取正常血流的障碍^[18]。研究还发现针刺并非如扩张血管的药物那样,只是简单的扩张血管,而是有效地改善微血管的舒缩协调运动,协调流质、流场的动态耦合运动。因此,针刺水沟改善脑血管的机能状态,促进脑表面血管侧支循环是治疗急性脑血管病的重要途径,于是脑表面血管系统就成为研究电针水沟治疗脑血管病效应的切入点之一。

3.2 急性脑血管病选水沟穴的理论基础

《素问·阴阳应象大论》:“阴阳者,天地之道也,万物之纲纪,变化之父母,生杀之本始,神明之府也,治病必求于本。”据此中医学将“调和阴阳”作为治疗疾病的大法和总纲。任脉总任一身之阴经,调节阴经气血,为“阴脉之海”,督脉总督一身之阳经,为“阳脉之海”,从循行线路上来看^[19]任脉循行“上行环绕口唇,经面部进入目眶下,联系与目”、督脉循行“沿前额下

行鼻柱,止于上唇系带处”。因此,水沟是任督二脉经脉循行线有穴通路上在头面部唯一的交会穴。因此要调和全身经脉的阴阳,非水沟莫属;而这也是“急救刺水沟”的真正理论依据。石学敏院士在治疗脑梗死患者昏迷的时候,采用雀啄手法急救刺水沟穴时,要求刺激量必须达到使患者流泪、流涕或者额头汗出为止,其实这也是阴阳交感、阴阳调和后的具体临床表现^[20]。故在动物实验中,笔者用电针刺激“水沟”,既能保证针刺效应的一致性,也能体现临床醒脑开窍针法的精髓。

3.3 血管平滑肌的舒缩与 Ca^{2+} 浓度之间的关系

血管平滑肌细胞内 Ca^{2+} 浓度的稳态对于血管平滑肌细胞的舒缩有重要的调节作用。研究表明血管平滑肌细胞内 Ca^{2+} 浓度升高是导致血管收缩的关键因素,而细胞内 Ca^{2+} 浓度升高主要通过细胞膜电压依赖性钙通道^[21-22]和受体门控钙通道^[23-24]使细胞外 Ca^{2+} 大量内流,内流的 Ca^{2+} 与钙调蛋白结合形成复合物激活肌球蛋白轻链激酶,从而进一步引发平滑肌的收缩。而细胞内 Ca^{2+} 的清除,则主要通过两种机制, $\text{Na}^{+}-\text{Ca}^{2+}$ 交换^[25]是 Na^{+} 从膜的一侧转运到另一侧以交换 Ca^{2+} 的反方向运动,它依赖于 $\text{Na}^{+}-\text{K}^{+}$ ATP酶建立的胞内外浓度以及膜电位; Ca^{2+} -ATP酶通过主动的耗能,每分解一个ATP,可转运1~2个 Ca^{2+} 到细胞外或肌浆网,同时,按1:2的比例转运 H^{+} 到胞内,以维持膜内外的电中性。二者相互协作,可直接降低细胞内 Ca^{2+} 浓度,磷酸化丝氨酸使平滑肌舒张。

3.4 实验结果对临床的指导意义

从本次实验结果发现大鼠脑梗死后24 h内,电针干预可明显抑制脑动脉血管平滑肌上 Ca^{2+} -ATP酶和NCX mRNA表达的下调,虽其干预最佳时点二者不太一致,究其原因可能是 Ca^{2+} -ATP酶对 Ca^{2+} 的亲合性很高,在细胞排钙的过程中,主要起到一种灵敏的调节作用,而NCX对 Ca^{2+} 的亲合性低,但转运容量高,能够清除胞内大量的 Ca^{2+} 的缘故^[26],而NCX1和NCX3对 Ca^{2+} 的亲合性之间的差异,可能是造成电针干预时点NCX1和NCX3不完全一致的主要原因。结合笔者团队前期研究成果^[27-28],提示笔者在脑梗死急性期针刺治疗或许可以以6 h左右为间隔,反复针刺,对提高临床疗效或许有积极意义。

综上所述,电针干预可明显抑制脑血管平滑肌上NCX1和NCX3及 Ca^{2+} -ATP酶表达量的下调,从而减轻脑动脉血管平滑肌内 Ca^{2+} 超载,维持细胞内外 Ca^{2+} 稳态,

进而对于抑制缺血后血管平滑肌痉挛,保持血管功能和状态的正常,增加脑梗死区周围血流灌注具有重要作用,但针刺效应具有一定时效性。

参考文献

- [1] 邢东,吴志新,董辉,等.电针预处理对大鼠脑缺血损伤后脑内炎症反应及NF- κ B的影响[J].陕西医学杂志,2017,46(9):1155-1158.
- [2] JUNG Y S, LEE S W, PARK J H, et al. Electroacupuncture preconditioning reduces ROS generation with NOX4 down-regulation and ameliorates blood-brain barrier disruption after ischemic stroke[J]. *J Biomed Sci*, 2016, 23:32.
- [3] 范茜茜,董勤,沈梅红,等.电针对大鼠脑缺血再灌注损伤后细胞凋亡相关基因Bcl-2、Bax表达的影响[J].中国老年学杂志,2017,37(5):1041-1043.
- [4] WANG S, MA T, WANG L, et al. Effect of acupuncture on cerebrovascular reserve in patients with acute cerebral infarction: protocol for a randomized controlled pilot study[J]. *Trials*, 2017, 18(1):292.
- [5] KLEIN J D, WANG X H. Electrically stimulated acupuncture increases renal blood flow through exosome-carried miR-181[J]. *Am J Physiol-Renal Physiol*, 2018, 315(6):F1542-F1549.
- [6] 梁超,姜涛,王静芝,等.不同变频组合电针预处理对急性脑缺血大鼠神经功能和脑皮质促红细胞生成素的影响[J].中国中医基础医学杂志,2017,23(5):686-688.
- [7] 蒲传强.脑缺血再灌注的利与弊[J].中华神经科杂志,2003,36(4):244.
- [8] DESAI-SHAH M, COOPER R L. Different mechanisms of Ca^{2+} regulation that influence synaptic transmission: comparison between crayfish and *Drosophila* neuromuscular junctions[J]. *Synapse*, 2009, 63(12):1100-1121.
- [9] 中华人民共和国科学技术部.关于善待实验动物的指导意见[EB/OL].2006-09-30[2020-03-22].<http://www.most.gov.cn>.
- [10] LONGA E Z, WEINSTEIN P R, CARLSON S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. *Stroke*, 1989, 20(1):84-91.
- [11] 崔景军,何娇君,李晶,等.大鼠大脑中动脉梗死模型的

- 评价标准探讨[J]. 天津中医药, 2013, 30(1):33-35.
- [12] 华兴邦, 周浩良. 大鼠穴位图谱的研制[J]. 实验动物与动物实验, 1991, (1):1-5.
- [13] 张晶晶, 杜元灏, 李晶, 等. 电针干预对脑梗死大鼠脑组织Wnt信号通路的影响[J]. 针刺研究, 2020, 45(3):202-208.
- [14] 吕艳, 杜元灏, 徐彦龙, 等. 大脑中动脉梗塞大鼠大脑中动脉蛋白激酶C表达及电针水沟穴干预的研究[J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(8):2310-2314.
- [15] 吕艳, 杜元灏, 徐彦龙, 等. 电针“水沟”穴对大脑中动脉梗死大鼠脑血管平滑肌蛋白激酶C的影响[J]. 针刺研究, 2015, 40(3):219-223.
- [16] 李晶, 杜元灏, 张雪竹. 电针人中穴对CI大鼠血管紧张素II及其受体基因及蛋白表达的影响[J]. 辽宁中医杂志, 2018, 45(2):397-401.
- [17] 杨丽红, 杜元灏, 李晶. 电针对脑梗死大鼠脑血管内皮细胞Apelin-APJ系统的影响[J]. 针刺研究, 2017, 42(1):9-13.
- [18] 林雪, 杜元灏. 电针刺激对急性脑梗塞大鼠脑血管动脉平滑肌细胞cAMP的影响[J]. 中国中医基础医学杂志, 2007, 13(11):860-862.
- [19] 梁繁荣, 王华. 针灸学[M]. 北京:中国中医药出版社, 2016:100-107.
- [20] 徐彦龙, 杜元灏, 武连仲, 等. 从理论角度看醒脑开窍法取穴及针刺依据[J]. 中国中医基础医学杂志, 2011, 17(5):544-546.
- [21] DOLPHIN A C. A short history of voltage-gated calcium channels[J]. *Br J Pharmacol*, 2006, 147(Suppl 1):S56-S62.
- [22] LIPSCOMBE D, HELTON T D, XU W. L-type calcium channels: the low down[J]. *J Neurophysiol*, 2004, 92(5):2633-2641.
- [23] ZITT C, HALASZOVICH C R, LÜCKHOFF A. The TRP family of cation channels: probing and advancing the concepts on receptor-activated calcium entry[J]. *Prog Neurobiol*, 2002, 66(4):243-264.
- [24] BUGAJ V, ALEXEENKO V, ZUBOV A, *et al*. Functional properties of endogenous receptor- and store-operated calcium influx channels in HEK293 cells[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(17):16790-16797.
- [25] REMBOLD C M, RICHARD H, CHEN X L. $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ exchange, myoplasmic Ca^{2+} Concentration, and contraction of arterial smooth muscle[J]. *Hypertension*, 1992, 19(4):308-313.
- [26] 刘洪国, 朱广友, 赵子琴. 阴茎海绵体平滑肌钙信号通路研究进展[J]. 中国男科学杂志, 2005, 19(5):63-65.
- [27] 徐彦龙, 高靓, 石磊, 等. 针刺对脑梗死大鼠脑血管平滑肌蛋白激酶C的影响[J]. 针刺研究, 2012, 37(3):218-223.
- [28] 徐彦龙, 徐秀梅, 杨正飞, 等. 电针“水沟”对脑梗死大鼠脑动脉血管平滑肌中可溶性鸟苷酸环化酶及蛋白激酶G表达的影响[J]. 针刺研究, 2020, 45(10):789-792.

收稿日期 2021-05-18