

电针对局灶性脑梗死大鼠皮质 Slit2 及 HSPGs 表达的影响*

龙飞, 李学智[△], 龚标, 汪莹, 代恩泽, 郭全虎

重庆医科大学中医药学院(重庆 400016)

【摘要】 目的 观察局灶性脑梗死大鼠皮质轴突导向因子 Slit2、硫酸肝素蛋白多糖(HSPGs)的表达和电针对其表达的影响,探讨电针对脑梗死后神经可塑性的作用机制。**方法** 将 40 只雄性 SD 大鼠随机分为正常组、模型组、非经穴电针组和电针组,每组 10 只。用线栓法栓塞模型组、非经穴电针组、电针组大鼠大脑中动脉 1.5 h 后恢复血流。电针组大鼠针刺“足三里”“曲池”,非经穴电针组则针刺足阳明胃经、手阳明大肠经以外的非 14 经穴的左侧的其它穴位,1 次/d,共 14 d,模型组、正常组大鼠在自制容器中固定 30 min。在 14 d 时用神经功能评分(mNSS)观察大鼠神经功能缺损;用尼氏染色观察大脑梗死灶周围组织形态学变化;用免疫荧光、免疫印迹检测大脑梗死灶组织 Slit2 和 HSPGs 的表达。**结果** mNSS 评分显示,正常组评分为 0,低于电针组,电针组低于非经穴电针组,模型组最高,两两比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。尼氏染色显示,电针组可见尼氏体数量增多、排列整齐;非经穴电针组可见尼氏体数量增多,但排列紊乱;模型组尼氏体数量变少、排列紊乱且大脑水肿。免疫荧光和免疫印迹显示,电针组 Slit2、HSPGs 荧光强度和蛋白表达高于非经穴电针组($P < 0.05$),非经穴电针组荧光强度和蛋白表达高于模型组($P < 0.05$),模型组荧光强度和蛋白表达低于正常组($P < 0.05$)。尼氏染色、免疫荧光、免疫印迹分析结果一致。**结论** 电针可以促进局灶性脑梗死大鼠皮质 HSPGs 及 Slit2 表达,从而促进脑梗死后神经功能的恢复,这可能是电针促进脑梗死后神经功能恢复的机制之一。

【关键词】 脑缺血再灌注 电针 Slit2-Robo 硫酸肝素蛋白多糖

Effect of Electro-acupuncture on the Expression of Slit2 and HSPGs in Rats with Focal Cerebral Infarction LONG Fei, LI Xue-zhi[△], GONG Biao, WANG Ying, DAI En-ze, GUO Quan-hu. *Traditional Chinese Medicine College, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China*

[△] Corresponding author, E-mail: lixz.999@126.com

【Abstract】 Objective To determine the expression of Slit2 and heparan sulfate proteoglycans (HSPGs) in cortex of rats with focal cerebral infarction and the effect of acupuncture (EA) on the expression of Slit2 and HSPGs. **Methods** 40 male Sprague Dawley (SD) rats were equally randomized into four groups: Control group, model group, non-acupoint EA group, and EA group. Thread-tying method was used in the model group, non-acupoint EA group and EA group to clog arteries and then open up after 1.5 h. Morphology changes of tissues around the infarction area were observed 14 days later by Nissl staining. The expressions of Slit2 and HSPGs in the ischemic brain tissues were detected by indirect immunofluorescence staining (IF) and Western blot (WB). **Results** Modified neurologicalseverity scores (mNSS) showed zero in the control group, lower than the score of EA group. The EA group had lower mNSS score than the non-acupoint group. The highest mNSS score appeared in the model group. Paired comparisons showed statistical differences ($P < 0.01$). Nissl's staining showed that EA group had increased Nissl bodies in alignment; non-acupoint EA group had increased and disordered Nissl bodies; model group had decreased and disordered Nissl bodies with edema in the brain. IF and WB showed that non-acupoint EA group had higher levels of Slit2 and HSPGs than model group ($P < 0.05$); EA group had higher levels of Slit2 and HSPGs than non-acupoint EA group ($P < 0.05$); model group had higher levels of Slit2 and HSPGs than control group ($P < 0.05$). The results of Nissl's staining, IF and WB were consistent. **Conclusion** EA can enhance the expressions of Slit2 and HSPGs. This may be one of the mechanisms of EA promoting recovery of neural functions after cerebral infarction.

【Key words】 Cerebral ischemia-reperfusion Electroacupuncture Slit2-Robo HSPGs

* 重庆市科委科技计划项目(No. CSTC,2010BB5380;estc2014jcyjA10043)和重庆市教委科学技术研究项目(No. KJ130323)资助

[△] 通讯作者, E-mail: lixz.999@126.com

脑卒中是我国中老年人群的常见病、多发病,具有高发率、高死亡率和致残率等特点,近年来呈上升和低龄化趋势,针灸作为脑卒中的传统治疗手段,已被证实有确切的临床疗效^[1],但其机理还需要更多的深入研究。脑卒中后运动功能的恢复,与神经的可塑性有关,轴突导向因子是神经系统发育和神经可塑性的热点,目前已明确的轴突导向因子有 Netrins 家族、Slits 家族、Semaphorins 家族和 Ephrins 家族^[2-6],近年来 Slit 的功能研究已成为国内外研究热点之一。Slit 是多功能的导向分子,参与神经轴突导向、肿瘤转移、血管生成等生理过程^[7-11],尤其在神经系统发育的轴突导向过程中至关重要。硫酸肝素蛋白多糖(HSPGs)是 Slit-Robo 的协同受体。HSPGs 在多种研究中被证实与 Slit-Robo 信号有关^[12],影响 Slit-Robo 的轴突导向功能,调控和引导轴突在体内生长,包括中枢和周围神经轴突的生长、延伸以及靶细胞识别等过程^[13-15]。本实验通过制备大鼠脑梗死模型,观察脑梗死后 Slit2 和 HSPGs 的表达,以及电针对其表达的影响,探讨电针对神经的可塑性和 Slit2 与 HSPGs 的关联性。

1 材料及方法

1.1 实验动物及分组

SPF 级成年健康雄性 SD 大鼠 40 只,动物许可证号[SYXK(渝)2012-0001],体质量 250~350 g,由重庆医科大学动物中心提供,随机分为正常组、模型组、非经穴电针组和电针组,每组各 10 只。手术过程中大鼠死亡率为 26%,补充大鼠 16 只。实验过程中对动物的处置符合中华人民共和国科学技术部 2006 年颁布的关于善待实验动物的指导性意见。

1.2 试剂和仪器

Slit2(0.1 mL)抗体和 HSPGs(0.1 mL)抗体购自北京博奥森生物技术有限公司,免疫荧光二抗 Dylight 购自 Abbkine 公司,免疫印迹二抗购自康为世纪有限公司,其余实验试剂均由碧云天提供。CM1900 冷冻切片机,LEICA TCS SP2 激光共聚焦显微镜,上海医疗仪器厂 G6805 电针仪(上海医疗器械厂),毫针(10 号 1 寸,华佗牌)。

1.3 大鼠局灶性脑梗死模型制备及神经功能评分

术前 12 h 大鼠禁食不禁水,参照 Longa 等^[16]以线栓法制备大鼠大脑中动脉缺血再灌注模型:以 3.5%水合氯醛(1 mL/100 g 体质量)腹腔注射麻醉,仰卧固定。在颈部正中切开长约 3 cm 的纵形切

口,避开血管和神经,依次钝性分离左侧颈总动脉(CCA)、颈外动脉(ECA)、颈内动脉(ICA)。在颈总动脉、颈外动脉各挂 1 根线,在动脉分叉 5 mm 处结扎颈外动脉。用蛙心夹夹住颈总动脉近心端和颈内动脉远端,然后用眼科剪在颈总动脉上剪一小口,将线栓经切口插入颈内动脉,当线栓穿过颈总动脉分叉处时将预先挂于颈总动脉的挂线打 1 个单结固定,然后取走颈内动脉上的动脉夹,用镊子缓慢地将线栓向颈内动脉方向推送约 18~20 mm,推送遇阻力时即停止插线。1.5 h 后进行再灌注处理,最后清创缝合伤口,注意大鼠术后保温。模型组、非经穴电针组处理与电针组相同。

待大鼠术后清醒后参照神经功能(modified neurological severity score, mNSS)评分标准进行评分:从运动、感觉、反射和平衡 4 个方面评估,运动试验 6 分,平衡试验 6 分,感觉试验 2 分,反射试验 4 分,总计 0~18 分,分值与神经功能缺损程度呈正比,正常大鼠 0 分。各组在 14 d 进行 1 次神经行为学评分。

1.4 电针方法

“曲池”和“足三里”穴位在针灸临床和实验室动物研究中被广泛使用。《内经》中写到“治萎独取阳明”,而“曲池”和“足三里”分别为手、足阳明经合穴,阳明经为多气多血之经,具有联接脏腑内外、沟通上下等功能,并且相关实验研究表明,针刺“足三里”对缺血性脑卒中患者脑血流自动调节功能、脑血管舒缩反应能力、大脑半球侧支循环代偿功能有明显改善作用^[17]。针刺“曲池”可显著改善缺血性脑卒中上肢功能障碍患者的运动功能,促进日常生活能力的恢复^[18],因此我们遴选“足三里”和“曲池”穴进行实验。将大鼠置于自制容器固定,在功能障碍侧,选取 1 寸毫针刺刺激,电针组大鼠针刺“足三里”和“曲池”,非经穴电针组则针刺足阳明胃经、手阳明大肠经以外的非 14 经穴的左侧的其它穴位,模型组、正常组大鼠在自制容器中固定 30 min。使用“华佗牌”10 号 1 寸毫针,穴位定位依据方宗畴《实验大鼠针灸俞穴图谱及针刺手法》^[19]，“足三里”直刺 3 mm,“曲池”直刺 5 mm,均连接华佗牌 sdz-II 型电子针疗仪进行电针治疗 14 d,刺激参数为疏密波,频率为 2 Hz,电流为 1 mA,留针 30 min。

1.5 尼氏染色观察脑梗死区组织形态

各组随机抽取 5 只大鼠,用 3.5%水合氯醛(1 mL/100 g 体质量)进行麻醉,仰卧固定,沿腹中线和胸骨剑突中线向上将皮肤剪至下颌,分离腹部

皮下组织,沿膈肌向两侧剪开胸骨,并用止血钳将胸骨钳紧,将止血钳翻向外侧以充分暴露心脏。分离出主动脉,将灌注针插入心室并送至主动脉内,剪开右心耳,灌注 200 mL 生理盐水,使血液排出,然后开始灌注 300 mL 的 4% (体积分数) 多聚甲醛溶液固定液,大鼠出现四肢抽动,灌注后断颈取脑,取出脑在 4% 多聚甲醛溶液固定 24 h。然后放入 4 °C 冰箱冰冻 10 min 后,切掉多余组织,然后在右侧梗死灶区(正常组大鼠相同部位)进行组织切片,每个标本切片 10 张,每片厚约 10 mm,保存在 4 °C 冰箱。

每组取 5 张切片留置蒸馏水中 2 min,然后将玻片放入湿盒,湿盒置于 50 °C 的水浴箱中,尼氏染色液用离心机离心 2 min,每张玻片滴 5~10 μ L 尼氏染色液,以覆盖组织为准,染色 6 min,然后在蒸馏水中洗涤 2 次(每次数秒钟即可)。置于 95% (体积分数) 乙醇中 5 s 1 次,70% 乙醇中 5 s 2 次后直接观察。观察结果较好的片子进行封片,在显微镜下观察。

1.6 免疫荧光检测脑梗死区 Slit2 和 HSPGs 蛋白的表达

将已切好的另 5 张片放到 PBS 液中,放至微波炉中高温加热 2 min 进行抗原修复,取出后降至室温,用 PBS 液洗 3 次 \times 5 min,放入湿盒,滴山羊血清孵育 30 min,然后倒掉多余的山羊血清,滴 Slit2 和 HSPGs 一抗,稀释比例均为 1:50,4 °C 孵育过夜(15~20 h),次日,将湿盒放至 37 °C 烤箱复温 1.5 h,再入 PBS 液漂洗 3 次 \times 5 min,然后避光操作,滴二抗,稀释比例 1:100,放至 37 °C 烤箱孵育 1 h,然后 PBS 液漂洗 3 次 \times 5 min,滴入 DAPI,PBS 液漂洗 3 次 \times 5 min,滴加少许甘油原液,盖上盖玻片荧光显微镜下观察,计算积分光密度值(IOD 值)。

1.7 Western blot 定量检测脑梗死区 Slit2 和 HSPGs 表达

常规提取另 5 只大鼠脑梗死区(正常组大鼠相同部位)组织蛋白,蛋白浓度为 25.01 μ g/ μ L。灌制聚丙烯凝胶,0.06 分离胶,0.04 浓缩胶,上样量 100 μ g;电泳时先用 80 V 电压直至跑出 marker,再用 120 V 跑至分离胶底部;然后取出凝胶,和相同大小的 PVDF(先用 95% 乙醇固定)置于三层滤纸中间进行转膜,电流 250 mA 约 60~150 min。取出 PVDF 膜,放入 0.05 的脱脂奶粉中封闭;加入一抗(1:200 用 0.1% TBST 配制),4 °C 冰箱过夜;0.01 mol/L PBST 洗 5 min \times 3 次;加二抗(1:5 000 用 0.1% TBST 配制)放置于 37 °C 恒温

箱中 1 h;0.01 mol/L PBST 洗 5 min \times 3 次;将 PVDF 置于化学发光试剂中增强反应 3 min;在暗室中使 X 光片曝光,常规方法显影,定影,并扫入凝胶成像系统进行图像分析(Bio-Rad Gel Doc 2000),计算光密度值(OD 值)重复 3 次。用 GAPDH 为内参,以 Quantity One4.6 (Bio-Rad) 图像分析软件进行结果分析。

1.8 统计学方法

所有数据经过方差齐性检验和正态性检验,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠术后神经功能评分

术后各组大鼠在治疗 14 d 后 mNSS 评分(均数)如下:正常组 0 分,模型组 9.5 分,非经穴电针组 6.5 分,电针组 3.2 分,各组评分比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。

2.2 各组大鼠脑梗死区尼氏染色结果

见图 1。在显微镜下观察大鼠缺血梗死灶,正常组可见尼氏体(紫色三角形则是尼氏体)排列整齐,且数量较多;模型组与正常组相比,模型组可见尼氏体数量变少、排列紊乱、大脑水肿;非经穴电针组与模型组相比,在非经非穴治疗 14 d 后,可见尼氏体数量增多,但依旧排列紊乱;在电针治疗 14 d 后,可见尼氏体数量增多、排列整齐。

2.3 各组大鼠脑梗死区 Slit2 和 HSPGs 的免疫荧光检测结果

如图 2、图 3、表 1 所示:正常组 Slit2 和 HSPGs (蓝色表示细胞核,周围的圈红色的荧光则是细胞浆,Slit2 和 HSPGs 主要表达于细胞浆)IOD 值高于电针组、模型组和非经穴电针组,差异有统计学意义($P < 0.05$),电针组高于模型组及非经穴,差异有统计学意义($P < 0.05$),非经穴电针组高于模型组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.4 Western blot 检测各组大鼠脑梗死区 Slit2 和 HSPGs 表达的结果

由表 2、图 4 可见:正常组 Slit2 和 HSPGs 表达较高,造模成功后可见 Slit2 和 HSPGs 表达同时降低,差异有统计学意义($P < 0.05$),经过非经穴电针组治疗 14d 后,Slit2 和 HSPGs 表达较模型组升高,差异有统计学意义($P < 0.05$),针刺“曲池”和“足三里”14 d 后,Slit2 和 HSPGs 表达较非经穴电针组升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

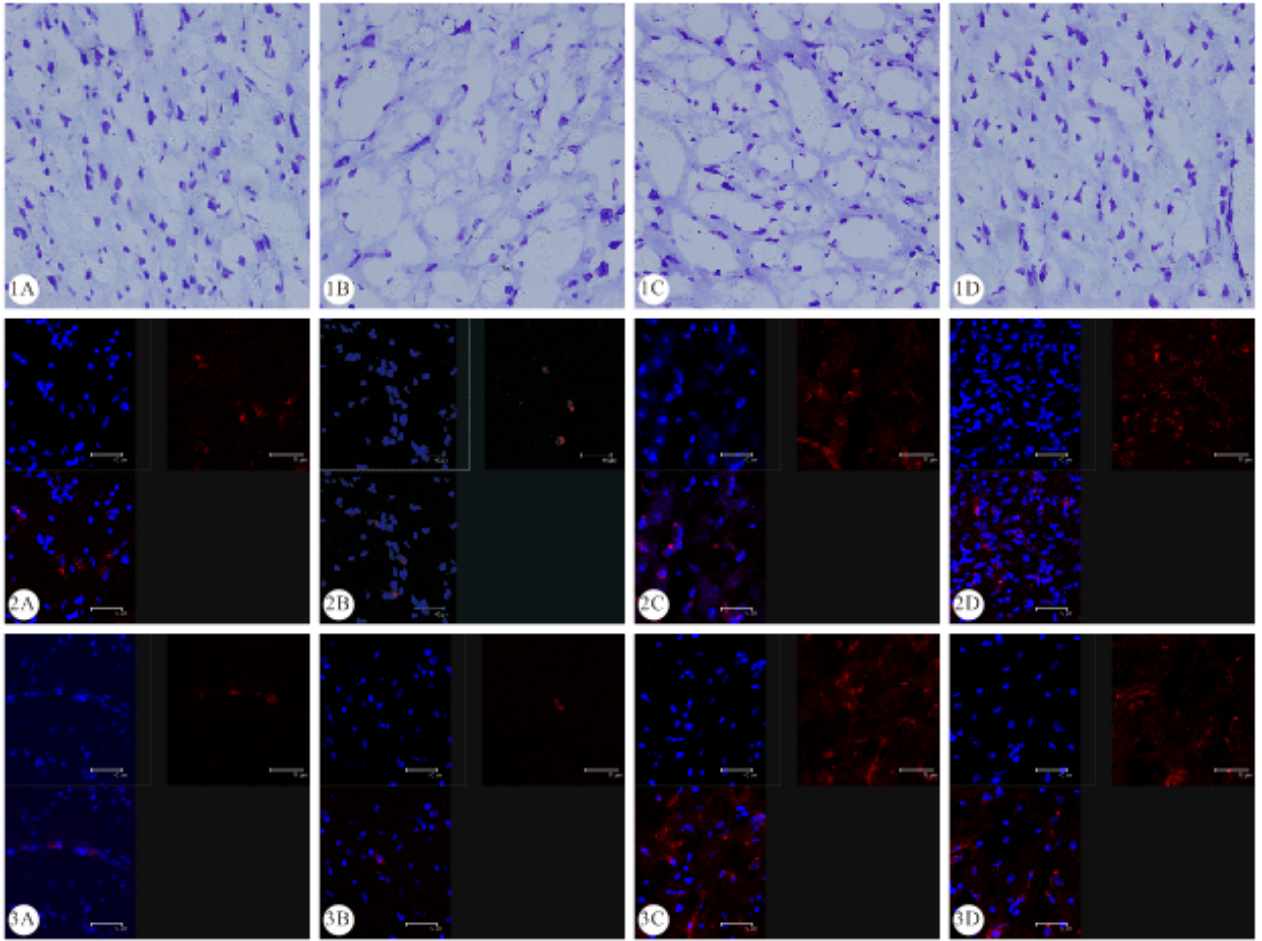


图 1 各组大鼠脑梗死区尼氏染色。×400 图 2 各组大鼠脑梗死区组织 Slit2 免疫荧光染色。×800 图 3 各组大鼠脑梗死区组织 HSPG 免疫荧光染色。×800

Fig 1 Nissl's staining in brain issues of rats. ×400 Fig 2 Slit2 immune fluorescence staining in brain issues of rats. ×800 Fig 3 HSPG immune fluorescence staining in brain issues of rats. ×800

A: Normal group; B: Model group; C: Non-acupoint group; D: EA group

表 1 Slit2 和 HSPGs 的 IOD 值

Table 1 Immunofluorescence intensity of Slit2 and HSPGs (IOD value)

Group	n	Slit2	HSPGs
Normal	5	52.15±0.65	37.05±1.11
Model	5	37.27±0.51 [#]	23.81±0.88 [#]
Non-acupoint	5	40.64±0.43 ^{#·△}	27.59±0.91 ^{#·△}
EA	5	44.58±0.47 ^{#·△·☆}	30.74±0.93 ^{#·△·☆}

[#]*P*<0.05, vs. normal group; [△]*P*<0.05, vs. model group; [☆]*P*<0.01, vs. non-acupoint group

表 2 Slit2 和 HSPGs 蛋白的表达水平(OD 值)

Table 2 Expression of Slit2 and HSPGs in brain tissues of rats (OD value)

Group	n	Slit2	HSPGs
Normal	5	1.06±0.08	0.92±0.02
Model	5	0.75±0.12 [#]	0.61±0.11 [#]
Non-acupoint	5	0.83±0.06 ^{#·△}	0.73±0.04 ^{#·△}
EA	5	0.94±0.03 ^{#·△·☆}	0.84±0.03 ^{#·△·☆}

[#]*P*<0.05, vs. normal group; [△]*P*<0.05, vs. model group; [☆]*P*<0.05, vs. non-acupoint group

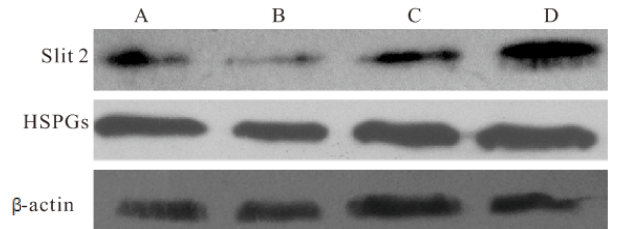


图 4 Western blot 检测各组大鼠的 Slit2 与 HSPGs 蛋白表达
Fig 4 Expression of Slit2 and HSPGs in brain tissues of rats (Western blot)

A: Normal group; B: Model group; C: Non-acupoint group; D: EA group

3 讨论

本研究发现,神经功能评分显示,电针组与模型组、非经穴电针组相比,电针组的 mNSS 评分明显

降低,说明电针干预可以促进缺血性脑卒中的梗死区域神经细胞的可塑性和瘫痪肢体的功能部分重建。现有研究表明,中枢神经系统保留了一些功能可塑性,在适当的条件下能够再生^[20]。在中枢神经的再生中,轴突导向分子对神经网络的形成起了重要的作用,其中最主要的轴突导向分子为 Slit^[21]。Slit2 主要在少突胶质细胞中表达,由 N 末端信号肽、四个领域(D1~D4)、重复的富亮氨酸(LRR)、几个 EGF 象序列、一层粘连蛋白-G 领域和一个半胱氨酸组成。Robo1 是 Slit2 的受体,属于免疫球蛋白(Ig) 超级家族细胞黏附分子^[22],Robo1 受体通过 Ig1 和 Ig2 域绑定 Slit2 的 LRR 域,在大鼠发育的神经系统的特定区域形成神经回路的过程中,发挥至关重要的作用。在受损的中枢神经系统,Slit2 可以促进轴突再生,抑制星形胶质细胞增生和其他方面的组织对损伤的反应,减少病变及细胞凋亡,增强血管生成和细胞髓鞘形成^[23,24];Robo1 主要参与轴突生长、树突分支,介导神经细胞迁移等生理过程^[25,26]。

HSPGs 由蛋白多糖核心蛋白质和硫酸乙酰肝素(HS)链子组成,是 Slit-Robo 的协同受体^[27,28],HS 与 Robo 受体 Ig1 域形成三元复合体或与 Slit 的 D4 域结合形成二聚体,稳定和加强 Slit-Robo 相互作用。HSPGs 具有双重角色,作为细胞黏附管理者时,在细胞外结合其他轴突导向分子,而作为信号分子时,HSPGs 能引导轴突导向分子定向移动。在中枢神经系统损伤的时候 HSPGs 可以调控轴突在体内生长,参与中枢神经轴突生长、延伸、靶细胞识别等过程,促进 Slit2-Robo1 相互作用^[29,30],如果用降解酶清除 HSPGs,会导致轴突导向因子 Slit2 与细胞表面的结合受阻,从而减弱 Slit2 对生长锥的排斥作用^[31],阻碍脑卒中后的神经网络重建,从而影响中枢神经可塑性。

本实验研究结果表明,尼氏染色显示,电针治疗脑梗死大鼠 14 d 后神经细胞增多、排列整齐;免疫荧光、Western blot 显示,电针组 Slit2、HSPGs 分子蛋白表达增多,说明电针可通过促进 Slit2 和 HSPGs 的表达,对脑梗死大鼠神经细胞功能产生一定的修复作用。这可能是电针治疗脑卒中功能恢复的生物学机制之一。

参 考 文 献

1 龚 标,李长清,李隆龄. 针刺、推拿配合功能训练改善脑梗死患者神经功能和日常生活活动能力. 中国临床康复,2006;10

- (11):1-4.
- 2 Tessier Lavigne M, Goodman CS. The molecular biology of axon guidance. *Science*,1996;274(5290):1123-1133.
 - 3 Wu W, Wong K, Chen J, *et al.* Directional guidance of neuronal migration in the olfactory system by the protein slit. *Nature*, 1999;400(6742):331-336.
 - 4 Pircher A, Wellbrock J, Fiedler W, *et al.* New antiangiogenic strategies beyond inhibition of vascular endothelial growth factor with special focus on axon guidance molecules. *Oncology*,2014;86(1):46-52.
 - 5 Refai O, Rohs P, Mains PE, *et al.* Extension of the *Caenorhabditis elegans* Pharyngeal M1 neuron axon is regulated by multiple mechanisms. *G3 (Bethesda)*,2013;3(11):2015-2029.
 - 6 Yaron A, Zheng B. Navigating their way to the clinic: emerging roles for axon guidance molecules in neuroles in neurological disorders and injury. *Dev Neurobiol*,2007;67(9):1216-1231.
 - 7 Campbell DS, Holt CE. Apoptotic pathway and MAPKs different tially regulate chemotropic responses of retinal growth cones. *Neuron*,2003;37(6):939-952.
 - 8 Brose K, Bland KS, Wang KH, *et al.* Slit proteins bind Robo receptors and have an evolutionarily conserved role in repulsive axon guidance. *Cell*,1999;96(6):795-806.
 - 9 Hu H. Chemorepulsion of neuronal migration by Slit2 in the developing mammalian forebrain. *Neuron*, 1999;23(4):703-711.
 - 10 Ozdinler PH, Erzurumlu RS. Slit2, a branching-arborization factor for sensory axons in the mammalian CNS. *Neurosci*, 2002;22(11):4540-4549.
 - 11 于 奇,周启升,赵 晓等. 神经轴突导向分子 Slit 的功能及其分子作用机制研究进展. *生理学报*,2012;64(2):220-230.
 - 12 James G, Foster SR, Key B, *et al.* The expression pattern of EVA1C, a novel slit receptor, is consistent with an axon guidance role in the mouse nervous system. *PLoS One*,2013;8(9):e74115. doi:10.1371/journal.pone.0074115.
 - 13 Kimberley F, Guadagnoli M, van Eenennaam H, *et al.* A proliferation-inducing ligand (APRIL): the development of antagonistic agents as potential therapeutics and deciphering the role of heparan sulphate proteoglycans (HSPGs) in APRIL Signalling. *Adv Exp Med Biol*, 2011;691:501-506. doi:10.1007/978-1-4419-6612-4_52.
 - 14 Wang B, Xiao Y, Ding BB, *et al.* Induction of tumor angiogenesis by Slit-Robo signaling and inhibition of cancer growth by blocking Robo activity. *Cancer Cell*,2003;4(1):19-29.
 - 15 Thompson H, Camand O, Barker D, *et al.* Slit proteins regulate distinct aspects of retinal ganglion cell axon guidance within dorsal and ventral retina. *J Neurosci*,2006;26(31):8082-8091.
 - 16 Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, *et al.* Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*, 1989;20(1):184-191.

(下转第 213 页)

- 12 王倩,管小琴.大鼠非酒精性脂肪肝造模方法的改进.世界华人消化杂志,2007;15(11):1219-1224
- 13 李忠仁.实验针灸学.北京:中国中医药出版社,2007:255-257.
- 14 郝婕,唐成林,刘仁健等.不同强度电针对肥胖大鼠附睾脂肪细胞内质网应激的影响.中国病理生理杂志,2013;29(2):354-357.
- 15 Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007;8(7):519-529.
- 16 Zhang Y, Venugopal SK, He S, *et al.* Ethanol induces apoptosis in hepatocytes by a pathway involving novel protein kinase C isoforms. Cell Signal, 2007;19(11):2339-2350.
- 17 Liu J, Jin X, Yu CH, *et al.* Endoplasmic reticulum stress involved in the course of lipogenesis in fatty acids-induced hepatic steatosis. J Gastroenterol Hepatol, 2010;25(3):613-618.
- 18 Leamy AK, Egnatchik RA, Young JD. Molecular mechanisms and the role of saturated fatty acids in the progression of non-alcoholic fatty liver disease. Prog Lipid Res, 2013;52(1):165-174.
- 19 Wang H, Chan PK, Pan SY, *et al.* ERp57 is up-regulated in freefatty acids-induced steatotic L-02 cells and human nonalcoholic fatty livers. J Cell Biochem, 2010;110(6):1447-1456.
- 20 McPherson R, Gauthier A. Molecular regulation of SREBP function; the Insig-SCAP connection and isoform-specific modulation of lipid synthesis. Biochem Cell Biol, 2004;82(1):201-211.
- 21 Higuchi N, Kato M, Shundo Y, *et al.* Liver X receptor in cooperation with SREBP-1c is a major lipid synthesis regulator in nonalcoholic fatty liver disease. Hepatol Res, 2008;38(11):1122-1129.
- 22 杨敏.非酒精性脂肪肝的中医学研究进展.中医临床研究,2012;4(3):118-120.
- 23 夏建国,储浩然.针灸治疗高脂血症研究进展.中医药临床杂志,2011;23(1):86-88.

(2015-09-20 收稿,2015-12-25 修回)

编辑 汤洁

(上接第 207 页)

- 17 陈文,顾红卫,马维平等.针刺足三里、悬钟对缺血性中风患者脑血管功能的影响.多中心随机对照研究.中国针灸,2006;6(1):851-853.
- 18 廖少钦,江征,卓丽萍等.针刺“曲池”“外关”穴位促进脑卒中手功能恢复临床研究.亚太传统医药,2014;10(22):60-62.
- 19 方宗畴.实验大鼠针灸穴位图谱及针刺手法.南京铁道医学院学报,1993;12(1):19-21.
- 20 Schwab ME. Repairing the injured spinal cord. Science, 2002;295(5557):1029-1031.
- 21 Marillat V, Cases O, Nguyen-Ba-Charvet KT, *et al.* Spatiotemporal expression patterns of slit and robo genes in the rat brain. J Comp Neurol, 2002;442(2):110-155.
- 22 Seeger M, Tear G, Ferres-Marco D, *et al.* Mutations affecting growth cone guidance in Drosophila: genes necessary for guidance toward or away from the midline. Neuron, 1993;10(3):409-426.
- 23 Kaneko S, Iwanami A, Nakamura M, *et al.* A selective Sema1A inhibitor enhances regenerative responses and functional recovery of the injured spinal cord. Nat Med, 2006;12(12):1380-1389.
- 24 Zheng B, Lee JK, Xie F. Genetic mouse models for studying inhibitors of spinal axon regeneration. Trends Neurosci, 2006;29(11):640-646.
- 25 Whitford KL, Marillat V, Stein E, *et al.* Regulation of cortical dendrite development by Slit-Robo interactions. Neuron, 2002;33(1):47-61.
- 26 Andrews W, Liapi A, Plachez C, *et al.* Robo1 regulates the development of major axon tracts and interneuron migration in the forebrain. Development, 2006;133(11):2243-2252.
- 27 Johnson KG, Tenney AP, Ghose A, *et al.* The HSPGs Syndecan and Dallylike bind the receptor phosphatase LAR and exert distinct effects on synaptic development. Neuron, 2006;49(4):517-531.
- 28 Walz A, McFarlane S, Brickman YG, *et al.* Essential role of heparan sulfates in axon navigation and targeting in the developing visual system. Development, 1997;124(12):2421-2430.
- 29 杨新颖,王丽梅,戴功等.硫酸多糖在介导胶质细胞源性神经生长因子神经营养活性中的作用.中国临床康复,2005;9(38):126-129.
- 30 朱莉,吴连俊,王彦亮.硫酸乙酰肝素蛋白聚糖在神经损伤再生反应中的作用.国际口腔医学杂志,2013;40(5):687-690.
- 31 Paveliev M, Hienola A, Jokitalo E, *et al.* Sensory neurons from N-syndecan-deficient mice are defective in survival. Neuroreport, 2008;19(14):1397-1400.

(2015-08-30 收稿,2015-12-25 修回)

编辑 沈进