

·基础研究·

针刺对缺血性脑卒中大鼠 MBP 基因表达的影响

段建钢¹ 刘 鸣^{1,2}

摘要 目的:从 MBP 基因表达水平来观察针刺对缺血性脑卒中大鼠受损髓鞘的神经保护作用。方法:选用 48 只成年雄性 SD 大鼠,随机分为正常组、模型组、早期针刺组、晚期针刺组。用线栓法制备局灶性脑缺血再灌注模型。分别于缺血后不同时间点进行针刺。应用半定量 RT-PCR 法、实时荧光定量 PCR 法对各组在实验开始后不同时间点缺血灶 MBP 基因转录水平进行动态观察。结果:①模型组缺血灶 MBP mRNA 的含量随着观察时间的延长逐渐升高,在第 7 天时明显升高($P<0.05$);②与模型组相比,针刺组在各个时间点的脑 MBP mRNA 含量随着时间的推移迅速增高($P<0.05$);③与晚期针刺组比较,早期针刺组脑 MBP mRNA 含量增高的幅度更高、速度更快($P<0.05$)。结论:脑缺血后,针刺可能是通过明显刺激 MBP 基因转录,使 MBP 合成增多,从而促进髓鞘再生。早期针刺更有利于刺激 MBP 基因的转录。

关键词 针刺;缺血性脑卒中;大鼠;髓鞘碱性蛋白;基因表达

中图分类号:R246,R743.3,R493 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2009)-03-0240-04

The effect of acupuncture on MBP mRNA expression in ischemic stroke rats/DUAN Jian gang, LIU Ming// Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2009, 24(3): 240—243

Abstract Objective: To observe neuroprotective effect of acupuncture on injured cerebral myelin in ischemic stroke rats from the expression of myelin basic protein (MBP)mRNA. **Method:** Forty-eight adult male Sprague-Dawley rats were employed in this study, and divided into normal, ischemia-reperfusion model, early acupuncture and late acupuncture groups by random digits table. Focal cerebral ischemia-reperfusion models were established with thread embolism method. Acupuncture was applied on different time points after ischemia. The expressions of MBP mRNA were observed continuously by RT-PCR and Real-time fluorescent quantitative PCR (FQ-PCR) techniques in all groups before operation and on different time points after operation respectively. **Result:** ①In model group the expressions of ischemic focus MBP mRNA upregulated gradually, and ascended significantly on the 7th d ($P<0.05$). ②Compared with model group, in acupuncture group the expressions of ischemic focus MBP mRNA ascended rapidly on different time points ($P<0.05$). ③Compared with late acupuncture group, in early acupuncture group the expressions of ischemic focus MBP mRNA ascended higher and faster ($P<0.05$). **Conclusion:** Acupuncture treatment could promote remyelination by stimulating transcription of MBP mRNA obviously and increasing the synthesis of MBP mRNA in ischemic focus after focal cerebral ischemia. Early acupuncture treatment could provide more beneficial effect to stimulate transcription of MBP mRNA.

Author's address Dept. of Neurology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu, 610041

Key words acupuncture; ischemic stroke; rat; myelin basic protein; gene expression

髓鞘碱性蛋白(myelin basic protein, MBP)是功能上很重要的髓鞘结构蛋白,MBP 受基因的调控,MBP 基因表达增加,引起 MBP 合成增加,从而促进髓鞘的形成^[1]。本研究已观察到“醒脑开窍”针刺法对受损脑髓鞘有保护作用^[2],并且可能通过刺激缺血性脑卒中大鼠的髓鞘再生而有助于神经功能恢复,而针刺是否通过刺激 MBP 基因转录来促进 MBP 合成增多的研究尚未见报道。为此,本研究拟以半定量 RT-PCR 法、实时荧光定量(fluorescent quantitative, PCR)(FQ-PCR)法对在不同时间窗进行针刺的缺血性脑卒中大鼠在针刺后不同时间点的缺血灶 MBP 基因转录情况进行动态观察,为进一步研究针刺治疗脑白质损伤的分子机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 药品和试剂

RT-PCR 引物设计及合成由成都博瑞克生物技术有限公司提供;FQ-PCR 引物合成及探针修饰由上海生物工程有限公司提供;总 RNA 提取试剂盒由北京 TIANGEN 公司提供。

1.2 实验设计

将体重在 250—300g 符合纳入标准的健康雄性

1 四川大学华西医院神经内科,610041;现在天津市环湖医院神经内科工作,300060

2 通讯作者

作者简介:段建钢,男,主治医师,博士

收稿日期:2008-08-11

清洁级 SD 大鼠 48 只用随机数字表的方法随机分成以下 4 组: 正常组(N)、缺血再灌注模型组(C+)、缺血再灌注早期针刺组(E2)、缺血再灌注晚期针刺组(E3); 除 N 组外, 每组又分成 5 个时间点进行检测: 分别是造模前(0 h) 和造模后第 1 天、第 3 天、第 5 天、第 7 天。N 组为 3 只, C+、E2、E3 组的大鼠分别为 15 只, 这三个组在各个时间点的鼠分别为不同的 3 只。其中 E2 和 E3 组在针刺治疗开始的时间窗上有区别, E2 组是在缺血 30min 时开始针刺, E3 组是在缺血 2h 拔线实现再灌注时给予针刺治疗。

1.3 模型的制备方法及判断标准

1.3.1 脑缺血再灌注动物模型的制备: 采用改良的线栓法制备大鼠右侧大脑中动脉阻塞的局灶性脑缺血再灌注模型。麻醉、手术期间及大鼠苏醒过程中均用烤灯使大鼠肛温保持在 37—37.5℃。待大鼠苏醒后送回恒温动物室内单笼喂养、观察。

1.3.2 模型成功的判断标准: 大鼠清醒后具备以下特征者为造模成功: 大鼠左前肢无力向左侧方爬行, 或者朝左侧转圈爬行, 并且无烦躁不安体征者。处死动物时检查线栓是否在大脑中动脉内予以进一步验证。

1.4 治疗方法

造模成功的动物用自制鼠夹固定, 不麻醉。根据华兴邦等^[3]制定的大鼠针灸穴位图谱, 主穴: 双侧内关(手厥阴心包经)、水沟(督脉)、双侧三阴交(足太阴脾经)。配穴: 百会(督脉)。采用苏州生产的华佗牌毫针, 规格为直径 0.20 mm, 针身长 0.25—0.50 寸。选用天津脑卒中研究组创立的“醒脑开窍”针刺法进行针刺: 先直刺双侧“内关”1mm 至筋间, 用捻转提插结合的泻法, 持续 1min, 留针 15min; 继刺水沟, 在鼻中隔下部向上斜刺“水沟”穴 1mm, 施雀啄法强刺激 1min; 其次刺三阴交, 直刺 5mm, 采用提插补法刺激 1min; 最后向前或向后斜刺“百会穴”2mm, 并采用平补平泻的捻转手法, 转角度 180°左右, 施手法 1min, 留针 15min, 留针期间各行针 2—3 次。每天治疗 1 次, 最长的疗程为 7d。正常组、模型组大鼠在实验开始后不同的观察时间点均用鼠夹固定相同的时间, 不进行针刺。

1.5 脑标本的采集及储存

各组在每个时间点分别选 3 只动物, 于相应时间点经 10% 水合氯醛(0.5ml/100g 体重)腹腔深度麻醉, 用经过高温处理的无 RNA 酶的手术器械迅速剪开头皮, 断头、取缺血侧脑组织, 移入用 0.1% 的 DEPC 水浸泡过并烤干的 1.8ml 冻存管中, 标记后迅

速投入液氮罐中保存。

1.6 半定量 RT-PCR 检测 MBP mRNA 的表达

1.6.1 引物设计: 以 GAPDH 基因为内参基因, 遵循引物设计的原则^[4], 设计普通 RT-PCR 的 MBP、GAPDH 引物, 如表 1 所示。

表 1 普通 RT-PCR 引物

基因/引物		序列	引物长度	产物长度
MBP				250bp
上游	5′-CTTCTTTAGCGGTGACAGGG-3′		20bp	
下游	5′-TCTTGCCATGGGAGATCCAG-3′		20bp	
GAPDH				450bp
上游	5′-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3′		20bp	
下游	5′-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3′		20bp	

1.6.2 RT-PCR 操作步骤: 按总 RNA 提取试剂盒的说明, 采用一步法提取 RNA, 用分光光度计检测, 并经 1% 琼脂糖凝胶电泳 70V, 1h 鉴定, 28s、18s 条带清晰可见, 无明显降解, 将样品置于 -70℃ 冰箱保存。按照试剂盒操作说明合成 cDNA 第一链, 然后进行 PCR 30 个循环(94℃ 30s, 54℃ 退火 30s; 72℃ 45s, 72℃ 延伸 5min)。PCR 反应结束后, 以 1.0% 的琼脂糖进行 DNA 凝胶电泳; 80V, 90min。通过 EB 染色, 在紫外灯下观察电泳条带并照相。以 Gel Doc 1000 凝胶成像系统进行灰度扫描, 检测电泳条带光密度值, 以 GAPDH 作内参校正, 以实现结果的半定量分析。MBP mRNA 表达的相对量就是 DNA 的光密度强度比值(ratio)=MBP mRNA/GAPDH mRNA。

1.7 实时 FQ-PCR 检测 MBP mRNA 的表达

1.7.1 FQ-PCR 的 MBP、GAPDH 引物和 TaqMan 荧光探针: 由 TaKaRa 公司合成并经质量检测, 如表 2 所示。

表 2 FQ-PCR 引物及 TaqMan 荧光探针

基因/引物	序列	引物长度	产物长度	
MBP			107bp	
上游	5'-ACACGGGCATCCTTGACT-3'	18bp		
下游	5'-GGAGCCGTAGTGGGTAGTT-3'	19bp		
TM	5'- FAMTTGGGCGCACCCCTGTCA-TAMRA3'	18bp		
GAPDH				141bp
上游	5'-CCTCAAGATTGTCAGCAAT-3'	19bp		
下游	5'-CCATCCACAGTCTTCTGAGT-3'	20bp		
TM	5'- FAMACCACAGTCCATGCCATCACTAMRA3'	20bp		

TM: 代表 TaqMan 探针; 5'端标记的 FAM, 为报告荧光基团, 3'端加上荧光淬灭基团: TAMRA

1.7.2 FQ-PCR 扩增 MBP 和 GAPDH 目的基因。

1.7.2.1 将 MBP 与内参 GAPDH 基因一起扩增, 按照试剂盒操作说明进行, 反应体系在 FTC2000 型荧光定量 PCR 仪上进行, 扩增条件如下: 94℃ 变性 2 min, 94℃ 20s, 55℃ 退火 30s, 60℃ 延伸 40s, 45 次循环。

1.7.2.2 制作标准曲线: 将 PCR 仪的荧光采集时间

统一设定在扩增反应的延伸期。45次循环的扩增反应结束后,绘制每一反应管的扩增动力学曲线。根据动力学曲线确定每个样品管中荧光强度增加到某一特定阈值时的扩增循环数(C_t 值),根据 C_t 值与标准模板(cDNA)初始拷贝的对数值作图,得到该样品的标准曲线。

1.8 统计学分析

通过普通 RT-PCR 检测的光密度值和用 FQ-PCR 检测的由原始数据(C_t 值)换算成的基因相对表达量,均使用 SPSS11.0 软件进行统计学处理,正态分布数据用均数 $\pm$ 标准差表示,不同组不同时间点的比较使用重复测量方差分析,根据情况进行两两比较。 α 设为 0.05。

2 结果

2.1 普通 RT-PCR 结果

采用普通 RT-PCR 检测各组动物在各个时间点缺血区脑 MBP mRNA 的表达水平。将 MBP 基因与内参 GAPDH 基因放在同一泳道上进行电泳,均扩增出了相应产物长度的基因;经凝胶成像系统进行灰度扫描,计算出各组在各个时间点 MBP mRNA 表达的相对量。表 3 中,N 组脑 MBP mRNA 有少量表达。C+、E2、E3 组进行组内比较,不同时间点与造模前相比,脑 MBP mRNA 含量均随着时间的推移

而升高,但升高幅度不同:模型组在造模后第 1 天时,脑 MBP mRNA 含量略升高,差异无显著性($P>0.05$),在其余时间点,其 MBP mRNA 含量随着观察时间的延长逐渐升高,差异具有显著性($P<0.05$);针刺组在造模后不同时间点的脑 MBP mRNA 含量均随着时间的推移明显升高,差异具有显著性($P<0.01$)。对不同组进行组间比较,可以看出在 0h 时各组间的 MBP mRNA 含量无明显差异($P>0.05$),在其余时间点,各组间 MBP mRNA 含量差异均有显著性($P<0.01$),其中 E2、E3 组的脑 MBP mRNA 含量增高的幅度均高于 C+组,且 E2 组的脑 MBP mRNA 含量增加的幅度比 E3 组快。

2.2 实时荧光定量 PCR 结果

2.2.1 标准曲线的绘制:MBP 基因和 GAPDH 基因的 cDNA 模板按 10 倍梯度进行稀释,行 FQ-PCR 扩增。先绘制扩增动力学曲线,然后根据动力学曲线,以各样品初始拷贝数的对数为横坐标, C_t 值为纵坐标,拟合标准曲线。如图 1、图 2 所示,本实验中 MBP 和 GAPDH 基因标准曲线的相关系数均为 1,说明 C_t 值与模板初始拷贝数对数之间的线性关系良好,拟合满意。利用标准曲线求得的扩增效率平均为 1.94,只要获得未知样品的 C_t 值,即可利用标准曲线计算出该样品的起始拷贝数。

2.2.2 各组待测样品 MBP 基因的起始拷贝数:采用

表 3 缺血性脑卒中大鼠缺血侧脑 MBP mRNA 相对量的动态变化

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

组别	例数	0h	第 1 天	第 3 天	第 5 天	第 7 天
C+组	15	0.52 $\pm$ 0.016	0.57 $\pm$ 0.016 ^②	0.72 $\pm$ 0.019 ^①	0.84 $\pm$ 0.019	1.03 $\pm$ 0.023
E2 组	15	0.52 $\pm$ 0.012	0.86 $\pm$ 0.013 ^①	1.03 $\pm$ 0.014	1.36 $\pm$ 0.017	1.95 $\pm$ 0.024 ^③
E3 组	15	0.52 $\pm$ 0.028	0.67 $\pm$ 0.015 ^①	0.87 $\pm$ 0.018	1.04 $\pm$ 0.016	1.45 $\pm$ 0.071 ^③
N 组	3	0.52 $\pm$ 0.028	0.52 $\pm$ 0.028	0.52 $\pm$ 0.028	0.52 $\pm$ 0.028	0.52 $\pm$ 0.028

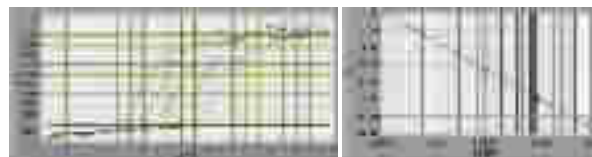
注:经重复测量方差分析检验:同一组内不同时间点与造模前比较,① $P<0.05$,② $P>0.05$;不同组间相对应时间点的 MBP 值进行比较,在第 7 天时,E2、E3 与 C+ 组比较,③ $P<0.05$ 。



(a)MBP 基因扩增动力学曲线 (b)MBP 基因标准曲线

图 1 MBP 基因标准曲线的绘制

Taq Man 荧光探针,对各组脑标本进行 FQ-PCR 检测,根据各组的扩增动力学曲线确定每个样品管中荧光强度增加到某一特定阈值时的 C_t 值,与标准曲线比较,得出各组大鼠缺血侧脑 MBP mRNA 初始拷贝数的相对量(表 4)。由表 4 可见,正常组(N)脑 MBP mRNA 的初始拷贝数较低。同一组内不同时间点与造模前相比,模型组(C+)缺血侧脑 MBP mRNA 的初始拷贝数在第 1 天、第 3 天时略有升高,差异无显著性($P>0.05$),以后随着时间的延长,增加缓慢,



(a)GAPDH 基因扩增动力学曲线 (b)GAPDH 基因标准曲线

图 2 GAPDH 基因标准曲线的绘制

差异具有显著性($P<0.05$),在第 7 天时,与第 1 天相比差异具有显著性($P<0.01$),第 3 天与第 1 天、第 5 天与第 3 天、第 7 天与第 5 天之间相比其差异均无显著性($P>0.05$);早期针刺组(E2)在造模后不同时间点缺血侧脑 MBP mRNA 的初始拷贝数均随着时间的推移迅速升高,差异具有显著性($P<0.05$);晚期针刺组(E3)缺血侧脑 MBP mRNA 的初始拷贝数在 1d 时有所升高,差异无显著性($P>0.05$),以后也随着治疗时间的延长,迅速增高,差异具有显著性($P<$

0.05)。对不同组间相对应时间点缺血侧脑 MBP mRNA 的初始拷贝数进行比较,可以看出,在 0 h 时各组间的差异均无显著性($P>0.05$),在其余时间点,各组间的差异均有显著性意义($P<0.01$),其中 E2、

E3 组的脑 MBP mRNA 初始拷贝数增高的幅度均高于 C+ 组,且 E2 的脑 MBP mRNA 初始拷贝数增加的幅度比 E3 组快($P<0.01$)。

表 4 缺血性脑卒中大鼠脑 MBP mRNA 初始拷贝数的动态变化

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

组 别	例数	0h	第 1 天	第 3 天	第 5 天	第 7 天
C+组	15	1.22±0.424	1.97±0.116 ^②	2.56±0.095 ^②	4.83±0.629 ^①	6.96±0.111 ^①
E2 组	15	1.23±0.424	3.57±0.050 ^①	6.89±0.031	12.88±0.275	17.90±0.258 ^③
E3 组	15	1.23±0.012	2.48±0.091 ^②	4.96±0.084 ^①	9.55±0.129	13.13±0.263 ^③
N 组	3	1.23±0.424	1.23±0.424	1.23±0.424	1.23±0.424	1.23±0.424

注:经重复测量方差分析检验;同一组内不同时间点与造模前比较:① $P<0.05$,② $P>0.05$;不同组间相对应时间点的 MBP 值进行比较,在第 7 天时,E2、E3 与 C+ 组比较,③ $P<0.05$ 。

3 讨论

在中枢神经系统中,神经纤维要经过髓鞘化才能发挥正常的传导功能。髓鞘的形成要依靠几种髓鞘基因的协调表达^[5-8],MBP 基因是髓鞘结构基因的代表,其正确表达在髓鞘形成过程中扮演着重要的角色^[9]。在神经再生机制的精确调控下,足够的 MBP 对 CNS 的功能恢复是必要的^[10],因为 MBP 的缺乏导致髓鞘形成不足,从而引起各种各样的神经功能障碍^[11-12]。有文献报道,MBP 基因的表达水平是与髓鞘形成相平行的^[13]。

人和鼠的 MBP 基因均位于第 18 号染色体远端;序列比较表明该基因具有高度保守性,因为 MBP 基因在转录水平的调节机制上是保守的^[14]。人和鼠的同源序列在编码区达 93%,5'端非编码区和上游调节区为 80%^[15]。由此可见,人和鼠的 MBP 基因有高度的同源性。

在成髓鞘的 OLs 中 MBP 的表达主要是在基因的转录水平被调节。为此,本实验以 RT-PCR 及 FQ-PCR 方法连续观察了 MBP 基因在各组缺血性脑卒中大鼠缺血区脑组织中的表达情况。普通的 RT-PCR 方法以其迅速、简便、灵敏等优点成为科研、临床诊断中的常用技术,但其测得的基因表达相对量的准确性相对较差。FQ-PCR 技术通过对 Ct 值的准确判读,按指数扩增的规律计算出初始模板拷贝数,其结果的准确性非常高,是近年来分子生物学界广泛应用的检测基因转录水平的方法^[16-17],但其价格昂贵。因此,本实验先采用 RT-PCR 法检测各组 MBP 基因转录水平,旨在发现针刺是否有促进 MBP 基因转录的趋势,之后选用 FQ-PCR 对 MBP mRNA 的初始拷贝数进行检测,以进一步明确针刺对该基因转录的影响。

通过 RT-PCR 及 FQ-PCR 法的研究结果表明:正常成年大鼠脑 MBP mRNA 有少量表达,这可能是由于成年大鼠在未受缺血损伤的情况下,其自身的 MBP 基因表达量较低;模型组在缺血损伤后,脑

MBP mRNA 的表达随着时间的推移缓慢升高,在第 7 天时其值明显高于第 1 天,这提示大鼠脑部存在一定的自然恢复机制^[18-19],而缺血损伤只能一定程度上通过激活脑的自然恢复机制来轻度刺激 MBP 基因的转录,从而促进 MBP 的合成,这与文献报道的一致^[20],但从实验结果可以看出,脑部的这种自然恢复机制在缺血损伤的刺激下,其潜能是有限的;针刺组的脑 MBP mRNA 含量随着时间的推移迅速增高,在造模后不同时间点均明显高于模型组,说明针刺治疗能明显激活脑的自然恢复机制,或者可能通过激活某条信号传导通路来增加 MBP 基因的转录,使 MBP 合成增多,从而促进髓鞘的再生;在针刺治疗后的相应时间点,早期针刺组(E2)的脑 MBP mRNA 含量增高的幅度均高于晚期针刺组(E3),这提示针刺的早期参与更有助于刺激 MBP 基因的转录,使 MBP 合成量增加,从而更有利于髓鞘的再生。这与本研究小组前期的研究结果^[2]一致。本次实验从基因转录水平进一步明确了针刺可促进脑缺血区 MBP 基因的转录,并且早期针刺优于晚期针刺。在实验中,通过 RT-PCR 和 FQ-PCR 法得出的研究结果,除了有些细微的差别,基本一致。

本研究在针刺治疗的 7d 内观察到缺血损伤和针刺治疗均能够刺激缺血性脑卒中大鼠缺血区脑 MBP mRNA 的转录,并且 MBP 基因转录水平也随着缺血时间或针刺时间的延长而增加,但是在 7d 之后脑 MBP mRNA 的转录水平如何,仍待今后进一步研究。

针刺是通过何种分子机制来促进 MBP 基因的转录,从而促进髓鞘再生未有报道。脑髓鞘的再生和重塑是一个十分复杂的课题。在缺血性脑卒中后,深入了解髓鞘的再生机制及针刺对髓鞘再生的影响可能会为临床上对缺血后脑白质的结构和功能的恢复提供新的治疗策略。本研究初步探讨了缺血性脑卒中后针刺促进髓鞘再生的机制,其结果为进一步深

(下转 251 页)