

·基础研究·

电针对脑缺血再灌注模型大鼠脑源性神经营养因子表达的影响*

叶晓倩¹ 江一静² 游咏梅¹ 陶静¹ 吴雅吟¹ 江欣¹ 黄佳¹ 林志诚¹ 邹愉龙¹ 陈立典^{1,3}

摘要

目的:观察电针(EA)对脑缺血再灌注模型大鼠脑组织中脑源性神经营养因子(BDNF)表达,探讨电针治疗缺血性脑卒中的作用机制。

方法:SPF级雄性大鼠60只,随机分为假手术组、模型组和电针组,每组均为20只;模型组和电针组均用改良的线栓法建立大鼠左侧大脑中动脉缺血(MCAO)再灌注模型。电针患侧“曲池穴”和“足三里穴”30min,1次/d,至动物处死。蛋白免疫印记杂交和聚合酶链反应技术(RT-PCR)检测大鼠左侧皮质BDNF蛋白和基因表达情况。

结果:①与假手术组比较,模型组和电针组BDNF蛋白和基因表达升高($P<0.05$);②与模型组相比,电针组BDNF蛋白和基因表达均增高($P<0.05$)。

结论:缺血再灌注模型大鼠大脑皮质中的BDNF短暂应激性表达增高,这可能是电针能够增强缺血性脑卒中BDNF的脑保护作用的生物学机制之一。

关键词 电针;曲池穴;足三里穴;脑源性神经营养因子

中图分类号:R245,R493 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2014)-03-0204-04

The effect of electroacupuncture the expression of brain-derived neurotrophic factor in cerebral ischemia-reperfusion injury model rats/YE Xiaoqian, YOU Yongmei, JIANG Yijing, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2014, 29(3):204—207

Abstract

Objective: To observe the effect of electroacupuncture(EA) on expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the brain of cerebral ischemia reperfusion model rats to study the mechanism of EA treatment for cerebral stroke.

Method: Sixty SPF SD male rats were randomly divided into 3 groups: sham operation group, ischemia group, EA group, 20 rats in each group. All groups except sham operation group received left middle cerebral artery occlusion(MCAO). EA was applied at ipsilateral Quchi(LI11) and Zusanli(ST36), 30min once a day until the rats sacrificed. The changes of BDNF in left cortex were examined by RT-PCR and Western blot.

Result: Compared with sham operation control group, in ischemia group and EA group the gene and protein levels of BDNF increased($P<0.05$). But the gene and protein levels of BDNF in EA group were higher than that in ischemia control group($P<0.05$).

Conclusion: EA at Quchi and Zusanli acupoints of contralateral paralyzed limb in cerebral ischemia reperfusion model rats can enhance the expression of BDNF in cerebral cortex, and it may be one of the biological mechanism of brain protection of EA in cerebral stroke.

Author's address College of Rehabilitation Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, 350122

Key word electroacupuncture; Quchi; Zusanli; brain-derived neurotrophic factor

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2014.03.002

*基金项目:福建省中医临床基地诊疗方案研究项目课题(ZLCKF01);福建省卫生厅医学创新项目(2012-CX-28)

1 福建中医药大学康复医学院,福建福州,350122; 2 福建中医药大学附属康复医院; 3 通讯作者

作者简介:叶晓倩,女,在读硕士; 收稿日期:2013-09-16

临床上运用电针治疗缺血性脑卒中疾病,疗效显著^[1],但是具体作用机制尚不明确。已有研究显示,脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)对脑缺血性大鼠起到神经保护作用,降低神经行为学评分,促进模型大鼠神经功能恢复,改善脑卒中后功能缺损^[2]。因此,我们假设电针对缺血性脑卒中的治疗效应可能与BDNF有关,本实验研究通过建立大鼠脑缺血再灌注模型,观察电针曲池、足三里对大鼠缺血侧皮质BDNF蛋白和基因表达的影响,为电针在脑卒中康复治疗的有效性中提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物:SPF级健康雄性SD大鼠60只(250—300g),购自上海斯莱克动物有限公司[许可证号:SCXX(沪)2007-0005]。

1.1.2 试剂:BDNF、 β -actin单克隆抗体购自美国Cell Signaling Technology公司,HRP标记抗鼠二抗、抗兔二抗购自厦门鹭隆生物科技发展有限公司;BDNF、 β -actin(肌动蛋白)引物购自上海生工生物工程有限公司,逆转录试剂盒(Promega公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组:用随机数字表法,将60只SPF级SD大鼠分为假手术组、模型组和电针组,每组各20只,称重并编号,将造模成功的大鼠再随机分为模型组和电针组,最终剔除造模不成功和造模后死亡的老鼠,假手术组20只,模型组15只,电针组16只。大鼠体重(g):假手术组(252.71 ± 0.40),模型组(258.67 ± 0.39),电针组(255.58 ± 0.36);鼠龄(月):假手术组(2.11 ± 0.41),模型组(2.17 ± 0.26),电针组(2.15 ± 0.30)。经统计无显著性差异($P > 0.05$),具有可比性。

1.2.2 动物造模:造模前所有实验动物均禁食12h,大鼠称重,腹腔注射3ml/kg水合氯醛进行麻醉,参照Zea-Longa线栓法^[3]进行大鼠大脑中动脉缺血再灌注模型的制备:所有大鼠均选择左侧大脑中动脉区作为梗死侧。假手术组只分离动脉,不结扎、插线。手术结束后,动物放置于室温(25℃)环境下苏醒,正常饮食。于大鼠脑缺血再灌注2h后,采用

Zea-Longa^[3]0—4分评价,1—3分说明模型成功。

1.2.3 干预方法:①假手术组:予同样抓取,手术后回笼饲养,不予任何治疗;②模型组:予同样抓取,造模后回笼饲养,不予任何治疗;③电针组:予同样抓取,用长袜子套住大鼠,只暴露患肢,穴位取患侧“曲池”、“足三里”(大鼠穴位定位参考《实验针灸学》^[4]中的定位方法),应用G6805电针仪,电压峰值为6V,以肢体轻轻抖动为度,疏密波,频率1—20Hz,每次电针30min,1次/d,手术后第1天开始治疗,至第3天动物处死。

造模组和电针组大鼠均予以青霉素钠粉针剂(40万单位,国药准字H44022446,广州白云山天心制药股份有限公司)加入2.5ml生理盐水,腹腔注射0.5ml/d,预防感染。

1.2.4 Western Blot法检测:BDNF蛋白表达取大鼠左侧皮质脑组织200mg加1ml裂解缓冲液,研磨均匀后静置30min,取上清,4℃离心,13000r/min,5min,吸取上清,取待测样品,100 μ l加入25 μ l上样缓冲液100℃水浴锅变性,SDS-PAGE电泳,转膜后,将PVDF膜取出用5%脱脂奶粉封闭2h,分别加入抗BDNF、 β -actin(1:1000)抗体孵育,4℃过夜,加入相应二抗(1:5000)室温60min。将PVDF膜放图像扫描仪上,避光配置显色液并覆盖PVDF膜,反应1min后运行Image-lab软件并进行分析处理。

1.2.5 RT-PCR法检测:BDNF的基因表达取200mg左侧脑皮质组织,加入1ml Trizol剪碎,震荡30s;加0.2ml氯仿,剧烈摇动30s,室温3min;12000g,4℃离心,15min;轻轻吸取上层无色水相,移入另一EP管中(约0.5ml);加等体积异丙醇,室温放置10min;4℃离心,12000g,10min;在管底部可见微量RNA沉淀。加入75%乙醇1ml,振荡,4℃离心,7500g,5min;弃上清,小心吸取残留乙醇,开盖干燥5min,用DEPC水20 μ l溶解RNA,检测RNA浓度,根据RNA浓度,计算RNA体积。按照逆转录试剂盒以及相关引物说明书加入相应量的试剂进行聚合酶链反应。

BDNF引物序列为:

F:CTGAGCGTGTGTGACAGTATTAGCG,

R:CAGCCTTCCTTCGTGTAACCCAT;

β -actin引物序列为:

F:ACTGGCATTGTGATGGACTC,
R: CAGCACTGTGTTGGCATAGA。

取8μl PCR产物经1.5琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像。计算机图像软件分析电泳条带。

1.3 统计学分析

用SPSS16.0进行数据统计分析,数据采用均值±标准差表示,计量资料方差分析。当P<0.05时差异具有显著性意义。

2 结果

2.1 电针治疗脑缺血再灌注大鼠对BDNF蛋白表达的影响

与模型组相比,电针组大鼠左侧皮质BDNF蛋白表达明显增强($P\Delta=0.004<0.05$);电针组和模型组BDNF蛋白表达均高于假手术组($P<0.05$),见图1,表1。 β -actin为参照指标。

2.2 电针治疗脑缺血再灌注大鼠对BDNF的基因表达的影响

模型组和电针组的BDNF基因表达与假手术组相比差异明显,均升高($P<0.05$)。但电针组BDNF基因表达明显高于模型组($P<0.05$),见图2,表1。 β -actin为参照指标。

图1 电针治疗脑缺血再灌注大鼠对BDNF蛋白表达的影响

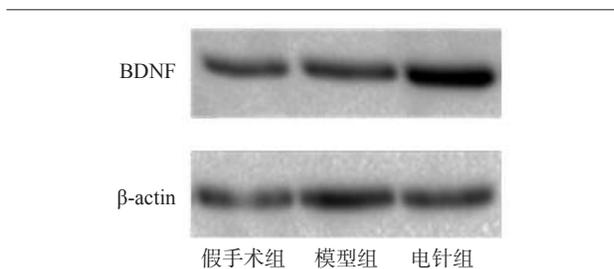


图2 电针治疗脑缺血再灌注大鼠对BDNF的mRNA表达的影响

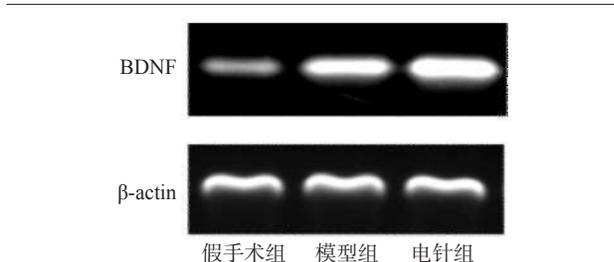


表1 各组大鼠BDNF/ β -actin的蛋白和mRNA灰度值比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	蛋白	mRNA
假手术组	1.027±0.340 ^①	0.511±0.141 ^①
模型组	1.586±0.329 ^②	1.130±0.206 ^②
电针组	2.558±0.336 ^③	3.154±0.430 ^③

①BDNF蛋白或mRNA假手术组与电针组比较, $P<0.05$;②假手术组与模型组比较, $P<0.05$;③模型组与电针组比较, $P<0.05$

3 讨论

缺血性脑卒中是最常见的脑卒中类型,占60%—80%^[5],其本质是由于脑部血液循环障碍缺血缺氧导致局限性脑组织的缺血性坏死或者软化,出现局限性或弥漫性脑功能缺失征象。目前,作为有效治疗方法之一的溶栓疗法能使缺血性脑卒中得到救治,但临床工作者发现部分患者溶栓治疗后症状反而加重,甚至出现颅内出血。研究发现溶栓治疗使脑缺血组织血液再灌注不仅没有使组织功能恢复,反而使缺血所致的功能和结构破坏进一步加重,这种现象即为脑缺血再灌注损伤^[7]。而我们的动物实验研究也发现,缺血2h再灌注后大鼠的偏瘫状况加重,有的大鼠甚至不能爬行。

脑缺血再灌注的病理变化主要有:①自由基过多特别是超氧自由基阴离子过多造成脑组织损伤;②细胞内Ca²⁺超载,脑缺血再灌注病理状态下引起容止重排Ca²⁺,线粒体和内质网对的摄取Ca²⁺下降造细胞内超载发生;③兴奋性氨基酸增多,破坏正常的神经传递,影响多种生理功能包括协调运动,认知学习等;而这些因素最终都将导致神经细胞凋亡坏死。团队前期研究表明,电针激活脑缺血再灌注大鼠患侧大脑皮质PI3K/AKT信号通路,上调bcl-2等蛋白和基因的表达,抑制神经细胞凋亡,延长了细胞活力而起到脑保护作用^[8]。团队大量文献检索发现曲池穴,足三里穴是历代医家治疗脑卒中中使用频率最高的两个穴位,《医宗金鉴》曰:“曲池主治是脑卒中,手挛筋急痛痹风,兼治一切疟疾病,先寒后热自然平。”《针灸大成》有云:“未脑卒中时,一两月前或三四个月前,不时足胫上发酸重麻,良久方解,此将脑卒中之候也,便宜急灸三里、绝骨、四处各三壮。”现代研究表明,电针曲池、足三里下调下丘脑中具有广泛生物学活性的内源性阿片肽 β -EP和重要中枢

神经系统兴奋性递质之一Glu的表达,从而调控NEI网络功能而起到对脑缺血再灌注损伤的脑保护作用^[9]。因此,本研究结合古今研究,从而确定电针疗法和曲池、足三里两个穴位。

BDNF是于1982年德国神经生物学家BRADE等首次从猪脑中纯化得出,并发现其具有防止神经元死亡功能并广泛分布于中枢神经系统的一种蛋白质,为神经营养因子家族成员之一。由于BDNF具有增殖分化营养的作用,使其在中枢神经系统发育过程中起重要作用。BDNF调节合成代谢,增加神经元胞体的大小,修复受损神经元并促进神经元的再生;另外其能促进神经递质、神经营养因子合成,刺激成年神经元的轴突和树突出芽,增强突触递质的释放,调节突触传递引起突触前后的长时程增强,加强了突触联系,影响神经元的可塑性,同时也能维持成熟神经元的正常功能。BDNF表达广泛,包括大脑皮质、海马、基底前脑、纹状体、下丘脑、小脑,其中皮质和海马含量最高^[10]。高俊淑等^[11]运用探索学习训练脑缺血再灌注大鼠,采用免疫组织化学染色检测大鼠脑梗死灶周围BDNF阳性神经元数量,发现探索学习组最高,脑组织中BDNF表达增多,对缺血性脑损伤起到保护作用。本研究结果显示模型组BDNF蛋白表达水平较假手术高,可能是因为脑损伤后机体启动自我保护功能,缺血再灌注损伤自我上调BDNF表达^[12];电针组上调BDNF蛋白水平高于模型组,提示电针通过提高BDNF表达水平而保护神经元免受缺血缺氧损伤。研究中BDNF基因表达情况与蛋白表达情况一致。由此,本实验研究表明,电针曲池、足三里可能通过诱导脑缺血再灌注大鼠梗死灶皮质BDNF蛋白和基因表达,改善脑缺血再灌注大鼠功能。很多研究结果表明,电针促进脑组织中BDNF表达量的增加,修复缺血受损的神经元,减少其凋亡^[13-14],与本实验结果一致。

参考文献

- [1] Hsing WT, Imamura M, Weaver K, et al. Clinical effects of scalp electrical acupuncture in stroke: a sham-controlled randomized clinical trial[J]. *J Altern Complement Med*, 2012, 18: 314—316.
- [2] 白蓉,梁雪琴,王魁花.康复训练脑缺血大鼠行为学及BDNF、CaBP-D28k表达的影响[J]. *山东医药*, 2012, 52(21):33—35.
- [3] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion craniectomy in rats[J]. *Stroke*, 1989, 20:84—91.
- [4] 李忠仁. 实验针灸学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2003.
- [5] 中华医学会神经病学分会脑血管病学组急性缺血性脑卒中诊治指南撰写组. 中国急性缺血性脑卒中诊治指南2010[J]. *中国全科医学*, 2010:4013—4017.
- [6] Donnan GA, Fisher M, Macleod M, et al. *Stroke*[J]. *Lancet*, 2008, 371:1612—1623.
- [7] 田洪,宋川,范汝雄,等. 动脉溶栓后脑再灌注损伤的临床救治探讨[J]. *介入放射学杂志*, 2011, 20(8):603—605.
- [8] Chen A, Lin Z, Lan L, et al. Electroacupuncture at acupoints of quchi and zusanli exerts neuroprotective role in cerebral ischemia-reperfusion injured rats via activation of PI3K/Akt pathway[J]. *Int J Mol Med*, 2012, 30:791—796.
- [9] 蔡玉颖,刘志顺,王顺,等.电针足三里、曲池对脑缺血再灌注损伤大鼠β-EP、Glu蛋白表达的影响[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2010, 16(11): 1030—1033.
- [10] Kim WS, Lim JY, Shin JH, et al. Effect of the presence of brain-derived neurotrophic factor val(66)met polymorphism on the recovery in patients with acute subcortical stroke[J]. *Ann Rehabil Med*, 2013, 37(3):311—319.
- [11] 高俊淑,李阔,李娜,等.探索需谘对据造型脑梗死大鼠梗死灶周围皮质BDNF表达的影响[J]. *中国康复医学杂志*, 2007, 22(7): 584—588.
- [12] 李红玲,王马魁,任力,等.运动训练对大鼠出血性脑损伤BDNF基因及其蛋白表达的影响[J]. *中国康复医学杂志*, 2008, 23(9): 782—785.
- [13] 王彦春,梁少荣,马骏,等.电针对局灶性脑缺血模型大鼠皮质BDNF、TrkB的影响[J]. *中华中医药学刊*, 2012, 30(3):469—471.
- [14] 夏毅,王海东,丁莹,等.电针合药物治疗帕金森病伴发抑郁症及对患者血清BDNF的影响[J]. *中国针灸*, 2012, 32(12):1071—1074.