

从Notch通路探讨电针促进局灶性脑缺血再灌注大鼠海马神经干细胞增殖的作用机制*

陈斌¹ 陶静¹ 黄佳² 陈立典^{3,4}

摘要

目的:通过Notch信号通路探讨电针对局灶性脑缺血再灌注模型大鼠海马神经干细胞增殖的促进作用,阐明其治疗脑梗死的可能机制。

方法:将54只SD大鼠随机分为假手术组、模型组及电针组,以大脑中动脉闭塞(MCAO)法建立大鼠局灶性脑缺血再灌注模型,通过巢蛋白(nestin)免疫组化法观察脑缺血大鼠海马神经干细胞增殖情况,应用蛋白免疫印迹法(Western blot)和RT-PCR检测海马组织中Notch信号通路上关键信号分子Notch1和胞内片段(NICD)的表达情况,同时使用酶联免疫吸附法(ELISA)测定大鼠血清中血管内皮生长因子(VEGF)浓度。

结果:电针“曲池”、“足三里”穴可明显改善MCAO大鼠的神经功能缺损症状;促进脑缺血后海马神经干细胞(nestin⁺)的增殖(模型组 vs 电针组:173.40±38.76 vs 246.80±47.73, $P=0.028$);增强Notch信号通路中Notch1和NICD的表达,并提高血清中VEGF的分泌。

结论:电针可通过活化Notch信号通路,同时促进VEGF的分泌,促进海马神经干细胞的增殖,来实现对脑缺血的治疗作用。

关键词 电针;脑缺血;Notch通路;神经干细胞;增殖

中图分类号:R743.3,R245 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2014)-05-0399-06

The possible mechanism of electroacupuncture promoting hippocampal neural stem cells proliferation in rats with focal cerebral ischemia-reperfusion via activation of Notch signaling pathway/CHEN Bin, TAO Jing, HUANG Jia, et al//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2014, 29(5): 399—404

Abstract

Objective: To investigate the effect of electroacupuncture (EA) promoting hippocampal neural stem cells (NSCs) proliferation in rats with focal cerebral ischemia-reperfusion (I/R) via Notch pathway and to clarify the possible mechanism of EA in treatment of cerebral ischemia.

Method: Fifty-four male adult SD rats were randomly divided into the sham operation control group (SC group), the ischemia model group (IC group) and the electroacupuncture group (EA group). Middle cerebral artery occlusion (MCAO) was performed to establish the focal cerebral I/R injury model. Proliferation of hippocampal NSCs in cerebral I/R injured rats was determined by nestin immunohistochemical staining. The expressions of Notch1 and intracellular domain of Notch (NICD) were detected by Western blotting and RT-PCR. The serum level of vascular endothelial growth factor (VEGF) was measured using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

Result: EA at Quchi (LI11) and Zusanli (ST36) acupoints alleviated neurological deficits significantly and promoted the proliferation of hippocampal NSCs (IC vs EA: 173.40±38.76 vs 246.80±47.73, $P=0.028$) in cerebral I/

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2014.05.001

*基金项目:国家自然科学基金资助项目(81273835);福建省卫生厅中医临床基地诊疗方案研究(zlckf01)

1 福建中医药大学康复医学院,福州,350003; 2 教育部中医骨伤及运动康复重点实验室; 3 福建中医药大学; 4 通讯作者
作者简介:陈斌,男,硕士研究生; 收稿日期:2013-07-18

R injured rats; enhanced the expressions of Notch1 and NICD, crucial signaling molecules in Notch signaling pathway, and increased the secretion of VEGF.

Conclusion: The up-regulatory effect of EA on Notch signaling pathway and neurotrophic factor secretion may result in the promotion of NSCs proliferation and consequently provide the therapeutic effect on cerebral ischemia.

Author's address Fujian University Traditional Chinese Medicine, Fuzhou City, 350122

Key word electroacupuncture; cerebral ischemia; Notch; neural stem cell; proliferation

脑卒中已成为当今危害人类健康的第二大原因,50%—70%的存活者遗留有严重的残疾,阻碍其重新走向生活、走向工作,给家庭和社会带来沉重的负担。其中缺血性中风的发病率约占全部脑卒中的2/3^[1-2]。脑缺血损伤所引起的神经功能障碍,一直是神经病学领域亟待解决的难题。大量临床和基础研究已证实电针疗法是治疗脑缺血行之有效的方法之一。目前的研究表明脑缺血损伤能促使大鼠脑内神经干细胞(neural stem cells, NSCs)大量增殖、迁移和分化,参与神经再生和脑组织功能的恢复,一定程度上改善神经功能缺损,而使用电针治疗可进一步促进脑缺血后 NSCs 的增殖分化^[3-5]。Kim 等^[6]研究提示电针能促进海马齿状回细胞的增殖,并能改善神经缺损症状,但其治疗脑缺血损伤的分子机制尚不明确。

本研究选用大鼠大脑中动脉缺血再灌注模型,旨在从 Notch 信号通路探讨电针对脑缺血再灌注大鼠海马神经干细胞促增殖作用的可能机制,为针灸临床提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物分组

所有试验均遵照国际动物保护和使用指南的规定实施。选取清洁级健康雄性 SD 大鼠 54 只(动物批号:2007000638342),体重(250±30)g,由上海斯莱克实验动物责任有限公司[生产许可证号码:SCXK(沪)2012-0002]提供,根据随机数字表分为:假手术组、模型组和电针组,每组各 18 只。

1.2 主要试剂

Trizol(Invitrogen, Carlsbad, CA);逆转录试剂盒(Fermentas, Hanover, MD);Notch1 和 β -actin 一抗及辣根过氧化物酶二抗(Cell Signaling Technology, Beverly, MA);Nestin 一抗(Abcam, Cam-

bridge, MA);大鼠 BDNF 和 GDNF 的 ELISA 试剂盒(上海西塘生物有限公司,上海)。

1.3 模型制备

模型制作方法如下:术前所有实验动物均禁食 12h。在室温 22℃ 条件下,大鼠称重后,参考 Zea Longa 方法^[7],行左侧大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)手术。腹腔注射 3ml/kg 水合氯醛进行麻醉,仰卧位,正中切开颈部皮肤,充分暴露并钝性分离左侧颈总动脉(common carotid artery, CCA)、颈外动脉(external carotid artery, ECA)及颈内动脉(internal carotid artery, ICA)。依次结扎 CCA 近心端及 ECA,并用微动脉夹夹闭远端 ICA。在颈总动脉上近分叉处约 5mm 处剪一“V”型小口,将已备好的线栓经颈总动脉插入颈内动脉,直至有少许阻力感时,即阻断大脑中动脉入口处,从颈外动脉与颈内动脉分叉处起计算约插入约 18—22mm,并结扎颈内动脉,伤口常规缝合。待缺血 2h 后缓慢退出尼龙线,使血流再灌注。试验过程和动物苏醒期间注意保温。

动物苏醒后观察其体态及行为,按 Zea Longa 评分标准评价动物的行为变化以判断 MCAO 模型是否成功。假手术组只分离动脉,不结扎和插线。手术结束后,动物用白炽灯照射取暖,维持肛温在 37℃ 左右。具体评分标准为:0 分:无神经功能缺损体征;1 分:不能完全伸展对侧前爪;2 分:向偏瘫侧转圈;3 分:行走时向偏瘫侧倾倒;4 分:不能自发行走,意识丧失;评分为 1—3 分纳入实验动物,0 分、4 分子以剔除。

1.4 电针干预措施

采用捆绑固定法固定大鼠(参考《医学实验动物学》^[8]),取右侧“曲池”、“足三里”穴(大鼠穴位定位参考《实验针灸学》^[9]中之定位方法),使用华佗牌 30 号 0.5 寸毫针,斜刺 0.2—0.3cm,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,共6次,手术后第2天开始治疗。假手术组及模型组以同样方法固定30min,但不进行电针刺激。

1.5 取材处理

干预结束后,采用腹腔注射10%水合氯醛深度麻醉进行取材。所有大鼠均经腹主动脉采血5ml,血液于室温静置2h后,3000r/min离心10min,分离血清,-80℃保存待测。每组取6只大鼠经左心室依次灌注生理盐水和4%多聚甲醛溶液,随后迅速断头取脑,经过灌流固定的脑组织浸泡于4%多聚甲醛溶液中,24h后常规梯度乙醇脱水、二甲苯透明、石蜡包埋,做连续冠状脑切片,切片厚5 μ m。余下所有大鼠不经心脏灌注直接断头取脑,分离缺血侧海马组织,-80℃保存,以备提取蛋白和RNA。

1.6 检测方法及指标

1.6.1 免疫组化法:选择含海马组织的石蜡切片进行常规的脱蜡入水,在0.01M枸橼酸钠(pH6.0)中热抗原修复10min;3% H₂O₂室温孵育5min,以消除内源性过氧化物酶的活性;PBS冲洗,5min 3次,10%正常山羊血清封闭,室温孵育30min;倾去血清,勿洗,滴加小鼠抗大鼠nestin一抗工作液(1:200),置于湿盒中4℃过夜;PBS冲洗,5min 3次,滴加适量生物素标记兔抗小鼠二抗工作液,37℃孵育30min;PBS冲洗,5min 3次,滴加辣根过氧化物酶标记链霉卵白素工作液,37℃孵育10min;PBS冲洗,5min 3次,DAB显色剂显色1min,自来水充分冲洗;苏木素复染,PBS返蓝,梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片观察。

1.6.2 蛋白免疫印迹法(Western blot):每100mg脑组织中加入1ml的细胞裂解液和10 μ l PMSF储存液提取蛋白质。考马斯亮蓝法测定蛋白浓度,加热变性后,取50 μ g经12% SDS-PAGE(十二烷基硫酸胺-聚丙烯酰胺)电泳,转移至PVDF膜上。5%脱脂牛奶室温封闭2h,Notch1(1:1000)、NICD(1:500)和 β -actin(1:1000)一抗4℃孵育过夜,洗膜后加入辣根过氧化物酶标记的二抗37℃振荡孵育1h。最后ECL化学发光液显色,并采用Bio-Image分析系统(Bio-Rad, Hercules,USA)显影成像及Image-Pro Plus软件对扫描图像的目的条带进行灰度分析。

1.6.3 逆转录PCR:Trizol法提取缺血侧海马组织的总RNA,检测RNA浓度,然后根据Fermentas逆转录试剂盒操作说明将mRNA逆转录为cDNA。PCR扩增参数为94℃预变性3min,94℃变性30s,54℃—62℃退火30s,70℃延伸30s,变性、退火、延伸共35个循环,最后70℃延伸5min。

引物序列为:

Notch1:

Forward 5'-ATC CAT GGC TCC ATC GTC TA -3',

Reverse 5'-TTC TGA TTG TCG TCC ATC AG -3';

β -actin:

Forward 5'-CGG GAG AAC AGG GTA TGA-3',

Reverse 5'-CAG GCT GGA AGG AGA AGA T-3'。

将PCR扩增产物在1.5%琼脂糖凝胶上电泳。电泳结束后使用Model Gel 2000凝胶成像系统(BioRad, Model Gel Doc 2000, USA)对目的基因及对照基因PCR产物的灰度进行比较分析,从而得出mRNA的相对含量。

1.6.4 酶联免疫吸附测定(ELISA法):根据ELISA试剂盒说明书对大鼠血清中的血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)水平进行检测。将试剂盒恢复至室温,分别将样品及标准品加入反应板,每孔100 μ l,充分混匀后置37℃孵育120min。随后按步骤每孔依次加入100 μ l生物素标记抗体,37℃孵育60min;100 μ l酶标,37℃孵育30min;100 μ l TMB显色液,37℃暗处反应15min。每次加入试剂前进行5次洗板,并用干原有液体。最后直接加入100 μ l终止液,在30min内用酶标仪(BioTek, Model ELX800, USA)于波长450nm处读OD值,根据标准曲线得出VEGF浓度。

1.7 统计学分析

所得数据均以均数 \pm 标准差表示,应用SPSS 16.0软件进行统计学处理,两组间则采用*t*检验(independent-samples-test)或Mann-Whitney *U*检验。

2 结果

2.1 电针改善MCAO大鼠的神经功能缺损评分

模型组和电针组在脑缺血再灌注2h后(未经电针干预),两组之间评分的差异无显著性($P=0.747$)。而在脑缺血再灌注7d后(经过电针干预),电针组的神经缺损评分与模型组相比差异有显著性

意义($P=0.033$)。由此提示电针对脑缺血大鼠的神经缺损症状有明显改善作用。见表1。

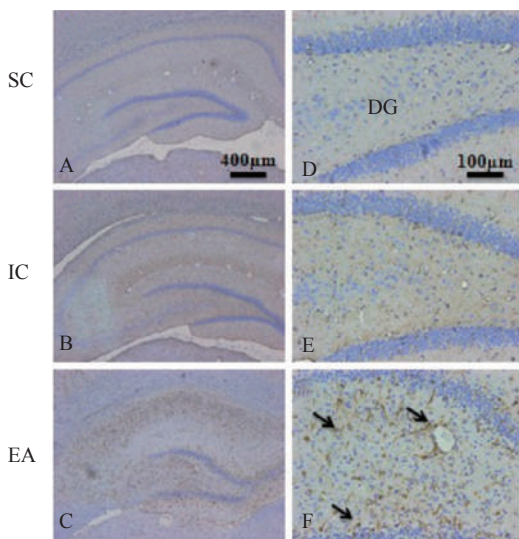
组别	缺血再灌注后2h	缺血再灌注后7d
假手术组	0	0
模型组	2.63±0.52	2.00±0.93
电针组	2.63±0.74 ^①	1.13±0.35 ^②

与模型组对比:① $P > 0.05$;② $P < 0.05$

2.2 电针促进MCAO大鼠海马神经干细胞的增殖
神经上皮干细胞蛋白(neuroepithelial stem cell protein, nestin)又称巢蛋白,在神经干细胞中的表达起始于胚胎时期,当神经干细胞迁移基本完成后,其表达开始下降,并随着其分化各种成熟的神经细胞而停止表达。目前nestin已被广泛应用于神经干细胞的鉴定^[10]。通过Nestin免疫组化法观察再灌注损伤后大鼠海马神经干细胞的增殖情况:结果表明(图1),与假手术组(50.75 ± 34.07)相比,模型组(173.40 ± 38.76)及电针(246.80 ± 47.73)组大鼠的海马齿状回表现出明显的神经干细胞增殖($P < 0.05$),而电针组增殖情况较模型组更加明显($P < 0.05$)。这证实了电针刺激“曲池”、“足三里”穴对大鼠的海马神经干细胞具有促增殖作用。见图1。

2.3 电针促进缺血侧海马组织中Notch信号通路的

图1 脑缺血损伤7d后各组大鼠缺血侧海马齿状回神经干细胞(nestin⁺)的增殖情况

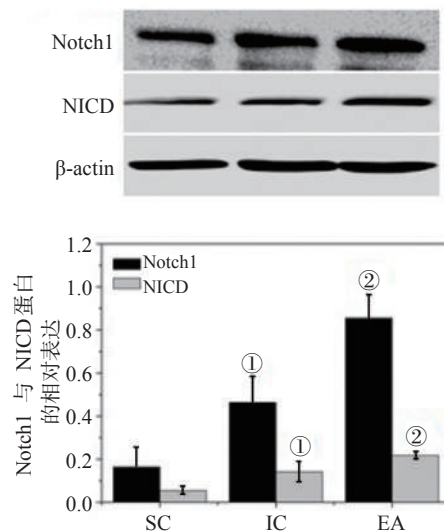


A—C($\times 50$)和D—F($\times 200$)分别为脑缺血损伤7d后,所有细胞核均被苏木素染成蓝色, nestin 阳性细胞为棕黄色,如箭头所示。

活化

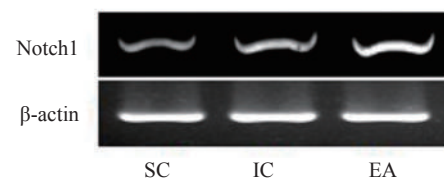
Notch 信号转导通路在脑缺血后 NSCs 的增殖分化和神经修复过程中具有重要的调控作用^[11-12]。Notch 受体一旦被激活,释放出一个活性胞内片段 NICD,转移进入细胞核,促进转录因子 Hes 基因家族分子(如 Hes1、Hes5 等)的基因表达。采用 Western blot 和 RT-PCR 检测海马组织中 Notch1 和 NICD 的表达情况,电针组的表达水平高于模型组。可见电针“曲池”、“足三里”穴能够促进缺血侧海马组织中 Notch 信号通路的活化。见图2—3。

图2 Western blot法检测海马组织中 Notch1 和 NICD 的蛋白表达情况



与假手术组对比:① $P < 0.05$;与模型组对比:② $P < 0.05$

图3 RT-PCR法检测海马组织中 Notch1 的 RNA 表达情况



2.4 电针促进血管内皮生长因子的分泌

血管内皮生长因子可刺激血管内皮细胞的有丝分裂与血管发生密切相关,脑缺血后 VEGF 在内皮细胞上的表达对诱导血管新生,促进脑功能的恢复具有重要意义。已有体内外研究表明^[13-14], VEGF 在成年大鼠脑内神经干细胞中表达,其表达增加可

以促进NSCs的增殖,并且对脑缺血有一定的神经保护作用。Ren和Finklestein^[15]发现,体内注射VEGF可以减少脑缺血的梗死面积,改善神经功能缺损症状。通过ELISA法检测发现,模型组(126.05±16.89)大鼠血清中VEGF水平较假手术组(68.02±23.45)明显升高($P<0.05$),而电针组(202.50±53.73)可进一步促进VEGF的分泌($P<0.05$)。

3 讨论

目前国内外大量的研究均证实^[16-17],在成年哺乳动物的脑室下区、海马齿状回、纹状体、大脑皮质、脊髓中央管等区域均有NSCs的存在。其中,室管膜下区(subventricular zone, SVZ)和海马齿状回的颗粒下层(subgranular zone, SGZ)是成体大脑内源性神经干细胞的主要分布区。这些干细胞在正常情况下处于“休眠”状态,但受到病理因素(如脑缺血)的刺激时,“休眠”状态的NSCs就会被激活,进入增殖分化阶段,并迁入特定的区域,替代并修复受损的神经元,一定程度上改善神经功能缺损。而使用电针治疗可促进脑缺血后NSCs的增殖分化^[3-5]。陶静等^[3]研究已表明电针可以促进脑缺血后内源性NSCs增殖,并可激发新增殖细胞向星型胶质细胞或神经元细胞分化。

Notch信号转导通路在脑缺血后NSCs的增殖分化和神经修复过程中具有重要的调控作用^[11-12]。Notch受体是一种跨膜蛋白,一旦激活,将被早老素1依赖的 γ -分泌酶裂解S3位点,释放出胞内片段NICD(intracellular domain of Notch),它是Notch受体的活性部分,NICD转移进入细胞核,与DNA结合蛋白Rbpj转录调节蛋白结合形成复合物,促进转录因子Hes基因家族分子的基因表达。Hes1是螺旋-环-螺旋转录因子家族中的负调控因子,是神经元分化的抑制剂,在缺乏Hes1的情况下,Notch就不能抑制神经元细胞的分化,表明Hes1是Notch信号通路必需的效应基因,对于维持NSCs的未分化状态和促进其增殖是必不可少的^[18-19]。

研究显示^[20-21],成年大鼠脑缺血后7d左右为海马神经干细胞增殖的高峰期,之后逐渐回落。故本研究采用线栓法建立MCAO局灶性脑缺血再灌注大鼠模型,通过nestin免疫组化法观察脑缺血7d后

大鼠海马神经干细胞的增殖情况,并检测海马组织中Notch1和NICD的表达情况,探讨Notch信号通路在其中的调控作用。nestin免疫组化实验结果显示(见图1),经过电针干预后神经干细胞在缺血后的海马齿状回的分布高于模型组。图中可见nestin阳性细胞的外形与星形胶质细胞相似,有文献报道,脑缺血后反应性的星形胶质细胞不仅表达GFAP(星形胶质细胞的标记物),同时也表达nestin,故在后续的实验中有待进一步讨论。模型组Notch1和NICD的表达高于假手术组这说明Notch信号通路可能参与了脑缺血后海马神经干细胞的增殖,与以往的研究结果相一致^[22],而且电针“曲池”、“足三里”穴能够进一步活化Notch通路促进干细胞增殖。同时,我们的研究结果还提示电针这两个穴位能使MCAO模型大鼠缺血后血清中的VEGF含量升高。已有研究表明^[13-14]脑组织神经营养因子,如血管内皮生长因子或者脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF),表达增加可以促进NSCs的增殖,对脑缺血起到神经保护作用。

综上所述,电针能促使脑缺血大鼠脑内NSCs大量增殖、迁移和分化,参与神经再生和脑组织功能的恢复,从而在一定程度上改善神经功能缺损。而电针“曲池”、“足三里”穴可通过活化Notch信号通路,同时增加VEGF的分泌,从而促进海马神经干细胞的增殖,这可能是其治疗脑缺血的重要机制之一。电针可通过多途径、多靶点、多环节减轻脑缺血再灌注损伤,促进神经功能恢复。Notch信号通路的调控可能只是其中调控途径之一,还有多种调控机制未被人们所发现,有待我们进一步探索。

参考文献

- [1] Rosamond W, Flegal K, Furie K, et al. Heart disease and stroke statistics--2008 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee[J]. Circulation, 2008, 117(4):e25—e146.
- [2] Donnan GA, Fisher M, Macleod M, et al. Stroke[M]. Lancet, 2008.1612—1623.
- [3] Tao J, Xue XH, Chen LD, et al. Electroacupuncture improves neurological deficits and enhances proliferation and differentiation of endogenous nerve stem cells in rats with focal cerebral ischemia[J]. Neurological Research, 2010, 32(2):198—204.

- [4] Yang Z, Yu H, Rao X, et al. Effects of electroacupuncture at the conception vessel on proliferation and differentiation of nerve stem cells in the inferior zone of the lateral ventricle in cerebral ischemia rats[J]. Journal of Traditional Chinese Medicine, 2008, 28(1):58—63.
- [5] Cheng H, Yu J, Jiang Z, et al. Acupuncture improves cognitive deficits and regulates the brain cell proliferation of SAMP8 mice[J]. Neuroscience Letters, 2008, 432(2):111—116.
- [6] Kim EH, Kim YJ, Lee HJ, et al. Acupuncture increases cell proliferation in dentate gyrus after transient global ischemia in gerbils[J]. Neuroscience Letters, 2001, 297(1):21—24.
- [7] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20(1):84—91.
- [8] 刘恩岐,等.医学实验动物学[M].第3版.北京:人民卫生出版社, 2004.123.
- [9] 邓春雷.实验针灸学[M].北京:人民卫生出版社,1998.
- [10] Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein[J]. Cell, 1990, 60(4):585—595.
- [11] Wang L, Chopp M, Zhang RL, et al. The Notch pathway mediates expansion of a progenitor pool and neuronal differentiation in adult neural progenitor cells after stroke[J]. Neuroscience, 2009, 158(4):1356—1363.
- [12] Wang X, Mao X, Xie L, et al. Involvement of Notch1 signaling in neurogenesis in the subventricular zone of normal and ischemic rat brain in vivo[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2009, 29(10):1644—1654.
- [13] Li B, Piao CS, Liu XY, et al. Brain self-protection: the role of endogenous neural progenitor cells in adult brain after cerebral cortical ischemia[J]. Brain Research, 2010, (1327):91—102.
- [14] Jin K, Zhu Y, Sun Y, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, 99(18):11946—11950.
- [15] Ren JM, Finklestein SP. Growth factor treatment of stroke [J]. Curr Drug Targets CNS Neurol Disord, 2005, 4(2): 121—125.
- [16] Ming GL, Song H. Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system[J]. Annu Rev Neurosci, 2005, (28): 223—250.
- [17] Suh H, Deng W, Gage FH. Signaling in adult neurogenesis [J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 2009, (25):253—275.
- [18] Kageyama R, Ohtsuka T, Kobayashi T. Roles of Hes genes in neural development[J]. Dev Growth Differ, 2008, 50(Suppl 1):S97—S103.
- [19] Kunisato A, Chiba S, Nakagami-Yamaguchi E, et al. HES-1 preserves purified hematopoietic stem cells ex vivo and accumulates side population cells in vivo[J]. Blood, 2003, 101(5):1777—1783.
- [20] Kawai T, Takagi N, Miyake-Takagi K, et al. Characterization of BrdU-positive neurons induced by transient global ischemia in adult hippocampus[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2004, 24(5):548—555.
- [21] Yu DQ, Pei HT, Zhang PH, et al. Effects of electroacupuncture on the expression of nestin in endogenous neural stem cell in hippocampus in rats with focal cerebral ischemia-reperfusion[J]. Zhongguo Zhen Jiu, 2010, 30(11):929—932.
- [22] Kawai T, Takagi N, Nakahara M, et al. Changes in the expression of Hes5 and Mash1 mRNA in the adult rat dentate gyrus after transient forebrain ischemia[J]. Neurosci Lett, 2005, 380(1—2):17—20.