

巨刺法对大鼠脑缺血再灌注损伤的神经保护机制*

江一静¹ 杨珊莉² 陶 静² 陈立典^{1,3}

摘要

目的:探寻巨刺法对大鼠脑缺血再灌注损伤的神经保护机制。

方法:将80只健康成年的Sprague Dawley大鼠(SD鼠)驯养3d后随机分成假手术组、模型组、非巨刺组及巨刺组,每组各20只,使用线栓法对模型组、巨刺组及非巨刺组大鼠进行脑缺血模型制作,缺血2h后进行再灌注,再灌注3d后将大鼠断头取脑,进行TTC染色及图像软件分析观察脑梗死体积,蛋白印迹法(Western blotting)、荧光PCR检测环磷酸腺苷反应元件结合蛋白(CREB)的蛋白及基因表达情况,使用酶联吸附试验法(ELISA)检测腺苷酸环化酶(AC)、环磷酸腺苷(cAMP)、蛋白激酶(PKA)的活性。

结果:①TTC及其图像软件分析:针刺干预组(包括非巨刺组以及巨刺组)的SD大鼠脑梗死体积明显小于模型组($P<0.01$);巨刺组脑梗死体积小于非巨刺组($P<0.05$)。②Western blotting:针刺干预组的SD大鼠CREB蛋白水平明显高于模型组($P<0.01$);巨刺组SD大鼠CREB蛋白水平高于非巨刺组($P<0.05$)。③荧光PCR:针刺干预组的SD大鼠CREB基因水平明显高于模型组($P<0.01$);巨刺组SD大鼠CREB基因水平高于非巨刺组($P<0.05$)。④ELISA:针刺干预组的SD大鼠AC、环磷酸腺苷(cAMP)、蛋白激酶A(PKA)的活性显著高于模型组($P<0.01$)。

结论:巨刺法改善脑缺血再灌注损伤可以通过调节环磷酸腺苷-蛋白激酶A-环磷酸腺苷反应元件结合蛋白(cAMP-PKA-CREB)信号传导通路实现。

关键词 脑缺血;再灌注损伤;SD大鼠;巨刺法;环磷酸腺苷-蛋白激酶A-环磷酸腺苷反应元件结合蛋白信号通路

中图分类号:R743.3, R245.31 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2014)-07-597-05

Exploration of neuroprotective mechanism of opposing needling on the ischemia-reperfusion injured rats/
JIANG Yijing, YANG Shanli, TAO Jing, et al//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2014, 29(7):
605—609

Abstract

Objective: To explore the neuroprotective mechanism of opposing needling on the ischemia-reperfusion rats.

Method: Eighty healthy adult Sprague Dawley (SD) rats (domesticated for 3d) were randomly divided into the sham group, the model group, the non-opposing needling group and the opposing needling group, 20 rats each group. The thread embolism method was used to make MCAO-cerebral ischemia models for the model group, the non-opposing needling and the opposing needling group. The reperfusion took place at 2h after ischemia. Rats were beheaded and the brains were taken off at 3d after reperfusion. TTC staining and image analysis were proceed to observe the cerebral infarction volume, the protein and gene expressions of CREB were detected by Western blotting, real-time PCR and enzyme linked adsorption method (ELISA) were used to test the activities of acethyl choline(AC), cyclic adenosine monophosphate(cAMP), protein kinase A(PKA).

Result: ① TTC and the image analysis: The cerebral infarction volume of acupuncture intervention groups (including the non-opposing needling group and the opposing needling group) were significantly smaller than that of the model group ($P<0.01$); the cerebral infarction volume of the opposing needling group were smaller

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2014.07.003

*基金项目:教育部博士点基金项目(博导类)(20103519110001);国家自然科学基金青年科学基金项目(81102628)

1 福建中医药大学,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:江一静,女,医师; 收稿日期:2013-03-11

than that of the non-opposing needling group ($P < 0.05$). ② Western blotting: the protein level of cAMP-response element binding protein (CREB) in the acupuncture intervention groups were obviously higher than that in the model group ($P < 0.01$); The protein level of CREB in the opposing needling group were higher than that in the non-opposing needling group ($P < 0.05$). ③ Real-time PCR: The gene level of CREB in the acupuncture intervention groups were obviously higher than that in the model group ($P < 0.01$); the gene level of CREB in the opposing needling group were higher than that in the non-opposing needling group ($P < 0.05$). ④ ELISA: Compared with the model group, the activities of AC, cAMP, PKA were significantly different in the acupuncture intervention groups ($P < 0.01$), the activities in the acupuncture intervention groups were much higher than that in the model group.

Conclusion: The opposing needling improved cerebral ischemia reperfusion injury, its mechanism might realized by regulating the cAMP - PKA - CREB signaling pathway.

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

Key word stroke; reperfusion injury; rat; opposing needling; cAMP - PKA - CREB signaling pathway

2011年“世界卒中日”最新调查结果显示,我国脑卒中的发病率以每年9%的速度上升,已经成为我国国民第一位的死亡原因,死亡率高于欧美国家4—5倍^[1]。其中缺血性脑卒中占脑卒中的85%以上,常造成人类中枢神经系统大量神经细胞缺失和神经网络受损,导致患者长期神经功能障碍^[2]。

环磷酸腺苷-蛋白激酶A-环磷酸腺苷反应元件结合蛋白(cAMP-PKA-CREB)信号转导通路在脑缺血中起了重要的作用^[3]。ATP、腺苷酸环化酶均影响cAMP的含量,cAMP在神经系统损伤中发挥重要的调控作用,其可以影响神经细胞膜蛋白的结构和功能,参与中枢神经系统突触传递,cAMP信号通过CREB直接或间接激活相关基因的转录,进而表达某些蛋白分子,这些基因产物调节着神经元在应激损伤后的再生、存活及修复等。又有研究表明^[4],PKA信号通路的激活可能是抵御缺血缺氧脑损伤的重要内在神经保护机制,从而对脑组织有保护作用。

目前治疗脑卒中后肢体功能障碍的方法很多,其中电针疗法治疗缺血性脑血管病已被认为是行之有效的方之一,不存在血脑屏障的问题^[5]。巨刺针法是源自《内经》的一种针刺疗法,由于经脉在人体多数有左右交会的腧穴,脉气因此左右相通,故能右穴治左病,左穴治右病,但其具体机制仍处于不断地探索中。

本课题立足于探索巨刺法改善缺血性脑卒中肢体运动状态的机制,以丰富中医针刺治疗脑卒中的理论,为同类研究提供可靠的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及其分组

80只健康成年清洁级SD大鼠,体重220—280g,平均 (250 ± 30) g,鼠龄2.5—4个月,平均 (2 ± 0.2) 个月。大鼠全由北京维通利华实验动物技术有限公司提供[批号:SD(CD)101]。80只大鼠随机分成假手术组、模型组、巨刺组、非巨刺组,每组各20只,4组大鼠在体重、鼠龄等一般情况方面无显著性差异($P > 0.05$),具有可比性。

1.2 模型制作

参照改良的Zea Longa^[6]方法制备大鼠大脑中动脉栓塞(MCAO)模型。首先使用10%水合氯醛按照0.3ml/kg的剂量对大鼠进行腹腔注射麻醉,随之将处于麻醉状态的大鼠固定于手术台,剔除大鼠颈部皮毛,于颈部正中切开长约3cm的切口,将左侧颈总动脉(CCA)充分暴露,逐步剥离迷走神经,将颈外动脉(ECA)和颈内动脉(ICA)充分剥离暴露,将CCA远心端充分结扎,用动脉夹夹闭ICA近分叉口处,同时将ECA近分叉口处充分结扎,在CCA近动脉分叉用显微剪剪切一小口,用硅化鱼线($d = 0.26$ mm,鱼线的2.0mm及2.5mm处各用记号笔作标记)插入切口。松掉ICA的血管夹后鱼线缓慢向颈内动脉插入,可见第一个标记距动脉分叉约2mm时停止,用缝合线将CCA和鱼线栓紧,缝好后用酒精棉球消毒皮肤缝合处。2h后将鱼线拔出2cm长度,形成再灌注模型。假手术组大鼠只切开皮肤剥离颈总、颈外、颈内动脉,结扎颈总、颈外动脉后即缝合皮

肤,缝好后用酒精棉球消毒皮肤缝合处。

造模后参照 Zea Longa 神经损害评分标准进行造模成功与否的判断,具体如下^[6]:0分,无神经损伤症状;1分,不能完全伸展对侧前爪;2分,向外侧转圈;3分,向对侧倾倒;4分,不能自发行走,意识丧失。1—3分说明造模成功。

1.3 治疗方法

4组SD大鼠置于相同环境饲养,假手术组、模型组大鼠造模成功后第1天,开始模拟捉拿、电针,用规格0.25×25mm华佗牌针具点触穴位,1次/d,连续治疗3d;非巨刺组参照李忠仁主编的《实验针灸学》常用实验动物针灸穴位取穴,对大鼠右侧合谷、外关、阳陵泉、足三里进行针刺,针刺深度上肢4—6mm,下肢6—8mm,连接刺激电极后对大鼠进行疏密波(疏波/密波=10Hz, Hz/5s, 10s)的刺激,以大鼠针刺肢体出现节律的收缩、颤动为度,持续30min,1次/d,连续治疗3d。巨刺组大鼠选择左侧肢体进行针刺,穴位、刺激量以及治疗时间与非巨刺组相同。

1.4 标本采集

治疗结束后,按指标检测要求取材,具体操作如下:0.3ml/kg的10%水合氯醛剂量腹腔注射麻醉,待大鼠麻醉完全后腹正中中线切开腹腔,分离出腹主动脉后以采血针+真空管采集腹主动脉血液,随后将腹主动脉夹闭,经左心室0.9%生理盐水灌洗后,于冰上迅速开颅取脑,取出的脑组织置于-80℃超低温冰箱中或置于液氮罐中,保存待用。

1.5 脑梗死体积计算

使用2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC)染色法检测大鼠脑梗死的体积。各组大鼠断头取脑后将脑组织置于-20℃冰箱冷冻15min至脑组织变硬,用锋利刀片将大脑自大脑半球额极至枕极做连续冠状位切片,每片厚约2mm,切成6片。将脑片放入1%TTC磷酸缓冲液(pH=7.4)后用锡箔纸盖住后,置于37℃温箱10—15min,用毛笔不时翻动脑片,使脑片均匀接触到染色液。TTC与正常组织中的脱氢酶反应而呈红色,而缺血组织内脱氢酶活性下降,不能反应,故脑梗死组织呈苍白色。利用Image-Pro Plus 6.0分析软件对脑梗死面积及缺血侧半球面积进行计算,然后得出脑梗死体积^[6](梗死体积=梗死面积和×2mm)。

1.6 蛋白印迹法测定蛋白水平变化

将所取大脑皮质200mg,加入1ml裂解液,4℃进行匀浆,15000r/min离心后取上清液,取25μl上清液进行BCA法测定浓度并计算上样量。将上清液和上样缓冲液按照4:1比例混匀后置于100℃的金属浴中变性7min。电泳(6%浓缩胶,12%分离胶,60V 145min)结束后将凝胶取出,进行转印(100V 2h)之后将PVDF膜取出,用丽春红对PVDF膜上的蛋白质进行预染,以证实蛋白质确实转移到膜上。使用TBST配置而成的5%脱脂奶粉进行封闭2h, TBST洗3次,每次10min,分别加入相应抗体,4℃环境孵育过夜后TBST洗3次,每次5min,再用碱性磷酸酶标记山羊抗兔IgG(1:1000)室温1h, TBST洗3次,每次5min。将PVDF膜放入显影仪器平板中,滴入ECL化学显影剂反应1min后显影,计算机扫描,数据处理。

1.7 荧光多聚酶链式反应测定基因水平变化

根据NCBI中Genebank基因库的设计引物序列,扩增片段长度约100—300bp。用0.1%DEPC水过夜室温或37℃处理1.5ml Eppendorf管和取液用10μl, 200μl和1ml Tip,高温蒸气灭菌,80℃烘干备用。将300mg大鼠大脑皮质组织加入4.5ml Trizol提取液于冰上快速研磨后置于离心机中以12000r/min速度离心后取上清液,将上清液吸于另一新离心管后加入1ml氯仿,用力震荡15s,冰上放置5min,再12000r/min,4℃离心15min,将上清液吸于另一新离心管后加入3ml异丙醇后均匀混合,冰上放置15min,12000r/min,4℃离心15min后弃上清液,加入1ml 75%乙醇轻轻摇晃,再7500r/min,4℃离心5min后将乙醇液弃去,冰上静置10min后加入DEPC-H₂O溶解总RNA后进行逆转录。逆转录过程:95℃(6min)→55℃(90s)→72℃(90s)→72℃(10min)→5℃(1h)。Real-Time PCR操作方法按照试剂盒说明书,使用GAPDH作为内部参照,将GAPDH的拷贝数作为校正基数,通过ABI7500软件获得检测指标Ct(cycle threshold)值,与同样本中GAPDH的Ct值相减,即获得该样本中相应指标的ΔCt值。以假手术组ΔCt值作为校正,软件根据 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 数值计算得出检测指标基因浓度水平。

1.8 ELISA测定大鼠血清酶活性变化

将所取大鼠腹主动脉血,4000r/min离心5min,

取上清液于4℃保存待测。操作过程按试剂盒说明书进行操作。用酶标仪于450nm测其吸光度值,根据标准品吸光度值,在EXCEL软件中做出标准曲线,从而得出样品相关酶活性的变化。

1.9 统计学分析

采用SPSS 16.0对所得数据进行统计分析,数据以均数±标准差表示,进行方差分析和组间比较统计学分析。

2 结果

2.1 巨刺法对大鼠脑梗死体积的影响

梗死体积,模型组(34.00 ± 0.11)m³,非巨刺组(18.00 ± 0.58)m³,巨刺组(10.00 ± 0.19)m³。针刺干预组的SD大鼠脑梗死体积明显小于模型组($P < 0.01$);巨刺组脑梗死体积小于非巨刺组($P < 0.05$)。

2.2 巨刺法对大鼠CREB蛋白水平的影响

针刺干预组的SD大鼠CREB蛋白水平明显高于模型组($P < 0.01$);巨刺组SD大鼠CREB水平高于非巨刺组($P < 0.05$)。见图1。

2.3 巨刺法对大鼠CREB基因水平的影响

针刺干预组的SD大鼠CREB基因水平明显高于模型组($P < 0.01$);巨刺组SD大鼠CREB基因水平高于非巨刺组($P < 0.05$)。见表1。

2.4 巨刺法对大鼠酶活性的影响

针刺干预组的SD大鼠AC、cAMP、PKA的活性与模型组比较具显著性差异($P < 0.01$),针刺干预组活性明显高于模型组。与非巨刺组相比,巨刺组大鼠AC、cAMP、PKA的活性较高($P < 0.05$)。提示巨刺针法能够理想提高大鼠AC、cAMP、PKA的活性。见表2。

图1 各组CREB Western-blot法结果比较



表1 CREB基因变化比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	Ct(CREB)	Ct(GAPDH)	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
假手术组	23.99 ± 1.49	20.90 ± 1.23	1
模型组	28.04 ± 1.28	22.89 ± 1.55	0.23 ± 0.77^{①}
非巨刺组	26.63 ± 0.83	22.46 ± 0.83	0.48 ± 0.44^{③}
巨刺组	25.02 ± 1.20	21.60 ± 0.84	0.88 ± 0.30^{②④}

与正常组比较:① $P < 0.01$;与模型组比较:② $P < 0.01$;③ $P < 0.05$;与非巨刺组比较:④ $P < 0.01$

表2 各组酶活性变化比较 ($\bar{x} \pm s$)

酶类别	假手术组	模型组	非巨刺组	巨刺组
AC	26.00 ± 0.31	22.00 ± 0.41	23.00 ± 0.06	24.00 ± 0.45^{①②}
cAMP	10.00 ± 0.08	9.00 ± 0.20	11.00 ± 0.71	12.00 ± 0.66^{③④}
PKA	360.00 ± 0.76	347.00 ± 0.31	371.00 ± 0.66	387.00 ± 0.04^{⑤⑥}

与模型组大鼠相比:① $P < 0.01$;与非巨刺组相比:② $P < 0.05$;与模型组大鼠相比:③ $P < 0.01$;与非巨刺组相比:④ $P < 0.05$;与模型组大鼠相比:⑤ $P < 0.01$;与非巨刺组相比:⑥ $P < 0.05$

3 讨论

急性脑缺血发生后在缺血病灶周围存在一个半影区,该区域的神经元的代谢和功能均被抑制,如果在干预手段的介入下能够逆转、活化,则神经元的功能将重新发挥。许多动物实验发现,脑缺血事件发生后神经元轴突在24h后触发始动,14d之内仍处于不断生长重塑状态,在第28天到达成熟期^[7]。从细胞学研究亦发现脑缺血后早期治疗有“时间窗”,如果在神经元轴突触发始动阶段进行干预治疗,则有益于神经功能的恢复。本研究在脑缺血再灌注24h后介入针刺治疗,以期顺应神经元突触生长特性进一步促进神经功能的恢复。

针刺作为中国传统医学的一种治疗方法,从古至今一直应用于脑卒中的治疗。巨刺针法首见于《内经》:“凡刺有九,以应九变……八曰巨刺。巨刺者,左取右,右取左。”故巨刺是一种左病取右,右病取左,左右交叉取穴施治的针刺方法。明代医家喻昌认为:“犯治一偏之病,治宜从阴引阳,从阳引阴,从左引右,从右引左,盖观树木之偏枯者,将溉其枯者乎?抑溉其未枯者,使期荣茂,而因以条畅其枯者乎?”提示巨刺针法在治疗脑卒中肢体障碍时利用刺激健侧肢体的经气激发患侧残余经气,健患侧经气共奏驱邪之功,濡养患侧肢体筋骨,促激患侧肢体潜在能力,恢复病情。祖国医学认为,脑卒中初始机体气血逆乱,风痰阻络,偏身不能用,患侧肢体腧穴处于低功能状态,针刺该部位穴位后得气受到影响,疗效仍无法达到最理想状态,此时刺激健侧腧穴,可以促进得气过程,提高疗效^[8]。从现代医学角度认为:人体的运动传导通路中不交叉的部分纤维、脊髓、脑干网状结构、丘脑非特异性投射系统以及大脑皮质是“巨刺法”效应产生的重要结构基础,“巨刺法”对脑卒中后神经功能改善调节的机制是多层次的,该

针法的针刺信息在脑干水平的影响不仅是双侧的,而且是弥漫广泛的^[9]。

本研究选用的合谷、外关、阳陵泉、足三里4个穴位是本团队对针刺治疗脑卒中的文献进行梳理归纳后发现使用频率最高的腧穴。再者,梁永瑛^[10]认为治疗脑卒中急性期的针刺方案以手足阳明、手足少阳经穴为主,意欲开窍启闭,疏经通络。

脑缺血疾病发生后,位于神经元突触的 γ -氨基丁酸B受体(GABAB)激活后与G蛋白偶联,减少兴奋性神经递质的分泌,介导了机体的抑制性反应,GABAB受体可降低细胞内cAMP的浓度,使神经元突触囊泡的募集受到阻碍。GABAB与被激活的G蛋白结合后抑制AC的激活,使AC结合ATP催化成cAMP的过程受抑制,机体cAMP浓度由此下降,导致PKA催化亚基从细胞核转位于胞浆并与保留于胞浆的调节亚基重新形成无活性的PKA全酶,因而抑制了PKA的激活。正常生理状况下,活化的PKA催化亚基最终使CREB磷酸化,调节转录因子活性,从而介导外界刺激^[6-7]。cAMP-PKA-CREB通路在神经元兴奋、生长、重塑、凋亡等重要过程都发挥主要作用,脑缺血发生后,cAMP-PKA-CREB通路因子活性受影响,不利于改善神经元的内生长状态,影响神经元轴突再生^[11-14]。

本研究通过cAMP-PKA-CREB通路标志性因子蛋白水平及基因水平的检测发现针刺干预组大鼠AC、cAMP、PKA、CREB水平均高于无干预的大鼠($P < 0.01$),在两组针刺干预组大鼠中,结果显示巨刺法能够理想提高大鼠AC、cAMP、PKA、CREB水平($P < 0.05$),故巨刺组疗效优于普通针刺干预组。

总之,文本观察到巨刺法能够缩小大鼠脑梗死病灶,该方法通过增强cAMP-PKA-CREB通路转导达到保护脑组织的目的。

参考文献

- [1] 中新网河南新闻.脑卒中死亡率年增9%,成国民健康第一“杀手”[EB/OL].[2011-10-30].<http://www.ha.chinanews.com/GN-news/1/2011/10/30/193641.shtml>.
- [2] Flynn RW, MacWalter RS, Doney AS. The cost of cerebral ischaemia[J]. *Neuropharmacology*, 2008, 55(3):250—256.
- [3] Duman CH, Schlesinger L, Kodama M, et al. A role for MAP kinase signaling in behavioral models of depression and antidepressant treatment[J]. *Biol Psychiatry*, 2007, 61(5):661—670.
- [4] 王顺,张静.不同经穴针刺对脑卒中偏瘫痉挛大鼠血清cAMP、cGMP含量影响的研究[J].*中国中医药科技*,2012,(1):54—55.
- [5] 孙晓伟,于学平,于春林,等.头针对脑缺血再灌注大鼠血脑屏障影响的实验研究[J].*针灸临床杂志*,2011,27(6):66—69.
- [6] Walteit R, Weller M. Signaling from cAMP/PKA to MAPK and synaptic plasticity[J]. *Mol Neurobiol*, 2003, 27(1):99—106.
- [7] 黄力平,向珩,肖娜,等.早期电针刺刺激局灶性脑缺血大鼠健侧肢体的康复效果[J].*中国康复医学杂志*,2012,9(27):808—812.
- [8] 周宇.巨刺针法治疗中风恢复期手功能障碍37例临床观察[J].*中医杂志*,2012,53(20):1746—1748.
- [9] 解桔萍.巨刺法神经解剖学机制探讨[J].*上海针灸杂志*,1997,16(2):28—29.
- [10] 梁永瑛.针灸治疗中风偏瘫选穴规律研究[J].*上海针灸杂志*,2007,26(10):28—30.
- [11] 蒋纪英,霍本良.高压氧对大鼠局灶性脑缺血再灌注神经细胞caspase-3表达的影响[J].*中华物理医学与康复杂志*,2006,28(12):853—855.
- [12] 田云丽,施静,刘爱芬.迷走神经刺激术在脑缺血中的应用及神经机制[J].*中国组织化学与细胞化学杂志*,2012,(3):312—315.
- [13] 石妮霞,张百祥.利脑心治疗脑梗死恢复期80例疗效观察[J].*世界中医药*,2012,(3):235.
- [14] Anderson LE, Seybold VS. Calcitonin gene-related peptide regulates gene transcription in primary afferent neurons[J]. *J Neurochem*, 2004, 91(6):1417—1429.