

# 电针抑制局灶性脑缺血损伤大鼠皮质细胞自噬的实验研究\*

何 坚<sup>1</sup> 黄紫妍<sup>1</sup> 陈伟标<sup>1</sup> 柳维林<sup>1</sup> 上官豪<sup>2</sup> 陶 静<sup>1</sup> 陈立典<sup>1,3</sup>

## 摘要

**目的:**观察电针“曲池”、“足三里”穴对缺血再灌注(MCAO)大鼠皮质神经细胞PI3K-mTOR信号通路的影响。

**方法:**参考Koizumi线栓法构建MCAO大鼠模型,电针“曲池”、“足三里”穴干预后,TTC染色观察梗死体积,采用Western blot检测细胞自噬标志蛋白Atg4、LC3B,以及自噬相关信号分子PI3K、mTOR蛋白的表达水平。

**结果:**TTC染色显示电针减少了MCAO大鼠脑梗死体积;电针抑制了LC3B I向LC3B II的转化;与模型组相比,电针组Atg4表达下降,而PI3K和mTOR蛋白表达水平升高。

**结论:**电针“曲池”、“足三里”治疗3天抑制细胞自噬相关分子,其可能机制电针激活了PI3K-mTOR信号分子。

**关键词** 电针;神经细胞;自噬;LC3B;PI3K-mTOR;脑缺血性损伤;脑卒中

中图分类号:R743.3, R245 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2015)-12-1203-05

**Effects of protection of electroacupuncture against cerebral ischemic injury by inhibiting autophagy in rats/HE Jian, HUANG Ziyan, CHEN Weibiao, et al.//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2015, 30 (12): 1203—1207**

## Abstract

**Objective:** To observe effects of electroacupuncture (EA) of "Quchi (LI11)" point, "Zusanli (ST36)" point on the structure of cortical mitochondria and autophagosome in cerebral ischemia reperfusion (MCAO) rats.

**Method:** The model MCAO rats were constructed according to Koizumi methods. After EA at "Quchi", "Zusanli" point intervention, the volumes of cerebral ischemia were observed by TTC staining, electron microscope was used to observe the autophagosome and the structure of mitochondria. Western blot was used to detect autophagy marker protein expression levels of Atg4 and LC3B.

**Result:** TTC staining showed that EA reduced cerebral infarct volumes of rats in model MCAO group. EA intervention inhibited the transformation of LC3B I to LC3B II. In addition, compared with model group, in EA group the expression of Atg4 decreased, whereas the expressions of PI3K and mTOR proteins increased.

**Conclusion:** MCAO could promote autophagy occurring in cortical cells, while EA at "Quchi (LI11)", "Zusanli (ST36)" for 3d could inhibit the autophagy, the mechanisms maybe mediate PI3K-mTOR signaling.

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

**Key word** electroacupuncture; neural cell; autophagy; LC3B; PI3K-mTOR; cerebral ischemic injury; stroke

缺血性脑卒中具有高发病率、高死亡率、高致残率的特点<sup>[1]</sup>。缺血性脑卒中后,缺血、缺氧可导致神经元出现一系列异常变化,如细胞肿胀、细胞裂解、细胞器游离等。近年来,自噬(autophagy)已成为研

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2015.12.001

\*基金项目:国家自然科学基金资助项目(81273835);重点学科专项课题(X2014073-学科)

1 福建中医药大学康复医学院,福州,350122; 2 福建省运动功能康复重点实验室,福州,350001; 3 通讯作者

作者简介:何坚,男,副教授; 收稿日期:2015-05-06

究的热点,而细胞自噬在神经系统疾病中的作用也越来越受到重视<sup>[1]</sup>。自噬是指细胞内受损的细胞器、长效蛋白及一部分细胞质被双层膜结构包裹形成自噬体,自噬体通过细胞骨架微管系统运输到溶酶体形成自噬溶酶体,并进行多种酶的消化及降解,以实现细胞本身的代谢需要和某些细胞器的更新,来维持细胞正常功能的机制<sup>[2]</sup>。自噬在中枢神经系统中起着重要的作用,尤其是对神经元功能的维持<sup>[3]</sup>,自噬可能成为一个新的治疗靶点。现在众多学者在局部脑缺血动物模型的受损脑组织中通过可靠的形态学和生物化学证据,证明自噬被缺血性脑卒中激活<sup>[5-6]</sup>。神经细胞自噬,在数小时后即被激活。因此,自噬的激活对脑组织有保护作用。

针刺疗法系祖国传统中医疗法的一种重要组成部分,具有简单、便捷、经济、疗效佳的特点。随着分子生物学的发展,针刺治疗也正逐步被西方医学所认可接受<sup>[7]</sup>。阳明经为多气多血之经,“曲池”、“足三里”分别为手足阳明经之合穴,是阳明经气最强盛之处,针刺阳明经穴可以益气行血,通经活络,有利于脑部气血的恢复,针刺两穴更是体现了“治痿独取阳明”这一经典理论。前期我们在阐明电针“曲池”、“足三里”穴作用机制时,发现电针激活PI3K-Akt信号通路<sup>[8]</sup>,而现在大量的研究表明PI3K-Akt的激活,能够磷酸化mTOR,并抑制细胞自噬<sup>[9-10]</sup>。因此,本研究提出研究假说:电针“曲池”、“足三里”穴是否激活PI3K-mTOR信号通路,抑制细胞自噬从而起到神经保护作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

健康雄性SD大鼠,SPF级体重(200—250g),由福建中医药大学动物实验中心提供,附实验动物合格证书。鱼线(直径0.20—0.25mm)。自噬蛋白LC3B、Atg4和PI3k、mTOR、 $\beta$ -actin用于Western blot检测的一抗及相应的二抗。

### 1.2 实验分组

根据随机的原则,将30只大鼠分为3组,假手术组、模型组、电针组,每组10只大鼠。

### 1.3 MCAO动物造模

在室温22℃条件下,大鼠称重后,参考Koizumi

线栓法<sup>[11]</sup>,行左侧MCAO手术,制备急性脑梗死动物模型。具体方法为所有大鼠均选择左侧大脑中动脉(middle cerebral artery, MCA)区作为梗死侧,10%水合氯醛(3ml/kg)腹腔麻醉成功后,常规去毛消毒,正中切开颈部皮肤,暴露颈总动脉并向上分离出颈内动脉和颈外动脉主干及分支,在颈内、外动脉分叉处结扎颈外动脉,在近心端结扎颈总动脉。用动脉夹夹闭颈内动脉,然后在颈总动脉结扎处远端约3mm处剪一小口,将直径为0.24mm的尼龙线从切口导入,经颈内动脉至左侧大脑中动脉起始部阻断血流(有少许阻力为止),从颈外动脉与颈内动脉分叉处插入约18—22mm,从而造成局灶性脑缺血。2h后缓慢退出尼龙线。实验过程和动物苏醒期间注意保暖。假手术组只分离血管,不结扎、插线。动物苏醒后观察其体态及行为,以判断MCAO模型成功,将不合格的动物剔除。

### 1.4 电针干预

电针组大鼠在造模后第1天即开始电针干预。采用捆绑法固定,所有电针组大鼠取患侧“曲池”、“足三里”穴,穴位定位参考《实验针灸学》。局部消毒后,用华佗牌30号0.5寸毫针,斜刺0.2—0.3cm,接G6805型电针仪,电压峰值6V,以大鼠肢体轻轻抖动为度,选用疏密波,频率1—20Hz,电针时间30min。电针干预时间为3d。假手术组及模型组同时以同样的方法固定30min,但不予以电针刺激。

### 1.5 Western blot检测

将取得的组织及时置于液氮低温保存后,于-80℃冰箱保存。经过裂解,BCA测蛋白溶度后,采用SDS-PAGE电泳,检测各组大鼠皮质组织中自噬蛋白LC3B、Atg4和PI3k、mTOR、 $\beta$ -actin的表达。

### 1.6 统计学分析

数据以均数 $\pm$ 标准差表示,应用SPSS 18.0进行统计学分析处理,计量资料行 $F$ 检验,进一步两两比较采用LSD检验。

## 2 结果

### 2.1 TTC染色

假手术组正常组织为红色,缺血再灌注3d后,模型组、电针组梗死灶不着色,显示为白色,而电针组梗死灶体积(33.62% $\pm$ 4.62%)较模型组(21.96% $\pm$

3.65%)减少( $P<0.05$ )。见图1。

### 2.2 自噬相关蛋白表达水平

Western blot显示缺血再灌注3d后模型组较假手术组自噬标志物LC3B II向LC3B I转化( $0.08\pm 0.02, 0.38\pm 0.08$ ),而电针干预后,电针降低了自噬蛋白LC3B的转化( $0.26\pm 0.06$ ), $P<0.05$ 。而另一个自噬相关蛋白Atg4,相对模型组,电针组其表达水平显著性被抑制( $0.66\pm 0.10, 0.42\pm 0.09$ ), $P<0.05$ 。见图2—3。

### 2.3 PI3K、mTOR 信号通路的变化

Western blot显示模型组较假手术组缺血再灌注3d后大鼠脑组织皮质区的PI3K/Akt信号通路中关键蛋白分子PI3K( $0.80\pm 0.06, 0.3\pm 0.02$ )及mTOR( $0.56\pm 0.06, 0.32\pm 0.03$ )蛋白表达减少( $P<0.01$ );与模型组比较,电针组的PI3K( $0.62\pm 0.10$ )及mTOR( $0.68\pm 0.11$ )的蛋白表达明显升高( $P<0.05$ )。图4。

## 3 讨论

脑卒中属于中医学“中风”范畴,中风是指以突然昏倒,不省人事,伴口角歪斜,言语不利,半身不遂;或仅以口僻,半身不遂,偏身麻木为主要临床表现的一种病证。气血阴阳失调,经脉闭阻,偏身经气尤其是阳经经气受阻,经脉失养,而发偏瘫。因此治疗当以调整气血、平衡阴阳、疏通经脉为主要治疗原则。针灸是治疗中风的行之有效的方法之一。历代文

图1 TTC染色和体积百分比

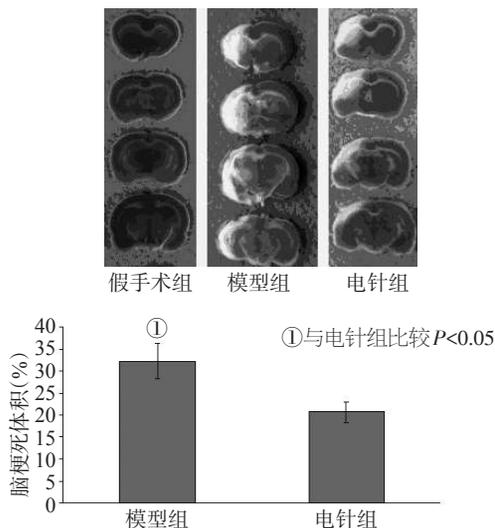


图2 LC3B蛋白水平和统计结果

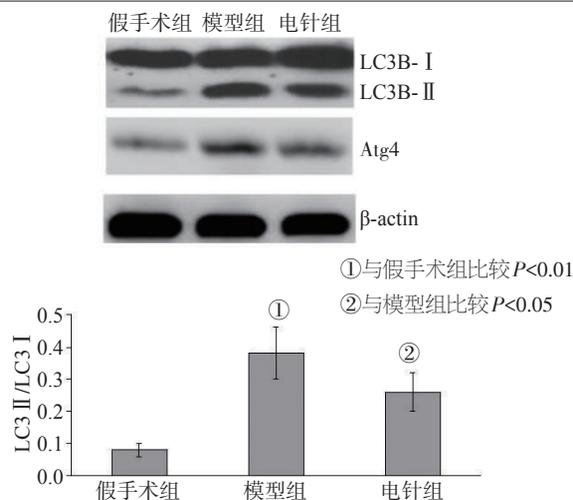


图3 Atg4的统计结果

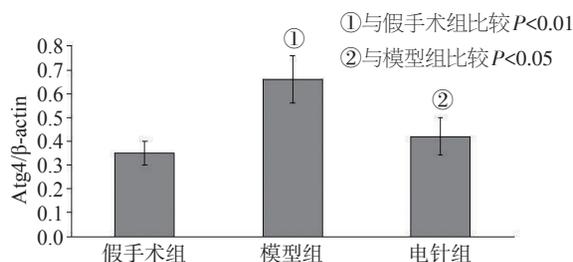
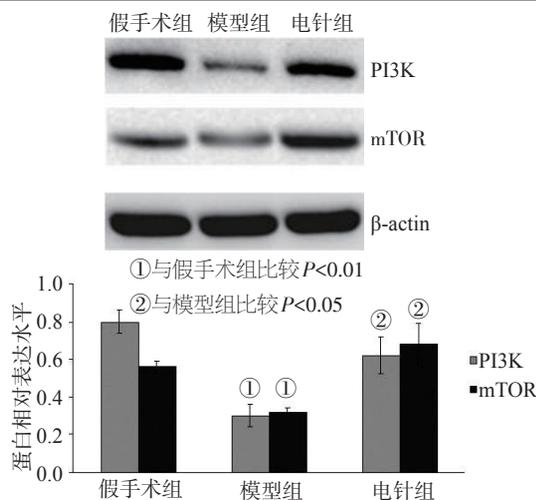


图4 PI3K、mTOR 信号通路相关蛋白水平和统计结果



献已有对中风针灸疗法的记载,《素问·痿论篇》提出了“治痿独取阳明”的基本治则,“阳明者,五藏六腑之海,主润宗筋,宗筋主束骨而利机关也”,阳明经为

多气多血之经,“曲池”、“足三里”穴分别为手阳明大肠经和足阳明胃经之要穴,既能灌其中土、荣养四肢,又可以疏通经络、运行气血。电针“曲池”、“足三里”穴可以达到调整气血、平衡阴阳、疏通经脉的作用,使机体功能得到最大限度的恢复。临床研究已证实针刺“曲池”、“足三里”穴能改善中风患者的运动功能<sup>[12]</sup>。本研究也发现电针“曲池”、“足三里”穴能有效减少脑梗死面积。但是电针“曲池”、“足三里”穴治疗中风的机制尚未彻底清楚。

近年细胞自噬在脑缺血中的作用得到了越来越多的研究,但是电针作为改善脑缺血的有效治疗方法是否通过影响神经细胞自噬而起保护作用的研究,却尚未见有报道。Carloni S等<sup>[13-14]</sup>在缺血、缺氧的大鼠模型中,自噬在缺血后被激活,经PI3K抑制剂三甲基腺嘌呤(3-methyladenine, 3-MA)抑制自噬后,早期坏死的细胞数量显著增多,而用自噬激动剂雷帕霉素后,早期坏死的细胞数明显减少,脑缺血损伤程度减轻;表明自噬可保护神经细胞,减轻缺血性损伤。Chauhan A等<sup>[15]</sup>在大鼠局灶性脑缺血模型造模后1h腹腔注射自噬激活剂雷帕霉素后,应用MRI检测脑梗死体积,发现雷帕霉素能减少脑梗死体积。Puyal和Clarke<sup>[16]</sup>在大鼠脑缺血模型研究中观察到,缺血灶周围脑组织神经元中的溶酶体和自噬活动均显著增强,认为自噬活动对缺血周围脑组织具有保护作用。Zhu等<sup>[17]</sup>在小鼠HI损伤8h后,检测到LC3-II表达的增加及大量自噬泡形成,24—72h尤为明显。Yan等<sup>[18]</sup>在局灶性脑缺血大鼠实验中发现,高压氧预适应模型中,自噬激活,从而保护脑组织,而雷帕霉素自噬激活剂具有模拟高压氧预适应的生物学效应,减轻脑缺血损伤,具有脑保护作用。研究表明,自噬作为应激反应,可能参与脑缺血的病理生理过程。在体内和体外研究发现缺血再灌注后自噬激活起到神经保护作用<sup>[19]</sup>。脑缺血后自噬与星形胶质细胞的研究中发现:缺血或缺氧诱发的自噬/溶酶体途径激活,可以导致星形胶质细胞的缺血性损伤<sup>[20]</sup>。适度激活自噬可能对细胞损伤起保护作用,过度的激活会导致细胞死亡<sup>[21]</sup>。本研究发现,MCAO大鼠缺血刺激后激活自噬标准蛋白LC3B亚型的转化,而电针“曲池”、“足三里”穴干预后,有效缓解神经细胞自噬情况,且抑制LC3B I向LC3B II

的转化水平。

PI3K-mTOR通路作为细胞内非常重要的信号转导途径,在细胞的生长、存活、增殖、凋亡、血管生成、自噬等过程中发挥着极其重要的生物学功能。已有研究表明,PI3K-mTOR途径在脑缺血再灌注损伤中能够减少脑梗死体积,减少神经细胞凋亡,发挥脑保护作用;但是随着脑损伤的加重,这种自我保护效应最多只能持续24h<sup>[22]</sup>。目前有越来越多的证据发现,PI3K-mTOR途径在脑缺血再灌注损伤的神经保护作用与抑制凋亡和抑制细胞自噬密切相关,且自噬时间先于凋亡<sup>[23-24]</sup>。而本研究发现电针“曲池”、“足三里”穴干预治疗后,激活PI3K-mTOR信号通路,并抑制细胞自噬。

综上所述,本研究发现脑缺血再灌注后促进皮层神经细胞自噬的发生,而电针“曲池”、“足三里”治疗3天后可抑制细胞自噬,其可能机制是电针激活了PI3K-mTOR信号通路,但本研究缺乏自噬激动剂或抑制剂对照组的设立,因此,其电针是否介导PI3K-mTOR信号通路仍需进一步探讨。

## 参考文献

- [1] Hoyer-Hansen M, Jäätelä M. Autophagy: an emerging target for cancer therapy[J]. *Autophagy*, 2008, 4(5):574—580.
- [2] Wong E, Cuervo AM. Autophagy gone awry in neurodegenerative diseases[J]. *Nat Neurosci*, 2010, 13(7):805—811.
- [3] Donnan GA, Fisher M, Macleod M, et al. Stroke[J]. *Lancet*, 2008, 371(9624):1612—1623.
- [4] Klionsky DJ. Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8(11):931—937.
- [5] Wen YD, Sheng R, Zhang LS, et al. Neuronal injury in rat model of permanent focal cerebral ischemia is associated with activation of autophagic and lysosomal pathways[J]. *Autophagy*, 2008, 4(6):762—769.
- [6] Rami A, Langhagen A, Steiger S. Focal cerebral ischemia induces upregulation of Beclin 1 and autophagy-like cell death[J]. *Neurobiol Dis*, 2008, 29(1):132—141.
- [7] 李静. 电针治疗中风偏瘫临床研究[J]. *中医临床研究*, 2011, 3(02): 1—6.
- [8] Xue X, You Y, Tao J, et al. Electro-acupuncture at points of Zusanli and Quchi exerts anti-apoptotic effect through the modulation of PI3K/Akt signaling pathway[J]. *Neurosci Lett*, 2014, (558):14—19.
- [9] Zhou ZW, Li XX, He ZX, et al. Induction of apoptosis and autophagy via sirtuin1- and PI3K/Akt/mTOR-mediated

- pathways by plumbagin in human prostate cancer cells[J]. Drug Des Devel Ther, 2015, (9):1511—1554.
- [10] Li P, Shi J, He Q, et al. Streptococcus pneumoniae induces autophagy through the inhibition of the PI3K- I/Akt/mTOR pathway and ROS hypergeneration in A549 cells[J]. PLoS One, 2015, 10(3):e0122753.
- [11] K Jin-Ichi, Y Yoji, N Teiji, O Genju. Experimental studies of ischemic brain edema:1.A new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area[J]. Jpn J Stroke.1986, 8 (5): 1—8.
- [12] Zhang GC, Fu WB, Xu NG, et al. Meta analysis of the curative effect of acupuncture on post-stroke depression[J]. J Tradit Chin Med, 2012, 32(1):6—11.
- [13] Carloni S, Girelli S, Scopa C, et al. Activation of autophagy and Akt/CREB signaling play an equivalent role in the neuroprotective effect of rapamycin in neonatal hypoxia-ischemia[J]. Autophagy, 2010, 6(3):366—377.
- [14] Carloni S, Buonocore G, Balduini W. Protective role of autophagy in neonatal hypoxia-ischemia induced brain injury [J]. Neurobiol Dis, 2008, 32(3):329—339.
- [15] Chauhan A, Sharma U, Jagannathan NR, et al. Rapamycin protects against middle cerebral artery occlusion induced focal cerebral ischemia in rats[J]. Behav Brain Res, 2011, 225 (2):603—609.
- [16] Puyal J, Clarke PG. Targeting autophagy to prevent neonatal stroke damage[J]. Autophagy, 2009, 5(7):1060—1061.
- [17] Zhu C, Wang X, Xu F, et al. The influence of age on apoptotic and other mechanisms of cell death after cerebral hypoxia-ischemia[J]. Cell Death Differ, 2005, 12(2):162—176.
- [18] Yan W, Zhang H, Bai X, et al. Autophagy activation is involved in neuroprotection induced by hyperbaric oxygen preconditioning against focal cerebral ischemia in rats[J]. Brain Res, 2011, (1402):109—121.
- [19] Wang P, Guan YF, Du H, et al. Induction of autophagy contributes to the neuroprotection of nicotinamide phosphoribosyltransferase in cerebral ischemia[J]. Autophagy, 2012, 8 (1):77—87.
- [20] Qin AP, Liu CF, Qin YY, et al. Autophagy was activated in injured astrocytes and mildly decreased cell survival following glucose and oxygen deprivation and focal cerebral ischemia[J]. Autophagy, 2010, 6(6):738—753.
- [21] Lee JA. Neuronal autophagy: a housekeeper or a fighter in neuronal cell survival?[J]. Exp Neurobiol, 2012, 21(1):1—8.
- [22] Zhao H, Shimohata T, Wang JQ, et al. Akt contributes to neuroprotection by hypothermia against cerebral ischemia in rats[J]. J Neurosci, 2005, 25(42):9794—9806.
- [23] Wu Z, Zou Z, Zou R, et al. Electroacupuncture pretreatment induces tolerance against cerebral ischemia/reperfusion injury through inhibition of the autophagy pathway[J]. Mol Med Rep, 2015, 11(6):4438—4446.
- [24] Balduini W, Carloni S, Buonocore G. Autophagy in hypoxia-ischemia induced brain injury[J]. J Matern Fetal Neonatal Med, 2012, 25(Suppl 1):30—34.

## 第七届全国儿童康复、第十四届全国小儿脑瘫康复学术会议暨国际交流会议通知(第一轮)

为了推动我国儿童康复事业的发展,促进学术交流,中国康复医学会儿童康复专业委员会暨中国残疾人康复协会小儿脑瘫康复专业委员会拟于2016年8月18日至21日在陕西省西安市召开两年一度的第七届全国儿童康复、第十四届全国小儿脑瘫康复学术会议暨国际交流会议。**会议主题:**规范康复行为、发展儿童康复。**征文范围:**主要包括儿童康复和脑瘫康复相关领域的临床及基础研究。儿童康复评定方法(运动、智能、心理、ADL等)和治疗技术(包括PT、OT、ST、中西医结合等)。早期干预、诊断及鉴别诊断,医教结合,社区与家庭康复,康复护理,康复工程,中国传统康复,儿童残疾的预防监测、转诊服务和流行病学研究及康复管理等其他相关领域。**投稿要求:**未在全国性公开刊物上发表的论文等,文责自负。文稿内容包括题目、作者、800字以内的中文摘要(目的、方法、结果和结论)。请注明作者姓名、单位名称、职务/职称、通讯地址及邮编、电子邮箱。**投稿方式:**www.xachyy.com/huiyizhongxin/index.php。**截稿日期:**2016年5月31日。**继教学分:**参加会议代表可获得国家级一类学分10分。**联系人:**杨红梅 87692218 13571978099;杨馥羽 87692175 13186131998。**联系邮箱:**ertongkangfuhuiyi@163.com。**主办单位:**中国康复医学会儿童康复专业委员会;中国残疾人康复协会小儿脑瘫康复专业委员会。**承办单位:**西安市儿童医院