

基于TLR4/MyD88/JNK信号通路的电针曲池、足三里穴治疗脑缺血再灌注损伤的作用机制*

何 坚¹ 柳维林¹ 王露露² 林云娇² 叶晓倩² 陶 静¹ 陈立典^{1,3}

摘要

目的:探讨电针曲池、足三里穴是否通过TLR4/MyD88/JNK信号通路产生脑缺血再灌注损伤的保护作用。

方法:将36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。采用TTC染色观察脑缺血后梗死体积;采用蛋白免疫印迹法观察缺血周边区脑组织中TLR4、MyD88的蛋白表达以及JNK的磷酸化水平。

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和脑梗死体积($P<0.05$);电针可以抑制缺血周边区脑组织中TLR4、MyD88的蛋白表达($P<0.05$),降低JNK的磷酸化水平($P<0.05$)。

结论:电针曲池、足三里穴可能通过抑制TLR4/MyD88信号通路,降低JNK的磷酸化,从而产生对脑损伤的神经保护作用。

关键词 电针;脑缺血再灌注损伤;TLR4/MyD88/JNK信号通路

中图分类号:R245;R743.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2016)-08-0847-05

The mechanism of electroacupuncture at Quchi and Zusanli acupoints on cerebral ischemia and reperfusion injury based on TLR4/MyD88/JNK signal pathway/HE Jian, LIU Weilin, WANG Lulu, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2016,31(8): 847—851

Abstract

Objective: To investigate if the TLR4/MyD88/JNK signaling pathway mediates the protective effect on cerebral ischemia reperfusion injury by Electroacupuncture (EA) at Quchi, Zusanli.

Method: The 36 SD rats were randomly divided into sham operation group, model group and EA group. The focal cerebral ischemia reperfusion model was established by middle cerebral artery occlusion (MCAO) in rats. TTC staining was used to observe the infarct volume after cerebral ischemia, and the expression of MyD88 and TLR4 in the ischemic surrounding region was observed by Western blotting. The phosphorylation level of JNK was observed by Western blotting.

Result: EA at the Quchi and Zusanli acupoints could significantly improve the neurological symptoms and relieve the cerebral infarct volume in MCAO rats ($P<0.05$). EA could inhibit the expression of TLR4 and MyD88 protein in the ischemic surrounding region ($P<0.05$) and reduce the phosphorylation of JNK ($P<0.05$).

Conclusion: EA at the Quchi and Zusanli acupoints exerts neuroprotection against the cerebral ischemia and reperfusion injury by reducing phosphorylation of JNK and inhibiting the TLR4/MyD88 signaling pathway.

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

Key word electroacupuncture; cerebral ischemia and reperfusion injury; TLR4/MyD88/JNK signaling pathway

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2016.08.004

*基金项目:国家自然科学基金资助项目(81273835)

1 福建中医药大学康复医学院,福州,350122; 2 福建省康复技术重点实验室; 3 通讯作者

作者简介:何坚,男,副教授; 收稿日期:2015-10-15

缺血性脑血管病是因脑部血液供应障碍,缺血、缺氧引起的局限性脑组织缺血性坏死或脑软化,占脑血管病的70%—80%,具有高发病率、高病死率、高致残率和高复发率等特点,成为人类死亡的主要原因之一。近年来,随着降纤、溶栓等治疗方法的建立,缺血性损伤及其后继性再灌注损伤在治疗过程中日益受到重视,如何减轻缺血再灌注性脑损伤是当今研究的焦点和重点。电针疗法在临床治疗缺血性脑血管病中已被认为是行之有效的方法之一,但其作用机制尚不明确。

近几年来,一种模式识别受体(pattern recognition receptor, PRR)—Toll样受体4被发现,并证实具有介导组织免疫炎症反应的作用。TLR4介导的信号转导通路在脑缺血再灌注过程中促成了脑组织的缺血性损伤,而TLR4基因缺失时则表现出了对脑组织的保护作用^[1-3]。TLR4可活化髓样分化因子88(myeloid differentiation factor 88, MyD88)依赖性和非依赖性两条信号途径:前者活化丝裂原激活的蛋白激酶(mitogen activated protein kinase, MAPK)和NF- κ B信号通路^[4]。前者MAPK信号转导通路包括c—Jun氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)等^[5]。JNK信号通路参与了细胞增殖、分化和凋亡的调节^[6]。因此,TLR4-JNK信号通路为针刺治疗缺血性脑血管病的作用机制研究开辟了新的探索途径。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

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SPF级健康雄性SD大鼠36只(动物批号:2014000638342),体重(250 $\pm$ 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)2014-0005]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12只。

1.2 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ZeaLonga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。

1.3 模型的筛选标准

采用Zea-longa评分方法,当造模大鼠清醒后,即评定动物神经功能缺损。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分予以剔除。

1.4 电针干预措施

采用大鼠固定装置固定大鼠,取右侧前肢“曲池”、后肢“足三里”穴(大鼠穴位定位参考《实验针灸学》^[8]中之定位方法),曲池穴位于桡骨近端肘关节外侧前方的凹陷中;足三里穴位于膝关节后外侧,腓骨小头下约5mm处。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20min,1次/d,共7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20min,但不进行电针刺激。

1.5 CatWalk行为学检测

54只SD雄性大鼠首先在实验前,进行CatWalk适应性训练1w,训练合格标准为:大鼠连续不停顿地通过通道至少3次^[9]。大鼠在电针干预7d后,模型组和电针组先进行神经行为学评分;之后3组分别接受CatWalk系统步态分析。每只大鼠接受至少3次评估,每次必须连续地走完设定好的长度范围玻璃平板,整个实验过程在暗室环境中完成。CatWalk系统在识别并标记出每一个脚印后,将自动生成一系列步态参数,包括速度、持续时间等。

1.6 TTC染色

脑组织-20℃冰冻20min,从视交叉处取冠状面均匀切成厚2mm脑片,共切5片,切好置于1% TTC 磷酸缓冲液(0.2mol/L,pH7.4)中,放入37℃避光孵箱,每15min翻面一次,翻两次后取出。正常组织TTC染色为红色,梗死处TTC染色呈白色。用数码相机进行拍照,运用计算机测量梗死面积百分比。

1.7 蛋白免疫印迹法

每100mg缺血周边区脑组织中加入1ml的细胞裂解液和10μl 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50μg经12% SDS-PAGE电泳,转移至PVDF膜上。5%脱脂牛奶室温封闭2h,TLR4(1:300)、MyD88(1:300)、p-JNK(1:400)、t-JNK(1:300)和β-actin(1:1000)一抗4℃孵育过夜,洗膜后加入辣根过氧化物标记的二抗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。

1.8 统计学分析

所得数据均以均数±标准差表示,应用SPSS18.0软件进行统计学处理,三组组间比较采用方差分析,两组组间则采用t检验。

2 结果

2.1 电针曲池、足三里穴改善脑缺血再灌注损伤大鼠行为学评分

造模成功后的MCAO大鼠出现不同程度的神经功能缺损。分别在缺血再灌注后2h、3天和7天进行大鼠动物行为学评分。结果显示:脑缺血再灌注2h后,各组之间的行为学评分无显著性差异($P=0.742$)。而电针组干预3天和7天后脑缺血再灌注的神经缺损评分逐渐减低,且在第3天和第7天较模型组明显降低($P<0.05$)。由此说明电针“曲池”、“足三里”穴改善缺血性脑卒中大鼠的神经缺损症状。见表1。

表1 神经功能缺损评估 ($\bar{x}\pm s, n=12$)

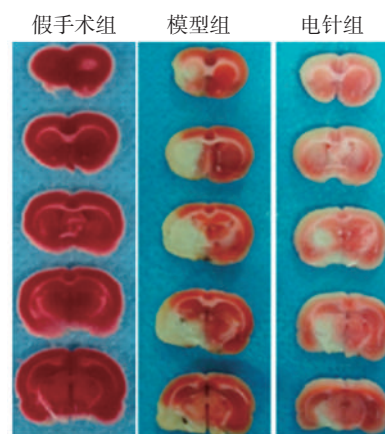
组别	缺血再灌注2h	缺血再灌注3天	缺血再灌注7天
假手术组	0	0	0
模型组	2.30±0.39	1.95±0.33	1.42±0.15
电针组	2.35±0.40	1.43±0.28 ^①	1.14±0.17 ^①

①模型组与电针组比较: $P<0.05$

2.2 电针“曲池”、“足三里”穴对MCAO大鼠脑梗死体积的影响

采用TTC染色分析各组大鼠7天后脑梗死体积。如图1所显示的,假手术组脑组织染色全部为红色,其余两组脑组织冠状切面均可见不同程度的左侧梗死灶呈苍白色,与周围红色的正常脑组织界限清晰,符合血管分布范围。与模型组比较,电针“曲池”、“足三里”穴7天显著性地减少了脑梗死体积($P<0.05$)。

图1 MCAO后各组大鼠7天后脑梗死体积TTC染色



2.3 电针曲池、足三里穴对MCAO大鼠动物整体行为学的影响

通过Catwalk步态分析系统观察动物整体行为学变化,结果显示:模型组大鼠通过Catwalk跑道的平均速度较假手术组减慢($P<0.05$),而持续时间增加($P<0.05$);电针分别治疗3天和7天后,均显示电针组较模型组大鼠平均速度增加,持续时间减少($P<0.05$)。见图2。

2.4 电针曲池、足三里穴对TLR4-JNK信号通路蛋白表达的影响

脑缺血再灌注7天,与假手术组相比,模型组大鼠脑缺血周边区脑组织TLR4、MyD88的蛋白表达、p-JNK的磷酸化水平(p-JNK/t-JNK)均显著性增加,而电针组干预其表达均降低($P<0.05$)。表明电针曲池、足三里抑制缺血再灌注损伤大鼠缺血周边区TLR-JNK信号通路。见图3—4。

图2 各组大鼠通过Catwalk跑道的速度和时间

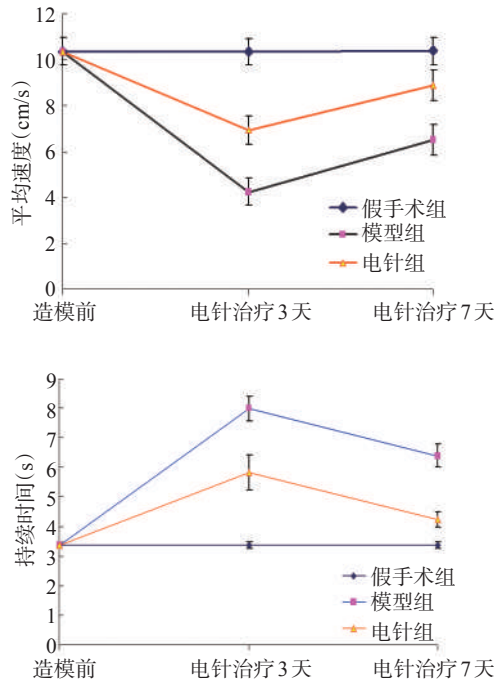


图3 TLR4-JNK 蛋白电泳结果

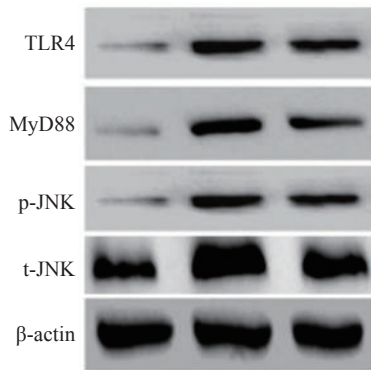
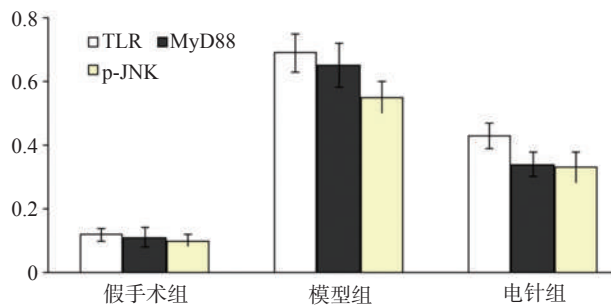


图4 TLR4-JNK 蛋白表达水平



3 讨论

脑缺血属中医学的“中风”范畴,《素问·生气通天论》曰:“阳气者,烦劳而张。”《丹溪心法·论中风》言:“湿土生痰,痰生热,热生风也。”《素问·痿论篇》有曰:“治痿独取阳明”。阳明经为多气多血之经,又主润宗筋,“阳虚则宗筋纵,宗筋纵则不能束筋骨以流利机关”。故阳明经穴对于中风之肢体痿痹的治疗尤为适宜,而“曲池”、“足三里”均为阳明经之穴。曲池:曲,屈曲。属手阳明大肠经之合穴,出自《灵枢·本输》。唐《备急千金要方》卷八·治诸风方·偏风第四:“针风池一穴、肩髃一穴、曲池一穴、支沟一穴、五枢一穴、阳陵泉一穴、巨虚下廉一穴。凡针七穴即瘥。”足三里穴,始载于战国时期《内经》。《针灸大成》卷四·窦文真公八法流注“中风偏枯,疼痛无时:绝骨、太渊、曲池、肩髃、三里、昆仑”。《针灸逢源》:“半身不遂:此由气血不周,一名偏枯是也,或但手不举口不能言,而无他症者,此中经也,各随其经络俞穴而针灸之。百会、肩井、肩髃、曲池、手三里、列缺、风市、绝骨、足三里。以上穴,先针无病手足,后针有病手足”。

TLR 家族是一个受体家族,参与免疫系统对微生物的识别。TLRs 识别病原体相关分子模式,近年研究发现 TLRs 识别模式在心脑血管系统发挥重要作用。TLRs 激活一种共同的信号通路,最终引起核转录因子 NF- κ B、丝裂原活化蛋白激酶 MAPKs、胞外信号调节激酶 ERK、p38 和 c-Jun N 端激酶 JNK 的活化^[10]。研究表明脑缺血再灌注损伤后 TLR4 被激活后,通过 MyD88/JNK 和 NNF- κ B/IRF3 等信号转导途径,表达多种炎性细胞因子、趋化因子、酶等,产生炎症反应,加重脑缺血性损伤^[11]。有文献报道,与野生型相比,TLR4 缺陷的小鼠脑缺血后脑梗死体积缩小,神经行为明显改善,TLR4 缺陷的小鼠脑缺血 6h 再灌注 24h 后,无论是脑水肿程度、脑梗死体积,还是神经元损伤程度均明显降低^[12]。有研究发现脑缺血再灌注模型小鼠中皮质、海马等部位 JNK 表达升高,激活 Caspas-3、Bad 等信号促进细胞凋亡^[13]。随着 TLR4-JNK 信号通路研究的不断深入,一系列实验表明电针刺激可能通过调节 TLR4-JNK 信号通路,从而对抗中枢神经元凋亡、抗非感染性炎症反应。沈氏^[14]等用 MCAO 模型大鼠,电针取“百

会”、“大椎”穴可抑制脑缺血再灌注大鼠受损神经元TLR4、TLR2的蛋白表达。邢氏^[15]等用头针(电针)刺激MCAO模型大鼠,发现TLR4/MyD88在梗死侧脑组织中表达降低,减轻脑缺血再灌注损伤,实现对脑组织的保护作用。Dai W研究表明电针可以抑制氧化应激损伤大鼠海马JNK磷酸化水平,从而抑制海马神经细胞凋亡^[16]。本文研究发现,缺血再灌注损伤导致缺血周边区脑组织TLR4、MyD88表达升高,促进了JNK磷酸化,但是电针干预治疗后,TLR4、MyD88的表达降低,同时抑制JNK的磷酸化。

综上所述,电针曲池、足三里穴可能通过抑制TLR4/MyD88信号通路,降低缺血再灌注损伤后JNK的磷酸化,从而产生对脑损伤后炎症、凋亡的保护作用。

参考文献

- [1] Caso JR, Pradillo JM, Hurtado O, et al. Toll-like receptor 4 is involved in brain damage and inflammation after experimental stroke[J]. *Circulation*, 2007, 115(12): 1599—1608.
- [2] Trotta T, Porro C, Calvello R, et al. Biological role of Toll-like receptor-4 in the brain[J]. *J Neuroimmunol*, 2014, 268(1-2):1—12.
- [3] Hua F, Ma J, Ha T, et al. Activation of Toll-like receptor 4 signaling contributes to hippocampal neuronal death following global cerebral ischemia reperfusion[J]. *J Neuroimmunol*, 2007, 190(122):101—111.
- [4] Wang Y, Ge P, Zhu Y. TLR2 and TLR4 in the brain injury caused by cerebral ischemia and reperfusion[J]. *Mediators Inflamm*, 2013, 2013:124614.
- [5] Filipović D, Zlatković J, Pavićević I, et al. Chronic isolation stress compromises JNK/c-Jun signaling in rat brain[J]. *J Neural Transm*, 2012, 119(11):1275—1284.
- [6] Coffey ET. Nuclear and cytosolic JNK signalling in neurons[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2014, 15(5):285—299.
- [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] 李忠仁. 实验针灸学[M]. 北京:中国中医药出版社, 2007:255.
- [9] Deumens R, Jaken RJ, Marcus MA, et al. The CatWalk gait analysis in assessment of both dynamic and static gait changes after adult rat sciatic nerve resection[J]. *J Neurosci Methods*, 2007, 164(1):120—130.
- [10] Ahmad A, Crupi R, Campolo M, et al. Absence of TLR4 reduces neurovascular unit and secondary inflammatory process after traumatic brain injury in mice[J]. *PLoS One*, 2013, 8(3):e57208.
- [11] Wang L, Liu XH, Chen H, et al. Picroside II protects rat kidney against ischemia/reperfusion-induced oxidative stress and inflammation by the TLR4/NF- κ B pathway[J]. *Exp Ther Med*, 2015, 9(4):1253—1258.
- [12] Cao CX, Yang QW, Lv FL, et al. Reduced cerebral ischemia reperfusion injury in Toll-like receptor 4 deficient mice[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 353(2):509—514.
- [13] Wang Y, Zhen Y, Wu X, et al. Vitexin protects brain against ischemia/reperfusion injury via modulating mitogen-activated protein kinase and apoptosis signaling in mice[J]. *Phytomedicine*, 2015, 22(3):379—384.
- [14] 沈梅红, 李忠仁, 项晓人, 等. 电针对局灶性脑缺血再灌注大鼠受损神经元细胞外信号调节蛋白激酶的影响[J]. *针刺研究*, 2007, 32(60):368—372.
- [15] 邢甲进, 黄国付, 周利, 等. 头针对急性脑缺血再灌注大鼠P38促分裂原活化蛋白激酶表达的影响[J]. *湖北中医药大学学报*, 2011, 13(2):3—5.
- [16] Dai W, Li WD, Lu J. Effect of electroacupuncture on hippocampal apoptosis and JNK signal pathway in chronic stress depression rats[J]. *Zhen Ci Yan Jiu*, 2010, 35(5):330—334.