

电针对脑缺血再灌注模型大鼠脑组织 Beclin-1 蛋白及基因表达的影响*

冯晓东¹ 高玲莉² 李瑞青¹ 孙伟娟¹ 白俊敏¹

摘要

目的:观察电针(EA)对脑缺血再灌注认知障碍模型大鼠脑组织中 Beclin-1 的影响,探讨脑卒中后认知障碍的康复机制。

方法:健康SD雄性大鼠105只,随机分为3组:电针组、模型组和假手术组,每组35只;大鼠缺血再灌注模型采用改良线栓法栓塞左侧大脑中动脉制备。电针“神庭穴”、“百会穴”各30min,1次/日,从术后第1天至第10天动物处死。采用Morris水迷宫实验观测模型大鼠的学习、记忆能力;采用Western blot和荧光定量PCR法检测大鼠脑组织 Beclin-1 蛋白和基因的表达。

结果:造模后的第4到第8天,模型组大鼠的逃避潜伏期较假手术组长($P < 0.05$),EA组大鼠的逃避潜伏期较模型组缩短($P < 0.05$)。电针组大鼠海马及左侧大脑皮质中 Beclin-1 蛋白的电泳条带与假手术组相比,电针组条带灰度值较假手术组高($P < 0.05$),与模型组相比,电针组 Beclin-1 蛋白电泳条带灰度较模型组高($P < 0.05$)。模型组和电针组的 Beclin-1 基因表达的 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 与假手术组相比差异明显,均升高($P < 0.05$)。但电针组 Beclin-1 基因表达的 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 明显较模型组高($P < 0.05$)

结论:①电针神庭、百会可以促进脑缺血再灌注后认知障碍模型大鼠的认知功能的恢复;②电针可以提高缺血再灌注模型大鼠脑组织中的 Beclin-1 表达。Beclin-1 是一种自噬相关蛋白,直接执行自噬的过程,被作为自噬发生的标志物。对自噬网络系统的调控可能是电针能够改善脑卒中后认知障碍的生物学机制之一。

关键词 电针;认知障碍;神庭;百会;Beclin-1;脑缺血

中图分类号:R743.3, R245.9 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2016)-12-1307-004

Effects of electroacupuncture on expression of Beclin-1 in cerebral ischemia rats/FENG Xiaodong, GAO Lingli, LI Ruiqing, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2016, 31(12): 1307—1310

Abstract

Objective: To observe effects of electroacupuncture (EA) on expression of Beclin-1 in the brain of cognitive disorder model rats after cerebral ischemia reperfusion and to explore the mechanism of EA treatment for cognitive disorder.

Method: Total of 105 SD male rats were randomized into 3 groups:electroacupuncture treatment group, model group and sham operation group, 35 rats in each.The model group and electroacupuncture group were treated with MCAO to produce cerebral ischemia reperfusion cognitive impairment model rats. We applied EA at Shenting (DU24) and Baihui (GV20) 30min once daily, from the day after operation to sacrificed at day 10. The learning and memory ability was tested by Morris water maze and the changes of Beclin-1 in left cortex were examined by RT-PCR and Western blot.

Result: From 4th to 8th day after modeling, the latency of water maze in model group is longer than sham

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2016.12.003

*基金项目:河南省教育厅科学技术研究重点项目(13A360598);河南省中医临床学科领军人才培育计划资助项目(2100202)

1 河南中医学院第一附属医院,郑州,450000; 2 河南中医学院

作者简介:冯晓东,男,教授,主任医师;收稿日期:2015-06-02

operation group ($P<0.05$). Comparing with the model group, the latency of water maze decreased in electroacupuncture group ($P<0.05$). The grey scale value of Beclin-1 protein of electrophoresis bands obtained from left cerebral cortex and hippocampus of rats is higher in electroacupuncture group than in model group ($P<0.05$), in model group is higher than in sham operation group ($P<0.05$). Comparing with sham operation group, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ of Beclin-1 gene expression is obvious higher both in model group and EA group ($P<0.05$), EA group is higher than model group ($P<0.05$).

Conclusion: EA at "Shenting", "Baihui" could ameliorate the cognitive disorder of cerebral ischemia rats and enhance expression of Beclin-1 in brain of model rats. Beclin-1 is one of the autophagy-related protein executing the process of autophagy directly. It accepts many signals to regulate autophagy process, and has been used as autophagy marker to test autophagy. Up regulation of Beclin-1 may be one of the biological mechanism of EA treatment for cognitive impairment after cerebral stroke.

Author's address The First Affiliated Hospital of Henan College of TCM, Zhengzhou, 450008

Key word electroacupuncture; cognitive impairment; Shenting; Baihui; Beclin-1; cerebral ischemia

认知功能障碍是脑卒中患者常见的功能障碍之一,对患者ADL能力和质量产生了严重的影响,且不能主动参与或配合其他功能障碍康复治疗,影响了整体的康复进程。我国的传统疗法针刺在脑卒中后认知障碍的康复治疗临床经验丰富。近些年大量临床研究显示^[2],体针、头部围针加体针,醒脑开窍针刺法等多种方法均可以改善脑缺血再灌注后患者的认知功能,因此,我们假设电针对脑卒中后认知障碍的治疗效应可能与自噬调控系统有关,本实验研究通过建立大鼠脑缺血再灌注模型,观察电针神庭、百会对大鼠缺血侧皮质及海马区Beclin-1蛋白和基因表达的影响,为电针在脑卒中后认知障碍康复治疗的有效性提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物: SPF级健康雄性SD大鼠105只(250—300g),购自河南省动物实验中心并于河南中医学院第一附属医院中心实验室饲养。造模前大鼠自由饮水,进食3天。

1.1.2 主要试剂及仪器: RNAiso Reagent (TaKaRa公司), PrimeScript RT reagent Kit (TaKaRa公司), SYBR PrimeScript Ex Taq酶 (Takara), Beclin-1兔抗鼠抗体,生物素化羊抗兔抗体(武汉博士德生物工程有限公司),7300实时荧光定量PCR仪(ABI),xr-xm101 Morris水迷宫(上海鑫鑫有限公司)和高速离心机lumaccp100wx。

1.2 方法

1.2.1 动物分组: 采用随机数字表法,将105只清洁级SD大鼠分为电针组、模型组和假手术组,每组各35只。所有大鼠进行称重、编号,造模后,符合试验要求的模型大鼠按照随机数字表法分为电针组和模型组,最终剔除不符合成功模型标准的大鼠,电针组32只,模型组30只,假手术组35只。大鼠体重:假手术组(250.71 ± 0.40)g,模型组(256.67 ± 0.39)g,电针组(253.58 ± 0.36)g;鼠龄:电针组(2.13 ± 0.30)月,模型组(2.16 ± 0.26)月,假手术组(2.10 ± 0.41)月。

1.2.2 动物模型: 术前禁食12h,动物称重并按3ml/kg水合氯醛通过腹腔注射麻醉。使用线栓法进行大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型的制备:所有大鼠均选择左侧大脑中动脉区作为梗死部位。假手术组只分离动脉,不进行MCAO模型制备。术后,大鼠放置于26℃环境下苏醒。大鼠脑缺血再灌注2h后,采用Longa EZ^[3] 0—4分评分法评价造模是否成功,1—3分说明模型成功。

1.2.3 干预方法: ①电针组:督脉上选取“神庭”、“百会”,动物穴位定位参考《实验针灸学》^[4],使用G6805-2A电针仪,输出疏密波,针体轻轻震动(电压峰值调为6v,频率1—20Hz),EA治疗从术后2h开始,每天1次,每次30min,至术后第10天将动物处死;②模型组:术后模型大鼠室温饲养,正常进食,进水,无康复治疗干预;③假手术组:术后,大鼠回笼饲养,无康复治疗干预。

电针组和造模组大鼠均给予庆大霉素2U/只,连续注射3天,预防感染。术后、术中均保持室温

25℃左右。

1.2.4 Morris 水迷宫实验:大鼠水迷宫试验于电针干预后的第1天进行,在水迷宫四个象限中任一个象限中心设置平台,平台没于水面下2cm。动物模型连续训练5天,于每天上午、下午两个时段进行,两次训练间隔至少8h。找到平台的潜伏期为大鼠在90s内爬上平台,并且停留时间超过3s。在规定时间内未找到平台,人为将大鼠引导至平台,并熟悉10s,此大鼠的潜伏期则按90s计算,每次训练间隔为5min。每天的游泳结果:两个时段的潜伏期平均数。此试验主要是测试动物模型的学习能力。

1.2.5 Western blot 方法:脑组织200mg,取自大鼠海马及左侧大脑皮质部位,加裂解缓冲液2ml,4℃,15000r/min离心。取上清25μl测蛋白含量。采用BCA法测蛋白浓度,用凝胶加样缓冲液将各管蛋白浓度调为一致,取20ml样品煮沸5min,电泳(120V,50mA,1.5h)结束后将凝胶取出。遵循胶在负极,膜在正极的原则(80V,100mA,2h)进行转膜。将PVDF膜取出,用丽春红对固定于PVDF膜上的蛋白质进行预染,看电泳带是否清晰,证实蛋白质确实转移到膜上。5%脱脂奶粉封闭1h,TBS洗3次,每次5min。分别加入兔Beclin-1单克隆抗体孵育,室温孵育1h。TBST洗涤缓冲液洗3次,每次5min,加入碱性磷酸酶标识山羊抗兔IgG,4℃过夜,TBST洗涤缓冲液洗3次,每次5min。最后用TBS漂洗膜2次,每次5min,将滤膜放入配好的显色液,计算机扫描,分析处理。

1.2.6 荧光定量PCR法检测:取200mg海马及左侧皮质脑组织研磨后加入1ml Trizol震荡30s;加氯仿0.2ml,剧烈震荡30s,室温静置3min,4℃,12000r/min离心15min。取上清,加入0.5ml异丙醇,轻轻混匀,于室温静置10min后,4℃,12000r/min离心10min。加入75%乙醇1ml,震荡,4℃离心,7500g,5min;将样品晾干,加入20μl DEPC溶解。检测RNA浓度,根据RNA浓度,计算RNA体积。按照试剂盒以及相关引物说明书加入相应量的试剂进行逆

转录DNA反应,进行实时荧光定量PCR反应,根据CT值,计算相应 $\Delta\Delta CT$ 值,得出相应的mRNA相对含量,同样方法测其他相关mRNA水平。

Beclin-1引物序列为:

F:GATGGTGTCTCTCGCAGATTG

R:CTGTGCATTCCCTC ACAGAGTG

β -actin引物序列为:

F:GTCAGGTCATCACTATCGGCAAT

R:AGAGGTCTTTACGGATGTCAACGT

1.3 统计学分析

所得数据采用SPSS 19.0软件统计分析,用均值±标准差表示,组间计量资料采用重复测量数据方差分析。

2 结果

2.1 Morris 水迷宫实验检测结果

造模后的第4到第8天,模型组大鼠的逃避潜伏期较假手术组长($P < 0.05$),EA组大鼠的逃避潜伏期较模型组缩短($P < 0.05$),见表1。

以上实验结果表明,电针组在改善脑卒中后缺血再灌注大鼠的学习记忆能力明显优于模型组。

2.2 电针神庭百会对大鼠脑组织中Beclin-1蛋白表达的影响

电针组大鼠海马及左侧大脑皮质中Beclin-1蛋白的电泳条带与模型组相比,电针组条带灰度值较假手术组高($P < 0.05$),与模型组相比,电针组Beclin-1蛋白电泳条带灰度较模型组高($P < 0.05$),参照指标选用 β -actin,见图1,表2。

2.3 电针治疗脑缺血再灌注大鼠对Beclin-1的基因表达的影响

模型组和电针组的Beclin-1基因表达的 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 与假手术组相比差异明显,均升高($P < 0.05$)。但电针组Beclin-1基因表达的 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 明显较模型组高($P < 0.05$),见表2。

表1 各组大鼠逃避潜伏期比较 $(\bar{x}\pm s,s)$

组别	鼠数	第4天	第5天	第6天	第7天	第8天
电针组	20	69.20±15.51 ^{①②}	59.78±9.03 ^{①②}	51.88±10.40 ^{①②}	47.46±10.38 ^{①②}	35.41±9.26 ^{①②}
模型组	20	83.75±13.40 ^②	77.23±10.49 ^②	73.27±11.12 ^②	67.80±11.50 ^②	59.25±8.41 ^②
假手术组	20	42.55±9.83	59.78±9.03	30.44±9.69	26.82±8.10	18.19±4.23

①与模型组比较 $P < 0.05$;②与假手术组比较 $P < 0.05$

表2 各组大鼠模型脑组织 Beclin-1 的蛋白及基因表达比较

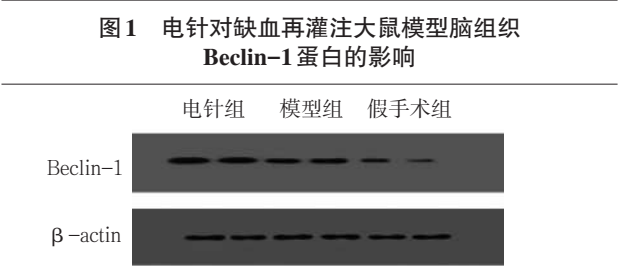
($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	灰度值	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
电针组	5	0.93±0.22 ^①	3.60±0.03 ^①
模型组	5	0.65±0.32 ^②	2.02±0.04 ^②
假手术组	5	0.22±0.23 ^③	1.01±0.04 ^③

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

3 讨论

认知障碍是脑卒中后常见的功能障碍之一,是康复医学领域研究的重点问题^[6]。目前乙酰胆碱酯酶抑制剂、钙通道阻滞剂、促神经细胞代谢剂等西药是临床上用于改善认知障碍的常用药,主要是对症治疗,缺乏广泛公认有效的治疗方案。我国的传统疗法针刺技术应用于认知障碍的康复治疗中,并在临床中取得较好的疗效,常用的针法主要有头针疗法、靳三针疗法和醒脑开窍疗法等。电针是近年来在针刺技术上发展而来的,并在临床中得到了广泛的应用,如:徐世芬等^[7]采用电针针刺百会、印堂穴位治疗抑郁症取得了良好的临床疗效。嘉士健等^[8]临床观察发现电针配合天麻素穴位注射,可以改善椎基底动脉供血不足的临床症状。李静等^[9]临床观察发现电针可以改善多囊卵巢综合征患者卵子的质量,提高受孕率。江玉娟等^[10]在临床上使用体表定位电头针结合 Rosenbek 八步训练法治疗脑卒中患者的言语失用取得了明显的疗效。头为“诸阳之会”,督脉总督一身之阳气,采用电针疗法,取头部督脉神庭、百会二穴,改善脑卒中患者的认知障碍,取得了良好的临床疗效。我国传统医学认为“脑为元神之府”,人的精神、智慧等从大脑生发出来,而神庭正是其最中心之处,故古人说“神者,智之渊也”。中国传统文化则认为,“丹田一线不绝,则生命不亡”,丹田在人体上是极其重要的部位,维系着机体的生命。传统中医理论认为神庭穴是上丹田,因此对神经系统起着调控作用,且古人认为神庭“神处其中则灵,灵则应,应则保身”,所以此穴位尤善治疗神智方面的疾病。百会穴,又名三阳五会、天满、巅上,百会穴与脑密切联系,是调节大脑功能的要穴。百会穴为各经脉气会聚之处,穴性属阳,又寓阴于阳,能连贯周身经穴,通达全身阴阳,调节机体的阴阳平衡。故神庭、百会两穴是改善认知障碍的要穴,团队前期



动物实验表明:电针神庭、百会对脑卒中后神经具有保护作用,减少动物的梗死面积,可以通过抑制 p38MAPK 信号通路,调控海马区组织 CREB、p-CREB、NGF、c-fos 蛋白表达水平及 CREB、NGF 及 c-fos 基因表达水平,改善认知障碍。

Beclin-1 是与自噬调控相关的重要基因,其表达强度反映自噬的活性,因此也成为监测和判断细胞自噬活性的重要指标。有研究发现^[11],Beclin-1 在胚胎发育、肿瘤形成过程及自噬的诱导中起着关键作用。自噬是真核细胞内高度保守的蛋白质、细胞器等降解过程,是一种依赖溶酶体性降解途径并通过降解受损的细胞器、毒性代谢产物以及异常蓄积的蛋白质,以维持细胞内环境的稳态^[12]。脑缺血再灌注后神经细胞缺血、缺氧,导致能量代谢障碍产生大量损害神经细胞的产物,如大量氧自由基、兴奋性氨基酸等,诱导了自噬的发生。在脑缺血再灌注的过程中同时伴随着神经细胞的损伤甚至死亡。Scherz-Shouval R 等^[13]认为在细胞缺血再灌注损伤时,活性氧可通过一系列途径上调细胞自噬,进而降解被氧化的各种功能蛋白,从而减小氧化应激对细胞的损伤。本研究结果显示,本模型组 Beclin-1 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 Beclin-1 表达;电针组上调 Beclin-1 蛋白水平高于模型组,提示电针通过提高自噬系统的表达水平而保护神经元免受缺血缺氧损伤。研究中 Beclin-1 基因表达情况与蛋白表达保持一致。由此本实验表明,电针神庭、百会可能通过诱导脑缺血再灌注认知障碍大鼠梗死灶皮质及海马部位自噬的表达,保护神经细胞,从而改善脑缺血再灌注认知障碍模型大鼠的学习和记忆能力。有研究发现^[14],自噬的激活参与局灶性脑缺血大鼠神经细胞的保护,给予自噬抑制

(下转第 1354 页)