

电针通过AKT/mTOR/P70S6K通路促进大鼠局灶脑缺血/再灌注大脑缺血皮质区血管再生的研究*

李琼莉¹ 蒋 锦¹ 马宏梅¹ 詹 剑¹ 张 莹¹ 罗 勇^{1,2}

摘要

目的:观察电针对大鼠局灶脑缺血/再灌注大脑缺血皮质区p-AKT、p-mTOR、p-P70S6K表达及CD34⁺微血管密度变化的影响,探讨电针促进大脑缺血皮质区血管再生的机制。

方法:140只雄性SD大鼠随机分为4组:假手术组、模型组、模型+电针组(电针组)、模型+电针+哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin,mTOR)特异性抑制剂雷帕霉素(Rapamycin,RAPA)组(抑制剂组);采用线栓法制备SD大鼠右侧局灶脑缺血/再灌注模型,缺血2h后将假手术组、模型组、电针组和抑制剂组各分为再灌注12h、24h、48h、72h、7d五个亚组;取大鼠“百会”穴(GV 20)及左侧“四关”穴(合谷LI 4/太冲LR 3)为电针刺激穴位,刺激时间30min/次,每日1次,最长持续7d;采用Western Blot检测各组大鼠缺血皮质区磷酸化的蛋白激酶B(p-protein kinase B,p-AKT)、磷酸化的哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(p-mammalian target of rapamycin,p-mTOR)、磷酸化的核糖体蛋白S6激酶(p-ribosomal protein S6 kinase,p-P70S6K)蛋白的表达水平;免疫组化法检测大鼠缺血皮质区VEGFR2蛋白、CD34⁺微血管血管的表达;Longa法检测神经功能。

结果:与假手术组相比,模型组p-AKT蛋白的表达在24h、48h和72h增加($P < 0.05$),模型组p-mTOR和p-P70S6K的蛋白表达在48h、72h和7d增加($P < 0.05$),与模型组相比较,电针组各个时间点p-AKT、p-mTOR和p-P70S6K蛋白的表达均显著增加($P < 0.01$),在RAPA的作用下,抑制剂组中各个时间点p-AKT、p-mTOR和p-P70S6K蛋白的表达明显低于电针组($P < 0.05$);与模型组相比,电针组再灌注72h和7d大鼠缺血皮质区VEGFR2蛋白、CD34⁺微血管的表达明显增多($P < 0.01$),与电针组相比,抑制剂组再灌注72h和7d大鼠缺血皮质区VEGFR2蛋白、CD34⁺血管减少($P < 0.05$);与模型组和抑制剂组相比,电针组再灌注72h、7d神经功能评分明显改善($P < 0.05$)。

结论:电针可提高大鼠局灶脑缺血/再灌注大脑缺血皮质区p-AKT、p-mTOR和p-P70S6K的表达,可能通过AKT/mTOR/P70S6K通路促进大鼠大脑缺血皮质区血管的再生和神经功能的恢复。

关键词 电针;局灶脑缺血/再灌注;AKT/mTOR/P70S6K;血管再生;雷帕霉素

中图分类号:R245,R493 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2018)-04-0397-08

Effects of electroacupuncture on angiogenesis via AKT/mTOR/P70S6K pathway in rats ischemic cerebral cortex after focal cerebral ischemia/reperfusion/LI Qiongli, JIANG Jin, MA Hongmei, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2018, 33(4): 397—404

Abstract

Objective: To explore the mechanism of electroacupuncture in promoting angiogenesis in ischemic cerebral cortex by investigating the effects of electroacupuncture on p-AKT, p-mTOR, p-P70S6K and CD34⁺ microvessels in ischemic cerebral cortex after focal cerebral ischemia/reperfusion.

Method: A total of 140 healthy male adult Sprague-Dawley (SD) rats were randomly assigned to shame opera-

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2018.04.005

*基金项目:教育部“高等学校博士学科点专项科研”联合资助课题(20095503110001);重庆市卫生局中医药科研重点项目(ZY20131027);重庆市卫生局中医药科研项目(渝中医2005-B-24)

1 重庆医科大学附属第一医院神经内科,重庆,400016; 2 通讯作者

作者简介:李琼莉,女,硕士研究生; 收稿日期:2017-07-25

tion group, model group, model +electroacupuncture group(electroacupuncture group)and electroacupuncture plus RAPA(A specific antagonist of mTOR)group(antagonist group). The model of focal cerebral ischemia/reperfusion was prepared by the thread embolism method, and all groups were divided into 12h, 24h, 48h, 72h and 7d sub-groups after reperfusion 2 hour. Electroacupuncture was given at "Baihui"(GV 20) and left "Siguan"(Hegu LI 4 / Taichong LR 3) acupoints for 30 minutes every turn, once per day. Western Blot was used to detect the protein expression of p-protein kinase B(p-AKT), p-mammalian target of rapamycin(p-mTOR), p-ribosomal protein S6 kinase(p-P70S6K) in rat cerebral ischemic cortex. The VEGFR2 protein and the CD34⁺ microvessels were measured by immunohistochemical method. Longa score was applied to evaluate neurobehavioral function.

Result: Compared with sham operation group, the protein expression of p-AKT in model group was increased at 24h, 48h and 72h, the protein expression of p-mTOR and p-P70S6K in model group were increased at 48h, 72h and 7d ($P < 0.05$). Compared with model group, the protein expression of p-AKT, p-mTOR and p-P70S6K were more increased significantly at each time point in electroacupuncture group ($P < 0.01$). Compared with electroacupuncture group, the protein expression of p-AKT, p-mTOR and p-P70S6K at each time point were decreased in antagonist group ($P < 0.05$). Compared with model group, the number of VEGFR2 protein and CD34⁺ microvessels were increased significantly at 72h and 7 day in electroacupuncture group ($P < 0.05$). Compared with electroacupuncture group, the VEGFR2 protein and the number CD34⁺ microvessels were reduced at 72h and 7 day in antagonist group ($P < 0.05$). Compared with model group and antagonist group, the neurobehavioral function was improved significantly at 72h and 7 day in I/RE group ($P < 0.05$).

Conclusion: Electroacupuncture could promote the expression of p-AKT, p-mTOR and p-P70S6K in rat cerebral ischemic cortex and may promote angiogenesis and neurobehavioral recovery via AKT/mTOR/P70S6k pathway.

Author's address The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, 400016

Key word electroacupuncture; focal cerebral ischemia/reperfusion; angiogenesis; AKT/mTOR/P70S6K; rapamycin

缺血性脑卒中是常见的重大疾病, 发病率高、致残率高、死亡率高。研究表明, 电针能抑制炎症反应, 促进脑缺血区血管和神经的再生, 促进神经功能恢复^[1-3], 已成为脑血管病的研究热点之一。AKT信号通路在血管再生中是一个重要的信号传递者, 能促进内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)和内皮细胞(endothelial cells, ECs)的迁移、分化、增殖并伴随着eNOS的磷酸化^[4-5]。体外研究表明, mTOR/P70S6K通路作为AKT活化的下游靶点, 在血管再生中可调节EPCs的多种生物学功能^[6], 是AKT信号转导通路介导骨髓EPCs动员、迁移至外周血的下游关键调控因素^[7]。本团队既往研究发现, 电针可通过提高AKT的磷酸化水平, 促进大鼠缺血皮质区血管的再生^[8], 其机制是否与AKT的下游通路mTOR/P70S6K有关尚无相关报道。故本研究通过观察在电针及mTOR的特异性抑制剂雷帕霉素干预下大鼠局灶脑缺血/再灌注大鼠缺血皮质区p-AKT、p-mTOR、p-P70S6K和VEGFR2蛋白表达的变化情况, CD34⁺微血管的再生和大鼠神经功能恢复的情况, 以进一步探讨和阐明电针对大鼠

局灶脑缺血/再灌注大鼠缺血皮质区血管再生的影响及其机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

SPF级成年雄性SD大鼠140只, 体重250—300g, 由重庆医科大学动物中心[SCXK(渝)2012-0002]提供。大鼠随机分为假手术组、模型组、模型+电针组(电针组)、模型+电针+mTOR特异性抑制剂RAPA组(抑制剂组)。根据局灶脑缺血2h后再灌注的时间, 将假手术组、模型组、电针组、抑制剂组各分为再灌注12h、24h、48h、72h、7d五个亚组。12h、24h、48h每个亚组5只, 72h、7d每个亚组10只。五个亚组均进行Western Blot检测信号通路相关蛋白的表达, 此外, 根据信号通路相关蛋白表达出现的高峰时间筛选72h和7d两个亚组进行免疫组织化学染色。

1.2 主要试剂及材料

AKT、p-AKT(Ser473)兔多克隆抗体(Cell Signaling 公司), mTOR兔多克隆抗体(Proteintech 公

司),p-mTOR(Ser2448)鼠单克隆抗体(Santa Cruz Biotechnology 公司),P70S6K兔多克隆抗体(Proteintech 公司),p-P70S6K(Thr389)兔多克隆抗体(Cell Signaling 公司),VEGFR2兔多克隆抗体(Cell Signaling 公司),CD34鼠单克隆抗体(Santa Cruz Biotechnology 公司), β -actin兔多克隆抗体(Proteintech 公司)、雷帕霉素(大连美仑),山羊抗兔或抗小鼠的HRP(Abcclonal),免疫组化试剂盒及DAB显色试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司),G6850型电针治疗仪(北京精工仪器厂)。

1.3 动物模型的制备

采用改良线栓法并参照罗勇等^[9]介绍的方法经验规范制备SD大鼠右侧大脑中动脉缺血/再灌注模型(middle cerebral artery occlusion/reperfusion, MCAO/R)。整个实验过程中大鼠置于37℃恒温台。实验中尽可能避免造模外因素对实验结果的影响。待大鼠清醒后,采用Longa等^[10]方法对大鼠进行双盲评分:0分:无神经功能缺失症状;1分:轻度局灶神经功能缺失(不能完全伸展左侧前肢);2分:中度局灶神经功能缺失(向左侧转圈);3分:重度神经功能缺失(向左侧倾斜);4分:不能自发行走,意识水平降低。评分为2—3分者视为造模成功,入选实验。凡因各种原因导致各实验组动物数不足预定数量者,均通过随机抽样原则补齐所需的实验动物数量。

1.4 电针刺激及RAPA干预法

参照中国针灸学会实验针灸委员会制定的实验动物穴位图谱及华兴邦^[11]的《大鼠穴位图谱的研制》,选取大鼠“百会”穴(GV 20)及左侧“四关”穴(合谷LI 4/太冲LR 3)为电针穴位,利用华佗牌不锈钢银针(直径为0.38mm、长度为1寸),取“百会”穴斜刺入头皮1mm,直刺“合谷”穴及“太冲”穴2mm,通电刺激。连接G6850型电针治疗仪,刺激参数采用频率为2/20Hz,波型为疏密波,强度以大鼠肢体轻微震颤为度。电针组、抑制剂组首次电针刺激于再灌注后2h进行,刺激时间30min/次,每日治疗1次,最长7d^[3]。抑制剂组大鼠再灌注后1h腹腔注射RAPA,每次0.3mg/kg^[12],每日1次,最长7d, RAPAs的终浓度为0.1mg/ml [1mg的RAPAs溶于10ml的二甲基亚砜(DMSO)]。

1.5 Western Blot检测

在再灌注相应的时间点深麻醉大鼠,断头取脑取新鲜的缺血区大脑皮质100mg,按凯基磷酸化蛋白提取试剂盒说明书提取磷酸化蛋白。BCA法测蛋白浓度,用4×上样缓冲液将蛋白稀释成相同浓度,100℃沸水中煮15min,分装后-80℃保存。以60 μ g蛋白上样进行SDS-PAGE凝胶电泳(分离胶8%,浓缩胶5%),恒压(浓缩胶60V,分离胶80V);再将蛋白转至PVDF膜上(恒流,300mA);5%脱脂奶粉室温封闭2h;孵育一抗(AKT、p-AKT、mTOR、p-mTOR、P70S6K、p-P70S6K和 β -actin抗体稀释比例分别为1:1000、1:500、1:1000、1:500、1:1000、1:1000和1:3000),4℃过夜;次日,TBST洗膜(15min/次×3),孵育二抗(稀释比为1:3000),37℃,1h;TBST洗膜(10min/次×3);用cECL发光试剂盒在FUSION-FX7 Spectra凝胶成像图像分析系统显影,用Fusion软件分析结果,以 β -actin为内参进行Western Blot检测结果分析。

1.6 免疫组织化学染色

在再灌注相应的时间点深麻醉大鼠,用4℃的生理盐水和4%的多聚甲醛对大鼠进行心脏灌注。快速取脑,在4%的多聚甲醛中固定7d后修整并进行石蜡包埋,从额极后5mm处开始,从前至后连续切出5 μ m厚的石蜡切片。将切片脱蜡,修复液修复37℃、2h,自然冷却至室温,3% H₂O₂室温孵育25min,山羊血清37℃封闭30min,孵育一抗(VEGFR2和CD34一抗稀释比例分别为1:100、1:50),同时滴加PBS代替一抗作阴性对照,4℃过夜;次日,37℃复温1.5h,孵育二抗37℃、30min,加链霉素标记卵蛋白,室温孵育20min,DAB显色,苏木素染核、脱色、返蓝、酒精脱水、透明、封片。结果判定:采用Image-Pro Plus 16.0图像测量分析软件测定VEGFR2蛋白表达的平均光密度(mean optical density, MOD)。大脑缺血皮质区微血管密度(microvessel density, MVD)结果判定:根据Weidner等^[13]改良血管计数法,在200倍视野下观察,CD34表达以血管内皮细胞内有浅棕色至深棕色颗粒沉着为标准,计数CD34微血管密度(血管直径<20 μ m或单个细胞阳性但和周围细胞分界清楚视为一个新生血管),微血管数(个/HP)为每个视野下的血管数。

1.7 统计学分析

应用SPSS21.0统计软件处理数据,数据均用均数 $\pm$ 标准差表示,采用两因素方差分析,组间比较用LSD-*t*检验。检验水准 $\alpha=0.05$, $P<0.05$ 具有显著性意义。

2 结果

2.1 电针对AKT/mTOR/P70S6K信号通路相关蛋白表达的影响

在假手术组各个时间点,大脑皮质区有少量的p-AKT、p-mTOR和p-P70S6K表达。与假手术组相比,模型组中p-AKT的表达在12h无明显改变,在24h、48h、72h表达增加($P<0.05$),在48h达到高峰;与模型组相比,电针组中各时间点p-AKT的表达从12h开始明显增加并持续到7d仍维持在较高的水平($P<0.01$);与电针组相比,抑制剂组中各时间点p-AKT的表达明显降低($P<0.05$)(见图1,表1)。提示电针可增加大鼠缺血皮质区p-AKT的表达。与假手术组相比,模型组中p-mTOR和p-P70S6K的表达在48h、72h和7d增加($P<0.05$),在72h达到高峰;与模型组相比,电针组中各时间点p-mTOR和p-P70S6K的表达明显增加($P<0.01$);与电针组相比较,抑制剂组中各时间点p-mTOR和p-P70S6K的表达降低($P<0.05$)(图2和表2,图3和表3)。提示电针可增加大鼠缺血皮质区p-mTOR和p-P70S6K的

表达。所有实验组AKT、mTOR和P70S6K表达水平基本相等,组间无显著差异。

2.2 电针对大鼠缺血皮质区VEGFR2蛋白表达的影响

与假手术组相比,模型组72h和7d VEGFR2蛋白表达增加($P<0.05$),与模型组相比电针组72h和7d VEGFR2蛋白表达明显增加($P<0.01$);使用AKT/mTOR/P70S6K通路抑制剂RAPA后,抑制剂组VEGFR2蛋白表达与电针组相比明显减少($P<0.05$)。提示电针可能通过AKT/mTOR/P70S6K通路上调大鼠缺血皮质区VEGFR2蛋白表达(图4和表4)。

2.3 电针对CD34⁺微血管数目的影响

与假手术组相比,模型组7d CD34⁺微血管数目密度增加($P<0.05$);与模型组相比,电针组72h和7d CD34⁺微血管数目密度明显增加($P<0.01$);抑

图1 各组不同时间点大鼠局灶缺血/再灌注大鼠缺血皮质区p-AKT蛋白的表达

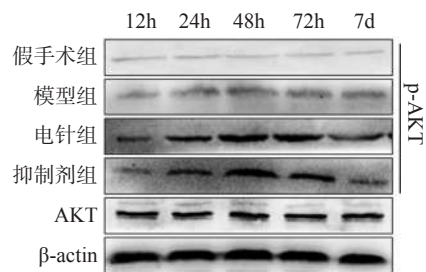


表1 各组不同时间点大鼠局灶缺血/再灌注大鼠缺血皮质区p-AKT蛋白表达相对含量比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	12h	24h	48h	72h	7d
假手术组	25	0.126 $\pm$ 0.022	0.126 $\pm$ 0.018	0.125 $\pm$ 0.027	0.123 $\pm$ 0.035	0.131 $\pm$ 0.031
模型组	25	0.166 $\pm$ 0.018	0.319 $\pm$ 0.048 ^①	0.383 $\pm$ 0.018 ^①	0.319 $\pm$ 0.045 ^①	0.157 $\pm$ 0.054
电针组	25	0.377 $\pm$ 0.107 ^②	0.780 $\pm$ 0.097 ^②	1.350 $\pm$ 0.102 ^②	1.019 $\pm$ 0.073 ^②	0.776 $\pm$ 0.182 ^②
抑制剂组	25	0.186 $\pm$ 0.069 ^③	0.353 $\pm$ 0.086 ^③	0.506 $\pm$ 0.102 ^③	0.422 $\pm$ 0.086 ^③	0.311 $\pm$ 0.046 ^③

注:与同时点假手术组相比较:① $P<0.05$;与同时时间点的模型组相比较:② $P<0.01$;与同时时间点的电针组相比较:③ $P<0.05$

图2 各组不同时间点大鼠局灶缺血/再灌注大鼠缺血皮质区p-mTOR蛋白的表达

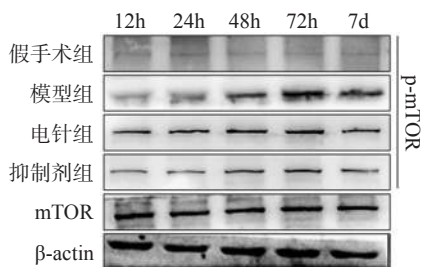


图3 各组不同时间点大鼠局灶缺血/再灌注大鼠缺血皮质区p-P70S6K蛋白的表达

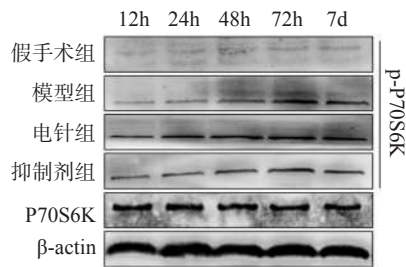


表2 各组不同时间点大鼠局灶脑缺血/再灌注大脑缺血皮质区 p-mTOR 蛋白表达相对含量比较 (x̄±s)

组别	鼠数	12h	24h	48h	72h	7d
假手术组	25	0.053±0.012	0.057±0.019	0.057±0.019	0.057±0.023	0.057±0.016
模型组	25	0.054±0.008	0.093±0.030	0.160±0.023 ^①	0.183±0.044 ^①	0.145±0.019 ^①
电针组	25	0.380±0.090 ^②	0.431±0.073 ^②	0.558±0.051 ^②	0.624±0.073 ^②	0.366±0.103 ^②
抑制剂组	25	0.127±0.063 ^③	0.189±0.036 ^③	0.302±0.057 ^③	0.333±0.021 ^③	0.253±0.069 ^③

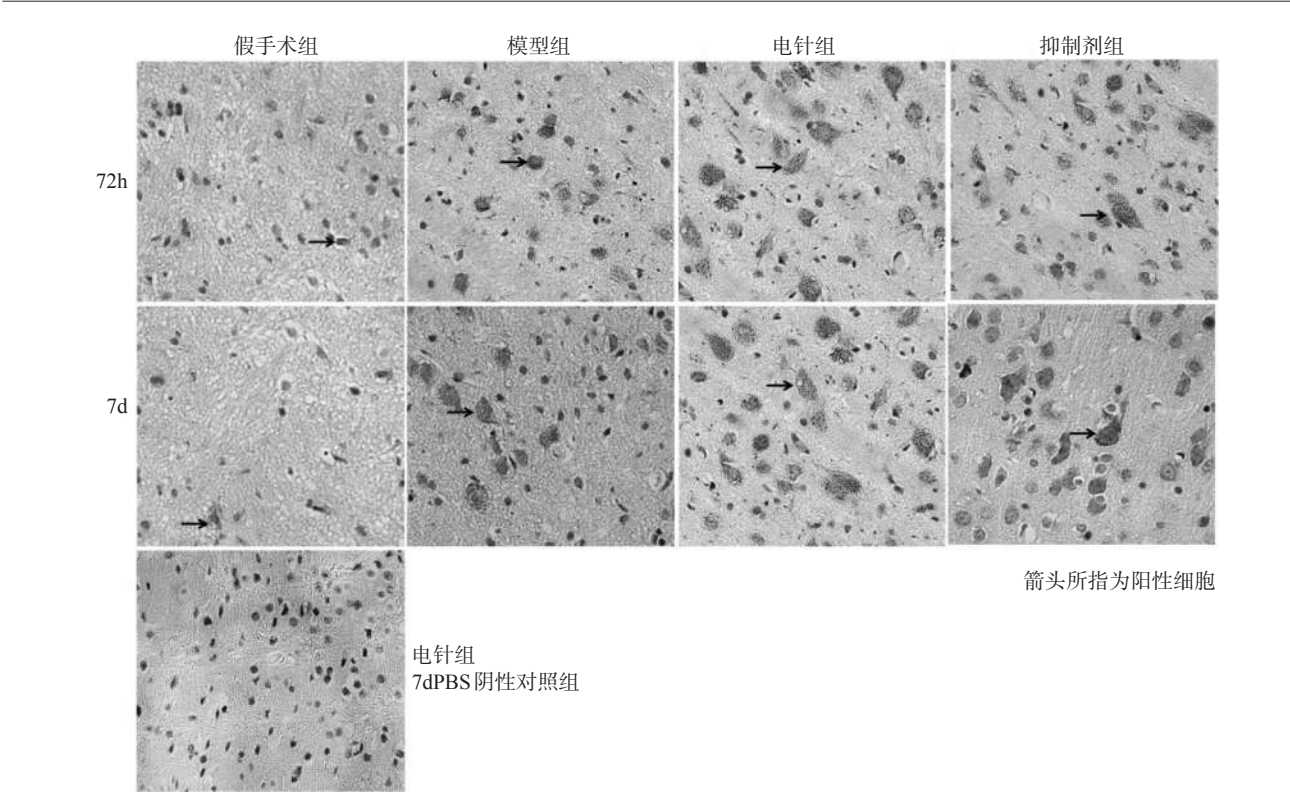
注:与同时时间点假手术组相比较:①P<0.05;与同时时间点的模型组相比较:②P<0.01;与同时时间点的电针组相比较:③P<0.05

表3 各组不同时间点大鼠局灶脑缺血/再灌注大脑缺血皮质区 p-P70S6K 蛋白表达相对含量比较 (x̄±s)

组别	鼠数	12h	24h	48h	72h	7d
假手术组	25	0.073±0.039	0.076±0.045	0.074±0.023	0.075±0.031	0.782±0.029
模型组	25	0.089±0.028	0.168±0.046	0.332±0.123 ^①	0.476±0.093 ^①	0.426±0.094 ^①
电针组	25	0.634±0.083 ^②	0.732±0.111 ^②	0.969±0.103 ^②	1.212±0.179 ^②	0.851±0.136 ^②
抑制剂组	25	0.278±0.068 ^③	0.354±0.063 ^③	0.522±0.031 ^③	0.653±0.054 ^③	0.437±0.062 ^③

注:与同时时间点假手术组相比较:①P<0.05;与同时时间点的模型组相比较:②P<0.01;与同时时间点的电针组相比较:③P<0.05

图4 各组不同时间点大鼠局灶脑缺血/再灌注大脑皮质区 VEGFR2 蛋白表达 (免疫组化染色,×400)



制剂 RAPA 后,抑制剂组与电针组相比 CD34⁺微血管数目的密度减少(P<0.05)。提示电针可能通过 AKT/mTOR/P70S6K 通路增加大脑缺血皮质区 CD34⁺微血管的数目(见图5,表5)。

2.4 神经功能学评分

与模型组相比,电针组再灌注 72h 和 7d 神经功能评分明显改善(P<0.01),与抑制剂组比较,电针

组神经功能恢复较好(P<0.05)(表6)。提示电针可能通过 AKT/mTOR/P70S6K 通路促进大鼠局灶脑缺血/再灌注后神经功能的恢复。

3 讨论

目前,缺血性脑卒中是严重危害人类健康的常见重大疾病。在脑缺血后的损伤修复过程中,血管

图5 各组不同时间点大鼠局灶脑缺血/再灌注大脑缺血皮质区CD34⁺微血管表达 (免疫组化染色,×200)

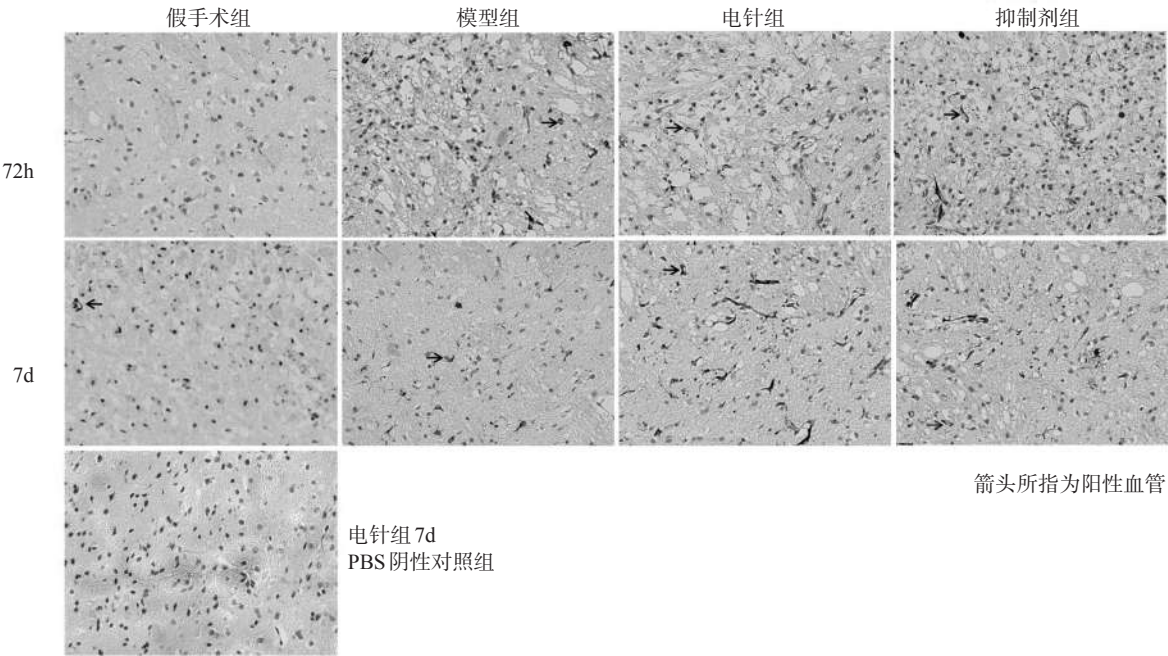


表4 各组不同时间点大鼠局灶脑缺血/再灌注大脑皮质区VEGFR2蛋白表达平均光密度值比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	72h	7d
假手术组	10	0.138±0.013	0.144±0.011
模型组	10	0.156±0.015	0.190±0.009 ^①
电针组	10	0.266±0.011 ^②	0.298±0.026 ^②
抑制剂组	10	0.208±0.022 ^③	0.224±0.017 ^③

注:与同时时间点假手术组相比较:① $P<0.05$;与同时时间点的模型组相比较:② $P<0.01$;与同时时间点的电针组相比较:③ $P<0.05$

表5 各组不同时间点大鼠局灶脑缺血/再灌注大脑缺血皮质区CD34⁺微血管密度变化比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	72h	7d
假手术组	10	1.200±0.447	1.400±0.547
模型组	10	2.600±0.548	7.800±1.303 ^①
电针组	10	19.250±1.949 ^②	28.400±1.140 ^②
抑制剂组	10	7.800±0.837 ^③	14.60±1.245 ^③

与同时时间点假手术组相比较:① $P<0.05$;与同时时间点的模型组相比较:② $P<0.01$;与同时时间点的电针组相比较:③ $P<0.05$

表6 各组不同时间点神经功能学评分 ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	72h	7d
假手术组	20	0±0	0±0
模型组	20	2.50±1.08	1.90±0.99
电针组	20	1.30±1.16 ^①	0.90±0.73 ^①
抑制剂组	20	2.40±1.17 ^②	1.85±0.97 ^②

注:与同时时间点的模型组相比较:① $P<0.05$;与同时时间点的电针组相比较:② $P<0.05$

再生是一个十分重要的生理和病理过程。生理情况下,EPCs主要存在于骨髓中,外周血中EPCs的数量相当有限,在机体发生缺血性疾病的情况下,EPCs可在多种细胞因子的介导下(eNOS、MMP-2和SDF-1 α 等),从骨髓动员、增殖、迁移和归巢至缺血区域促进血管的再生^[14-15]。EPCs的表面标记成动态性的变化,主要有AC133、CD34和VEGFR2,早期的EPCs主要表达AC133,VEGFR2主要出现在晚期的EPCs,CD34在早期和晚期的EPCs都有表达^[16]。其中CD34是一种标记血管特异性较高的抗原,常用来标记血管。Tang等^[17]研究发现,激活AKT/mTOR/P70S6K信号通路可促进EPCs的增殖和管腔的形成,促进血管的再生和保护细胞免受氧化应激的损害,其机制可能是通过激活mTOR/P70S6K信号通路后使其下游的MMP-2的基因和蛋白表达发生改变,从而引起细胞外基质降解,促进血管的再生^[18]。另有研究发现,抑制AKT/mTOR/P70S6K信号通路,可抑制肿瘤组织血管的再生、缩小肿瘤体积、抑制肿瘤的生长速度^[19]。

本研究发现,局灶脑缺血/再灌注24h后p-AKT的表达才开始增加,48h达到高峰,72h开始下降,同

样在局灶脑缺血/再灌注 48h 后 p-mTOR、p-P70S6K 的表达开始升高,72h 达到最高峰,7d 开始降低。提示 AKT 可能在缺血的早、中期发挥作用,mTOR 和 P70S6K 可能在缺血的中、晚期发挥作用,三者在学习上交叉重叠、相互联系。p-AKT 与 p-mTOR 和 p-P70S6K 表达的时间差异可能是 mTOR/P70S6K 作为 AKT 的下游通路,在 AKT 激活后产生级联反应进一步激活 mTOR 和 P70S6K,从而引起 EPCs 增殖和迁移,促进血管再生^[20]。根据信号通路相关蛋白表达的高峰时期,本实验筛选 72h 和 7d 进一步检测脑血管再生和神经功能恢复的情况。本实验研究发现,模型组中只有少量的新生血管且神经功能较差,虽然观察到大鼠局灶脑缺血/再灌注后有少量新生血管出现,但当疾病发生的早期仅靠内源性活化的 AKT/mTOR/P70S6K 信号通路尚不足以及时有效的促进血管再生。

依据我国传统医学理论,脑卒中多以肝肾亏虚、肝风妄动、痰浊内生、气机失调造成的气血逆乱为主要病机。“百会”穴位于巅顶部,乃“诸阳之会”,能醒脑开窍和通督定志,是调节大脑功能的要穴,对于调节机体阴阳平衡起着重要的作用,是治疗脑卒中的常用穴和经典穴。“四关”穴为两侧“合谷”穴和“太冲”穴的总称,两穴配合“一气一血”、“一阳一阴”、“一上一下”互相调节互相影响。“百会”穴与“四关”穴配伍能够醒脑开窍、舒经活络、平肝熄风、祛瘀化痰,符合干预脑卒中常见证型的选穴原则,同时是治疗脑卒中最常选取的基础穴。电针作为针刺治疗的主要形式之一,相比传统的针灸,其更加量化规范、简便安全、易于推广、更适合于临床治疗。本团队既往的研究发现,电针刺激“百会”穴和病侧“四关”穴可提高 p-AKT 的表达,加强 PI3K/AKT 信号通路的激活,促进 EPCs 归巢至缺血区组织,从而促进缺血区血管的再生^[8]。结合团队的研究现状,本研究进一步深入探讨 AKT 的下游靶点 mTOR/P70S6K 在电针的干预下对大鼠局灶脑缺血/再灌注后大脑缺血皮质区血管再生的影响。本研究结果显示,在电针组中,p-AKT 的表达在再灌注 12h 开始增加,48h 达到高峰,持续到 7d,提示电针治疗后可使 p-AKT 的表达升高更为明显和持久,p-mTOR 和 p-P70S6K 的表达在再灌注后 12h 开始明显增加,72h 达到高峰,

持续到 7d,提示电针治疗后可使 p-mTOR 和 p-P70S6K 的表达更显著、更早。在 I/RE 组中新生血管和 VEGFR2 明显增加,神经功能恢复较好,提示电针可能通过 AKT/mTOR/P70S6K 信号通路促进血管的再生,改善神经功能,发挥保护神经的作用。Wang 等^[21]研究发现,在短暂的大脑中动脉闭塞中电针可通过加强 AKT 的活化减少神经元的凋亡。Wu 等^[22]研究发现,在大脑缺血中电针可通过 mTOR 信号通路的介导调节自噬的表达发挥脑保护作用。本研究也发现在缺血性脑病中电针可通过调节 AKT/mTOR/P70S6K 信号通路发挥脑保护作用,但本实验从新的观点血管再生的角度阐述了在缺血性脑病中电针可通过激活 AKT/mTOR/P70S6K 信号通路促进脑缺血皮质区血管再生从而发挥脑保护作用。Butzal 等^[23]研究证实,RAPA 可通过 AKT/mTOR/P70S6K 信号通路抑制 EPCs 增殖和迁移从而抑制血管的再生。为进一步证实电针是通过 AKT/mTOR/P70S6K 信号通路介导 EPCs 促进血管再生,我们采用 mTOR 的特异性抑制剂 RAPA 进行验证。结果显示,给予 RAPA 后,电针提高 p-AKT、p-mTOR 和 p-P70S6K 和 VEGFR2 的表达以及促进血管再生和改善神经功能的作用明显降低。

总之,大鼠局灶脑缺血/再灌注后,电针可通过上调 p-AKT 和其下游的 p-mTOR 和 p-P70S6K 的表达,改善神经功能以及促进大脑皮质缺血区血管再生;其机制可能是电针通过激活 AKT/mTOR/P70S6K 信号通路介导骨髓 EPCs 动员归巢至缺血区参与血管再生从而促进神经功能的恢复,其深入的机制需要我们进一步研究。

参考文献

- [1] Zhan J, Qin W, Zhang Y, et al. Upregulation of neuronal zinc finger protein A20 expression is required for electroacupuncture to attenuate the cerebral inflammatory injury mediated by the nuclear factor- κ B signaling pathway in cerebral ischemia/reperfusion rats[J]. *J Neuroinflammation*, 2016, 13 (1):258—276.
- [2] Du Y, Shi L, Li J, et al. Angiogenesis and improved cerebral blood flow in the ischemic boundary area were detected after electroacupuncture treatment to rats with ischemic stroke[J]. *Neurol Res*, 2011, 33(1):101—107.
- [3] Lu T, Luo Y, Sun H, et al. Electroacupuncture improves be-

- havioral recovery and increases SCF/c-kit expression in a rat model of focal cerebral ischemia/reperfusion[J]. *Neurol Sci*, 2013, 34(4):487—495.
- [4] Zheng H, Fu G, Dai T, et al. Migration of endothelial progenitor cells mediated by stromal cell- derived factor-1 α /CXCR4 via PI3K/Akt/eNOS signal transduction pathway[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2007, 50(3):274—280.
- [5] Everaert BR, Craenenbroeck EM, Hoymans VY, et al. Current perspective of pathophysiological and interventional effects on endothelial progenitor biology Focus on PI3K/AKT/eNOS pathway[J]. *Int J Cardiol*, 2010, 144(3):350—366.
- [6] Li W, Petrimpol M, Molle KD, et al. Hypoxia-Induced Endothelial Proliferation Requires Both mTORC1 and mTORC2 [J]. *Circ Res*, 2007, 100(1):79.
- [7] Eguchi M, Masuda H, Kwon S, et al. Lesion-targeted thrombopoietin potentiates vasculogenesis by enhancing motility and enlivenment of transplanted endothelial progenitor cells via activation of AKT/mTOR/p70S6kinase signaling pathway [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2008, 45(5):661—669.
- [8] 张珊珊, 罗勇, 武磊. PI3K/AKT通路在电针促进局灶脑缺血再灌注大鼠脑内血再生中的作用[J]. *第三军医大学学报*, 2010, 32(23):2488—2491.
- [9] 罗勇, 董为伟. Wistar大鼠插线法局灶性脑缺血/再灌注模型的实验研究[J]. *重庆医科大学学报*, 2002, 27(1):1—4.
- [10] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. *Stroke*, 1989, 20(1):84—91.
- [11] 华兴邦, 周浩良. 大鼠穴位图谱的研制[J]. *实验动物与动物实验*, 1991, (1):1—5.
- [12] 刘海涛. 雷帕霉素抑制内皮细胞增殖和迁移: PI3K/Akt/mTOR/p70S6K信号通路的作用[D]. 第四军医大学, 2010.
- [13] Weidner N, Semple JP, Welch WR, et al. Tumor angiogenesis and metastasis- correlation in invasive breast carcinoma [J]. *N Engl J Med*, 1991, 324(1):1—8.
- [14] Khurana R, Simons M. Endothelial progenitor cells: precursors for angiogenesis[J]. *Semin Thorac Cardiovasc Surg*, 2003, 15(3):250—258.
- [15] Xie C, Gao X, Luo Y, et al. Electroacupuncture modulates stromal cell-derived factor-1 α expression and mobilization of bone marrow endothelial progenitor cells in focal cerebral ischemia/reperfusion model rats[J]. *Brain Res*, 2016, 1648(Pt A):119—126.
- [16] Udi J, Wider D, Kleber M, et al. Early and mature endothelial progenitors and VEGFR2⁺ cells in multiple myeloma: association with disease characteristics and variation in different cell compartments[J]. *Leuk Res*, 2011, 35(9):1265—1268.
- [17] Tang Y, Vater C, Jacobi A, et al. Salidroside exerts angiogenic and cytoprotective effects on human bone marrow-derived endothelial progenitor cells via Akt/mTOR/p70S6K and MAPK signaling pathways[J]. *Br J Pharmacol*, 2014, 171(9):2440—2456.
- [18] Li WD, Hu N, Lei FR, et al. Autophagy inhibits endothelial progenitor cells migration via the regulation of MMP2, MMP9 and uPA under normoxia condition[J]. *Biochem & Biophys Res Commun*, 2015, 466(3):376—380.
- [19] Pratheeshkumar P, Budhraj A, Son YO, et al. Quercetin inhibits angiogenesis mediated human prostate tumor growth by targeting VEGFR2 regulated AKT/mTOR/P70S6K signaling pathways[J]. *PLoS One*, 2012, 7(10):e47516.
- [20] Cheng HX, Xu XD, Zhang RQ, et al. Effects of constant magnetic fields on proliferation and migration of endothelial progenitor cells under rapamycin intervention: experiment with rats[J]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2008, 88(38):2719—2721.
- [21] Wang SJ, Omori N, Li F, et al. Potentiation of Akt and suppression of caspase-9 activations by electroacupuncture after transient middle cerebral artery occlusion in rats[J]. *Neurosci Lett*, 2002, 331(2):115—118.
- [22] Wu ZQ, Cui SY, Zhu L, et al. Study on the mechanism of mTOR- mediated autophagy during electroacupuncture pretreatment against cerebral ischemic injury[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2016, 2016(5):1—8.
- [23] Butzal M, Loges S, Schweizer M, et al. Rapamycin inhibits proliferation and differentiation of human endothelial progenitor cells in vitro[J]. *Exp Cell Res*, 2004, 300(1):65—71.