

·基础研究·

电针对脑梗死大鼠海马齿状回Notch1调控作用的研究*

赵俊红^{1,4} 林阳阳² 何晓阔³ 燕铁斌^{4,5} 潘翠环¹ 庄志强⁴ 金冬梅⁴

摘要

目的:观察电针对脑梗死大鼠海马齿状回Notch1的调控作用。

方法:采用线栓法成功制备雄性SD大鼠右侧大脑中动脉闭塞(MCAO)模型大鼠,随机分为电针组、模型组和假手术组。在造模成功后第3天开始电针大鼠“百会”、“人中”穴15分钟/次,直至各个取材时间点。对各组在电针治疗各时间点行Morris水迷宫测试,采用免疫印迹法检测大鼠梗死侧海马齿状回区Notch1蛋白表达量。

结果:与相同时间点模型组比较,电针组的Morris水迷宫测试差异有显著性意义($P < 0.05$)。在梗死侧海马齿状回区域,电针组在治疗第3天和第7天时Notch1蛋白表达量较模型组相同时间点增高,差异具有显著性意义($P < 0.05$),且第7天时达到高峰,在第14天时仍高于模型组,但差异无显著性意义($P > 0.05$)。

结论:电针能上调局灶性脑梗死大鼠梗死侧海马齿状回区Notch1蛋白表达量,改善脑梗死大鼠的认知功能,从而减轻脑梗死对神经元的损伤,达到治疗脑梗死功能障碍的疗效。

关键词 电针;脑梗死;Notch1;Morris水迷宫

中图分类号:R743.3, R245 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2018)-05-0520-05

A study on the regulation effect of electroacupuncture on Notch1 at dentate gyrus in rats with acute cerebral infarction/ZHAO Junhong, LIN Yangyang, HE Xiaokuo, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2018, 33(5): 520—524

Abstract

Objective: To investigate the regulation effect of electroacupuncture (EA) on Notch1 at dentate gyrus in rats with acute cerebral infarction.

Method: Intraluminal middle cerebral artery occlusion (MCAO) was performed to establish the cerebral ischemia model. The male adult SD rats were randomly divided into the electroacupuncture group (EA group), the ischemia model group (MCAO group), and the sham operation group (sham group). EA was applied at Baihui and Renzhong after operation, 15min once a day from operation to the day sacrificed. Each group rats were assessed the Morris water maze test before and after intervention. The expression of Notch1 protein in hippocampus was detected by Western Blotting.

Result: Compared with the model group, EA at Baihui and Renzhong acupoints alleviated cognitive impairment significantly and the expression of Notch1 protein in hippocampal of EA group was significantly increased.

Conclusion: EA at Baihui and Renzhong acupoints can improve cognition and upregulate the expression of Notch1 of protein of hippocampal, so as to reduce the damage of cerebral ischemia on neurons, and provide

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2018.05.005

*基金项目:国家自然科学基金面上项目(81472157);广州医科大学校级课题(2013A07)

1 广州医科大学附属第二医院,广州,510260; 2 中山大学附属第六医院; 3 湖北十堰市太和医院; 4 中山大学孙逸仙纪念医院; 5 通讯作者

作者简介:赵俊红,女,医师; 收稿日期:2016-10-28

the therapeutic effect on cerebral ischemia.

Author's address The Second Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou, 510260

Key word electroacupuncture; cerebral ischemia; Notch1; the morris water maze test

脑卒中是人类目前致死率和致残率最高的疾病之一^[1],且极易复发,大约70%—80%的存活者存在不同程度的功能障碍,给家庭和社会带来沉重的负担。其中缺血性脑卒中的发病率约占全部脑卒中的80%^[2]。脑梗死引起的功能障碍严重影响患者日常生活,成为临床中亟待解决的难题。电针治疗脑缺血后功能障碍的疗效已经得到临床的广泛认可^[3]。大量基础研究表明,电针在缺血性脑血管疾病的治疗中占有重要的地位,以往这方面的研究主要集中在神经保护方面^[4-5]。Notch信号通路被认为是一个经典的保守调控细胞各种生理活动的通路^[6],Notch信号通路由受体、配体和CSL DNA结合蛋白、靶基因和效应物等组成^[7-8]。经典的Notch信号通路是由Notch受体与其配体结合后,经一系列蛋白水解释放出胞内区域(Notch intracellular domain, NICD),NICD与DNA结合蛋白CSL结合形成转录因子,激活下游靶基因表达产生抑制因子。目前已有许多文献报道,Notch信号通路与缺血性脑血管病的神经修复有关。有研究发现Notch信号通路与小胶质细胞的激活密切相关,缺血缺氧性脑损伤时,阻断Notch信号通路可抑制小胶质细胞活化,减少炎症介质的释放,从而减轻脑损伤^[9]。国内有研究发现,Notch1受体mRNA分布在哺乳动物出生后脑的不同区域,包括室管膜下区和海马齿状回^[10],这为Notch通路参与神经重塑提供了重要依据。尽管目前Notch信号通路与神经可塑性的关系及其具体参与机制尚不完全清楚,但目前已有学者开始研究不同的干预治疗措施对脑梗死的作用,及其可能机制与Notch信号通路的关系,如国内有学者已发现七氟醚预处理后可以上调Notch1的表达,减轻大鼠脑缺血损伤后的缺血梗死程度,但具体机制尚不明确^[11]。本研究采用成年大鼠大脑中动脉缺血模型,应用免疫印迹观察电针对脑缺血后梗死侧齿状回Notch1的蛋白影响,探讨其治疗脑梗死的可能机制。

1 材料与方法

1.1 动物分组

所有动物实验均遵照国际动物保护法和使用指南的规定实施。实验选用SPF级成年Sprague-Dawley(SD)雄性大鼠,体重为(310±30)g,周龄为8周,由中山大学实验动物中心提供。根据随机数字表分为:假手术组、模型组和电针组,每组再分为电针治疗第3、7、14和21d后4个时间点,每个时间点各组5只大鼠。

1.2 模型制备

本研究选用北京沙东生物技术有限公司生产的AAAA级大鼠脑缺血MCAO模型尼龙栓线。大鼠术前6小时禁食,经改进Longa等线栓法^[12]后,制作大鼠右侧MCAO动物模型。具体方法为所有大鼠均选择右侧大脑中动脉区作为梗死侧,以10%水合氯醛按0.35ml/100g体重剂量行腹腔注射麻醉,仰卧于手术台(20×25cm木板)上,四肢用线绳固定。用碘伏消毒其颈部皮肤,铺盖无菌洞巾。正中切开颈部皮肤,暴露并钝性分离右侧颈总动脉、颈内动脉和颈外动脉主干及分支,在颈总动脉分叉处结扎颈外动脉,在近心端结扎颈总动脉。在此过程中注意分离迷走神经和颈总动脉。在颈总动脉远心端备线,参照Longa方法略作改进,用眼科剪在颈总动脉主干分叉处剪一约0.2mm的“V”字形切口,然后轻插线栓,当推进到分叉处时,稍微向下轻拉颈总动脉以便栓线顺利进入颈内动脉,直至遇有阻力即停止插入线栓。从颈总动脉分叉处计算线栓插入深度约(18±0.5)mm,使线栓经颈总动脉分叉部顺利进入颈内动脉入颅,阻断大脑中动脉所有血流来源,如果线栓在0.5—1.0cm处遇有明显阻力,说明栓线误入翼腭动脉,此时需要调整线栓的方向和角度以重新插入,伤口常规缝合。手术过程和动物苏醒期间注意保暖和保持呼吸道通畅。假手术组只分离动脉,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。不合格的动物剔除。

大鼠清醒后采用改良的Bederson评分标准^[13]进行神经功能初步评定,以2—3分为标准,将符合要求的脑梗死大鼠纳入本研究。改良的Bederson神经功能评分标准如下:0分,无神经功能缺失的体

症;1分,提尾时损伤对侧的前肢发生屈曲;2分,前肢屈曲以及对侧抵抗力均下降;3分,向着对侧转圈;4分,向对侧转圈并且意识障碍。

纳入标准:动物清醒后出现右眼 Horner 征、提尾时出现左侧前肢屈曲或向左侧转圈(追尾现象),即神经功能评分为2—3分的大鼠。

1.3 电针干预方法

MCAO 模型成功后第3天给予治疗,用自制固定器固定动物后,给予针刺通电治疗,15分钟/次,3天组和7天组每天1次,14天组和21天组,每治疗7天,休息1天再继续治疗,直至各个取材时间点。电针组穴位取患侧“人中”、“百会”(大鼠穴位定位参考《实验针灸学》中的定位方法),使用华佗牌30号0.5寸毫针。假手术组、模型组:给予同样抓取,不予任何治疗。

1.4 Morris 水迷宫的评定方法

本研究采用 Morris 水迷宫装置系统采集并系统分析动物的动态图像,从定位航行实验方面检测大鼠的学习能力。具体操作过程如下:

将造模成功的大鼠在结束电针治疗第7天、第14天和第21天的相应时间后开始 Morris 水迷宫测试,每个亚组依照水池上的四个象限标志,从不同象限将大鼠头向池壁放入水中,强迫大鼠游泳,学习寻找没于水面以下的目标平台。由计算机记录并计算120s内大鼠的逃避潜伏期,作为实验测试结果。

如果测试的大鼠在120s内爬上平台,并在平台上停留时间超过3s,则认为大鼠找到平台,用计算机分析软件系统记录其从象限出发点至寻找到目标平台的时间,即逃避潜伏期(escape latency, EL)。如果大鼠120s内未能找到平台,则将其引导至平台,并允许其在平台上停留15s强化记忆后将其捞起,此时逃避潜伏期计为120s。按上述方法连续训练4d,每天分上午、下午两个固定训练时间段,每个时间段训练2次。以第5天记录的时间均值作为观察指标来评定其效果。整个实验过程均由计算机跟踪系统记录分析。

1.5 免疫印迹方法

每100mg脑组织中加入1ml的细胞裂解液和1μl PMSF 储存液提取蛋白质。采用 Bradford 法定蛋白浓度,加热变性后,取50μg经12%十二烷基

硫磺胺-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),转移到PVDF膜上。5%脱脂牛奶室温封闭90min。免疫反应:以封闭液稀释兔抗 Notch1(1:500, CST)的一抗置摇床上4℃孵育过夜,洗膜后加用 TBST 1:5000 稀释的羊抗兔、羊抗小鼠二抗溶液中,室温孵育1h。最后采用化学发光法(ECL法)检测蛋白,并以脑组织中的 GAPDH 内参蛋白的表达情况为对照进行图像扫描分析,判断目的蛋白的表达量,采用 Kontron elektronik AS 图像分析系统拍照并扫描,分析光密度值。

1.6 统计学分析

数据采用均数±标准差表示,所有数值均经方差齐性及正态性检验,应用 SPSS 16.0 版统计软件进行统计学处理,组间相同时间点比较采用重复测量方差分析。

2 结果

2.1 电针治疗对脑梗死大鼠 Morris 水迷宫测试的影响

与模型组比较,电针组的逃避潜伏期在电针治疗第7天时差异无显著性意义($P > 0.05$),在电针治疗第14天和第21天时差异有显著性意义($P < 0.05$),见表1。

表1 Morris水迷宫大鼠逃避潜伏期 ($\bar{x} \pm s, s$)			
组别	电针7天	电针14天	电针21天
电针组	98.25±2.43	90.63±2.62 ^①	84.63±1.92 ^①
模型组	103.50±1.51	98.13±2.90	94.13±1.46

与同时时间点模型组相比:① $P < 0.05$

2.2 电针治疗对脑梗死大鼠缺血侧齿状回 Notch1 表达的影响

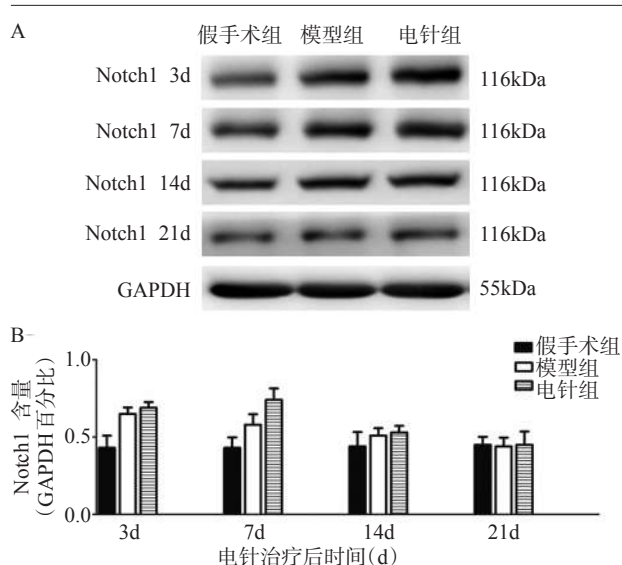
假手术组各时间点 Notch1 的蛋白表达量无明显变化,而模型组和电针组在缺血侧海马齿状回可见 Notch1 蛋白的大量表达。随着缺血时间的延长,Notch1 的蛋白表达量在缺血周边区逐渐增多,在电针治疗3天和7天后,与同时时间点模型组比较,电针组缺血侧海马齿状回的 Notch1 蛋白表达量均显著增加($P < 0.05$),且第7天时达到高峰,在第14天时仍高,但差异无显著性意义($P > 0.05$)。电针组和模型组 Notch1 的蛋白表达量在治疗第21天时接近假手术组,差异无显著性意义($P > 0.05$),见表2和图1。

表2 电针治疗后梗死侧海马区 Notch1 蛋白的表达 ($\bar{x} \pm s$)

组别	电针3天	电针7天	电针14天	电针21天
假手术组	0.43±0.079	0.43±0.068	0.44±0.092	0.45±0.051
模型组	0.65±0.041 ^①	0.58±0.067 ^①	0.51±0.047 ^①	0.44±0.056
电针组	0.69±0.036 ^{①②}	0.74±0.074 ^{①②}	0.53±0.042 ^①	0.45±0.086

与同时时间点假手术组相比:① $P < 0.05$;与同时时间点模型组相比:② $P < 0.05$

图1 电针组和模型组 Notch1 的蛋白表达量



3 讨论

电针是在针刺得气的基础上,通过毫针在腧穴上用电针机接通适宜的电流以刺激穴位,将电流刺激和针刺手法结合以防治疾病的一种疗法。因操作简便、节省人力、使用安全和提高疗效等优点,对脑血管疾病具有良好的疗效,已成为当今医学界的研究热点之一^[14]。中国传统医学认为,“病变在脑,首取督脉”,百会是督脉与足太阳、手少阳、足少阳和足厥阴等经脉交会穴,针刺治疗中风病,取百会穴有直中病位之意。人中是督脉和手足阳明之交会穴,针刺人中可激发阳明经经气,具有调节气血盛衰,平衡阴阳之效。百会、人中位于头面部,皆为督脉要穴,而督脉连于脑,依“腧穴所在,主治所在”故可治疗脑病,通过电针百会、人中,可调节督脉之经气,达到升提清阳,醒脑调神,开窍启闭的作用。《针方六集》曰:人中可治“脊强脊痛……中风不省人事”。同时,历代中医文献、医家和民间百姓往往把人中作为急救第一要穴,如《肘后备急方》述人中“救卒死方,令爪

其病人人中,取醒”。此为本研究选取“百会”、“人中”二穴的中医理论依据。

目前中日合作的一项研究发现电针刺激“百会”和“人中”能增强MCAO模型大鼠中的Akt通路,抑制caspase-9的活动,从而可能有助于减少神经元凋亡的数量^[15],这表明电针“百会”和“人中”二穴,对卒中后功能障碍产生的康复疗效可能是通过影响神经细胞而实现的。王述菊等^[16]研究发现电针“百会”和“人中”能显著降低急性脑梗死大鼠血浆D二聚体、纤维蛋白原含量,降低血液黏稠度,改善脑部血液循环,这可能是电针“百会”和“人中”产生康复疗效的另一个重要机制。也有相关临床实验发现电针此二穴对脑卒中偏瘫患者大脑皮质的中枢生物电有良好的调节作用^[17]。基于以百会和人中为主穴来治疗脑卒中的方法在临床应用中已经越来越广泛,并结合以上相关基础研究证据^[15-19],故本研究选用百会和人中穴作为研究穴位。本研究电针刺激MCAO大鼠“百会”、“人中”穴后,对其进行Morris水迷宫测试,结果表明电针能改善脑梗死大鼠的认知功能障碍,证实电针“百会”、“人中”穴对脑缺血损伤具有较好的神经修复作用。

Notch1是Notch信号通路中第一个被同源重组的基因,为多种神经发育阶段的关键影响因素,同时促进新生神经元树突分支和存活。近年来,有关Notch1和认知障碍的相关研究越来越多,主要集中在Notch1和突触可塑性、空间学习和记忆功能等方面的相关研究。众所周知,突触可塑性是学习和记忆功能形成的基础,有研究证实,在成人大脑SGZ区Notch信号通路的表达水平和神经元树突的复杂程度是相关的^[20],在诱导Notch1敲除的成年小鼠齿状回区检测到小于正常状态的树突的颗粒细胞神经元^[21]。在成熟神经元中敲除Notch1不会造成神经元整体形态的改变,但会对树突棘产生影响,并可损害LTP和LTD,从而造成多种记忆功能的明显受损^[22]。另外,不少研究发现Notch1对空间学习和记忆功能有维持和促进作用。一项早期国外研究发现成年Notch1杂合基因突变小鼠会有空间学习和记忆功能障碍,成年Rbpj杂合基因突变小鼠也会有此类型的学习和记忆功能损伤^[23]。近期也有研究用水迷宫对Notch1基因突变鼠进行测试,结果发现长程

空间记忆缺陷,并有CSL基因复制缺失,而CSL是Notch信号通路中的关键转录调节因子。敲除鼠Notch基因检测对海马神经元可塑性的影响,结果显示长时程增强受到抑制,给予外源性Notch配体Jag-1可以纠正这种抑制作用^[24]。

本研究发现,电针能改善脑梗死大鼠的认知功能,同时我们也发现电针组Nocthl蛋白表达量显著增加,提示Nocthl可能在电针改善脑梗死后认知功能的机制中发挥着特殊作用。因此,我们推测电针治疗促进脑梗死大鼠认知功能恢复的机制,可能与上调梗死侧海马齿状回区Notch1蛋白的表达量,参与神经康复有关,同时,也提示Notch信号通路参与了电针修复脑梗死引起的认知功能障碍的神经可塑性活动中。

参考文献

- [1] Hilbrich L, Truelsen T, Yusuf S. Stroke and cardiovascular diseases: the need for a global approach for prevention and drug development[J]. *Int J Stroke*, 2007, 2(2):104—108.
- [2] 罗祖明,丁新生.缺血性脑血管病学[M].北京:人民卫生出版社,2011.1001.
- [3] XIE K, LIU MQ. Clinical observation of electroacupuncture and rehabilitation training in treating cerebral infarction[J]. *J. Acupunct. Tuina. Sci.*, 2009, 7:140—142.
- [4] 刘玉珍,蒋戈利,韩景献,等.电针对局灶性脑缺血大鼠细胞间黏附分子-1表达和白细胞浸润的影响[J]. *中国康复医学杂志*, 2007, 22(2):122.
- [5] Tao J, Xue XH, Chen LD, et al. Electroacupuncture improves neurological deficits and enhances proliferation and differentiation of endogenous nerve stem cells in rats with focal cerebral ischemia[J]. *Neurol Res*, 2010, 32(2):198—204.
- [6] Lai EC. Notch signaling: control of cell communication and cell fate[J]. *Development*, 2004, 131(5):965—973.
- [7] Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development[J]. *Science*, 1999, 284(5415):770—776.
- [8] Bray SJ. Notch signalling: a simple pathway becomes complex[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006, 7(9):678—689.
- [9] Yao L, Kan EM, Kaur C, et al. Notch-1 signaling regulates microglia activation via NF- κ B pathway after hypoxic exposure in vivo and in vitro[J]. *PLoS One*, 2013, 8(11):e78439.
- [10] Wang X, Mao X, Xie L, et al. Involvement of Notch1 signaling in neurogenesis in the subventricular zone of normal and ischemic rat brain in vivo[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2009, 29(10):1644—1654.
- [11] Zhang HP, Sun YY, Chen XM, et al. The neuroprotective effects of isoflurane preconditioning in a murine transient global cerebral ischemia-reperfusion model: the role of the Notch signaling pathway[J]. *Neuromolecular Med*, 2014, 16(1):191—204.
- [12] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. *Stroke*, 1989, 20(1):84—91.
- [13] Wang CX, Yang Y, Yang T, et al. A focal embolic model of cerebral ischemia in rats: Introduction and evaluation[J]. *Brain Res Protoc*, 2001, 7(2):115—120.
- [14] Domenici RM, Mingfu L, Tebano MT, et al. Study of the effects of electroacupuncture in a rodent model of cerebral ischaemia[J]. *Ann Ist Super Sanita*, 2003, 39(3):441—445.
- [15] 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.
- [16] Wang SJ, Sun GJ, Wu XP, et al. Effect of electroacupuncture at Baihui and Shuigou acupoints on the contents of plasma Ddimer and fibrinogen in rats with acute cerebral infarction[J]. *WJAM*, 2009, 19(3): 49—53.
- [17] 左方,石现,田嘉禾,等.电针头穴对人脑运动功能区糖代谢影响的正电子发射断层扫描研究[J]. *中国康复理论与实践*, 2008, 14(3):237—238.
- [18] 彭拥军,陈理,王和生,等.电针不同穴位治疗急性脑缺血再灌注大鼠疗效观察[J]. *安徽中医学院学报*, 2010, 29(5):31—34.
- [19] 李铁浪,严洁,邓常青,等.电针不同穴组对急性脑缺血大鼠脑组织NPY及其基因表达的影响[J]. *湖南中医学院学报*, 2006, 26(2):43—45.
- [20] Ahimou F, Mok LP, Bardot B, et al. The adhesion force of Notch with Delta and the rate of Notch signaling[J]. *J Cell Biol*, 2004, 167(6):1217—1229.
- [21] Itoh M, Kim CH, Palardy G, et al. Mind bomb is a ubiquitin ligase that is essential for efficient activation of Notch signaling by Delta[J]. *Dev Cell*, 2003, 4(1):67—82.
- [22] Seugnet L, Simpson P, Haenlin M. Requirement for dynamin during Notch signaling in Drosophila neurogenesis[J]. *Dev Biol*, 1997, 192(2):585—598.
- [23] Lyman DF, Yedvobnick B. Drosophila Notch receptor activity suppresses Hairless function during adult external sensory organ development[J]. *Genetics*, 1995, 141(4):1491—1505.
- [24] Lasky JL, Wu H. Notch signaling, brain development, and human disease[J]. *Pediatr Res*, 2005, 57(5 Pt 2):104R—109R.