

电针对脑缺血大鼠海马神经元凋亡的影响

郑彩霞, 韩肖华, 黄晓琳, 郭雅碧

【摘要】 目的:探讨电针对脑缺血大鼠海马神经元凋亡的作用及可能内在机制。方法:将90只雄性SD大鼠随机分为假手术组、模型组、电针组、电针+PKA抑制剂(H89)组和电针+生理盐水(NS)组,每组又分为7d、14d、21d 3个亚组。制备双侧颈总动脉永久性结扎(2VO)模型;电针百会穴(GV20)和大椎穴(GV14);通过TUNEL法和免疫蛋白印迹法观测海马神经元凋亡及Bax蛋白、Bcl-2蛋白表达量。结果:各组大鼠组内3个时间点间的海马神经元凋亡率相比,模型组14d组、21d组较7d组显著增加($P<0.05$);其余各组各时间点差异均无统计学意义。凋亡相关蛋白表达量比较,电针组21d组较14d组Bcl-2蛋白量显著增多($P<0.05$)。其余各组各个评价指标在3个时间点比较差异无统计学意义。同时间点各组大鼠间海马神经元凋亡率比较,模型组较假手术组均显著增加($P<0.05$);电针组较模型组均显著降低($P<0.05$);电针+H89组较电针+NS组均显著增多($P<0.05$)。同时间点各组大鼠间的凋亡相关蛋白表达量比较,模型组较假手术组Bax蛋白量均显著增高($P<0.05$),而Bcl-2蛋白量均显著降低($P<0.05$);电针组较模型组Bax蛋白量均显著降低($P<0.05$),而Bcl-2蛋白量均显著增加($P<0.05$);电针+H89组较电针+NS组Bax蛋白量均明显增多($P<0.05$),而Bcl-2蛋白量明显降低($P<0.05$),但在14d时2组Bcl-2蛋白表达差异无显著统计学意义。结论:电针百会穴和大椎穴可抑制Bax蛋白表达,促进Bcl-2蛋白表达而减轻脑缺血大鼠海马神经元凋亡,给予H89后电针的作用被抑制,说明电针抗凋亡作用的内在机制可能与激活PKA-CREB信号通路相关。

【关键词】 脑缺血;电针;凋亡;PKA-CREB信号通路

【中图分类号】 R49;R743.3 **【DOI】** 10.3870/zgkf.2015.05.001

Effects of electroacupuncture on neuronal apoptosis of hippocampus in rats with cerebral hypoperfusion Zheng Cai xia, Han Xiaohua, Huang Xiaolin, et al. Department of Rehabilitation Medicine, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

【Abstract】 Objective: To investigate whether electroacupuncture (EA) protects hippocampal neurons from apoptosis and its probable mechanism in rats following cerebral hypoperfusion. **Methods:** Ninety male Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into five groups: a sham-operated control group (Con), a model group (Mod), an EA group (EA), an EA combined with intracerebroventricular (ICV) injection of PKA blocker H89 group (EA+H89) and an EA combined with ICV injection of normal saline (NS) group (EA+NS). Each group included three time courses: 7 days, 14 days and 21 days. Cerebral hypoperfusion was induced by permanent and bilateral common carotid artery occlusion (2-vessel occlusion, 2VO). EA was given on GV20 and GV14. TUNEL and Western blotting were employed to observe apoptosis of neurons and expression changes of Bax and Bcl-2 proteins of the hippocampus. **Results:** In the Mod group, the apoptosis rate was significantly higher on day 14 and 21 than on day 7 ($P<0.05$), and there was no significant difference in other groups among the three time points. In the EA group, the expression of Bcl-2 protein was significantly higher in the 21-day subgroup than in the 14-day subgroup ($P<0.05$), and there were no significant differences in other groups. Percentages of apoptotic neurons were higher in the Mod group than in the Con group ($P<0.05$), but lower in the EA group than in the Mod group ($P<0.05$). In the EA+H89 group, protecting effects of EA were weakened, and those in the EA+NS group had no significant change. Western blotting suggested that the expression of Bax protein was significantly up-regulated ($P<0.05$) and that of Bcl-2 protein significantly down-

基金项目:国家自然科学基金项目(81171858)

收稿日期:2015-07-17

作者单位:华中科技大学同济医学院附属同济医院康复医学科,武汉430030

作者简介:郑彩霞(1988-),女,博士研究生,主要从事神经康复方面的研究。

通讯作者:韩肖华,hanxiao1470@sina.com

regulated ($P < 0.05$) in the Mod group as compared with the Con groups, and the Bax protein significantly reduced ($P < 0.05$) and the Bcl-2 protein significantly increased ($P < 0.05$) in the EA group as compared with the Mod group. In the EA+H89 group, the Bax protein was significantly increased ($P < 0.05$) and the Bcl-2 protein significantly decreased ($P < 0.05$) as compared with the EA+NS group (the expression of Bcl-2 protein had no significant difference on the day 14). **Conclusion:** EA on GV20 and GV14 could alleviate apoptosis of hippocampal neurons by regulating the expression of Bax and Bcl-2 proteins after cerebral hypoperfusion, and the above effects could be inhibited by PKA blocker H89, suggesting that EA might exert antiapoptotic effects through activation of the PKA-CREB signaling pathway.

【Key words】 cerebral hypoperfusion; electroacupuncture; apoptosis; PKA-CREB signaling pathway

国际阿尔茨海默氏病联盟 (Alzheimer's Disease International, ADI) 统计表明: 截止 2013 年, 全世界范围内痴呆患者达到 4 440 万, 预计到 2050 年, 痴呆患者将超过 13 550 万。血管性痴呆 (vascular dementia, VaD) 占痴呆总数的 20%~30%, 是仅次于阿尔茨海默氏病 (Alzheimer's disease, AD) 的第 2 大痴呆类型^[1]。针灸作为替代疗法对 VaD 的改善作用在中西方已经得到越来越多的实验证实^[2-3], 但其具体机制尚不明确。韩肖华等^[4]发现电针 (electroacupuncture, EA) 刺激百会穴和大椎穴 7d 可促进脑缺血大鼠海马蛋白激酶 A-环磷酸腺苷反应元件结合蛋白 (protein kinase A-cAMP response element binding protein, PKA-CREB) 信号通路激活, 使磷酸化环磷酸腺苷反应元件结合蛋白 (phosphorylated cAMP-response element binding protein, pCREB) 和 Bcl-2 蛋白量升高, Bax 蛋白量下降, Morris 水迷宫成绩提高。在以上研究基础上, 本实验设置术后 7d、14d、21d 3 个时间点, 通过延长观察时间, 进一步探讨电针对脑缺血大鼠海马神经元凋亡的影响及可能内在机制。

1 材料与方法

1.1 材料 ①实验动物: SPF (Specific pathogen Free) 级成年 SD (Sprague-Dawley) 雄性大鼠 90 只, 体重 250±20g, 由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供 (许可证号: SCXK(湘)2011-0003)。②主要试剂: PKA 选择性抑制剂 H89 (Sigma 公司)、TUNEL 试剂盒 (Roche 公司)、兔抗大鼠 Bcl-2 单克隆抗体 (Cell Signaling Technology 公司)、兔抗大鼠 Bax 单克隆抗体 (Abcam 公司)、兔抗大鼠 GAPDH 多克隆抗体 (Abcam 公司)、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔二抗 (KPL 公司)、DAB 显色试剂盒 (武汉博士德生物技术公司)。③主要材料与仪器: PVDF 膜 (Millipore 公司)、电针仪 (上海 G6805-II 型)、毫针 (华佗牌, 30 号)、脑立体定位仪、微量注射器、尼康 E100 型生物显微镜、佳能 600D 相机。

1.2 方法 ①分组及处理: 90 只大鼠随机分为 5 组:

假手术组、模型组、电针组、电针+H89 组和电针+NS 组各 18 只, 每组又分成 7d、14d、21d 3 个亚组 ($n=6$), 每组其中 3 只新鲜取材后用于 Western blotting 检测, 另外 3 只灌注后用于原位末端转移酶标记技术 (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling, TUNEL) 检测。②侧脑室注射: 电针+H89 组和电针+NS 组大鼠分别侧脑室注射 H89 (2μg/μL) 或 NS 10 μL 后再制作脑缺血模型。侧脑室定位坐标: 前囟后 0.8mm, 前囟右侧 1.5mm, 硬脑膜下约 4.0mm。第 14d、21d 组大鼠每间隔 1 周重复侧脑室注射 H89 或 NS 一次。③造模: 制备双侧颈总动脉永久性结扎 (2-vessel occlusion, 2VO) 模型: 钝性分离颈总动脉后分别结扎近端和远端并剪断中部; 假手术组大鼠仅分离双侧颈总动脉但不接扎和剪断。④电针治疗: 电针组、电针+H89 组和电针+NS 组大鼠于造模次日开始接受电针治疗。参照《实验针灸学》^[5], “百会”穴位于顶骨正中, “大椎”穴位于背部正中第 7 颈椎与第 1 胸椎间。用针灸毫针斜刺入“百会”1cm, 直刺入“大椎”0.5cm 后连接上海 G6805-II 型电针仪, “百会”接负极, “大椎”接正极, 选取连续波, 频率 20Hz, 强度以观察到大鼠眼睑轻微颤动为宜, 每天 1 次, 每次 20min, 根据分组分别连续治疗 7d、14d 或 21d。假手术组及模型组大鼠术后常规饲养, 无其他特殊处理。

1.3 评定标准 ①组织切片: 10% 水合氯醛 3ml/kg 腹腔注射麻醉大鼠后, 经心脏依次快速灌注生理盐水 250ml 及 4% 多聚甲醛 250ml, 断头取脑后置于 4% 多聚甲醛中后固定 24h, 常规脱水、透明、浸蜡及包埋。按照《大鼠脑立体定位图谱》在海马典型位置连续冠状切片 (厚度 4μm)^[6], 每间隔 12μm 留取 1 张切片, 每个脑组织取 3 张切片用于 TUNEL 检测。②TUNEL 检测: 实验步骤按照试剂盒说明书操作。在 400 倍光学显微镜下, 每张切片分别拍摄双侧海马 CA1 区, 每侧 CA1 区随机选取 2 个视野拍照。采用 Image-Pro Plus 软件计数各视野下调亡细胞数和细胞总数, 并计算调亡细胞所占比率, 以上述 4 个视野下调亡细胞率的均

值作为该大鼠海马 CA1 区神经元凋亡细胞率的值。
③蛋白免疫印迹 (Western blotting): 10% 水合氯醛 3ml/kg 腹腔注射麻醉大鼠后, 直接断头取脑并迅速分离出海马组织。取 1/2 海马组织块与裂解液混合并匀浆, 离心 (4℃, 14000g, 20min) 后, 提取总蛋白液。上样量 60μg, 行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) (浓缩 80V 30min; 分离 120V 90min) 和转膜 (200mA 70min), 再先后孵育一抗 (1:2000, 4℃, 12h) 和二抗 (1:10000, 室温, 2h); 经 X 胶片曝光显像, 采用 Image-J 软件分析目标蛋白及内参蛋白的灰度值并计算比值。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 20.0 统计学软件进行统计学分析, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 单因素方差分析及 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

各组大鼠组内 3 个时间点间的海马神经元凋亡率相比, 模型组 14d 组、21d 组较 7d 组显著增加 ($P < 0.05$); 其余各组各时间点差异均无统计学意义。凋亡相关蛋白表达量比较, 电针组 21d 组较 14d 组 Bcl-2 蛋白量显著增多 ($P < 0.05$)。其余各组各个评价指标在 3 个时间点比较差异均无统计学意义。同时间点各组大鼠间海马神经元凋亡率比较, 模型组较假手术组均显著增加 ($P < 0.05$); 电针组较模型组均显著降低 ($P < 0.05$); 电针+H89 组较电针+NS 组均显著增多 ($P < 0.05$)。同时间点各组大鼠间的凋亡相关蛋白表达量比较, 模型组较假手术组 Bax 蛋白量均显著增高 ($P < 0.05$), 而 Bcl-2 蛋白量均显著降低 ($P < 0.05$); 电针组较模型组 Bax 蛋白量均显著降低 ($P < 0.05$), 而 Bcl-2 蛋白量均显著增加 ($P < 0.05$); 电针+H89 组较电针+NS 组 Bax 蛋白量均明显增多 ($P < 0.05$), 而 Bcl-2 蛋白量明显降低 ($P < 0.05$), 但在 14d 时 2 组 Bcl-2 蛋白表达差异无显著统计学意义。见图 1 及表 1。

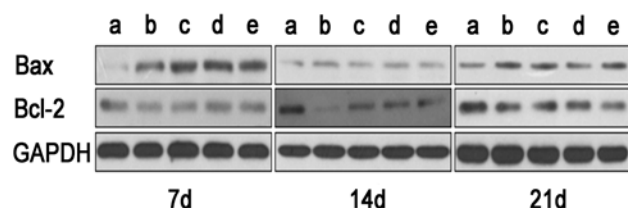


图 1 各组大鼠海马区 Bax 蛋白、Bcl-2 蛋白的表达
a. 假手术组; b. 模型组; c. 电针组; d. 电针+H89 组; e. 电针+NS 组

表 1 各组大鼠海马神经元凋亡率、Bax 蛋白相对表达量、Bcl-2 蛋白相对表达量比较 $\bar{x} \pm s$

组别	时间	神经元凋亡率 (%)	Bax/GAPDH 相对表达量	Bcl-2/GAPDH 相对表达量
假手术组 (n=3)	7d	6.27±0.94	0.18±0.00	0.69±0.02
	14d	7.71±1.86	0.18±0.02	0.54±0.02
	21d	6.83±1.50	0.27±0.02	0.66±0.04
模型组 (n=3)	7d	42.70±2.91 ^c	0.51±0.06 ^c	0.36±0.06 ^c
	14d	64.52±0.85 ^{ac}	0.40±0.04 ^c	0.32±0.06 ^c
	21d	67.19±2.67 ^{ac}	0.48±0.04 ^c	0.38±0.02 ^c
电针组 (n=3)	7d	30.26±3.56 ^d	0.27±0.07 ^d	0.50±0.02 ^d
	14d	34.84±3.71 ^d	0.22±0.02 ^d	0.45±0.03 ^d
	21d	43.65±1.15 ^d	0.33±0.08 ^d	0.72±0.11 ^{bd}
电针+H89 组 (n=3)	7d	45.80±4.48 ^c	0.53±0.02 ^c	0.36±0.04 ^c
	14d	49.62±1.48 ^c	0.60±0.01 ^c	0.46±0.06
	21d	55.73±4.36 ^c	0.47±0.07 ^c	0.45±0.04 ^c
电针+NS 组 (n=3)	7d	37.69±0.18	0.32±0.04	0.54±0.02
	14d	42.04±0.22	0.26±0.04	0.52±0.01
	21d	39.32±0.39	0.31±0.01	0.61±0.02

与同组 7d 比较, ^a $P < 0.05$; 与同组 14d 比较, ^b $P < 0.05$; 与同时时间点假手术组比较, ^c $P < 0.05$; 与同时时间点模型组比较, ^d $P < 0.05$; 与同时时间点电针+NS 组比较, ^e $P < 0.05$

3 讨论

慢性脑低灌注是 VaD 和 AD 患者发生认知功能下降的基本发病机制之一^[7], 大鼠 2VO 模型常用于模拟人类大脑慢性低灌注病变。在该模型中, 海马 CA1 区神经元丢失随缺血时间延长逐渐加重, 在术后 2 周^[8]、4 周^[8]和 8~13 周^[9], 分别有 6%~29%、55% 和 67% 的大鼠出现海马结构破坏, 这与本实验中模型组 7d、14d、21d 神经元凋亡率逐渐加重的结果相一致。脑缺血后机体 PKA-CREB 信号通路可被激活^[2], 可通过调控多种靶基因的转录而力图减轻脑缺血缺氧引起的神经功能失稳和认知功能下降, 其中 Bcl-2^[10]、BDNF 等基因与神经元存活密切相关^[10-11]。Bcl-2 蛋白是中枢神经系统内主要的抗凋亡蛋白, 而 Bax 蛋白会促进凋亡^[12]。在本实验中, 3 个时间点模型组与假手术组相比, Bax 蛋白量显著升高, 伴有 Bcl-2 蛋白量显著降低, 可能是模型组海马 CA1 区海马神经元凋亡率显著升高的内在机制之一。

电针具有抗脑缺血后细胞凋亡的作用。陶静等^[13]研究表明电针可抑制局灶性脑缺血再灌注损伤大鼠脑组织中 Bax 蛋白表达, 提高 Bcl-2、BDNF 蛋白表达, 加速神经功能恢复。余茜等^[14]研究表明电针可上调右侧大脑中动脉缺血模型大鼠海马 Bcl-2 蛋白表达、下调 Bax 蛋白表达而促进脑梗死大鼠行为能力恢复。本实验结果中, 电针组较模型组神经元凋亡率和 Bax 蛋白量均显著下降, 同时 Bcl-2 蛋白量均显著升高, 提示电针可以明显改善脑缺血后神经元凋亡反应。

但同时,分别电针治疗 7d、14d、21d 的三组大鼠海马神经元凋亡率仍然呈增加的趋势,分析可能原因:持续性脑流量下降发生 15~20min 后神经元开始发生不可逆性损伤^[15],并且随缺血缺氧时间延长神经元病变范围和程度会进行性加重,尽管电针组较同时点模型组凋亡进展的严重程度已经显著缓解,但并不能逆转或者完全遏制凋亡反应逐渐加重的趋势。同时我们还发现,Bcl-2 蛋白量在电针组 21d 组较 14d 组显著增加,提示增加电针疗程可能对神经元的保护作用更明显。

H89 是蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA) 的选择性抑制剂,在电针治疗前侧脑室注射 H89 组与 NS 组的大鼠相比,神经元凋亡率和 Bax 蛋白表达均显著增加,伴有 Bcl-2 蛋白表达显著下降,说明电针的抗神经元凋亡作用被抑制,反向验证了电针的内在机制之一可能与激活 PKA-CREB 通路相关。电针+H89 组与电针+NS 组在 14d 时 Bcl-2 蛋白量无显著统计学差异,可能有以下原因:①多种激酶[如 Ca^{2+} /钙调蛋白激酶 IV (Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type IV, CaMK IV)]都能磷酸化 CREB^[16],当 CaMK IV 激活 CREB 后也可以调控 Bcl-2 基因的表达,此时 H89 不能阻断其他激酶对 CREB 及 Bcl-2 基因的作用;②后续如果增加 14d、21d 组的样本量,实验结果可能更有说服力。

综上所述,电针刺激百会穴和大椎穴 7d、14d 和 21d 均可以明显减轻脑缺血后海马神经元凋亡,其内在机制可能与激活 PKA-CREB 信号通路后调节 Bax 蛋白、Bcl-2 蛋白表达相关。本研究结果提示 PKA-CREB 信号通路可能是电针的作用机制之一,但电针是否影响该信号通路上其他基因的调控有待进一步研究。

【参考文献】

- [1] Gorelick PB, Nyenhuis D. Understanding and treating vascular cognitive impairment[J]. Continuum (Minneapolis), 2013, 19(2): 425-437.
- [2] Shi GX, Liu CZ, Guan W, et al. Effects of acupuncture on Chinese medicine syndromes of vascular dementia[J]. Chin J Integr Med, 2014, 20(9): 661-666.
- [3] Chou P, Chu H, Lin JG. Effects of electroacupuncture treatment on impaired cognition and quality of life in Taiwanese stroke patients[J]. J Altern Complement Med, 2009, 15(10): 1067-1073.
- [4] Han X, Zhao X, Lu M, et al. Electroacupuncture Ameliorates Learning and Memory via Activation of the CREB Signaling Pathway in the Hippocampus to Attenuate Apoptosis after Cerebral Hypoperfusion[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2013, 2013: 156489-156489.
- [5] 林文注,王佩. 实验针灸学[M]. 上海:上海科学技术出版社,1994, 286-286.
- [6] 诸葛启钊. 大鼠脑立体定位图谱[M]. (第3版), 北京:人民卫生出版社, 2005, 101-108.
- [7] Yang Z, Cheng XG. From chronic cerebral hypoperfusion to Alzheimer-like brain pathology and neurodegeneration[J]. Cell Mol Neurobiol, 2015, 35(1): 101-110.
- [8] Farkas E, Luiten PG, Bari F. Permanent, bilateral common carotid artery occlusion in the rat: a model for chronic cerebral hypoperfusion-related neurodegenerative diseases[J]. Brain Res Rev, 2007, 54(1): 162-180.
- [9] Liu J, Jin DZ, Xiao L, et al. Paeoniflorin attenuates chronic cerebral hypoperfusion-induced learning dysfunction and brain damage in rats[J]. Brain Res, 2006, 1089(1): 162-170.
- [10] Mayr B, Montminy M. Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001, 2(8): 599-609.
- [11] Zhao Y, Xiao M, He W, et al. Minocycline upregulates cyclic AMP response element binding protein and brain-derived neurotrophic factor in the hippocampus of cerebral ischemia rats and improves behavioral deficits[J]. Neuropsychiatr Dis Treat, 2015, 11: 507-516.
- [12] Martinou JC, Youle RJ. Mitochondria in apoptosis: Bcl-2 family members and mitochondrial dynamics [J]. Dev Cell, 2011, 21(1): 92-101.
- [13] 陶静,陈阿贞,兰岚,等. 电针对大鼠早期局灶性脑缺血再灌注损伤细胞凋亡机制的研究[J]. 中国康复医学杂志, 2014, 29(1): 3-8.
- [14] 余茜,李晓红,黄林. 电针对脑梗死大鼠行为能力及海马 CA1 区凋亡相关基因 B 细胞淋巴瘤/白血病基因-2、细胞凋亡通路蛋白 X 表达的影响[J]. 中华物理医学与康复杂志, 2012, 34(4): 245-249.
- [15] Sekhon LH, Spence I, Morgan MK, et al. Chronic cerebral hypoperfusion in the rat: temporal delineation of effects and the in vitro ischemic threshold[J]. Brain Res, 1995, 704(1): 107-111.
- [16] Bell KF, Bent RJ, Meese-Tamuri S, et al. Calmodulin kinase IV-dependent CREB activation is required for neuroprotection via NMDA receptor-PSD95 disruption[J]. J Neurochem, 2013, 126(2): 274-287.