

# 电针对脑缺血大鼠海马神经元 microRNA132 和 p250GAP 蛋白表达的影响

郑彩霞, 黄晓琳, 陆敏, 张凤霞, 郭雅碧, 韩肖华

**【摘要】** 目的:探讨电针(electroacupuncture, EA)对脑缺血大鼠海马区 microRNA132(miR132)和 p250GAP 蛋白表达的影响及可能内在机制。方法:将 90 只雄性 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组、EA 组、EA+H89(N-[2-(p-Bromocinnamylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide·2HCl hydrate)组和 EA+NS(normal saline)组。永久性结扎双侧颈总动脉(2-vessel occlusion, 2VO)制备脑缺血模型,造模成功次日于百会穴(GV20)和大椎穴(GV14)施以 EA 治疗。治疗后的 7, 14, 21d, 采用实时荧光定量 PCR(Quantitative Real-time PCR, RT-PCR)方法检测海马 miR132 的表达,并通过蛋白免疫印迹(western blot)方法检测海马 GTP 酶活化蛋白 p250GAP 蛋白的表达。结果:同时点各组大鼠间相比,7、14、21d 时,模型组与假手术组相比,大鼠海马组织 miR132 的表达量均显著下降,同时 p250GAP 蛋白量均显著增加( $P<0.05$ );EA 组与模型组相比,miR132 的表达量均显著增加( $P<0.05$ );同时 p250GAP 蛋白量均显著下调( $P<0.05$ );EA+H89 组与 EA+NS 组相比,miR132 表达量均显著下调( $P<0.05$ );p250GAP 蛋白量均显著增加( $P<0.05$ )。同组别三个不同时间点之间 miR132 表达量相比,EA+NS 组大鼠在 14d 时 miR132 的表达量较 7d 显著增加,但 21d 时 miR132 的表达量较 14d 显著减少( $P<0.05$ ),其余组各时间点间无显著统计学差异。结论:EA 能促进脑缺血大鼠海马区 miR132 增加并下调 p250GAP 蛋白的表达,给予 H89 后电针的作用被部分抑制,提示电针的作用可能与激活 PKA/CREB 信号通路相关。

**【关键词】** 脑缺血;电针;microRNA132;PKA/CREB 信号通路

**【中图分类号】** R49;R743 **【DOI】** 10.3870/zgkf.2016.06.006

**Effects of electroacupuncture on expression of microRNA132 and p250GAP protein in hippocampus of cerebral ischemia rats** Zheng Caixia, Huang Xiaolin, Lu Min, 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 and how electroacupuncture (EA) affects the expression of miR132 and p250GAP protein in the hippocampal neurons of rats following cerebral ischemia. **Methods:** Ninety Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into five groups: sham-operated control group, model group, EA group, EA combined with intracerebroventricular (ICV) injection of PKA blocker H89 (EA+H89) group and EA combined with ICV injection of normal saline (NS) (EA+NS) group. Cerebral ischemia was induced by permanent, bilateral common carotid artery occlusion (2-vessel occlusion, 2VO), and EA was delivered the day after the operation at Baihui (GV20) and Dazhui (GV14) acupoints. Quantitative real-time PCR (RT-PCR) and Western blotting were respectively employed to detect the changes of miR132 and p250GAP protein in the hippocampus on the day 7, 14 or 21 after the EA treatment. **Results:** On the day 7, 14 and 21, the expression levels of miR132 were significantly decreased and the p250GAP protein were significantly increased in the model group as compared with the control group ( $P<0.05$ ), while those of miR132 were significantly higher and those of p250GAP protein were significantly lower in the EA group than in the model group ( $P<0.05$ ). In the EA+H89 group, protective effects of EA were weakened, whereas in the EA+NS group they were not affected. Among the 3 time points in each group, the expression of miR132 in the EA+NS groups was significantly higher on the day 14 than that on the day 7 ( $P<0.05$ ), but that was significantly lower on the day 21 than that on the day 14 ( $P<0.05$ ). No statistically significant difference was found among the other groups at each time point. **Conclusion:** EA could promote the increase

基金项目:国家自然科学基金项目(NO81171858)

收稿日期:2016-07-18

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

of miR132 and inhibit the decrease of p250GAP protein in the hippocampus of cerebral ischemia rats, and these effects could be inhibited by H89, suggesting that PKA/CREB signaling pathway might be activated in effects of EA.

**【Key words】** cerebral ischemia; electroacupuncture; microRNA132; PKA/CREB signaling pathway

血管性痴呆(vascular dementia, VaD)是指由缺血性卒中、出血性卒中和造成脑区低灌注的脑血管疾病所致的严重认知功能障碍综合征。在全世界范围内, VaD是仅次于阿尔茨海默氏病(Alzheimer's disease, AD)的第二大痴呆类型, 约占痴呆总数的20%~30%<sup>[1]</sup>。近年来, 越来越多的临床研究及实验研究证实针灸对 VaD 引起的学习记忆功能下降具有明显的保护和改善作用, 但其具体作用机制尚不明确<sup>[2-3]</sup>。韩肖华等<sup>[4]</sup>发现电针(electroacupuncture, EA)刺激百会穴和大椎穴可以提高脑缺血大鼠 Morris 水迷宫成绩, 机制可能与 EA 刺激可能激活海马区 PKA/CREB 信号通路, 上调其下游的 Bcl-2 靶基因转录水平, 使翻译成的 Bcl-2 蛋白量增多, 进而发挥抗神经元凋亡作用相关; Li 等<sup>[5]</sup>在后来的研究中也表明 EA 可能是通过 cAMP/PKA/CREB 通路改善多发性脑梗塞大鼠的学习记忆功能。研究表明, miR-212/132 可能受转录因子 CREB(cAMP-response element binding)<sup>[6]</sup>和转录抑制因子 REST/NRSF(Repressor Element 1 silencing transcription factor/neuron-restrictive silencer factor)调控<sup>[7]</sup>, 其中 CREB 存在于神经细胞中, 而 REST 存在于小鼠胚胎成纤维细胞中。miR132 和 miR212 串联基因的正常表达是神经元发育、成熟、发挥正常功能的必要条件, 它们的异常表达会引起一些神经系统疾病, 如 AD 和 tau 疾病<sup>[8]</sup>。由于海马区 miR-212/132 成熟产物主要是 miR132, miR132 被认为在成年小鼠海马区新生神经元的突触生长和分支中发挥重要作用<sup>[9]</sup>。miR132 可能通过抑制 GTP 酶活化蛋白 p250GAP 而促进树突棘成熟, 影响突触形成<sup>[10]</sup>。本实验旨在初步探讨 EA 是否通过激活 PKA/CREB 信号通路影响 miR132 及其下游 p250GAP 蛋白表达, 为 EA 改善学习记忆障碍的内在机制提出新的证据。

## 1 材料与方法

1.1 材料 ①实验动物: 健康成年 SPF(Specific pathogen Free)级 SD(Sprague-Dawley)雄性大鼠 90 只, 体质量 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: H89(Sigma-Aldrich, Shanghai, China)、山羊抗大鼠 p250GAP 多克隆抗体(1:200, Santa Cruz Bio-

technology, Santa Cruz, CA, USA), 小鼠抗大鼠  $\beta$ -tubulin 单克隆抗体(1:1000, Affinity Bioscience, USA)、辣根过氧化物酶(HRP)标记抗体(1:5000; Proteintech Group Inc., Wuhan, China)、增强化学发光系统(an enhanced chemiluminescence system, ECL, Millipore, Billerica, MA, US)、反转录试剂盒(TOYOBO First Strand cDNA Synthesis Kit, USA)、定量 PCR 试剂盒( TOYOBO THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix, USA)。③主要材料与仪器: 电针仪(G6805-II 型, 上海)、毫针(华佗牌, 30 号)、脑立体定位仪(深圳沃瑞德科技有限公司)、微量进样器、PVDF 膜(Merck Millipore, Germany)、荧光定量 PCR 仪(StepOne™ Real-Time PCR System, Life Technologies, New York, USA)。

1.2 方法 ①动物分组及处理: 90 只动物随机分为假手术组、模型组、EA 组、EA+H89 组和 EA+NS 组, 每组 18 只, 每组又分为 7, 14, 21d 三个观察时间点, 即每个时间点 6 只 SD 大鼠。②侧脑室注射: 在制作 2VO 模型前 1h, EA+H89 组和 EA+NS 组的大鼠分别侧脑室注射 H89(2 $\mu$ g/ $\mu$ L)或 NS 10 $\mu$ L。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。14、21d 组的大鼠每间隔 1 周重复侧脑室注射 H89 或 NS 一次。③模型制备: 腹腔注射 10%水合氯醛(3ml/kg)麻醉大鼠后, 行颈部正中约 2cm 切口, 并游离一小段颈总动脉, 分别结扎其近端和远端并剪断中部, 以完全阻断双侧颈总动脉血流; 假手术组大鼠双侧颈总动脉只暴露, 不接扎和剪断。缝合切口, 消毒皮肤, 术后常规饲养。④EA 参数: GV20 位于顶骨正中, GV14 位于背部正中第 7 颈椎与第 1 胸椎间。以 30 号 1 寸毫针斜刺入 GV20 10mm, 直刺入 GV14 5mm。将针柄分别连接至电针仪上, GV20 接负极, GV14 接正极, 选取连续波, 频率 20Hz, 电流强度以观察到大鼠眼睑轻微颤动为宜。每天 1 次, 每次 20min。

1.3 评定标准 ①RT-PCR: 直接断头法取出大脑后快速在冰上分离出双侧海马组织。取 100mg 组织, 加入 1ml Trizol Reagent 彻底匀浆, 随后加入氯仿和异丙醇, 抽提总 RNA。取 10 $\mu$ l 水溶 RNA, 依次加入特异性反转录引物 U6-RT(10mM), miR-132-5p-RT(10mM)各 1 $\mu$ l, 及 4 $\mu$ l 5 $\times$  buffer, 2 $\mu$ l 10mM dNTPs, 1 $\mu$ l RNA inhibitor 和 1 $\mu$ l 反转录酶, 用枪抽吸混匀后

于 PCR 仪上进行逆转录反应。配制 10 $\mu$ l 反应体系,每个反转录产物配制 3 管,进行 PCR 扩增。选用 U6 RNA 作为内源参考基因。采用 2<sup>- $\Delta\Delta$ CT</sup>法计算 miR132 表达的相对变化。引物由 Invitrogen Biotechnology Co., LTD 中国公司合成。miR132 的引物:miR-132-5p-S: 5'-ACCGTGGCTTTTCGATTGTTAC-3',通用下游: 5'-TGGTGTCTGGAGTTCG-3'; U6 的引物: R-U6-S: 5'-CCTGCTTCGGCAGCACA-3', R-U6-A: 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'。② Western blot: 取 100mg 组织,与裂解液混合并匀浆,提取总蛋白液。每孔总蛋白上样量约 60 $\mu$ g,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),电泳完成后将蛋白质转移至 PVDF 膜上。将 PVDF 膜用 5%脱脂奶粉/TBS 封闭液室温振荡封闭 1h 后,加入适当稀释的一抗 4 $^{\circ}$ C 下过夜。滴加辣根过氧化物酶标记二抗,在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 1h,并采用 ECL 显色系统显色。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。所有测定重复至少 3 次。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 19.0 统计软件进行统计学分析,计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,同时间点假手术组、模型组、EA 组组间比较采用单因素方差分析(One Way ANOVA)后进行 Dunnet's post hoc 检验,EA+H89 组与 EA+NS 组组间比较采用独立样本 *t* 检验(two-sample *t*-test)。同组别 3 个不同时间点间比较亦采用单因素方差分析(One Way ANOVA)后进行 Dunnet's post hoc 检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 大鼠海马区 miR132 的表达 同时间点各组大鼠间的 miR132 表达量相比,7、14、21d 时,模型组大鼠 miR132 的表达量较假手术组均显著下降( $P < 0.05$ );EA 组较模型组 miR132 的表达量均显著增多( $P < 0.05$ );EA+H89 组较 EA+NS 组 miR132 的表达量均显著下降( $P < 0.05$ )。同组别 3 个不同时间点之间 miR132 表达量相比,模型组、EA 组随着时间延长,miR132 的表达量有逐渐下降的趋势,但各时间点间差

异无统计学意义;EA+NS 组大鼠在 14d 时 miR132 的表达量较 7d 显著增加,但 21d 时 miR132 的表达量较 14d 显著减少( $P < 0.05$ )。见表 1。

2.2 大鼠海马区 p250GAP 蛋白的表达 同时间点各组大鼠间的 p250GAP 蛋白表达量相比,7、14、21d 时,模型组与假手术组大鼠相比,海马区 p250GAP 蛋白量均显著增多( $P < 0.05$ ),EA 组与模型组大鼠相比,海马区 p250GAP 蛋白量均显著减少( $P < 0.05$ ),且 14d 时,EA 组与假手术组大鼠相比,海马区 p250GAP 蛋白量亦显著减少( $P < 0.05$ );EA+H89 组与 EA+NS 组比较,海马区 p250GAP 蛋白量均明显增多( $P < 0.05$ )。见表 1。同时间点各组大鼠间的 p250GAP 蛋白上样顺序及典型条带见图 1。

表 1 各组大鼠海马神经元 miR132 及 p250GAP 蛋白表达量比较  $\bar{x} \pm s$

组别	时间	miR132	p250GAP 蛋白
假手术组	7d	1.00 $\pm$ 0.01	0.16 $\pm$ 0.01
	14d	1.00 $\pm$ 0.07	0.35 $\pm$ 0.02
	21d	1.00 $\pm$ 0.03	0.18 $\pm$ 0.02
模型组	7d	0.67 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	0.31 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>
	14d	0.61 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	0.56 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>
	21d	0.59 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	0.32 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>
EA 组	7d	1.08 $\pm$ 0.08 <sup>b</sup>	0.18 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>
	14d	1.07 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	0.21 $\pm$ 0.02 <sup>ab</sup>
	21d	0.90 $\pm$ 0.07 <sup>b</sup>	0.19 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>
EA+H89 组	7d	0.77 $\pm$ 0.04 <sup>c</sup>	0.39 $\pm$ 0.04 <sup>c</sup>
	14d	0.84 $\pm$ 0.03 <sup>c</sup>	0.50 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>
	21d	0.66 $\pm$ 0.04 <sup>c</sup>	0.35 $\pm$ 0.07 <sup>c</sup>
EA+NS 组	7d	1.05 $\pm$ 0.07	0.22 $\pm$ 0.04
	14d	1.52 $\pm$ 0.04 <sup>d</sup>	0.32 $\pm$ 0.04
	21d	0.91 $\pm$ 0.02 <sup>e</sup>	0.20 $\pm$ 0.01

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

## 3 讨论

miRNA 主要通过降解靶 mRNA 或抑制靶 mRNA 翻译参与细胞转录后调节,在细胞增殖、分化、凋亡、代谢、胚胎发育等一系列生命过程中起重要作用<sup>[11]</sup>,同时参与许多疾病的病理过程。Dhar 等<sup>[10]</sup>发现肥胖基因 Leptin 可以通过促进海马神经元 miR132 表达抑制

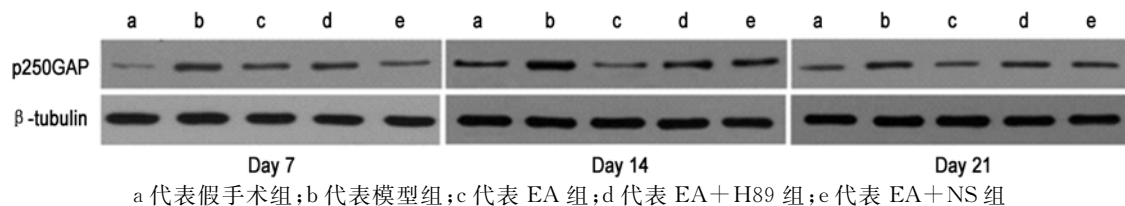


图 1 各组大鼠海马组织 p250GAP 蛋白的表达

GTP 酶活化蛋白 p250GAP 而促进树突棘成熟,影响突触形成。另一项研究也表明, BDNF 可能通过调控 miR132 及 p250GAP 蛋白的表达促进视网膜神经节细胞 (retinal ganglion cells, RGC) 的轴突分枝<sup>[12]</sup>。miR132 的上调会特异性的定位于动态突触, 在长时程突触激活和记忆过程中发挥重要作用<sup>[13]</sup>。本研究发现, 在 7、14、21d 时, 脑缺血会引起大鼠海马组织 miR132 水平显著下降, 同时伴有 p250GAP 蛋白显著增多; EA 治疗可以明显促进 miR132 上调, p250GAP 蛋白下调, 提示 EA 可能通过对 miR132 及 p250GAP 蛋白的调控影响突触形成, 这可能是电针改善脑缺血后学习记忆功能障碍的作用机制之一。模型组、EA 组三个不同时间点相比时, 随着时间延长, miR132 的表达量有逐渐下降的趋势, 提示随着缺血缺氧时间延长, miR132 的下降会进行性加重, 尽管 EA 组较同时间点模型组大鼠 miR132 的下降的严重程度已显著缓解, 但并不能完全逆转或遏制 miR132 的下降水平。在 western blot 实验中, 电泳条件及曝光时间对免疫沉淀复合物的相对光密度影响较大, 此次实验并不能提供同组别不同时间点标本的电泳图, 若直接使用同时间点不同组别样品上样后的实验结果进行比较没有实际意义, 这也是下一步有待完善之处。

蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA)、Ca<sup>2+</sup>/钙调蛋白激酶 IV (Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type IV, CaMK IV) 等都能通过磷酸化 CREB 参与学习记忆形成机制<sup>[14]</sup>, 其中, 大量研究表明, PKA/CREB 信号通路对学习记忆过程至关重要<sup>[15]</sup>。为了验证 PKA/CREB 信号通路激活是否可能涉入 EA 对 miR132 的调节作用, 我们给予 PKA 特异性抑制剂-H89 后观察 EA 的上述作用是否会被抑制。结果表明, 侧脑室注射 H89 的大鼠, 虽然按同样方法在手术次日开始进行 EA 治疗, 但在 7、14、21d 时, 相比侧脑室注射 NS 的大鼠, EA 对 miR-132、p250GAP 蛋白有利的调节作用均受到抑制, 提示 PKA/CREB 信号通路可能是 EA 调控 miR132 表达及作用的内在机制之一。

综上所述, 电针刺激百会穴和大椎穴 7、14 或 21d 时均可以调控 miR-132 及 p250GAP 蛋白的表达, 其内在机制可能与 PKA/CREB 信号通路激活相关。但 EA 能否因此调控海马神经元树突生长和分枝, 以及动态突触形成等, 进而发挥改善突触可塑性和学习记忆功能的作用还有待下一步深入研究。

### 【参考文献】

[1] Gorelick P B, Nyenhuis D. Understanding and treating vascular

cognitive impairment [J]. Continuum (Minneapolis, Minn), 2013, 19 (2): 425-437.

[2] Shi G X, Liu C Z, 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] Yu J, Zhang X, Liu C, et al. Effect of acupuncture treatment on vascular dementia [J]. Neurological Research, 2006, 28 (1): 97-103.

[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]. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2013, 20(1): 1-8.

[5] Li Q Q, Shi G X, Yang J W, et al. Hippocampal cAMP/PKA/CREB is required for neuroprotective effect of acupuncture [J]. Physiol Behav, 2015, 13(9): 482-490.

[6] Vo N, Klein M E, Varlamova O, et al. A cAMP-response element binding protein-induced microRNA regulates neuronal morphogenesis [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102 (45): 16426-16431.

[7] Conaco C, Otto S, Han J J, et al. Reciprocal actions of REST and a microRNA promote neuronal identity [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103 (7): 2422-2427.

[8] Wang W X, Huang Q, Hu Y, et al. Patterns of microRNA expression in normal and early Alzheimer's disease human temporal cortex; white matter versus gray matter [J]. Acta Neuropathol, 2011, 121 (2): 193-205.

[9] Magill S T, Cambronne X A, Luikart B W, et al. microRNA-132 regulates dendritic growth and arborization of newborn neurons in the adult hippocampus [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, 107 (47): 20382-20387.

[10] Dhar M, Zhu M, Impey S, et al. Leptin Induces Hippocampal Synaptogenesis via CREB-Regulated MicroRNA-132 Suppression of p250GAP [J]. Molecular Endocrinology, 2014, 28 (7): 1073-1087.

[11] Fasanaro P, Greco S, Ivan M, et al. microRNA: emerging therapeutic targets in acute ischemic diseases [J]. Pharmacol Ther, 2010, 125(1): 92-104.

[12] Marler K J, Suetterlin P, Dopplapudi A, et al. BDNF Promotes Axon Branching of Retinal Ganglion Cells via miRNA-132 and p250GAP [J]. Journal of Neuroscience, 2014, 34 (3): 969-979.

[13] Nudelman A S, DiRocco D P, Lambert T J, et al. Neuronal activity rapidly induces transcription of the CREB-regulated microRNA-132, in vivo [J]. Hippocampus, 2010, 20 (4): 492-498.

[14] Bell K F S, Bent R J, Meese-Tamuri S, et al. Calmodulin Kinase IV-dependent CREB activation is required for neuroprotection via NMDA receptor-PSD95 disruption [J]. Journal of Neurochemistry, 2013, 126 (2): 274-287.

[15] Abel T, Nguyen P V, Barad M, et al. Genetic demonstration of a role for PKA in the late phase of LTP and in hippocampus-based long-term memory [J]. Cell, 1997, 88 (5): 615-626.