

医学康复

· 基础研究 ·

电针曲池、足三里对缺血再灌注大鼠缺血侧运动皮层小胶质细胞与外泌体蛋白的影响及机制

金婷婷^{1,2}, 柳维林^{1,3}, 李钻芳⁴, 李建鸿^{1,3}, 张嘉泳¹, 李乐¹, 张宇豪¹, 陈立典^{1,5}, 陶静^{1,5}

【摘要】 目的:探究缺血再灌注损伤大鼠缺血侧运动皮层中 M2 型小胶质细胞衍生的外泌体表达,观察电针曲池、足三里穴对缺血再灌注损伤大鼠运动功能的影响及其可能机制。方法:36 只雄性 SD(Sprague-Dawley)大鼠随机分为假手术组、模型组和电针组各 12 只,采用 Zea-Longa 神经行为学评分进行神经功能缺损评定;Catwalk 跑台实验评估运动功能;免疫组化法标记缺血侧运动皮层 M2 型小胶质细胞阳性细胞数量,免疫荧光双标法标记其外泌体蛋白 CD81 的表达。结果:干预 7 d 后,电针组与模型组大鼠相比,Zea-Longa 评分显著降低($P<0.05$);步行速度增快($P<0.01$),持续时间减少($P<0.05$),大鼠爪印面积显著性增加($P<0.01$);缺血侧运动皮层 M2 型小胶质细胞及其分泌的外泌体蛋白 CD81 增多,差异均有统计学意义($P<0.01$)。结论:电针曲池、足三里穴可促进缺血侧运动皮层 M2 型小胶质细胞外泌体的分泌,发挥神经保护作用,有效改善缺血再灌注损伤大鼠的运动功能。

【关键词】 缺血再灌注;M2 型小胶质细胞;外泌体;电针

【中图分类号】 R49;R681 **【DOI】** 10.3870/zgkf.2019.08.001

Effects of electroacupuncture at Quchi and Zusanli on microglia and exosome protein in ischemic motor cortex of ischemia-reperfusion rats and mechanism Jin Tingting, Liu Weilin, Yang Minguang, et al. College of Rehabilitation Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China

【Abstract】 **Objective:** To investigate the expression of M2 microglia-derived exosomes in the ischemic motor cortex of rats with ischemia-reperfusion injury, and to observe the effects of electroacupuncture at Quchi and Zusanli on motor function in rats with ischemia-reperfusion injury and possible mechanisms. **Methods:** Thirty-six male Sprague-Dawley rats were randomly divided into sham operation group, model group and electroacupuncture group ($n=14$ each). Zea-Longa neurobehavioral score was used for neurological deficit assessment. Catwalk treadmill experiment was used to evaluate motor function. The number of M2 microglia positive cells in the ischemic motor cortex was marked by immunohistochemistry, and the expression of exosome protein CD81 was detected by immunofluorescence double labeling. **Results:** After 7 days of electroacupuncture intervention, the Zea-Longa score was significantly reduced ($P<0.05$), the walking speed increased significantly ($P<0.01$), the duration decreased significantly ($P<0.05$), the paw print area of the rats increased significantly ($P<0.001$), and the number of M2 type microglia and the secretion of exogenous protein CD81 increased significantly in the ischemic motor cortex ($P<0.01$) in the electroacupuncture group as compared with those in the model group. **Conclusion:** Electroacupuncture at Quchi and Zusanli can promote the secretion of M2 type of microglia exosomes in the ischemic motor cortex, play a neuroprotective role and effectively improve the motor function of rats with ischemia-reperfusion injury.

【Key words】 cerebral ischemia; M2 type of microglia; exosomes; electroacupuncture

基金项目:国家自然科学基金(81373778);福建省自然科学基金项目(2016J01397)

收稿日期:2018-12-25

作者单位:1. 福建中医药大学康复医学院,福州 350122;2. 福建省康复技术重点实验室,福州 350122;3. 福建康复产业研究院技术创新平台,福州 350122;4. 福建中西医结合研究院,福州 350122;5. 国家中医药管理局中医康复研究中心,福州 350122;

作者简介:金婷婷(1995-),女,硕士研究生,主要从事神经康复与认知科学方面的研究。

通讯作者:陶静,taojing01@fjtcu.edu.cn

脑卒中是世界范围内死亡的主要原因之一,约 75% 的幸存者因脑卒中导致残疾,运动功能障碍是脑卒中后残疾的主要的功能障碍表现之一^[1-2]。小胶质细胞的激活和极化在脑损伤后神经炎症中发挥重要作用,具有不同的表型并发挥不同的功能^[3]。研究表明中枢神经系统神经炎症疾病,可以通过外泌体调节外周免疫反应^[4]。M2 型小胶质细胞衍生的外泌体可以通过控制释放炎性细胞因子,从而调节神经炎症反

应^[5]。通过团队前期研究发现,电针曲池和足三里穴可以促进缺血性脑卒中后运动功能障碍的恢复^[6-7]。因此本研究通过电针缺血再灌注大鼠的曲池、足三里穴观察其是否通过影响小胶质细胞衍生的外泌体的分泌,进而改善大鼠脑缺血后的神经功能缺损症状及运动功能障碍。

1 材料与方法

1.1 材料 ①实验动物:36只SPF级雄性Sprague-Dawley大鼠,购于上海斯莱克实验动物责任有限公司,体质量(280 ± 20)g,生产许可证号SCXK(沪)2012-0002。由福建中医药大学实验动物中心提供,其许可证号为:SYXK(闽)2005-004。环境及饮食符合实验动物标准,每笼5~6只,适应性喂养1周后,进行造模和干预。所有动物方案均根据实验动物使用指南(National Academy Press)进行。②主要试剂和仪器:G6805电针仪(苏州医疗用品厂有限公司);免疫组化试剂盒(迈新公司);CD81一抗(Cell Signaling Technology公司);Arginase一抗(ABCAM公司);Catwalk XT 10.0(荷兰Noldus Information Technology公司);莱卡DM4000B LED倒置显微镜(德国莱卡公司)。

1.2 方法 ①造模与分组:将36只SD大鼠随机分为假手术组、模型组和电针组各12只。模型组和电针组参考改良Koizumi法制备左侧大脑缺血再灌注动物模型^[8],术前禁食12h,腹腔注射3.0%异氟烷麻醉并固定。将颈部皮肤中央纵向剪开约2cm,肌肉和结缔组织解离暴露左侧颈总、颈外和颈内动脉。结扎左侧颈总、颈外动脉,将颈内动脉近心端预留结扎线,微动脉夹暂时夹闭左侧颈内动脉;将线栓从左侧颈总动脉结扎处远端3mm处插入,直至大脑前动脉近端,从颈外动脉的残端沿颈内动脉插入(18 ± 2)cm深;结扎左侧颈内动脉上预留的线并固定线栓;缝合皮肤,检查、清洗手术创口;90min后退出线栓,造成缺血再灌注模型。假手术组只分离颈总、颈内动脉和颈外动脉,不予结扎动脉和线栓插入。将造模后大鼠置于25℃环境下苏醒,术中、术后均注意保暖。②干预方法:电针组大鼠穴位参考《实验针灸学》^[9],取曲池、足三里穴。采用华佗牌30号0.5寸毫针,斜刺0.2cm左右。接G6805电针仪,疏密波,频率2~20Hz,电流强度1~3mA。每次0.5h,每天1次,电针7d。假手术组和模型组每天同一时间同等条件抓取后回笼饲养,不予任何治疗。

1.3 检测指标 ①神经功能缺损评估:采取Zea-Longa法在造模2h后对大鼠进行神经功能缺损评分,

评分为0~4分。0分,无神经功能缺损体征;1分,对侧前爪不能完全伸展;2分,向偏瘫侧转圈;3分,行走时向偏瘫侧倾倒;4分,不能自发行走,意识丧失。②Catwalk测试:测试前采用Catwalk步态分析系统进行1周的适应性训练^[10]。各组大鼠在电针治疗7d后,经神经行为学评分完成后接受Catwalk系统步态分析,整个实验过程在暗室环境中完成,每次必须持续地穿过固定长度范围的玻璃平板,该系统在可以从速度、持续时间、爪印面积等方面检测大鼠得分肢体运动功能障碍的改变情况。③免疫组化染色:各组大鼠在行为学检测后灌注取脑,制备5μm冠状切片。经过脱蜡、梯度酒精脱水,柠檬酸抗原修复后,滴加3% H₂O₂常温孵育10min;PBS漂洗3次;10%山羊血清常温封闭10min;滴加一抗Arginase(1:200),于湿盒中4℃过夜;室温中复温30min,滴加生物素标记二抗,室温孵育10min,PBS漂洗3次;滴加链霉卵白素-过氧化物酶,室温10min;PBS漂洗3次;滴加DAB显色剂,苏木素染色后返蓝、封片。结合细胞构筑信息,并参考大鼠脑定位图谱,确定运动皮层的位置。每只大鼠选取6个视野使用Motic Med 6.0病理图像分析系统,计算阳性率(阳性细胞数/总细胞数)。④免疫荧光染色:组织切片后使用柠檬酸修复,5%胎牛血清封闭后室温孵育2h。依据分组加入兔抗Arginase多克隆抗体(1:100, Abcam)、鼠抗CD81多克隆抗体(1:20, Abcam),于湿盒中4℃过夜;室温复温30min,分别加入羊抗兔荧光二抗(1:500, invitrogen),和羊抗鼠荧光二抗(1:500, invitrogen),37℃孵育2h,PBS漂洗3次。使用含有DAPI的抗荧光淬灭封片剂封片后用德国莱卡免疫荧光显微镜下观察并拍照,计数阳性细胞数量。

1.4 统计学分析 采用SPSS 24.0统计软件进行统计分析,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,免疫组化和免疫荧光结果符合正态分布的采用单因素方差分析(one-way ANOVA),Zea-Longa评分不符合正态分布,采用非参数检验中的Kruskal-Wallis H和Mann-Whitney检验比较。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3组大鼠Zea-longa神经功能缺损评分结果比较 与假手术组相比,造模后2h,模型组和电针组Zea-longa神经功能缺损评分明显升高($P < 0.01$)。电针干预7d后,电针组相比模型组Zea-longa神经功能缺损评分明显降低($P < 0.05$)。见表1。

表 1 3 组大鼠缺血再灌注后 2h 及 7d 时 Zea-longa 评分比较

组别	n	缺血再灌注后 2h	缺血再灌注后 7d
假手术组	12	0	0
模型组	12	2.83±0.58 ^a	2.34±0.43
电针组	12	2.92±0.51 ^a	1.58±0.52 ^b

与假手术组比较,^a $P<0.01$;与模型组比较,^b $P<0.05$

2.2 电针曲池、足三里穴对动物整体行为学的影响

干预 7d 后,Catwalk 步态分析系统显示,模型组相比假手术组及电针组大鼠穿过 Catwalk 跑道的平均速度减慢($P<0.01$),而持续时间增加($P<0.01$),爪印面积(左前爪 LF、左后爪 LH、右前爪 RF;右后爪 RH)减少($P<0.05$);电针组相比模型组大鼠平均速度增快($P<0.01$),持续时间减少($P<0.05$),爪印面积明显增加(左前爪 LF、左后爪 LH、右前爪 RF、右后爪 RH)($P<0.01$),见表 2,3。

表 2 3 组大鼠干预 7d 后 Catwalk 步态分析平均速度和持续时间比较

组别	n	平均速度(cm/s)	持续时间(s)
假手术组	12	15.60±1.16	2.15±0.30
模型组	12	6.17±1.06 ^a	5.79±0.58 ^a
电针组	12	9.37±0.94 ^{ab}	3.34±0.85 ^{ac}

与假手术组比较,^a $P<0.01$;与模型组比较,^b $P<0.01$,^c $P<0.05$

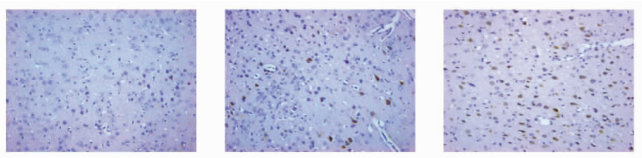
表 3 3 组大鼠干预 7d 后爪印面积比较

组别	n	左前爪 LF	左后爪 LH	右前爪 RF	右后爪 RH
假手术组	12	0.71±0.04	0.87±0.08	0.68±0.13	0.86±0.07
模型组	12	0.57±0.18 ^a	0.78±0.06 ^a	0.44±0.77 ^a	0.52±0.22 ^a
电针组	12	0.63±0.07 ^{ab}	0.80±0.04 ^{ab}	0.53±0.12 ^{ab}	0.79±0.08 ^{ab}

与假手术组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.01$

2.3 3 组大鼠缺血侧运动皮层 M2 型小胶质细胞情况比较

干预 7d 后,采用免疫组化法检测缺血侧运动皮层 Argnise 的阳性率,结果表明电针组 Argnise 的表达明显比模型组增多($P<0.01$)。见图 1a~c,表 4。



a. 假手术组 b. 模型组 c. 电针组

图 1a~c 干预 7d 后 3 组大鼠缺血侧运动皮层 Argnise 表达(免疫组化染色 200 倍)

2.4 3 组大鼠缺血侧运动皮层小胶质细胞分泌的外泌体情况比较

干预 7d 后,采用免疫荧光法检测缺血侧皮层小胶质细胞衍生的外泌体 CD81 的表达,结果表明,模型组和电针组 Argniseey 及缺血侧运动皮层 CD81/Argnise 阳性细胞数多于假手术组($P<0.01$),且电针组缺血侧运动皮层 CD81/Argnise 阳性细胞数多于模型组($P<0.01$)。CD81 在假手术组中分泌于未极化状态的 M2 型小胶质细胞表面,模型组和电针组分泌于脑卒中后极化状态下的 M2 型小胶质细胞表面。见图 2a~c,表 4。

表 4 3 组大鼠干预 7d 后缺血侧运动皮层 Argnise 及 CD81/Argnise 结果比较

组别	n	Argnise	CD81/Argnise
假手术组	4	0.19±0.06	4.75±0.96
模型组	4	0.37±0.83 ^a	16.75±8.06 ^a
电针组	4	0.68±0.04 ^{ab}	48.50±1.91 ^{ab}

与假手术组比较,^a $P<0.01$;与模型组比较,^b $P<0.01$

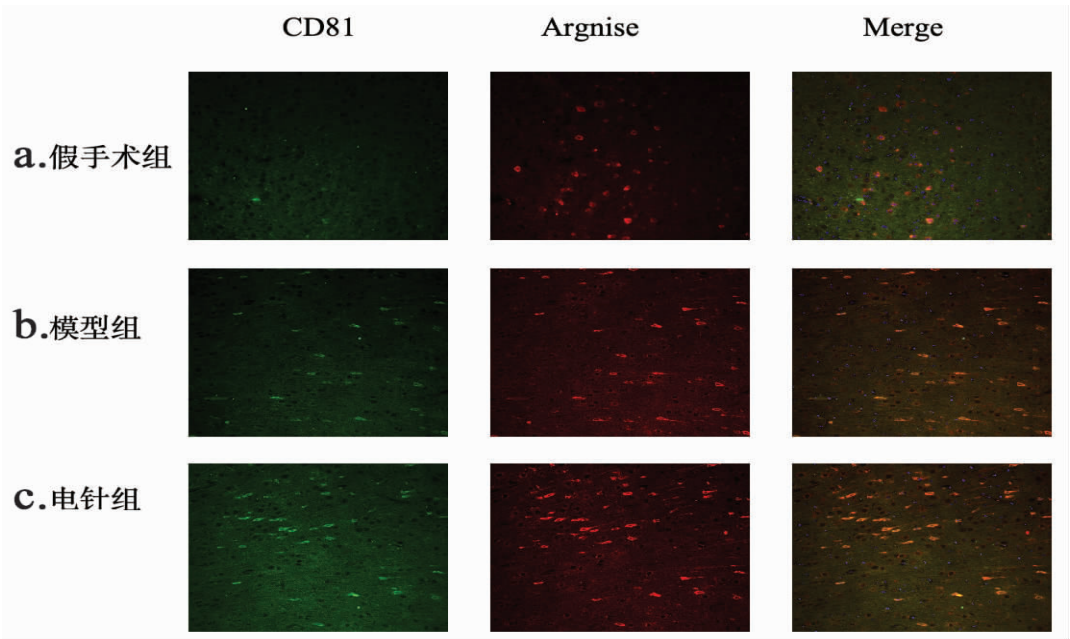


图 2a~c 干预 7d 后 3 组大鼠缺血侧运动皮层 CD81/Argnise 表达(免疫荧光染色 200 倍)

3 讨论

脑卒中属于中医学“中风”范畴,中医认为以阳气经气受阻,经脉失其所养而致。故治疗原则当以调整气血、平衡阴阳、疏通经脉为主。《内经》明确指出针灸可以作为治疗中风的有效方法之一。本课题组通过前期文献梳理,发现曲池、足三里穴在古籍中为中风病治疗的常用的穴位。本研究也发现电针曲池、足三里穴可以通过增加小胶质细胞衍生的外泌体的分泌,有效改善缺血再灌注大鼠运动功能,缓解缺血再灌注损伤后的神经功能缺损。

小胶质细胞占总神经胶质细胞总数的 20%,是中枢神经系统的常驻吞噬细胞,主要功能是维持脑组织稳态,在缺血再灌注损伤中小胶质细胞也发挥了重要的调节作用^[11]。小胶质细胞又分为 M1(促炎)和 M2(抗炎)细胞,促炎症表型旨在保护和修复 CNS 免受损伤,然而在神经系统中过度 and 长期的神经炎症可能会加重脑损伤。M2 表型可选择活化状态,抑制炎症并且有效恢复体内平衡^[12]。外泌体作为纳米囊泡(直径约 30~100 nm)的一种,通过递送蛋白质,脂质和核酸靶向细胞功能,正在成为疾病阶段特异性信息的宝贵来源,并作为不同病理生理状态下的潜在生物标志物^[13],在神经系统疾病中发挥重要作用。外泌体中含有促炎和抗炎信号,可以作为治疗中风的有效载体^[14]。小胶质细胞衍生的外泌体含有各种生物活性分子,可以调节神经元功能并且影响周围非神经元细胞的活性,可以通过将未成熟的 IL-1 β 转化为生物活性分子调节急性炎症反应^[15]。

本课题证实电针曲池、足三里穴能够显著改善脑缺血再灌注大鼠的神经功能缺损症状,增加了 M2 型小胶质细胞的数量,并且促进 M2 型小胶质细胞外泌体的表达,促进运动功能的恢复。综上所述,电针曲池、足三里穴可以有效地改善缺血再灌注大鼠改善大鼠脑缺血后的神经功能缺损症状及运动功能障碍,其作用可能与增加 M2 型小胶质细胞衍生的外泌体的分泌有关,但电针如何促进外泌体分泌的机制尚未明确,在今后的研究中应予以深入研究。

【参考文献】

- [1] Wang Y, Liao X, Zhao X, et al. Using recombinant tissue plasminogen activator to treat acute ischemic stroke in china analysis of the results from the Chinese National Stroke Registry (CNSR) Stroke. 2011, 42 (11):1658-1664.
- [2] Dimyan MA, Cohen LG. Neuroplasticity in the context of motor rehabilitation after stroke[J]. Nat Rev Neurol, 2011, 7(2):76-85.
- [3] Xiong XY, Liu L, Yang QW. Functions and mechanisms of microglia/macrophages in neuroinflammation and neurogenesis after stroke. [J]. Prog Neurobiol. 2016, 142(1):23-44.
- [4] Selmaj I, Mycko MP, Raine CS, et al. The role of exosomes in CNS inflammation and their involvement in multiple sclerosis[J]. J Neuroimmunol. 2017, 306(1):1-10.
- [5] Turola E, Furlan R, Bianco F, et al. Microglial microvesicle secretion and intercellular signaling[J]. Front Physiol, 2012, 3(2):149-155.
- [6] 郑慧, 柳维林, 上官豪, 等. 电针对局灶性脑缺血再灌注大鼠缺血周围皮质与纹状体区波形蛋白表达的影响[J]. 中国康复医学杂志, 2016, 31(1):14-19.
- [7] 陶静, 柳维林, 黄佳, 等. 基于 Notch1 信号通路观察电针对脑缺血再灌注大鼠缺血周围皮质与 SVZ 区神经干细胞增殖的影响[J]. 康复学报, 2015, 25(3):23-34.
- [8] Koizumi J, Yoshida Y, Nakazawa T, et al. Experimental studies of ischemic brain edema: A new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area [J]. Jpn J Stroke, 1986, 8 (1):1-8.
- [9] 李忠仁. 实验针灸学[M]. 北京:中国中医药出版社, 2003:22-23.
- [10] Miyagi M, Ishikawa T, Kamoda H, et al. Assessment of gait in a rat model of myofascial inflammation using the CatWalk system[J]. Spine, 2011, 36(21): 1760-1764.
- [11] Saijo K, Glass CK. Microglial cell origin and phenotypes in health and disease[J]. Nat Rev Immunol, 2011, 11(11):775-787.
- [12] Tay TL, Savage JC, Hui CW, et al. Microglia across the lifespan: from origin to function in brain development, plasticity and cognition[J]. J Physiol, 2017, 595(6): 1929-1945.
- [13] Rufino Ramos D, Albuquerque PR, Carmona V, et al. Extracellular vesicles: Novel promising delivery systems for therapy of brain diseases[J]. J Control Release. 2017, 262(3):247-258.
- [14] Chen J, Chopp M. Exosome Therapy for Stroke[J]. Stroke, 2018, 49 (5):1083-1090.
- [15] Gabrielli M, Battista N, Riganti L, et al. Active endocannabinoids are secreted on extracellular membrane vesicles[J]. EMBO Rep, 2015, 16(2): 213-220.