

电针对缺血性脑卒中再灌注损害大鼠 CREB 表达的影响

杨珊莉¹ 江一静² 陶 静¹ 陈立典²

(1 福建中医药大学附属康复医院,福州,350001; 2 福建中医药大学,福州,350108)

摘要 目的:探寻电针对缺血性脑卒中再灌注损害大鼠 cAMP 反应原件结合蛋白(cAMP-response Element Binding Protein, CREB)表达的影响。方法:将 60 只健康成年的 SD 大鼠驯养 3 d 随机分成假手术组、模型组以及电针组,每组各 20 只,使用线栓法大脑中动脉闭塞(Middle Cerebral Artery Occlusion, MCAO)对模型组、电针组大鼠进行脑缺血模型制作,缺血 2 h 后进行再灌注,电针组大鼠接受电针干预,再灌注 3 d 后将大鼠断头取脑,进行 2,3,5-氯化三苯基四氮唑(2,3,5-triphenyltetrazolium chloride, TTC)染色以及图像软件分析观察脑梗死体积,免疫蛋白印迹法(Western blotting)检测 CREB 蛋白水平,聚合酶链反应(Reverse Transcription-polymerase Chain Reaction, PCR)检测 CREB 的基因表达水平。结果:TTC 及其图像软件分析表明,电针组的 SD 大鼠脑梗死面积明显小于模型组($P < 0.01$);电针组的 SD 大鼠 CREB 蛋白水平明显高于模型组($P < 0.01$);电针组的 SD 大鼠 CREB 基因水平明显高于模型组($P < 0.01$)。结论:电针改善脑缺血再灌注损伤可以通过上调 CREB 实现。

关键词 脑缺血;再灌注损伤;电针;cAMP 反应原件结合蛋白

The Impact of Electro-Acupuncture on the Expression of CREB in Ischemia-Reperfusion Rats

Yang Shanli¹, Jiang Yijing², Tao Jing¹, Chen Lidian²

(1 Rehabilitation Hospital affiliated to Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, 350001, China;

2 Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, 350108, China)

Abstract Objective: To explore the impact of electro-acupuncture on the expression of CREB in the ischemia-reperfusion rats. **Methods:** Sixty healthy adult SD rats which were domesticated for 3 days were randomly divided into the sham group, the model group and the electro-acupuncture group. There were 20 rats in each group. The rats of the model group and the electro-acupuncture group were given the line bolt method (MCAO) to complete the brain ischemia model, and were reperfused 2 hours after ischemia. The electro-acupuncture group adopted the intervention of electro-acupuncture. Three days after the reperfusion, all the rats were beheaded and taken brains. The cerebral infarction volume was observed through TTC staining and image analysis, and the protein expression of CREB were detected by protein imprinting method (Western blotting) and gene expression of CREB were tested by Real-Time PCR. **Results:** TTC and the image analysis showed that the cerebral infarction volume of electro-acupuncture group was significantly smaller than that of the model group ($P < 0.01$); the CREB protein level in the electro-acupuncture group was obviously higher than that of the model group ($P < 0.01$); the CREB gene level in the electro-acupuncture group was much higher than that of the model group ($P < 0.01$). **Conclusion:** Electro-acupuncture can realize the improvement of the cerebral ischemia reperfusion injury by up-regulating CREB.

Key Words Cerebral ischemia; Reperfusion injury; Electro-acupuncture ;CREB

中图分类号:R245.9;R255.2 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2014.02.027

脑卒中是一组突然起病,以局灶性神经功能缺失为共同特征的急性脑血管疾病,具有发病率高、死亡率高、致残率高及复发率高等特点,是当今严重威胁人类健康与生命的主要疾病,2004 年世界卫生组织报告^[1]指出全球每年约有 1 500 万新发脑卒中患者,约 500 万患者发病后死亡。2011 年“世界卒中日”最新调查结果显示,我国脑卒中的发病率以每年 9% 的速度上升,已经成为我国国民第一位死亡原因,死亡率高于欧美国家 4~5 倍^[2]。脑卒中中最常见的是缺血性脑卒中,其发病率占脑卒中的 85% 以上,常造成人类中枢神经系统大量神经细胞缺失和神经网络受损,导致患者长

期神经功能障碍^[3]。缺血所导致的组织受损是临床上死亡的主要原因之一。在缺血性疾病的急救过程中临床工作者逐渐发现,缺血本身对组织造成的损害远远低于恢复血供后过量的自由基攻击缺血组织细胞所造成的“组织缺血再灌注损伤”。缺血性组织恢复血供后活性氧自由基水平上调,组织经过缺血后合成抗氧化酶能力下降,过氧化物被转换为无害的物质的过程障碍,导致过氧化物在体内堆积而加剧了对缺血后再灌注组织的损伤。目前治疗脑卒中后肢体功能障碍的方法多种多样,其中电针疗法在治疗缺血性脑血管病已被认为是行之有效的方法之一,且不存在血脑屏障

的问题。但其具体机制仍处于不断的探索中。本课题立足于探索电针改善缺血性脑卒中肢体运动状态的机理,以丰富中医针刺治疗脑卒中的理论基础,为同类研究提供可靠的理论依据。笔者通过对 60 只成年 SD 进行造模干预观察,探寻电针对大鼠脑缺血再灌注损伤的神经保护机理,报道如下。

1 材料和方法

1.1 动物及其分组 60 只健康成年清洁级 SD 大鼠,体重 220 ~ 280 g,平均(250 ± 30)g,鼠龄 2.5 ~ 4 个月,平均(2 ± 0.2)月。大鼠全由北京维通利华实验动物技术有限公司提供。60 只大鼠随机分成假手术组、模型组、电针组,每组各 20 只,3 组大鼠在体重、鼠龄等一般情况方面无统计学差异,具有可比性。

1.2 模型制作 参照改良的 Zea Longa^[4]方法制备大鼠 MCAO 模型。首先使用 10% 水合氯醛按照 0.3 mL/kg 的剂量对大鼠进行腹腔注射麻醉,随之将处于麻醉状态的大鼠固定于手术台,剔除大鼠颈部皮毛,与颈部正中切开长约 3 cm 的切口,将左侧颈总动脉(Common Carotid Arteries, CCA)充分暴露,逐步剥离迷走神经,将颈外动脉(External Carotid Artery, ECA)和颈内动脉(Internal Carotid Artery, ICA)充分剥离暴露,将 CCA 远心端充分结扎,用动脉夹夹闭 ICA 近分叉口处,同时将 ECA 近分叉口处充分结扎,在 CCA 近动脉分叉用显微剪剪一小口,用硅化鱼线(d = 0.26 mm, 鱼线的 2.0 mm 及 2.5 mm 处各用记号笔作标记)插入切口。松掉 ICA 的血管夹后鱼线缓慢向颈内动脉插入,可见第一个标记距动脉分叉约 2 mm 时停止,用缝合线将 CCA 和鱼线栓紧,缝好后用酒精棉球消毒皮肤缝合处。2 h 后将鱼线拔出 2 cm 长度,形成再灌注模型。假手术组大鼠只切开皮肤剥离颈总、颈外、颈内动脉,结扎颈总、颈外动脉后即缝合皮肤,缝好后用酒精棉球消毒皮肤缝合处。

1.3 治疗方法 3 组 SD 大鼠置于相同环境饲养,假手术组、模型组大鼠造模成功后第 1 天,开始模拟推拿、电针,用直径 40 mm 华佗牌牌针具点触穴位,每日 1 次,连续治疗 3 d;电针组参照李忠仁主编的《实验针灸学》常用实验动物针灸穴位取穴,对大鼠右侧合谷、外关、阳陵泉、足三里进行针刺,针刺深度上肢 4 ~ 6 mm,下肢 6 ~ 8 mm,连接刺激电极后对大鼠进行疏密波(疏波/密波 = 10 Hz, Hz/5 s, 10 s)的刺激,以大鼠针刺肢体出现节律的收缩、颤动为度,持续 30 min,每日 1 次,连续治疗 3 d。

1.4 标本采集 治疗结束后,按指标检测要求取材,具体操作如下:0.3 mL/kg 的 10% 水合氯醛剂量腹腔

注射麻醉,待小鼠麻醉完全后腹正中线切开腹腔,分离出腹主动脉后以采血针 + 真空管采集腹主动脉血液,随即冰盐水灌注取脑。

1.5 神经行为学评价 参照 Zealoga 神经损害评分标准^[5]:0 分,无神经损伤症状;1 分,不能完全伸展对侧前爪;2 分,向外侧转圈;3 分。向对侧倾倒;4 分,不能自发行走,意识丧失。1 ~ 3 分说明造模成功。

1.6 脑梗死体积计算 使用 TTC 染色法检测大鼠脑梗死的面积。各组大鼠断头取脑后将脑组织置于 -20 °C 冰箱冷冻 15 min 至脑组织变硬,用锋利刀片将大脑自大脑半球额极至枕极做连续冠状位切片,每片厚约 2 mm,切成 6 片。将脑片放入 1% TTC 磷酸缓冲液(PH = 7.4)后用锡箔纸盖住后,置于 37 °C 温箱 10 ~ 15 min,用毛笔不时翻动脑片,使脑片均匀接触到染色液。TTC 与正常组织中的脱氢酶反应而呈红色,而缺血组织内脱氢酶活性下降,不能反应,故脑梗死组织呈苍白色。利用 ImageProPlus 6.0 分析软件对脑梗死面积进行计算,然后得出脑梗死体积(梗死体积 = 梗死面积和 × 2 mm)。

1.7 Western - blotting 法测定蛋白水平变化 将所取大脑皮质 200 mg,加入 1 mL 裂解液,4 °C 进行匀浆,15 000 r/min 离心后取上清液,取 25 mL 上清液进行 BCA 法测定浓度并计算上样量。将上清液和上样缓冲液按照 4:1 比例混匀后置于 100 °C 的金属浴中变性 7 min。电泳(6% 浓缩胶,12% 分离胶,60V 145 min)结束后将凝胶取出,进行转印(100V 2 h)之后将 PVDF 膜取出,用丽春红对 PVDF 膜上的蛋白质进行预染,以证实蛋白质确实转移到膜上。使用 TBST 配置而成的 5% 脱脂奶粉进行封闭 2 h, TBST 洗 3 次,每次 10 min,分别加入相应抗体,4 °C 环境孵育过夜后 TBST 洗 3 次,每次 5 min,再用碱性磷酸酶标记山羊抗兔 IgG (1:1 000)室温 1 h, TBST 洗 3 次,每次 5 min。将 PVDF 膜放入显影仪器平板中,滴入 ECL 化学显影剂反应 1 min 后显影,计算机扫描,数据处理。

1.8 rtPCR 法测定基因水平变化 根据 NCBI 中 Genebank 基因库的设计引物序列,扩增片段长度约 100 ~ 300 bp。用 0.1% DEPC 水过夜室温或 37 °C 处理 1.5 mL Eppendorf 管和取液用 10 μL, 200 μL 和 1 mL Tip, 高温蒸气灭菌,80 °C 烘干备用。将 300 mg 大鼠大脑皮质组织加入 4.5 mL Trizol 提取液于冰上快速研磨后置于离心机中以 12 000 r/min 速度离心后取上清液,将上清液吸于另一新离心管后加入 1 mL 氯仿,用力震荡 15 s,冰上放置 5 min,再 12 000 r/min, 4 °C 离心 15 min,将上清液吸于另一新离心管后加入 3 mL 异丙

醇后均匀混合,冰上放置 15 min,12 000 r/min,4 ℃ 离心 15 min 后弃上清液,加入 1 mL 75% 乙醇轻轻摇晃,再 7 500 r/min,4 ℃ 离心 5 min 后将乙醇液弃去,冰上静置 10 min 后加入 DEPC - H₂O 溶解总 RNA 后进行逆转录。逆转录过程:95 ℃ (6 min)→55 ℃ (90 s)→72 ℃ (90 s)→72 ℃ (10 min)→5 ℃ (1 h)。Real - Time PCR 操作方法按照试剂盒说明书,使用 GAPDH 作为内部参照,将 GAPDH 的拷贝数作为校正基数,通过 ABI7500 软件获得检测指标 Ct (cycle threshold) 值,与同样本中 GAPDH 的 Ct 值相减,即获得该样本中相应指标的 ΔCt 值。以假手术组 ΔCt 值作为校正,软件根据 2^{-ΔΔCt} 数值计算得出检测指标基因浓度水平。

1.9 统计学处理 采用 SPSS 18.0 对所得数据进行统计分析,组间显著性比较采用 *t* 检验;计数资料以百分率表示,组间显著性比较采用卡方检验。

2 结果

2.1 电针对大鼠脑梗死面积的影响 电针组的 SD 大鼠脑梗死面积明显小于模型组 ($P < 0.01$),见表 1。

表 1 各组梗死体积变化比较 (m²)

组别	梗死面积
假手术组	0
模型组	34 ± 0.11
电针组	18 ± 0.58 **

注:与模型组比较,** $P < 0.01$ 。

2.2 电针对大鼠 CREB 蛋白水平的影响 电针组的 SD 大鼠 CREB 蛋白水平明显高于模型组 ($P < 0.01$),见图 1。

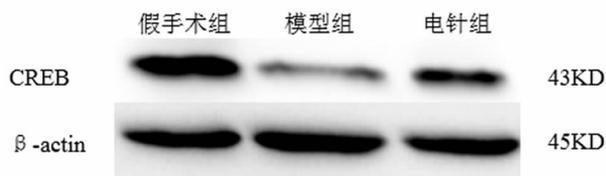


图 1 各组 CREB Western - blotting 结果比较

2.3 电针对大鼠 CREB 基因水平的影响 电针组的 SD 大鼠 CREB 基因水平明显高于模型组 ($P < 0.01$),见表 2。

表 2 CREB 基因变化比较 ($\bar{x} \pm s$, 光密度)

组别	CT (CREB)	CT (GAPDH)	2 ^{-ΔΔCT}
假手术组	23.99 ± 1.49	20.90 ± 1.23	1
模型组	28.04 ± 1.28	22.89 ± 1.55	0.23 ± 0.77 ΔΔ
电针组	26.63 ± 0.83	22.46 ± 0.83	0.48 ± 0.44 *

注:与模型组比较,* $P < 0.05$;与假手术组比较,ΔΔ $P < 0.01$ 。

3 讨论

CREB 是一种聚在脑细胞的分子,作用在于刺激特定基因,制造蛋白质,强化细胞彼此的连接。通过激活 CREB 实现启动细胞内一系列信号转导通路来促进

神经元存的目的。CREB 属于 cAMP 结合元件依赖蛋白,脑缺血疾病发生后蛋白激酶与 ATP 结合催化成 cAMP 的过程受抑制,机体 cAMP 浓度由此下降,因而抑制了 CREB 的激活,不利于改善神经元的内生长状态,影响神经元轴突再生^[5-7]。有研究表明脑缺血后及早增强的磷酸化 CREB,可阻止脑缺血半影区梗死灶的扩大,同时体外研究发现磷酸化 CREB 在介导神经元对各种神经营养素,如 BDNF 和 NGF 的反应方面起重要作用。另外,CREB 还可调节多种基因的表达,参与脑缺血损伤的内源性保护机制^[8-15]。

本课题实验结果显示,脑缺血再灌注损伤大鼠经过电针干预后脑梗死面积明显缩小,CREB 的表达水平明显升高,说明电针干预可通过上调 CREB 的表达水平减少脑缺血再灌注损伤影响的程度,从而病情恢复,提示电针对脑缺血大鼠的神经细胞保护机制之一,可能是通过上调 CREB 的表达而实现的。

参考文献

- [1] Mackay J, Mensah G. WHO publishes definitive atlas on global heart disease and stroke epidemic [J]. Indian J Med Sci, 2004, 58(9): 405 - 406.
- [2] 中新网河南新闻. 脑卒中死亡率年增 9%, 成国民健康第一“杀手” [EB/OL]. 2011 - 10 - 30. <http://www.ha.chinanews.com.cn/GN-news/1/2011/10/30/193641.shtml>.
- [3] Flynn RW, MacWater RS, Doney AS. The cost of cerebral ischaemia [J]. Neuropharmacology, 2008, 55(3): 250 - 256.
- [4] 王顺, 张静. 不同经穴针刺对脑卒中偏瘫痉挛大鼠血清 cAMP、cGMP 含量影响的研究 [J]. 中国中医药科技, 2012, 19(1): 54 - 55.
- [5] 田云丽, 施静, 刘爱芬. 迷走神经刺激术在脑缺血中的应用及神经机制 [J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2012, 21(3): 312 - 315.
- [6] 石妮霞, 张百祥. 利脑心治疗脑梗死恢复期 80 例疗效观察 [J]. 世界中医药, 2012, 7(3): 235.
- [7] 张柳青. 经络学说起源于循经感传 [J]. 世界中医药, 2012, 7(1): 5 - 6.
- [8] 徐冰, 田国萍. 脑源性神经营养因子在脑缺血损伤修复反应中的作用 [J]. 中国医药导报, 2011, 3(5): 34 - 35.
- [9] 余亚娟. 针刺对局灶性脑缺血再灌注大鼠神经细胞凋亡的影响 [J]. 咸宁学院学报, 2009, 23(4): 277 - 279.
- [10] 张毅敏, 唐纯志, 程少冰, 等. 针刺对脑挫伤大鼠脑组织坏死面积及脑细胞凋亡的影响 [J]. 中国中医药信息杂志, 2010, 51(6): 528 - 530.
- [11] 疏树华. 兴奋性氨基酸及受体与脑损伤的研究进展 [J]. 立体定向和功能性神经外科杂志, 2007, 20(1): 124 - 126.
- [12] 张红星, 杨敏, 周利, 等. 头针对急性脑缺血再灌注大鼠的保护作用. 神经损伤与功能重建 [J]. 中国针灸, 2008, 3(6): 377 - 380.
- [13] 李常法, 赵驻军, 李亚, 等. 针刺组穴对脑缺血大鼠脑细胞凋亡相关蛋白表达研究 [J]. 针灸临床杂志, 2009, 22(7): 57 - 58.
- [14] 程洁, 李忠仁, 朱毅, 等. 电针对脑缺血再灌注大鼠海马钙调蛋白表达的影响 [J]. 中国针灸, 2011, 31(11): 1015 - 1019.
- [15] 王冠, 孙晓伟, 邹伟, 等. 头针对大鼠中动脉缺血再灌注模型大鼠 Cyt - c、Caspase - 3 表达的影响 [J]. 针灸临床杂志, 2009, 25(08): 45 - 46.