

针刺足三里、曲池对 MCAO 模型大鼠梗死周围组织 PI3K/AKT 信号通路表达的影响

唐冕¹ 章琪² 陈红霞³

(1 湖北科技学院临床医学院, 咸宁, 437100; 2 湖北科技学院附属第二医院中医康复科, 咸宁, 437100;

3 湖北科技学院基础医学院病理生理教研室, 咸宁, 437100)

摘要 目的:评价针刺曲池穴及足三里穴对 MCAO 模型大鼠运动功能的影响及观察脑梗死灶周围组织 PI3K/AKT 信号通路表达的变化。方法:将 45 只 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组及干预组,各 15 只。假手术组仅予切开皮肤剥离神经血管后缝合,模型组及干预组大鼠予线栓法进行 MCAO 模型制备,造模成功后干预组大鼠予针刺曲池穴及足三里穴,1 次/d,30 min/次,假手术组及模型组大鼠仅模仿捉拿、回笼,连续干预 14 d,用 Homeage Scan 行为学评价大鼠不同时间段运动能力的变化,免疫组化检测 PI3K、Bax 的表达差异,免疫蛋白印迹(Western blotting)观察 AKT、p-Akt 的浓度变化。结果:1)Homeage Scan 行为学检测显示:假手术组大鼠未见明显异常,造模大鼠出现明显偏瘫,随着时间的推移模型组及干预组大鼠花费在行走、后肢站立、舔毛 3 种行为的时间逐渐延长,其中干预组改善更为明显($P < 0.05$)。2)造模组大鼠脑组织 TTC 染色出现明显白色梗死区域,干预组大鼠梗死区域明显小于模型组。3)免疫组化显示造模后大鼠 PI3K 降低, Bax 升高,针刺足三里穴及曲池穴可上调 PI3K 及 AKT 的磷酸化程度,抑制了 Bax 的表达;4)Western blotting 显示针刺足三里、曲池穴可上调造模大鼠 AKT 的磷酸化程度。结论:针刺曲池穴、足三里穴可改善脑缺血大鼠的神经缺损症状,其作用机制可能与 PI3K/AKT 信号通路有关。

关键词 MCAO 模型;大鼠;曲池穴;足三里穴;PI3K/AKT 信号通路

Effects of Acupuncture at Quchi (LI 11) and Zusanli (ST 36) on the Expression of PI3K/AKT Signal Pathway in the Infarction Surrounding Tissue of MCAO Model Rats

Tang Mian¹, Zhang Qi², Chen Hongxia³

(1 General Medicine, School of Clinical Medicine, Hubei University of Science and Technology, Xianning 437100, China; 2 Traditional Chinese Medicine Rehabilitation of Second Affiliated Hospital of Hubei University, Xianning 437100, China; 3 Department of Pathophysiology, School of Basic Medical Sciences, Hubei University of Science and Technology, Xianning 437100, China)

Abstract Objective: To evaluate the effects of the acupuncture at Quchi (LI 11) and Zusanli (ST 36) on motor function of the MCAO model rats and to observe PI3K/AKT signal pathway expression changes in the surrounding tissue of cerebral infarcts.

Methods: A total of 45 SD rats were randomly divided into blank group, model group and intervention group, with 15 in each group. Blank group received only the skin incision and sutured after vascular decollement, and model group and intervention group rats accepted string inserting method for MCAO model preparation. After the successful modeling, the rats of the intervention group acupunctured at LI 11 and ST 36, 1 time/day, 30 min/time. The rats of the blank group and the model group only imitate the arrest, and go back to the cages for 14 days continuous intervention. The athletic ability changes of rats in different periods by using Homeage Scan behavior were evaluated, and the expression differences of PI3K and Bax were detected by immunohistochemical.

The concentration changes of AKT and p-AKT were observed by Western blotting. **Results:** 1) Homeage Scan behavior test showed; the blank group rats did not see obvious abnormality, and the model rats appeared obvious hemiplegia. With the pass of time, rats in the model group and intervention group spent gradually extend time in walking, standing, licking the hairs, and the behavior of intervention group improved more significantly ($P < 0.05$). 2) TTC staining of the brain tissue of rats in model group showed obvious white infarction area. The infarction area in the intervention group was significantly smaller than that in the model group. 3) Immunohistochemical revealed PI3K reduced and Bax increased after the model made, and acupunctured in Quchi (LI 11) and Zusanli (ST 36) could increase extent of phosphorylation of PI3K and AKT, and inhibit the expression of Bax. 4) Western blotting showed that acupuncture at Quchi (LI 11) and Zusanli (ST 36) could up-regulate AKT phosphorylation of modeling rats. **Conclusion:** Acupuncture at Quchi (LI 11) and Zusanli (ST 36) can improve the neurological defect symptoms of cerebral ischemia rats, whose the mechanism may be associated with PI3K/AKT signal pathway.

Key Words MCAO model rats, Quchi (LI 11), Zusanli (ST 36), PI3K/AKT signaling pathway

中图分类号: R255.2 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1673-7202.2018.03.041

脑卒中中以高发病率、高致残率及高死亡率的特点,被临床视为继肿瘤之后的难治疾病。其中70%为缺血性脑卒中,遗留明显的肢体功能障碍,给个人、家庭及社会带来沉重负担。针灸对缺血性脑卒中的临床疗效已被多次证实,其作用机制目前尚处于不断研究中。有研究发现利用针灸治疗缺血性脑卒中时,急性期、恢复期及后遗症期介入后疗效存在统计学差异,说明针灸治疗时机已然从恢复期/后遗症期逐渐转移至急性期^[1]。近年来神经干细胞在修复受损神经方面的作用逐渐受到重视^[2-3],认为其自我更新及分化能力是治疗神经受损疾病的切入点,这亦予研究针刺的作用机制带来了新思路。查阅大量古籍及国内外文献,我们发现曲池穴及足三里穴是治疗脑卒中中使用频率最高的组合穴,亦有团队研究^[4-6]证实针刺曲池穴及足三里穴可诱发大鼠内源性神经干细胞增殖、迁移及分化,但其作用途径目前尚无明确定论,PI3K/AKT信号通路可介导机体多个生物学效应,亦可调控神经干细胞的增殖、分化,基于此我们设想——针刺曲池穴及足三里穴与内源性NSCs之间的关系是否借助PI3K/AKT信号途径进行桥接?我们将MCAO模型大鼠作为研究对象,进行针刺曲池穴及足三里穴干预,并对脑梗死灶周围组织的PI3K/AKT通路标志性蛋白水平进行检测,以期深入研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 将60只SPF级Sprague Dawley (SD)雄性大鼠纳入研究,体重190~285 g,平均(250±10.24)g,鼠龄3~5个月,平均(4±0.25)个月,所有大鼠由凯学生物科技(上海)有限公司提供,饲养于湖北科技学院临床医学院动物中心,饲养环境温度24~26℃,平均(18.23±5.3)℃。

1.1.2 试剂与仪器 氯化三苯基四氮唑(TTC)溶液、PI3K、Akt、p-Akt、Bax、cleaved Caspase-3、 β -actin一抗均购自美国Sigma公司;SDS-PAGE电泳胶购自碧云天生物公司,DAB免疫组化测试盒购自美国ZYMED公司,BCA蛋白试剂盒购自西安晶彩生物科技有限公司,10%水合氯醛购自凯福达化工有效公司。

1.2 方法

1.2.1 分组与模型制备 1) 分组:将60只大鼠随

机分为假手术组、模型组及干预组,各20只,3组大鼠一般资料均衡($P > 0.05$),具有可比性。2) 模型制备:参照Zea-Longa线栓法复制大鼠中动脉缺血模型,使用10%水合氯醛将各组大鼠充分麻醉,仰卧置于手术台,切开颈部正中皮肤,将颈总动脉、颈内动脉、颈外动脉、迷走神经剥离,将颈总动脉及颈外动脉结扎,在颈内动脉内侧支做一切口,插入鱼线2 mm左右,有抵触感为度,随后逐层缝合皮肤后消毒。假手术组大鼠仅接受切开皮肤,剥离血管神经后缝合皮肤消毒^[7]。

1.2.2 干预方法 造模后3组大鼠均回笼饲养,假手术组及模型组大鼠每日模拟捉拿,干预组大鼠予电针曲池穴及足三里穴,定位参照李忠仁主编的《实验针灸学》,针刺深度约3~4 mm,适当捻转后接入华佗牌电针仪,疏密波,频率1~10 Hz,刺激强度以大鼠肢体轻度抖动为度,1次/d,20 min/次,连续治疗14 d直至大鼠断头处死。

1.2.3 检测指标与方法

1.2.3.1 Homecage Scan行为学评价 于造模后第1天、第7天和第14天观察各组大鼠在Home cage仪器中24 h的行为改变情况,每个观察笼内仅有1只大鼠,供应足够的水及食物,分析选取大鼠进食、后肢站立、行走、舔毛的行为时间。

1.2.3.2 脑梗死体积 随机抓取各组3只大鼠,予10%水合氯醛将各组大鼠充分麻醉后经左心室灌洗生理盐水,快速于冰山取脑,脑组织取出后立即置于-20℃冰箱冰冻20 min,随后将脑组织沿着冠状面平均切成5个薄片,每片厚度约2 mm,将薄片置于TTC溶液中进行染色,染色过程于避光环境中进行,染色接收取出脑组织脑片整齐排列于带有刻度标尺的桌面,用高分辨率相机进行拍照后输入计算机,用Image-ProPlus软件进行脑梗死体积计算^[8-9]。

1.2.3.3 免疫组化检测PI3K、Bax表达水平 随机抓取各组3只大鼠,予10%水合氯醛将各组大鼠充分麻醉后经左心室多聚甲醛,于冰山快速取出大脑,挖取梗死灶周围组织切割成大小2 mm×2 cm的块状,进行常规流程石蜡包埋,随后将制成切片,利用0.3%双氧水灭活内源性过氧化物酶,再用事先配制好的0.01 mol/LPBS冲洗3次,5 min/次,经过非特异性染色阻断剂处理后加入PI3K、Bax一抗工作液,孵育过夜后再次用0.01 mol/LPBS冲洗3次,5 min/

次,随后加入羊抗兔的二抗工作液,孵育 10~20 min 后用 PBS 冲洗,加入 DAB 显色剂后于 3 min 后自来水冲洗切片,苏木素染色、脱水、封片后于显微镜下观察,以以棕色然后为表达形式的阳性细胞数。

1.2.3.4 Western blot 检测 AKT、p-AKT 蛋白表达

随机抓取各组 3 只大鼠,予 10% 水合氯醛将各组大鼠充分麻醉后经左心室灌注生理盐水,快速于冰山取脑,切取梗死灶周围组织约 200 mg,置于离心管中,加入 1 mL 蛋白裂解液,随后于 4 °C,5 000 r/min 条件下离心 20 min,抽取上清液,利用 DAB 试剂盒对样本蛋白质进行定量计算出上样量,随后将样本 100 °C 金属浴锅中变性 10 min,抽取实现计算好的样本量加入配制的电泳凝胶中,将目的蛋白转膜至 PVDF 膜中,用脱脂奶粉进行封闭后加入 Akt、p-Akt 及 β -actin 抗体,4 °C 孵育过夜后用 TBS 冲洗,加入相应的二抗后室温再次孵育 2 h,随后滴入 ECL 显影液于图像分析系统 (Model Gel Doc 2000) 中进行显色计算 OD 值。

1.3 统计学方法 采用 Excel 表格对本研究数据进行登记,采用 SPSS 20.0 统计软件对数据进行分析,数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,对数据进行正态分布检测,符合正态分布用 *t* 检验,不符合正态分布用秩和检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 Homecage Scan 行为学比较 Homecage Scan 行为学检测显示:假手术组大鼠未见明显异常,造模第 7 天大鼠出现明显偏瘫,行走、后肢站立、舔毛时间明显缩短,进食时间延长,随着时间的推移模型组及干预组大鼠花费在行走、后肢站立、舔毛行为的时间逐渐延长,进食时间缩短,其中干预组改善得更为明显 ($P < 0.05$)。见图 1。

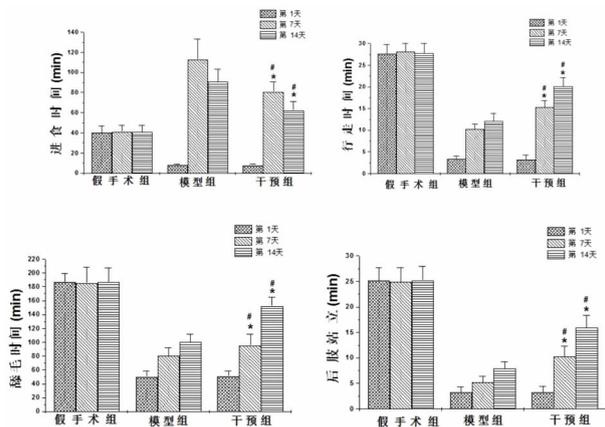


图 1 各组大鼠不同时间点行为学情况

2.2 各组脑梗死体积比较 造模组大鼠脑组织

TTC 染色出现明显白色梗死区域,干预组大鼠梗死区域明显小于模型组。见图 2。



图 2 各组脑组织冠状面 TTC 染色

注:3 组动物 ($n = 3$) 典型冠状面脑组织切片 TTC 染色;SC 表示假手术组,IC 表示模型组,DZ 表示干预组

2.3 各组 PI3K 及 Bax 浓度变化 免疫组化显示造模后大鼠 PI3K 降低,Bax 升高,针刺足三里穴及曲池穴可上调 PI3K 水平,抑制了 Bax 的表达。见图 3、4。

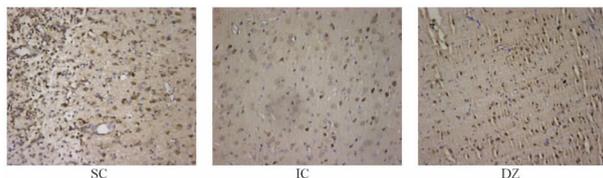


图 3 各组 PI3K 浓度变化 (IHC 染色 $\times 200$)

注:SC 表示假手术组;IC 表示模型组;DZ 表示干预组

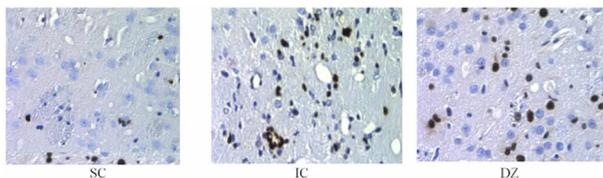


图 4 各组 Bax 浓度变化 (IHC 染色 $\times 200$)

注:SC 表示假手术组;IC 表示模型组;DZ 表示干预组

2.3 各组 AKT 及 pAKT 的浓度变化 Western blotting 显示针刺足三里、曲池穴可上调造模大鼠 AKT 的磷酸化程度。见图 5。

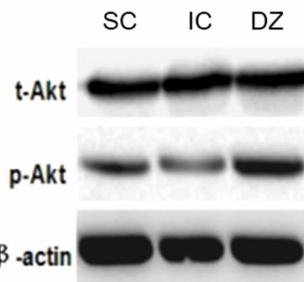


图 5 各组脑组织 tAkt、pAKT 蛋白检测

注:(A) Western blot 法检测各组 ($n = 3$) 大鼠脑梗死灶周围组织 t-Akt、p-Akt 的浓度, β -actin 作为内参蛋白。注 SC 表示假手术组,IC 表示模型组,DZ 表示干预组

3 讨论

几千年来大量医学资料均证实针刺穴位对多数疾病有理想的疗效,近年来大量的研究通过临床或动物实验证实了腧穴的特异性^[10-12]。足三里穴属于足阳明胃经,曲池穴属于手阳明大肠经,两穴均是本经的“合穴”。经气由此汇聚,进而回合于各自脏腑,正如《灵枢·邪气藏府病形》一书描述:“荣输治外经、合治内府”,由此我们认为刺激合穴可促进经气的通畅,调节隶属脏腑之气,从而使气血生化充足,经络得以疏通^[13]。故本研究采用针刺曲池穴及足三里穴作为干预手段具有一定的理论依据。

行为学变化是神经功能的直观体现,Homeca-g-eScan 系统较其他行为学检测手段而言具有明显的优势,它可实时捕捉及自动化分析大鼠的日常动作,避免了人为观察导致的干扰因素,更为客观评价大鼠的行为学变化。我们将各组中大鼠置于 Homeca-g-eScan 系统观察笼中,结果我们发现造模大鼠舔毛、行走、后肢站立等动作时间较假手术组明显长,进食时间明显缩短,考虑造模后大鼠神经功能缺损严重,加上手术创伤,进行上述动作明显困难,故时间明显延长,在研究中我们发现在第 7 天后 2 组造模大鼠舔毛、行走、后肢动作逐渐缩短,进食时间延长,我们认为模型组大鼠本身具有较强的自我愈合能力,故随着时间的延续大鼠的动作明显改善,进食时间增加,而干预组改善的情况更加理想,明显优于模型组。我们利用 TTC 溶液对各组大鼠脑组织切片进行染色,结果发现接受造模术大鼠脑片组织均出现白色梗死灶区域。TTC 溶液属于脂溶性光敏感复合物,在脱氢酶的作用下 TTC 溶液于正常组织结合而出现红色,而梗死灶因脱氢酶活性下降甚至消失,无法与 TTC 溶液产生反应而出现白色区域,研究中我们造模组大鼠脑组织 TTC 染色出现明显白色梗死区域,干预组大鼠梗死区域明显小于模型组,这一结果说明了针刺曲池穴及足三里穴可以明显缩小 MCAO 模型大鼠的脑梗死体积,从而促进神经功能的恢复。

脑缺血行损伤设计的病理机制复杂,但不论何种病理过程均与细胞凋亡关系密切,依照目前的研究细胞凋亡的前提条件是信号转导,大量文献显示 PI3K/AKT 信号通路是细胞凋亡的重要信号通路,多数神经营养因子通过介导 PI3K/AKT 信号通路抑制神经细胞的凋亡而发挥治疗效果^[14-15]。有研究显示 PI3K/AKT 在脑缺血事件中发挥重要作用,AKT 是该通路重要调节因子,但 AKT 被激活后可作用于其

下游的 Bax 等,从而介导多种生物效应。本研究通过免疫组化及 Western blotting 手段对 PI3K、AKT、p-AKT、Bax 因子浓度进行检测,结果显示造模后大鼠 PI3K 降低,Bax 升高,针刺足三里穴及曲池穴可上调 PI3K 及 AKT 的磷酸化程度,抑制了 Bax 的表达;并且上调造模大鼠 AKT 的磷酸化程度。由此说明,针刺曲池穴及足三里穴可通过介导 PI3K/AKT 信号通路发挥神经保护效应。

参考文献

- [1] 刘喆,赖新生. 论神经干细胞在缺血性脑病针灸研究中的新思路[J]. 中国针灸,2004,24(1):69-72.
- [2] 高剑峰,朱长连,李建生. 脑脉通对老龄大鼠脑缺血/再灌注海马内源性神经干细胞增殖分化的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志,2009,16(1):26-29.
- [3] 吴中华. 脑外源性神经因子基因修饰神经干细胞对脑卒中的神经保护机制[J]. 中国组织工程研究,2015,(45):7331-7336.
- [4] 江欣,陈立典. 电针曲池、足三里对脑缺血大鼠 NICD 表达影响观察[J]. 亚太传统医药,2014,10(4):25-26.
- [5] 游咏梅,薛偕华. 电针足三里穴、曲池穴对脑缺血再灌注大鼠 Bad 及其磷酸化的影响[J]. 亚太传统医药,2014,10(4):21-23.
- [6] 李秀坤,黄英华. 基于 PI3K/Akt 信号转导通路探讨电针足三里、曲池对脑缺血再灌注大鼠神经细胞凋亡的影响[J]. 重庆医学,2016(3):303-306.
- [7] 江一静. 从 GABAB 受体介导 cAMP-PKa-CREB 信号通路途径探讨巨刺法改善 MCAO 大鼠运动功能的作用机制[D]. 福州:福建中医药大学,2015.
- [8] 叶晓倩,江一静,游咏梅,等. 电针对脑缺血再灌注模型大鼠脑源性神经营养因子表达的影响[J]. 中国康复医学杂志,2014,29(3):204-207.
- [9] 叶晓倩,杨珊珊,江一静. 电针对缺血性脑卒中后神经行为学评分及 ERK1/2 通路影响研究[J]. 亚太传统医药,2014,10(20):74-75.
- [10] 霍则军,张莉,钱瑞琴. 针刺不同穴组对全脑缺血再灌注大鼠 TNF- α , IL-6, WBC 和自由基的影响[J]. 针刺研究,2003,28(2):94-98,123.
- [11] 李华南,张海明,顾兵,等. 针刺促进脊髓损伤后神经功能恢复的机制及相关信号通路的作用[J]. 中国康复理论与实践,2017,23(6):641-644.
- [12] 张毅敏,于斌,陈佳,等. 针刺治疗对卵巢早衰大鼠 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的影响[J]. 中国针灸,2015,35(1):53-58.
- [13] 沈宁,葛鹏玲,代巧妹. 电针曲池、神门、足三里穴对胸主动脉缩窄法诱导心肌肥厚大鼠 Bcl-2 及 Bax 的影响[J]. 中医药信息,2015,25(3):66-70.
- [14] 张珊珊,罗勇,武磊. PI3K/AKT 通路在电针促进局灶性脑缺血再灌注大鼠脑内血管再生中的作用[J]. 第三军医大学学报,2010,32(23):2488-2491.
- [15] 肖志娟,赵志敏,邹玉安,等. 康脑液对局灶性脑缺血再灌注大鼠的脑保护作用机制研究[J]. 中国临床药理学杂志,2014,32(12):1101-1104.