

电针“曲池”和“足三里”对脑缺血大鼠皮质突触素、 脑源性神经营养因子表达的影响

赵嘉培¹, 黄丹霞², 黄赛娥³, 周凡萍⁴

(1.厦门市第五医院康复医学科,福建省厦门市 361101;2.泉州医学高等专科学校临床医学院,福建省泉州市 362010;
3.福建中医药大学附属康复医院脑病康复二科,福建省福州市 350003;4.福建中医药大学康复医学院,福建省福州市 350122)

[关键词] 电针; “曲池”穴; “足三里”穴; 脑缺血; 突触素; 脑源性神经营养因子

[摘要] **目的** 观察电针“曲池”、“足三里”对脑缺血模型大鼠缺血皮层中突触素(SYN)及脑源性神经营养因子(BDNF)表达的影响,探讨电针治疗缺血性脑卒中的作用机制。**方法** 90只大鼠随机分为假手术组、模型组、电针组,按时间点每组又分为3个亚组:3天组、7天组、14天组,每亚组10只大鼠。模型组和电针组均用改良的线栓法建立大鼠左侧大脑中动脉阻塞模型。各组于术后2h及处死前行神经功能缺损评分。电针组予电针患侧“曲池”穴和“足三里”穴,1次/天,每次30min,至动物处死。采用免疫组织化学染色、Western blot和逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测大鼠左侧皮质SYN、BDNF表达情况。**结果** 与假手术组比较,模型组、电针组神经功能缺损评分明显升高($P<0.01$);经电针治疗后,电针组神经功能缺损评分低于模型组($P<0.05$)。免疫组织化学染色和Western blot结果显示,与假手术组比较,模型组、电针组SYN蛋白表达显著降低,电针组SYN蛋白表达比模型组显著提升($P<0.01$);与假手术组比较,模型组、电针组BDNF蛋白表达显著上升,电针组BDNF蛋白表达比模型组显著增多($P<0.01$)。RT-PCR结果表明,与假手术组比较,模型组、电针组SYN mRNA表达显著下降,电针组SYN mRNA表达比模型组显著升高($P<0.01$);与假手术组比较,模型组、电针组BDNF mRNA表达显著升高,电针组BDNF mRNA表达比模型组显著升高($P<0.01$)。**结论** 电针“曲池”、“足三里”可促进脑缺血大鼠皮质BDNF的合成和分泌,上调SYN的表达,可能在调控脑可塑性方面发挥重要作用。

[中图分类号] R743

[文献标识码] A

Effect of electroacupuncture at Quchi and Zusanli acupoint on the expressions of cortical synaptophysin and brain-derived neurotrophic factor in cerebral ischemia rats

ZHAO Jia-Pei¹, HUANG Dan-Xia², HUANG Sai-E³, ZHOU Fan-Ping⁴

(1.Department of Rehabilitation Medicine, the Fifth Hospital of Xiamen, Xiamen, Fujian 361101, China; 2.School of Clinical Medicine, Quanzhou Medical College, Quanzhou, Fujian 362010, China; 3.Department of Encephalopathy Rehabilitation, Rehabilitation Hospital, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, Fujian 350003, China; 4.Rehabilitation Medical College, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, Fujian 350122, China)

[KEY WORDS] Electroacupuncture; Quchi acupoint; Zusanli acupoint; Cerebral ischemia; Synaptophysin; Brain-derived neurotrophic factor

[ABSTRACT] **Aim** To observe the effect of electroacupuncture (EA) at Quchi and Zusanli acupoint on the expressions of cortical synaptophysin (SYN) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in cerebral ischemia model rats, and to explore the mechanism of EA in the treatment of ischemic stroke. **Methods** 90 rats were randomly divided into sham operation group, model group and EA group, and each group was divided into 3 subgroups according to time points: 3 days group, 7 days group, 14 days group, 10 rats in each subgroup. Left middle cerebral artery occlusion model was established by modified suture plug method in model group and EA group. Neurological deficit score was scored at 2 h after operation and before death. EA group received EA at affected side Quchi and Zusanli acupoint, 1 time each day, 30 mi-

[收稿日期] 2016-11-06

[修回日期] 2017-07-18

[基金项目] 福建省自然科学基金(2017J01829);福建省医学创新课题(2016-CX-47);福州市科技局课题(2016-G-49)

[作者简介] 赵嘉培,硕士,住院医师,研究方向为神经康复与认知科学,E-mail为 zjp196273@163.com。通讯作者黄赛娥,硕士,副主任医师,硕士研究生导师,研究方向为神经康复与认知科学,E-mail为 hse7411@163.com。

minutes each time, until the animal was killed. Immunohistochemical staining, Western blot and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) were used to detect the expression of SYN and BDNF in the left cortex of rats.

Results Compared with sham operation group, the neurological deficit scores of model group and EA group were significantly increased ($P < 0.01$); after EA treatment, the neurological deficit score of EA group was lower than that of model group ($P < 0.05$). Immunohistochemical staining and Western blot results showed that compared with sham operation group, the expression of SYN protein was significantly decreased in model group and EA group, and the expression of SYN protein in EA group was significantly higher than that in model group ($P < 0.01$); Compared with sham operation group, the expression of BDNF protein was significantly increased in model group and EA group, and the expression of BDNF protein in EA group was significantly higher than that in model group ($P < 0.01$). RT-PCR results showed that compared with sham operation group, the expression of SYN mRNA was significantly decreased in model group and EA group, and the expression of SYN mRNA in EA group was significantly higher than that in model group ($P < 0.01$); Compared with sham operation group, the expression of BDNF mRNA was significantly increased in model group and EA group, and the expression of BDNF mRNA in EA group was significantly higher than that in model group ($P < 0.01$). **Conclusion** Electroacupuncture at Quchi and Zusanli acupoint can promote the synthesis and secretion of BDNF in the cerebral cortex of rats with cerebral ischemia, and increase the expression of SYN, which may play an important role in the regulation of brain plasticity.

据我国第3次居民死因调查结果,在脑卒中病人中缺血性脑卒中的比率约占75%^[1-2],患者伴有不同程度的功能障碍,严重影响了生活质量。近年来研究发现脑卒中后,大脑功能和组织结构可以发生一定的自我修复和重建能力即脑可塑性。而突触可塑性是活动依赖性脑可塑性变化的关键结构部位。突触素(synaptophysin, SYN)在神经元胞体合成后主要转运至轴突终末,分布于突触前囊泡膜上,与神经递质的包装、储存、调节及释放密切相关。因此,SYN被广泛地用于标记轴突终末,是突触重建和神经再生的重要标志之一^[3-4]。脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)是在脑中分布最多的神经营养因子^[5],是一类分泌性蛋白,这种蛋白可调节活动依赖性过程,如突触的形成和神经元生长等,是调控突触可塑性的重要因素之一^[6-8]。

针灸治疗脑卒中的临床疗效是确定的,脑卒中是WHO向全球推荐采用针灸疗法的43个病种之一。其中,电针对缺血性脑卒中后神经功能缺损的改善疗效确切,在临床中使用广泛。因此,本研究拟从突触重塑、脑微环境的角度探讨电针“曲池”、“足三里”促进脑缺血后脑可塑性的可能机制。

1 材料和方法

1.1 动物及分组

90只SPF(specific pathogen free)级健康雄性SD大鼠(250~300g),购买于上海斯莱克动物有限公司[许可证号:SCXX(沪)2007-0005]。将90只大鼠用随机数字表法随机分为3组:假手术组、模型组、电针组,每组30只大鼠;按时间点不同每组又分

为3个亚组:3天组、7天组、14天组,每亚组10只大鼠,称重并编号。

1.2 主要试剂及设备

试剂:SYN单克隆抗体(ab32127)及BDNF单克隆抗体(ab108383)(英国Abcam公司), β -actin单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记抗鼠二抗、抗兔二抗(北京全金金生物技术有限公司),Trizol、逆转录试剂盒(南京诺唯赞生物科技有限公司),SYN、BDNF、 β -actin上下游引物(上海铂尚生物有限公司设计、合成),免疫组织化学(联苯二胺)试剂盒、苏木素染色液(福州迈新生物技术开发有限公司)。

设备:Olimpus BX51光学显微镜及Olimpus D70U-CMD3照相机(日本TKO德高光学仪器株式会社),IPP 7.0图像分析仪(美国Media Cybernetics公司),MILLI-Q超纯水装置(美国Milipore公司),电泳槽、Bio-Image分析系统(美国Bio-Rad公司),RNA浓度测试仪Nano-Drop 2000c(德国Thermo公司),移液器、低温高速离心机、常温离心机、常温高速离心机及普通PCR仪(德国Eppendorf公司),金属恒温箱(上海一恒科学仪器公司),切片机、石蜡包埋机、烤片机及激光共聚焦显微镜(德国Leica公司), -80°C 超低温冰箱(日本Sanyo公司), 4°C 摇床机、冰箱(青岛Haier公司),华佗牌G6805电针(苏州医疗用品厂有限公司)。

1.3 动物造模及神经功能缺损评分

饲养7天适应环境后,于造模前所有实验动物均禁食12h。大鼠称重后,室温 25°C 条件下,采用腹腔注射10%水合氯醛(3mL/kg)麻醉,参照改良的Longa线栓法^[9]建立大鼠左侧大脑中动脉阻塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型,其中假手术组无结扎、插线,只进行动脉分离。手术结束后,将动物放置于室温

(25℃)环境下苏醒,给予正常饮水、饮食。

神经功能缺损评分:按照 Longa 等^[9]的 5 分法评分标准,分别于脑缺血后 2 h(即治疗前)和治疗后 3、7、17 天时(取脑前)对实验大鼠进行神经功能缺损评分:0 分:无神经功能缺损症状;1 分:轻度局灶性神经功能缺损,即提尾悬空不能伸展右侧前爪;2 分:中度局灶性神经功能缺损,即行走向右侧转圈;3 分:重度局灶性神经功能缺损,即行走困难,并向右侧倾倒;4 分:不能自发行走,意识水平下降。造模成功标准:评分为 1~3 分者。

模型制备完成后大鼠虽然有脑缺血症状,但伴随下列情形之一者不纳入研究:(1)神经功能缺损评分为 0 分及 4 分;(2)取材时发现蛛网膜下腔出血;(3)未到观察时间点死亡。

1.4 干预措施

假手术组:另置普通笼中饲养,只予以同等条件抓取,不予任何治疗。模型组:造模后回笼饲养,只予以同等条件抓取,不予任何治疗。电针组:穴位取右侧肢体“曲池”、“足三里”,大鼠穴位定位方法参考《实验针灸学》^[10]。“曲池”穴:位于桡骨近端关节外侧前方凹陷中,直刺约 5 mm;“足三里”穴:位于膝关节后外侧,腓骨小头下约 5 mm,直刺约 5 mm;应用 G6805 电针仪,电压峰值为 6 V,以肢体轻轻抖动为度,疏密波,频率 1~20 Hz,每次电针 30 min,1 次/天,手术后 24 h 开始治疗,至动物处死。

1.5 标本采集

分别于动物造模脑缺血 3、7、14 天后,采用 10%水合氯醛(3 mL/kg)麻醉大鼠。处理脑组织前,先对各组大鼠进行腹主动脉采血。一部分大鼠于采血后冰上迅速小心开颅取脑,将取出的脑组织置于液氮罐中后转移至-80℃的冰箱中保存备用,用于免疫印迹法和逆转录 PCR 检测;另一部分大鼠于采血后立即打开胸腔,迅速暴露心脏,经左心室生理盐水灌洗后,再行 4%多聚甲醛磷酸盐缓冲液灌注固定,后于冰上迅速小心断头取脑,在视交叉后 2 mm 处以冠状切面切开大脑,5 等分切开,置于 4%多聚甲醛液体中固定,后进行脱水、透明、浸蜡、包埋;将石蜡包埋块切成 5 μm 厚防脱切片,用于免疫组织化学染色。

1.6 免疫组织化学染色

取石蜡切片进行常规的脱蜡至水,在 0.01 mol/L 枸橼酸钠(pH 6.0)中热抗原修复 10 min;3% H_2O_2 室温孵育 10 min,以消除内源性过氧化物酶的活性;PBS 冲洗 3 次,每次 5 min,10%正常山羊血清封闭,室温孵育 30 min;倾去血清,勿洗,分别滴加 BDNF、SYN 一抗工作液(BDNF 为 1:200,SYN

为 1:400),置于湿盒中 4℃过夜;PBS 冲洗 3 次,每次 5 min,滴加适量生物素标记二抗工作液,37℃孵育 10 min;PBS 冲洗 3 次,每次 5 min,滴加辣根过氧化物酶标记链霉卵白素工作液,37℃孵育 10 min;PBS 冲洗 3 次,每次 5 min,联苯二胺显色剂显色,显色为淡棕色后即可自来水充分冲洗;苏木素复染约 1 min,PBS 返蓝,梯度酒精脱水,二甲苯透明,采用中性树胶封薄片于显微镜下观察。

采用日本 Olympus 光学显微镜观察 SYN 及 BDNF 切片,美国 IPP 7.0 图像分析软件采集大鼠左侧皮质病灶区的免疫信号。结果用平均光密度(mean optical density,MOD)值表示,使用校正光密度值(corrected optical density,COD)进行量化分析,即:免疫阳性产物的 MOD 值减去相应脑区阴性对照 MOD 值则得到 COD。每个脑样本制成 3 张切片,每张切片选取缺血病灶区 5 个不重叠的高倍视野(400 倍),取其平均值。

1.7 Western blot 检测

采用 Western blot 检测 BDNF、SYN 蛋白的表达情况。冰上快速取大鼠左侧皮质脑组织约 200 mg,加入 1 mL RIPA 裂解液,迅速研磨均匀后静置 30 min,取上清,4℃ 13000 r/min 离心 5 min,小心取上清。取待测样品 100 μL,加入 25 μL 上样缓冲液,100℃水浴锅变性,经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳、转膜后,将二氟化树脂(polyvinylidene fluoride,PVDF)膜取出,摇床上使用封闭液浸泡 2 h 后取出,分别加入抗 SYN(1:5000)、BDNF(1:1000)、β-actin(1:1000)抗体孵育,4℃过夜后取出,加入相应二抗(1:5000),置室温摇床上 60 min。将 PVDF 膜置于图像扫描仪上,避光下配置显色液并覆盖 PVDF 膜,反应 1 min 后运行 Image Lab 软件采集图像并进行分析处理。

1.8 逆转录-聚合酶链反应

采用逆转录-聚合酶链反应(reverse transcription polymerase chain reaction,RT-PCR)检测 BDNF、SYN 的 mRNA 表达情况。冰上操作,取约 200 mg 左侧大脑皮质组织,加入 1 mL Trizol,迅速研磨,震荡 30 s;加入 200 μL 氯仿,剧烈摇动 30 s,室温下静置 3 min,4℃ 13000 r/min 离心 15 min;小心吸出上层无色水相,移入新的 RN-free EP 管中,加等体积异丙醇,室温静置 10 min,4℃ 13000 r/min 离心 10 min,在管底部可见微量白色 RNA 沉淀。加入 75%乙醇 1 mL,振荡,4℃ 13000 r/min 离心 5 min,弃上清,小心吸取残留乙醇(内含 RNA),开盖干燥 5 min,用焦碳酸二乙酯水 30 μL 溶解 RNA,混匀后立即检测 RNA 浓度,根据 RNA 浓度,

计算 RNA 体积。按照逆转录试剂盒及引物说明书加入相应量的试剂,根据说明书反应条件进行 RT-PCR 反应。SYN 引物序列为:上游 5'-TTCTTCGGAATG-GAGTCAAA-3',下游 5'-TGCTTGTCTTCATCCTGGTG-3'; BDNF 引物序列为:上游 5'-TCGCTTCATCTTAGGAGT-3',下游 5'-TCAACATAAACCACCAAC-3'; β -actin 引物序列为:上游 5'-TCAGGAGGAGCAATGATCTTG-3',下游 5'-TCCTCCCTGGAGAAGAGCTA-3'。取 8 μ L PCR 产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳,用 Image Lab 软件采集凝胶成像并分析电泳条带。

1.9 统计学方法

数据采用 SPSS 18.0 进行统计分析,所有数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。计量资料多组间均数差异显著性比较符合正态分布的采用单因素方差分析,多样本均数间两两比较方差齐时采用 LSD 检验,方差不齐时采用 Games-Howell 检验;计量资料多组间均数差异显著性比较不符合正态分布的采用 Kruskal-Wallis H (K) 检验;两样本计量资料比较符合正态分布的采用单因素方差分析,方差齐时采用独立样本 t 检验;

两样本计量资料比较不符合正态分布的采用 Mann-Whitney U 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 动物基本情况

剔除造模不成功和造模后死亡的大鼠,剩余大鼠数为:假手术组 30 只,模型组 20 只,电针组 23 只。大鼠体重:假手术组 252.71 ± 0.40 g,模型组 258.67 ± 0.39 g,电针组 255.58 ± 0.36 g;大鼠鼠龄:假手术组 2.11 ± 0.41 月,模型组 2.17 ± 0.26 月,电针组 2.15 ± 0.30 月。经统计学分析 3 组之间无显著性差异($P>0.05$),具有可比性。

2.2 神经功能缺损评分

脑缺血后,与假手术组比较,模型组及电针组神经功能缺损评分明显升高($P<0.01$),但模型组与电针组间无显著差异,表明造模成功。脑缺血后 3、7、14 天 3 个时间点电针组神经功能缺损评分皆低于模型组(表 1)。

表 1. 各组大鼠 MCAO 术后神经功能缺损评分

Table 1. Neurological deficit scores after MCAO in each group

分 组	2 h	3 天	7 天	14 天
假手术组	0(30)	0(10)	0(10)	0(10)
模型组	$2.400\pm0.675^a(30)$	$2.286\pm0.488(6)$	$2.000\pm0.577(7)$	$1.667\pm0.516(7)$
电针组	$2.433\pm0.626^a(30)$	$1.625\pm0.518^b(7)$	$1.125\pm0.641^b(8)$	$0.714\pm0.756^b(8)$

括号中数字为大鼠只数。a 为 $P<0.01$,与假手术组比较;b 为 $P<0.05$,与模型组比较。

2.3 免疫组织化学法检测 SYN 和 BDNF 表达

免疫组织化学染色显示,SYN 阳性物质主要见于血肿周围和大脑皮质神经元胞浆、突起及纤维束中,呈棕褐色颗粒状或点状,各组均可见表达(图 1)。与假手术组比较,模型组、电针组在各时间点 SYN 的表达值均显著降低($P<0.01$);但电针组比模型组在各时间点 SYN 表达有显著提升($P<0.01$;表 2)。

表 2. 各组大鼠 MCAO 术后大脑缺血区皮质 SYN 的 COD 值

Table 2. COD values of SYN in the cortex of cerebral ischemic area after MCAO in rats of each group

分 组	n	3 天	7 天	14 天
假手术组	30	0.351 ± 0.024	0.352 ± 0.018	0.353 ± 0.018
模型组	20	0.219 ± 0.011^a	0.233 ± 0.010^a	0.261 ± 0.008^a
电针组	23	0.252 ± 0.008^{ab}	0.282 ± 0.007^{ab}	0.311 ± 0.012^{ab}

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

BDNF 阳性物质呈棕褐色圆形、长条形或不规则多角形,主要分布于梗死灶周围神经元细胞及胶质细胞的胞浆、突起中(图 2)。假手术组大鼠相应区域可见少量 BDNF 表达;与假手术组比较,模型组、电针组在各时间点 BDNF 表达均显著上升($P<0.01$);3 个时间点电针组 BDNF 表达均比模型组显著增多($P<0.01$;表 3)。

表 3. 各组大鼠 MCAO 术后大脑缺血区皮质 BDNF 的 COD 值

Table 3. COD values of BDNF in the cortex of cerebral ischemic area after MCAO in rats of each group

分 组	n	3 天	7 天	14 天
假手术组	30	0.626 ± 0.012	0.623 ± 0.015	0.630 ± 0.013
模型组	20	0.717 ± 0.023^a	0.761 ± 0.027^a	0.844 ± 0.044^a
电针组	23	0.820 ± 0.012^{ab}	0.922 ± 0.012^{ab}	1.102 ± 0.008^{ab}

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

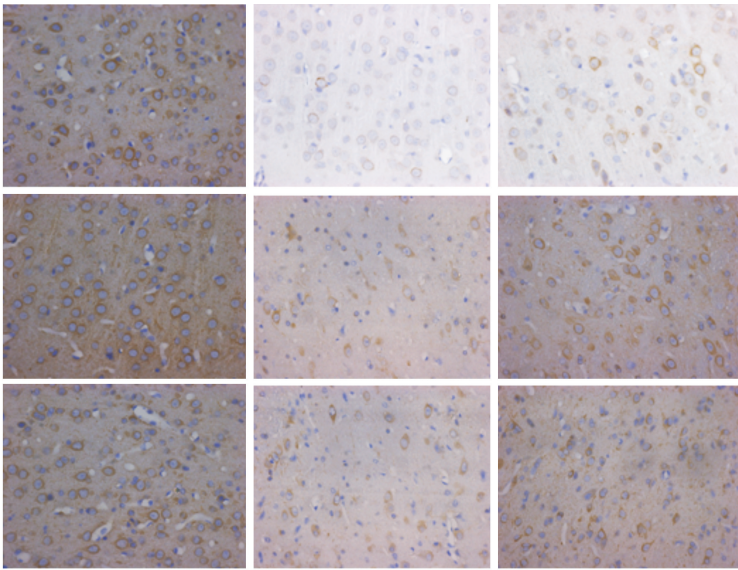


图 1. 各组大鼠不同时间点左侧大脑皮质区 SYN 表达 从左到右,第 1 列为假手术组,第 2 列为模型组,第 3 列为电针组;从上到下,第 1 排为 MCAO 术后 3 天,第 2 排为 MCAO 术后 7 天,第 3 排为 MCAO 术后 14 天。
Figure 1. Expression of SYN in the left cerebral cortex of rats at different time points in each group

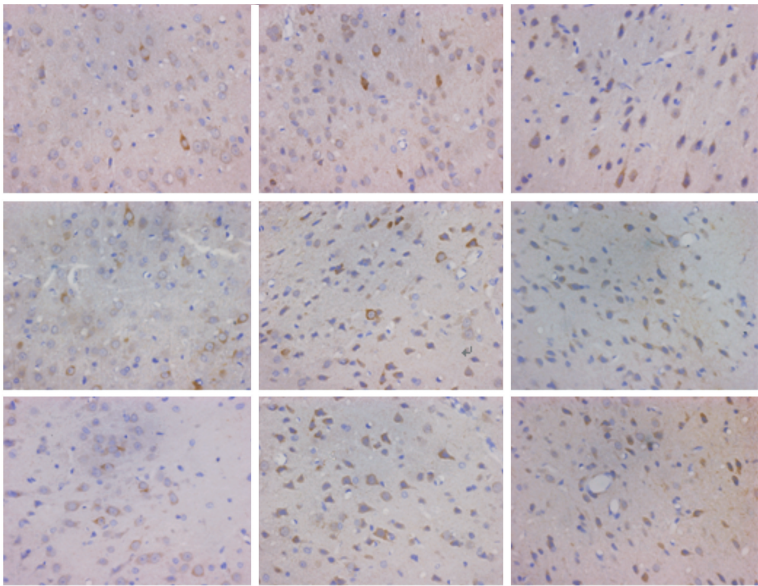


图 2. 各组大鼠不同时间点左侧大脑皮质区 BDNF 表达 从左到右,第 1 列为假手术组,第 2 列为模型组,第 3 列为电针组;从上到下,第 1 排为 MCAO 术后 3 天,第 2 排为 MCAO 术后 7 天,第 3 排为 MCAO 术后 14 天。
Figure 2. Expression of BDNF in the left cerebral cortex of rats at different time points in each group

2.4 Western blot 检测 SYN 和 BDNF 蛋白变化

SYN 蛋白表达在假手术组最强,电针组和模型组 SYN 蛋白表达均低于假手术组 ($P<0.01$);与模型组比较,电针组左侧皮质 SYN 蛋白表达显著提高 ($P<0.01$;图 3、表 4)。BDNF 蛋白表达在假手术组最弱,电针组和模型组 BDNF 蛋白表达均高于假手术组 ($P<0.01$);与模型组比较,电针组大鼠左侧皮质 BDNF 蛋白表达明显增强 ($P<0.01$;图 3、表 5)。 β -actin 为参照指标。

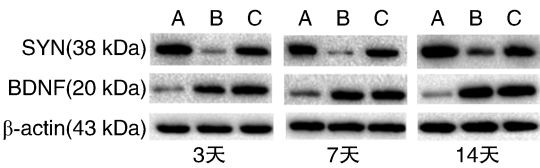


图 3. 各组大鼠不同时间点 SYN、BDNF 蛋白表达变化 A 为假手术组,B 为模型组,C 为电针组。
Figure 3. Expression changes of SYN and BDNF protein at different time points in each group

表 4. 各组大鼠 MCAO 术后大脑缺血区皮质 SYN/ β -actin 的蛋白灰度值

Table 4. Protein gray values of SYN/ β -actin in the cortex of cerebral ischemic area after MCAO in rats of each group

分 组	<i>n</i>	3 天	7 天	14 天
假手术组	30	2.518±0.076	2.536±0.096	2.527±0.071
模型组	20	0.511±0.015 ^a	0.803±0.023 ^a	1.103±0.018 ^a
电针组	23	1.243±0.073 ^{ab}	1.513±0.089 ^{ab}	1.932±0.056 ^{ab}

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

表 5. 各组大鼠 MCAO 术后大脑缺血区皮质 BDNF/ β -actin 的蛋白灰度值

Table 5. Protein gray values of BDNF/ β -actin in the cortex of cerebral ischemic area after MCAO in rats of each group

分 组	<i>n</i>	3 天	7 天	14 天
假手术组	30	0.723±0.019	0.716±0.021	0.723±0.020
模型组	20	1.259±0.087 ^a	1.525±0.071 ^a	1.906±0.067 ^a
电针组	23	1.825±0.084 ^{ab}	2.211±0.077 ^{ab}	2.814±0.100 ^{ab}

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

2.5 RT-PCR 检测 SYN 和 BDNF mRNA 变化

SYN mRNA 表达在假手术组最强,模型组和电针组 SYN mRNA 表达与假手术组比较显著下降($P<0.01$);与模型组比较,电针组 SYN mRNA 表达显著升高($P<0.01$;图 4、表 6)。BDNF mRNA 表达在假手术组最弱,模型组和电针组 BDNF mRNA 表达与假手术组比较显著升高($P<0.01$);与模型组比较,电针组 BDNF mRNA 表达显著升高($P<0.01$;图 4、表 7)。 β -actin 为参照指标。

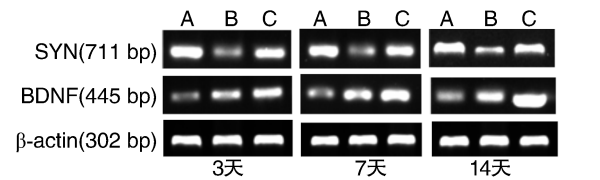


图 4. 各组大鼠不同时间点 SYN、BDNF mRNA 表达变化
A 为假手术组, B 为模型组, C 为电针组。

Figure 4. Expression changes of SYN and BDNF mRNA at different time points in each group

表 6. 各组大鼠 MCAO 术后大脑缺血区皮质 SYN/ β -actin 的 mRNA 灰度值

Table 6. The mRNA gray values of SYN/ β -actin in the cortex of cerebral ischemic area after MCAO in rats of each group

分 组	<i>n</i>	3 天	7 天	14 天
假手术组	30	1.518±0.124	1.527±0.124	1.515±0.126
模型组	20	0.367±0.031 ^a	0.425±0.008 ^a	0.496±0.029 ^a
电针组	23	0.681±0.066 ^{ab}	0.963±0.083 ^{ab}	1.171±0.134 ^{ab}

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

表 7. 各组大鼠 MCAO 术后大脑缺血区皮质 BDNF/ β -actin 的 mRNA 灰度值

Table 7. The mRNA gray values of BDNF/ β -actin in the cortex of cerebral ischemic area after MCAO in rats of each group

分 组	<i>n</i>	3 天	7 天	14 天
假手术组	30	0.355±0.031	0.349±0.029	0.341±0.040
模型组	20	0.588±0.051 ^a	1.064±0.092 ^a	1.401±0.116 ^a
电针组	23	1.164±0.120 ^{ab}	1.446±0.104 ^{ab}	1.782±0.174 ^{ab}

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

3 讨 论

缺血性脑血管病所遗留的神经功能损害,严重影响患者的生活质量。研究提示突触可塑性是神经系统生长发育损伤修复及学习记忆等活动的神经生物学基础^[11],在脑卒中后神经功能改善中占重要角色。而突触素的表达及突触密度被用于评估突触可塑性和突触形成,是突触的量化标志^[12]。研究^[13]发现,脑缺血可导致 SYN 低水平;本研究结果与此一致。本研究结果显示,模型组、电针组 SYN 表达在脑缺血后较假手术组明显下降;与模型组比较,电针组大鼠左侧皮质 SYN 表达明显增强,这表明电针“曲池”、“足三里”可上调 SYN 水平,促进大鼠脑缺血后突触可塑性,并有效改善大鼠神经功能缺损评分。亦有研究^[14]发现:MCAO 大鼠梗死灶周围皮层 SYN 变化明显,对侧对应皮层表达亦增加。SYN 免疫活性增高可能与突触重建有关,表明存在明显的突触可塑性变化,针刺可促进这种可塑性变化,可能是脑功能恢复的主要物质基础。

1982 年 Barde 等人从猪脑中纯化提取了 BDNF,其主要由脑组织合成,在中枢神经系统中分布广泛,主要见于皮质、海马及杏仁体^[15]。目前研究认为,BDNF 可减少不同脑卒中类型的梗死体积,促进神经细胞的迁移和分化,防止神经元被破坏,调节突触功能和突触可塑性^[13,16-18];具体表现为:BDNF 可刺激成熟神经元轴突和树突出芽;调节合成代谢,增加神经元胞体大小,影响突触的可塑性^[19]。BDNF 与酪氨酸激酶受体 B 结合后促进突触蛋白表达,明显促进大鼠原代神经元(包括皮层、海马、小脑等处的神经元)中 SYN 的表达上调^[20-22]。研究表明,大脑缺血性损伤后 BDNF 及其受体表达增加,这可改善突触功能^[23];本实验结果与此一致。本研究结果显示模型组 BDNF 蛋白表达水平较假手术组高;文献报道指出,大鼠脑损伤后其机体的自我保护功能启动从而上调 BDNF 表达^[24]。电针组

BDNF 蛋白水平上调高于模型组,提示电针“曲池”、“足三里”可提高 BDNF 表达水平从而降低脑组织神经元受到缺血缺氧损伤。其他关于电针的研究^[25-26]亦发现,电针通过激活大鼠脑内 BDNF 可显著促进神经再生。

本实验选取电针“曲池”、“足三里”干预脑缺血后缺血区皮质的突触可塑性。张义等^[27]研究表明,现代针灸治疗中风偏瘫总体治疗思路为首选阳经腧穴,而“合谷”、“曲池”、“足三里”是临床治疗中风使用频次最高的 3 个穴位,其对患者肢体功能改善有确切疗效。祖国医学对中风病因病机有深刻的认识:首先,中风的发病与“风”(内风和外风)密切相关,而“风为阳邪,其性开泄,易袭阳位”,故多犯阳经;第二,《灵枢·刺节真邪》描述中风昏仆为:“虚邪偏客于身半,其入深,内居营卫,营卫稍衰,则真气去,邪气独留,发为偏枯”,因此治疗应当体现“阴病治阳”、“从阳引阴”的特点;第三,针刺治疗中风具有“论言治痿者,独取阳明何也”的理论支持。故本研究选用的“曲池”、“足三里”均为阳明经穴,符合上述祖国医学理论;且我们团队前期梳理文献也发现其使用频率最高。“曲池”、“足三里”二穴又为手足阳明经之合穴,针刺合穴可直接鼓动经气畅行,激发脏腑之气,脏腑乃气血生化之源,脏腑气盛则气血旺,气血旺则疏通闭阻经脉之力强。

综上所述,电针“曲池”、“足三里”通过促进脑缺血大鼠病灶周围神经元内源性 BDNF 局部蛋白的合成或分泌,上调 SYN 的表达,可能在调控突触可塑性、促进神经网络构建和突触损伤修复等方面发挥重要作用,达到大脑功能重组和代偿。

[参考文献]

- [1] 国家卫生部新闻办公室. 第三次全国死因调查主要情况[J]. 中国肿瘤, 2008, 17(5): 344-345.
- [2] 董瑞国. 卒中的流行病学研究和预防[J]. 国际脑血管病杂志, 1995, 3(3): 115-118.
- [3] Qu H, Zhao M, Zhao S, et al. Forced limb-use enhances brain plasticity through the cAMP/PKA/CREB signal transduction pathway after stroke in adult rats[J]. Restor Neurol Neurosci, 2014, 32(5): 597-609.
- [4] Shin JA, Lim SM, Jeong SI, et al. Noggin improves ischemic brain tissue repair and promotes alternative activation of microglia in mice[J]. Brain Behav Immun, 2014, 40(8): 143-154.
- [5] Ernfors P, Ibáñez CF, Ebendal T, et al. Molecular cloning and neurotrophic activities of a protein with structural similarities to nerve growth factor: developmental and topographical expression in the brain[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87(14): 5 454-458.
- [6] Leal G, Afonso PM, Salazar IL, et al. Regulation of hippocampal synaptic plasticity by BDNF[J]. Brain Res, 2015, 24(1621): 82-101.
- [7] MacLellan CL, Keough MB, Granter-Button S, et al. A critical threshold of rehabilitation involving brain-derived neurotrophic factor is required for poststroke recovery[J]. Neurorehabil Neural Repair, 2011, 25(8): 740-748.
- [8] Begni V, Riva MA, Cattaneo A. Cellular and molecular mechanisms of the brain-derived neurotrophic factor in physiological and pathological conditions[J]. Clin Sci, 2017, 131(2): 123.
- [9] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91.
- [10] 李忠仁. 实验针灸学(供中药类专业用)[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2003; 327-329.
- [11] Hasan A, Nitsche MA, Rein B, et al. Dysfunctional long-term potentiation-like plasticity in schizophrenia revealed by transcranial direct current stimulation[J]. Behav Brain Res, 2011, 224(1): 15-22.
- [12] Calhoun ME, Jucker M, Martin LJ, et al. Comparative evaluation of synaptophysin-based methods for quantification of synapses[J]. J Neurocytol, 1996, 25(12): 821-828.
- [13] Chen XM, Wang NN, Zhang TY, et al. Neuroprotection by sildenafil: neuronal networks potentiation in acute experimental stroke[J]. CNS Neurosci Ther, 2014, 20(1): 40-49.
- [14] 陈加俊, 石岩殊, 韩雪梅, 等. 大鼠脑梗死后突触素的变化及针刺的影响[J]. 中国老年学杂志, 2004, 24(4): 333-335.
- [15] Kawamoto Y, Nakamura S, Nakano S, et al. Immunohistochemical localization of brain-derived neurotrophic factor in adult rat brain[J]. Neuroscience, 1996, 74(4): 1 209-226.
- [16] Cui X, Chopp M, Zacharek A, et al. Niacin treatment of stroke increases synaptic plasticity and axon growth in rats[J]. Stroke, 2010, 41(9): 2 044-049.
- [17] Greenberg ME, Xu B, Lu B, et al. New insights in the biology of BDNF synthesis and release: implications in CNS function[J]. J Neurosci, 2009, 29(41): 12 764-767.
- [18] Gonzalez A, Moya-Alvarado G, Gonzalez-Billaut C, et al. Cellular and molecular mechanisms regulating neuronal growth by brain-derived neurotrophic factor[J]. Cytoskeleton, 2016, 73(10): 612-628.
- [19] Mariga A, Mitre M, Chao MV. Consequences of brain-derived neurotrophic factor withdrawal in CNS neurons and implications in disease[J]. Neurobiol Dis, 2017, 97(Pt B): 73-79.

- [20] Spencer-Segal JL, Waters EM, Bath KG, et al. Distribution of phosphorylated TrkB receptor in the mouse hippocampal formation depends on sex and estrous cycle stage [J]. *J Neurosci*, 2011, 31(18): 6780-790.
- [21] Tartaglia N, Du J, Tyler WJ, et al. Protein synthesis-dependent and -independent regulation of hippocampal synapses by brain-derived neurotrophic factor [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(40): 37585-593.
- [22] Takei N, Sasaoka K, Inoue K, et al. Brain-derived neurotrophic factor increases the stimulation-evoked release of glutamate and the levels of exocytosis-associated proteins in cultured cortical neurons from embryonic rats [J]. *J Neurochem*, 1997, 68(1): 370-375.
- [23] Ishrat T, Pillai B, Soliman S, et al. Low-dose candesartan enhances molecular mediators of neuroplasticity and subsequent functional recovery after ischemic stroke in rats [J]. *Mol Neurobiol*, 2015, 51(3): 1542-553.
- [24] 李红玲, 王马魁, 任力, 等. 运动训练对大鼠出血性脑损伤 BDNF 基因及其蛋白表达的影响 [J]. *中国康复医学杂志*, 2008, 23(9): 782-785.
- [25] Zhao J, Xu H, Tian Y, et al. Effect of electroacupuncture on brain-derived neurotrophic factor mRNA expression in mouse hippocampus following cerebral ischemia-reperfusion injury [J]. *J Tradit Chin Med*, 2013, 33(2): 253-257.
- [26] Hwang IK, Chung JY, Yoo DY, et al. Effects of electroacupuncture at Zusanli and Baihui on brain-derived neurotrophic factor and cyclic AMP response element-binding protein in the hippocampal dentate gyrus [J]. *J Vet Med Sci*, 2010, 72(11): 1431-436.
- [27] 张义, 任玉兰, 王兴丽, 等. 现代针灸治疗中风偏瘫选穴处方规律研究 [J]. *辽宁中医药大学学报*, 2012, 15(9): 61-64.
- (此文编辑 曾学清)

(上接第 1098 页)

- [9] Jiang L, Xu F, He W, et al. CD200Fc reduces TLR4-mediated inflammatory responses in LPS-induced rat primary microglial cells via inhibition of the NF- κ B pathway [J]. *Inflamm Res*, 2016, 65(7): 521-532.
- [10] Holy EW, Tanner FC. Tissue factor in cardiovascular disease pathophysiology and pharmacological intervention [J]. *Adv Pharmacol*, 2010, 59(10): 259-292.
- [11] Iii APO, Mackman N. Tissue factor and thrombosis: The clot starts here [J]. *Thromb Haemost*, 2010, 104(3): 432-439.
- [12] Cam A, Sivaguru M, Mejia EGD. Endocytic mechanism of internalization of dietary peptide lunasin into macrophages in inflammatory condition associated with cardiovascular disease [J]. *PLoS One*, 2013, 8(9): e72115.
- [13] Saha RN, Pahan K. Differential regulation of Mn-superoxide dismutase in neurons and astroglia by HIV-1 gp120: Implications for HIV-associated dementia [J]. *Free Radical Bio Med*, 2007, 42(12): 1866-878.
- [14] Mitchell RAC, Lovegrove A, Shewry PR. Lunasin in cereal seeds: What is the origin? [J]. *J Cereal Sci*, 2013, 57(3): 267-269.
- [15] Gonzalez DME, Vázquez M, de Lumen BO, et al. Lunasin concentration in different soybean genotypes, commercial soy protein, and isoflavone products [J]. *J Agr Food Chem*, 2004, 52(19): 5882-887.
- [16] Baker RG, Hayden MS, Ghosh S. NF- κ B, Inflammation, and metabolic disease [J]. *Cell Metab*, 2011, 13(1): 11-22.
- [17] Lawrence T. The nuclear factor- κ B pathway in inflammation [J]. *CSH Perspect Biol*, 2009, 1(6): a1651.
- [18] Goebeler M, Gillitzer R, Kilian K, et al. Multiple signaling pathways regulate NF-kappa B-dependent transcription of the monocyte chemoattractant protein-1 gene in primary endothelial cells [J]. *Blood*, 2001, 97(1): 46-55.
- [19] Gao MY, Chen L, Yang L, et al. Berberine inhibits LPS-induced TF procoagulant activity and expression through NF-kappa B/p65, Akt and MAPK pathway in THP-1 cells [J]. *Pharmacol Rep*, 2014, 66(3): 480-484.
- (此文编辑 曾学清)