

# 针刺对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤后神经元凋亡的影响

甘云波 黄光英 张明敏

**【摘要】** **目的** 观察针刺对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤后海马区细胞周期因子和神经元凋亡的影响。**方法** 选取成年健康雄性 Sprague-Dawley 大鼠 30 只,分为对照组、缺血再灌注组和针刺组,采用大脑中动脉线栓法建立脑缺血再灌注损伤模型,针刺组大鼠造模成功后给予针刺治疗。应用免疫印迹法检测细胞周期素 D1 (Cyclin D1) 和细胞周期素依赖性激酶 4 (CDK4) 的表达,采用流式细胞计数法检测细胞凋亡率。**结果** 与对照组比较,缺血再灌注组再灌注 48 h 后海马细胞 Cyclin D1、CDK4 表达升高,凋亡细胞增多 ( $P < 0.01$ ); 与缺血再灌注组比较,针刺组 Cyclin D1、CDK4 表达下降,凋亡细胞明显减少 ( $P < 0.05$  或  $0.01$ )。**结论** 针刺对脑缺血再灌注损伤有拮抗作用,其机制可能与其调控细胞周期因子从而抑制细胞凋亡有关。

**【关键词】** 针刺; 脑缺血再灌注; 细胞周期因子; 凋亡

**The effects of acupuncture on neuronal apoptosis after focal cerebral ischemia-reperfusion in rats** GAN Yun-bo, HUANG Guang-ying, ZHANG Ming-min. Institute of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

**【Abstract】 Objective** To investigate the effects of acupuncture on expression of cyclin D1 and CDK4 protein in neurons as well as neuronal apoptosis in hippocampus after focal cerebral ischemia-reperfusion in rats. **Methods** Thirty adult healthy male Sprague-Dawley rats were divided into a control group (6 rats), an ischemia group (12 rats) and an acupuncture group (12 rats). A model of middle cerebral artery occlusion (MCAO) in rats was established with intraluminal filament occlusion. Acupuncture was employed to treat the model animals. The western blot was used to measure the expression of cyclin D1 and CDK4 protein, and the flow cytometry was used to calculate neuronal apoptosis rate in hippocampus. **Results** A significant increase in cyclin D1 and CDK4 was detected at 48 h after reperfusion. The difference between ischemic group and acupuncture group with regard to the expression of cyclin D1 and CDK4 as well as the cell apoptosis were statistically significant ( $P < 0.05$  or  $0.01$ ). **Conclusion** Acupuncture can protect cerebral tissues by regulating cell cycle factors and inhibiting cell apoptosis caused by ischemia-reperfusion injury.

**【Key words】** Acupuncture; Cerebral ischemia-reperfusion; Cell cycle factor; Apoptosis

脑缺血再灌注损害是由多因素引起的病理过程,能够导致神经元死亡。细胞凋亡与细胞坏死方式不同,是细胞的一种主动程序性死亡。在缺血性损害,尤其是在缺血易感区域部分而短暂的缺血损害中,细胞凋亡是主要的死亡形式。在近几年的研究中,细胞周期因子与细胞凋亡的关系得到重视,细胞周期因子在细胞凋亡过程中扮演着重要的角色<sup>[1]</sup>。针刺作为一种传统的治疗手段,在脑血管疾病中的疗效得到了肯定<sup>[2,3]</sup>,但其具体机制尚未明确。本研究通过观察针刺对脑缺血再灌注损伤后海马神经元细胞周期素 D1 (Cyclin D1)、细胞周期素依赖性激酶 4 (cyclin-dependent kinases 4, CDK4) 水平和神经元凋亡的影响,探讨其治疗作用及可能的机制。

## 材料与方法

### 一、实验动物与分组

选择成年健康雄性 Sprague-Dawley 大鼠 30 只,体重 200 ~ 250 g,清洁级,由同济医学院实验动物中心提供。将入选动物分为对照组 6 只、缺血再灌注组 12 只和针刺组 12 只。

### 二、模型制作

采用 10% 水合氯醛以 350 mg/kg 体重腹腔注射麻醉大鼠,颈部正中切口,分离并结扎左侧颈总动脉、颈外动脉,注意避免刺激迷走神经;从左颈总动脉分叉处插入直径为 0.25 mm 的丝线,沿颈内动脉进入大脑前动脉,距颈总动脉分叉处约 1.8 ~ 2.0 cm;30 min 后拔出丝线实现脑缺血再灌注。术中肛温维持在 37℃。

术后进行 Bederson 评分:0 分为无明显神经功能障碍;1 分为提鼠尾,前肢不能完全伸直;2 分为一侧前

肢阻力减小,行走偏向一侧;3 分为一侧旋转行走;4 分为原地旋转;5 分为完全性瘫痪,身体倾向一侧。Bederson 评分  $\geq 2$  分为造模成功。缺血再灌注组和针刺组各有 8 只大鼠造模成功。

### 三、针刺方法

针刺组大鼠造模成功后,按照《实验针灸学》<sup>[4]</sup>中的方法,取水沟、内关、曲池和足三里穴,直刺进针,提插捻转,四穴交替行针,每次共治疗 20 min,每 12 h 治疗 1 次,每日 2 次,共治疗 2 d。针刺在动物清醒状态下进行,用自制大鼠固定器固定,尽量减少对动物的刺激。对照组及缺血再灌注组每次用固定器固定,但不行针刺。

### 四、检测方法

各组大鼠于再灌注 48 h 后断头处死,在冰面上剥离大鼠左侧海马,  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱中冻存备用。

1. Western blot 法检测 Cyclin D1 和 CDK4 蛋白水平:海马匀浆后提取蛋白,采用 Bradford 法<sup>[5]</sup>测定蛋白含量。SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳,转膜,用 0.2% TTBS 洗膜,5% 脱脂奶粉封闭 1 h,加入 1:200 兔多克隆 Cyclin D1 和 CDK4 一抗(美国 Santa Cruz 公司产品)于  $4^{\circ}\text{C}$  下孵育过夜;用 0.2% TTBS 洗膜,加入 HRP 抗兔二抗于  $37^{\circ}\text{C}$  下孵育 1 h;在暗室中采用化学发光法显影,应用 Kodak 图像分析系统处理免疫印迹条带光密度,结果以相对密度表示(相对密度 = 各组条带平均光密度/对照组平均光密度)。

2. 流式细胞计数法检测细胞凋亡:将海马组织剪碎后,用 0.25% 胰蛋白酶于  $37^{\circ}\text{C}$  下消化,以等量生理盐水终止消化,经 200 目筛网过滤,离心,用 PBS 洗 2 次,调整细胞数为  $1 \times 10^6/\text{ml}$ ,Annexin V/PI 双染色法检测细胞凋亡。细胞凋亡率(%) = (凋亡细胞数/细胞总数)  $\times 100\%$ 。

### 五、统计学分析

实验数据以  $(\bar{x} \pm s)$  表示,采用 SPSS 11.0 版统计软件进行单因素方差分析,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

### 一、Cyclin D1 和 CDK4 的表达

与对照组相比,缺血再灌注组 Cyclin D1 和 CDK4 蛋白表达明显升高( $P < 0.01$ );与缺血再灌注组比较,针刺组 Cyclin D1 和 CDK4 蛋白表达明显降低( $P < 0.05$ 或  $0.01$ ),见图 1 和表 1。提示针刺作用能下调细胞周期因子的表达。

### 二、细胞凋亡情况

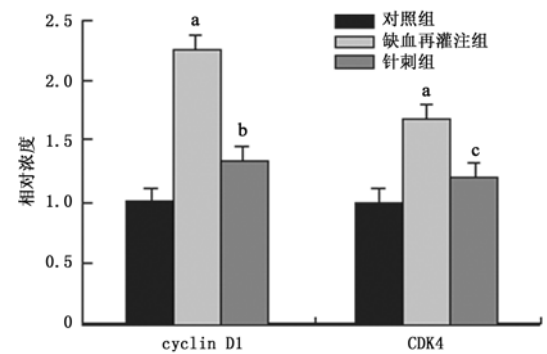
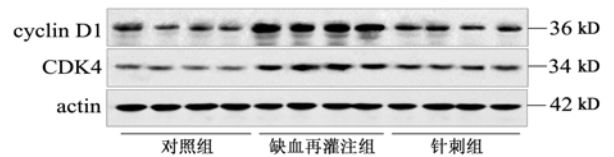
与对照组相比,缺血再灌注组细胞凋亡率显著升高( $P < 0.01$ ),针刺治疗后细胞凋亡率明显下降( $P <$

$0.05$ ),见表 1,图 2。提示针刺能够抑制凋亡。

表 1 各组 Cyclin D1 和 CDK4 蛋白相对密度及细胞凋亡率比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

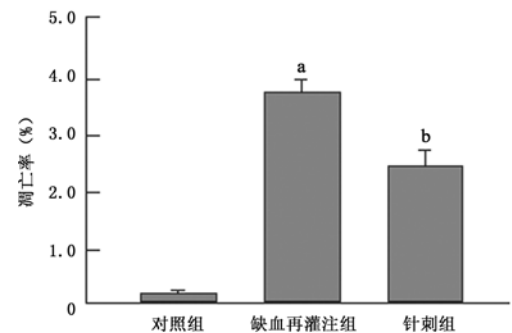
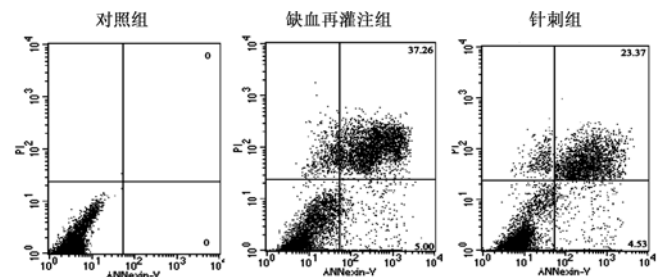
组 别	n	Cyclin D1	CDK4	细胞凋亡率(%)
对照组	6	1	1	$1.47 \pm 1.03$
缺血再灌注组	8	$2.2563 \pm 0.0717^a$	$1.6778 \pm 0.1044^a$	$37.58 \pm 5.04^a$
针刺组	8	$1.3015 \pm 0.1025^b$	$1.1959 \pm 0.1257^c$	$22.89 \pm 4.46^c$

注:与对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.01$ ;与缺血再灌注组比较,<sup>b</sup> $P < 0.01$ ,<sup>c</sup> $P < 0.05$



注:与对照组相比,<sup>a</sup> $P < 0.01$ ;与缺血再灌注组比较,<sup>b</sup> $P < 0.01$ ,<sup>c</sup> $P < 0.05$

图 1 各组脑缺血再灌注 48 h 后海马 Cyclin D1 和 CDK4 蛋白的表达



注:与对照组相比,<sup>a</sup> $P < 0.01$ ;与缺血再灌注组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$

图 2 各组脑缺血再灌注 48 h 后海马细胞凋亡率的比较

### 讨 论

近来有研究表明正常发育的神经细胞凋亡受两种不同的机制调控,一种涉及细胞周期蛋白,另一种即经典的 caspase 通路<sup>[6]</sup>。Cyclin D1 和 CDK4 是细胞从 G1 期进入 S 期的关键因子。在大鼠局灶性脑缺血后发现,Cyclin D1 和 CDK4 表达升高,表达高峰出现在缺血后 24~48 h,而凋亡高峰发生在缺血后 48~72 h<sup>[7]</sup>;全脑缺血后,在海马神经元中也发现 Cyclin D1 和 CDK4 表达升高<sup>[8]</sup>;应用 CDK 抑制剂可以抑制脑缺血后的神经元凋亡<sup>[9]</sup>。这些研究结果表明 Cyclin D1 和 CDK4 在缺血后中枢神经细胞中的表达,并非发挥其在细胞周期中的作用,而有可能直接启动神经细胞的凋亡过程,对细胞周期蛋白的调控可能是脑缺血后神经保护作用的一条途径。本研究发现,脑缺血再灌注后海马 Cyclin D1 和 CDK4 蛋白表达增高,凋亡细胞增多,与上述报道相符,表明脑缺血再灌注后异常表达的 Cyclin D1 和 CDK4 蛋白能够促进细胞凋亡。

针刺作为传统中医的有效治疗手段,对脑缺血有较好的治疗作用<sup>[10,11]</sup>。有研究表明,针刺对脑缺血引起的凋亡有明显抑制作用,其机制主要为减少自由基、防止钙超载、下调凋亡基因和上调抑凋亡基因<sup>[12-14]</sup>。本研究结果显示,针刺使脑缺血再灌注后神经元凋亡率下降,同时使 Cyclin D1、CDK4 蛋白表达降低,提示针刺对 cyclin D1 和 CDK4 的调控作用可能是其抗脑缺血再灌注后神经元凋亡的机制之一。

### 参 考 文 献

[1] Copani A, Uberti D, Sortino MA, et al. Activation of cell-cycle-associated

proteins in neuronal death: a mandatory or dispensable path. Trends Neurosci, 2001, 24: 25-31.

[2] Gao H, Guo J, Zhao P, et al. The neuroprotective effects of electroacupuncture on focal cerebral ischemia in monkey. Acupunct Electrother Res, 2002, 27: 45-57.

[3] Kim EH, Kim YJ, Lee HJ, et al. Acupuncture increases cell proliferation in dentate gyrus after transient global ischemia in gerbils. Neurosci Lett, 2001, 297: 21-24.

[4] 林文注, 王佩. 实验针灸学. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 288.

[5] Ausubel FM, 著. 颜自颖, 王海林, 译. 精编分子生物学实验指南. 北京: 科学出版社, 1998: 332.

[6] Lossi L, Gambino G, Mioletti S, et al. In vivo analysis reveals different apoptotic pathways in pre-and postmigratory cerebellar granule cells of rabbit. J Neurobiol, 2004, 60: 437-452.

[7] Li Y, Chopp M, Powers C, et al. Immunoreactivity of cyclin D1/CDK4 in neurons and oligodendrocytes after focal cerebral ischemia in rat. J Cereb Blood Flow Metab, 1997, 17: 846-856.

[8] Timsit S, Rivera S, Ouaghi P, et al. Increased cyclin D1 in vulnerable neurons in the hippocampus after ischemia and epilepsy: a modulator of in vivo programmed cell death. Eur J Neurosci, 1999, 11: 263-278.

[9] Osuga H, Osuga S, Wang F, et al. Cyclin-dependent kinases as a therapeutic target for stroke. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97: 10254-10259.

[10] 郭壮丽, 裴海涛. 急性脑缺血再灌注大鼠脑内 IL-1 $\beta$  蛋白表达及针刺对其抑制作用的研究. 中华物理医学与康复杂志, 2005, 27: 16-19.

[11] 沐榕, 李菁. 针刺配合康复训练对脑卒中偏瘫患者早期功能恢复的影响. 中华物理医学与康复杂志, 2006, 28: 128-129.

[12] 柏志全, 周丽丽, 郑辉, 等. 电针对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护. 针灸临床杂志, 2004, 20: 47-48.

[13] 梁宪如, 郭永明, 郑俊江, 等. 温通针法减轻脑缺血损伤的实验研究. 天津中医, 2002, 19: 30-31.

[14] 张京钟, 施静, 刘晓春, 等. 电针对大鼠局灶性脑缺血后 Bax, Bcl-2 表达的影响. 中国组织化学和细胞化学杂志, 2001, 10: 27.

(收稿日期: 2007-05-19)  
( 本文编辑: 吴 倩)

## 《中华物理医学与康复杂志》2008 年第 1 期 “继续教育园地”测试题

读杂志、获学分,本刊继续教育园地栏目每期推出,只要您每期阅读该栏目文章,正确填写答题卡寄回本刊编辑部,您就可获得国家 II 类继续教育学分,全年可获得 5 分。

测试题(文章见本期 64 页,答题卡见本期 38 页):

- 心脏负荷运动试验在心脏康复中的作用不包括下列哪一项:
  - 测定最大耗氧量
  - 测定运动耐力
  - 增加关节活动度
  - 帮助判定康复训练、药物干预疗效
- 评价体力活动能力的运动试验除症状限制运动试验、亚极量运动试验、医师检诊和职业模拟评价外,还包括:
  - 气体代谢运动试验
  - 6~12 min 步行评价
  - 心电图检查
  - MRI 检查

- 心肺运动仪测定的指标不包括:
  - 耗氧量
  - 代谢当量
  - 呼吸频率
  - 血液中白细胞水平
- 下列哪一期不包括在运动处方的程度内:
  - 热身期
  - 锻炼期
  - 平台期
  - 恢复期
- 某人体重 65 kg,运动强度为 5 METs,运动持续时间为 50 min,则其运动消耗的热量为:
  - 284.4 kcal
  - 300.4 kcal
  - 256.4 kcal
  - 320.4 kcal