

针刺对新生鼠缺血缺氧性脑损伤皮质神经营养因子及受体基因表达的影响

庄明华 郭燕春 白晔 刘明发 骆健明

【摘要】目的 观察针刺对新生大鼠缺血缺氧性脑损伤皮质神经营养因子及受体基因表达的影响,探讨针刺治疗缺血缺氧性脑病的分子机制。**方法** 建立新生大鼠脑缺血缺氧性损伤模型,用 GEArray Q 系列神经营养因子及受体基因芯片检测针刺治疗 14 d 后大鼠皮质基因表达的变化。**结果** 针刺组共有 48 条基因(占被检测基因总数的 50%)与对照组有表达差异,其中 40 条[占差异表达基因的 83.3%,如脑源性神经营养因子(BDNF)、睫状神经营养因子(CNTF)及受体(CNTFR)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)及受体(FGFR1)等]上调,8 条[占 16.7%,如神经调节素 1(Nrg1)、神经调节素 4(Nrg4)及酪氨酸激酶 C(TrkC)等]下调。**结论** 针刺对缺血缺氧性脑损伤新生大鼠大脑皮质多种神经营养因子及受体基因的表达有调节作用,这可能介导了针刺治疗缺血缺氧性脑病的分子机制。

【关键词】 针刺; 缺血缺氧性脑病; 神经营养因子; 受体

Effects of acupuncture on gene expression profile of neurotrophin and its receptors in cerebral cortex of neonatal rats after cerebral hypoxic-ischemic injury ZHUANG Ming-hua*, GUO Yan-chun, BAI Ye, LIU Ming-fa, LUO Jian-ming. * Department of Neurosurgery, the 2nd Affiliated Hospital of Shantou University Medical College, Shantou 515041, China

Corresponding author: GUO Yan-chun, Email: endless_99@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the effects of acupuncture on gene expression profile of neurotrophin and its receptors in cerebral cortex of neonatal rats after cerebral hypoxic-ischemic injury, and to explore the molecular mechanism of acupuncture in treatment of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. **Methods** The model of cerebral hypoxic-ischemic injury was established with 10 neonatal Sprague-Dawley (SD) rats, who were subjected to acupuncture once daily for 14 days. The animals were sacrificed on the next day of the last acupuncture and their brain cortex was sampled for examination of gene expression, using GEArray Q series neurotrophin and receptors gene array. **Results** After 14 days of acupuncture, it was found that 48 genes (50% of total genes on the microarray) were expressed differently between the two groups, of which 40 genes (83.3% of differently expressed genes), such as those of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF), ciliary neurotrophic factor (CNTF), ciliary neurotrophic factor receptor (CNTFR), basic fibroblast growth factor (bFGF) and fibroblast growth factor receptor type 1 (FGFR1) were up-regulated, and 8 genes (16.7% of differently expressed genes), such as genes of neuregulin-1 (Nrg1), neuregulin-4 (Nrg4) and tyrosine kinase C (TrkC) were down-regulated. **Conclusion** Acupuncture can regulate the expression of various genes of neurotrophin and receptors in cerebral cortex of neonatal rats after cerebral hypoxic-ischemic injury, which might be the mechanism of acupuncture facilitating the recovery of the rats from hypoxic-ischemic encephalopathy.

【Key words】 Acupuncture; Hypoxia-ischemia encephalopathy; Neurotrophin; Receptors

新生儿缺血缺氧性脑病(hypoxic-ischemic encephalopathy, HIE)是新生儿期危害最大的常见病之一,常引起新生儿死亡或严重的神经功能损害。针刺治疗 HIE 具有确切的临床效果,但其机制目前尚未完全明确。基因芯片技术是近年来发展起来的一项前沿生物技术,其特点是高通量、高灵敏度,能够对参与疾病过

程的众多基因的表达进行快捷、有效的筛查。本研究采用基因芯片研究针刺对新生大鼠缺血缺氧性损伤大脑皮质神经营养因子及受体基因表达的影响,从分子水平探讨针刺治疗 HIE 的机制。

材料与方法

一、材料、试剂和分组

7 d 龄新生 SD 大鼠 10 只,清洁级,体重 11 ~ 14 g,雌雄不拘,由广东省实验动物中心提供,与母鼠同笼喂养。GEArray Q 系列大鼠神经营养因子及受体基因芯

基金项目:广东省第三批科技计划项目(2003c33902)

作者单位:515041 汕头,汕头大学医学院第二附属医院神经外科(庄明华、郭燕春、刘明发、骆健明),针灸科(白晔)

通讯作者:郭燕春,Email:endless_99@163.com

片(美国 SuperArray 公司)及 Trizol 试剂(美国 Invitrogen life technologies 公司),均购自上海康成生物工程有限公司。将 10 只大鼠随机分成针刺组与对照组,每组 5 只。

二、HIE 模型建立

采用改良的 HIE 建模方法^[1],将 7 d 龄 SD 大鼠标记后,在清醒状态下取颈前正中切口,分离并双重结扎左颈总动脉,从中间剪断血管,缝合切口。随后立即放入 37℃ 水溶闭缺氧箱,持续充以含 8% 氧气和 92% 氮气的混合气体,气流量 1 L/min,维持 2 h 后分别取出,返笼由母鼠喂养。每只大鼠独立计时。

三、针刺和取材方法

针刺组于建模次日开始行针刺治疗,参照《实验针灸学》^[2]循经取督脉穴(百会、天门、大椎和脊中)、任脉穴(关元、中腕、膻中和承浆)、膀胱经穴(肺俞、心俞、脾俞和肾俞),毫针浅刺,不留针,每天针刺 1 次,共治疗 14 d;对照组建模后不做针刺治疗。针刺治疗结束次日将 2 组大鼠断颈处死,取左侧顶枕叶缺血缺氧病变明显部位的大脑皮质,每只大鼠取 50 mg,按 50~100 mg 脑组织/ml Trizol 试剂迅速加入 Trizol 试剂,匀浆后置 -80℃ 冰箱中保存备下一步用。本研究将针刺组 5 只大鼠所取脑组织混合作为一个样本,将对照组 5 只大鼠所取脑组织混合作为另一个样本。

四、神经营养因子和受体基因表达谱分析

1. RNA 抽提和质量检测:将上述匀浆液经氯仿抽提后,上层水相转移到新离心管内,按 1 ml Trizol 试剂/0.5 ml 加入异丙醇以沉淀其中的 RNA,然后用 75% 乙醇洗涤沉淀物,空气干燥。再用无 RNA 酶的水重新溶解 RNA 沉淀。用紫外吸收测定法检测所抽提 RNA 的浓度和纯度,针刺组和对照组吸光度 A260/A280 均大于 1.8,变性琼脂糖凝胶电泳结果同样显示获得了高纯度的总 RNA。

2. 探针合成:退火混合液包含总 RNA 5 μg,缓冲液 A 3 μl,无 RNA 酶的水补足体积至 10 μl,混匀,70℃ 下作用 3 min,然后在 42℃ 下冷却。10 μl RT 混合液含缓冲液 BN 4 μl, Biotin-16-dUTP 2 μl, RNA 酶抑制剂 1 μl, 逆转录酶 1 μl, 无 RNA 酶的水 2 μl, 混匀, 42℃ 孵育 1 min。每张芯片探针制备:加 10 μl 预热的 RT 混合液到 10 μl 退火混合液中,混匀,42℃ 孵育 90 min。反应得到的 cDNA 探针于 94℃ 加热 5 min,然后迅速放入冰中进行探针变性。此 cDNA 探针即可用于杂交。

3. 芯片杂交:将 GEAArray Q 芯片膜与含 100 μg/ml 热变性鲑鱼精子 DNA 的 GEAprehyb 预杂交液在 60℃ 下转速 6 r/min 预杂交 1.5 h。弃去杂交管中的预杂交液,加入杂交液(含 cDNA 探针的预杂交液)在 60℃

下 6 r/min 杂交过夜。然后以洗膜液 1 及洗膜液 2 分别洗膜 2 次,每次 5 ml,60℃ 温度下以 30~40 r/min 旋转 15 min。

4. 化学发光检测:弃去洗膜液后立即加入 1.5 ml GEA 封闭液 Q,30~40 r/min 孵育 40 min;弃去 GEA 封闭液 Q,加入 2 ml 结合缓冲液,孵育 10 min 后洗膜 4 次,每次用 4 ml 缓冲液 F 温和振荡 5 min 后弃去。再用 3 ml 缓冲液 G 冲洗 2 次。加入 1.0 ml CDP-Star 化学发光底物于杂交管中室温孵育 2 min,然后用 X-射线胶片曝光。

5. 图像采集和数据分析:X-射线胶片曝光后,将胶片上的图像转换成灰度 TIFF 格式的图片文件,再运用 ScanAlyze 和 GEAArray Analyzer 软件进行数据转换及资料分析,计算出针刺组与对照组标本在基因芯片上所获得的基因表达丰度的相对比值,筛选出比值 ≥2 或 ≤0.5 的基因(表 1)。

表 1 针刺组与对照组缺血缺氧大鼠皮质表达有差异的神经营养因子及受体基因

基因分类	表达上调基因 (针刺组/对照组 ≥2)	表达下调基因 (针刺组/对照组 ≤0.5)
神经营养因子及受体基因	Artn, Bdnf, Cntf, Cntfr, Crh, Crhbp, Crhr, F2, Gfra1, Gfra2, Gfra3, Gfra4, Gmfb, Snt-1, Tnfrsf5, Ucn, Zfp369	Nrg1, Nrg4, Ntrk3, Pnoc
神经肽及受体基因	Gpr74, Npff, Npy, Npy1r	Hert, Npy6r
生长因子及受体基因	Fgf2, Fgf9, Fgfr1, Tgfb1, Tgfb1i1	
细胞因子及受体基因	Il6ra, Il6st, Lif	Il1r1
化学因子受体基因		Cx3cr1
信号传导分子基因	Atf2, Ets1, Jun, Ncoa1, Stat4, Stat5a, Stat5b, Stat6	
凋亡相关基因	Bax, Bcl2, Trp53	

结 果

GEAArray Q 系列大鼠神经营养因子及受体基因芯片排列有 96 条神经营养因子及受体基因。对针刺组和对照组缺血缺氧损伤大鼠皮质的 96 条基因的表达谱进行分析比较(图 1),结果显示,针刺组总共有 48 条基因与对照组有表达差异,占被检测基因总数的 50%。其中 40 条[占差异表达基因总数的 83.3%,如脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)、睫状神经营养因子(ciliary neurotrophic factor, CNTF)、睫状神经营养因子受体(ciliary neurotrophic factor receptor, CNTFR)、碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)、碱性成纤维细胞生长因子受体 1(fibroblast growth factor receptor

type 1, FGFR1) 等] 上调, 8 条 [占差异表达基因总数的 16.7%, 如神经调节素 1 (Nrg1)、神经调节素 4 (Nrg4)、酪氨酸激酶 C (tyrosine kinase C, TrkC) 等] 下调 (表 1)。上调的基因涉及神经营养素及受体、神经肽及受体、生长因子及受体、细胞因子及受体、信号传导分子和凋亡相关基因等六大类, 下调的基因较少, 只涉及神经营养素及受体、神经肽及受体、细胞因子及受体、化学因子受体基因等四大类。

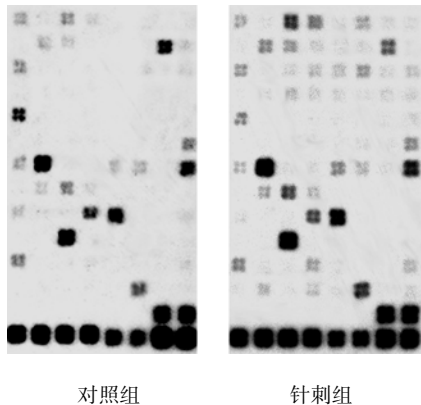


图 1 神经营养因子及受体基因芯片杂交图

讨 论

神经营养因子是神经系统重要的生物活性因子, 根据同源性大小等可将其主要分为神经营养素家族、胶质源性神经营养因子家族、睫状神经营养因子家族、成纤维细胞生长因子家族等几大家族^[3]。它们在神经元的生长、存活、分化及神经损伤的保护与修复中发挥了重要作用。

已有研究证明, 针刺能促进缺血缺氧损伤脑组织神经营养因子基因的表达^[4,5]。但以往实验应用常规的基因表达分析方法, 在一次实验中只能分析少数几条基因, 而大多数疾病过程是多基因参与的, 因此应用常规基因表达分析方法难以反映参与疾病过程的基因表达谱。基因芯片技术的出现使得大规模筛选疾病相关基因成为可能。应用基因芯片可以探索针刺治疗前、后 HIE 模型鼠大脑皮质神经营养因子及受体基因表达谱的差异, 对阐述针刺的治疗机制具有重要的意义。

本实验采用 GEArray Q 系列大鼠神经营养因子及受体基因芯片研究针刺督脉、任脉及膀胱经对新生大鼠缺血缺氧损伤大脑皮质相关基因表达的影响。结果显示, 针刺治疗 14 d 后, 在检测的 96 条神经营养因子及受体基因中, 针刺组共有 48 条与对照组表达有差异, 其中 40 条上调, 8 条下调。上调的基因涉及神经营养因子各个家族及受体, 主要包括神经营养素家族中的 BDNF, 睫状神经营养因子家族的 CNTF 及受体 CNTFR, 成纤维细胞生长因子家族中的 bFGF 及受体

FGFR1 等基因。BDNF 是发现比较早、研究比较多的神经营养因子, 广泛分布于中枢神经系统, 特别是在海马及皮质神经元, 为广谱神经营养因子。研究发现, 缺血损伤能升高 BDNF mRNA 水平, 而且 BDNF mRNA 水平高及反应高的区域病理改变轻^[6], 提示 BDNF mRNA 水平增高有利于损伤的细胞存活、生长、恢复。其它实验研究也证明 BDNF 对缺血缺氧性脑损伤具有明显的神经保护作用^[7,8]。本实验结果显示, 针刺治疗 14 d 后缺血缺氧损伤皮质 BDNF 基因明显上调, 提示针刺通过刺激 BDNF 基因的表达, 改善了脑内神经元生存环境而促进神经元再生、修复, 与既往研究结果^[4,5]一致。CNTF 在中枢和周围神经系统中的星形胶质细胞和雪旺细胞中均有表达, 具有广泛的生物活性, 可以促进感觉、交感、睫状、运动等多种神经元的存活、分化。Wen 等^[9]将 CNTF 灌注入前脑缺血模型鼠侧脑室, 发现 CNTF 灌注 7 d 后能防止模型鼠缺血引起的学习障碍, 并使其海马 CA1 区锥体细胞及突触比对照组明显增多。说明 CNTF 能保护缺血引起的神经元损伤及神经功能障碍。本实验中针刺治疗后缺血缺氧损伤大脑皮质 CNTF 及 CNTFR 基因明显上调, 提示针刺通过上调 CNTF 及其受体, 保护缺血缺氧损伤的神经元, 促进神经功能的恢复。bFGF 是一种广谱的有丝分裂原, 具有广泛的细胞增殖效应。它在中枢神经系统中主要来源于星形细胞, 能够促进大脑神经元的存活及神经突的生长^[10]。实验研究证明, bFGF 能够刺激大鼠神经干细胞分裂增殖^[11], 并能诱导皮质神经干细胞分化为神经元^[12]。本实验中针刺治疗后 bFGF 及其受体基因上调, 提示针刺可能通过上调 bFGF 及其受体, 刺激损伤部位神经干细胞分裂增殖, 并促使增殖的神经干细胞分化为神经元, 从而修复缺血缺氧损伤的脑组织。

下调的基因种类及数量均较少, 具有代表性的是 Nrg1 基因。Nrg1 基因的产物为与表皮生长因子具有相似结构的多个信号因子, 其中的胶质细胞生长因子 (glial growth factor, GGF) 主要分布于神经系统, 通过与 ErbB 受体结合, 在胶质细胞发育过程中发挥重要作用^[13], 并能减轻缺血引起的脑损伤^[14]。体外标准的培养条件下, 具有多分化潜能的神经嵴细胞克隆能够分化成 peripherin⁺ 细胞 (神经元) 和 GFAP⁺ 细胞 (胶质细胞)。加入 GGF (Nrg1) 后, 神经嵴细胞克隆仍可分化成 GFAP⁺ 细胞, 而 peripherin⁺ 细胞则始终未出现^[15]。另有实验证明, Nrg1 能够促进培养的小鼠纹状体神经干细胞增殖, 促进神经干细胞向少突胶质细胞和星形胶质细胞分化, 而对神经元的诱导分化没有影响^[16]。提示 Nrg1 具有促使神经干细胞向胶质细胞分化的作用。本课题组已证明针刺可促进缺血缺氧大鼠皮质神经干细胞增殖^[17,18]。本实验中针刺治疗后

Nrg1 基因下调,推测与促进增殖的神经干细胞向神经元方向而不是胶质细胞方向分化有关,这可能更有利于促进神经损伤的修复。

综上所述,针刺治疗后,HIE 模型鼠缺血缺氧损伤大脑皮质大量神经营养因子及受体基因的表达发生改变,其中大部分上调,少数下调。差异表达的基因大多数在促进神经元生长、存活、分化及对神经损伤的保护与修复等方面发挥一定的作用。由此可见,针刺治疗 HIE 的机制并不是简单的上调具有神经保护作用的众多神经营养因子的表达,而是针刺治疗后,损伤局部微环境中大量神经营养因子的表达发生改变,各种神经营养因子之间还通过相互调节、协调作用,其总合作用最终促进受损脑组织的修复。这种众多神经营养因子互相调节的作用方式或许更有利于促进损伤神经元的修复。此外,针刺还调节了细胞因子基因、信号传导分子基因、凋亡相关基因等的表达,提示针刺对缺血缺氧性脑病治疗机制的复杂性,可能是通过多条途径,作用于多个靶点而最终实现的。

参 考 文 献

- [1] 骆健明,庄明华,刘明发,等. 两种新生儿缺血缺氧性脑病模型建模方法的比较. 中国康复理论与实践,2005,11:548-549.
- [2] 李忠仁,主编. 实验针灸学. 北京:中国中医药出版社,2003:327-329.
- [3] 王利军,白丽敏. 神经营养因子在中枢神经系统的作用. 神经解剖学杂志,2003,19:217-220.
- [4] 郭宗君,王鲁民. 电针刺刺激神经干对脑缺血再灌注后不同时期皮层 BDNF mRNA 表达的影响. 中华物理医学与康复杂志,2004,26:585-588.
- [5] 张雪朝,孙国杰. 针刺对缺血再灌注大鼠海马源性神经营养因子 mRNA 的影响. 中国神经免疫学和神经病学杂志,2004,11:98-101.
- [6] 石向群,陆兵勋,米瑞发,等. 脑缺血再灌注后脑内源性神经营养因子的基因表达与调节. 卒中与神经疾病,2000,7:1-3.
- [7] Larsson E, Nanobashvili A, Kokaia Z, et al. Evidence for neuroprotective effects of endogenous brain-derived neurotrophic factor after global forebrain ischemia in rats. J Cereb Blood Flow Metab, 1999, 19:1220-1228.
- [8] Schäbitz WR, Berger C, Kollmar R, et al. Effect of brain-derived neurotrophic factor treatment and forced arm use on functional motor recovery after small cortical ischemia. Stroke, 2004, 35:992-997.
- [9] Wen TC, Matsuda S, Yoshimura H, et al. Ciliary neurotrophic factor prevents ischemia-induced learning disability and neuronal loss in gerbils. Neurosci Lett, 1995, 191:55-58.
- [10] Abe K, Saito H. Effects of basic fibroblast growth factor on central nervous system functions. Pharmacol Res, 2001, 43:307-312.
- [11] Itoh T, Satou T, Dote K, et al. Effect of basic fibroblast growth factor on cultured rat neural stem cell in three-dimensional collagen gel. Neurol Res, 2005, 27:429-432.
- [12] Palmer TD, Markakis EA, Willhoite AR, et al. Fibroblast growth factor-2 activates a latent neurogenic program in neural stem cells from diverse regions of the adult CNS. J Neurosci, 1999, 19:8487-8497.
- [13] Garratt AN, Britsch S, Birchmeier C. Neuregulin, a factor with many functions in the life of a schwann cell. Bioessays, 2000, 22:987-996.
- [14] Shyu WC, Lin SZ, Chiang MF, et al. Neuregulin-1 reduces ischemia-induced brain damage in rats. Neurobiol Aging, 2004, 25:935-944.
- [15] Shah NM, Marchionni MA, Isaacs I, et al. Glial growth factor restricts mammalian neural crest stem cells to a glial fate. Cell, 1994, 77:349-360.
- [16] Calaora V, Rogister B, Bismuth K, et al. Neuregulin signaling regulates neural precursor growth and generation of oligodendrocytes in vitro. J Neurosci, 2001, 21:4740-4751.
- [17] 刘明发,庄明华,骆健明,等. 针刺对新生鼠缺血缺氧性脑损伤皮层 Nestin 表达的影响. 中华物理医学与康复杂志,2006,28:437-440.
- [18] 庄明华,骆健明,刘明发,等. 针刺任脉、督脉及膀胱经促进新生儿缺血缺氧性脑病鼠模型脑内神经干细胞增殖. 中华神经医学杂志,2006,5:686-688.

(修回日期:2007-05-16)

(本文编辑:阮仕衡)

· 消息 ·

第七届“脑卒中患者运动再学习方案”学习班通知(国家级继续教育项目)

北京大学第一医院物理医学康复科自 1999 年将澳大利亚悉尼大学教授 J. H. Carr 和 R. Shepherd 的《A Motor Relearning Programme for Stroke》一书翻译成中文《中风病人的运动再学习方案》并发行后,已连续举办六届全国学习班,介绍“运动再学习”方法,深深体会到该方法的科学性和高效性。2007 年我科又将 J. H. Carr 和 R. Shepherd 教授的《Stroke Rehabilitation: Guidelines for Exercise and Training to Optimize Motor Skill》一书翻译成中文《脑卒中康复——优化运动技能的练习与训练指南》,成为运动再学习方案的升级版。该书充实了大量研究新成果,为运动再学习方案提供了更加深入的科学依据。新的升级版将作为本届学习班讲义,相信在充分理解机制的基础上学习脑卒中康复治疗技术会达到融会贯通的更高层次。从第五届学习班开始,授课教师由我科参译作者(副主任医师以上职称)和经验丰富的治疗师承担,在认真整理和汇总前几届内容尤其是 Carr 和 Shepherd 教授亲自主讲部分的基础上,高效、系统、详细地介绍脑卒中患者运动再学习方案,理论解析与动手操作相结合,并融入了我们多年来的经验和体会,得到学员们一致好评。应广大同行的要求及对升级版的期待,今年举办的学习班将继续以同样的方式介绍实用的操作技术及其机制,希望我们的学习班成为具有丰富技术含量的学习班。时间为 2007 年 11 月 4~9 日(4 日全天报到)。学费 900 元,资料费 100 元。食宿统一安排,费用自理。考试合格者授予国家级继续教育学分 13 学分。报名请于 10 月 10 日前寄到:北京大学第一医院物理医学康复科 黄真 收,邮编:100034。或 E-mail: huangzhen6313@yahoo.com.cn,电话联系:010-66551122-2455。以往参加过“中风病人运动再学习方案”学习班的学员优先。名额 50 人。若无第二轮通知,请按时到北京市西城区西什库大街 7 号,北大医院第二住院部教学楼一层报到。

北京大学第一医院物理医学康复科