

·基础研究·

早期电针对局灶性脑缺血大鼠双侧皮质脑源性神经营养因子表达的影响*

于俊海^{1,2,6} 肖娜^{2,3,6} 向珩^{2,4,6} 黄力平^{2,6,7} 周石^{2,5,6}

摘要

目的:观察早期电针治疗对局灶性脑缺血大鼠双侧皮质脑源性神经营养因子(BDNF-mRNA)的时序性变化,探讨电针治疗偏瘫的交叉迁移效果的分子生物学机制。

方法:用线栓法建立局灶性脑缺血模型,将建模成功的54只SD大鼠随机分为健肢治疗组(UALTG)、患肢治疗组(ALTG)、对照组(CG),各组再随机分为1周、2周、3周组,造模成功24h后对治疗组浅麻醉行电针穴位治疗,每组各时间段结束24h内分离缺血皮质及对侧同部位皮质,采用RT-PCR法测定BDNF-mRNA表达量。

结果:①对缺血皮质BDNF-mRNA表达的影响:ALTG组BDNF-mRNA在第7天、第14天、第21天时表达量均有增加,与CG组相比有显著性增高($P<0.01$),而UALTG组在第7天和第21天时表达量均有增加,与CG组相比有显著性增高($P<0.01$);在第7天和第21天时UALTG组较ALTG组表达量更高($P<0.01$)。②对缺血对侧皮质BDNF-mRNA表达的影响:ALTG组在第7天和第21天时BDNF-mRNA表达量高于CG组($P<0.01$);UALTG组在第14天时表达量高于CG组($P<0.01$),且ALTG组表达量同时也高于UALTG组($P<0.01$);而UALTG组和ALTG组在第21天时的表达量均下降,低于CG组($P<0.01$)。

结论:早期电针治疗MCAO局灶性脑缺血大鼠健侧肢体和患侧肢体都能有效促使双侧皮质BDNF-mRNA的表达上调,具有明显的交叉迁移效果,且健侧较患侧更大幅度提高缺血皮质BDNF-mRNA的表达,这种变化可能是大鼠功能恢复较好和病死率较低的分子机制之一。

关键词 电针;脑缺血;脑源性神经营养因子;交叉迁移;早期康复

中图分类号:R245;R743.3;R493 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2015)-02-0122-05

Effects of early electroacupuncture on the expression of brain derived neurotrophic factor-mRNA in the bilateral cerebral cortex after local cerebral ischemia in rats/YU Junhai, XIAO Na, XIANG Heng, et al// Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2015, 30(2):122—126

Abstract

Objective: To examine the temporal effects of electroacupuncture(EA) on the changes of brain derived neurotrophic factor(BDNF)-mRNA in bilateral cerebral cortexes after local cerebral ischemia in rats in order to approach the mechanism of cross education of EA on hemiplegia.

Method: Fifty-four SD rats with middle cerebral artery occlusion (MCAO) were established the local ischemic models and randomly divided into three groups: control group (CG, n=18), unaffected limb therapy group (UALTG, n=18), and affected limb therapy group (ALTG, n=18). EA groups received EA at 24h after the onset of MCAO model. Six rats in each group were sacrificed in a random order, at the 7th, 14th and 21st d after modeling. Ischemic cerebral and the contralateral cortex were dissected quickly. The specimens were frozen

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2015.02.004

*基金项目:天津市高等学校科技发展基金项目(2006ZX02)

1 陕西省体育科学研究所,西安,710065; 2 天津体育学院; 3 北京市第二人民医院; 4 天津医科大学; 5 澳大利亚南十字星大学; 6 天津市运动生理学与运动医学重点实验室; 7 通讯作者

作者简介:于俊海,男,助理研究员; 收稿日期:2014-04-18

in liquid nitrogen before analyse for BDNF-mRNA expression by RT-PCR.

Result: ①The up-regulation expression of BDNF-mRNA in the ischemic cortex of ALTG demonstrated significantly higher than that of CG at the 7th d,14th d,21st d($P<0.01$),The level of BDNF-mRNA in UALTG was higher than that of CG at the 7th d,21st d,meanwhile,which was higher than that of ALTG($P<0.01$);②There was also a quickly high expression of BDNF-mRNA in the contralateral cortex of ALTG at the 7th d and 14th d,which was higher than that of CG ($P<0.01$). The expression of BDNF-mRNA in UALTG become higher than that of CG at the 14th d ($P<0.01$),but lower than that of ALTG($P<0.01$), the levels of both EA groups were significantly lower than that of CG at the 21st d($P<0.01$).

Conclusion: The up-regulation expression of BDNF-mRNA level in ischemic and contralateral cortex were observed after EA on both side limbs, which indicated the effectiveness of cross-education.From the 7th d to the 21st d,The expression of BDNF-mRNA consecutively kept high level in ischemic cortex in EA groups,higher expression of BDNF gene induced by EA intervention on the unaffected limb, which showed EA intervention on the unaffected limb at earlier time might promote nerve-regeneration better in ischemic cortex, facilitate the balance of both side cortices.This plasticity may be one of the mechanisms that promote better recovery and lower mortality in rats with MCAO.

Author's address Shanxi Institute of Sport Science, Xi'an,Shanxi Province, 710065

Key word electroacupuncture; cerebral ischemia; brain derived neurotrophic factor;cross education; early rehabilitation

临床研究表明,针刺作为一种有效的治疗手段已广泛应用于缺血性脑血管疾病康复的急性期及恢复期,其不仅可以在细胞、分子等多个层面抑制脑损伤的级联反应,而且在神经修复过程中也发挥积极作用。但目前针刺部位,穴位选取等方面尚未统一^[1]。本课题组前期研究显示^[2],脑卒中后穴位电针治疗能够促进局灶性脑缺血大鼠神经功能恢复,减少梗死面积,而健侧肢体穴位电针治疗较患侧穴位电针治疗能够有更好的效果。因此本实验拟在此基础上通过对脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)表达变化的研究,探讨健侧电针与患侧电针治疗是否具有交叉迁移效果,以及哪侧治疗后脑内源性BDNF基因反应较好,从而阐明其治疗可能的机制,为早期健侧电针治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 研究对象及分组

实验选用健康雄性SD大鼠60只,体重275—320g(中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心提供),实验前先进行一周的适应性饲养,建立大脑中动脉栓塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型,手术完成后1h采用Longa评分法评

定^[3],评分为2—4分视为建模成功。将建模成功的54只大鼠随机分为健肢穴位治疗组(unaffected limb therapy group, UALTG),患肢穴位治疗组(affected limb therapy group, ALTG),模型对照组(control group, CG),每组18只,各组再随机分为1周、2周、3周组,(每组各6只)。建模成功24h开始对两个治疗组浅麻醉后行电针穴位治疗,模型组同样进行浅麻固定,但不给予电针穴位治疗。

1.2 模型制作

参照改良的Zea-Longa法^[3]制备MCAO模型,先将SD大鼠称重后用10%水合氯醛(0.3ml/100g体重)腹腔注射麻醉,仰卧位固定于小动物手术台上,剃去颈前正中线偏左侧鼠毛,常规消毒,铺巾,巾洞口偏向左侧,在颈前正中线中点左侧旁开1cm处切开约1.5cm小口,依次剥离皮肤,筋膜,胸骨锁骨肌,颈前外侧肌,分离颈动脉壳,轻轻剥离颈总动脉,在颈总动脉的近心端和远心端分别挂线,结扎颈总动脉的远心端后再次挂线,一根提拉血管,一根轻栓动脉备用,在结扎口附近剪一T字形小口,提拉血管,将鱼线和硅胶做成的线栓由小孔插进,顺颈内动脉走行,避开翼腭动脉,穿过颈内动脉口入颅,当感觉到阻力,大约距颈内外分叉17cm处,结扎线栓,用庆大霉素冲洗伤口后,依次缝合伤口。待大鼠清醒后

放干净清洁笼中喂养。

1.3 治疗方法及参数

将穴位治疗组大鼠浅麻醉(10%水合氯醛, 0.2ml/100g)后俯卧位固定于自制训练架上,电针穴位及解剖部位参考《大鼠穴位图谱的研制》^[4],选取曲池、外关、足三里、下巨虚四个穴位,(中医理论,偏枯者取手足阳明经穴为主),选用毫针(长度25mm,直径0.18mm)直刺,刺激频率10Hz,疏密波,以见到骨骼肌轻微收缩为宜,时间15min,早晨8—10h,每日1次,每周7次。模型各周期组同样采取浅麻醉,固定,但不给予电针治疗。

1.4 指标的检测

将各组大鼠在治疗结束后24h腹腔注射10%水合氯醛(0.3ml/100g)麻醉,冰冻生理盐水经左心室灌注处死,迅速开颅分离脑组织,依据《大鼠脑组织立体定位图谱》^[5],去除前囟(bregma)线前2.7mm,耳间(interaural)线前11.70mm和前囟线后-8.30mm,耳间线前0.70mm两个层面,分离中间皮质,迅速置于液氮中过夜,之后于-80℃冰箱中保存,以备生化测试。取脑组织冰冻缺血皮质样本50mg,加入1ml-Trizol(Invitrogen)匀浆,抽提总RNA。总RNA质量由紫外分光光度计A260/280比值和0.8%琼脂糖凝胶电泳确定。按照Fermentas公司Revert AidTM-First Strand cDNA Synthesis Kit说明书进行逆转录反应,将逆转录产物稀释10倍后冻置-20℃保存备用;实时定量PCR按照荧光定量试剂盒说明书操作,应用PE公司的7900HP荧光定量PCR仪进行。

引物序列为:

BDNF上游: atc cac tga gca aag ccg aac;

下游cag cct tca tgc aac cga agt a(198bp);

18S rRNA上游:tga ggt ttc ccg tgt tga g;

下游:gac cat aaa cga tgc cga ct(190 bp)。

扩增条件:预变性95℃ 2min;变性95℃ 5s,退火54.0—55.5℃(根据不同引物的退火温度)20s,共40个循环。溶解曲线温度为55—95℃(每10s升高0.5℃),扩增完毕进行溶解曲线分析,并读取各管中CT值。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法进行数据分析。 ΔCt 值由目标基因的Ct值减去18s的Ct值得到,每组目标基因的 ΔCt 都与CG的平均 ΔCt 相减得到 $\Delta\Delta Ct$,然后用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 来表示其相对表达量。

1.5 主要仪器和试剂

SDZ-II电针仪(华佗牌,苏州);渔线d0.235mm(雪姬牌,日本);ChampGel2000型凝胶成像仪(上海天能科技有限公司);Cary Eclipse荧光分光光度计(Beckman Co, USA);PCR扩增仪(PE-9600)(Varian Co, USA);7900HP荧光定量PCR仪(PE-Cetus Co, USA);引物,Fermentas反转录试剂盒 Revert AidTMFirst Strand cDNA Synthesis Kit(中国晶美公司);SYBR® Premix Ex TaqTM(Sigma Co.)。

1.6 统计学分析

所有实验数据由SPSS13.0处理,计算均值和标准差。重复方差分析检验组间差异,统计学显著性水平定为 $P<0.05$ 。

2 结果

2.1 电针穴位治疗对缺血皮质BDNF-mRNA表达的影响

UALTG组和ALTG组BDNF-mRNA在治疗第7天时均有较高程度表达,与CG组相比,有显著性差异($P<0.01$),且UALTG组较患侧电针治疗组的表达量更高($P<0.01$),在治疗第14天时两治疗组表达量均下降,而ALTG组的表达量仍高于CG组,有显著性差异($P<0.01$),治疗第21天时两治疗组表达量再次升高,与CG组比较有显著性差异($P<0.01$),UALTG组BDNF-mRNA的表达量再次高于ALTG组,差异有显著性意义($P<0.01$),见表1。

2.2 电针穴位治疗对缺血对侧皮质BDNF-mRNA表达的影响

ALTG组在治疗第7天时缺血对侧皮质BDNF-mRNA表达量高于CG组,有显著性差异($P<0.01$),在治疗第14天时两治疗组的表达量均高于CG组,有显著性差异($P<0.01$),且ALTG组高于UALTG组,差异有显著性意义($P<0.01$),而两治疗组第21天时的表达量均低于CG组,有显著性差异($P<0.01$),见表2。

表1 各组缺血皮质BDNF-mRNA表达水平比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	治疗第7天	治疗第14天	治疗第21天
UALTG组	16.21±1.01 ^{①②}	0.25±0.03 ^{①②③}	10.30±0.54 ^{①②③④}
ALTG组	5.10±0.48 ^①	1.56±0.11 ^{①③}	4.32±0.35 ^{①③④}
CG组	1.04±0.26	1.02±0.19	1.00±0.04

①与CG组同时时间点比较 $P<0.01$;②与患侧电针治疗组同时时间点比较 $P<0.01$;③与组内治疗第7天比较 $P<0.01$;④与组内治疗第14天比较 $P<0.01$ 。

表2 各组缺血对侧皮质BDNF-mRNA表达水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	治疗第7天	治疗第14天	治疗第21天
UALTG组	0.38±0.01 ^{①②}	1.92±0.38 ^{①②③}	0.72±0.09 ^{①②③④}
ALTG组	2.59±0.11 ^①	3.52±0.25 ^{①③}	0.11±0.02 ^{①③④}
CG组	1.02±0.17	1.00±0.08	1.10±0.27

①与CG组同时时间点比较 $P<0.01$;②与患侧电针治疗组同时时间点比较 $P<0.01$;③与组内治疗第7天比较 $P<0.01$;④与组内治疗第14天比较 $P<0.01$ 。

3 讨论

研究显示,脑组织损伤过程中,神经元出现了一系列损伤性改变及相应的保护机制。这些相应的变化都是由相关损伤和抗损伤因子调节,脑损伤作为一种刺激可以诱导损伤和抗损伤因子的表达^[6-7],脑源性神经营养因子BDNF就是抗损伤因子中的一种。BDNF是一种广泛分布的多效能神经营养因子,不仅在中枢神经系统发育过程中对神经元的生存、分化、生长和维持神经元正常的生理功能起关键作用,而且还具有抵抗伤害性刺激,促进神经元损伤后的修复及再生等作用^[8-9]。脑缺血后BDNF反应性增强,是机体早期神经元对缺血、缺氧自我保护的一个重要内容^[10]。目前已知脑缺血后内源性BDNF的表达水平偏低,持续时间亦较短,单纯内源性BDNF的上调不足以防止神经细胞死亡,只有当BDNF含量达到一定阈值损伤大脑才能够恢复,而外源性BDNF不能通过血脑屏障,从而限制了静脉给药途径,因此,康复训练、针刺等各种外界刺激上调BDNF表达对卒中后神经功能恢复具有极其重要的意义^[11-13]。

本研究中发现,患侧治疗组缺血皮质BDNF-mRNA表达量在各时间点均高于模型对照组,第7天时表达量最高,第14天下降,提示电针治疗增强了缺血皮质的自身代偿能力,上调内源性BDNF的表达量,进而提高神经细胞抗缺血损伤能力,促进神经元的修复、再生,而第21天的表达量再次升高,可能与BDNF在不同时间段的作用机制不同相关。而健侧治疗组缺血皮质BDNF-mRNA不仅在第7天有更高水平的表达量,在第21天时仍有高水平的表达量,与以往的研究结果一致^[14]。缺血皮质BDNF-mRNA的这种表达变化说明,持续高水平的BDNF不仅能够挽救缺血半影区缺血神经元,修复损伤神经元,而且能够促进梗死灶周围神经元出芽,再生并

形成新的突触连接,BDNF可以经胞体运输至轴突末端释放,被次级神经元摄取利用,参与突触的可塑性^[2,15]。同时在轴突生长发育中激活了各种信号传导系统,调节神经元的生长和分化,促进了突触的形成^[7,16]。另外,我们根据祖国传统医学中“巨刺者,左取右,右取左”,的经络气血相贯,左右倾移,上下互调而采用的这种选穴针刺方法^[2]。发现早期持续的健侧电针刺激可以促使受损脑区域的皮质BDNF-mRNA的表达量持续上调,更有利于缺血皮质抗损伤效应的发挥和神经元修复及神经连接发生的重建,这对卒中后神经功能的恢复采用早期电针穴位治疗具有重要意义。

在本实验中发现,健侧治疗组和患侧治疗组的缺血对侧皮质BDNF-mRNA在治疗第7天时均有较高程度表达,与模型对照组相比有显著性差异,且健侧治疗组较患侧治疗组的表达量更高($P<0.01$),表明健侧大脑皮质参与了卒中后脑功能的重建,这与先前的研究结果是一致的^[17]。有研究发现,电针针刺健康受试者右侧肢体时,左侧大脑感觉运动皮质的葡萄糖代谢增高,而对卒中患者进行针刺患侧肢体时,对侧皮质葡萄糖代谢增高,也证实了针刺卒中患者的患侧肢体时会产生双侧的大脑皮质效应^[18]。本研究中健侧治疗组的BDNF-mRNA的表达量高于患侧治疗组说明针刺治疗后局灶缺血性脑损伤区域的局部环境中BDNF的表达量发生增加,使各种神经营养因子之间相互调节的作用增强,促进了受损伤神经元的修复,从而促进损伤脑组织的修复^[12]。运动生理学研究表明,长期一侧肢体运动对对侧肢体同源部位肌肉功能会产生明显的影响,对侧肢体获得的这种功能变化表现出训练效果的特异性,被称之为交叉迁移现象,当测试方式和同侧肢体训练方式相同时,交叉迁移的效果更为明显^[19]。相关研究显示,采用电针足三里和下巨虚等穴位,对健康受试者进行为期4—6周的单侧针刺穴位训练,可以同步提高两侧胫骨前肌的肌肉力量,显现出治疗效果的交叉迁移^[20]。而本实验中健侧电针治疗组在第7天时对缺血皮质的表达量增加就高于患侧电针治疗组对缺血皮质的影响,并且在第21天时持续表达升高,也高于患侧电针治疗组,说明早期健侧电针穴位治疗对缺血皮质区的影响以及治疗效果要优于

患侧治疗。

本实验中还发现,患侧电针治疗组在治疗第7天、第14天时缺血皮质的对侧皮质BDNF-mRNA表达量显著高于模型对照组,进一步说明患侧治疗同样也可导致对侧迁移,影响缺血对侧的大脑皮质BDNF-mRNA表达增加,而缺血对侧大脑皮质的BDNF-mRNA表达上调同时可增加局部神经营养因子的相互联系和协调,促使缺血侧的神经元得到更快修复,也进一步证实了神经系统的这种交叉迁移效果。这与我们前期采用fMRI观察双侧大脑皮质的交叉迁移现象的研究结果也是类似的^[21]。而本实验中所发现在治疗第14天时两治疗组的表达量均高于模型对照组,而随着治疗时间推移,两治疗组在第21天时的表达量均显著低于模型对照组,说明早期的电针穴位治疗脑卒中的重要性和必要性。

在本实验中,依据大部分相关研究中基础实验电针刺激对实验动物采用的都是浅麻醉方式,因此本研究对实验各组所有动物均采用浅麻醉方式在相同情况下实施干预,故各组之间的实验结果是可以比较的。考虑到浅麻醉或许对针刺效果有影响,我们将在下一步的研究中再增加非麻醉组观察。

本实验首次观察到,早期电针穴位治疗健侧肢体可以增加脑缺血区皮质BDNF-mRNA的分泌和表达时程,同时,还可促进局灶性脑缺血大鼠的双侧皮质BDNF-mRNA的表达上调。

4 结论

早期电针穴位治疗MCAO局灶性脑缺血大鼠健侧肢体和患侧肢体都能有效促使双侧皮质BDNF-mRNA的表达上调,具有明显的交叉迁移效果。健侧较患侧更大幅度提高缺血皮质BDNF-mRNA的表达,提示早期健侧电针治疗能更好启动缺血皮质神经修复再生过程,促进两侧皮质间平衡,这种可塑性变化可能是大鼠功能恢复较好和病死率较低的分子机制之一。

参考文献

[1] 马允,杨帆,昂文平.针刺对脑损伤保护机制的实验研究进展[J].广州中医药大学学报,2013,30(1):120—124.
[2] 黄力平,向珩,肖娜,等.早期电针刺激局灶性脑缺血大鼠健侧肢体的康复效果[J].中国康复医学杂志,2012,27(9):808—812.

[3] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke,1989,20:84—91.
[4] 华兴邦,周浩良.大鼠穴位图谱的研制[J].实验动物与动物实验,1991,(1):1.
[5] Paxinos G. The rat brain in stereotaxic coordinates[M].3th ed. San Diego: Elsevier. 2005.
[6] Huang D, Zhang Z, Chen B, et al. Therapeutic efficacy of lentiviral vector mediated BDNF gene-modified MSCs in cerebral infarction[J]. Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao, 2008,24(7):1174—1179.
[7] 王尊,王磊,王彤.血液中枢源性神经生长因子与疾病与运动的关系[J].中国康复医学杂志,2014,29(3):291—294.
[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] 张丽,林海燕,屠文展,等.电针对慢性期脊髓损伤大鼠功能恢复及神经营养因子表达的影响[J].中国康复医学杂志,2014,29(4):311—315.
[10] Song XY, Li F, Zhang FH, et al. Peripherally-derived BDNF promotes regeneration of ascending sensory neurons after spinal cord injury[J]. PLoS One, 2008, 3(3):1707.
[11] Heed T,Beurze SM,Toni I,et al. Functional rather than effector specific organization of human posterior parietal cortex [J]. Neurosci,2011,31: 3066.
[12] Jiang H, Wang M, Guo J, et al. The midnight-noon ebbs flow point selection for 30 cases acute ischemic cerebrovascular disease[J]. Tradit Chin Med, 2008, 28(3):193—197.
[13] Ke Z, Yip SP, Li L, et al. The effects of voluntary, involuntary, and forced exercises on motor recovery in a stroke rat model[J]. Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc, 2011: 8223—8226.
[14] 李英平,郭瑞芳,李育臣,等.局灶性脑缺血大鼠海马区不同部位脑源性神经营养因子的表达及其意义[J].中国老年医学杂志,2004,24(12):1180—1182.
[15] Huang SH,Duan S,Sun T,et al. JIP3 mediates TrkB axonal anterograde transport and enhances BDNF signaling by directly bridging TrkB with kinesin-1[J]. J Neurosci,2011,31(29):10602—10614.
[16] Cheng PL,Song AH,Wong YH,et al. Self-amplifying autocrine actions of BDNF in axon development[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2011,108(45):18430—18435.
[17] Biernaskie J, Szymanska A, Windle V, et al. Bi-hemispheric contribution to functional motor recovery of the affected forelimb following focal ischemic brain injury in rats[J]. Eur J Neurosci, 2005,21(4):989—999.
[18] 贾少微,徐文贵,王全师,等.应用PET研究针刺信号对人脑能量代谢的影响[J].中西医结合杂志,2002,22(7):508—511.
[19] Hortobagyi T. Cross education and the human central nervous system[J]. IEEE Engineering in Medicine and Biology Magazine,2005,24(1):22—28.
[20] Zhou S, Huang LP, Liu J, et al. Bilateral effects of 6 weeks' unilateral acupuncture and electroacupuncture on ankle dorsiflexors muscle strength: a pilot study[J]. Arch Phys Med Rehabil,2012,93(1):50—55.
[21] Marcelo Saad. Acupuncture- Concepts and Physiology[M]. Publisher:InTech. 2011. 49—68.