

电针对大脑中动脉梗塞大鼠 EphrinB2/EphB2 信号通路上突触重塑相关因子的影响*

李洪亮^{1,2} 向娟² 欧阳里知² 陈果² 薛智慧² 龙抗胜² 李铁浪^{2,3}

摘要

目的:观察电针对大脑中动脉梗塞模型(MCAO)大鼠促红细胞生成素产生肝细胞配体-B2(erythropoietin-producing hepatocyte receptor interacting protein-B2, EphrinB2)/受体-B2(erythropoietin-producing hepatocyte receptor-B2, EphB2)信号通路上突触重塑相关因子表达的影响,以期揭示针刺治疗脑缺血的可能机制。

方法:120只雄性SD大鼠随机分为假手术组、模型组、穴位组、非穴位组(n=30);各组再分为术后3d,14d及21d三个亚组(n=10)。除假手术组外,其余各组大鼠用Zea-longa线栓法制备MCAO模型;穴位组和非穴位组电针治疗,其余两组只绑不针。对大鼠行神经功能评分,采用免疫组化、免疫荧光和蛋白质印迹法行相应指标检测。

结果:模型组术后3d梗死灶周EphrinB2/EphB2表达明显减少,但随时间呈递增趋势,21d恢复到假手术水平。穴位组较模型组和非穴位组增加更明显,术后21d表达高于假手术组($P<0.05$)。Ras相关的C3肉毒毒素底物1(ras-related C3 botulinum toxin substrate-1, Rac-1)和微管相关蛋白-2(microtubule-associated protein-2, MAP-2)的表达随时间逐渐递增,且均与神经功能改善相吻合;其中穴位组增加最明显,术后21d超假手术组水平($P<0.05$)。

结论:EphrinB2/EphB2信号通路参与了MCAO大鼠突触重塑,电针肝俞、肾俞穴可能通过激活EphrinB2/EphB2信号通路,促进MCAO大鼠神经功能的康复。

关键词 脑缺血; EphrinB2/EphB2信号通路; 肝俞穴、肾俞穴; 电针

中图分类号: R743.3, R493 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-1242(2016)-10-1067-11

Effects of electroacupuncture on the synaptic plasticity related factors of EphrinB2/EphB2 pathway in MCAO rats/LI Hongliang, XIANG Juan, OUYANG Lizhi, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2016, 31(10): 1067—1077

Abstract

Objective: To observe the effect of electroacupuncture on EphrinB2 (Erythropoietin-producing hepatocyte receptor interacting protein-B2)/EphB2 (Erythropoietin-producing hepatocyte receptor-B2, EphB2) pathway and its synaptic plasticity related factors in MCAO rats.

Method: A total of 120 healthy male SD rats were randomly and equally divided into four groups: the sham-operated group, the model group, the acupuncture group and the nonacupuncture point group. After that, each group was divided into three subgroups: 3d, 14d and 21d postoperation. Samples were duplicated into models of MACO with thread-occlusion method. Nerve functional scoring was evaluated and at the same time, immunohistochemistry and western blot were adopted to detect the EphrinB2/EphB2, Rac-1(Ras-related C3 botulinum toxin substrate-1) and MAP-2(Microtubule-associated protein-2) expression in MCAO rats.

Result: The expression of EphB2/EphrinB2 in the infarct periphery was decreased after MACO and then gradually increased with the time. The increased expression of EphB2/EphrinB2 of the acupuncture group were dra-

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2016.10.004

*基金项目:湖南省高校创新平台开放基金项目(14K070);湖南省中管局重点项目(201310);湖南省研究生创新基金项目(CX2014B360)

1 湖南中医药大学第一附属医院,湖南长沙,410007; 2 湖南中医药大学针灸推拿学院; 3 通讯作者

作者简介:李洪亮,男,硕士,医师; 收稿日期:2016-05-09

matically when compared with the model group and the nonacupuncture point group ($P<0.05$) and exceeded the level of the sham group on 21d after operation($P<0.05$). The expression of Rac-1 and MAP-2 were gradually increased with the time and reached the level of the sham group on 21d after operation. The expression of Rac-1 and MAP-2 were significantly increased in the model group comparing with the nonacupuncture point group and exceeded the level of the sham group on 21d after operation ($P<0.05$).

Conclusion: The electroacupuncture treatment on Ganshu, Shenshu points can improve the neurologic function of MCAO rats, which may due to the gradually enhanced of EphrinB2/EphB2 pathway and its synaptic plasticity related factors, and the upregulation of synaptic plasticity in the infarct periphery.

Author's address The First Affiliated Hospital of Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha City, Hunan Province, 410007

Key word cerebral ischemia; EphB2/EphrinB2 pathway; Ganshu(BL18); Shenshu(BL23); electroacupuncture

脑梗死后未受损的神经元轴突出现芽生并与轴突受损的神经元形成新的联系,为神经修复提供重要的物质基础^[1]。突触再生及重塑严格依赖细胞间的相互接触,轴突-树突对接引发新生的突触前后膜的结构建立,而介导细胞间接触的黏附分子在此过程中至关重要。促红细胞生成素产生肝细胞受体(erythropoietin-producing hepatocyte receptor, Eph)是已知最大的酪氨酸蛋白激酶受体家族,按其序列同源性及与配体亲和力可分为两个亚组:EphA和EphB,其中EphB2及其膜附着型配体EphrinB2作为突触间的黏附分子,介导的信号通路在包括神经网络形成,神经管成型,细胞迁移和轴突路径导引中起重要作用。EphrinB2结合并激活EphB2, EphB2受体C-末端的PDZ结构域结合突触骨架蛋白如突出后致密物-95(postsynaptic density-95, PSD-95),进而募集大量蛋白复合物,形成新的突触结构^[2];其下游通路上的关键因子Rac-1和MAP-2,通过调控树突棘发生和成熟、神经元轴突和树突的发生、延长和稳定^[3-4],促进突触结构及功能重塑。

针刺通过多种机制对神经组织发挥保护作用,包括改善脑血流及氧代谢、抑制细胞凋亡、诱导神经干细胞再生及促进神经功能重塑等。突触重塑作为神经功能重塑中最重要的部分,一直都是针灸治疗脑缺血研究的热点。我们前期研究发现电针肝俞、肾俞穴能增加海马CA1区及皮质Ⅲ—Ⅳ神经元密度,缩小脑梗死体积,改善行为学评分^[5]。为进一步揭示电针治疗脑缺血的机制,本实验通过观察电针肝俞、肾俞穴对大鼠中动脉阻塞模型(middle cerebral artery occlusion model, MCAO)大鼠 Eph-

rinB2/EphB2信号通路及其突触重塑相关因子的影响,探讨电针治疗脑缺血性的可能机制。

1 材料与方法

1.1 动物及分组

SPF 清洁级成年雄性SD大鼠120只,体质量(250 ± 20 g),由湖南中医药大学实验动物中心提供(合格证号:SYXK(湘)-2013-0005)。随机分为假手术组、模型组、穴位组、非穴位组($n=30$)。各组又分为术后3d、14d及21d 3个亚组($n=10$)。

1.2 主要试剂

EphB2(santa cruz, SC-28980), EphrinB2(santa Cruz, SC-15397),二抗:山羊抗兔鼠通用二抗(DAKO, K5007), Rac-1(CST, 2465p), MAP-2(Proteintech, 17490-1-AP), Actin(Santa Cruz, SC-1616R)。

1.3 动物模型

动物适应性饲养1周后,采用张少冲等^[6]改良大鼠中动脉线栓法制备大鼠右侧MCAO模型,其中假手术组仅结扎颈总动脉不插线栓。模型成功评判标准:Zea Longa 5分制评分标准^[7],1—3分纳入实验,其余剔除。因模型死亡率高,用差额补充的方法以保证每组样本量。

1.4 干预方法

参照《实验针灸学》^[8]大鼠穴位拟人比照法定位:肝俞:第9胸椎下旁开5mm;肾俞:第2腰椎下旁开5mm;非穴对照点:肝肾、肾俞穴外开1cm处。假手术组、模型组只绑不针,其余两组用毫针直刺6mm后连接电针,同一输出电极接同侧两穴。刺激

参数^[9]:疏密波,疏波 2Hz,密波 30Hz,电流强度 2mA,输出电压 2—4V,以局部轻颤为度,刺激时间 30min/次,每日 1 次。

1.5 指标检测

1.5.1 神经功能评分:MCAO 术后 3d、14d、21d 各组治疗结束后参照《实验动物学》神经功能评定标准进行神经功能缺损评分^[10]:满分为 11 分,分数越高,神经功能障碍越严重。

1.5.2 免疫组化染色检测梗死灶周围皮质 EphB2 和 EphrinB2 的表达:取各组大鼠右脑,经包埋和切片后,行免疫组化相应处理、封片;应用 BX51T-PHD-J11 显微镜采集和分析系统,每只大鼠大脑梗死灶周围切片同一部位随机选取 5 个高倍镜视野($\times 400$)拍照。用 Image-Pro-Plus6.0 软件选取相同的棕黄色作为判断所有照片阳性的统一标准,计阳性细胞吸光度值(IOD),阳性细胞为胞质黄褐色着染。

1.5.3 免疫荧光双标染色检测梗死灶周围皮质 EphB2⁺/PSD-95⁺的表达:取各组大鼠右脑,经包埋和切片后,行免疫荧光双标染色组化相应处理、封片;将切片置于尼康倒置荧光显微镜下观察并采集图像。

1.5.4 蛋白质印迹检测梗死灶周围皮质 EphB2、EphrinB2、Rac-1 和 MAP-2 的表达:取右脑于冰上分离取出梗死灶周围皮质,匀浆后提取总蛋白,随后行 Western blot 相应处理,利用显影仪显影并将胶片进行扫描存档,利用 Alpha 软件处理系统分析目标带灰度值(各指标相对表达量=指标条带蛋白灰度值/ β -actin 条带蛋白灰度值)。

1.6 统计学分析

采用 SPSS19.0 统计软件包进行数据处理,各组数据以均数 \pm 标准差表示。组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 SNK-*q* 检验。

2 结果

2.1 神经功能评分

除假手术组外其余 3 组大鼠神经功能 3d 时评分最高,即神经功能受损最严重;14d 和 21d 评分均逐渐降低,各组前后比较差异均有显著性意义($P < 0.05$)。各时间点穴位组分别与模型组及非穴位组比较差异有显著性意义($P < 0.05$);模型组与非穴位组

较,仅在 21d 时非穴位组神经功能评分稍低于模型组($P < 0.05$);见表 1。

表 1 术后各组大鼠神经功能评分 ($\bar{x} \pm s$, 分)

组别	例数	3d	14d	21d
假手术组	10	0	0	0
模型组	10	7.8 \pm 0.92	7.4 \pm 0.84	6.6 \pm 0.97 ^③
穴位组	10	6.3 \pm 1.06 ^①	4.9 \pm 1.10 ^{①③}	3.6 \pm 1.58 ^{①③④}
非穴位组	10	7.5 \pm 1.27 ^②	6.5 \pm 1.08 ^②	5.6 \pm 0.97 ^{②③}

注:同一时间点组间比较:①穴位组、非穴位组分别与模型组比较 $P < 0.05$;②非穴位组与穴位组比较 $P < 0.05$ 。组内不同时间点之间比较:③14d 和 21d 分别与 3d 比较 $P < 0.05$;④21d 与 14d 比较 $P < 0.05$ 。

2.2 梗死灶周围皮质 EphB2 和 EphrinB2 的表达

2.2.1 梗死灶周围皮质 EphB2 的表达:模型组与假手术组比较,术后 3d 梗死灶周 EphB2⁺细胞、EphB2⁺/PSD-95⁺细胞及 EphB2 蛋白表达均明显减少($P < 0.05$),术后 14d 和 21d 各表达均逐渐增加,但仍少于假手术组。穴位组术后 14d EphB2⁺细胞、EphB2⁺/PSD-95⁺细胞及 EphB2 蛋白表达均明显增加,至 21d 时均超过假手术组水平($P < 0.05$),穴位组各时间点 EphB2⁺细胞数、EphB2⁺/PSD-95⁺细胞及 EphB2 蛋白表达均高于非穴位组。非穴位组与模型组比较,各时间点三种表达均无明显差异($P > 0.05$),见图 1—6。

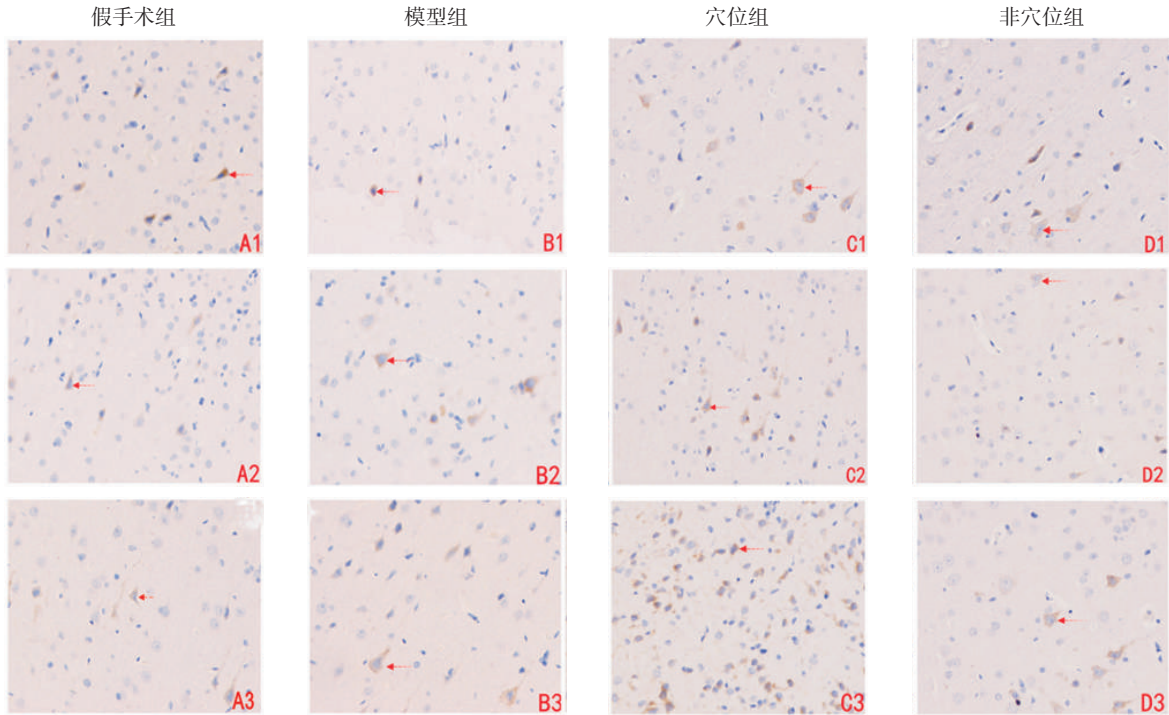
2.2.2 梗死灶周围皮质 EphrinB2 的表达:模型组与假手术组比较,术后 3d 梗死灶周 EphrinB2⁺细胞及 EphrinB2 蛋白表达均明显减少,术后 14d 和 21d 表达有所恢复,但少于假手术组。穴位组术后 14d 梗死灶周 EphrinB2⁺细胞及 EphrinB2 蛋白表达均明显增加,至 21d 时超过假手术水平($P < 0.05$)。穴位组各时间点 EphrinB2⁺细胞及 EphrinB2 蛋白表达均多于非穴位组。非穴位组与模型组比较,各时间点梗死灶周 EphrinB2⁺细胞及 EphrinB2 蛋白表达无明显差异($P > 0.05$),见图 7—9。

2.3 梗死灶周围皮质 Rac-1 和 MAP-2 的蛋白表达

2.3.1 梗死灶周 Rac-1 的相对表达量:①模型组术后随时间延长 Rac-1 的表达量逐渐上升,由 3d 明显低于假手术组水平($P < 0.05$),至 21d 达假手术组水平($P > 0.05$)。②穴位组各时间点 Rac-1 的表达量均高于模型组和非穴位组($P < 0.05$);与假手术组比较,3d 与假手术组相当($P > 0.05$),21d 明显高于假手术组($P < 0.05$)。③非穴位组各时相与模型组均无显著差异($P > 0.05$),见图 10。

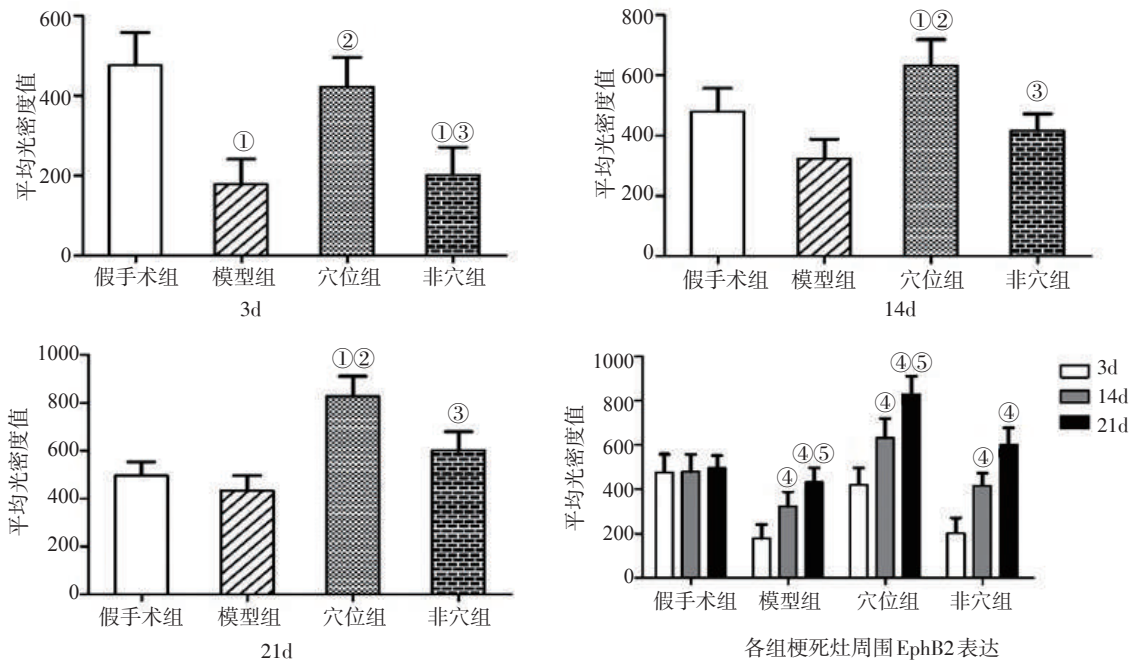
图1 术后各组大鼠脑梗死灶周围EphB2表达情况

(免疫组化染色, ×400)



注: A1, B1, C1, D1: 术后3d; A2, B2, C2, D2: 术后14d; A3, B3, C3, D3: 术后21d。图中红色箭头所指为EphB2⁺细胞。

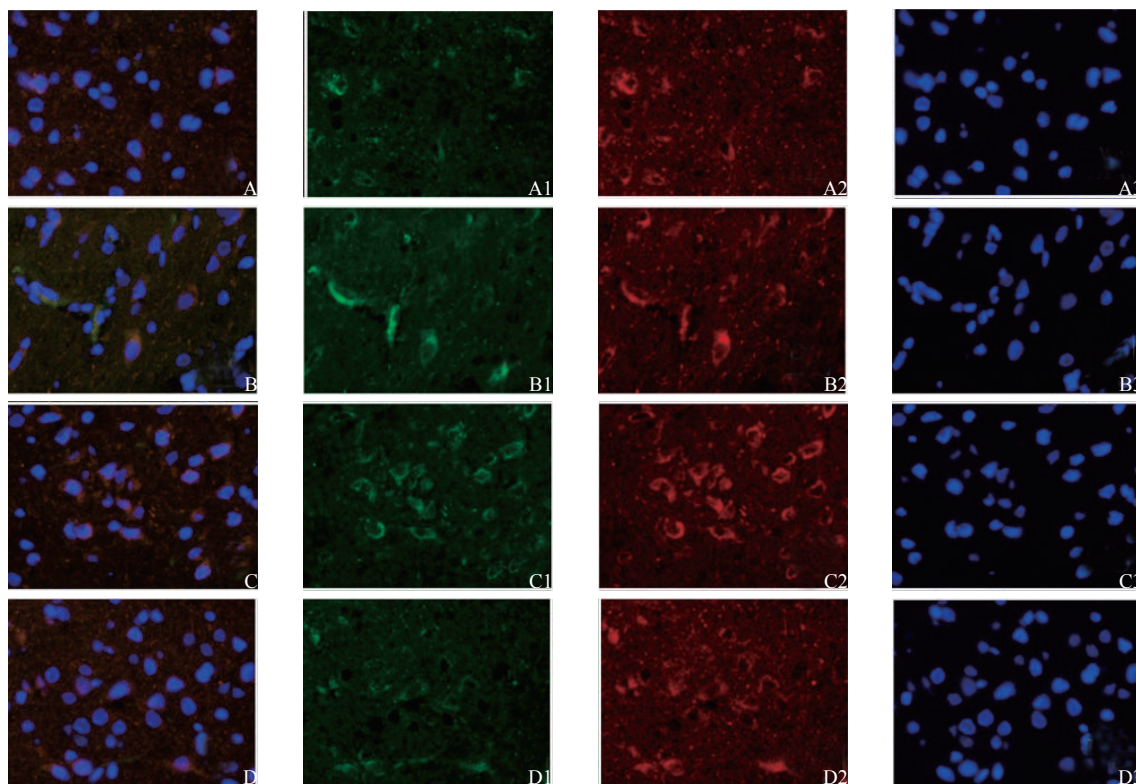
图2 术后各组大鼠脑梗死灶周围EphB2免疫组化柱状图



注: 同一时间点组间比较: 模型组、穴位组、非穴位组分别与假手术组比较, ① $P < 0.05$; 穴位组、非穴位组分别与模型组比较, ② $P < 0.05$; 非穴位组与穴位组比较, ③ $P < 0.05$ 。组内不同时间点之间比较: 14d、21d分别与3d比较, ④ $P < 0.05$; 21d与14d比较, ⑤ $P < 0.05$ 。

图3 术后21d各组大鼠脑梗死灶周 EphB2⁺/PSD-95⁺荧光双标图

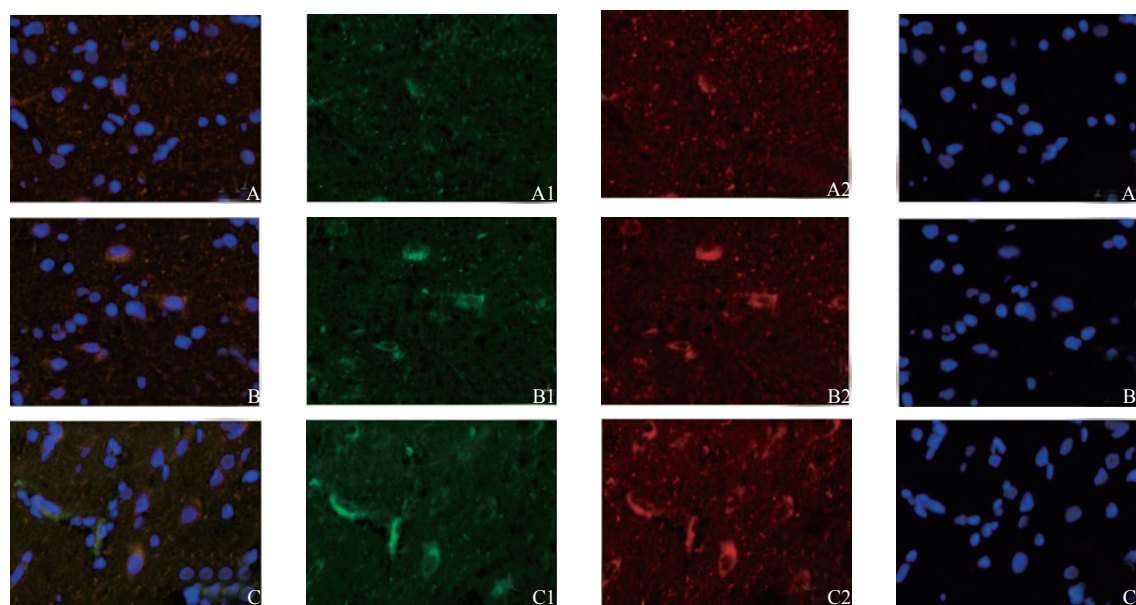
(×400)



A:假手术组,B:模型组,C:穴位组,D:非穴位组;A1、B1、C1、D1:梗死灶周 EphB2+呈绿光,A2、B2、C2、D2:PSD-95+呈红光,A3、B3、C3、D3:细胞核呈蓝光。第1纵列图片为第2、3、4纵列的叠加图(即 EphB2 绿光+PSD-95 红光+细胞核蓝光),三者均有表达则计为阳性表达

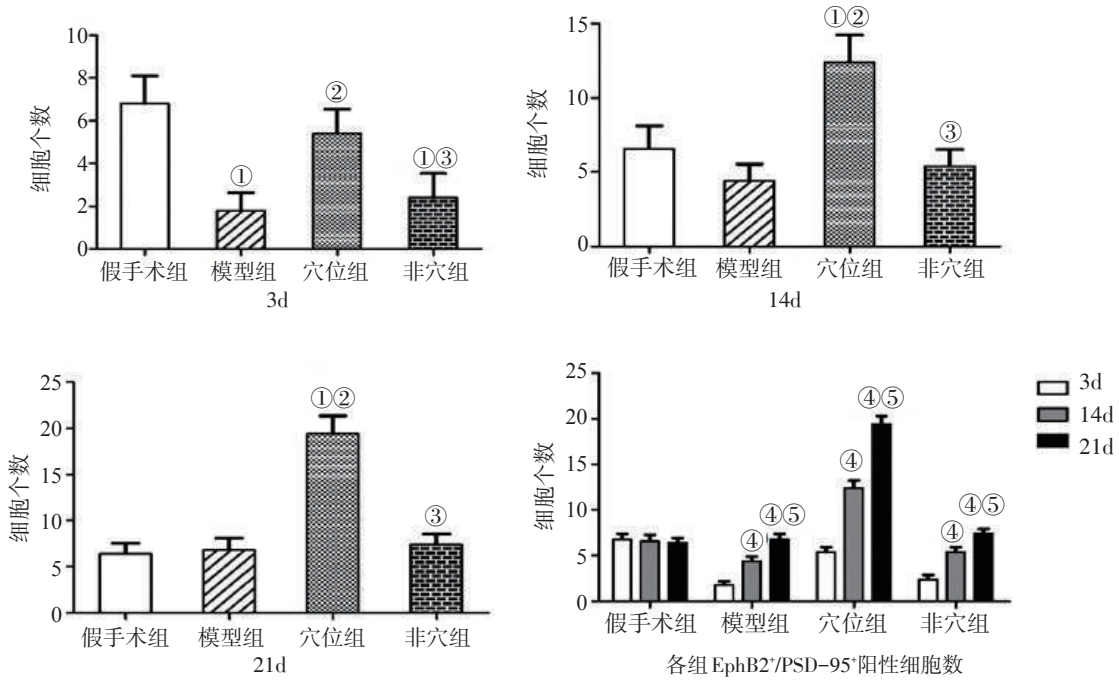
图4 术后模型组各时相 EphB2⁺/PSD-95⁺荧光双标图

(×400)



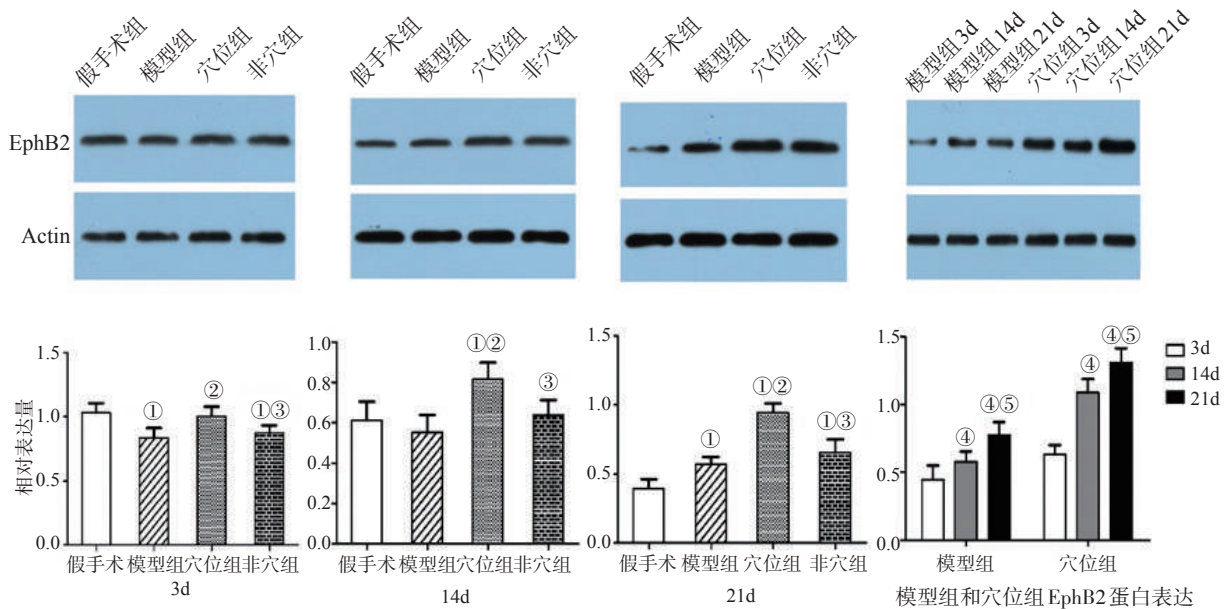
A:模型组术后3d,B:模型组术后14d,C:模型组术后21d;A1、B1、C1:梗死灶周 EphB2+呈绿光,A2、B2、C2:PSD-95+呈红光,A3、B3、C3:细胞核呈蓝光。第1纵列图片为第2、3、4纵列的叠加图(即 EphB2 绿光+PSD-95 红光+细胞核蓝光),三者均有表达则计为阳性表达

图5 术后各组梗死灶周EphB2⁺/PSD-95⁺荧光双标柱状图



注:同一时间点组间比较:模型组、穴位组、非穴位组分别与假手术组比较,① $P<0.05$;穴位组、非穴位组分别与模型组比较,② $P<0.05$;非穴位组与穴位组比较,③ $P<0.05$ 。组内不同时间点之间比较:14d、21d分别与3d比较,④ $P<0.05$;21d与14d比较,⑤ $P<0.05$ 。

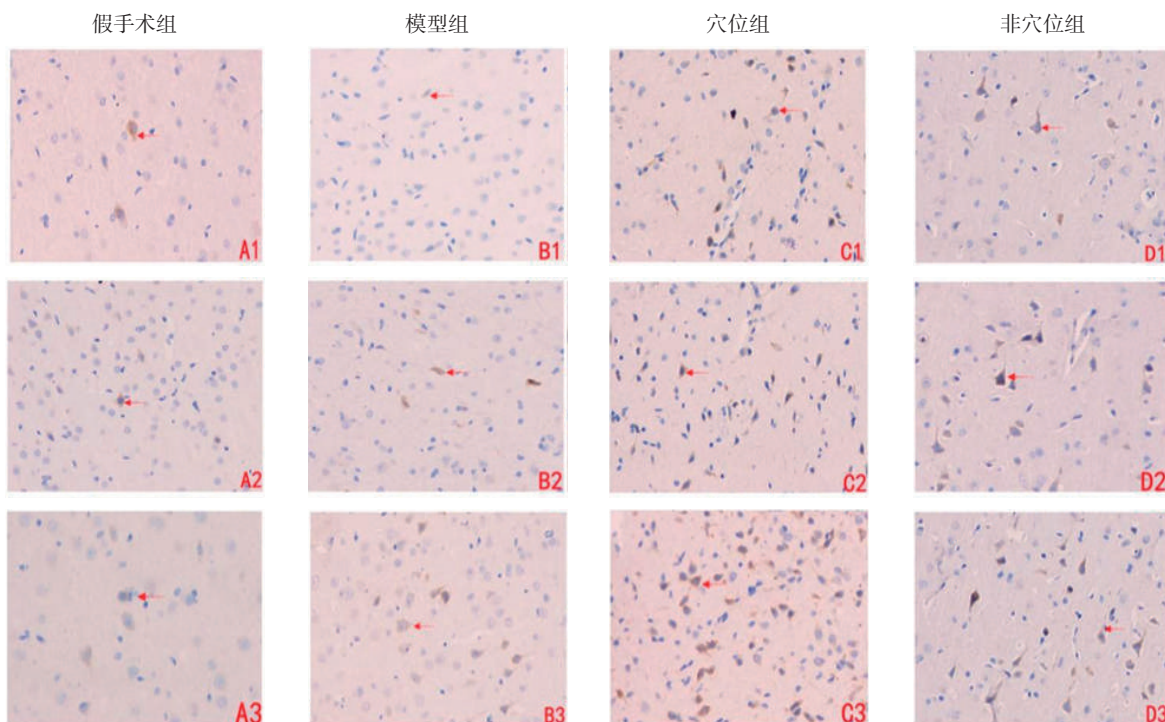
图6 Western blot法检测梗死灶周EphB2蛋白表达水平



注:同一时间点组间比较:模型组、穴位组、非穴位组分别与假手术组比较,① $P<0.05$;穴位组、非穴位组分别与模型组比较,② $P<0.05$;非穴位组与穴位组比较,③ $P<0.05$ 。组内不同时间点之间比较:14d、21d分别与3d比较,④ $P<0.05$;21d与14d比较,⑤ $P<0.05$ 。

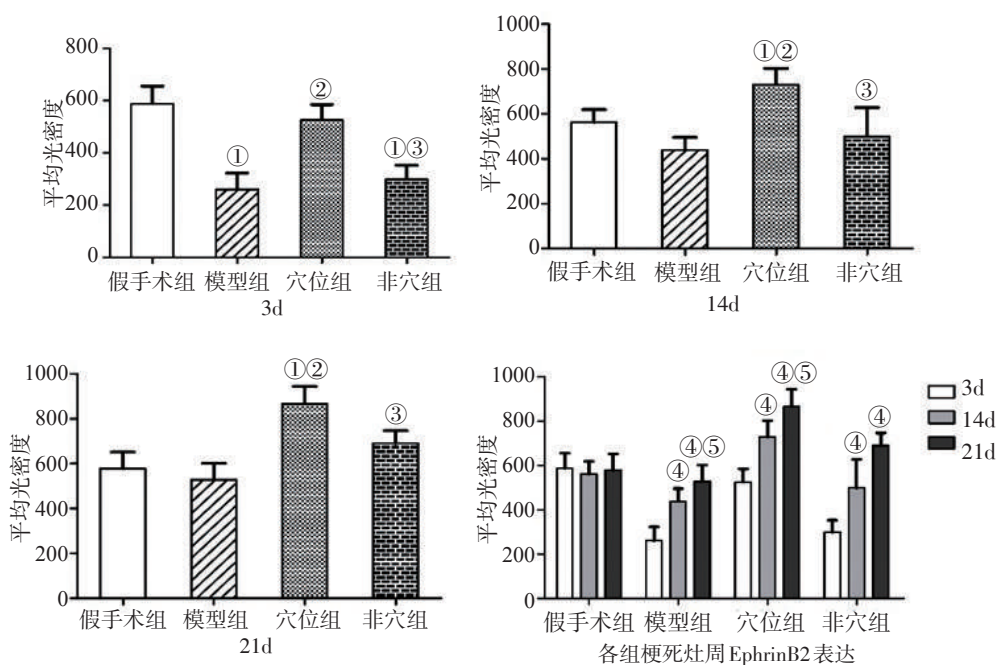
图7 术后各组大鼠脑梗死灶周EphrinB2免疫组化图

(×400)



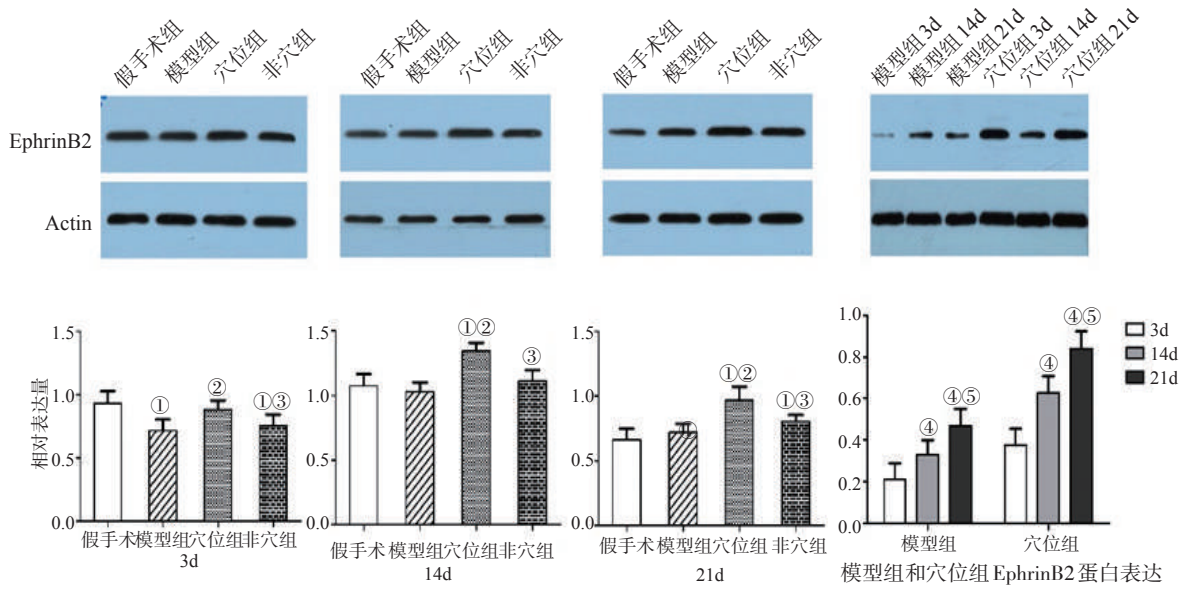
注: A1,B1,C1,D1:术后3d;A2,B2,C2,D2:术后14d;A3,B3,C3,D3:术后21d。图中红色箭头所指为EphrinB2⁺细胞。

图8 术后各组大鼠脑梗死灶周围EphrinB2免疫组化柱状图



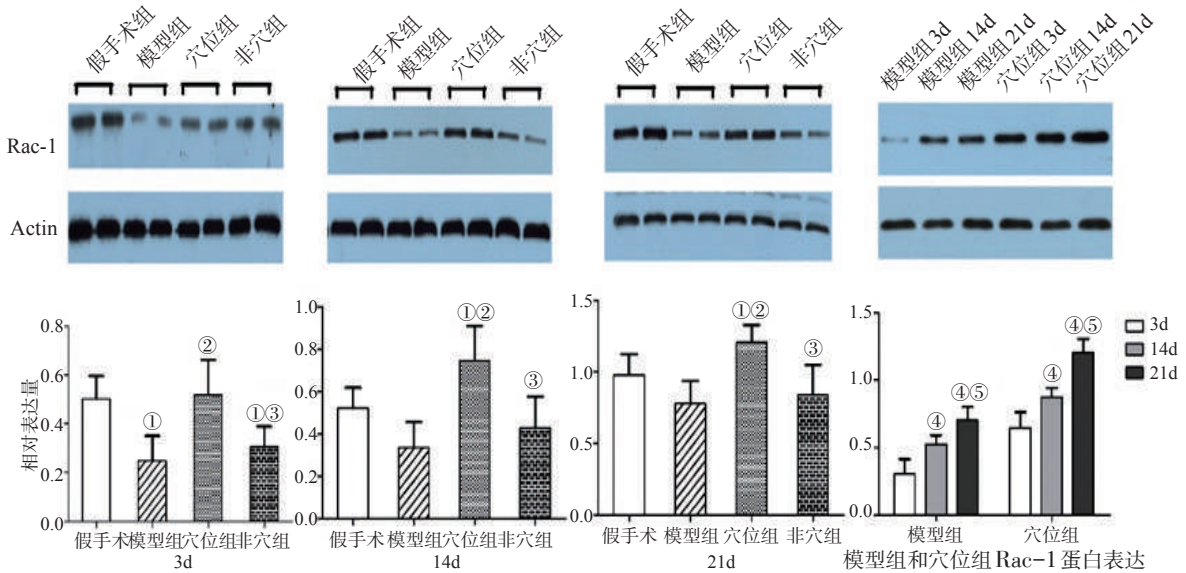
注:同一时间点组间比较:模型组、穴位组、非穴位组分别与假手术组比较,① $P<0.05$;穴位组、非穴位组分别与模型组比较,② $P<0.05$;非穴位组与穴位组比较,③ $P<0.05$ 。组内不同时间点之间比较:14d、21d分别与3d比较,④ $P<0.05$;21d与14d比较,⑤ $P<0.05$ 。

图9 Western blot法检测梗死灶周EphrinB2蛋白表达水平



注:同一时间点组间比较:模型组、穴位组、非穴组分别与假手术组比较,① $P<0.05$;穴位组、非穴组分别与模型组比较,② $P<0.05$;非穴组与穴位组比较,③ $P<0.05$ 。组内不同时间点之间比较:14d、21d分别与3d比较,④ $P<0.05$;21d与14d比较,⑤ $P<0.05$ 。

图10 Western blot法检测梗死灶周Rac-1蛋白表达水平

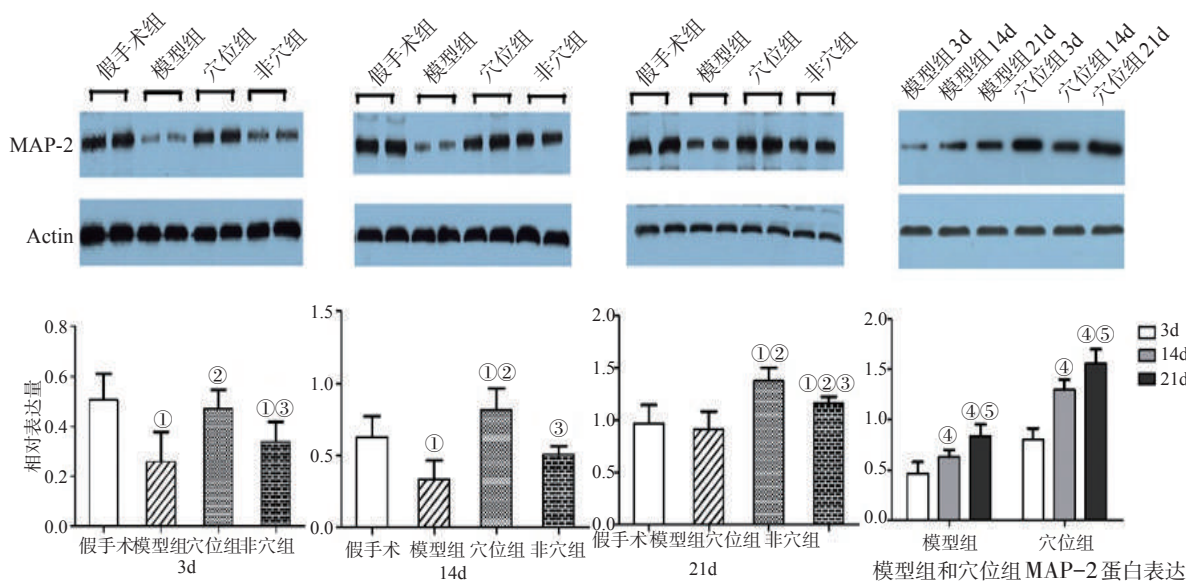


注:同一时间点组间比较:模型组、穴位组、非穴组分别与假手术组比较,① $P<0.05$;穴位组、非穴组分别与模型组比较,② $P<0.05$;非穴组与穴位组比较,③ $P<0.05$ 。组内不同时间点之间比较:14d、21d分别与3d比较,④ $P<0.05$;21d与14d比较,⑤ $P<0.05$ 。

2.3.2 梗死灶周围皮质 MAP-2 的相对表达量:①模型组 3d 时 MAP-2 的相对表达量明显低于假手术组 ($P<0.05$), 14d 和 21d 其表达量逐渐增加达假手术组水平 ($P>0.05$); 其与非穴组比较, 各时间点均无明显

差异 ($P>0.05$), 仅 21d 略低于非穴组 ($P<0.05$)。②穴位组 3d 达假手术水平, 14d 和 21d 表达量逐渐超过假手术组 ($P<0.05$); 穴位组各时间点均高于模型组和非穴组 ($P<0.05$), 见图 11。

图 11 Western blot 法检测梗死灶周 MAP-2 蛋白表达水平



注:同一时间点组间比较:模型组、穴位组、非穴组分别与假手术组比较,① $P<0.05$;穴位组、非穴组分别与模型组比较,② $P<0.05$;非穴组与穴位组比较,③ $P<0.05$ 。组内不同时间点之间比较:14d、21d 分别与 3d 比较,④ $P<0.05$;21d 与 14d 比较,⑤ $P<0.05$ 。

3 讨论

3.1 针刺方案的选择

中风的病因病机可归纳为“虚火风痰气血六端,以肝肾阴虚为其根本”,故调补肝肾为治疗之本。本实验选肝俞、肾俞穴依据有四:①循行上,《灵枢·经脉》:“膀胱足太阳之脉……从巅顶入络脑……”,膀胱经与肝肾等脏腑直接联系,通过经别的离入出合,五脏六腑之气均可输注于膀胱经。②功能上,足太阳之脉对脑主神的功能有重要作用:膀胱经络脑且与督脉交于诸阳之会,有调养元神的作用。③治疗上,肝藏血化精,肾藏精生髓,精血同源;脑为髓海,故治脑之本在肝肾;针对中风之病机选用肝俞、肾俞穴,以疏通经脉,滋水涵木,补益肝肾,补精生髓,如此则精盛、髓满、脑充、痰散、窍通。④现代医学研究认为肝俞、肾俞穴位于胸腹交感干、脊髓的体表投影区及脊神经所过之处,是背俞穴针刺效应主要神经生理学基础^[11]。既往实验表明^[12],在 MCAO 急性期

给予电针刺激能下调神经蛋白聚糖 mRNA 的表达并改善行为学评分,其中肝俞、肾俞穴的效果较好。

3.2 针刺对 MCAO 大鼠梗死灶周 EphrinB2/EphB2 信号通路的影响

研究证实,中枢神经系统受损后具有修复自身结构和功能的能力,这种能力称之为可塑性。脑梗死后神经功能恢复的主要机制是神经可塑性的增强,且突触再生及其功能重塑在神经可塑中扮演重要角色^[13]。脑梗后一方面神经细胞的突触受损,另一方面未受影响的神经元轴突芽生成新的神经终端,与轴突受损的神经元形成新的联系,后者为神经修复提供重要的物质基础。突触再生严格依赖细胞间的相互接触,轴突-树突对接引发新的突触前后膜结构建立。因此介导细胞间黏附的黏附分子在突触发生中至关重要^[14-15]。EphrinB2 和 EphB2 作为这类粘附分子可介导信号通路,在增强树突棘伪足的运动能力、促进轴突生长和再生等方面发挥重要作用^[16]。

EphrinB2 激活 EphB2 诱发下游信号通路^[1], 通过 Scr 家族酪氨酸激酶使 N-甲基-D-天冬氨酸受体 2B 亚基胞内段磷酸化, 使突触后 EphB2 受体能快速改变肌动蛋白动力学特性, 增强 Ca^{2+} 内流从而诱导突触形成^[17-18], 说明 EphrinB2/EphB2 信号通路在突触再生中发挥重要作用。Grunwald 等证实电刺激可促进 EphB2 的表达并改变海马区突触结构; 反之, 在敲除 EphB2 基因的小鼠海马齿状回神经元上, 记录到削弱的突触电流^[19]。既往研究显示突触再生在梗死后 1—3d 出现^[20], 7—14d 持续进展, 梗死后 28d 形成成熟的突触^[21]。本实验观察到 EphrinB2 和 EphB2 表达随时间变化的趋势与上述梗死后突触再生变化基本吻合; 二者的表达在术后 3d 时最低, 可能与梗死早期细胞死亡及抑制性神经活动增强有关^[22]; 其后随突触再生逐渐加强而增多, 尤以穴位组增加最明显; 说明 EphrinB2 和 EphB2 参与了突触再生, 且针刺对此具有促进作用。为了进一步论证, 我们选择突触后膜特异性标记物 PSD-95 作为突触再生的指标。PSD-95 具有突触支架蛋白作用区, 不仅能串集 NMDAR 及信号通路中的相关蛋白, 组成受体-信号分子-调节分子-靶分子复合物; 还可通过多种蛋白的相互作用参与突触连接的形成和维持^[23]; 此外, EphB2 受体的 C-末端含有 PDZ 结合域, 可与 PSD-95 结合募集大量蛋白复合物, 形成新的突触结构^[24]。本研究显示, 穴位组 EphB2⁺/PSD-95⁺ 随时间变化的趋势与 EphrinB2 及 EphB2 的各种表达结果基本一致, 证实了 EphrinB2 和 EphB2 参与突触再生, 且电针肝俞、肾俞穴能增强这一作用, 这在该通路下游突触重塑相关因子的研究中也得到了验证。

研究证实 Eph2 参与突触重塑与 Rac-1 GTP 酶的活化相关^[25-26]。Rac-1 是肌动蛋白细胞骨架的核心因子, 能在有活性 GTP 和无活性 GDP 结合形式之间循环, 以“分子开关”形式在轴突的形成和生长、树突及树突棘的形成和维持等方面起关键作用^[3]。本实验中模型组 Rac-1 蛋白呈递增趋势, 且各时相均低于假手术组; 这可能与梗死初期大量神经元、突触破坏, 随后突触再生及重塑加强有关。谭峰等^[27]通过电针 MCAO 大鼠“百会”、“大椎”观察到梗死 4 周内 Rac-1 蛋白表达趋势电针组较模型组显著升高。尽管本研究取穴有所不同, 但都观察到电针穴位后

Rac-1 蛋白均高于其他各组; 说明电针穴位治疗能显著增加大鼠神经元 Rac-1 蛋白表达, 可能与电针促进大脑功能重塑, 尤其是促进突触重塑相关。此外 Rac-1 可激活 c-Jun 氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK) 促进核内的 MAP-2 基因转录, MAP-2 作为一种调节微管蛋白组装及动力学的重要因子, 它对脑缺血敏感, 常被作为缺血诱导神经元损伤的早期标志物^[28]。MAP-2 主要在神经元胞体和树突中表达, 与突触后膜骨架上的信号蛋白和膜受体相结合, 可作为 EphrinB2/EphB2 信号通路蛋白激酶的底物, 参与神经元发育、结构稳定、突起形成和突触重塑调节^[4]。与本实验结果类似, 王淑兰等^[29]证实针刺督脉经穴使 MCAO 再灌注大鼠缺血半暗带区 MAP-2 蛋白表达上调, 并改善大鼠神经功能缺损状态。

通过对大鼠神经功能恢复进行评价, 进一步证明大鼠神经功能改善与梗死灶周 EphrinB2/EphB2, Rac-1 和 MAP-2 的蛋白表达变化相符。因此, 我们认为针刺肝俞、肾俞可促进 EphrinB2 结合并激活 EphB2, 募集 Rac-1 特异性的鸟苷酸交换因子 Kalirin 和 Tiam1 能够促进 GDP 转化为 GTP, 从而激活 Rac-1, 促进树突棘的发育, 通过 Rac-1 激活 JNK 信号通路促进核内的 MAP-2 基因转录, 从而促进突触再生及重塑。因此肝俞、肾俞对 EphrinB2/EphB2 信号通路上突触重塑相关因子的调控可能是其治疗脑缺血的机制之一。

4 结论

本研究观察到脑梗死后早期梗死灶周围皮质 EphrinB2、EphB2、Rac-1 和 MAP-2 表达均出现下降, 但随时间延长上述四种蛋白的表达呈递增趋势, 且与模型组比较, 穴位组各时间点的上升幅度均高于非穴组。提示脑缺血对 EphrinB2/EphB2 信号通路产生影响, 该通路启动并表达上调, 从而脑突触可塑性的增强。此外穴位组突触重塑相关因子的变化与神经功能改善相吻合, 认为 EphrinB2/EphB2 信号通路参与了 MCAO 大鼠突触重塑, 针刺肝俞、肾俞穴可通过激活 EphrinB2/EphB2 信号通路, 从而促进 MCAO 大鼠神经功能的康复。

参考文献

- [1] Klein R. Bidirectional modulation of synaptic functions by Eph/ephrin signaling[J]. *Nat Neurosci*, 2009, 12(1): 15—20.
- [2] Biederer T, Stagi M. Signaling by synaptogenic molecules [J]. *Curr Opin Neurobiol*, 2008, 18(3): 261—269.
- [3] Govsek EE, Newey SE, Van Aelst L. The role of the Rho GTPases in neuronal development[J]. *Genes Dev*, 2005, 19(1): 1—49.
- [4] Sanchez C, Diaz-Nido J, Avila J. Phosphorylation of microtubule-associated protein 2 (MAP2) and its relevance for the regulation of the neuronal cytoskeleton function[J]. *Prog Neurobiol*, 2000, 61(2): 133—168.
- [5] 李铁浪. 电针不同穴组对急性脑缺血大鼠治疗作用比较及相关机理探讨[D]. 湖南中医药大学, 2005.
- [6] 张小冲,赵浩,马建华,等. 线栓法大鼠MCAO模型的实验研究[J]. *医药研究杂志*, 2013:55—58.
- [7] Longa Ez WPCS. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84—91.
- [8] 李忠仁. 实验针灸学[M]. 中国中医药出版社, 2007. 327—329.
- [9] 张泓,王珍珍,张雨辰,等. 电针“小海”与“下巨虚”穴对十二指肠溃疡大鼠血清肿瘤坏死因子- α 及十二指肠高迁移率族蛋白B1表达的影响[J]. *针刺研究*, 2015,40(1): 35—39.
- [10] 孙敬芳. 实验动物方法学[M]. 第1版.北京:人民卫生出版社, 2001.11.
- [11] 刘智斌,牛晓梅. 论背俞穴定位的神经解剖学基础[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2013,19(1): 83—85.
- [12] 钟艺华,唐显军,李光勤,等. 不同穴组电针对局灶性脑梗死大鼠神经行为学及Neurocan表达的影响[J]. *中国康复理论与实践*, 2013,19(5): 444—447.
- [13] Murphy TH, Corbett D. Plasticity during stroke recovery: from synapse to behaviour[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2009,10(12):861—72.
- [14] Carmichael ST, Chesselet MF. Synchronous neuronal activity is a signal for axonal sprouting after cortical lesions in the adult[J]. *J Neurosci*, 2002, 22(14): 6062—6070
- [15] Mcallister AK. Dynamic aspects of CNS synapse formation [J]. *Annu Rev Neurosci*, 2007, 30: 425—450.
- [16] Parrinello S, Napoli I, Ribeiro S, et al. EphB signaling directs peripheral nerve regeneration through Sox2-dependent Schwann cell sorting[J]. *Cell*, 2010, 143(1): 145—155.
- [17] Takasu MA, Dalva MB, Zigmond RE. Modulation of NMDA receptor-dependent calcium influx and gene expression through EphB receptors[J]. *Science*, 2002, 295:491—495.
- [18] Grunwald IC, Korte M, Wolfer D, et al. Kinase-independent requirement of EphB2 receptors in hippocampal synaptic plasticity[J]. *Neuron*, 2001,32:1027—1040.
- [19] Grunwald I C, Korte M, Wolfer D, et al. Kinase-independent requirement of EphB2 receptors in hippocampal synaptic plasticity[J]. *Neuron*, 2001, 32(6): 1027—1040.
- [20] Carmichael ST, Chesselet MF. Synchronous neuronal activity is a signal for axonal sprouting after cortical lesions in the adult[J]. *J Neurosci*, 2002, 22(14): 6062—6070.
- [21] Leon S, Yin Y, Nguyen J, et al. Lens injury stimulates axon regeneration in the mature rat optic nerve[J]. *J Neurosci*, 2000, 20(12): 4615—4626.
- [22] Murphy TH, Corbett D. Plasticity during stroke recovery: from synapse to behaviour[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2009, 10(12): 861—872.
- [23] 刘轲,鲁红伟,冯静静,等. 脑脉通联合骨髓间充质干细胞移植对脑缺血再灌注大鼠神经细胞中SYN-38和PSD-95表达变化的影响[J]. *时珍国医国药*,2015,26(5):1048—1051.
- [24] Mcallister A K. Dynamic aspects of CNS synapse formation [J]. *Annu Rev Neurosci*, 2007, 30: 425—450.
- [25] Penzes P, Beeser A, Chernoff J, et al. Rapid induction of dendritic spine morphogenesis by trans-synaptic ephrinB-EphB receptor activation of the Rho-GEF kalirin[J]. *Neuron*, 2003, 37(2): 263—274.
- [26] Murai KK, Nguyen LN, Irie F, et al. Control of hippocampal dendritic spine morphology through ephrin- A3/EphA4 signaling[J]. *Nat Neurosci*, 2003, 6(2): 153—160.
- [27] 谭峰,陈杰,梁艳桂,等. 电针对高血压大鼠脑梗死皮质与颈髓Rac-1蛋白表达的影响[J]. *广州中医药大学学报*, 2014,31(1): 66—71.
- [28] Johnson GV, Jope RS. The role of microtubule-associated protein 2 (MAP-2) in neuronal growth, plasticity, and degeneration[J]. *J Neurosci Res*, 1992, 33(4): 505—512.
- [29] 王淑兰,倪光夏. 针刺督脉经穴对局灶性脑缺血再灌注大鼠缺血半暗带MAP-2、NF-L的mRNA表达的影响[J]. *上海针灸杂志*, 2013,32(3): 221—223.