

电针调控细胞周期相关蛋白对局灶性脑缺血大鼠皮质细胞增殖的影响*

陈 斌^{1,2} 李钻芳¹ 林如辉² 陶 静³ 陈立典^{1,4}

摘要

目的:通过细胞周期相关蛋白探讨电针对局灶性脑缺血再灌注模型大鼠皮质细胞增殖的促进作用,阐明其治疗脑缺血的可能机制。

方法:将45只雄性SD大鼠随机分为假手术(Sham)、模型(MCAO)及电针(MCAO+EA)组,以Zea Longa法制备大鼠局灶性脑缺血再灌注模型,通过TTC和NeuN染色观察电针对脑缺血大鼠的神经保护作用,使用BrdU免疫组化法观察电针对梗死侧皮质细胞的增殖作用情况,应用Western blot和RT-PCR检测梗死侧皮质细胞周期相关蛋白的表达。

结果:电针“曲池”、“足三里”两穴可明显减轻脑缺血大鼠的脑梗死体积和神经元损伤;促进梗死侧神经细胞的增殖;并且提高细胞周期相关蛋白的表达。

结论:电针可通过调控细胞周期相关蛋白的表达,缓解脑缺血所引起的神经损伤,同时促进梗死侧皮质的神经细胞增殖,来实现对脑缺血的治疗作用。

关键词 电针;脑缺血;增殖

中图分类号:R245,R743.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2016)-07-0729-05

Electroacupuncture increases cortical cells proliferation via regulation of cell cycle-related protein in focal cerebral ischemic rats/CHEN Bin, LI Zuanfang, TAO Jing, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2016, 31(7): 729—733

Abstract

Objective: To investigate electroacupuncture (EA)-enhanced cortical cells proliferation in rats with focal cerebral ischemia-reperfusion(I/R) via cell cycle-related protein and to clarify the possible mechanism of treatment of cerebral ischemia by EA.

Method: Forty-five male adult SD rats were randomly divided into sham operation control group (Sham), middle cerebral artery occlusion group (MCAO) and electroacupuncture group (MCAO+EA). The method of Zea Longa was performed to establish the focal cerebral ischemia-reperfusion (I/R) injury model. The neuroprotective effect of the EA stimulation on ischemic rats was evaluated by TTC and NeuN staining. The proliferation of cortical cells in the cerebral I/R injured rats was determined by BrdU immunohistochemical staining. The expression of cell cycle-related protein was detected by Western blot and reverse transcription PCR.

Result: Electroacupuncture at the Quchi (LI11) and Zusanli (ST36) acupoints significantly reduced cerebral infarct volume, alleviated neuronal injury and enhanced cortical cells proliferation (BrdU positive) in the cerebral I/R injured rats, with the increased expression of cell cycle-related protein.

Conclusion: The EA-induced increase of cell cycle-related protein may result in the promotion of cortical cells proliferation and consequently the therapeutic effect on cerebral ischemia.

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2016.07.003

*基金项目:国家自然科学基金课题(81273835和81373778)

1 福建中医药大学,福州市,350122; 2 福建省康复技术重点实验室; 3 福建中医药大学康复医学院; 4 通讯作者

作者简介:陈斌,男,在读博士研究生; 收稿日期:2015-10-04

Author's address Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou,350122

Key word electroacupuncture; cerebral ischemia; proliferation

近年来,脑卒中(stroke)已经成为危害人类健康最主要的致死和致残疾病之一,幸存者中75%不同程度地丧失劳动能力,40%重残。其中缺血性脑卒中的发病率约占全部脑卒中的80%^[1-2]。因此,脑缺血所引起的严重神经功能障碍,仍然是当今神经病学领域迫切需要解决的难题之一。

大量的临床和基础实验研究,都已证实了电针疗法是目前治疗缺血性卒中有效的方法之一^[3-6]。有研究表明电针能促进神经细胞的增殖^[7-8],改善脑缺血后神经缺损症状,但其治疗脑缺血损伤的分子机制尚不明确。故本研究选用大鼠大脑中动脉缺血再灌注模型,探讨电针“曲池”、“足三里”两穴对MCAO大鼠脑梗皮质细胞促增殖作用的可能机制,为针灸临床提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物分组

选取SPF级雄性SD大鼠45只,体重为(250±10)g,由上海斯莱克实验动物责任有限公司提供,使用随机数字表将其分为:假手术组(Sham)、模型组(MCAO)及电针组(MCAO+EA)。所有试验均按照国际动物保护和使用指南的相关规定严格实施。

1.2 主要试剂

免疫组化DAB试剂盒(迈新生物有限公司,福州);2,3,5-氯化三苯基四氮唑(Sigma, USA);Trizol试剂(Invitrogen, Carlsbad, CA);逆转录PCR试剂盒(Fermentas, Hanover, MD);CDK4、Cyclin D1和β-actin一抗及Anti-mouse/rabbit的辣根过氧化物酶二抗(Cell Signaling Technology, Beverly, MA);PCR引物设计与合成(生工生物工程,武汉)。

1.3 模型制备

模型的制作参考Zea Longa法^[9],简述如下:在室温22℃条件下,腹腔注射0.3ml/100g的水合氯醛进行麻醉,分离左侧的颈总动脉(common carotid artery, CCA)、颈外动脉(external carotid artery, ECA)以及颈内动脉(internal carotid artery, ICA)三条血管。然后,结扎CCA近心端及ECA远心端,暂时夹闭ICA远心端。将消毒过的线栓经颈外动脉切

口插入颈内动脉,直至有少许的阻力感时,从颈内、外动脉分叉处起插入约17—19mm即可。缺血阻断120min后,缓慢退出尼龙线,恢复血流,试验过程注意动物的保温。假手术组只进行动脉分离,不结扎血管和插栓线。按Zea Longa神经行为评分标准判断MCAO模型是否成功。具体评分标准为:0分:无神经功能缺损体征;1分:不能完全伸展对侧前爪;2分:向偏瘫侧转圈;3分:行走时向偏瘫侧倾倒;4分:不能自发行走,意识丧失;评分为1—3分纳入实验动物,0分、4分予以剔除。

1.4 电针干预措施

以捆绑法来固定大鼠,取右前肢“曲池”穴(LI11:桡骨近端的关节外侧前方的凹陷中)、和右后肢“足三里”穴(S36:膝关节后外侧,在腓骨小头下约5mm处)穴,使用0.5寸华佗牌毫针,斜刺进针0.2—0.3cm,疏密波,1次/d,30min/次,总共3次,于手术后24h开始治疗。假手术组与模型组只进行同样的捆绑固定,不进行电针干预。

1.5 Brdu腹腔注射

将Brdu(Sigma, USA)溶解于无菌的生理盐水中,配成终浓度为10mg/ml的工作液,电针干预前先腹腔注射Brdu(50mg/kg),2次/d,中间间隔8h,最后一次注射24h后进行取材。

1.6 取材处理

电针干预结束后,每组取6只SD大鼠经左心室依次灌注PBS和4%PFA溶液各200ml,动物呈现出四肢僵硬状态,随后迅速将其断头取脑,浸泡于4%PFA中进行后固定。24h后使用不同梯度的酒精依次脱水、二甲苯透明、浸蜡、包埋以便于免疫组化实验。余下大鼠直接断头取脑,4只用于TTC染色,5只分离缺血侧的脑组织,液氮内低温保存,以备提取蛋白和RNA。

1.7 检测方法及指标

1.7.1 TTC染色:将新鲜的大鼠脑组织放入切脑模具中置于-20℃冰箱20min后,用剃须刀片去除嗅球,小脑及低位脑干部分,沿冠状面切成6片,每片的厚度约2mm。然后,将冠状位切片靠近小脑侧的那面放入2%TTC染液中,恒温箱中避光孵育

15min。染色后的脑片按顺序整齐地放置于平板上,并用高分辨率的数码相机(PowerShotSX20IS; Canon)拍照。应用Image J图像分析软件,计算脑组织梗死百分比率。

1.7.2 免疫组化法:免疫组化检测步骤如下:先将石蜡切片进行常规脱蜡入水,然后DNA变性(用于BrdU染色):2N HCl 37℃孵育45min,使DNA变性后,0.1M硼酸溶液(pH8.5)洗5min×3次;脑组织泡在0.01M枸橼酸钠(pH6.0)中进行抗原修复10min;自然冷却后,PBS冲洗,10min 3次,3%的H₂O₂孵育7min;PBS冲洗,10min 3次,10%羊血清封闭60min;一抗(BrdU或NeuN)4℃过夜;PBS冲洗,10min 3次,二抗工作液37℃孵育30min;PBS冲洗,10min 3次,链霉卵白素工作液,37℃孵育10min;PBS冲洗,10min 3次,DAB显色剂显色90s,自来水洗涤干净后,苏木素染核,PBS返蓝,脱水透明,中性树胶封片,待干后观察采集数据。

1.7.3 蛋白免疫印迹法(Western blot):脑组织中加入适量的细胞裂解液和PMSF储存液研磨提取蛋白质。考马斯亮蓝法测定所提出的蛋白浓度,98℃加热变性,每次取50μg组织样本进行的SDS-PAGE(12%)电泳和转膜。室温条件下,5%的脱脂牛奶封闭60min,CDK4(1:500)、Cyclin D1(1:500)和β-actin(1:1000)一抗4℃过夜孵育,TBS液10min 5次洗涤后,辣根过氧化物标记的二抗振荡37℃孵育2h。TBS液10min 5次洗涤后,ECL化学发光法进行显色,并采用Bio-Image Analysis System(BioRad,Hercules,CA,USA)显影成像与分析。

1.7.4 逆转录PCR:采用Trizol法提取脑组织的总RNA含量,检测RNA浓度之后,按照逆转录试剂盒相应操作将mRNA逆转录为cDNA。PCR扩增参数为95℃预变性3min,95℃变性30s,55—60℃退火45s,72℃延伸45s,变性、退火及延伸共32个循环,最后72℃延伸5min。

引物序列为:

CDK4: Forward 5'-CTT CCC GTC AGC ACA GTT CGT-3',

Reverse 5'-TGT CCA GGT ATG TCC GTA GGT-3';

Cylin D1: Forward 5'-GAG GAG CAG AAG TGC GAA GA-3',

Reverse 5'-GGC GGA TAG AGT TGT CAG TG-3';

β-actin: Forward 5'-CGG GAG AAC AGG GTA TGA-3',

Reverse 5'-CAG GCT GGA AGG AGA AGA T-3'。

PCR扩增产物在琼脂糖凝胶(1.5%)上进行电泳。电泳后,使用Model Gel 2000凝胶成像系统(BioRad, Model Gel Doc 2000, USA)对所检测的目的基因及管家基因PCR产物的灰度值进行比较和分析,从而得出mRNA的相对含量。

1.8 统计学分析

本文数据均以均数±标准差表示,应用SPSS16.0软件进行统计学处理分析,两组间的比较则采用独立样本t检验或Mann-Whitney U检验,以P<0.05为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 电针“曲池”、“足三里”减少MCAO大鼠的脑梗死体积

应用经典TTC染色来确认脑缺血模型的成功与否,以及电针“曲池”、“足三里”两穴对MCAO大鼠的初步疗效。如图1所示,假手术组脑组织呈红色为正常,模型组及电针组均出现白色的梗死区,但经过3天的电针治疗,电针组大鼠的脑梗死百分比率明显小于模型组(MCAO: 36.83%±4.68%, MCAO+EA: 24.38%±3.84%, P<0.01)。由此提示电针“曲池”与“足三里”对脑缺血大鼠具有一定的神经保护作用。

2.2 电针减轻皮质神经元损伤

为了从细胞水平进一步探讨电针对脑缺血的神

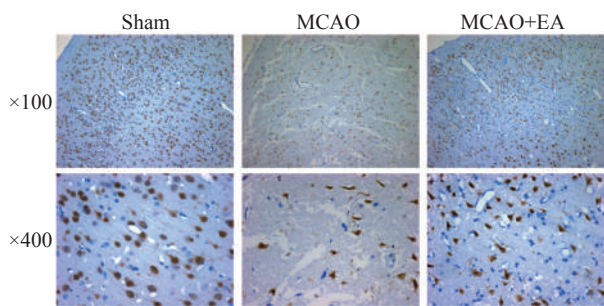
图1 MCAO造模后3d,各组大鼠脑组织的TTC染色



红色为正常脑组织,白色为梗死部分

经保护作用,本实验通过NeuN的常规组化染色,直观地观察脑梗死区域的神经元细胞形态和数量等变化情况。如图2所示,假手术组大鼠皮质的神经元细胞数目多,分布均匀,排列整齐,形态丰满及结构正常;相比之下,模型组大鼠梗死侧皮质神经元明显减少,分布不均,排列疏松,形态不规则,呈三角形;而经过电针治疗之后,梗死侧的神经元细胞数量增加,病理性改变有所缓解。由此可以推测电针可以在一定程度上挽救神经元的损伤,从而改善神经功能损伤。

图2 脑缺血损伤3d后,各组大鼠脑梗死皮质神经元细胞的情况 (HE染色)



注:NeuN为神经元的特异性蛋白,其阳性的细胞为棕黄色,所有细胞核均被苏木素染成蓝色。

2.3 电针促进皮质神经细胞增殖

5-溴代-2'-脱氧尿苷(BrdU)是一种人工合成的核苷酸,可以与胸苷竞争性地掺合到新增殖细胞的DNA中(S期),利用BrdU的特异性抗体与之结合,便可以检测出新增殖的细胞。因此,本研究通过BrdU的DAB免疫组化法来观察电针对脑缺血再灌注损伤后大鼠神经细胞的增殖情况;结果表明(图3),与假手术组相比较,模型组和电针组的大鼠脑梗死皮质均表现出明显的神经细胞增殖(Sham:7.41±1.37,MCAO:67.93±12.04,MCAO+EA:176.33±43.12, $P<0.01$),然而,电针组的增殖幅度较模型组则更加明显($\#P<0.05$)。这提示了电针“曲池”、“足三里”两穴对大鼠脑梗死皮质的神经细胞具有一定的促增殖作用。

2.4 电针促进细胞周期蛋白表达

细胞周期蛋白(CDK4和Cyclin D1)作为细胞周期正向调节因子之一,在决定细胞增殖方面起着重要的作用。采用Western blot和RT-PCR检测梗

死皮质中CDK4-Western blot(MCAO:1.62±0.22, MCAO+EA:2.83±0.18, $P<0.01$);PCR(MCAO:1.61±0.35,MCAO+EA:2.69±0.42, $P<0.05$)和Cyclin D1-Western blot(MCAO:1.55±0.47,MCAO+EA:2.24±0.84, $P<0.05$);PCR(MCAO:1.74±0.17,MCAO+EA:2.28±0.27, $P<0.05$)的表达情况,电针组的表达水平高于模型组(见图4和5)。可见电针“曲池”、“足三里”两穴能够促进缺血侧皮质的细胞周期蛋白活化。

图3 脑缺血损伤3d后,各组大鼠脑梗死皮质神经细胞的增殖(BrdU⁺)情况

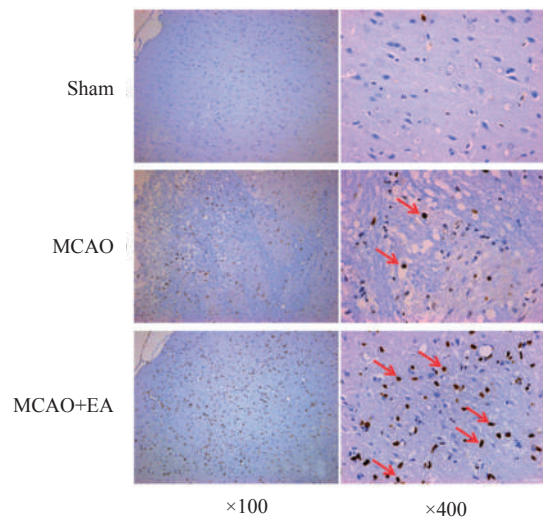


图4 Western blot法检测梗死皮质中CDK4和Cyclin D1的蛋白表达情况

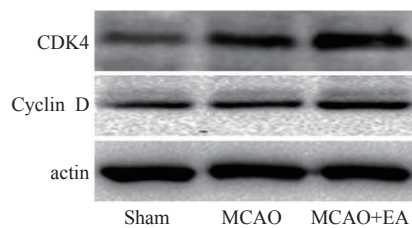
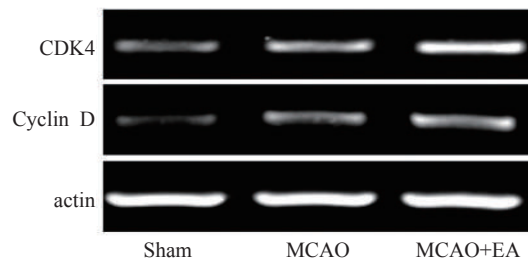


图5 RT-PCR法检测梗死皮质中CDK4和Cyclin D1的RNA表达情况



3 讨论

细胞周期由3类因子进行精密调控,它们分别是周期素依赖性激酶(CDKs)、周期素(Cyclins)和周期素依赖性激酶抑制因子(CKIs),其中细胞周期蛋白(CyclinD1)和CDK4在决定细胞增殖方面起着重要的作用。细胞周期蛋白(CyclinD1)作为细胞周期正向调节因子之一,与CDKs结合所构成的复合体,可使G1期周期抑制蛋白(Rb)被磷酸化,从而推动细胞周期由G1时期进入到S时期,促进细胞增殖^[10]。

目前国内外大量的研究均证实^[11-13],在脑缺血病理刺激下,脑梗死区及梗死边缘区会有大量的细胞增殖,至于这些细胞是从何而来,具有何种功能,能在多大程度上替代或修复受损的神经细胞,从而改善神经功能缺损,目前还没有统一的论断。Tao和Kim等研究^[7-8]表明电针能促进神经细胞的增殖,改善脑缺血后神经缺损症状,但其治疗脑缺血损伤的分子机制尚不明确。故本研究采用Zea Longa线栓法建立MCAO局灶性脑缺血再灌注模型,通过TTC和NeuN染色观察电针对脑缺血大鼠的神经保护作用,使用BrdU免疫组化法观察脑缺血3d后大鼠皮质神经细胞的增殖情况,同时应用Western blot和RT-PCR检测脑梗死皮质中CDK4和Cyclin D1的表达情况,探讨细胞周期相关蛋白在其中的调控作用。

本实验的TTC染色结果确认了MCAO模型的成功,并初步判断电针“曲池”、“足三里”穴具有减小脑梗死体积的神经保护作用,这与之前的报道相符合^[3-4]。为进一步揭示电针的治疗作用,通过免疫组化实验结果显示,电针可明显减轻MCAO大鼠神经元损伤,促进梗死侧神经细胞的增殖。CyclinD1和CDK4与脑缺血后的细胞增殖关系密切,起到决定性作用。模型组CDK4和Cyclin D1的表达高于假手术组,这说明细胞周期蛋白参与了脑缺血后神经细胞的增殖,与神经功能的恢复有一定的相关性,也与以往脑缺血的机制研究结果相一致^[14],而电针“曲池”、“足三里”穴能够进一步提高其mRNA和蛋白表达,增强细胞的增殖,促进神经功能的恢复。

综上所述,电针能够促使局灶性脑缺血大鼠梗死皮质的神经细胞大量增殖,参与神经重塑和功能恢复,从而在一定程度上缓解神经功能缺损。电针“曲池”、“足三里”两穴通过调控细胞周期相关蛋

白的表达,促进梗死侧皮质的神经细胞增殖,这可能是其治疗脑缺血的重要机制之一。但是,电针具有多方面调节功能,促进皮质细胞增殖可能只是其中调控途径之一,还有多种调控机制待我们进一步探索。

参考文献

- [1] Donnan GA, Fisher M, Macleod M, et al. Stroke[J].Lancet, 2008, 371(9624): 1612—1623.
- [2] Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM, et al. Heart disease and stroke statistics—2012 update: a report from the American Heart Association[J].Circulation, 2012, 125(1): e2—e220.
- [3] Kim JH, Choi KH, Jang YJ, et al. Electroacupuncture acutely improves cerebral blood flow and attenuates moderate ischemic injury via an endothelial mechanism in mice[J]. PLoS One, 2013, 8(2): e56736.
- [4] Jin Z, Liang J, Wang J, et al. Delayed brain ischemia tolerance induced by electroacupuncture pretreatment is mediated via MCP- induced protein 1[J].J Neuroinflammation, 2013, 10: 63.
- [5] Liu H, Shen X, Tang H, et al. Using microPET imaging in quantitative verification of the acupuncture effect in ischemia stroke treatment[J].Sci Rep, 2013, 3: 1070.
- [6] Wu P, Mills E, Moher D, et al. Acupuncture in poststroke rehabilitation: a systematic review and meta-analysis of randomized trials[J].Stroke, 2010, 41(4): e171—e179.
- [7] Kim EH, Kim YJ, Lee HJ, et al. Acupuncture increases cell proliferation in dentate gyrus after transient global ischemia in gerbils[J]. Neurosci Lett, 2001, 297(1): 21—24.
- [8] Tao J, Xue XH, Chen LD, et al. Electroacupuncture improves neurological deficits and enhances proliferation and differentiation of endogenous nerve stem cells in rats with focal cerebral ischemia[J]. Neurol Res, 2010, 32(2): 198—204.
- [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] Zhang RL, Zhang ZG, Roberts C, et al. Lengthening the G (1) phase of neural progenitor cells is concurrent with an increase of symmetric neuron generating division after stroke[J].J Cereb Blood Flow Metab, 2008, 28(3): 602—611.
- [11] Shimada IS, LeComte MD, Granger JC, et al. Self-renewal and differentiation of reactive astrocyte-derived neural stem/progenitor cells isolated from the cortical peri-infarct area after stroke[J].J Neurosci, 2012, 32(23): 7926—7940.
- [12] Nakagomi T, Taguchi A, Fujimori Y, et al. Isolation and characterization of neural stem/progenitor cells from post-stroke cerebral cortex in mice[J]. Eur J Neurosci, 2009, 29(9): 1842—1852.
- [13] Nakagomi T, Molnar Z, Nakano-Doi A, et al. Ischemia-induced neural stem/progenitor cells in the pia mater following cortical infarction[J].Stem Cells Dev, 2011, 20(12): 2037—2051.
- [14] Kawai T, Takagi N, Nakahara M, et al. Changes in the expression of Hes5 and Mash1 mRNA in the adult rat dentate gyrus after transient forebrain ischemia[J]. Neurosci Lett, 2005, 380(1): 17—20.