

· 基础研究 ·

不同时间窗电针结合经颅磁刺激对脑梗死大鼠 B 细胞淋巴瘤/白血病-2 基因及脑源性神经营养因子表达的影响

李媛 宋艳玲 王梦滢 梅元武 黎刚 方媛

【摘要】目的 观察大鼠脑缺血/再灌注后不同时间窗介入电针及经颅磁刺激(TMS)对其 B 细胞淋巴瘤/白血病-2 基因(Bcl-2)和脑源性神经营养因子(BDNF)表达的影响。**方法** 将 100 只 SD 大鼠随机分为正常组、假手术组、治疗组及模型组,每组又根据术后干预时间点不同细分为术后 6 h、12 h、24 h、48 h 及 72 h 共 5 个亚组。采用线栓法将治疗组及模型组大鼠制成左侧大脑中动脉栓塞/再灌注(MCAO/R)模型。治疗组各亚组大鼠分别于脑缺血/再灌注后第 6、12、24、48 及 72 小时给予电针及 TMS 治疗,而正常组、假手术组及模型组各亚组均于上述相同时间点给予假电针及假 TMS 治疗。各组大鼠均于治疗后第 14 天时取脑,采用实时荧光定量 PCR 技术检测脑梗死灶 Bcl-2 及 BDNF mRNA 表达情况。**结果** 各组大鼠梗死侧脑标本中均检测到 BDNF 及 Bcl-2 mRNA 阳性表达,治疗组各亚组 Bcl-2 及 BDNF mRNA 表达均显著高于模型组各亚组水平($P < 0.05$);对治疗组各亚组进行组内比较发现,该组各亚组间 BDNF 及 Bcl-2 mRNA(除术后 12 h 与术后 72 h 亚组外)组间差异均具有统计学意义($P < 0.05$),其中以术后 48 h 亚组 BDNF 及术后 24 h 亚组 Bcl-2 mRNA 表达水平相对较高。**结论** 于脑缺血/再灌注后 24~48 h 期间介入电针及 TMS 治疗,能显著促进脑梗死大鼠 BDNF 及 Bcl-2 表达,对保护受损神经细胞、促进神经功能恢复具有重要意义。

【关键词】 电针; 经颅磁刺激; 脑梗死; 细胞淋巴瘤/白血病-2 基因; 脑源性神经营养因子

The effect of electroacupuncture combined with transcranial magnetic stimulation on the expression of the B-cell lymphoma/leukemia-2 genes and brain derived neurotrophic factor in rats after cerebral infarction LI Man, SONG Yan-ling, WANG Meng-die, MEI Yuan-wu, LI Gang, FANG Yuan. Department of Neurology, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China
Corresponding author: FANG Yuan, Email: fangyuan28@hotmail.com

【Abstract】Objective To study the effect of electroacupuncture (EA) combined with transcranial magnetic stimulation (TMS) on the expression of the B-cell lymphoma/leukemia-2 gene (Bcl-2) and brain derived neurotrophic factor (BDNF) after cerebral infarction. **Methods** One hundred Sprague-Dawley rats were randomly and equally divided into a normal group, a sham-operated control group, a model group and an EA plus TMS group. A cerebral infarction model was established in the latter two groups using left middle cerebral artery occlusion (MCAO). Five-member subgroups of the EA plus TMS group were then treated at 6, 12, 24, 48 and 72 hours after reperfusion. Sham EA plus TMS was given to similar sub-groups from the other groups at the same time points. The expression of Bcl-2 mRNA and BDNF mRNA were measured using a RT-PCR at the 14th day. **Results** Positive expression of Bcl-2 mRNA and BDNF mRNA was detected around the infarction in all groups. The average expression of both was significantly higher in the EA plus TMS group than in the model group. Bcl-2 mRNA peaked when the therapy was administered at 24 hours and BDNF mRNA at 48 hours. **Conclusions** The expression of Bcl-2 mRNA and BDNF mRNA is maximized when EA plus TMS is administered 24-48 hours after cerebral infarction. EA plus TMS does have protective and rehabilitative effects on rats after cerebral infarction.

【Key words】 Electroacupuncture; Transcranial magnetic stimulation; Cerebral infarction; B-cell lymphoma/leukemia-2 gene; Brain derived neurotrophic factors

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2010.09.001

基金项目:国家自然科学基金(30640010)

作者单位:430032 武汉,华中科技大学同济医学院附属协和医院神经内科

通信作者:方媛,Email:fangyuan28@hotmail.com

随着缺血性脑卒中发病率逐年增高,脑梗死患者的康复治疗已成为当前临床研究的重要内容之一。国内、外已有大量研究证实,电针、经颅磁刺激(transcranial magnetic stimulation, TMS)治疗均能促使脑梗死后保护性因子表达增强,从而保护神经元、促进神经功能恢复^[1-3];但关于电针联合 TMS 治疗脑梗死的时间窗以及对脑梗死后保护性因子表达的影响目前鲜见报道。基于上述背景,本研究于大鼠脑缺血/再灌注后不同时间窗给予电针及 TMS 联合治疗,并观察对大鼠 B 细胞淋巴瘤/白血病-2 基因(B-cell lymphoma/leukemia-2, Bcl-2)及脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)表达的影响,初步探讨电针联合 TMS 治疗脑梗死的最佳时间窗以及可能机制。现报道如下。

材料与方法

一、实验动物及分组

共选取健康成年 Sprague-Dawley 雄性大鼠 100 只,由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供,大鼠体重(250 ± 30)g,鼠龄 12 周,采用随机数字表法将其分为正常组、假手术组、治疗组及模型组,各组再根据术后开始干预的时间窗细分为术后 6 h、12 h、24 h、48 h 及 72 h 共 5 个亚组,每个亚组有 5 只大鼠。

二、脑梗死动物模型制作

参照廖维靖等^[4]介绍的改良 Zea Longa 线栓法将治疗组及模型组大鼠制成左侧大脑中动脉栓塞/再灌注(middle cerebral artery occlusion/reperfusion, MCAO/R)模型,具体操作步骤如下:首先采用 10% 水合氯醛按每千克体重 3 ml 进行腹腔注射麻醉,待麻醉剂生效后进行颈正中切口,暴露左侧颈总动脉及颈内动脉,结扎颈总动脉近心段并分离颈内动脉;将涂有多聚赖氨酸、直径为 0.28 mm 的尼龙线沿颈动脉分叉处插入颈内动脉约(18.0 ± 1.0)mm 处,结扎固定尼龙线后缝合皮肤;待大脑中动脉栓塞 90 min 后将线栓拔出约 10 mm 实现血液再灌注。脑梗死大鼠模型制作成功标准如下:大鼠苏醒后提尾时出现右侧前肢内收屈曲;Horner 征阳性;爬行时向右侧划圈;站立时向右侧倾倒等。凡实验大鼠术后具有上述表现者均提示制模成功。假手术组大鼠手术操作过程均与模型组及治疗组一致,但术中不栓塞大脑中动脉血流;正常组未给予任何手术处理。

三、干预方法

治疗组各亚组大鼠根据预先设定时间点,分别于脑缺血/再灌注后 6 h、12 h、24 h、48 h 及 72 h 时给予 TMS 和电针治疗,治疗持续时间为 14 d,具体操作步骤如下。

1. 磁刺激治疗:采用丹麦 Dantec 公司生产的磁刺激器及圆形线圈,线圈直径 12 cm,能产生脉冲强度峰值为 1.9 T 的磁场,设置磁刺激频率为 0.5 Hz,磁场强度为最大输出强度的 70% 水平(约 1.33 T),每次磁刺激持续时间为 1 min(约 30 个脉冲刺激),每天刺激 2 次,中间间隔 8 h(分别于上午 9 时及下午 5 时各刺激 1 次)。

2. 电针治疗:参考《实验针灸学》^[5]中大鼠针灸穴位定位方法及拟人比照法定位,取百会、大椎穴,选择医用 15 mm、28 号毫针进行穴位针刺,然后连接 G6805-2 型电针治疗仪,电针刺激参数如下:疏密波,其中疏波频率为 2 Hz,密波频率为 30 Hz,电流强度为 2 mA,输出电压为 2~4 V,以局部肌肉轻颤为度,刺激时间为每次 30 min,每天刺激 2 次,中间间隔 8 h(分别于上午 9 时及下午 5 时各刺激 1 次)。

正常组、假手术组及模型组各亚组大鼠均于上述相同时间点给予假磁刺激和假电针治疗,在进行假磁刺激时,大鼠所处环境条件均与治疗组一致,但在治疗过程中磁刺激器无能量输出;进行假电针治疗时,仅于相应时间点进行捆扎处理,未给予针刺治疗。

四、大鼠脑内 Bcl-2 及 BDNF mRNA 检测

各组实验大鼠于治疗 14 d 后采用过量 10% 水合氯醛深度麻醉,于冰盘上快速断头取脑,切取脑梗死灶周边组织约 100 mg,每份标本取约 1×10^5 个细胞,去上清液后加入 Trizol 溶液 0.5 ml,混匀后静置 10 min;每管加入氯仿 200 μ l,用手振摇 15 s;于 4 $^{\circ}$ C 环境下以 12 000 rpm 离心 15 min;取上清液 400 μ l,加入等体积异丙醇混匀, -20 $^{\circ}$ C 环境下静置 30 min;然后于 4 $^{\circ}$ C 环境下以 12 000 rpm 离心 10 min;去上清液,经 75% 乙醇洗涤、沉淀、离心后,去净残余上清液,于室温下晾干;用 50 μ l 经焦碳酸二乙酯处理过的三蒸水溶解沉淀,选择紫外分光光度计测定其浓度及纯度,在逆转录酶 M-MLV 作用下,将 mRNA 逆转录成 cDNA 分子,采用 SYBR Green I 荧光染料技术进行实时定量多聚酶链反应(polymerase chain reaction, PCR),以获取各组标本标准曲线,采用计算机分析 Ct 值。引物设计序列如下, BDNF 上游引物:5'-CCCTTCTACACTTTACCTCT-TG-3';下游引物:5'-GTTTCACCCTTTCCACTCCTA-3'; Bcl-2 上游引物:5'-GGGACGCGAAGTGCTATTGGTA-3';下游引物:5'-CAGGCTGGAAGGAGAAGATGC-3'。

五、统计学分析

采用 Excel 2003 版软件进行数据整理及制图,应用 SPSS 12.0 版统计学软件包进行数据分析,主效应及交互效应统计选用多组重复测量方差分析,单独效应分析选用单因素方差分析及单组重复测量资料方差分析, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

结 果

一、不同时间窗干预对各组大鼠 Bcl-2 mRNA 表达的影响

对相同时间窗各亚组大鼠比较后发现,正常组及假手术组各亚组 Bcl-2 mRNA 组间差异均无统计学意义($P>0.05$);而模型组及治疗组各亚组 Bcl-2 mRNA 与正常组及假手术组各亚组比较,发现组间差异均有统计学意义($P<0.05$);治疗组与模型组比较,发现各亚组间差异均有统计学意义($P<0.05$),提示电针联合 TMS 治疗能显著增强脑梗死大鼠 Bcl-2 mRNA 表达。对同一组内不同时间窗亚组比较后发现,正常组、假手术组及模型组各亚组 Bcl-2 mRNA 组内差异均无统计学意义($P>0.05$),而治疗组除术后 12 h 与术后 72 h 亚组组间差异无统计学意义外($P>0.05$),其余各亚组 Bcl-2 mRNA 表达组间差异均有统计学意义($P<0.01$),并且以术后 24 h 亚组 Bcl-2 mRNA 表达水平相对较高,提示不同时间窗给予电针及 TMS 治疗对脑梗死大鼠 Bcl-2 表达具有显著影响作用,具体数据详见表 1。

二、不同时间窗干预对各组大鼠 BDNF mRNA 表达的影响

对相同时间窗各亚组大鼠比较后发现,正常组及假手术组各亚组 BDNF mRNA 组间差异均无统计学意义($P>0.05$);而模型组及治疗组各亚组 BDNF mRNA 与正常组及假手术组各亚组比较,发现组间差异均有统计学意义($P<0.05$);治疗组与模型组比较,除术后 72 h 亚组外,其它各亚组组间差异均有统计学意义($P<0.05$),提示于脑缺血/再灌注后 6~48 h 期间给予电针及 TMS 治疗,能显著增强脑梗死大鼠 BDNF mRNA 表达。对同一组内不同时间窗亚组比较后发

现,正常组、假手术组及模型组各亚组 BDNF mRNA 表达组内差异均无统计学意义($P>0.05$),而治疗组各亚组 BDNF mRNA 表达组内差异均有统计学意义($P<0.01$),并且以术后 48 h 亚组 BDNF mRNA 表达水平相对较高,提示不同时间窗给予电针及 TMS 治疗对脑梗死大鼠 BDNF mRNA 表达具有显著影响作用,具体数据详见表 1。

讨 论

相关研究发现,缺血性脑梗死病灶中存在缺血半暗带区,缺血半暗带区内神经元损伤在一定时间内具有动态变化及可逆性等特点,故在有效时间内采取适当治疗可显著抑制缺血半暗带区神经细胞凋亡,减少神经元受损,从而降低脑梗死患者的致死率及致残率,有效改善患者生活质量^[6]。电针作为一种传统治疗手段,目前已在临床中广泛应用。大量研究发现,电针治疗能抑制缺血性脑梗死神经元凋亡、促进脑功能恢复^[7]。TMS 是一种能改变大脑皮质兴奋性的无创、无痛且相对安全的新型治疗技术。据相关研究显示,TMS 能抑制缺血性脑梗死神经细胞凋亡、促进受损神经功能恢复^[8]。目前有学者采用电针及 TMS 联合治疗缺血性脑梗死患者,发现能显著改善患者预后,但其作用机制尚不明确^[9]。本研究于脑梗死后不同时间窗介入电针及 TMS 治疗,并观察该联合疗法对大鼠 BDNF 及 Bcl-2 mRNA 表达的影响,从而探讨电针联合 TMS 治疗脑梗死的最佳时间窗及相关机制。

BDNF 是一种生物活性物质,作为神经营养素家族成员之一,其主要分布于大脑皮质、海马、小脑等中枢神经组织中,具有促神经元存活、分化、增殖,抑制运动神经元退行性变以及抗神经元凋亡等功效^[10]。有研究发现电针联合 TMS 治疗能显著促进脑梗死大鼠

表 1 不同时间窗干预对各组大鼠脑梗死灶 Bcl-2 及 BDNF mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s$)

组 别	只数	Bcl-2 mRNA 表达	BDNF mRNA 表达	组 别	只数	Bcl-2 mRNA 表达	BDNF mRNA 表达
治疗组				正常组			
术后 6 h 亚组	5	0.24 ± 0.16	0.81 ± 0.17	术后 6 h 亚组	5	1.04 ± 0.10 ^{ab}	1.07 ± 0.13 ^{ab}
术后 12 h 亚组	5	0.56 ± 0.05	1.72 ± 0.28	术后 12 h 亚组	5	1.06 ± 0.19 ^{ab}	1.05 ± 0.19 ^{ab}
术后 24 h 亚组	5	1.74 ± 0.43	2.47 ± 0.43	术后 24 h 亚组	5	1.10 ± 0.21 ^{ab}	1.09 ± 0.08 ^{ab}
术后 48 h 亚组	5	1.42 ± 0.15	3.08 ± 0.79	术后 48 h 亚组	5	1.03 ± 0.25 ^{ab}	1.14 ± 0.23 ^{ab}
术后 72 h 亚组	5	0.51 ± 0.19	0.52 ± 0.15	术后 72 h 亚组	5	1.02 ± 0.08 ^{ab}	1.30 ± 0.26 ^{ab}
模型组				假手术组			
术后 6 h 亚组	5	0.19 ± 0.01 ^a	0.47 ± 0.01 ^a	术后 6 h 亚组	5	1.03 ± 0.05 ^{ab}	1.04 ± 0.15 ^{ab}
术后 12 h 亚组	5	0.21 ± 0.01 ^a	0.54 ± 0.03 ^a	术后 12 h 亚组	5	1.08 ± 0.16 ^{ab}	1.06 ± 0.17 ^{ab}
术后 24 h 亚组	5	0.23 ± 0.02 ^a	0.58 ± 0.19 ^a	术后 24 h 亚组	5	1.02 ± 0.25 ^{ab}	1.16 ± 0.18 ^{ab}
术后 48 h 亚组	5	0.28 ± 0.07 ^a	0.62 ± 0.18 ^a	术后 48 h 亚组	5	1.04 ± 0.13 ^{ab}	1.02 ± 0.20 ^{ab}
术后 72 h 亚组	5	0.36 ± 0.05 ^a	0.50 ± 0.09	术后 72 h 亚组	5	1.05 ± 0.12 ^{ab}	1.15 ± 0.33 ^{ab}

注:与相同时间窗治疗组各亚组比较,^a $P<0.05$;与相同时间窗模型组各亚组比较,^b $P<0.05$

神经细胞内磷酸化环腺苷酸反应元件结合蛋白(phosphorylated cAMP-response element binding protein, p-CREB)表达,而 p-CREB 表达增强能激活神经生长因子(nerve growth factor, NGF)、BDNF 等基因转录^[11],本研究也观察到类似结果;同时本研究还采用 RT-PCR 技术观察不同时间窗介入电针及 TMS 治疗对脑缺血/再灌注大鼠 BDNF mRNA 表达的影响,发现治疗组术后 48 h 亚组 BDNF mRNA 表达水平明显高于其它各亚组($P < 0.05$),由此推测电针联合 TMS 治疗脑梗死存在时间窗效应。目前研究已发现,BDNF 的作用机制是与其受体 TrkB 结合后,通过拮抗兴奋性氨基酸毒性、稳定细胞内 Ca^{2+} 浓度、拮抗氧自由基、抑制细胞凋亡等参与脑缺血损伤保护过程,既能抑制缺血半暗带区神经元凋亡,又能缓解迟发性神经元坏死^[12],因此本研究推测电针联合 TMS 治疗脑梗死的机制可能与增强脑梗死灶 BDNF 表达有关。

细胞凋亡是脑梗死后神经元坏死的重要形式之一。Bcl-2 在脑缺血过程中广泛表达,其主要功能是抑制细胞凋亡、促进细胞存活^[10]。目前研究已证实,BDNF 可通过调节机体 Bcl 及 Bax 蛋白表达水平^[12],从而进一步抑制细胞凋亡,故本研究同时采取 RT-PCR 技术检测各时间窗治疗对脑梗死大鼠 Bcl-2 mRNA 表达的影响,实验结果显示,治疗组术后 24 h 亚组 Bcl-2 mRNA 表达水平相对较高($P < 0.05$),其变化趋势与治疗组各亚组 BDNF mRNA 的改变类似,推测电针联合 TMS 治疗不仅能直接促进 bcl-2 表达,而且还可通过提高 BDNF 水平,间接促进 Bcl-2 表达,从而发挥其抗细胞凋亡及保护神经元功能。另外有研究发现,电针联合 TMS 治疗还可通过其它途径对脑梗死发挥治疗作用,如通过加快脑缺血大鼠脑水肿消退及良性调节细胞外 Ca^{2+} 浓度、促进脑梗死灶周围血管新生及神经干细胞增殖等,从而加速脑梗死大鼠受损神经功能恢复^[13]。

综上所述,本研究发现 MCAO/R 模型大鼠于脑梗死后 24~48 h 时间窗内介入电针及 TMS 治疗,可显著提高脑梗死灶 BDNF 及 Bcl-2 表达水平,从而尽可能抑制神经元凋亡,挽救缺血半暗带区濒临死亡细胞,有助于促进神经功能恢复及改善脑梗死预后。如能将本实

验进一步深入、完善,并进行相关临床研究,那么对指导脑梗死患者选择最佳时间窗实施电针及 TMS 治疗、促其神经功能恢复将具有重要意义。

参 考 文 献

- [1] Liu W, Mukherjee M, Sun C, et al. Electroacupuncture may help motor recovery in chronic stroke survivors: a pilot study. *J Rehabil Res Dev*, 2008, 45: 587-595.
- [2] Kim WS, Kim IS, Kim SJ, et al. Effect of electroacupuncture on motor recovery in a rat stroke model during the early recovery stage. *Brain Res*, 2009, 1248: 176-183.
- [3] Feng HL, Yan L, Cui LY. Effects of repetitive transcranial magnetic stimulation on adenosine triphosphate content and microtubule associated protein-2 expression after cerebral ischemia-reperfusion injury in rat brain. *Chin Med J*, 2008, 121: 1307-1312.
- [4] 廖维靖, 刘淑红, 范明, 等. 线栓阻断大鼠大脑中动脉制作缺血性脑损伤模型的改良. *中华物理医学与康复杂志*, 2002, 24: 345-348.
- [5] 邓春雷, 殷克敬. 实验针灸学. 北京: 人民卫生出版社, 1998: 142-143.
- [6] Boggi PS, Alonso AM, Mansur CG, et al. Hand function improvement with low-frequency repetitive transcranial magnetic stimulation of the unaffected hemisphere in a severe case of stroke. *Am J Phys Med Rehabil*, 2006, 85: 927-930.
- [7] Wang Q, Peng Y, Chen S, et al. Pretreatment with electroacupuncture induces rapid tolerance to focal cerebral ischemia through regulation of endocannabinoid system. *Stroke*, 2009, 40: 2157-2164.
- [8] Fujiki M, Kobayashi H, Abe T, et al. Repetitive transcranial magnetic stimulation for protection against delayed neuronal death induced by transient ischemia. *J Neurosurg*, 2003, 99: 1063-1069.
- [9] Cruccu G, Aziz TZ, Garcia LL, et al. EFNS guidelines on neurostimulation therapy for neuropathic pain. *Eur J Neurol*, 2007, 14: 952-970.
- [10] 杨克红, 葛树星, 徐冰莹, 等. 三七皂苷对大鼠脑缺血再灌注损伤中 BDNF mRNA 含量的影响. *中药材*, 2007, 30: 313-316.
- [11] 黄国付, 黄晓琳, 郭铁成, 等. 电针结合经颅磁刺激对局灶性脑缺血大鼠 p-CREB 表达的影响. *中国康复医学杂志*, 2009, 24: 289-292.
- [12] Feng HL, Yan L, Guan YZ, et al. Effects of transcranial magnetic stimulation on motor cortical excitability and neurofunction after cerebral ischemia-reperfusion injury in rats. *Chin Med Sci J*, 2005, 20: 226-230.
- [13] 李铁山, 阎文静, 刘晓光, 等. 脑卒中后受损脑同侧肢体偏瘫的经颅磁刺激研究. *中华物理医学与康复杂志*, 2008, 30: 355-357.

(修回日期: 2010-06-20)

(本文编辑: 易 浩)

本刊办刊方向:

立足现实; ; 关注前沿; ; 贴近读者; ; 追求卓越