

· 基础研究 ·

电针结合重复经颅磁刺激对局灶性脑缺血大鼠蛋白激酶 A-环磷腺苷反应元件结合蛋白信号转导通路的影响

黄国付 黄晓琳

【摘要】目的 探讨电针结合重复经颅磁刺激(rTMS)对局灶性脑缺血大鼠蛋白激酶 A-环磷腺苷反应元件结合蛋白(PKA-CREB)信号转导通路的影响及其治疗缺血性脑损伤的机制。**方法** 取雄性 Wistar 大鼠 75 只,采用线栓法制备大鼠大脑中动脉闭塞模型,分为正常组、模型组、电针组、rTMS 组和电针 + rTMS 组,每组大鼠 15 只,通过蛋白印迹法检测正常组入组后及其它各组脑缺血后第 7、14、28 天 3 个时间点大鼠海马胞核内蛋白激酶 A(PKA)、磷酸化环磷腺苷反应元件结合蛋白(pCREB)表达的变化,并观测其神经功能评分。**结果** 脑缺血后不同时间点缺血侧海马 PKA 及 pCREB 灰度值比较,模型组在造模后第 7 天时高于正常组,造模后第 28 天时低于正常组,差异均有统计学意义($P < 0.05$),造模后第 14 天时与正常组相比差异无统计学意义($P > 0.05$);电针组、rTMS 组和电针 + rTMS 组 3 个时间点均高于模型组,造模后第 7、14 天时高于正常组,差异具有统计学意义($P < 0.05$),造模后第 28 天时与正常组相比差异无统计学意义($P > 0.05$),其中,电针 + rTMS 组第 7、14 天时高于电针组、rTMS 组,差异有统计学意义($P < 0.05$),电针组和 rTMS 组各时间点差异均无统计学意义($P > 0.05$)。电针组、rTMS 组和电针 + rTMS 组各时间点神经功能评分均较模型组改善($P < 0.01$),其中以电针 + rTMS 组神经功能评分改善最为明显。**结论** 电针结合 rTMS 对脑卒中后神经功能的恢复具有显著的促进作用,蛋白激酶 A-环磷腺苷反应元件结合蛋白信号转导通路蛋白的表达增强可能是其治疗缺血性脑卒中的机制之一。

【关键词】 脑缺血; 电针; 重复经颅磁刺激; 蛋白激酶 A-环磷腺苷反应元件结合蛋白

Effects of electro-acupuncture combined with repetitive transcranial magnetic stimulation on protein kinase A-cyclic adenosine monophosphate response element binding protein signal transduction system after focal cerebral ischemia in adult rats

HUANG Guo-fu*, HUANG Xiao-lin. * Department of Acupuncture and Moxibustion, Wuhan Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Wuhan 430022, China

Corresponding author: HUANG Xiao-lin, Email: xiaolin2006@yahoo.com.cn

【Abstract】Objective To investigate the effects of electro-acupuncture (EA) combined with repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) on protein kinase A-cyclic adenosine monophosphate response element binding protein (PKA-CREB) signal transduction system after focal cerebral ischemia in adult rats and to explore the mechanism of EA combined with rTMS in treating ischemic brain injury. **Methods** The animal model of transient focal ischemia was made by artificial middle cerebral artery occlusion. Seventy-five Wistar rats were randomly divided into normal group, model group, EA group, rTMS group and EA + rTMS group. The expressions of PKA and pCREB in hippocampus were detected and the neurologic impairment rating was observed at the 7th, 14th and 28th days, respectively, after infarction. **Results** The average gray densities of PKA and pCREB expressions in hippocampus after focal cerebral ischemia in model group were higher at the 7th d, lower at the 28th d than that in normal group ($P < 0.05$); higher in EA group, rTMS group, EA + rTMS group than that in model group at all time points ($P < 0.05$), higher in EA + rTMS group than that in EA group and rTMS group at 7th and 14th d ($P < 0.05$), and there was no difference between EA group and rTMS group ($P > 0.05$). The improvement of neural motor function was obvious in EA group, rTMS group and EA + rTMS group compared with model group ($P < 0.01$), especially in EA + rTMS group. **Conclusions** EA combined with rTMS can promote the functional recovery after cerebral ischemia, enhance the expression of PKA-CREB signal transduction system in hippocampus after focal cerebral ischemia, which

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2010.06.002

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30672216),武汉市卫生科研基金项目(WX08A01、WZ08B02)

作者单位:430022 武汉,武汉市中西医结合医院针灸科(黄国付);华中科技大学同济医学院附属同济医院康复医学科(黄晓琳)

通信作者:黄晓琳,Email:xiaolin2006@yahoo.com.cn

might be one of the important mechanisms of EA combined with rTMS in treating ischemia brain injury.

【Key words】 Cerebral ischemia; Electro-acupuncture; Repetitive transcranial magnetic stimulation; Protein kinase A-cyclic adenosine monophosphate response element binding system

缺血性脑卒中是中国最常见的脑血管疾病,致残率和致死率均较高。对大多数脑缺血患者而言,神经元死亡不可避免,如何积极有效地促进缺血性脑卒中患者神经功能的恢复目前仍然是脑缺血的研究重点。研究表明,电针结合重复经颅磁刺激(repetitive transcranial magnetic stimulation, rTMS)治疗能促进大鼠神经干细胞的增殖,改善大鼠学习记忆能力^[1]。近年来发现,蛋白激酶 A-环磷腺苷反应元件结合蛋白(protein kinase A-cyclic adenosine monophosphate response element binding protein, PKA-CREB)信号转导通路在中枢神经系统中起着关键的作用,能促进神经细胞的存活、再生、分化等,并有实验证明 PKA-CREB 信号转导通路与突触的可塑性及学习记忆功能有着密切的关系^[2-3]。随着脑缺血分子机制的深入研究,发现急性脑缺血激活了内源性保护机制 PKA-CREB 信号转导通路。本研究采用蛋白印迹法观察电针结合 rTMS 对局灶性脑缺血大鼠不同时相海马胞核内蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA)、磷酸化 cAMP 反应元件结合蛋白(phosphorylated CREB, pCREB)表达的影响,以探讨其在脑缺血神经修复中的作用机制。现报道如下。

材料与方法

一、主要仪器和试剂

石蜡切片机(Leica 2025 型,德国),生物显微镜(Olympus BS-50 型,日本),CCD 数码相机(Canon 970 型),图像分析系统(HPIAS21000),G6805-1 电针治疗仪(青岛产);磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)购于北京中山生物技术公司;PKA 多克隆抗体,正常山羊血清,DAB 试剂盒,购于武汉 Boster 公司;pCREB 多克隆抗体购自 Santa Cruz 公司;去离子甲酰胺,TritonX-100 等。

二、实验动物分组及模型建立

选用健康、雄性、清洁级、Wistar 大鼠 75 只,体重(200±20)g,由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供,在标准条件下适应性饲养 3 周后开始实验。将 75 只大鼠采用数字表法随机分成正常组、模型组、电针组、rTMS 组和电针+rTMS 组,每组 15 只,均选取造模后第 1 天作为开始的时间点,按第 7,14,28 天 3 个时间点分为 3 个亚组,每个亚组 5 只。

正常组不予任何处理,其它各组采用线栓法制备大鼠大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型;参照廖维靖等^[4]的大鼠大脑中动脉缺血

模型造模方法,腹腔注射 6% 水合氯醛(350 mg/kg 体重),颈部正中切口,长约 2 cm,暴露右侧颈总动脉(common cerebral artery, CCA)和颈外动脉(external carotid artery, ECA),5/0 号丝线结扎颈外动脉。分离与颈总动脉伴行的迷走神经,在距颈总动脉分叉处近端 0.5~0.6 cm 处结扎颈总动脉。在结扎线的远端置丝线备用。用微小动脉夹夹闭备用线远端的颈总动脉,在备用线的近端用眼科剪剪一小切口,将黑色 5/0 尼龙线线栓送进切口,向上推至动脉夹处,将备用线稍微扎紧,随即松开动脉夹。将线栓沿颈总动脉、颈内动脉顺行向上插入至 MCA 起始部,遇阻力时停止,从颈总动脉分叉处计算插入深度为(1.7±0.2)cm,造成大脑中动脉供血阻断。尼龙线由上海申丁实业有限公司生产,直径约 0.15 mm。实验前,用电烙铁加热线栓头端使之成为光滑球形,线栓长 4 cm。缺血 2 h 后,无需再次麻醉,轻轻抓握动物将栓线后拔退至颈总动脉,松开颈总动脉即恢复大脑中动脉的血供。造模时室温保持在 20~30℃,使用加热垫使动物的肛温维持在(37.0±0.5)℃,术后将动物置于放有清洁垫料的饲养盒,自由饮水、进食,用滴管给动物喂水、湿润鼻部和眼部。

术后 24 h 采用 Bederson 等^[5]推荐的标准初步评分并进行筛选。0 分为未见行为缺陷;1 分为左前肢屈曲(提尾悬空实验阳性);2 分为侧推抵抗力下降(侧向推力实验阳性),伴左前肢屈曲,无转圈行为;3 分为同 2 分行为,伴自发性旋转。选择评分为 1~3 分的大鼠纳入本研究。

三、治疗方法

正常组和模型组造模后当日开始按同等条件抓取,但不实施电针及 rTMS 处理;电针组采用督脉电针的刺激方式,以橡皮筋将大鼠四肢固定在治疗台上,参照《实验针灸学》^[6]选取督脉经穴“百会”“大椎”,以 30 号 1 寸毫针斜刺入“百会”10 mm,直刺入“大椎”5 mm,将针柄分别连接至电针仪上,选取连续波,频率为 2 Hz,强度为 1~2 mA。在造模 2 h 后即进行第 1 次治疗,每次治疗 30 min,每日 1 次。rTMS 组采用丹麦 Dantec 公司生产的磁刺激器及圆形线圈,线圈的直径为 12 cm,脉冲磁场的强度峰值为 2 T。刺激时固定大鼠头部,线圈紧贴头皮,与大鼠右侧大脑半球相切,中心位于动物右耳前 9 mm,在造模 2 h 后即进行第 1 次治疗,刺激频率为 0.5 Hz,强度为 70% 最大输出强度,连续刺激 20 次为 1 组,2 组/d,至各时间点大鼠处死前 1 日结束。电针+rTMS 组参数与疗程分别同电针组和 rTMS 组。

四、实验观察指标

1. 神经功能缺损评分: 参照 Bederson 等^[5] 的评分方法, 分别于第 7, 14, 28 天 3 个时间点观察大鼠行为表现并进行神经功能缺损评分。

2. 蛋白印迹法检测: 正常组入组后及其它各组脑缺血后第 7, 14, 28 天 3 个时间点快速断头取脑后, 分离出海马组织(冰上操作), 立即置液氮中保存。将海马组织从液氮中取出后放在匀浆器内, 迅速加入 1.5 ml 的匀浆裂解液[三氨基甲烷盐酸 20 mmol/L (pH 值为 7.6), 乙二胺四醋酸 5 mmol/L, 氟化钠 100 mmol/L, 1% 壬基酚聚氧乙烯醚, 苯甲基磺酰氟化物 1 mol/L, 抑蛋白酶肽 (Aprotinin) 10 μg/ml, 亮抑酶肽 (Leupeptin) 10 μg/ml], 于冰浴中匀浆。将匀浆液于 4℃ 以 12 000 转/min 离心 10 min, 取上清液, 测总蛋白含量后 EP 管分装, -80℃ 储存备用。取含 50 μg 蛋白质的样品经二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳, 蛋白印迹转至聚偏二氟乙烯膜上; 5% 牛血清白蛋白室温封闭过夜, 然后分别加入一抗 PKA 兔抗鼠多克隆抗体 (1:200)、pCREB 兔抗鼠多克隆抗体 (1:200) 室温孵育 3 h。三羟甲基氨基甲烷吐温 20 缓冲液洗膜 3 次, 加入二抗辣根酶标记山羊抗兔 IgG (1:200) 室温孵育 2 h。三羟甲基氨基甲烷吐温 20 缓冲液洗膜后, 电化发光显色, 沥干后保鲜膜包裹, 暗室内 X 线片曝光, 显影、定影处理, 结果以 HPIAS21000 图像分析软件测定 PKA、pCREB 吸光度值。

五、统计学分析

采用 SPSS 10.0 版统计学软件进行统计学处理, 每组细胞计数结果均以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用方差分析对组间数据进行比较。

结 果

一、各组大鼠缺血后神经行为学评分比较

Bederson 神经功能评定: 正常组得分均为 0, 电针组、rTMS 组、电针 + rTMS 组与模型组在第 7, 14, 28 天相比差异均有统计学意义 ($P < 0.01$), 电针 + rTMS 组与电针组、rTMS 组相比差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 电针组与 rTMS 组各时间点之间相比差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 详见表 1。

二、海马胞核内 PKA、pCREB 蛋白水平比较

相对灰度值比较, 模型组在第 7 天时高于正常组, 第 28 天时低于正常组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 第 14 天时与正常组相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 电针组、rTMS 组、电针 + rTMS 组 3 个时间点均高于模型组, 第 7, 14 天时高于正常组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 第 28 天时与正常组相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 其中电针 + rTMS 组第 7, 14 天时高于电针组、rTMS 组, 差异具有统计学意义 ($P <$

0.05), 电针组、rTMS 两组各时间点差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1, 图 1~2。

表 1 各组大鼠不同时间神经行为学评分和海马胞核内 PKA、pCREB 免疫反应产物灰度值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组 别	只数	神经功能缺损评分(分)	PKA 免疫反应产物灰度值	pCREB 平均灰度值
正常组	15			
入组后第 7 天	5	0	58.23 ± 5.16	0.41 ± 0.07
入组后第 14 天	5	0	58.16 ± 5.09	0.42 ± 0.07
入组后第 28 天	5	0	58.25 ± 5.22	0.40 ± 0.07
模型组	15			
造模后第 7 天	5	2.68 ± 0.06	86.39 ± 6.52	0.53 ± 0.10
造模后第 14 天	5	2.52 ± 0.12	62.32 ± 5.26	0.39 ± 0.06
造模后第 28 天	5	1.60 ± 0.13	31.26 ± 4.74	0.18 ± 0.05
电针组	15			
造模后第 7 天	5	1.96 ± 0.09 ^a	148.61 ± 5.70 ^a	0.89 ± 0.08 ^a
造模后第 14 天	5	1.68 ± 0.10 ^a	136.19 ± 10.46 ^a	0.61 ± 0.07 ^a
造模后第 28 天	5	0.59 ± 0.15 ^a	89.02 ± 6.15 ^a	0.40 ± 0.06 ^a
rTMS 组	15			
造模后第 7 天	5	1.97 ± 0.09 ^a	146.95 ± 3.81 ^a	0.86 ± 0.08 ^a
造模后第 14 天	5	1.64 ± 0.15 ^a	133.39 ± 8.22 ^a	0.58 ± 0.07 ^a
造模后第 28 天	5	0.52 ± 0.14 ^a	85.15 ± 5.76 ^a	0.39 ± 0.06 ^a
电针 + rTMS 组	15			
造模后第 7 天	5	1.28 ± 0.07 ^{ab}	196.09 ± 14.46 ^{ab}	1.26 ± 0.09 ^{ab}
造模后第 14 天	5	1.01 ± 0.10 ^{ab}	159.18 ± 8.02 ^{ab}	0.81 ± 0.07 ^{ab}
造模后第 28 天	5	0.30 ± 0.12 ^{ab}	91.22 ± 6.32 ^{ac}	0.42 ± 0.06 ^{ac}

注: 与模型组比较, ^a $P < 0.01$; 与电针组、rTMS 组比较, ^b $P < 0.01$

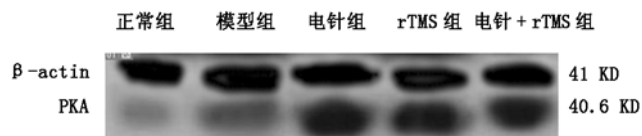


图 1 各组脑缺血第 7 天缺血侧海马 PKA 免疫印迹

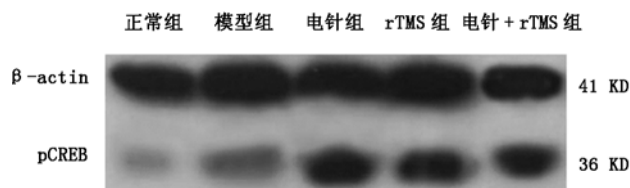


图 2 各组脑缺血第 7 天缺血侧海马 pCREB 免疫印迹

讨 论

研究表明, 脑卒中后积极采用针刺治疗, 明显有助于神经功能的恢复, 可促进海马神经元增殖^[7]。根据祖国传统医学的经验及国际上针刺循证医学的证据表明, 针刺治疗脑卒中功能障碍的疗效是肯定的。rTMS 是一种无创、无痛又安全的新技术, 可以在皮质产生可传导性的感生电流, 从而对刺激位点或有突触联系的远处皮质兴奋性产生抑制或易化。研究表明, rTMS 不仅可作为中风后功能评估和预测预后的方法, 并且对脑功能恢复有促进作用^[8-10]。在前期的研究工作中我们将中医传统的针刺治疗和现代 rTMS 技术相结合用

于大鼠缺血性脑损伤的研究,发现其对缺血后血管的新生和神经再生的微环境均有一定的影响^[11]。

在神经系统中,PKA 对神经元的存活与生长以及突触的可塑性起着重要的正调节作用。PKA 在哺乳类动物体内可表达 4 种调节亚基(R I α 、R I β 、R II α 、R II β) 和 3 种催化亚基(C α 、C β 、C γ),每个亚基在神经元内均有表达,其中 C α 、C β 亚基在神经元内表达丰富,且为突触可塑性所必需。胞质 cAMP 浓度升高时,C 亚基和 R 亚基解离,游离的 C 亚基除使细胞质组分磷酸化之外,还进入细胞核,对包括 CREB 在内的核组分起磷酸化作用,C 亚基在核内的主要靶标蛋白是 CREB^[12]。当活性 PKA 催化亚基进入核内使 CREB 磷酸化而活化,进而与相关基因的 cAMP 反应元件(CRE)结合,调节多种基因的转录和表达,影响其蛋白质的水平和功能,从而介导 PKA 激活所引起的反应。cAMP 反应元件结合蛋白属于碱性氨基酸亮氨酸拉链转录因子家族,它有两种形式:具有转录活性的二聚体和无转录活性的单体。其 133 位的丝氨酸残基(ser133)可被 PKA 磷酸化,磷酸化后的 CREB 形成同源二聚体或与 CREB/ATF(激活转录因子 1)家族的其他成员形成异二聚体,使 CREB 活化,与 CRE 结合,调控靶基因(如 c-fos、脑啡肽、强啡肽等)的转录。

缺血缺氧性损伤可引起海马亚区不同形式的细胞死亡,表现为 CA1 区细胞凋亡,CREB 磷酸化丢失,CA3 区及齿状回颗粒细胞不发生改变,伴随 CREB 磷酸化增强并且先于细胞死亡的发生,这些证据表明 CREB 的活化对海马神经元的存活起重要作用。这种神经保护信号是在 CREB 激活后通过对转录的调控,表达即刻早期基因产物 c-fos、Bcl-2 蛋白等,以及神经营养因子来抑制神经元的凋亡和促进细胞的修复,使部分细胞在应激性损伤后得以存活^[13-15]。

Zhu 等^[16]研究发现,局灶性脑缺血可刺激成年大鼠齿状回新的神经元发生,这与转录因子 CREB 的激活及促进下游基因 BDNF 的转录有关。Nagakura 等^[17]发现,与正常大鼠相比,血管性痴呆大鼠在水迷宫训练后逃避潜伏期延长,同时相应的海马等脑区的细胞核内,PKA-Ca 和 pCREB 的含量均有所下降。因此,PKA-CREB 信号通路的激活可能是抵御缺血缺氧脑损伤的重要内在神经保护机制。

在本实验中,电针组、rTMS 组和电针 + rTMS 组各时间点神经功能评分均较模型组改善,尤以电针 + rTMS 组为明显。脑缺血后不同时相缺血侧海马 PKA、pCREB 平均灰度值,电针组、rTMS 组和电针 + rTMS 组三个时间点均高于模型组,第 7、14 天时高于正常组,第 28 天时与正常组相比差异无统计学意义,其中电针 + rTMS 组第 7、14 天时高于电针组、rTMS 组。因此,

我们认为,电针结合 rTMS 对局灶性脑缺血大鼠神经行为学的改善作用与其促进缺血侧海马 PKA-CREB 的表达密切相关,促进缺血后海马 PKA-CREB 的表达是其治疗缺血性脑卒中的重要作用机制之一。但其对下游基因转录的影响,有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 彭力,黄晓琳,韩肖华,等. 电针结合经颅磁刺激对脑缺血大鼠神经干细胞增殖和电跳台的影响. 中国中医急症,2008,17:206-208.
- [2] Bourtchuladze R, Frenguelli B, Blendy J, et al. Inefficient long-term memory in mice with a targeted mutation of the cAMP-response element binding protein. Cell,1994,79:59-68.
- [3] Deisseroth K, Bito H, Tsier RW. Signaling from synapse to nucleus postsynaptic CREB phosphorylation during multiple forms of hippocampal synaptic plasticity. Neuron, 1996, 16: 89-101.
- [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,2002,24:345-349.
- [5] Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, et al. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. Stroke,1986,17:472-476.
- [6] 邓春雷,殷克敬. 实验针灸学. 北京:人民卫生出版社,1998:143.
- [7] Kim EH, Chung JH, Kim CJ. Auricular acupuncture increases cell proliferation in the dentate gyrus of Sprague-Dawley rats. Acupunct Electrother Res,2001,26:187-194.
- [8] McAllister TW. Repetitive transcranial magnetic stimulation after acute ischemic stroke. Curr Psychiatry Rep,2005,7:369.
- [9] 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.
- [10] Khedr EM, Ahmed MA, Fathy N, et al. Therapeutic trial of repetitive transcranial magnetic stimulation after acute ischemic stroke. Neurology,2005,65:466-468.
- [11] 黄晓琳, 韩肖华. 电针结合经颅磁刺激对脑缺血大鼠 VEGF164 mRNA 和 CD31 表达的影响. 中华物理医学与康复杂志,2006,28:10-13.
- [12] Adams SR, Harootyan AT, Buechler YJ, et al. Fluorescence ratio imaging of cyclic-AMP in single cell. Nature,1991,349:694-697.
- [13] Meller R, Minami M, Cameron JA, et al. CREB-mediated Bcl-2 protein expression after ischemic preconditioning. J Cereb Blood Flow Metab, 2005,25:234-246.
- [14] Ding Y, Li J, Luan X, et al. Exercise preconditioning reduces brain damage in ischemic rats that may be associated with regional angiogenesis and cellular overexpression of neurotrophin. Neuroscience,2004,124:583-591.
- [15] Kurozumi K, Nakamura K, Tamiya T, et al. BDNF gene-modified mesenchymal stem cells promote functional recovery and reduce infarct size in the rat middle cerebral artery occlusion model. Mol Ther,2004,9:189-197.
- [16] Zhu DY, Lau L, Liu SH, et al. Activation of cAMP of cAMP-response-element-binding protein (CREB) after focal cerebral ischemia stimulates neurogenesis in the adult dentate gyrus. Proc Natl Acad Sci USA, 2004,101:9453-9457.
- [17] Nagakura A, Niimura M, Takeo S. Effects of aphosphodiesterase IV inhibitor rolipram on microsphere embolism-induced defects in memory function and cerebral cyclic AMP signal transduction system in rats. Br J Pharmacol,2002,135:1783-1793.

(收稿日期:2009-12-23)

(本文编辑:阮仕衡)