

· 基础研究 ·

电针足三里穴对应激大鼠海马 11 β -羟基类固醇脱氢酶 1 表达的影响

万顺伦 尹岭

【摘要】目的 观察应激大鼠海马 11 β -羟基类固醇脱氢酶 1(11 β -HSD1)的表达变化及电针足三里穴对海马 11 β -HSD1 的调节作用,从而探讨电针调节大鼠下丘脑-垂体-肾上腺轴的可能机制。方法 将实验大鼠随机分为对照组、束缚组及电针组。对照组大鼠不给予任何特殊处理;束缚组大鼠将其束缚在一个特制圆筒型鼠笼内,双后肢固定于圆筒外使其完全不能活动;电针组大鼠则在上述束缚应激状态下,取其双侧足三里穴给予电针刺激。采用 Western 印迹杂交法观察 3 组大鼠海马 11 β -HSD1 的变化情况。结果 束缚组大鼠海马内 11 β -HSD1 表达水平明显高于对照组水平($P < 0.05$);电针组海马内 11 β -HSD1 表达水平较束缚组进一步增加,并且持续至针刺结束后 3 h。结论 电针足三里穴能促进束缚应激大鼠海马 11 β -HSD1 蛋白表达水平增加,可能与负反馈调节 HPA 轴功能有关。

【关键词】 海马; 11 β -羟基类固醇脱氢酶 1; 足三里; 电针

The expression of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in the hippocampus of rats restrained and stressed by electroacupuncture WAN Shun-lun*, YIN Ling. * Department of Neurology, 401 Hospital of the People's Liberation Army, Qingdao 266071, China

【Abstract】 Objective To observe the expression of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1(11 β -HSD1) in the hippocampi of rats stressed by restraint, and adjustments to 11 β -HSD1 expression in response to electroacupuncture. The mechanisms of adjustment of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA) to electroacupuncture were also studied. Methods Rats were randomly divided into a control group, a group stressed by restraint and an electroacupuncture group. The rats in the control group received no treatment. The rats in the stressed group were put into a small columnar cage and their hind legs tied outside the cage. The electroacupuncture group, in addition to being restrained, received electroacupuncture at the Zusanli acupoints on both sides of their bodies. The rats were then sacrificed and their hippocampi were isolated and lysed. The expression of 11 β -HSD1 in each hippocampus were observed using the Western blotting technique. Results The levels of expression of 11 β -HSD1 in the hippocampi of the restrained group were significantly higher than those in the control group. After electroacupuncture, 11 β -HSD1 expression in the hippocampus increased further and lasted 3 h. Conclusion Electroacupuncture at the Zusanli acupoints (ST36) can increase 11 β -HSD1 expression in the hippocampus of stressed rats, and this adjustment may be related to the HPA axis' negative feedback function.

【Key words】 Hippocampus; 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1; Zusanli acupoint; Electroacupuncture

相关研究发现,机体在应激过程中其下丘脑-垂体-肾上腺轴(hypothalamic-pituitary-adrenal axis, HPA)呈现功能亢进状态;海马是抑制 HPA 轴活动、参与 HPA 轴负反馈调节的上级中枢神经组织^[1,2],海马内 11 β -羟基类固醇脱氢酶 1(11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 1, 11 β -HSD1)与 HPA 轴反馈调节密切相关^[3]。有动物实验发现,针刺足三里穴能够调节大鼠 HPA 轴异常张力,使应激后升高的皮质酮、促肾上腺皮质激素

(adrenocorticotrophic hormone, ACTH)水平下降^[4,5]。为探讨针刺调节 HPA 轴的作用机制是否与海马 11 β -HSD1 蛋白表达水平有关,本研究以束缚应激大鼠为实验模型,观察电针对大鼠海马 11 β -HSD1 蛋白表达水平的影响,从而探讨电针调节 HPA 轴的可能机制。现报道如下。

材料与方法

一、动物分组及处理

共选取 28 只雄性 Wistar 大鼠,体重(220 $\pm$ 20)g,将其随机分为对照组(4 只)、束缚组(12 只)和电针组

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2009.03.005

作者单位:266071 青岛,解放军第 401 医院神经内科(万顺伦);北京解放军总医院神经信息中心(尹岭)

(12 只)。对照组大鼠实验期间未给予任何特殊处理,束缚组大鼠则制成束缚应激模型,电针组大鼠于束缚模型制作过程中给予电针刺激。大鼠束缚应激模型制作方法如下:将实验大鼠束缚在一个特制圆筒形鼠笼(鼠笼长 15.0 cm,内径 5.5 cm)内,双后肢固定于圆筒外,使其完全不能活动。电针组大鼠电针刺激参照《实验针灸学》及比照拟人法定位取穴^[6],于上述束缚应激状态持续 3 h 后^[7],取大鼠双侧足三里穴给予电针刺激。选用 WQ1002K 型电针治疗仪,设置疏密波频率为 5~12 Hz,电刺激起始强度为 1 mA,随后每刺激 10 min 电流强度则增加 1 mA,针刺总时间为 30 min。待电针组大鼠电针治疗结束后,解除各组大鼠束缚并放置于可自由饮水、觅食及活动的鼠笼内。

二、Western 印迹杂交检测

束缚组及电针组大鼠于电针治疗结束后即刻、1 h、3 h 分别取 4 只大鼠断头处死;对照组大鼠于电针治疗结束后即刻全部处死。提取各组大鼠海马组织蛋白质进行蛋白定量分析,采用 Western 印迹杂交法^[8]检测海马组织内 11 β -HSD1 蛋白含量。

Western 印迹杂交检测操作步骤如下:将各组大鼠海马标本加入到组织裂解液(0.5 g/L)中,经匀浆后于 4℃ 环境下离心(10 000 $\times$ g) 10 min,收集上清液测定蛋白含量^[9]。各组实验大鼠蛋白样品的电泳分离及转印方法如下:取 50 μ g 蛋白质样本,经加热变性后用 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白,然后采用电转膜仪(美国 Bio-Rad 公司出品)将凝胶上蛋白质转印到硝酸纤维素膜(美国 Amersham 公司出品)上。含蛋白质标本的纤维素膜经含 10% 脱脂奶粉和 0.1% Tween-20 的 Tris 缓冲液常温封闭 2 h,然后进行免疫杂交反应。首先加入 1:1000 的兔来源 11 β -HSD1 抗体,于 4℃ 环境下孵育过夜。标本经 Tris 缓冲液(含 0.1% Tween-20)洗涤 3 次后,加入羊抗兔 IgG-HRP 抗体,抗体滴度为 1:1000,室温下孵育 1 h;再用 Tris 缓冲液(含 0.1% Tween-20)洗涤 3 次,在暗室内加入增强化学发光剂(上海普飞公司出品),压 X 线片进行曝光,以显示 11 β -HSD1 条带。待该纤维素膜显示 11 β -HSD1 条带操作结束后,用洗脱缓冲液(50℃)将其洗涤 30 min,然后用同样方法显示 β -actin 条带(β -actin 抗体为美国 Sigma 公司出品),以此作为加样内参照物。样品密度扫描采用图像分析系统(上海复日科技有限公司出品)对 X 线片上的条带密度值进行定量测定,为纠正上样量的偏差,采用 11 β -HSD1 条带密度/ β -actin 条带密度比值表示 11 β -HSD1 蛋白的相对含量水平。

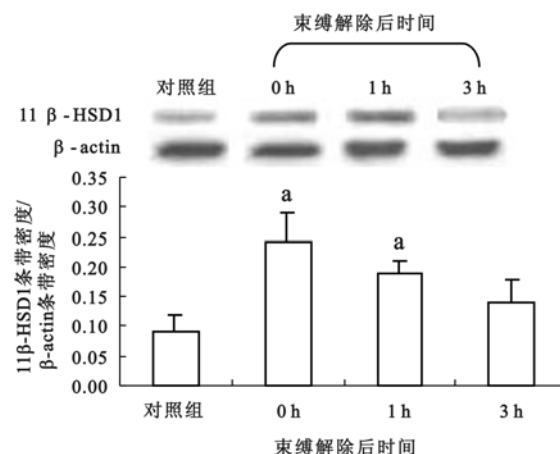
三、统计学分析

本研究各组大鼠海马标本内 11 β -HSD1 条带密度与 β -actin 条带密度比值以($\bar{x} \pm s$)表示,统计学方法选用 *t* 检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

结 果

一、束缚应激对大鼠海马 11 β -HSD1 蛋白表达的影响

Western 印迹杂交检测结果显示,束缚应激大鼠海马内 11 β -HSD1 蛋白表达水平明显增加,与对照组比较,差异具有统计学意义($P < 0.05$),其表达水平直到束缚解除后 1 h 仍显著高于对照组($P < 0.05$),具体情况详见图 1。束缚组和对照组海马内 11 β -HSD1 条带密度/ β -actin 条带密度比值分析详见表 1。



注:图内数据为 11 β -HSD1 条带密度/ β -actin 条带密度比值;与对照组比较,^a $P < 0.05$

图 1 对照组及束缚组大鼠 11 β -HSD1 条带密度/ β -actin 条带密度比值分析

表 1 束缚组与对照组大鼠海马内 11 β -HSD1 蛋白表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

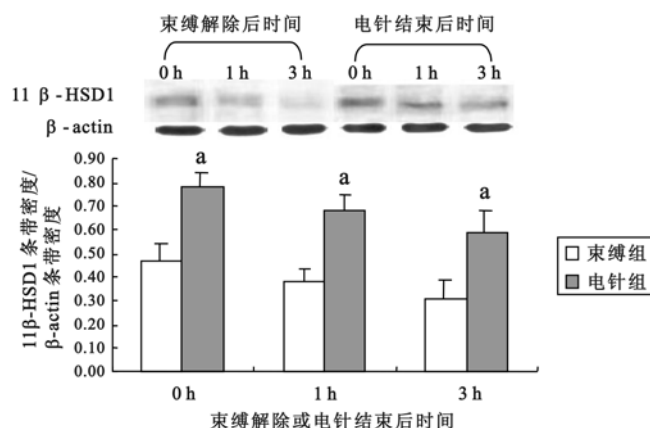
组 别	只数	海马内 11 β -HSD1 蛋白表达水平
对照组	4	0.09 $\pm$ 0.03
束缚组		
束缚解除后 0 h	4	0.24 $\pm$ 0.05 ^a
束缚解除后 1 h	4	0.19 $\pm$ 0.02 ^a
束缚解除后 3 h	4	0.14 $\pm$ 0.04

注:表内数据为 11 β -HSD1 条带密度/ β -actin 条带密度比值;与对照组比较,^a $P < 0.05$

二、电针足三里穴对束缚应激大鼠海马 11 β -HSD1 蛋白表达的调节作用

Western 印迹杂交结果显示,电针足三里穴并未下调大鼠束缚应激后海马内异常增高的 11 β -HSD1 蛋白表达,而是继续促进 11 β -HSD1 表达水平增高,直到电针治疗结束后 3 h 时仍显著高于束缚组水平($P <$

0.05),具体情况详见图2。电针组和束缚组各观察时间点海马内 11 β -HSD1 条带密度/ β -actin 条带密度比值分析结果详见表2。



注:图内数据为 11 β -HSD1 条带密度/ β -actin 条带密度比值;与束缚组比较,^a $P < 0.05$

图2 束缚组及电针组 11 β -HSD1 条带密度/ β -actin 条带密度比值分析

表2 电针组与束缚组大鼠海马内 11 β -HSD1 蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	海马内 11 β -HSD1 蛋白表达水平
束缚组		
束缚解除后 0 h	4	0.47 $\pm$ 0.07
束缚解除后 1 h	4	0.38 $\pm$ 0.06
束缚解除后 3 h	4	0.31 $\pm$ 0.08
电针组		
束缚解除后 0 h	4	0.78 $\pm$ 0.06 ^a
束缚解除后 1 h	4	0.68 $\pm$ 0.07 ^a
束缚解除后 3 h	4	0.59 $\pm$ 0.09 ^a

注:表内数据为 11 β -HSD1 条带密度/ β -actin 条带密度比值;与束缚组相应时间点比较,^a $P < 0.05$

讨 论

机体发生应激后,其 HPA 轴系统处于高张力状态,能导致肾上腺大量分泌糖皮质激素 (glucocorticoid, GC)。海马是调节 HPA 轴活动功能的上一级中枢神经组织,它能够抑制 HPA 轴活动,参与 HPA 轴的负反馈调节过程^[1,2]。海马对 HPA 轴系统的调节作用主要取决于海马组织内 GC 浓度和糖皮质激素受体 (glucocorticoid receptor, GR)、盐皮质激素受体 (mineralocorticoid receptor, MR) 相对比例。相关研究表明,人体海马内 GC 浓度受 11 β -HSD1 调节,11 β -HSD1 能将无活性的 11-脱氢皮质酮或可的松转化为有活性的皮质酮或皮质醇,从而提高机体海马组织局部 GC 水平^[2,3]。

有研究发现,敲除实验小鼠 11 β -HSD1 基因后,小

鼠 HPA 轴张力增高,导致血液内皮质酮、ACTH 基础含量增加,皮质酮高峰时间延迟,加重了机体对应激的反应程度^[10],而海马组织局部 GC 水平却显著降低^[11]。上述研究表明脑内 11 β -HSD1 能够增强 HPA 轴负反馈调节功能,有利于维持 HPA 轴稳定性^[3,10]。11 β -HSD1 在提高或维持海马组织局部 GC 浓度、保障 GC 发挥负反馈作用过程中具有重要意义,提示海马内 11 β -HSD1 能够通过影响 GC 浓度而调节 HPA 轴活动状态。

本研究结果发现,实验大鼠经束缚应激后,其海马内 11 β -HSD1 蛋白表达水平显著增高,并持续到束缚应激解除后 1 h,提示应激大鼠海马局部有较多无活性的 11-脱氢皮质酮转化为有活性的皮质酮,提高了海马局部皮质酮浓度。根据 GC 与 GR、MR 的亲合力不同,如 GC 与 MR 的亲合力是与 GR 亲和力的 10 倍,在低浓度 GC 情况下,GC 首先与海马组织内 MR 结合^[2],激活后的 MR 能参与基础水平 HPA 轴负反馈调节,形成 ACTH 和 GC 波谷期,使 HPA 轴的活动维持在一定基础水平;当 GC 浓度增加时,在激活 MR 的同时,也有大量 GR 被激活,激活的 GR 除参与 HPA 轴昼夜节律调节外,还参与负反馈调节肾上腺分泌 GC 过程 (由应激反应诱发),抑制 HPA 轴过度反应,促使应激状态下 HPA 轴功能恢复到基础水平^[1,2,12],所以在机体应激状态下,海马内 11 β -HSD1 蛋白表达增加可能就意味着激活了 GC 的负反馈调节过程。

传统中医治疗实践表明,针刺穴位可防治应激相关疾病,纠正 HPA 轴功能紊乱。据相关文献报道,针刺能够降低抑郁症患者血中异常升高的 ACTH 和皮质醇水平,促使功能亢进的 HPA 轴功能恢复正常,改善抑郁症患者神经内分泌功能及缓解抑郁状态^[13]。针刺足三里穴能下调大鼠应激后异常升高的皮质酮、ACTH 水平,能够抑制 HPA 轴亢奋功能^[5,14];但针刺调节 HPA 轴的机制是否与海马内 11 β -HSD1 的含量变化有关尚无定论。本研究结果发现,实验大鼠经束缚应激后,其海马内 11 β -HSD1 蛋白表达水平明显增高;经电针刺激足三里后,大鼠海马内异常增高的 11 β -HSD1 蛋白表达水平并未下降,而是较束缚组大鼠进一步增加,导致海马组织内有更多的 11-脱氢皮质酮转化为皮质酮,从而快速提高海马组织局部 GC 浓度,为 GC 与更多 GR 结合提供有利条件,抑制了 HPA 轴的过度亢奋反应。

综上所述,电针足三里穴能促进应激大鼠海马 11 β -HSD1 表达水平进一步上升,增加海马组织局部 GC 浓度,促进 HPA 轴负反馈调节机制产生,推测电针

促进海马 11 β -HSD1 表达可能与其调节 HPA 轴功能活动有关。

参 考 文 献

- [1] 杨权. 下丘脑-垂体-肾上腺皮质轴应激反应的中枢控制. 生理科学进展, 2000, 31: 222-226.
- [2] De Kloet ER, Vreugdenhil E, Oitzl MS, et al. Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. Endocr Rev, 1998, 19: 269-301.
- [3] 欧杨, 李启富. 11 β -HSD1 对下丘脑-腺垂体-肾上腺轴及海马的影响. 国际内分泌代谢杂志, 2006, 26: 138-140.
- [4] 严灿, 邓中炎, 王剑, 等. 调肝方药对束缚应激大鼠神经内分泌免疫功能的调节作用. 中国病理生理杂志, 2000, 16: 560-562.
- [5] 黄颖苏, 姜建伟, 吴根诚, 等. 褪黑素和电针对创伤大鼠淋巴细胞转化功能、IL-2 活性及 ACTH 水平的影响. 针刺研究, 2003, 28: 42-47.
- [6] 林文注, 主编. 实验针灸学. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 283.
- [7] Yun SJ, Park HJ, Yeom MJ, et al. Effect of electroacupuncture on the stress-induced changes in brain-derived neurotrophic factor expression in rat hippocampus. Neurosci Lett, 2002, 318: 85-88.
- [8] 万顺伦, 孙锦平, 李召峰. 应激后大鼠下丘脑 p38MAPK 的变化及

电针足三里穴的调节作用. 中华物理医学与康复杂志, 2005, 27: 202-204.

- [9] Ausubel FM, 著. 颜自颖, 王海林, 译. 精编分子生物学实验指南. 北京: 科学出版社, 1998: 332.
- [10] Harris HJ, Kotelevtsev Y, Mullins JJ, et al. Intracellular regeneration of glucocorticoids by 11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase (11 β -HSD)-1 plays a key role in regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis; analysis of 11 β -HSD-1-deficient mice. Endocrinology, 2001, 142: 114-120.
- [11] Yau JL, Noble J, Kenyon CJ, et al. Lack of tissue glucocorticoid reactivation in 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 knockout mice ameliorates age-related learning impairment. PNAS, 2001, 98: 4716-4721.
- [12] Jacobson L, Sapolsky R. The role of the hippocampus in feedback regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. Endocr Rev, 1991, 12: 118.
- [13] 刘运珠. 针灸治疗抑郁症的临床与机理研究进展. 上海针灸杂志, 2008, 27: 48-50.
- [14] 程谦, 王蕴红, 朱一力, 等. 针刺足三里对运动大鼠下丘脑-垂体-肾上腺轴的影响. 中国体育科技, 2005, 41: 23-25.

(修回日期: 2008-10-20)

(本文编辑: 易 浩)

· 短篇论著 ·

半导体激光联合运动疗法治疗膝关节骨性关节炎的疗效观察

吴秋霞

膝关节骨性关节炎(knee joint osteoarthritis, KOA)是临床常见病,据相关调查统计,55岁以上老年人群 KOA 发病率高达 44%~70%,其中约 10% 患者存在多种运动功能障碍^[1]。本病一般为间歇性发作,目前临床还不能根治该病,但通过给予 KOA 患者综合康复治疗,可在一定程度上改善患者症状^[2]。我科自 2006 年 5 月~2007 年 5 月采用半导体激光及运动疗法治疗 KOA 患者 68 例,临床疗效满意。现报道如下。

一、资料与方法

(一)一般资料

共选取经骨科门诊确诊的 KOA 患者 120 例,均符合《实用骨科学》中关于 KOA 的诊断标准^[3],并排除急、慢性化脓性关节炎,关节、滑膜结核及各种出血性疾病等。将上述患者随机分为 2 组。治疗组 68 例,男 22 例,女 46 例;年龄 43~74 岁,平均(55.8 $\pm$ 6.3)岁;病程 4 个月~10 年,平均(5.20 $\pm$ 2.35)年;左膝患病 28 例,右膝 40 例,其中有 15 例患者双膝发病;既往患膝有外伤史者 18 例。对照组 52 例,男 18 例,女 34 例;年龄 40~75 岁,平均(52.5 $\pm$ 6.6)岁;病程 2 个月~11 年,平均(5.10 $\pm$ 2.08)年;左膝患病 22 例,右膝 30 例,其中有 11 例患者双膝

发病;既往患膝有外伤史者 15 例。2 组患者一般情况及病情组间比较,差异均无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。

(二)治疗方法

治疗组患者给予综合治疗,具体操作如下:(1)半导体激光治疗,采用 SUNDOM-300I 型镱铝砷半导体激光治疗仪(北京产),激光波长 810~830 nm,输出功率 0~3000 mW 且连续可调,照射功率 1200 mW,光斑直径 10 mm,该激光治疗仪有大、小共 2 个照射头,选用大照射头(直径 10 cm)距皮肤 1 cm 处垂直照射患膝,照射强度以患处有微热感为宜,治疗时间为 10 min,每日 1 次,治疗 10 次为 1 个疗程。(2)运动疗法,主要包括:①关节松动术,以松动髌骨为主,患者取仰卧位,膝微屈,术者以双拇指抵于患者髌骨上、下、左、右缘,使髌骨向上、下、左、右各方向滑动;②牵伸治疗,患者取仰卧位,术者缓慢屈曲患膝直至患者有酸胀感,持续 5~10 s 后逐渐放松,休息 5 s 后重复该动作,共练习 5 次;休息 1 min 后对患膝进行垂直牵引,术者双手握紧患者踝关节,缓慢牵伸至受限点,持续 5 s 后放松,共进行 5 次;③肌力锻炼,如股四头肌等长和等张收缩,等张收缩时抗阻力量逐渐加大,以患者有酸胀感为度,共进行 5~10 次。(3)健康教育指导,嘱患者避免久站、久蹲、久走、穿高跟鞋、剧烈运动等,避免受凉、负重,轻者予以护膝保护,重者多卧床休息,每日坚持股四头肌锻炼,鼓励肥胖者积极减肥等。