

无热量超短波治疗对大鼠脑缺血再灌注损伤后 SPCA1 的影响

樊永梅 张长杰 彭文娜 尹婧 徐睿 胡治平

【摘要】 目的 观察无热量超短波治疗对大鼠脑细胞缺血再灌注损伤后脑梗死体积、分泌途径衍生钙离子转运 ATP 酶 (Secretory-pathway Ca^{2+} -ATPase, SPCA1) 的影响。**方法** 选取 80 只 SD 大鼠, 将大鼠分为假手术组 (8 只)、模型组 (36 只)、超短波组 (36 只)。用线栓法制备一侧大脑中动脉栓塞再灌注大鼠模型, 模型组和超短波组大鼠进行造模处理, 假手术组大鼠处理同模型组和超短波组, 但不插入线栓。模型组按照再灌注时间分为模型 1 d 组 (12 只)、模型 3 d 组 (12 只)、模型 7 d 组 (12 只), 超短波治疗组分为超短波 1 d 组 (12 只)、超短波 3 d 组 (12 只)、超短波 7 d 组 (12 只)。各亚组分别于造模后 1 d、3 d、7 d 处死取标本。用红四氮唑染色法观察并计算每组大鼠的脑梗死体积, 采用 Western blot 法检测患侧海马 SPCA1 蛋白变化。**结果** 假手术组大鼠脑切片均红染, 未见梗死灶。缺血再灌注后, 模型组和超短波组大鼠脑缺血区域出现白色梗死灶, 随着时间延长, 脑梗死体积均减小。与模型组同时点比较, 超短波组脑梗死体积均较小 ($P < 0.05$)。与假手术组比较, 除超短波 7 d 组外, 各组大鼠 SPCA1 均降低 ($P < 0.05$)。随着时间延长, 模型组和超短波组大鼠 SPCA1 增加 ($P < 0.05$)。与模型组同时点比较, 超短波 1 d 组大鼠 SPCA1 轻度增加, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 超短波 3 d 组、超短波 7 d 组大鼠 SPCA1 较模型组 3 d 组、模型组 7 d 组显著增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** 无热量超短波治疗可减小脑梗死体积, 减轻脑缺血再灌注损伤, 其机制可能是抑制了 SPCA1 表达水平下调, 从而减轻了神经细胞凋亡, 促进神经功能恢复。

【关键词】 脑缺血再灌注; 大脑中动脉栓塞; SPCA1; 高尔基体应激; 超短波

基金项目: 国家自然科学基金 (81171239)

The influence of ultra-shortwave irradiation on Ca^{2+} -ATPase expression after cerebral ischemia and reperfusion

Fan Yongmei*, Zhang Zhangjie, Peng Wenna, Ying Jing, Xu Rui, Hu Zhiping. * Department of Rehabilitation, Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011, China

Corresponding author: Hu Zhiping, Email: huzhiping2014@163.com

【Abstract】 Objective To observe the influence of ultra-shortwave (USW) irradiation on infarct volume and Ca^{2+} -ATPase (SPCA1) secretion after brain ischemia and reperfusion. **Methods** Eighty Sprague-Dawley rats were randomly divided into a sham operation group ($n = 8$), a model group ($n = 36$) and a USW group ($n = 36$). The animal model of middle cerebral artery ischemia and reperfusion (MCAO/R) was established using the suture method in the rats of the model and USW groups, while the sham operation group was given the same operation but without inserting the thread plug. One day, 3 days and 7 days after the intervention, 12 rats were sacrificed and the infarct volumes and SPCA1 protein expression were measured using 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride staining and western blotting. **Results** No white infarcted tissue was found in the sham operation group. In the model and USW groups the volume of infarcted tissue decreased with time. Significantly less infarcted volume was observed in the USW group compared to the model group at each time point. The SPCA1 levels in the brain tissue were lower than in the sham operation group after one and 3 days of USW treatment, but they were significantly lower in the model group as well. As time went by, the average SPCA1 level increased significantly in the model and USW groups. A slightly higher SPCA1 level was observed in the USW group compared to the model group after one day of treatment, but with no significance. However, significant differences were found between them after 3 and 7 days of intervention. **Conclusion** Ultra-shortwave irradiation can protect against MCAO/R injury by decreasing the infarcted volume, which may be related to down-regulation of SPCA1, minimizing nerve cell apoptosis and promoting neural functional recovery, at least in rats.

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2018.01.002

作者单位: 410011 长沙, 中南大学湘雅二医院康复科 (樊永梅、张长杰、彭文娜、尹婧、徐睿); 中南大学湘雅二医院神经内科 (胡治平)

通信作者: 胡治平, Email: huzhiping2014@163.com

【Key words】 Cerebral ischemia; Reperfusion; MCAO/R; SPCA1; Golgi apparatus stress; Ultra-short waves

Fund program: Natural Science Foundation of China (grant 81171239)

氧化应激是缺血性脑卒中后的重要病理生理机制。传统观点认为线粒体和内质网是氧化应激的主要细胞器^[1-2]。近年来一系列的研究发现高尔基体也是氧化应激所致缺血性脑损伤的重要细胞器之一,对高尔基体应激干预可能会减轻脑缺血再灌注损伤^[3]。分泌途径衍生钙离子转运 ATP 酶 (secretory pathway $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ -ATPase, SPCA1) 1 是 ATP2C1 基因编码的 P 型 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ ATP 酶,负责在细胞受到刺激后将钙离子从细胞浆转移至高尔基体,从而维持细胞内游离钙离子的稳定,对于维持细胞内钙离子稳态具有重要意义^[4]。SPCA1 特异性定位于高尔基体,可以较好地反映高尔基体氧化应激的程度和水平。有研究表明,无热量超短波治疗对大鼠脑缺血再灌注损伤具有保护作用^[5-8]。但具体机制仍不清楚,是否通过介导调节氧化应激来完成神经保护作用尚需探讨。本研究旨在探讨无热量超短波治疗对以 SPCA1 为重要参与部分的高尔基体应激的影响,进一步研究无热量超短波治疗的脑保护作用机制,为其临床应用提供理论依据。

材料与方 法

一、动物模型的制备与分组

选用湖南省人民医院实验动物中心提供的健康雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 80 只,体重 260~290 g, 2.5~3.0 月龄。参照 Longa 等^[9]报道的方法建立改良一侧大脑中动脉局灶性脑缺血再灌注模型。当造模大鼠清醒后,评定动物神经功能缺损情况:0 分,正常;1 分,对侧肢体屈曲;2 分,拖住尾巴后拉时,对侧肢体无力;3 分,拖住尾巴后拉时,向对侧转圈;4 分,自发向对侧转圈或倾倒;5 分,无任何自发活动^[9]。造模后剔除死亡及评分不足 2 分的大鼠后,将大鼠分为假手术组(8 只)、模型组(36 只)、超短波组(36 只)。模型组和超短波组大鼠进行造模处理,假手术组大鼠处理同模型组和超短波组,但不插入线栓。模型组按照再灌注时间分为模型 1 d 组(12 只)、模型 3 d 组(12 只)、模型 7 d 组(12 只),超短波治疗组分为超短波 1 d 组(12 只)、超短波 3 d 组(12 只)、超短波 7 d 组(12 只)。

二、超短波治疗

采用上海电子仪器厂生产的五官超短波治疗机,波长为 7.37 m,电流波形为脉冲式,高斯波形,频率为 40.68 MHz,最大输出功率为 40 W,调谐后第 1 档输出功率约为 11 W。电极直径 4 cm,对置于鼠脑两侧,电

极表面距鼠头皮约 10 cm。并取重物放置于其旁以起到固定作用。于脑缺血再灌注后 18 h 开始治疗,每次治疗 10 min,每日 1 次。取标本当日也进行治疗,最后 1 次治疗距取标本时间至少间隔 4 h。

三、观测指标

各亚组分别于造模后 1 d、3 d、7 d 处死取标本。用红四氮唑染色法观察并计算每组大鼠的脑梗死体积,采用 Western blot 法检测患侧海马 SPCA1 蛋白变化。

1. 计算脑梗死体积:假手术组(4 只)、模型 1 d 组(6 只)、模型 3 d 组(6 只)、模型 7 d 组(6 只)、超短波 1 d 组(6 只)、超短波 3 d 组(6 只)、超短波 7 d 组(6 只)大鼠在规定时间内被断头处死,冰皿上快速取出大脑,弃去嗅球、小脑和低位脑干,冠状切成 5 片,每片厚约 2 mm,放于 2% 的红四氮唑溶液中进行染色,染色的脑片在 37 ℃ 孵箱中孵育 30 min,梗死区呈白色,正常组织呈红色,将染色后的脑组织浸泡在 4% 多聚甲醛溶液中固定 2 h,用于脑梗死体积测定,计算脑梗死体积百分比。用数码相机拍照,输入计算机,每个脑片的梗死面积及脑缺血侧半球面积利用 Image J 软件进行分析处理,并根据公式 $V = t(A_1 + A_2 + \dots + A_n) - (A_1 + A_n)t/2$ 计算出脑梗死体积和脑缺血侧半球体积,其中 t 为切片厚度, A 为梗死面积。 $V\% = (\text{梗死体积}/\text{缺血侧半球体积}) \times 100\%$ 。

2. 采用 Western blot 检测 SPCA1 蛋白水平:将假手术组(4 只)、模型 1 d 组(6 只)、模型 3 d 组(6 只)、模型 7 d 组(6 只)、超短波 1 d 组(6 只)、超短波 3 d 组(6 只)、超短波 7 d 组(6 只)大鼠患侧海马总蛋白于 10% 十二烷基磺酸钠 (sodium dodecyl sulfate, SDS)-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE) 分离后,蛋白湿转入硝酸纤维膜上。经 5% 脱脂牛奶溶液封闭 30 min, 4% 牛血清白蛋白封闭 5 min, anti-SPCA1 抗体 4 ℃ 孵育 18 h,辣根过氧化物酶标记的二抗 37 ℃ 孵育 1 h,在化学发光溶液中显色曝光。

四、统计学处理

所有数据分析均采用 SPSS 19.0 版软件完成。实验数据以 $(\bar{x} \pm s)$ 形式表示,两组间均数比较采用 t 检验,多组间均数比较用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

结 果

一、各组大鼠的脑梗死体积比较



图 1 各组大鼠脑梗死

假手术组大鼠脑切片均红染,未见梗死灶。缺血再灌注后,模型组和超短波组大鼠脑缺血区域出现白色梗死灶,随着时间延长,脑梗死体积均减小。与模型组同时间点比较,超短波组脑梗死体积均较小,差异有统计学意义($P<0.05$)。详见表 1 和图 1。

表 1 各组大鼠脑梗死体积检测结果比较($\%, \bar{x} \pm s$)

组别	例数	脑梗死体积
假手术组	4	0.00±0.00
模型 1 d 组	6	0.39±0.05 ^a
模型 3 d 组	6	0.36±0.04 ^{ab}
模型 7 d 组	6	0.30±0.07 ^{abc}
超短波 1 d 组	6	0.25±0.04 ^{ad}
超短波 3 d 组	6	0.19±0.05 ^{abd}
超短波 7 d 组	6	0.13±0.04 ^{abcd}

注:与假手术组比较,^a $P<0.05$;与组内 1 d 比较,^b $P<0.05$;与组内 3 d 比较,^c $P<0.05$;与模型组同时间点比较,^d $P<0.05$

表 2 各组大鼠 SPCA1 蛋白检测结果比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	灰度值
假手术组	4	1.15±0.15
模型 1 d 组	6	0.28±0.06 ^a
模型 3 d 组	6	0.68±0.08 ^{ab}
模型 7 d 组	6	0.87±0.12 ^{abc}
超短波 1 d 组	6	0.30±0.10 ^a
超短波 3 d 组	6	0.79±0.19 ^{abd}
超短波 7 d 组	6	1.16±0.16 ^{bcd}

注:与假手术组比较,^a $P<0.05$;与组内 1 d 比较,^b $P<0.05$;与组内 3 d 比较,^c $P<0.05$;与模型组同时间点比较,^d $P<0.05$

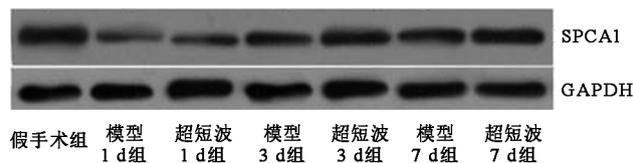


图 2 各组大鼠 SPCA1 蛋白条带图

二、各组大鼠 SPCA1 蛋白检测结果比较

与假手术组比较,除超短波 7 d 组外,各组大鼠 SPCA1 均降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。随着时间延长,模型组和超短波组大鼠 SPCA1 增加($P<0.05$)。与模型组同时间点比较,超短波 1 d 组大鼠 SPCA1 轻度增加,但差异无统计学意义($P>0.05$)。超短波 3 d 组、超短波 7 d 组大鼠 SPCA1 较模型组 3 d 组、模型组 7 d 组显著增加,差异有统计学意义($P<0.05$)。详见表 2 和图 2。

讨 论

缺血性脑卒中是常见的脑血管疾病之一,致残率和致死率较高。脑缺血后早期溶栓被认为是有效的治疗方法^[10]。但溶栓后血流再通可导致缺血再灌注损

伤。近年来,有研究探讨了高尔基体在与氧化应激相关的钙离子稳态、细胞凋亡、脂质代谢、信号转导及抗氧化等过程中的重要作用^[3]。细胞内游离钙离子是介导一系列生理过程的第二信使,过多的钙离子会干扰细胞正常代谢活动,甚至引起细胞死亡^[11-12]。为了维持稳定的细胞内游离钙离子浓度,细胞通过线粒体、内质网及高尔基体摄取钙离子,维持钙离子稳态。SPCA1 是特异性分布在高尔基体膜的钙离子泵,通过摄取细胞内的钙离子,降低细胞质钙离子浓度,对于在分泌活动中的钙离子稳态起到至关重要的作用^[13]。神经系统发育过程中,SPCA1 持续性高表达的区域如海马、皮质、小脑是对缺血较敏感的部位^[14]。有研究报道,SPCA1 有拮抗氧化应激的作用^[14-16]。氧糖剥

夺/复氧模型中存在 SPCA1 蛋白和基因表达的下降,发现转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)-Smad2/3-SPCA1 信号通路在氧糖剥夺/复氧损伤中起到重要作用^[14,17]。以上研究均提示 SPCA1 可能在高尔基体应激中起到了重要作用,通过干预高尔基体应激过程、提高 SPCA1 表达水平,可能对受损的脑组织有保护作用。

目前,治疗脑梗死的相关药物较多,非药物治疗手段也得到了广泛关注。研究表明,电磁场治疗能通过抑制炎症反应和氧化应激来达到神经保护作用^[18-22]。而超短波作为一种高频电场治疗,也能通过抗氧化应激的机制来达到减轻细胞损伤的目的^[23]。本研究结果显示,脑缺血再灌注后,作为脑组织内高尔基体应激的重要参与成分 SPCA1 表达下降,提示脑缺血后出现了高尔基体应激的激活;而无热量超短波治疗后,SPCA1 表达下调受到部分抑制,且逐渐回升,表明无热量超短波治疗可以调整高尔基体应激的过度激活。

综上所述,无热量超短波治疗能够减小脑梗死体积,减轻脑缺血再灌注损伤,其机制可能是抑制了 SPCA1 表达水平下调,抑制了过度的高尔基体应激,从而减轻了神经细胞凋亡,促进神经功能恢复。

参 考 文 献

- [1] Repnik U, Turk B. Lysosomal-mitochondrial cross-talk during cell death [J]. *Mitochondrion*, 2010, 10(6): 662-669. DOI: 10.1016/j.mito.2010.07.008.
- [2] Kurz T, Eaton JW, Brunk UT. Redox activity within the lysosomal compartment: implications for aging and apoptosis [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2010, 13(4): 511-523. DOI: 10.1089/ars.2009.3005.
- [3] Jiang Z, Hu Z, Zeng L, et al. The role of the Golgi apparatus in oxidative stress; is this organelle less significant than mitochondria [J]. *Free Radic Biol Med*, 2011, 50(8): 907-917. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.01.011.
- [4] Van Baelen K, Dode L, Wuytack F, et al. The $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ pumps in the Golgi apparatus [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1742(1-3): 103-112.
- [5] 张志强, 张立新, 苑秀华, 等. 超短波对大鼠局灶性脑缺血再灌注后大脑的保护作用 [J]. *中华物理医学与康复杂志*, 2003, 25(6): 322-324.
- [6] Zhang LX, Yuan XH, Zhang ZQ. Neural protection of ultra-high-frequency electric field after the reperfusion of cerebral ischemia in rats [J]. *Chin J Clin Rehabil*, 2004, 8(34): 7830-31.
- [7] 张立新, 张志强, 梁维娣, 等. 小剂量超短波对脑缺血再灌注损伤的保护作用的机制研究 [J]. *中华物理医学与康复杂志*, 2007, 29(10): 657-659.
- [8] 李天栋, 彭玉平. 超短波对实验性外伤性脑水肿的影响 [J]. *广东医学*, 1996, 17(4): 254-256.
- [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] 高敏, 李吕力, 韦俊杰, 等. 阿托伐他汀片对脑缺血再灌注大鼠髓鞘碱性蛋白和神经胶质纤维酸性蛋白及神经元特异性烯醇化酶的影响 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2017, 33(4): 327-329. DOI: 10.13699/j.cnki.1001-6821.2017.04.011.
- [11] Wang H, Joseph JA. Mechanism of hydrogen peroxide-induced calcium deregulation in PC12 cells [J]. *Free Radic Biol Med*, 2000, 28(8): 1222-1231. DOI: 10.1016/S0891-5849(00)00241-0.
- [12] Doan TN, Gentry DL, et al. Hydrogen peroxide activates agonist-sensitive Ca^{2+} -flux pathways in canine venous endothelial cells [J]. *Biochem J*, 1994, 297(1): 209-215.
- [13] Kienzle C, von Blume J. Secretory cargo sorting at the trans-Golgi network [J]. *Trends Cell Biol*, 2014, 24(10): 584-593. DOI: 10.1016/j.tcb.2014.04.007.
- [14] Wu L, Li HH, Wu Q, et al. The oxygen-glucose deprivation followed by reperfusion attenuates the function and expression of SPCA1- Ca^{2+} -ATPase and the underlying mechanism [J]. *J Mol Neurosci*, 2015, 56(4): 848-857.
- [15] Fan J, Hu Z, Zeng L, et al. Golgi apparatus and neurodegenerative diseases [J]. *Int J Dev Neurosci*, 2008, 26(6): 523-536. DOI: 10.1016/j.ijdevneu.2008.05.006.
- [16] Hu Z, Zeng L, Xie L, et al. Morphological alteration of Golgi apparatus and subcellular compartmentalization of TGF- β 1 in Golgi apparatus in gerbils following transient forebrain ischemia [J]. *Neurochem Res*, 2007, 32(11): 1927-1931.
- [17] Hu Z, Fan J, Zeng L, et al. Transient cerebral ischemia leads to TGF- β 2 expression in Golgi apparatus organelles [J]. *Curr Neurovasc Res*, 2008, 5(3): 178-184.
- [18] San-Juan D, Pon AA, Pohls FZ, et al. Peripheral pulsed electromagnetic fields may reduce the placebo effect in migraine patients that do not respond to the sham intervention in a randomized, placebo-controlled, double-blind, cross-over clinical trial [J]. *Complement Ther Med*, 2012, 20(1-2): 31-37. DOI: 10.1016/j.ctim.2011.09.006.
- [19] Bussel B. History of electrical stimulation in rehabilitation medicine [J]. *Ann Phys Rehabil Med*, 2015, 58(4): 198-200. DOI: 10.1016/j.rehab.2015.06.008.
- [20] Tang YH, Vital S, Russell J, et al. Interleukin-6 mediates enhanced thrombus development in cerebral arterioles following a brief period of focal brain ischemia [J]. *Exp Neurol*, 2015, 9(6): 351-357. DOI: 10.1016/j.aexpneurol.2015.06.004.
- [21] Clausen F. Exploring a new approach to treating brain injury: Anti-inflammatory effect of pulsed electromagnetic fields [J]. *Neurosci Lett*, 2012, 519(1): 1-3. DOI: 10.1016/j.neulet.2012.04.069.
- [22] Aydin B, Akar A. Effects of a 900-MHz electromagnetic field on oxidative stress parameters in rat lymphoid organs, polymorphonuclear leukocytes and plasma [J]. *Arch Med Res*, 2011, 42(4): 261-267. DOI: 10.1016/j.arcmed.2011.06.001.
- [23] Fan Y, Zhang C, Li T, et al. A new approach of short wave protection against middle cerebral artery occlusion/reperfusion injury via attenuation of golgi apparatus stress by inhibition of downregulation of secretory pathway Ca^{2+} -ATPase isoform 1 in rats [J]. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 2016, 25(7): 1813-1822. DOI: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2016.03.033.

(修回日期: 2017-11-13)

(本文编辑: 凌 琛)