

· 研究简报 ·

针刺对急性脑缺血大鼠昼夜节律蛋白 Clock 和 Bmal1 的影响

王琼¹ 李佳² 许辛寅² 周冰³¹武汉市中医医院二桥分院,武汉 430050; ²湖北中医药大学/湖北省中医院,武汉 430000;³武汉市中医医院,武汉 430000

通信作者:周冰,Email:65484745@qq.com

【摘要】 目的 探讨不同时间点针刺对急性脑缺血大鼠缺血脑区 Clock, Bmal1 的影响。方法 选取 3 月龄 SD 雌性大鼠 80 只,随机均分为正常组、模型组、6 h 针刺组和 24 h 针刺组,每组 20 只大鼠。模型组、6 h 针刺组和 24 h 针刺组采用开颅法电凝大脑中动脉复制急性脑缺血模型,6 h 针刺组和 24 h 针刺组于对应的造模成功后时间点针刺百会、足三里和关元穴。造模成功 24.5 h 后,采用改良的神经功能量表(mNSS)对 4 组大鼠进行神经功能评分。造模成功 25 h 后,4 组大鼠均拉断脊髓处死,断头取脑组织,采用 2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC)染色测定梗死面积,Western blot 法检测缺血脑组织 Clock 和 Bmal1 蛋白含量。结果 造模成功 24.5 h 后,6 h 针刺组和 24 h 针刺组大鼠的神经功能评分均显著低于模型组同时时间点,差异均有统计学意义($P < 0.05$);且 6 h 针刺组分的神经功能评分亦显著低于 24 h 针刺组同时时间点($P < 0.05$)。造模成功 25 h 后,模型组、6 h 针刺组和 24 h 针刺组的脑梗死体积显著大于正常组,模型组脑梗死体积显著大于 6 h 针刺组和 24 h 针刺组,且 6 h 针刺组脑梗死体积显著小于 24 h 针刺组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。造模 25 h 后,模型组、6 h 针刺组和 24 h 针刺组大鼠梗死区域脑组织中 Clock 和 Bmal1 蛋白的含量较正常大鼠明显减少,差异均有统计学意义($P < 0.01$);6 h 针刺组和 24 h 针刺组大鼠梗死区域脑组织中 Clock 和 Bmal1 蛋白的表达显著高于与模型组,差异均有统计学意义($P < 0.05$),且 6 h 针刺组大鼠梗死区域 Clock 和 Bmal1 蛋白的表达亦显著高于 24 h 针刺组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 针刺可以显著提高缺血脑组织 Clock 和 Bmal1 蛋白的表达,促进神经功能恢复,具有抗脑缺血损伤作用。

【关键词】 针刺疗法;脑缺血;Clock;Bmal1**基金项目:**武汉市卫生和计划生育委员会科研项目(WZ18D12);湖北省自然科学基金项目(2018CFC890)**Funding:**Scientific Research Project of Wuhan Health and Family Planning Commission(WZ18D12);Project of Natural Science Foundation of Hubei Province(2018CFC890)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2020.09.017

缺血性脑血管疾病是指颅内供应脑部的动脉血管管壁发生病理改变,使血管腔狭窄、闭塞、血流停滞,引起相应供血部位的脑组织发生缺血坏死,并出现相应的神经功能障碍的疾病。近年来,随着生活水平的不断提高,患肥胖症、高血脂、高血压及血管硬化的人群增多,脑血管疾病的发病率呈上升趋势^[1]。临床上许多脑缺血病患者由于在发病后超早期急救不及时,脑细胞在短期缺血、缺氧后形成了不可逆损伤,最终造成死亡或恢复期遗留严重后遗症。在发病后最短时间内,使用安全有效、简便易行的急救措施对脑组织进行有效的保护,将对患者的预后产生积极的影响^[2]。

急性脑缺血属中医学“中风”范畴,又称“脑卒中”。针灸治疗中风,目前仍多用于缓解期和后遗症期的治疗,但早期(病程<6 h)和急性期(病程<24 h)运用较少。已有研究表明^[3],针刺对急性缺血性脑损伤有保护作用,可以增加脑血流量、抑制细胞凋亡等。近年来关于生物钟的研究已成为热点,时钟蛋白在脑缺血损伤中的作用也逐渐被人们熟悉,其中 Clock 和 Bmal1 蛋白是形成机体昼夜节律必不可少的,而针刺对其调节作用仍不甚明了。因此,基于昼夜节律蛋白研究针刺早期介入的作用机制具有重要意义。本课题组前期通过 micro PET^[4]观察到早

期针刺对脑缺血葡萄糖代谢有较好的调节作用,并且发现,针刺可有效地调节脑缺血大鼠缺血侧皮质区域葡萄糖转运蛋白 1 和葡萄糖转运蛋白 3 的表达^[5]、显著降低血液和缺血脑组织白介素 IL-1 β 、IL-6 和 IL-8 含量,其作用机制可能与 SIRT1/NF- κ B 通路调节有关^[6]。本研究旨在观察脑缺血区域昼夜节律蛋白 Clock 和 Bmal1 的变化以及针刺对其表达的影响,试图探讨针刺抗脑缺血神经损伤的作用机制,以为临床应用提供科学的实验依据。

材料和方法

一、实验动物

选用 3 月龄无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级雌性 Sprague-Dawley(SD)大鼠 80 只,体重 200~220 g,由湖北省医学科学院实验动物中心提供,动物合格证号:SCXK(鄂)2015-0018 号。动物可自由摄食和饮水,饲养环境温度 21~25℃,湿度 40%~60%,光照时间每日 12 h。实验严格遵守科技部[2006]398 号文件《关于善待实验动物的指导性意见》的要求。

二、主要仪器与试剂

0.30 mm×13 mm 华佗牌毫针(苏州医疗器械厂);微型电钻

(深圳恒达电子设备有限公司); Axiovert 40CFL 显微镜(德国 ZWISS 公司); HMIAS-2000 高清晰度彩色医学图文分析系统(武汉千屏影像技术有限公司); 2,3,5-三苯基氯化四氮唑(2,3,5-triphenyltetrazolium chloride, TTC) 染色液(日本 Sigma 公司); Clock (C-8) 抗体(美国 Santa Cruz 公司); Bmal1 (B-1) 抗体(美国 Santa Cruz 公司); Bio-Rad 化学发光成像系统(美国 Bio-Rad 公司)、Bio-Rad 电泳仪(Power Pac TMHC, 美国 Bio-Rad 公司)、转膜仪(美国 Bio-Rad 公司); 手术器械包(包括手术刀、止血钳、无菌镊、眼科剪、直剪、弯剪等)。

三、动物分组和干预方法

按随机数字表法将 80 只大鼠分为正常组、模型组、6 h 针刺组和 24 h 针刺组, 每组 20 只大鼠。模型组、6 h 针刺组和 24 h 针刺组均制作大鼠脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型, 正常组常规饲养。模型组、6 h 针刺组和 24 h 针刺组大鼠均于造模成功后 25 h 取材, 正常组也于同时间点取材。

四、急性脑缺血模型的制作方法

模型组、6 h 针刺组和 24 h 针刺组参照 Bederson^[7] 和 Bai^[8] 的方法, 采用微创开颅法制作 MCAO 模型, 造模完成后, 待大鼠自然苏醒, 采用平衡木法^[9] 和 Zea-Longa 的 5 级评分法^[10] 判断大鼠造模是否成功。本研究仅选择 Zea-Longa 的 5 级评分法 ≥ 1 级的存活大鼠作为实验对象, 即 Zea-Longa 评分 ≥ 1 级则造模成功。评分后将造模成功的大鼠放回笼中继续饲养(本研究中所有造模大鼠均造模成功)。

五、针刺治疗方法

6 h 针刺组和 24 h 针刺组于对应的时间点(6 h 针刺组于造模成功 6 h 后, 24 h 针刺组于造模成功 24 h 后)参照《实验针灸学》中的大鼠穴位进行定位, 经 4% 水合氯醛麻醉(1 ml/100 mg 体重)后, 取“百会”、“足三里”和“关元”穴进行针刺。“百会”取穴在顶骨正中, 向前沿皮刺 0.5~1.0 cm; “关元”位于大鼠肚脐下约 25 mm 处, 耻骨联合上约 15 mm 处, 脐与耻骨联合上缘连线上 3/5 折点处, 直刺 0.5~1.0 cm; “足三里”穴位于膝关节下外侧, 腓骨小头下方约 5 mm 处, 直刺 0.5~1.0 cm。采用平补平泻针法进行捻转, 每 5 min 针刺 1 次, 每次 1 min, 每分钟捻转 120 次, 共针刺 30 min。

六、造模后动物筛选及神经功能评分

4 组大鼠均于造模成功后即刻和造模成功 24.5 h 后采用改良的神经能量表(modified neurological severity score, mNSS)评估其神经功能^[11], 该量表包括运动试验、感觉试验、平衡木试验、反射丧失、不正常运动、癫痫、肌阵挛、肌张力障碍等 9 项, 总分 18 分, 得分越高则神经功能越差。

七、脑梗死体积测定

造模成功 25 h 后, 4 组大鼠均按随机数字表法选取 10 只, 经水合氯醛麻醉后迅速开胸暴露心脏, 先用 4 ℃ 生理盐水 250 ml 快速冲管, 以清除血液, 然后迅速断头取脑, 放入装有生理盐水的烧杯中, 冰箱冷藏 10 min 后放入脑垫内, 冠状切片连续切取 6 片, 每片厚 2 mm, 将脑片置于 2% TTC 染色液中, 于 37 ℃ 孵育 30 min, 正常组织染色为玫瑰红色, 坏死组织为白色。然后将脑片置于新鲜配制的 10% 甲醛溶液中固定 24 h 以上, 避光保存。将固定好的脑片按切片顺序排列, 数码相机拍照后输入计算机, 用数字彩色显微图像分析系统计算每一脑片正常侧和缺血侧脑半球 TTC 红染(未缺血面积), 两者相减得到校正后

的缺血面积, 将每一脑片的缺血面积乘以厚度(2 mm), 再将各脑片数值相加后得到脑梗死灶体积的近似值。

八、Western blot 方法

造模成功 25 h 后, 将 4 组大鼠各剩余的 10 只大鼠按照上述方法取脑后切取左侧梗死区域脑组织, 液氮研磨制备脑组织匀浆提取蛋白并测定浓度后, 行聚丙烯酰胺凝胶电泳。结果行计算机扫描, 用图像分析系统, 测定目的条带 Clock 和 Bmal1 与内参 β -actin 的光密度值(optical density, OD), 并取两者的比值作半定量分析。

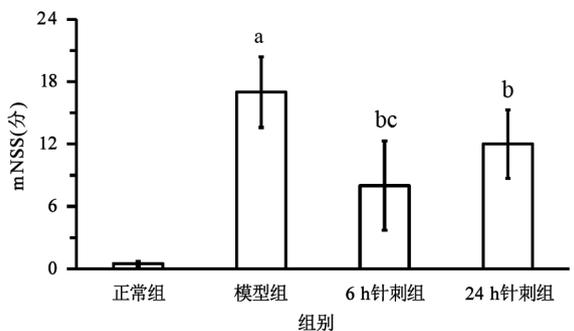
九、统计学方法

采用 SPSS 20.0 版统计进行数据分析, 计量数据以($\bar{x} \pm s$)表示, 符合正态分布用方差和 *t* 检验分析, 非正态分布数据用 Mann Whitney U 检验, 率的显著性比较采用 χ^2 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、4 组大鼠神经功能评分比较

模型组、6 h 针刺组和 24 h 针刺组造模成功后即刻的神经功能评分均显著高于正常组, 差异均有统计学意义($P < 0.01$); 造模成功 24.5 h 后, 6 h 针刺组和 24 h 针刺组大鼠的神经功能评分均显著低于模型组同时时间点, 差异均有统计学意义($P < 0.05$); 且 6 h 针刺组分的神经功能评分亦显著低于 24 h 针刺组同时时间点($P < 0.05$), 详见图 1。



注: 与正常组比较, $^a P < 0.01$; 与模型组比较, $^b P < 0.05$; 与 24 h 针刺组比较, $^c P < 0.05$

图 1 造模成功 24.5 h 后 4 组大鼠 mNSS 评分比较

二、4 组大鼠脑梗死体积的比较

造模成功 25 h 后, 模型组、6 h 针刺组和 24 h 针刺组左侧大脑半球肿胀, 体积明显大于对侧。经 TTC 染色后, 左侧大脑半球背外侧面 MCAO 供血区出现一类似椭圆形的苍白色损伤灶, 其范围主要包括额、顶、颞叶皮质, 部分有基底节区和丘脑区。造模成功 25 h 后, 模型组、6 h 针刺组和 24 h 针刺组的脑梗死体积显著大于正常组, 模型组脑梗死体积显著大于 6 h 针刺组和 24 h 针刺组, 且 6 h 针刺组脑梗死体积显著小于 24 h 针刺组, 差异均有统计学意义($P < 0.05$), 详见图 2。

三、4 组大鼠梗死区域脑组织中 Clock 和 Bmal1 蛋白含量的比较

造模 25 h 后, 模型组、6 h 针刺组和 24 h 针刺组大鼠梗死区域脑组织中 Clock 和 Bmal1 蛋白的含量较正常大鼠明显减少, 差异均有统计学意义($P < 0.01$); 6 h 针刺组和 24 h 针刺组大鼠梗死区域脑组织中 Clock 和 Bmal1 蛋白的表达显著高于与

模型组,差异均有统计学意义($P<0.05$),且 6 h 针刺组大鼠梗死区域 Clock 和 Bmal1 蛋白的表达亦显著高于 24 h 针刺组,差异有统计学意义($P<0.05$),详见图 3。

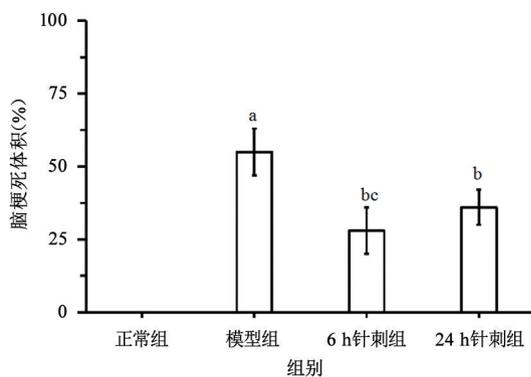
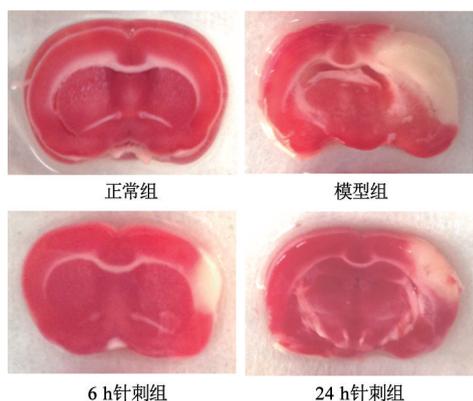
讨 论

本研究结果表明,针刺可显著提高缺血脑组织 Clock 和 Bmal1 蛋白的表达,从而促进神经功能恢复,发挥抗脑缺血损伤作用。该结果提示,针刺强壮穴可有效地降低脑缺血损伤,并且早期针刺更有利于改善缺血脑区损伤效应。

为研究针刺抗脑缺血脑损伤的作用机制,本课题组采用针刺干预急性脑缺血模型,通过对比观察大鼠日常生活状况,发现大鼠 MCAO 造模成功后,行为学改变较为明显(大鼠精神状态较差,萎靡不振,其毛色呈淡黄而无光泽,易受惊吓);同时,由于左侧大脑中动脉凝断后左侧脑区供血不足,可导致右侧偏

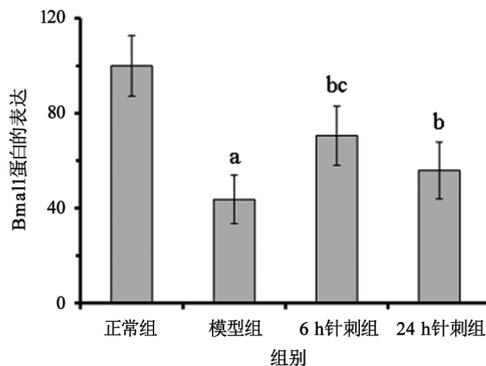
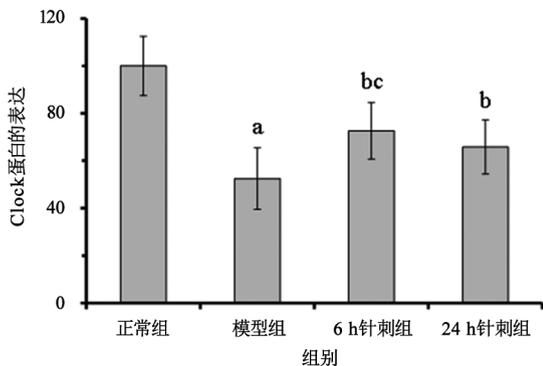
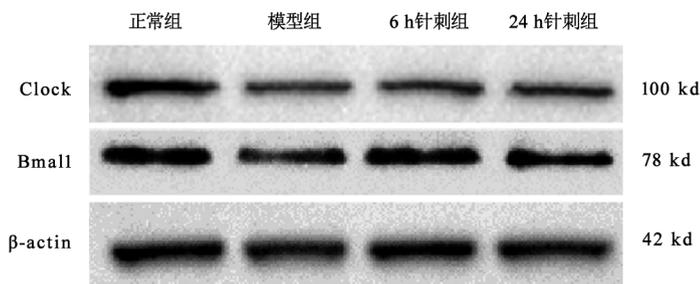
瘫和偏身感觉障碍,行走时右侧肌力明显较弱,神经功能缺失,其功能评分分值较高。6 h 针刺组和 24 h 针刺组大鼠通过对应时间点的针刺干预后,其神经功能获得较好的改善,大鼠一般状态获得一定程度的恢复,神经功能评分均优于模型组大鼠。本研究还发现,2 组针刺组的治疗结果有明显差异,6 h 针刺组的疗效显著优于 24 h 针刺组,说明早期针刺干预可有效地改善急性脑缺血引起的神经功能损伤,这与近年来根据“治疗时间窗”概念提出的早期治疗不谋而合。

有研究认为,在 6 h 内治疗的抢救称为“超早期治疗”,而在 6 h 之后的早期治疗属于抢救“缺血半暗带”的治疗^[12]。一般来说,脑缺血再灌注窗为脑缺血发病后 3~4 h,最迟不超过 6 h。有动物实验发现^[13],再灌注之前应用神经保护疗法,可使再灌注时间窗延长,有利于脑缺血的恢复。临床超早期(损伤 6 h 内)干预,其目的是在有效的治疗时间窗内,阻止缺血半暗



注:与正常组比较,^a $P<0.01$;与模型组比较,^b $P<0.05$;与24 h 针刺组比较,^c $P<0.05$

图 2 4 组大鼠脑梗死体积比较



注:与正常组比较,^a $P<0.01$;与模型组比较,^b $P<0.05$;与24 h 针刺组比较,^c $P<0.05$

图 3 4 组大鼠梗死区域脑组织中 Clock 和 Bmal1 蛋白含量的比较

区可存活组织发生进一步不可逆损害。相关研究也提示,在脑缺血 6 h 之前给予针刺,其干预治疗更有效,醒脑开窍针刺法可明显减少脑缺血区域神经细胞内的钙超载,从而抑制钙超载所引起的一系列病理反应,减轻神经细胞的损害,切断钙离子信号转导的重要环节,进而缩小缺血半暗区的范围,达到挽救濒临死亡脑组织的目的^[14]。本研究为了进一步证实早期针刺对脑缺血大鼠脑梗死区域的改善作用,借助 TTC 染色方法确定了脑梗死区域范围,从而发现,早期针刺可有效地降低脑缺血梗死体积,保护急性脑缺血损伤,即在脑缺血疾病发生后治疗越早,效果越好。

自然界生物体普遍存在昼夜节律变化,昼夜节律能够通过重置自己的节律适应不断变化的环境。研究发现生物钟对昼夜节律变化有着控制作用^[15],机体生物钟系统包括中枢钟(母钟)与外周生物钟(子钟),而中枢钟是关键。生物钟是由各种起调控作用的信号分子和自动调节反馈生理活动的各种回路共同作用形成的。目前已发现的调节昼夜节律的生物钟基因有十余种^[16],而正反馈环路作用机制是由 Clock 基因以及 Bmal1 形成 Clock-Bmal1 异二聚体,该复合体也是哺乳动物昼夜节律核心负反馈环中调控时钟基因转录的关键元件。有研究认为^[17],脑缺血损伤状态下,生物体的昼夜节律发生紊乱,失去其原有节律。在分子水平,时钟基因的转录水平、翻译后修饰水平的正常节律会发生变化,而这些变化又会进一步引起病理性变化,其中以 Clock 和 Bmal1 调控最为突出。本研究通过检测缺血区域脑组织的 Clock、Bmal1 蛋白表达发现,造模大鼠与正常组大鼠相比,左侧脑梗死区域中 Clock、Bmal1 二者呈现出明显降低的表达趋势,这种现象从正面证实了 Clock、Bmal1 二者共同调节的紧密联系,共同在脑缺血损伤病理过程中发挥重要作用。同时,与模型组大鼠相比,6 h 针刺组与 24 h 针刺组大鼠 Clock、Bmal1 蛋白的表达水平均被统一上调,针刺的干预对二者表达水平的影响进一步反映了 Clock 和 Bmal1 之间的高度相关性。并且,6 h 针刺组与 24 h 针刺组相比,在脑缺血炎症反应的早期对 Clock、Bmal1 蛋白的调节具有更明显的抑制优势,也证实了早期针刺治疗的优势。

综上所述,针刺治疗可以上调缺血脑组织中 Clock、Bmal1 蛋白的表达水平,其机制可能是针刺治疗可通过调节机体生物钟功能介导的脑缺血损伤,从而发挥对脑缺血神经功能恢复的作用。此外,由于实验条件的限制,本课题的研究仍存在很多的不足之处,如实验样本量过小,实验结果可能存在一定的偏差;实验的检测项目也只检测了 Clock、Bmal1 蛋白,无法全面反映脑缺血后针刺干预对生物钟其他相关指标影响的变化。本课题组拟在后期的研究中进一步深入探索,以求寻找到更多的实验依据。

参 考 文 献

[1] 高培毅.从国家发展规划看脑血管病影像学研究面临的任务与挑战[J].中华老年心脑血管病杂志,2010,12(8):673-675. DOI:10.3969/j.issn.1009-0126.2010.08.001.

[2] 黄伟.超早期针刺对急性脑缺血大鼠能量代谢的影响及其机制研究[D].武汉:湖北中医药大学,2010.

[3] 武晓娜,倪金霞,李苗苗,等.针刺对缺血性卒中神经组织凋亡与重塑的影响[J].环球中医药,2018,11(5):787-791. DOI:10.3969/

j.issn.1674-1749.2018.05.045.

[4] Liu HF, Shen XY, Tang HT, et al. Using MicroPET imaging in quantitative verification of the acupuncture effect in ischemia stroke treatment[J].Sci Rep,2013;3:1070. DOI:10.1038/srep01070.

[5] 黄伟,姜功道,李佳,等.超早期针刺百会、水沟对急性脑缺血大鼠 GLUT1、GLUT3 的影响[J].中国中医急症,2014(1):51-53. DOI:10.3969/j.issn.1004-745X.2014.01.024.

[6] 黄伟,李佳,朱广.针刺百会、人中穴对急性脑缺血大鼠模型 NF-κB/IκB-α 的影响[J].中华中医药杂志,2017,32(1):298-302.

[7] Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, et al. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination[J].Stroke,1986,17(3):472-476.

[8] Bai X, Zhang X, Chen L, et al. Protective effect of naringenin in experimental ischemic stroke: down-regulated NOD2, RIP2, NF-κB, MMP-9 and up-regulated claudin-5 expression [J].Neurochem Res,2014,39(8):1405-1415. DOI:10.1007/s11064-014-1326-y.

[9] Chen CC, Chang MW, Chang CP, et al. A forced running wheel system with a microcontroller that provides high-intensity exercise training in an animal ischemic stroke model[J].Braz J Med Biol Res,2014,47(10):858-868. DOI:10.1590/1414-431x20143754.

[10] 张玉莲.电针对脑缺血大鼠 TLR2/NF-κB 信号通路影响的研究[D].成都:成都中医药大学,2017.

[11] 张昆南,曹金娟,刘世民,等.大鼠脑梗死后脑组织 TNF-α、GFAP、NSE、BDNF、Nestin 的表达和神经功能变化[J].中国神经免疫学和神经病学杂志,2013,20(5):305-310. DOI:10.3969/j.issn.1006-2963.2013.05.001.

[12] 黄伟,刘建民,李佳,等.超早期针刺百会、水沟对急性脑缺血大鼠能量代谢的影响[J].中国中医急症,2013,22(12):2022-2024+2063. DOI:10.3969/j.issn.1004-745X.2013.12.014.

[13] 刘怀军,杨冀萍,刘瑞春,等.神经生长因子和血管内皮生长因子联合应用对兔局灶性脑缺血再灌注损伤神经元的保护时间窗[J].中国组织工程研究,2006,10(21):66-70. DOI:10.3321/j.issn:1673-8225.2006.21.026.

[14] 王德敬,景政,辛铭金,等.电针对大鼠脑缺血 6h 及再灌注损伤时活体海马[Ca²⁺]_i 的实验研究[J].四川中医,2009,27(08):27-29.

[15] Roenneberg T, Merrow M. The circadian clock and human health[J].Curr Biol,2016,26(10):R432-443. DOI:10.1016/j.cub.2016.04.011.

[16] Walker WH 2nd, Walton JC, DeVries AC, Nelson RJ. Circadian rhythm disruption and mental health[J].Transl Psychiatry,2020,10(1):28. DOI:10.1038/s41398-020-0694-0.

[17] Stubblefield JJ, Lechleiter JD. Time to target stroke: examining the circadian system in stroke[J].Yale J Biol Med,2019,92(2):349-357.

[18] 金明月,李政,刘松雨,等.早期针刺康复治疗中风病 425 例疗效观察[J].针灸临床杂志,2003(11):12-13+59. DOI:10.3969/j.issn.1005-0779.2003.11.009.

[19] 江一静,林志诚,郑美,等.针刺曲池、足三里对脑缺血大鼠行为学、超微结构及 TGF-β1 蛋白的影响[J].世界中医药,2018,13(05):1208-1212. DOI:10.3969/j.issn.1673-7202.2018.05.040.

[20] 邓容.电针任督脉对脑缺血再灌注大鼠炎症反应的影响[D].广州:广州中医药大学,2016.

(修回日期:2020-08-22)

(本文编辑:阮仕衡)