

## · 基础研究 ·

## 电针曲池穴及足三里穴对脑缺血再灌注损伤大鼠神经细胞线粒体凋亡途径的影响

游咏梅 薛偕华 陶静 杨珊莉 叶晓倩 江一静 吴雅吟 江欣

**【摘要】目的** 观察电针干预对脑缺血再灌注损伤大鼠神经细胞线粒体凋亡途径的影响。**方法** 选取 SD 大鼠 60 只,按照随机数字表法将其分为假手术组、模型组和电针组,每组 20 只。模型组、电针组大鼠采用 Zea Longa 线栓法制备大脑中动脉闭塞(MCAO)模型,缺血 2 h 后,再灌注 3 d。模型组与电针组各有 18 只大鼠造模成功。术后 2 h,在电针组大鼠“曲池”、“足三里”穴进行电针治疗,假手术组及模型组不作特殊干预。采用 Zea Longa 5 分评价法观察大鼠神经功能缺损的恢复程度;用 2,3,5-氯化三苯基四氮唑染色,计算脑梗死体积;应用 TUNEL 试剂盒检测皮质缺血周围神经细胞的凋亡情况;采用 Western blot 法、免疫组织化学法和逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)检测脑组织中 B 淋巴细胞瘤-2 基因(Bcl-2)、Bax 蛋白、胱天蛋白酶(caspase)的表达水平。**结果** 与组内术后 2 h、1 d 及 2 d 比较,模型组[(1.67±0.58)分]、电针组[(1.14±0.37)分]术后 3 d 时的神经功能缺损评分较低( $P<0.05$ )。与假手术组同时点比较,模型组、电针组大鼠术后 2 h、1 d、2 d 及 3 d 的神经功能缺损评分均较高,电针组术后 2 d 及 3 d 神经功能缺损评分低于模型组( $P<0.05$ )。术后 3 d,电针组大鼠脑梗死体积百分比明显减小( $P<0.05$ )。假手术组、模型组、电针组大鼠大脑皮质缺血半暗带区神经细胞的凋亡百分比分别为(1.07±0.02)%、(39.4±10.1)%、(15.1±4.2)%。与模型组比较,电针组凋亡细胞数量百分比明显较低( $P<0.05$ )。术后 3 d,模型组大鼠大脑皮质 Bcl-2 蛋白(0.11±0.02)、mRNA 的相对含量(0.13±0.04)较假手术组明显下降( $P<0.05$ ),与模型组比较,电针组 Bcl-2 蛋白(0.36±0.11)、mRNA 的相对含量(0.41±0.15)较高( $P<0.05$ )。术后 3 d,模型组、电针组大鼠大脑皮质 Bax 蛋白、mRNA 的相对含量均高于假手术组( $P<0.05$ ),与模型组比较,电针组大鼠大脑皮质 Bax 蛋白(0.51±0.14)、mRNA 的相对含量(0.37±0.13)较高( $P<0.05$ )。术后 3 d,电针组活化型胱天蛋白酶-3(cleaved caspase-3)免疫阳性细胞明显少于模型组,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。**结论** 电针刺激“曲池”及“足三里”穴对脑缺血再灌注损伤大鼠的神经细胞具有保护作用,其机制可能与调控线粒体凋亡途径蛋白的表达水平有关。

**【关键词】** 电针; 脑缺血再灌注; 神经保护; 线粒体凋亡

**Effect of electroacupuncture at Quchi and Zusanli acupoints on the regulation of neuronal mitochondrial apoptosis pathway in rats with cerebral ischemia-reperfusion injury** You Yongmei\*, Xue Xiehua, Tao Jing, Yang Shanli, Ye Xiaoqian, Jiang Yijing, Wu Yayin, Jiang Xin. \* College of Rehabilitation Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350108, China

Corresponding author: Xue Xiehua, Email: xuexiehua@yahoo.com.cn

**【Abstract】 Objective** To investigate the effects of electroacupuncture (EA) at Quchi (LI11) and Zusanli (ST36) on the regulations of neuronal mitochondrial apoptosis pathway in rats with cerebral ischemia-reperfusion (IR) injury. **Methods** Sixty male adult Sprague-Dawley rats were randomly and evenly divided into three groups: a sham control group (SC), an ischemia control group (IC), and an electroacupuncture group (EA), with 20 rats in each group. After 2 h of ischemia caused by middle cerebral artery occlusion (MCAO) followed by 3 d of reperfusion, IR model was established in IC group and EA group. Finally, there were 18 successful model rats in IC and EA groups, respectively. Rats in EA group received EA at Quchi and Zusanli acupoints beginning at 24 h after MCAO. Neurological deficit induced by IR injury were assessed by using Zea Longa method. The infarct volume was determined at 3 days after IR injury using TTC staining. Apoptotic cells in the cerebral cortex were quantified under confocal fluorescence microscope using TUNEL staining. The expressions of Bcl-2 and Bax were assessed by Western blotting and RT-PCR. Cleaved caspase-3-positive cells at ischemic penumbra of cerebral cortex were detected through im-

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2014.010.003

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金项目(81102628);国家自然科学基金项目(81273835)

作者单位:350108 福州,福建中医药大学康复医学院(游咏梅、叶晓倩、江一静、吴雅吟、江欣);福建中医药大学附属康复医院(薛偕华、陶静、杨珊莉)

通信作者:薛偕华,Email: xuexiehua@yahoo.com.cn

munohistochemistry method. **Results** Comparison in the group showed that at the time of 3 d postoperation neurological deficit scores of IC group ( $1.67 \pm 0.58$ ) and EA group ( $1.14 \pm 0.37$ ) were lower than at the time of 2 h, 1 d and 2 d postoperation ( $P < 0.05$ ). EA group scored significantly lower than IC group in terms of neurological deficit at the time of 2 d and 3 d postoperation ( $P < 0.05$ ). At 3 d postoperation, infarct volume of EA group reduced significantly ( $P < 0.05$ ). In SC, IC and EA group apoptotic nerve cells percentage were ( $1.07 \pm 0.02$ )%, ( $39.4 \pm 10.1$ )%, ( $15.1 \pm 4.2$ )%, respectively. Compared with IC group, the number of apoptotic nerve cells reduced greatly in EA group ( $P < 0.05$ ). The expressions of Bcl-2 at the protein and mRNA levels in IC and EA groups were lower than SC group ( $P < 0.05$ ), however those in EA group were higher than those in IC group ( $P < 0.05$ ). On the contrary, the expressions of Bax at protein and mRNA levels in IC and EA groups were higher than that in SC group ( $P < 0.05$ ). Compared with IC group the Bax expression was inhibited in EA group ( $P < 0.05$ ). Moreover, the number of cleaved caspase-3-positive cells in EA group decreased significantly compared with IC group ( $P < 0.05$ ).

**Conclusions** EA treatment at acupoints of Zusanli (ST36) and Quchi (LI11) exerted the neuroprotective effect on the cerebral IR injury through the modulation of related factor of mitochondrial apoptosis pathway.

**【Key words】** Electroacupuncture; Cerebral ischemia-reperfusion; Neuroprotection; Mitochondrial apoptosis

脑血管疾病是导致全球人口死亡的三大原因之一,其中,缺血性脑血管疾病是较为常见的类型,占脑卒中的 70%~80%。细胞凋亡又被称为程序性细胞死亡,是细胞在某些生理或病理条件下发生有序的、主动性的非炎症性死亡。研究表明,脑缺血再灌注可导致缺血区及周边区域神经细胞的坏死和凋亡<sup>[1]</sup>。目前,研究普遍认为介导哺乳动物体内细胞凋亡的途径有 2 条,分别是由细胞表面死亡受体介导的“外源性途径”和由线粒体介导的“内源性途径”。研究表明,B 淋巴细胞瘤-2 基因(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)与胱天蛋白酶(caspase)家族共同参与了细胞凋亡中的“内源性途径”。Bcl-2 家族基因在调节线粒体通透性上发挥着重要作用,若其水平下调和促凋亡 Bcl-2 家族成员过度表达或构象改变,将会使线粒体的通透性增加;线粒体膜结构改变会导致其内外膜之间的细胞色素 C 向胞浆释放,与凋亡蛋白酶活化因子-1 形成复合体,从而与胞浆中的 caspase-9 前体结合成凋亡小体,导致 caspase-9 被裂解激活,随后再激活 caspase 家族,导致细胞凋亡<sup>[2]</sup>。有研究证实,电针“曲池”、“足三里”穴能有效改善大鼠的脑缺血再灌注损伤,发挥脑保护作用,但其机制尚未完全阐明<sup>[3,4]</sup>。本研究采用电针刺激大鼠“曲池”、“足三里”穴,观察其对大鼠脑缺血再灌注损伤后线粒体凋亡蛋白 Bcl-2、Bax、活化型胱天蛋白酶-3 (cleaved caspase-3) 表达水平的影响,旨在探讨电针刺激“曲池”、“足三里”穴对缺血性脑损伤的神经保护机制。

## 材料与方法

### 一、实验动物

选取清洁级健康雄性 Sprague-Dawley 大鼠 60 只,体重( $300 \pm 20$ )g,由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供,动物使用许可证号:SCXK(沪)2007-0005。研究过程中,给予大鼠自由进食、自由光照。研究经福建

中医药大学动物使用管理委员会批准同意,动物处理严格按照国家科技部颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》中的动物伦理学标准进行。

### 二、主要试剂及仪器

2,3,5-氯化三苯基四氮唑染液(美国 Sigma 公司)、TUNEL 试剂盒及逆转录试剂盒(美国 Promega 公司)、4',6-二脒基-2-苯基吡啶(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)染液(美国 CST 公司)、苯甲基磺酰氟(pheylmethylsulfonyl fluoride, PMSF)及聚丙烯酰胺凝胶(中国碧云天公司)、Trizol 试剂(美国 Invitrogen 公司)。G6805 型电针仪购于中国上海,高速冷冻离心机、激光共聚焦荧光显微镜、转膜仪、凝胶成像系统及聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增仪购于美国,切片机、酶标仪、脱色摇床及电子分析天平购于德国。

### 三、造模与分组

按照随机数字表法将大鼠分为假手术组、模型组和电针组,每组 20 只。参照 Zea Longa 方法<sup>[5]</sup>,对模型组、电针组大鼠行左侧大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)术。术前所有大鼠禁食、不禁水 12 h。大鼠经 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉( $3 \text{ ml/kg}$ ),在室温  $24^\circ\text{C}$  的条件下,仰卧固定大鼠,颈前正中切开皮肤,钝性分离并暴露左侧颈总动脉、颈外动脉、颈内动脉。在颈总动脉分叉处结扎颈外动脉,用动脉夹夹闭颈总动脉的近心端及颈内动脉的远心端。用血管剪在靠近颈总动脉分叉处剪一小口,将涂有石蜡的鱼线沿切口插入颈总动脉(直径  $0.3 \text{ mm}$ ),移去颈内动脉远心端的动脉夹,并缓慢将鱼线向颈内动脉推入约  $20 \sim 22 \text{ mm}$ ,微感阻力时停止,将伤口缝合。于缺血 2 h 后拔出栓线,完成缺血再灌注模型。假手术组只分离左侧颈部动脉,不结扎、插线。手术结束后,动物放于室温( $24^\circ\text{C}$ )环境

下苏醒,苏醒后给予正常喂养。动物苏醒后通过观察其体态及行为,以判断脑缺血再灌注模型是否成功。模型组与电针组各有 18 只大鼠造模成功,成功率为 90%,其中造模过程中死亡 2 只,剔除神经行为学评分 4 分和 0 分各 1 只。

#### 四、电针干预

术后 2 h,参照《实验针灸学》中的定位方法<sup>[6]</sup>,取电针组大鼠右侧肢体“曲池”、“足三里”穴作为电针刺激穴位。采用 0.30 mm × 25.00 mm 的 G6805 型不锈钢针(中国苏州产),直刺穴位 2 ~ 3 mm。适当提插捻转后,通以电针仪,电针刺激参数:疏密波,频率 1 ~ 20 Hz,电流 1 ~ 3 mA,刺激强度以针刺局部轻微抖动为度。术后每隔 24 h 治疗 1 次,治疗时间 30 min,3 d 后将动物处死。假手术组及模型组不作特殊干预。

#### 五、神经行为学评分

术后 2 h、1 d、2 d、3 d,由 1 名对研究不知情的观察者按照 Zea Longa 5 分评价法<sup>[5]</sup>对大鼠的神经功能缺损程度进行评估。评价标准为:无神经功能缺损,0 分;提尾时右前肢内收,不能完全伸展,1 分;自发行走时向右侧转圈,2 分;行走时身体向右侧倾倒,3 分;不能自发行走,有意识丧失,4 分。0 分及 4 分者予以剔除。

#### 六、组织取样及处理

1. 脑梗死区域标本采集:再灌注 3 d 后,将各组大鼠麻醉处理,与冰上迅速开颅取脑,新鲜脑组织置于 -80 ℃ 冰箱中保存备用。

2. 免疫组织化学标本采集:脑缺血再灌注 3 d 后,大鼠经腹腔麻醉,用 0.9% 冰生理盐水、4% 冰多聚甲醛磷酸盐缓冲液进行灌洗后,于冰上迅速开颅取脑,分离左侧病灶处大脑皮质部的脑组织,置于 4% 冰多聚甲醛磷酸盐缓冲液中保存备用。

3. 蛋白质和 mRNA 检测标本采集:大鼠经腹腔麻醉后,予以断头处理,于冰上迅速分离左缺血侧皮质,置于液氮中,储存于 -80 ℃ 超低温冰箱中保存备用。

#### 七、脑梗死体积测定

在距大脑额部 2 mm 处,用刀片将脑组织沿冠状面切成厚约 2 mm 的薄片,将切片置于 2% 的 2,3,5-氯化三苯基四氮唑中,避光放入 37 ℃ 的温箱中,30 min,定时翻动脑片,使脑组织均匀接触染色液。2,3,5-氯化三苯基四氮唑是呼吸链中吡啶-核苷结构酶系统的质子受体,与正常组织中脱氢酶发生反应后呈红色,缺血组织内脱氢酶活性下降,不能发生反应,呈苍白色。染色完成后,梗死部分呈白色,未梗死区域呈红色,将染色后的脑组织切片按次序整齐排列于带刻度的标尺上,用高分辨率数码相机拍摄,采用 Image-ProPlus 图像分析处理系统检测每片脑组织梗死的体积,梗死体积 = 脑片梗死面积 × 2 mm,每个脑组织梗死的总体积等于连

续切割的 6 片脑组织梗死体积之和,最后采用(梗死总体积/大脑总体积)的百分比作为评价指标<sup>[7]</sup>。

#### 八、皮质缺血半暗带区域神经细胞凋亡数量检测

采用常规石蜡包埋、切片(厚约 5 mm)、脱蜡,根据原位细胞凋亡 TUNEL 检测试剂盒的检测说明,对神经细胞的凋亡数量进行检测。应用激光共聚焦荧光显微镜,观察经 DAPI 染色后呈现出蓝色荧光的细胞核和呈现出绿色荧光的凋亡神经细胞。每组任选 5 个视野,通过 Image-ProPlus 图像分析处理系统计算凋亡细胞数,结果以凋亡细胞率表示,凋亡细胞率 = (绿色荧光的凋亡细胞数/DAPI 染色的总细胞数) × 100%。

#### 九、蛋白提取及检测

1. 蛋白提取:取 200 mg 大鼠左侧皮质脑组织,加入 1 ml 含蛋白酶抑制剂的裂解缓冲液,于冰上均匀混合。4 ℃、12 000 r/min、离心半径 7.7 cm,离心 10 min,取上清液,100 μl 分装后,置于 -80 ℃ 备用。

2. 免疫印迹法:在 100 μl 蛋白液中加入 25 μl 的上样缓冲液,于 100 ℃ 金属浴中变性。以 50 μg 蛋白为上样量,计算每个泳道的上样体积。电泳结束后将凝胶取出,用湿转方式将蛋白质条带转移到聚偏氟乙烯膜上,电压 50 V,电流 100 mA,作用时间 2 h。膜用 5% 脱脂奶粉液封闭 2 h,洗涤 3 次,每次 5 min。分别加入稀释的抗 Bcl-2、Bax 和 β-actin 抗体,4 ℃ 孵育过夜,洗涤 3 次,每次 5 min,加入碱性磷酸酶标记山羊抗兔 IgG,室温孵育 2 h,洗涤 3 次,每次 5 min。在膜上滴加配好的显色液,显色时间 15 ~ 30 min,采用计算机扫描图像,所得数据信息采用 Model Gel Doc 2000 型生物图像分析系统处理。

#### 十、mRNA 提取及检测

1. mRNA 提取:取大鼠左侧皮质脑组织 200 mg,加入 1 ml Trizol 匀浆。震荡 30 s,加入 0.2 ml 氯仿,剧烈摇动 30 s,室温放置 3 min。4 ℃、12 000 r/min、离心半径 7.7 cm,离心 15 min。轻轻吸取上层无色水相,移入另一试管中(约 0.5 ml),加入等体积异丙醇,室温放置 10 min。4 ℃、12 000 r/min、离心半径 7.7 cm,离心 10 min,在管底部可见微量 RNA 沉淀。加入 75% 乙醇 1 ml,振荡,4 ℃、7500 r/min、离心半径 7.7 cm,离心 5 min,弃上清,小心吸取残留乙醇,开盖干燥 5 min,用 20 μl 纯化水溶解 RNA,检测 RNA 浓度。

2. 逆转录-聚合酶链式反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR):采用 RNA 逆转录试剂盒检测大脑 Bcl-2、Bax 等 mRNA 的表达水平。取 5 μl 产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像所得的 DNA 条带采用凝胶成像系统进行分析,读取条带 ID 值。用于扩增的引物序列如下:β-actin mRNA 的正向序列为 5'-actggcattgtgatggactc-3',β-actin mRNA 的反向

序列为 5'-cagcactgtggcataga-3', Bcl-2 mRNA 的正向序列为 5'-gggtgtggaggaactcttca-3', Bcl-2 mRNA 的反向序列为 5'-gagcagcgtcttcagagaca-3', Bax mRNA 的正向序列为 5'-gagcagcgtcttcagagaca-3', Bax mRNA 的反向序列为 5'-tcacggaggaagtcagtg-3'。

### 十一、统计学分析

采用 SPSS 16.0 版统计学软件包进行数据处理。所有数据采用( $\bar{x} \pm s$ )形式表示,数据比较采用  $t$  检验和单因素方差分析,  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 结 果

### 一、电针刺激对 3 组大鼠神经功能缺损的影响

随着缺血再灌注时间延长,模型组、电针组大鼠术后 3 d 时的神经功能缺损评分显著降低,与组内术后 2 h 比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。与组内术后 2 h 及 1 d 比较,模型组、电针组大鼠术后 3 d 时的神经功能缺损评分较低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。与组内术后 2 d 比较,模型组、电针组大鼠术后 3 d 时的神经功能缺损评分降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。假手术组大鼠的神经行为学评分为( $0.00 \pm 0.00$ )分,无神经功能缺损症状。与假手术组同时时间点比较,模型组、电针组大鼠术后 2 h、1 d、2 d 及 3 d 的神经功能缺损评分均较高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。与模型组同时时间点比较,电针组术后 2 d 及 3 d 时的神经功能缺损评分较低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),详见表 1。

表 1 电针刺激对 3 组大鼠神经功能缺损的影响  
(分,  $\bar{x} \pm s$ )

| 组别   | 只数 | 术后 2 h                   | 术后 1 d                   | 术后 2 d                    | 术后 3 d                       |
|------|----|--------------------------|--------------------------|---------------------------|------------------------------|
| 假手术组 | 20 | 0.00 ± 0.00              | 0.00 ± 0.00              | 0.00 ± 0.00               | 0.00 ± 0.00                  |
| 模型组  | 18 | 2.29 ± 0.39 <sup>d</sup> | 2.08 ± 0.42 <sup>d</sup> | 1.96 ± 0.54 <sup>d</sup>  | 1.67 ± 0.58 <sup>abcd</sup>  |
| 电针组  | 18 | 2.33 ± 0.40 <sup>d</sup> | 2.04 ± 0.47 <sup>d</sup> | 1.42 ± 0.29 <sup>de</sup> | 1.14 ± 0.37 <sup>abcde</sup> |

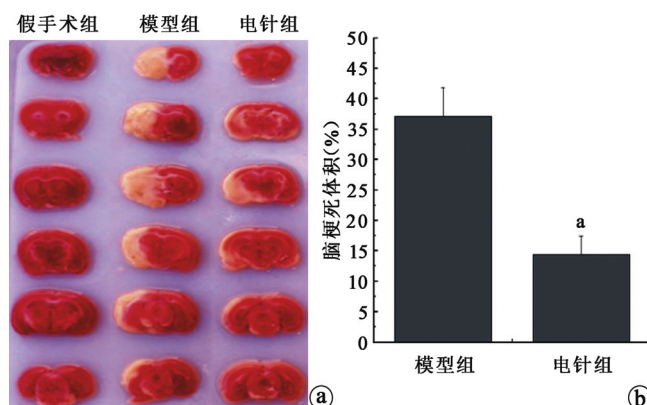
注:与组内术后 2 h 比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与组内术后 1 d 比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与术后 2 d 比较, <sup>c</sup> $P > 0.05$ ;与假手术组同时时间点比较, <sup>d</sup> $P < 0.05$ ;与模型组同时时间点比较, <sup>e</sup> $P < 0.05$

### 二、电针刺激对 3 组大鼠脑梗死体积的影响

术后 3 d,假手术组大鼠的脑组织经染色后呈红色,模型组、电针组大鼠脑组织冠状切面呈现出不同程度的苍白色,反映出大鼠左侧大脑不同体积的梗死灶。术后 3 d,与模型组比较,电针组大鼠脑梗死体积百分比明显减小( $P < 0.05$ )。详见图 1。

三、电针刺激对 3 组大鼠皮质缺血半暗带区神经细胞凋亡的影响

绿色荧光表示被标记的神经凋亡细胞,蓝色荧光表示所有神经细胞的细胞核。假手术组中几乎未见到绿色荧光细胞。术后 3 d,模型组大鼠大脑皮质缺血半



注:a 为 3 组大鼠术后 3 d 时的脑组织染色后冠状面切片;b 为术后 3 d 模型组与电针组大鼠的脑梗死体积百分比,与模型组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$

图 1 3 组大鼠术后 3 d 时脑组织染色后冠状面切片及脑梗死体积比较

暗带区的绿色荧光细胞数量增加,与假手术组比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。假手术组、模型组、电针组大鼠大脑皮质缺血半暗带区神经细胞的凋亡百分比分别为( $1.07 \pm 0.02$ )%、( $39.4 \pm 10.1$ )%、( $15.1 \pm 4.2$ )%。与模型组比较,电针组凋亡细胞数量百分比明显较低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),详见图 2。

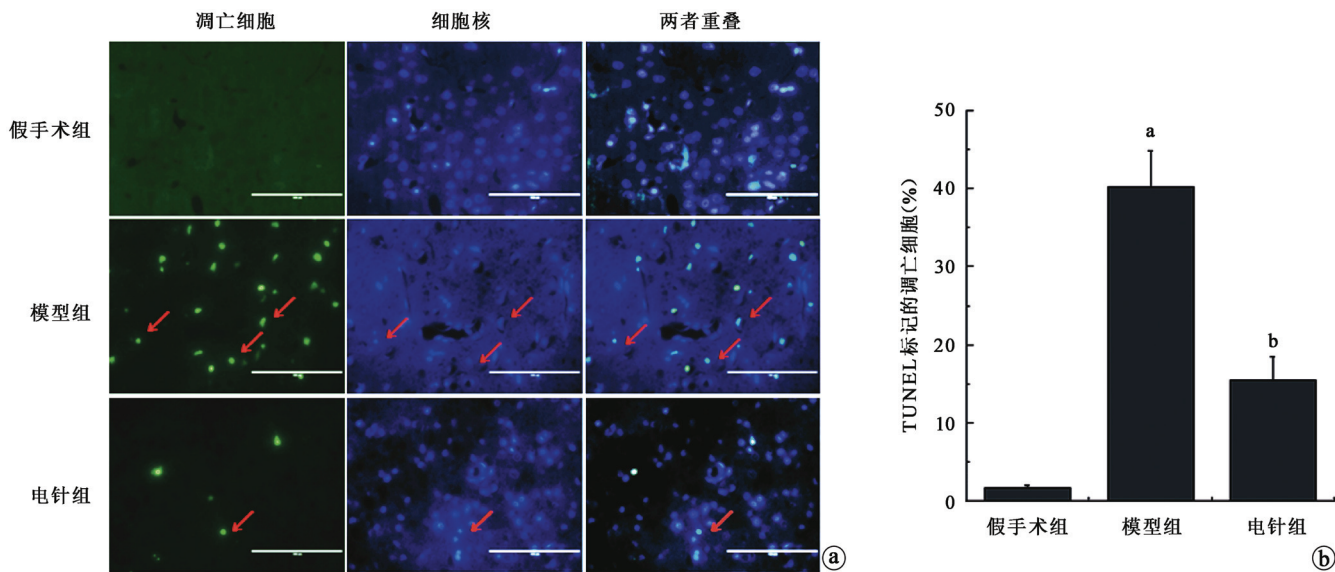
四、电针刺激对 3 组大鼠大脑皮质线粒体凋亡相关因子表达的影响

术后 3 d,模型组大鼠大脑皮质 Bcl-2 蛋白、mRNA 的相对含量较假手术组明显下降,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。电针组 Bcl-2 蛋白、mRNA 的相对含量虽低于假手术组,但差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。与模型组比较,电针组 Bcl-2 蛋白、mRNA 的相对含量较高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。术后 3 d,模型组、电针组大鼠大脑皮质 Bax 蛋白、mRNA 表达均高于假手术组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。与模型组比较,电针组大鼠大脑皮质 Bax 蛋白、mRNA 相对含量较高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),详见表 2、表 3、图 3。术后 3 d,假手术组未观察到有 cleaved caspase-3 阳性细胞表达,模型组、电针组则出现棕黄色的 cleaved caspase-3 阳性细胞。与模型组比较,电针组 cleaved caspase-3 阳性细胞较少,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),详见图 4。

## 讨 论

近年来,降纤、溶栓等方法在治疗缺血性损伤及再灌注损伤方面得到了广泛应用。脑缺血再灌注损伤涉及的病理生理机制较为复杂,包括兴奋性氨基酸中毒、离子稳态破坏、炎症反应、氧自由基损伤、血脑屏障破坏等,这些机制表现为一种动态变化过程,与神经细胞





注:a 为术后 3 d,各组大鼠大脑皮质缺血半暗带区的 TUNEL 染色图( $\times 400$ ),其中红色箭头所示分别为呈现出绿色荧光的凋亡神经细胞、蓝色荧光的细胞核及两者重叠后的凋亡神经细胞;b 为各组大鼠术后 3 d 时大脑皮质缺血半暗带区的神经细胞凋亡率,与假手术组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ,与模型组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$

图 2 3 组大鼠术后 3 d 大脑皮质缺血半暗带区神经细胞的 TUNEL 染色情况及凋亡率比较

**表 2** 3 组大鼠术后 3 d 时 Bcl-2 蛋白和 mRNA 相对含量比较( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别   | 只数 | Bcl-2 蛋白                 | mRNA                     |
|------|----|--------------------------|--------------------------|
| 假手术组 | 20 | 0.51 ± 0.18              | 0.61 ± 0.21              |
| 模型组  | 18 | 0.11 ± 0.02 <sup>a</sup> | 0.13 ± 0.04 <sup>a</sup> |
| 电针组  | 18 | 0.36 ± 0.11 <sup>b</sup> | 0.41 ± 0.15 <sup>b</sup> |

注:与假手术组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与模型组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ 。

**表 3** 3 组大鼠术后 3 d 时 Bax 蛋白和 mRNA 相对含量比较( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别   | 只数 | Bax 蛋白                    | mRNA                      |
|------|----|---------------------------|---------------------------|
| 假手术组 | 20 | 0.20 ± 0.04               | 0.09 ± 0.02               |
| 模型组  | 18 | 1.11 ± 0.34 <sup>a</sup>  | 0.63 ± 0.19 <sup>a</sup>  |
| 电针组  | 18 | 0.51 ± 0.14 <sup>ab</sup> | 0.37 ± 0.13 <sup>ab</sup> |

注:与假手术组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与模型组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ 。

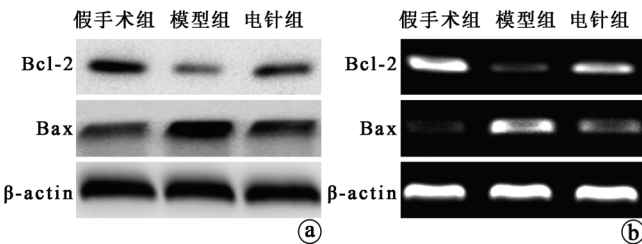
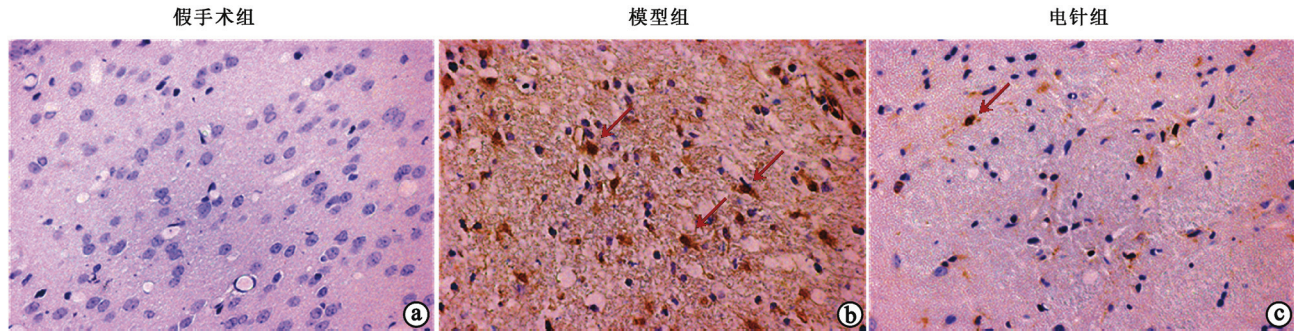


图 3 3 组大鼠术后 3 d 时 Bcl-2、Bax 蛋白和 mRNA 的表达情况

凋亡之间存在密切的关系<sup>[8]</sup>。研究认为,线粒体是脑缺血后神经细胞凋亡的重要途径之一,凋亡刺激信号促使线粒体的形态发生变化,如外膜通透性增加可促使凋亡蛋白细胞色素 C 释放,从而启动蛋白酶级联反应,最终诱导细胞凋亡<sup>[9-10]</sup>。

目前,多数研究认为,线粒体凋亡主要通过 Bcl-2



注:a 表示假手术组术后 3 d 时 cleaved caspase-3 阳性细胞的表达情况( $\times 400$ );b 表示模型组术后 3 d 时 cleaved caspase-3 阳性细胞的表达情况( $\times 400$ ),图中箭头所示为 cleaved caspase-3 阳性细胞;c 表示电针组术后 3 d 时 cleaved caspase-3 阳性细胞的表达情况( $\times 400$ ),图中箭头所示为 cleaved caspase-3 阳性细胞

图 4 3 组大鼠术后 3 d 时 cleaved caspase-3 阳性细胞的表达情况

家族蛋白调节,并证实 Bcl-2 蛋白家族参与了线粒体外膜通道的形成过程<sup>[11]</sup>。其中,Bcl-2 家族中主要的促凋亡因子 Bax 通过破坏线粒体膜的完整性,发挥促凋亡作用,当凋亡发生时,促凋亡蛋白 Bax 聚集到线粒体外膜上,与线粒体外膜电压依赖性阴离子通道相互作用,促使线粒体膜通透性转换孔开放<sup>[12]</sup>。Shimazaki 等<sup>[13]</sup>在研究沙土鼠脑缺血模型时发现,缺血 2 min 后,大鼠海马 CA1 区 Bcl-2 蛋白免疫活性增加,缺血 5 min 后降低,同时可在该区检测到凋亡的神经元细胞。在局灶性脑缺血损伤后,Bax 呈高水平表达,与线粒体的电压依赖性阴离子通道发生反应,促进细胞凋亡<sup>[14]</sup>。caspase 是线粒体凋亡途径中的重要物质之一,其中 caspase-3 是细胞凋亡过程中主要的效应因子,一旦被激活,细胞凋亡将进入不可逆阶段<sup>[15]</sup>。研究发现,大鼠在短暂性全脑缺血后,皮质区锥体神经元 caspase-3 mRNA 在 24 h 时表达水平最高,且这种高水平状态可持续 3 d<sup>[16]</sup>。本研究采用免疫印迹法和 RT-PCR,从蛋白和基因检测方面着手,观察脑缺血再灌注 3 d 后大鼠皮质 Bcl-2 和 Bax 的表达情况,发现术后 3 d 时脑组织中 Bcl-2 的水平降低,Bax 则呈高水平表达,与假手术组比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。通过免疫组织化学方法,发现大鼠缺血皮质区域内 cleaved caspase-3 免疫阳性细胞的数量明显多于假手术组( $P < 0.05$ ),这一变化与大鼠术后 3 d 的神经功能学评分、脑梗死体积、凋亡细胞数的变化趋势一致。

针灸疗法是传统中医疗法中的重要组成部分,具有简便、易操作的优势。Wang 等<sup>[17]</sup>选取雄性大鼠制作脑梗死模型,给予电针刺激,结果发现针刺组大鼠的认知功能得到显著改善,且神经元凋亡数量减少,表明针刺具有抗神经元凋亡作用,可用于改善多发性脑梗死大鼠的记忆功能,推测其抗凋亡作用是通过抑制 Bax 基因表达、增加 Bcl-2 表达水平实现。本研究采用电针刺激大鼠“曲池”、“足三里”穴位,证实电针能减轻脑缺血再灌注损伤、减少神经细胞凋亡数量,具有脑保护作用。术后 3 d,通过检测大鼠皮质线粒体凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax 及 caspase-3 的含量,发现电针刺激能上调抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达水平、下调促凋亡蛋白 Bax 及 caspase-3 的表达水平,与模型组比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

综上所述,电针刺激“曲池”、“足三里”穴能有效改善大鼠的脑缺血再灌注损伤,这一变化可能与线粒体凋亡途径中的凋亡因子 Bcl-2、Bax 及 caspase-3 被激活有关,从而抑制了神经细胞凋亡。但抑制神经细胞凋亡只是电针改善脑缺血损伤的可能机制之一,并不是唯一机制,其效应机制还有待于进一步的研究和深入,以便为临床应用提供有力的科学依据和理论基础。

## 参 考 文 献

- [1] Harris MH, Thompson CB. The role of the Bcl-2 family in the regulation of outer mitochondrial membrane permeability[J]. Cell Death Differ, 2000,7(12):1182-1191.
- [2] Zhang L, Xing D, Chen M. Bim(L) displacing Bcl-x(L) promotes Bax translocation during TNF alpha-induced apoptosis[J]. Apoptosis, 2008,13(7):950-958.
- [3] Chen A, Lin Z, Lan L, et al. Electroacupuncture at the Quchi and Zusanli acupoints exerts neuroprotective role in cerebral ischemia-reperfusion injured rats via activation of the PI3K/Akt pathway[J]. Int J Mol Med, 2012,30(4):791-796.
- [4] 肖娜, 向珩, 黄力平. 早期穴位电针治疗对局灶性脑缺血大鼠脑缺血皮质胰岛素样生长因子-1 表达的影像[J]. 中华物理医学与康复杂志, 2014,36(1):16-19.
- [5] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989,20(1):84-91.
- [6] 李忠仁. 实验针灸学[M]. 北京:中国中医药出版社, 2007:242.
- [7] Yang Y, Shuaib A, Li Q. Quantification of infarct size on focal cerebral ischemia model of rats using a simple and economical method[J]. J Neurosci Methods, 1998,84(1-2):9-16.
- [8] Dimagli U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischemic stroke: an integrated view[J]. Trends Neurosci, 1999,22(9):391-397.
- [9] Kumarswamy R, Seth RK, Dwarakanath BS, et al. Mitochondrial regulation of insect cell apoptosis: evidence for permeability transition pore-independent cytochrome-c release in the Lepidopteran Sf9 cells[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2009,41(6):1430-1440.
- [10] Kawai C, Pessoto FS, Rodrigues T, et al. pH-sensitive binding of cytochrome c to the inner mitochondrial membrane. Implications for the participation of the protein in cell respiration and apoptosis[J]. Biochemistry, 2009,48(35):8335-8342.
- [11] Orrenius S. Mitochondrial regulation of apoptotic cell death[J]. Toxicol Lett, 2004,149(1-3):19-23.
- [12] Yamagata H, Shimizu S, Nishida Y, et al. Requirement of voltage-dependent anion channel 2 for pro-apoptotic activity of Bax[J]. Oncogene, 2009,28(40):3563-3572.
- [13] Shimazaki K, Ishida A, Kawai N. Increase in bcl-2 oncoprotein and the tolerance to ischemia-induced neuronal death in the gerbil hippocampus[J]. Neurosci Res, 1994,20(1):95-99.
- [14] Cao G, Minami M, Pei W, et al. Intracellular Bax translocation after transient cerebral ischemia: implications for a role of the mitochondrial apoptotic signaling pathway in ischemic neuronal death[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2001,21(4):321-333.
- [15] Cryns V, Yuan J. Proteases to die for[J]. Genes Dev, 1998,12(11):1551-1570.
- [16] Ni B, Wu X, Su Y, et al. Transient global forebrain ischemia induces a prolonged expression of the caspase-3 mRNA in rat hippocampal CA1 pyramidal neurons[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 1998,18(3):248-256.
- [17] Wang T, Liu CZ, Yu JC, et al. Acupuncture protected cerebral multi-infarction rats from memory impairment by regulating the expression of apoptosis related genes Bcl-2 and Bax in hippocampus[J]. Physiol Behav, 2009,96(1):155-61.

(修回日期:2014-09-15)

(本文编辑:凌 琛)