

针刺足三里穴对端粒酶基因敲除小鼠海马 P2X 受体及其表达的影响

林丽莉 吴强 陈立典

【摘要】 目的 观察针刺足三里穴对端粒酶基因敲除小鼠海马 P2X 受体表达的影响。**方法** 采用随机数字表法将端粒酶基因敲除的早衰模型纯合子小鼠分为空白组、手针组及电针组,每组各 6 只小鼠。3 组小鼠均正常饲养,期间空白组不给予任何特殊处理,手针组及电针组小鼠分别给予手针或电针刺刺激足三里穴。于治疗 7 d 后观察各组小鼠海马区 P2X 受体及 cAMP 应答元件结合蛋白(CREB)表达间差异。**结果** ①手针组及电针组海马区 P2X₄ 相对表达量[分别为(0.67±0.05)和(0.70±0.13)]均较空白组(0.79±0.03)有下降趋势,但各组间差异均无统计学意义($P>0.05$)。②电针组及手针组海马区 P2X₇ 表达[分别为(1.00±0.04)和(1.07±0.02)]均较空白组(1.21±0.05)明显下降($P<0.05$),但电针组与手针组海马区 P2X₇ 表达组间差异无统计学意义($P>0.05$)。③电针组小鼠海马区 CREB 表达(0.67±0.07)较空白组(0.82±0.05)及手针组(0.86±0.03)明显下降($P<0.05$)。**结论** 电针可抑制端粒酶基因敲除小鼠海马区 P2X₄ 受体及 CREB 表达,其相关信号通路在针刺治疗神经退行性疾病的作用机制中可能发挥重要作用。

【关键词】 针刺; 电针; 端粒酶敲除; P2X

基金项目:福建省自然科学基金项目(2014J01353)

Effects of acupuncture on the expression of P2X receptors in the hippocampus of mice with a telomerase gene

knocked out Lin Lili, Wu Qiang, Chen Lidian. College of Acupuncture, Fujian Rehabilitation Tech Co-innovation Center, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China

Corresponding author: Chen Lidian, Email: lidianchen87@163.com

【Abstract】 Objective To observe the expression of P2X receptors in the hippocampus of telomerase gene knockout mice after acupuncture at the bilateral ST36 acupoints. **Methods** Eighteen telomerase gene knockout homozygous mice were randomly divided into a blank control group (group A), a manual acupuncture group (group B) and an electric acupuncture group (group C), each of 6. Group A was not given any intervention, while groups B and C were provided with manual or electric acupuncture at point ST36 for 7 days. The expression of P2X receptors and cAMP response element bound protein (CREB) in the hippocampus were observed and compared among the 3 groups. **Results** The expression of P2X₄ in the hippocampus was not significantly different among the 3 groups in groups B and C decreased significantly compared with group A, but there were no significant differences between group Bs and C. The expression of CREB in group C decreased significantly compared with groups A and B. **Conclusion** EA inhibits the expression of P2X₄ receptor and CREB the hippocampus. The signaling pathway may play an important role in the mechanism of action of acupuncture in neurodegenerative diseases.

【Key words】 Acupuncture; Electro-acupuncture; Telomerase knockout; P2X

Fund program: Natural Science Foundation of Fujian Province (2014J01353)

端粒酶缺失(Terc^{-/-}-telomerase RNA component)小鼠模型是目前广泛应用的衰老小鼠模型,端粒酶缺失小鼠表现出明显衰老相关特征^[1]。目前研究表明,发育阶段大脑端粒酶高表达于神经元前体细胞、神经元干细胞以及胚胎细胞^[2-3]。Rolyan 等^[4]利用端粒酶敲除小鼠分析端粒缩短对阿尔茨海默氏病的影响,发现

由于端粒酶缺失造成端粒缩短,能导致成年小鼠海马齿状回神经元发育异常,且该作用与促分裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPK)信号通路相关的 cAMP 应答元件结合蛋白(cAMP response element binding protein, CREB)下调有关^[5-6]。P2X 受体是三大类离子通道受体家族之一,由 379 至 595 个氨基酸组成^[7]; P2X 受体广泛分布于全身各组织中,其中 P2X₄ 与 P2X₇ 受体是离子通道受体,能调节神经递质释放、易化兴奋性神经信号传递、参与胶质细胞与

神经细胞间以及不同胶质细胞间网络信号交流等。有研究发现阿尔茨海默症、缺血性脑血管疾病及脊髓损伤等疾病模型可见 P2X₇ 表达增加^[8-10]; Parvathenani 等^[11-12] 也发现认知功能障碍动物模型及阿尔兹海默氏病患者 P2X 受体表达明显升高, 并且增高幅度与认知障碍程度间具有正相关性; 同时也有研究者观察到电针足三里穴能降低实验动物中枢神经系统中 P2X 受体表达^[13]。尽管目前有大量研究提示 P2X₇ 受体及其信号通路与神经退行性疾病具有密切联系, 但其确切作用机制尚未明确。本研究拟通过针刺足三里穴干预端粒酶敲除小鼠, 并观察不同针刺对该早衰小鼠模型海马区 P2X 受体表达的影响, 旨在为进一步研究及临床应用提供参考资料。

材料与方法

一、主要实验材料

共选取无特定病原体级 (specific pathogen free, SPF) 雌性端粒酶基因敲除小鼠 18 只, 鼠龄 38 周龄, 平均体重 (18.0±1.6) g, 该小鼠由美国 Jackson Lab 实验室提供, 上海茂生衍生物科技有限公司引进, 福建中医药大学实验动物中心负责育种。主要实验仪器包括: TS-1 型脱色摇床、HH-W 型三用恒温水箱、移液器、SAFIRE2 全波长荧光酶标仪 (瑞士产)、电泳仪、电泳槽、电转槽 (BIO-RAD 型)、BioRad 凝胶成像系统 (美国 BioRad 公司产)、0.35 mm×15 mm 针灸针 (华佗牌)、HANS-200 型韩氏穴位神经刺激仪 (南京济生医疗科技有限公司) 等。主要实验试剂包括: 凝胶配制试剂盒、BCA 蛋白定量试剂盒、裂解液、甘油、β-巯基乙醇、聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜、显影液、内参 (β-actin)、羊抗鼠 P2X₇ (L-20, 货号 sc-15200)、羊抗鼠 P2X₄ (N-15, 货号 sc-15187)、兔抗鼠 CREB 等, 上述抗体均购于 SANTA 公司。

二、实验方法

采用随机数字表法将上述小鼠分为空白组、手针组及电针组, 每组 6 只, 所有实验小鼠均分笼饲养, 期间自由摄食、饮水, 实验室保持通风、自然光照, 室温约 22℃。空白组小鼠不给予任何特殊处理; 手针组及电针组小鼠参照实验动物针灸穴位图谱^[14]取足三里穴, 采用华佗牌 0.35 mm×15 mm 针灸针顺经直刺, 皮下刺入深度约为 2 mm, 手针组进针得气后, 每 5 min 捻针 1 次, 留针 20 min; 电针组进针得气后连接韩氏电针仪辅以电针治疗, 采用 2/100 Hz 交替波形, 电刺激强度为 0.5~1.2 mA, 持续治疗 20 min。手针组及电针组小鼠每天于固定时间点治疗 1 次, 连续治疗 7 d。

三、标本采集与制备

各组小鼠于末次针刺结束后, 采用 10% 水合氯醛按每千克体重 4 ml 腹腔注射麻醉后断头冰上快速取脑, 取出双侧海马在预冷生理盐水中漂洗数次后, 置于十字匀浆器中。按照每 100 mg 脑组织加入 1 ml 裂解液并充分碾磨后, 置于冰上孵育 3 h 直至充分裂解。将裂解后液体移入 1.5 ml EP 管中, 在 4℃ 离心机以 16 000 g 离心 20 min, 取上清即为总蛋白。采用 BCA (bicinchoninic acid, BCA) 法检测蛋白浓度, 并配置十二烷基磺胺酸钠-聚丙烯酰胺电泳胶 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE), 定量后的蛋白样品经 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳后, 将蛋白转印到 PVDF 膜上并置入 5% 牛奶封闭液中封闭 1 h, 经磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered solution, PBS) 漂洗 3 次后加 3 ml 一抗 (P2X₄-1 : 1000, P2X₇-1 : 1000, CREB-1 : 3000, β-actin-1 : 5000) 4℃ 过夜, 漂洗后加入二抗, 室温孵育 1 h, 经 PBS 洗膜 5 min×3 次后进行化学发光反应, 应用胶片曝光, 并采用凝胶成像系统分析目标条带光密度值, 以目标蛋白与 β-actin 蛋白的比值作为该目标蛋白相对表达量。

四、统计学分析

本研究所得计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 SPSS 18.0 版统计学软件包进行数据分析, 多组间比较采用单因素方差分析及最小显著差异法 (least-significant difference, LSD), $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

结 果

一、针刺足三里穴对端粒酶基因敲除小鼠海马 P2X₄ 表达的影响

通过分析 Western blot 结果发现, 手针组及电针组海马区 P2X₄ 表达均较空白组有下降趋势, 但空白组、手针组及电针组海马区 P2X₄ 表达组间差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 具体情况详见图 1 及表 1。

二、针刺足三里穴对端粒酶基因敲除小鼠海马 P2X₇ 表达的影响

通过分析 Western blot 结果发现, 电针组及手针组小鼠海马区 P2X₇ 表达均较空白组明显下降 ($P < 0.05$), 电针组与手针组海马区 P2X₇ 表达组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。具体情况见图 2 及表 1。

表 1 各组小鼠海马区 P2X₄、P2X₇ 及 CREB 相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	P2X ₄ /β-actin	P2X ₇ /β-actin	CREB/β-actin
空白组	6	0.798±0.0309	1.216±0.0598	0.823±0.0539
手针组	6	0.677±0.0506	1.071±0.0261 ^a	0.868±0.0334
电针组	6	0.704±0.1318	1.003±0.0425 ^a	0.674±0.0702 ^{ab}

注: 与空白组比较, ^a $P < 0.05$; 与手针组比较, ^b $P < 0.05$

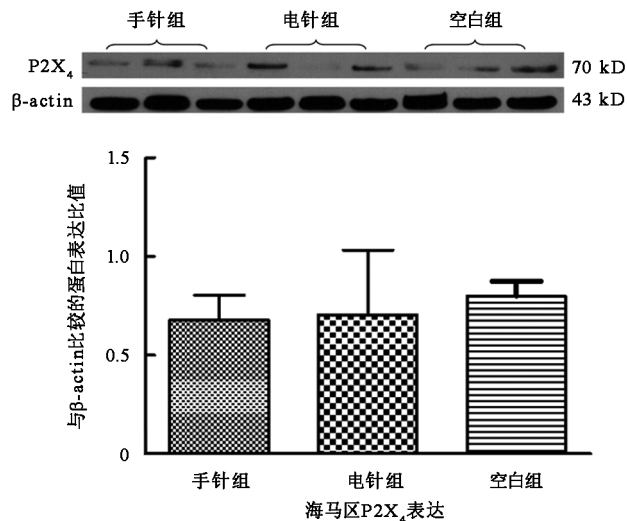
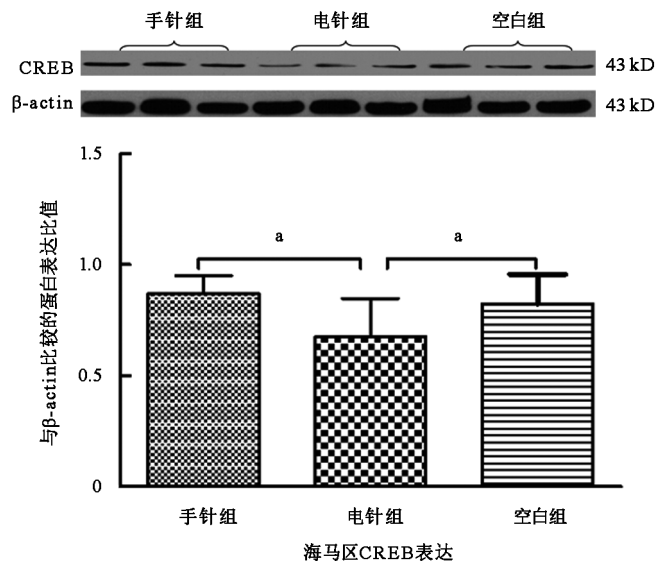
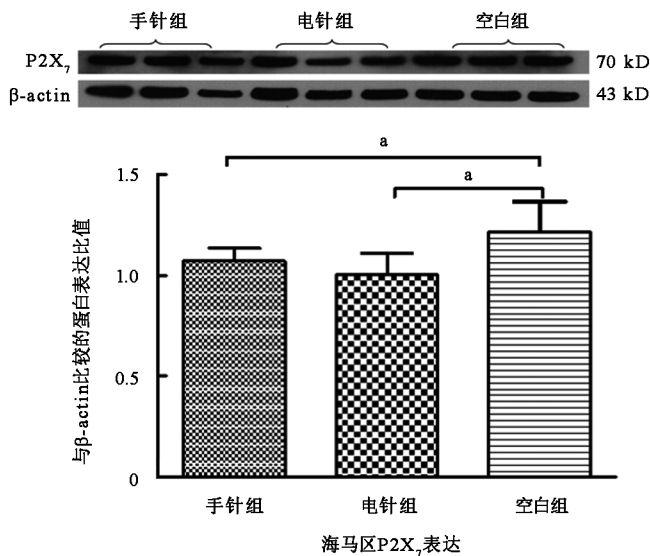


图 1 各组小鼠海马区 P2X₄/β-actin 相对表达量比较



注:与电针组比较,* $P<0.05$

图 3 各组小鼠海马区 CREB/β-actin 相对表达量比较



注:与空白组比较,* $P<0.05$

图 2 各组小鼠海马区 P2X₇/β-actin 相对表达量比较

三、针刺足三里穴对端粒酶基因敲除小鼠海马 CREB 表达的影响

通过分析 Western blot 结果发现,电针组小鼠海马区 CREB 表达较空白组及手针组明显减弱,组间差异均具有统计学意义(均 $P<0.05$)。具体情况见图 3 及表 1。

讨 论

目前研究表明,通过反转录方式维持端粒长度稳定的端粒酶是延长端粒长度的重要因素,而人类老化与端粒酶活性下降密切相关^[15-16]。本研究旨在探讨针刺足三里穴对端粒酶基因敲除小鼠海马 P2X 受体表达的影响,从而初步探讨针刺干预早衰动物模型的作用机制。

本研究结果显示,针刺端粒酶基因敲除小鼠足三里穴 7 d 后,发现针刺能显著下调海马区 P2X₇ 及 CREB 表达,并且以电针治疗作用较显著;但与 P2X₇ 同样高表达于高位神经中枢的 P2X₄ 各组小鼠间差异均无统计学意义($P>0.05$)。近年来研究表明,在中枢神经系统中 P2X 受体兼具“离子通道”和“孔道”功能,是一类与胞外核苷酸相结合的细胞膜受体^[17]。P2X 受体家族是一类配体门控型非选择性阳离子通道,目前为止已发现 7 种 P2X 受体亚型,其中 P2X₇ 受体可激活多种胞内信号通路,参与中枢神经系统免疫反应、神经递质释放、氧化应激及细胞增殖和凋亡等^[6,18]。P2X₄ 受体则广泛分布于脑、脊髓和神经节内小胶质细胞中,目前认为 P2X₄ 受体主要通过加速 CREB 磷酸化进程,促使小胶质细胞增殖,从而参与疼痛敏化状态调控^[10,19-20]。在中枢神经系统中,P2X₇ 受体大量表达于胶质细胞中,P2X₇ 受体持续激活可能是神经损伤、炎症、缺血及脱髓鞘后引发二次损伤的关键环节^[9,21]。本研究结果提示,电针能通过抑制 P2X₇ 受体表达保护神经元细胞,防止其进一步发生神经退行性改变。MAPK 是一组分布广泛的蛋白激酶,在多种胞外刺激信号传递中发挥重要作用,在中枢神经系统中 P2X₇ 受体激活了络氨酸蛋白的磷酸化反应,进而激活 MAPK 信号通路并通过 CREB 通路参与细胞调控^[22-24]。本研究结果初步肯定了电针对端粒酶基因敲除小鼠海马 P2X 受体的作用,并发现 P2X₇ 及其下游 CREB 表达变化与电针治疗密切相关。

综上所述,本研究结果提示电针较手针能更显著降低端粒酶基因敲除小鼠海马中 CREB 的表达,但二者对 P2X 受体表达的影响作用并无显著性差异。至

于这里是否存在其他不同通路作用途径,目前尚不明。我们推测,P2X₇受体介导的三磷酸腺苷(adenosine triphosphate,ATP)信号通路可能在针刺干预神经退行性疾病的作用机制中扮演重要角色。需要指出的是,由于本研究对象为转基因小鼠且动物数量有限,对其行为学变化尚有待进一步观察;加之由于研究设计原因,未能从细胞形态学层面观察针刺后端粒酶基因缺失小鼠海马神经元改变,上述不足均是本研究后续需完善之处。

参 考 文 献

- [1] 张俊伶,黄颂,路璐,等.第三代端粒酶缺失小鼠皮肤表皮干细胞分离培养特性观察[J].天津医药,2014,42(8):762-764. DOI: 10.3969/j.issn.0253-9896.2014.08.008.
- [2] Klapper W, Shin T, Mattson MP. Differential regulation of telomerase activity and TERT expression during brain development in mice[J]. J Neurosci Res, 2001, 64(3):252-260. DOI: 10.1002/jnr.1073.
- [3] Ostenfeld T, Caldwell MA, Prowse KR, et al. Human neural precursor cells express low levels of telomerase in vitro and show diminishing cell proliferation with extensive axonal outgrowth following transplantation[J]. Exp Neurol, 2000, 164(1):215-226. DOI: 10.1006/exnr.2000.7427.
- [4] Rolyan H, Scheffold A, Heinrich A, et al. Telomere shortening reduces Alzheimer's disease amyloid pathology in mice[J]. Brain, 2011, 134(7):2044-2056. DOI: 10.1093/brain/awr133.
- [5] Ferron S, Mira H, Franco S, et al. Telomere shortening and chromosomal instability abrogates proliferation of adult but not embryonic neural stem cells[J]. Development, 2004, 131(16):4059-4070. DOI: 10.1242/dev.01215.
- [6] Volonte C, Apolloni S, Skaper SD, et al. P2X₇ receptors: channels, pores and more[J]. CNS Neurol Disord Drug Targets, 2012, 11(6):705-721. DOI: 10.2174/187152712803581137.
- [7] 胡巨伟,郭洁洁,陈晓薇,等.P2X₇受体在神经退行性疾病中的研究进展[J].中国老年学杂志,2014,34(8):2291-2235. DOI: 10.3969/j.issn.1005-9202.2014.08.137.
- [8] Vazquez Villoldo N, Domercq M, Martin A, et al. P2X₄受体对活化的小胶质细胞的调控作用[J].神经损伤与功能重建,2014,9(1):50-52. DOI: 10.3870/sjsscj.2014.01.013.
- [9] 孔繁君,梁尚栋.P2X₇受体与神经病变的研究进展[J].神经解剖学杂志,2011,27(5):571-574. DOI: 10.3969/j.issn.1000-7547.
- [10] Vazquez-Villoldo N, Domercq M, Martin A, et al. P2X₄ receptors control the fate and survival of activated microglia[J]. Glia, 2014, 62(2):171-184. DOI: 10.1002/glia.22596.
- [11] McLammon JG, Ryu JK, Walker DG, et al. Upregulated expression of purinergic P2X(7) receptor in Alzheimer disease and amyloid-beta peptide-treated microglia and in peptide-injected rat hippocampus[J]. J Neuropathol Exp Neurol, 2006, 65(11):1090-1097. DOI: 10.1097/01.jnen.0000240470.97295.d3.
- [12] Parvathenani LK, Tertysnikova S, Greco CR, et al. P2X₇ mediates superoxide production in primary microglia and is up-regulated in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease[J]. J Biol Chem, 2003, 278(15):13309-13317. DOI: 10.1074/jbc.M209478200.
- [13] 王金金,屠文展,蒋松鹤,等.单双侧取穴电针对CCI模型大鼠镇痛效果及脊髓背角P2X₃受体表达的影响[J].中华中医药学刊,2014,32(2):305-308. DOI: 10.13193/j.issn.1673-7717.2014.02.027.
- [14] 郭义,余曙光.实验针灸学[M].上海:上海科学技术出版社,2009:150-151.
- [15] 曹瑞珍,魏永春,张国文,等.地锦草总黄酮对衰老小鼠组织端粒酶表达的影响[J].华西药理学杂志,2011,26(2):189-190. DOI: 10.13375/j.cnki.wcjps.2011.02.026.
- [16] 李雪燕,陈开兵,张丽云,等.当归多糖对衰老模型小鼠学习、记忆能力及脑组织凋亡蛋白表达的影响[J].中医研究,2013,26(6):68-71. DOI: 10.3969/j.issn.1001-6910.2013.06.34.
- [17] Brass D, Grably MR, Bronstein-Sitton N, et al. Using antibodies against P2Y and P2X receptors in purinergic signaling research[J]. Purinergic Signal, 2012, 8(S1):61-79. DOI: 10.1007/s11302-011-9278-z.
- [18] Surprenant A, North RA. Signaling at purinergic P2X receptors[J]. Annu Rev Physiol, 2009, 71(71):333-359. DOI: 10.1146/annurev.physiol.70.113006.100630.
- [19] Inoue K, Tsuda M. P2X₄ receptors of microglia in neuropathic pain[J]. CNS Neurol Disord Drug Targets, 2012, 11(6):699-704. DOI: 10.2174/187152712803581065.
- [20] 赵浩,余庆,刘曾旭.P2X受体介导的神经病理痛的研究进展[J].南昌大学学报(医学版),2013,53(4):90-91,95. DOI: 10.3969/j.issn.1000-2294.2013.04.028.
- [21] 杜侠莹,周新妹,万晓,等.中枢神经系统P2X-7受体的结构与功能[J].医学综述,2012,18(3):330-332. DOI: 10.3969/j.issn.1006-2084.2012.03.004.
- [22] 曾雯,童煜,毛萌.P2X₇受体与神经系统疾病[J].生命的化学,2011,31(6):887-889. DOI: 10.13488/j.smbx.2011.06.011.
- [23] 余茜,李晓红,何成松,等.康复训练对脑梗死大鼠学习记忆与健侧海马突触体胞浆游离Ca²⁺浓度的影响[J].中华物理医学与康复杂志,2004,26(4):209-211. DOI: 10.3760/j.issn:0254-1424.2004.04.006.
- [24] 王卫东,王洪典,王津存,等.康复训练对成年大鼠脑梗死后海马齿状回神经前体细胞增殖的影响[J].中华物理医学与康复杂志,2003,25(7):386-389. DOI: 10.3760/j.issn:0254-1424.2003.07.002.

(修回日期:2016-06-05)

(本文编辑:易 浩)