

·针灸推拿·

# 电针内关、百会穴对脑缺血/再灌注大鼠 GRP78 和 Caspase-12 基因表达的影响

沈菁<sup>1</sup>,雷晓明<sup>2</sup>,宋洋<sup>1</sup>,谭杏<sup>1</sup>,刘琴<sup>1</sup>,戴丽雯<sup>1</sup>,李文慧<sup>1</sup>,郁洁<sup>1\*</sup>

(1.湖南中医药大学针灸推拿学院,湖南长沙 410208;2.湖南中医药大学教务处,湖南长沙 410208)

**[摘要]** 目的 观察电针内关、百会穴对脑缺血/再灌注(Ischemia/Reperfusion, I/R)大鼠脑 GRP78 和 Caspase-12 基因表达的影响,探讨针刺发挥脑保护作用是否与内质网应激凋亡通路有关。**方法** 100 只大鼠随机分为 5 组,每组 20 只,即正常组、假手术组、手术造模组、依达拉奉组和针刺干预组。采用线栓法建立大鼠大脑中动脉阻塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)脑 I/R 模型。采用 TUNEL 染色法,检测大鼠神经细胞凋亡指数;采用实时定量多聚酶链式反应(Real-Time polymerase chain reaction, RT-PCR),检测 GRP78、Caspase-12 mRNA 表达。**结果** 与正常组和假手术组相比,手术造模组、依达拉奉组和针刺干预组大鼠细胞凋亡指数升高,GRP78 和 Caspase-12 mRNA 表达增多,差异具有统计学意义( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ );与手术造模组相比,依达拉奉组和针刺干预组大鼠细胞凋亡指数和 Caspase-12 mRNA 表达均明显降低( $P < 0.01$ ),GRP78 mRNA 表达明显升高( $P < 0.01$ );与依达拉奉组相比,针刺干预组大鼠各项指标差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。**结论** 针刺内关、百会穴可以有效抑制脑缺血神经元细胞凋亡,其保护机制可能上调内质网应激保护性 GRP78 表达,同时抑制促凋亡 Caspase-12 表达有关。

**[关键词]** 细胞凋亡;电针;脑缺血/再灌注损伤;百会;内关;GRP78;Caspase-12**[中图分类号]** R245.3**[文献标识码]** A**[文章编号]** doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2016.02.015

## Effect of Electroacupuncture at Neiguan and Baihui Points on GRP78 and Caspase-12 Gene Expression in Rats with Ischemia-Reperfusion Injury

SHEN Jing<sup>1</sup>, LEI Xiaoming<sup>2</sup>, SONG Yang<sup>1</sup>, TAN Xing<sup>1</sup>, LIU Qin<sup>1</sup>, DAI Liwen<sup>1</sup>,Li Wenhui<sup>1</sup>, YU Jie<sup>1\*</sup>

(1. Acupuncture and Tuina Massage School, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China;

2. Academic Affairs Division, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

**[Abstract]** **Objective** To observe the effects of electro-acupuncture (EA) at Neiguan and Baihui point on GRP78 and Caspase-12 gene expression in rats with ischemia/ reperfusion (IR) injury and investigate protective effects of acupuncture wheather related to endocyttoplasmic reticulum (ER) stressapoptosis passage. **Methods** 100 rats were randomly assigned to five groups, 20 in each group: the normal group, sham-operation group, operation model group, edaravone group and EA group. The IR model of middle cerebral artery occlusion (MCAO) was established by suture embolic method. The apoptosis index of nerve cells in rats were measured by TUNEL staining method. The mRNA expression of GRP78 and Caspase-12 were measure by Real-time polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** Compared with normal group and sham-operation group, the apoptosis indexes and mRNA expression of GRP78 and Caspase-12 in operation group, Edaravone group and EA group were increased, with statistical significance ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ); Compared with operation model group, the apoptosis indexes and Caspase-12 mRNA expression in edaravone group and EA group were decreased ( $P < 0.01$ ), GRP78 mRNA expression were increased obviously ( $P < 0.01$ ); there were no significant difference between edaravone group and EA group on the above indexes ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** Acupuncture at Neiguan and Baihui points could effectively suppress the nerve cell apoptosis in cerebral ischemia. The underlying mechanism might be related to upregulation of the ERS-protective GRP78 expression and inhibition of apoptosis-promotion Caspase-12 expression.

**[收稿日期]** 2015-08-24**[基金项目]** 国家自然科学基金青年项目(81202771);教育部新教师类项目(20114323120005);针灸推拿湖南省重点学科资助。**[作者简介]** 沈菁,女,医学博士,讲师,研究方向:针灸治病机制的研究。**[通讯作者]** \*郁洁,女,硕士研究生导师,副教授,E-mail:47060463@qq.com。

[**Keywords**] cell apoptosis, electroacupuncture, cerebral ischemia/reperfusion injury, Baihui point; Neiguan point; GRP78, Caspase-12

近年来有关内质网应激介导凋亡通路的研究受到广泛关注,已发现内质网应激与许多疾病的发生发展有关,比如糖尿病、肿瘤等。在这种形势下,明确内质网应激与脑缺血/再灌注(ischemia/reperfusion, I/R)损伤的关系显得十分必要。本研究通过观察电针对脑 I/R 大鼠 GRP78 和 Caspase-12 基因表达的影响,探讨针刺脑保护作用与内质网应激凋亡通路的关系,力求为临床针刺治疗中风提供一定实验基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物分组

10~12 周健康雄性清洁级 SD 大鼠 100 只,体重 230~250 g (由湖南中医药大学实验动物中心提供,合格证号:湘医动字 20-002)。所有大鼠随机分为 3 组,即正常对照组(A 组)20 只、假手术组(B 组)20 只、造模组 60 只。造模组成功后的大鼠随机分为手术造模组(C 组)20 只、依达拉奉组(D 组)20 只和针刺干预组(E 组)20 只。

### 1.2 主要仪器与试剂

DK-8D 型电热恒温水槽(上海森信实验仪器有限公司);DYY-8 型稳压稳流电泳仪(上海琪特分析仪器有限公司);H6-1 微型电泳槽(上海精益有机玻璃制品仪器厂);Rotor-Gene3000 RealtimePCR 仪、引物设计软件 Primer5.0、Rotor-gene6.0(CorbettResearch)等。

TRIZOL 试剂(上海生工生物工程有限公司);逆转录聚合酶链反应 RT-PCR 试剂盒(上海生工生物工程有限公司);MMLV 反转录酶、10 × RT 缓冲液(Epicentre);2.5 mM dNTP 混合液(HyTest Ltd);Oligo(dT)18、琼脂糖、溴化乙锭(EB)(上海生工生物工程有限公司);DEPC(焦炭酸二乙基酯)、氯仿、异丙醇(上海化学试剂有限公司)等。

### 1.3 模型制备

参考 Longa 等<sup>[1]</sup>报道的线栓法制备局灶性大脑中动脉脑缺血(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型。动物用 10%水合氯醛(35 mg/kg)腹腔注射麻醉。仰卧位固定,依次分离左侧颈总动脉(CCA)、颈外动脉(ECA)和颈内动脉(ICA)。在距 ECA 分叉部 4 mm 处剪一小口,将栓线插入深度约 18 mm。手术后 2 h 将栓线拔出。手术过程中及术后大鼠苏醒前予以灯照保暖。假手术组插入深度为 8~10 mm,其

余操作同手术组。根据神经功能缺损评分法<sup>[2]</sup>,于针刺干预组大鼠苏醒后即刻对所有大鼠进行评分,满分为 11 分,分数越高,说明动物行为障碍越严重。凡造模手术中动物死亡、蛛网膜下腔出血或无对侧偏瘫体征均视为手术造模失败。

### 1.4 依达拉奉注射方法

取 10 mg 依达拉奉注射液(商品名:必存,批号:H20031342,规格:10 mg/5 mL)以 5 mL 生理盐水稀释,配制成 1 mg/mL 的浓度。依达拉奉组大鼠在脑 I/R 即刻一次性予尾静脉注射依达拉奉 3 mg/kg。手术造模组在同一时刻给予注射等量生理盐水。

### 1.5 穴位定位与针刺方法

根据新世纪全国高等中医药院校规划教材《实验针灸学》<sup>[3]</sup>大鼠针灸穴位定位方法及拟人比照法定位。内关穴位于前肢内侧,距腕关节上 3 mm 左右的尺桡骨间,直刺 2 mm;百会穴位于顶骨正中,向前沿皮斜刺 2 mm。以医用 10 mm、28 号毫针刺入穴位,于针柄处接华佗牌 SDZ-II 型电针治疗仪。疏密波(疏波 10 Hz,密波 50 Hz),第一对电极负极接左侧内关穴,第二对电极负极接百会穴,正极均接鼠尾。强度以鼠尾轻颤为度,刺激时间 30 min。

### 1.6 实验步骤

第 1 天:正常对照组大鼠捆绑约 30 min;假手术组大鼠行假手术,待大鼠清醒并评分后注射生理盐水;手术造模组大鼠造模,待大鼠清醒并评分后注射生理盐水;依达拉奉组大鼠造模,待大鼠清醒并评分后注射依达拉奉;针刺干预组大鼠造模,待大鼠清醒并评分后予以针刺干预。第 2~4 天:针刺干预组大鼠针刺干预,其余各组捆绑约 30 min。

处理完毕后,全部大鼠用 10%水合氯醛进行深度麻醉,每组取 10 只大鼠沿胸骨旁线剪开胸腹腔,剪开右心耳生理盐水冲洗至肝脏变白、右心耳流出的液体清亮后灌注 4%多聚甲醛约 300 mL 至大鼠四肢强直僵硬后停止灌注。剥离脑组织,取视交叉后 2 mm 脑组织,4%多聚甲醛固定过夜,制作脑组织蜡块,4 °C 保存,以备检测细胞凋亡指数(apoptosis index, AI);每组另 10 只大鼠麻醉后断头取脑组织。切取缺血侧顶叶大脑皮质约 100 mg (冠状面距额极 7~11 mm,扇形分出缺血半暗带,即大脑纵裂到大脑外侧沟皮层上 1/3),迅速放入已编号的冻存管

中,液氮中保存,以备 RT-PCR 检测。

### 1.7 观察指标及检测方法

1.7.1 细胞凋亡指数(AI) TUNEL 染色法。具体步骤按试剂盒说明书进行。

凋亡细胞核呈棕黄色或棕褐色。测定部位为顶叶缺血区周围,每个标本在高倍镜( $\times 400$ )下随机观察梗死灶周边区域 5 个不重叠的视野,计算不同视野的凋亡阳性细胞数百分比,取平均值作统计。正常对照组和假手术组取脑相应部位观察。

1.7.2 GRP78 和 Caspase-12 基因表达 RT-PCR 检测。

(1)引物设计:GRP78、Caspase-12 引物由上海生工生物公司合成。各引物序列、产物长度、PCR 反应的退火温度见表 1。

表 1 引物序列

基因名	双向引物序列	退火温度(°C)	产物长度(bp)
GAPDH	F:5'GGAAAGCTGTGGCGTGAT3'	60	308
	R:5'AAAGTGAAGAATGGGAGTT3'		
GRP78	F:5'TCAATGACGCCGAGAAGTTT3'	60	190
	R:5'AGCCATTTCGATCTTTTCTCTA3'		
Caspase-12	F:5'AATGGAGGTAATGTTGGAGTG3'	60	112
	R:5'CCAATCACGAGAACATAGCTTC3'		

(2)结果与计算:各样品的目的基因和管家基因分别进行 Realtime PCR 反应。根据绘制的梯度稀释 DNA 标准曲线,各样品目的基因和管家基因的浓度结果直接由机器生成。每个样品的目的基因浓度除以其管家基因的浓度,即为此样品此基因的校正后的相对含量。

### 1.8 统计学方法

所有数据使用 SPSS17 for Windows 软件进行处理。数据用“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,各指标 5 组计量资料均采用单因素方差分析,细胞凋亡指数方差齐性检验显示方差不齐,两两比较采用 Tamhane's T2 法;GRP78 和 Caspase-12 表达方差齐性检验显示方差不齐,两两比较采用 LSD 法。

## 2 结果与分析

### 2.1 电针百会、内关穴对 I/R 大鼠脑神经元 AI 的影响

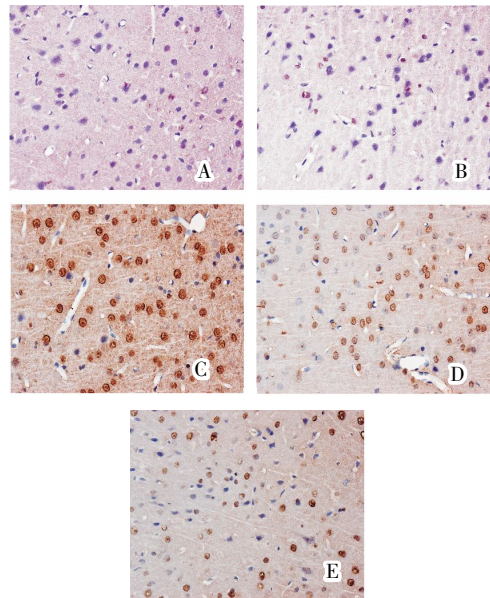
与正常对照组比较,假手术组大鼠脑神经元 AI 无明显变化( $P>0.05$ )。与正常对照组和假手术组比较,手术造模组、依达拉奉组和针刺干预组大鼠 AI 明显升高,差异有显著统计学意义( $P<0.01$ )。与手术造模组比较,依达拉奉组和针刺干预组大鼠 AI 明显降低( $P<0.01$ )。针刺干预组与依达拉奉组比较差异不明显( $P>0.05$ )。见表 2。

图 1 所示,蓝色为正常细胞,红色为凋亡细胞。正常对照组与假手术组可见少量凋亡细胞,手术造模组可见大量凋亡细胞,依达拉奉组与针刺干预组凋亡细胞数量较造模组减少。

表 2 电针对 I/R 大鼠脑神经元 AI 的影响 ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	n	AI(%)
正常对照组	10	6.12±0.93
假手术组	10	5.88±1.48
手术造模组	10	41.79±4.99***▲▲
依达拉奉组	10	30.08±2.93***▲▲#
针刺干预组	10	32.78±4.07***▲▲#
F		253.535

注:与正常对照组相比,\*\*\* $P<0.01$ ;与假手术组相比,▲▲ $P<0.01$ ;与手术造模组相比,## $P<0.01$ 。



A.正常对照组;B.假手术组;C.手术造模组;D.依达拉奉组;E.针刺干预组

图 1 各组大鼠脑神经元细胞凋亡光镜观察图( $\times 400$ )

### 2.2 电针百会、内关穴对 I/R 大鼠脑 GRP78 和 Caspase-12 基因表达的影响

与正常对照组比较,假手术组大鼠脑 GRP78 和 Caspase-12 mRNA 表达差异无统计学意义( $P>0.05$ )。与正常对照组和假手术组比较,手术造模组、依达拉奉组和针刺干预组大鼠 GRP78 和 Caspase-12 mRNA 表达均明显升高( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。与手术造模组相比,依达拉奉组和针刺干预组大鼠 GRP78 mRNA 表达显著增加( $P<0.01$ ),同时 Caspase-12 mRNA 表达明显减少( $P<0.01$ )。与依达拉奉组比较,针刺干预组大鼠 GRP78 和 Caspase-12 mRNA 表达差异无统计学意义( $P>0.05$ )。见表 3。

表2 电针对 I/R 大鼠脑 GRP78 和 Caspase-12 基因表达的影响  
( $n=10, \bar{x} \pm s$ )

组别	GRP78 mRNA	Caspases-12 mRNA
正常对照组	10.697±1.613	0.263±0.075
假手术组	10.881±1.447	0.278±0.072
手术造模组	13.471±1.657**▲▲	0.623±0.104**▲▲
依达拉奉组	17.472±1.663**▲▲#	0.356±0.055*▲#
针刺干预组	16.780±1.698**▲▲#	0.384±0.087**▲▲#
<i>F</i>	38.758	32.449

注:与正常对照组相比,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ;与假手术组相比,▲ $P<0.05$ ,▲▲ $P<0.01$ ;与手术造模组相比,## $P<0.01$ 。

### 3 讨论

脑血管病属于祖国医学“中风”病的范畴,临床上以突然昏仆、半身不遂、口舌歪斜等为主症的一种病证,与西医所称的脑血管病相似。缺血性中风病急性期以标实为主,而标实又以血瘀为本。针刺治疗中风病是行之有效的治疗方法之一<sup>[4-6]</sup>,故本实验以通经络、行气血、开脑窍为其针刺大法,选取百会、内关二穴。百会穴位于巅顶,属于督脉,是督脉、足太阳膀胱经、手少阳三焦经、足少阳胆经、足厥阴肝经的交会处,督脉由此入于脑,任、督、冲三脉同出一源,故针刺百会可调阴阳、熄肝风、填精补髓、益气养血、醒神开窍。内关为手厥阴心包经络穴,有宁心定志、调理三焦气机之功,同时是八脉交会穴之一,通过阴维脉主一身之里,调节周身阴气。二穴一主阳,一主阴,共奏开窍醒神、活血去风之功效,对中风疾病具有较好的效果。

脑 I/R 损伤使脑神经元内外环境产生缺氧、缺血变化,引起内质网功能紊乱,产生内质网应激。一方面开启自我保护性途径,GRP78 代偿性增多。GRP78 被认为是内质网应激(ERS)的经典标志物,GRP78 的上调表达对于 ERS 引起的神经元细胞有保护作用<sup>[7]</sup>,又可以间接抑制 Caspase-12 表达,阻断内质网应激凋亡。另一方面,过长过久的内质网应激,可以直接激活 Caspase-12。Caspase-12 是 ERS 导致凋亡的特异性介质。Caspase-12 缺陷鼠能抵抗 ERS 引起的凋亡,而非 ERS 介导的凋亡无关<sup>[8]</sup>。有研究表明,局部脑缺血和全脑缺血均引起 GRP78/BIP 表达的被上调<sup>[9-10]</sup>。Hayashi 等<sup>[11]</sup>研究亦发现,缺血预处理可以诱导 GRP78 表达上调抑制神经细胞的凋亡,从而起到脑细胞的保护作用。caspase-12 其表达上调在脑 I/R 动物模型中发现,而且,随着缺血再灌注时间的延长,保护性因子 GRP78 的活性被 caspase-12 抑制<sup>[12]</sup>。另外发现,caspase-12 基因敲除的小鼠无明显的发育或行为缺陷<sup>[13]</sup>,可明显抑制内

质网氧化应激引起的凋亡,说明通过 caspase-12 的阻断来抑制 ERS 介导的凋亡有效。

本实验研究发现:模型组大鼠脑 I/R 损伤,启动 ERS,一方面 GRP78mRNA 表达代偿升高,进行脑组织保护;同时 Caspase-12mRNA 表达显著增加,启动促细胞凋亡途径,AI 明显升高。针刺干预组在大鼠脑 I/R 损伤一开始,就进行针刺百会穴和内关穴干预,结果发现:与模型组相比,GRP78mRNA 表达进一步明显增加;同时 Caspase-12mRNA 表达均显著降低,AI 明显下降。

综上所述,针刺内关、百会穴可以有效抑制脑神经元细胞凋亡,其途径可能是通过激活 ERS 产生的。针刺发挥脑保护的内在机制可能与一方面上调 GRP78 表达,另一方面抑制 Caspase-12 表达有关。

### 参考文献:

- [1] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. Stroke, 1989,20(1):84-91.
- [2] 孙敬芳主编. 实验动物方法学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2001: 11.
- [3] 李忠仁主编. 实验针灸学[M].北京:中国中医药出版社, 2003: 327-329.
- [4] 邓凯文,贺福元,常小荣.针刺关元等穴配合补阳还五汤治疗中风恢复期偏瘫疗效观察[J].湖南中医药大学学报,2011,31(11):62-64.
- [5] 张金峰,王长德,刘欣燕,等.头穴针刺结合认知训练治疗中风后轻度认知功能障碍[J].长春中医药大学学报,2015,31(3):541-544.
- [6] 白玮婧,张春红,张新亚,等.针刺与康复训练治疗脑卒中后共济失调[J].吉林中医药,2014,34(9)941-944.
- [7] Uznetsov G, Chen LB, Nigam SK. Multiple molecular chaperones complex with misfolded large oligomeric glycoproteins in the endoplasmic reticulum[J]. Biol Chem,1997,272(5):3 057-3 063.
- [8] 美丽英,许彩民,潘华珍.内质网应激介导的细胞凋亡[J].生物化学与生物物理进展,2007,34(11):1 136-1 141.
- [9] Shibata M, Hattofi H,Sasaki T, et al.Activation of caspase-1 2 by endoplasmic reticulum stress induced by transient middle cerebral artery occlusion in mice [J]. Neuroscience,2003,118(2): 491-499.
- [10] Ito D, Tanaka K, Suzuki S, et al. Up-regulation of the Ire 1-mediated signaling molecule,Bip,in ischemic rat brain [J]. Neuroreport,2001,12(18):4 023-4 028.
- [11] Hayashi T, Saito A, Okuno S, et al. Induction of GRP78 by ischemic preconditioning reticulum stress and prevents delayed neuronal cell death[J]. Cereb Blood Flow Metab,2003,23(8):949-961.
- [12] Paschen W, Aufenberg C, Hotop S, et al. Transient cerebral ischemia activates processing of xbp1 messenger RNA indicative of endoplasmic reticulum stress [J]. Cereb Blood Flow Metab,2003,23(4):449-461.
- [13] Mehmet H. Caspases find a new place to hide [J]. Nature, 2000,403:29-30.