

针刺联合亚低温对脑缺血/再灌注损伤大鼠 Bcl-2、Bax、Caspase-3 蛋白表达的影响

肖 姮, 阳仁达, 田浩梅, 林亚平, 陈 文, 刘 琴, 杨茜芸, 陈楚洵*
(湖南中医药大学, 湖南 长沙 410208)

〔摘要〕 目的 探讨针刺联合亚低温方法对脑缺血/再灌注(ischemia/reperfusion, I/R)损伤大鼠梗死面积比及 Bcl-2、Bax、Caspase-3 蛋白表达的影响。方法 将 50 只 SD 健康雄性大鼠常规饲养 1 周后, 随机选取假手术组 10 只, 余 40 只用 Zea Longa 线栓法制作大鼠大脑中动脉闭塞局灶性 I/R 模型, 待造模成功后, 再将 40 只 SD 大鼠随机分为模型组、针刺组、亚低温组、针刺联合亚低温组, 每组各 10 只。治疗 72 h 后, 使用 TTC 染色检测脑梗死面积比、免疫组化法检测 Bcl-2、Bax、Caspase-3 蛋白的阳性细胞数。结果 与假手术组比较, 模型组大鼠梗死面积比、Bax、Caspase-3 蛋白表达水平明显增高, Bcl-2 表达水平显著下降, 差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与模型组比较, 各治疗组大鼠梗死面积比、Bax、Caspase-3 蛋白表达水平明显降低, Bcl-2 表达水平明显升高, 差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 各治疗组之间 Bcl-2、Bax、Caspase-3 的差异无统计学意义($P > 0.05$), 但脑梗死面积比针刺联合亚低温组较针刺组和亚低温组低, 差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 针刺联合亚低温治疗可通过减少脑梗死面积比、提高 Bcl-2 表达水平、降低 Bax 与 Caspase-3 蛋白表达从而实现了对脑细胞的保护作用。

〔关键词〕 针刺联合亚低温; 脑缺血/再灌注损伤; 脑梗死面积比; Bcl-2 蛋白; Bax 蛋白; Caspase-3 蛋白

〔中图分类号〕 R245.3

〔文献标识码〕 A

〔文章编号〕 doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2016.02.016

Effect of Acupuncture combined Hypothermia on Bcl-2, Bax and Caspase-3 Expressions of Cerebral Ischemia Reperfusion Injury Rats

XIAO Heng, YANG Renda, TIAN Haomei, LIN Yaping, CHEN Wen, LIU Qin, YANG Qianyun, CHEN Chutao*
(Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

〔Abstract〕 Objective To investigate acupuncture combined hypothermia on infarction area ratio, Bcl-2, Bax and Caspase-3 protein expressions in rats with cerebral ischemia/reperfusion injury. **Methods** 50 healthy male SD rats were given conventional feeding for 1 week, then 10 rats were randomly selected as the sham-operation group, the other 40 rats were built middle cerebral artery occlusion focal cerebral ischemia/reperfusion models by Zeab Longa suture method. After the success of the modeling, then 40 SD rats were randomly divided into model group, acupuncture group, hypothermia group, the acupuncture combined hypothermia group, 10 rats in each group. After treatment for 72 h, the cerebral infarction area ratio was detected by TTC staining method. The apoptosis cell numbers of Bcl-2, Bax and Caspase-3 proteins were detected by immunohistochemical method. **Results** Compared with the sham-operation group, the infarction area ratio, Bax, Caspase-3 protein expressions in rats of model group were increased obviously, the Bcl-2 expression level decreased significantly, the difference was statistically significant ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); Compared with the model group, the infarction area ratio, Bax, Caspase-3 protein expressions in each treatment group were decreased obviously, the Bcl-2 expression level decreased significantly, the difference was statistically significant ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); The indexes of Bcl-2, Bax and Caspase-3 in each treatment group have no statistical significance ($P > 0.05$), but the trend was that acupuncture combined hypothermia group was superior to the acupuncture group and hypothermia group. **Conclusion** Acupuncture combined hypothermia treatment can reduce the cerebral infarction area ratio, improve the level of the Bcl-2 expressions and reduction of Bax and Caspase-3 protein expressions to protect brain cells.

〔Keywords〕 acupuncture combined hypothermia; cerebral ischemia/reperfusion injury; cerebral infarction area ratio; Bcl-2 protein; Bax protein; Caspase-3 protein

脑缺血/再灌注(ischemia/reperfusion, I/R)损伤是指脑缺血致脑细胞损伤, 恢复血液再灌注后, 其

缺血性损伤反而进一步加重的现象, 是脑血管疾病发病的主要部分。脑 I/R 损伤具有高发病率、高致残

〔收稿日期〕 2015-10-08

〔基金项目〕 国家自然科学基金项目(81303051); 湖南省中医药科研计划项目(201471); 中医内科学省部共建教育部重点实验室资助(ZYNK201501)。

〔作者简介〕 肖 姮, 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 针灸治病的疗效及机制研究。

〔通讯作者〕 * 陈楚洵, 男, 副教授, 硕士研究生导师, E-mail: 451358104@qq.com。

率和高死亡率的特点^[1]。课题前期研究发现:针刺大椎、百会、人中穴能改善大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型大鼠神经功能缺损、减少脑梗死面积从而对脑具有保护作用^[2]。李宗敏等^[3]实验显示,亚低温可使缺血半暗带的凋亡细胞明显减少,梗死体积缩小。本实验通过运用针刺、亚低温以及针刺联合亚低温三种不同疗法对脑 I/R 损伤大鼠进行治疗,通过比较各组脑梗死面积比及 Bcl-2、Bax、Caspase-3 蛋白的阳性细胞数,探讨联合疗法对脑 I/R 大鼠早期治疗效果是否优于单独疗法。现将实验方法及结果报道如下。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 动物 选取 SD 大鼠 50 只,SPF 级,雄性,体质量 250~280 g,由湖南中医药大学实验动物中心提供。许可证号 SCXK(湘)2013-0004。

1.1.2 试剂与仪器 Bcl-2、Bax、Caspase-3 试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司);1.5% 2,3,5-苯氯化四氮唑(TTC)溶液(C19H15)、4%多聚甲醛(WB0401)、DEPC 水(WB0006)、PBS 溶液(WB1001)(均来自维尔生物科技有限公司);数位温度表(TES 1310 TYPE-K,台湾泰仕电子工业股份有限公司);肛温温度计(nt,北京冀诺泰科技发展有限公司);MIAS 医学图像分析系统(北航公司)等。

1.2 方 法

1.2.1 动物分组 将 50 只 SD 健康大鼠于湖南中医药大学实验动物中心常规饲养 7 d,期间大鼠自由获取食物与水,1 周后随机选取假手术组 10 只,其余 40 只参考 Zea Longa 等^[4]方法制备 MCAO 大鼠模型,造模成功后再随机分为模型组、针刺组、亚低温组、针刺联合亚低温组,每组各 10 只。

1.2.2 模型制备 参照 Zea Longa 等^[4]的方法,禁食 12 h 后,大鼠以 10%水合氯醛 3 mL/kg 腹腔麻醉,仰卧位固定于鼠板,颈正中切口,暴露右侧的颈总动脉(CCA)、颈外动脉(ECA)及颈内动脉(ICA),电凝交通动脉,结扎 ECA 后将其电凝,动脉夹夹闭 CCA 与 ICA,在颈外剪一斜形切口,将 3 mm 单丝尼龙鱼线头端 5 mm 用石蜡包被,并于 18 mm 长度处标记,从切口处插入,插入栓线长度自 CCA 分叉处算起约 18~20 mm(根据动物体质量而定),栓塞右侧大脑中动脉,然后缝合皮肤,栓线尾端部分固定于皮肤上。缺血 2 h 后小心抽出栓线 8 mm 左右,即形成再灌注模型。假手术组仅插入尼龙鱼线约 10 mm,不栓塞,其余步骤同造模组。待大鼠呼吸、心跳等生命体征稳定以后(即脑缺血再灌注 1 h),神经功能评分为 1~3

分则造模成功,用于实验。造模成功后大鼠在 20 ℃ 环境下单笼饲养,自由进食、水,必要时滴管喂水。

1.2.3 穴位定取 根据李忠仁主编^[5]《实验针灸学》及华兴邦^[6]等制定的《实验动物穴位图谱》提供的方法,并模拟人体腧穴骨度分寸法量取。针刺穴位组由“大椎”(第 7 颈椎与第 1 胸椎间,背部正中)、“百会”(顶骨正中)、“人中”(唇裂鼻尖下 1 mm 正中处)三穴组成。

1.2.4 针刺方法 选取华佗牌美容针灸针(0.19×10 mm),大椎直刺 3 mm;百会平刺 2 mm;人中是向鼻中隔方向斜刺 2 mm。针刺组和联合组待大鼠呼吸、心跳等生命体征稳定以后(即脑缺血再灌注 1 h),即刻针刺相应穴位留针 30 min,期间 15 min 后人工捻转 1 min,且按此方法针刺 1 次/12 h,共针刺 7 次。

1.2.5 亚低温方法 参考舒鑫^[7]、殷玉华^[8]亚低温方法并加以改良。测温:测直肠温度代表全身深部体温,测鼓膜温度代表脑组织温度。具体步骤:待大鼠呼吸、心跳等生命体征稳定以后(即脑 I/R 后 1 h),即刻将亚低温组与针刺联合亚低温组大鼠放入装有冰袋和碎冰的代谢笼中,30 min 内,大鼠肛温应降至(33±1) ℃(电子温度计插入大鼠肛门约 5 cm);用数位温度表检测大鼠鼓膜温度,鼓膜温度应降至(31±1) ℃。期间测温为 1 次/10 min。温度控制稳定后,监测肛温与鼓膜温度为 1 次/h,当测温时发现温度超出正常范围外可根据调整代谢笼内冰袋数量来控制温度,若温度过低则用火炉复温。持续亚低温治疗 72 h。

1.3 指标检测及方法

1.3.1 脑梗死面积比 连续治疗 72 h 后,大鼠经 10%水合氯醛腹腔注射麻醉,迅速断头取脑,用冰生理盐水冲洗后,迅速放入-20 ℃冰箱内,5 min 后取出,切除额极,从视交叉水平开始间隔 2 mm,连续 5 个冠状脑切片,将其立即置于 1.5%氯化三苯基四氮唑(TTC)溶液中,37 ℃避光孵育 15~30 min,期间,每隔 5 min 翻动一次组织,使其均匀接触到染色液,染色后(正常组织染成红色,梗死区呈现白色),然后置于 10%甲醛 4 ℃避光固定 24 h,之后用数码相机拍照拷入电脑,再用显微图像分析系统(IPP)采集脑切片图,取最大缺血断面 A 片梗死面积结果,按梗死面积占 A 片大脑总面积的百分数表示,运用 MIAS 医学图像分析系统扫描计算 A 片梗死区面积和非梗死区面积。计算脑梗死面积比值。梗死面积按 Swanson^[9]方法进行校正后计算 A 片梗死面积的百分比(IS%)表示梗死程度。计算公式:IS%=(S1-Sr)/2S1×100%(S1: A 片健侧总面积;Sr: A 片患侧非梗死区面积)。

1.3.2 免疫组化检测 Bcl-2、Bax、Caspase-3 免疫

组化检测步骤如下:组织切片常规脱蜡;根据所应用的一抗的特殊要求,对组织切片进行预处理;3%过氧化氢孵育 10 min,以阻断内源性过氧化物酶活性;PBS 冲洗,2 min×3 次;分别滴加适当稀释的 Bcl-2、Bax、Caspase-3 一抗,室温或 37 °C 孵育 1-2 h 或 4 °C 过夜;PBS 冲洗,2 min×3 次;滴加 Polymer Helper,室温或 37 °C 孵育 20 min,PBS 冲洗,2 min×3 次;滴加 Polyperoxidase-anti-mouse/rabbit IgG,室温或 37 °C 孵育 20~30 min,PBS 冲洗,2 min×3 次;应用 DAB 溶液显色;自来水充分冲洗、复染、脱水、透明、封片。10×40 倍光镜下 Bcl-2、Bax、Caspase-3 为胞浆中有棕黄色颗粒为阳性细胞。采用显微镜及 Biomias2001 图像分析系统,在 10×40 倍光学显微镜下,通过 SONY 摄像头采集大鼠脑组织免疫组化染色图像并进行图像分析。每张切片随机选取海马区 5 个非重叠的视野,长×宽:2.16 mm×1.62 mm。用鼠标点击法计数凋亡(阳性)细胞^[10]。

1.4 统计学分析

所有数据使用 SPSS 17.0 软件进行处理,数据用“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,所有资料进行正态性检验。符合正态分布者,多组计量资料采用单因素方差分析(One-way ANOVA),方差齐者用 LSD 法。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

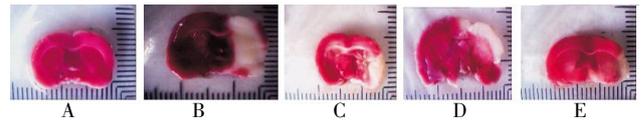
2.1 针刺联合亚低温对脑 I/R 损伤大鼠脑梗死面积比的影响

各组大鼠脑组织切片经 TTC 染色后,白色为梗死区域,红色为正常区域。假手术组未见梗死灶,其余各组造模成功后皆出现或多或少的白色梗死灶。与假手术组比较,模型组及各治疗组间大鼠梗死面积比大,差异有显著统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$);与模型组比较,各治疗组之间大鼠梗死面积比缩小,差异有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$);与针刺联合亚低温组比较,针刺组和亚低温组脑梗死面积比较大($P<0.05$ 或 $P<0.01$),说明针刺联合亚低温组优于针刺组和亚低温组。见表 1、图 1。

表 1 各组大鼠治疗后脑梗死面积比的比较 ($\bar{x}\pm s$)

分组	n	脑梗死面积比
假手术组	5	0±0
模型组	5	33.43±5.64♦♦
针刺组	5	18.39±10.86♦♦▲▲
亚低温组	5	22.70±4.91♦♦▲▲
针刺联合亚低温组	5	9.78±8.08♦♦▲
F 值		22.14
P 值		0.00

注:与假手术组相比♦ $P<0.05$,♦♦ $P<0.01$;与模型组相比▲ $P<0.05$,▲▲ $P<0.01$ 。;与针刺联合亚低温组相比★ $P<0.05$ ★★ $P<0.01$ 。

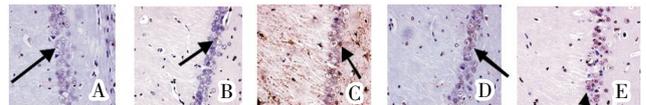


A.假手术组;B.模型组;C.针刺组;D.亚低温组;E.针刺联合亚低温组

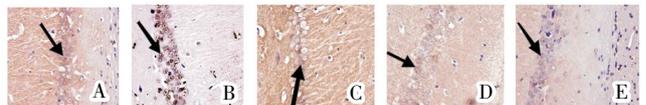
图 1 各组大鼠治疗后脑梗死面积 TTC 染色图的比较

2.2 针刺联合亚低温对脑 I/R 损伤大鼠 Bcl-2、Bax、Caspase-3 的阳性细胞数的影响

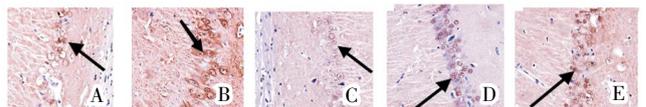
在 10×40 倍光学显微镜下观察,免疫组化染色后,造模组缺血周围区可见大量阳性细胞,细胞核呈现棕黄色或棕褐色,浓缩,致密,形态不规则,大小不一,其他正常细胞着染后细胞核呈现蓝色。与假手术组比较,模型组大鼠 Bcl-2 阳性细胞数减少, Bax、Caspase-3 阳性细胞数增多,差异有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$);模型组与其他各组比均有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$);各治疗组均能不同程度地提高 Bcl-2 表达水平、降低 Bax 与 Caspase-3 的阳性细胞数,但三组之间差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见表 2、图 2。



Bcl-2:由下图可知,B组阳性细胞数最少,呈零散分布,余下各组相对于B组,阳性细胞分布较多。



Bax:由下图可看出,B组阳性细胞数最多,呈团状密集分布,余下各组相对于B组,阳性细胞分布较少。



Caspase-3:由下图可看出,B组阳性细胞数最多,呈块状大量分布,余下各组相对于B组,阳性细胞分布较少。

A.假手术组;B.模型组;C.针刺组;D.亚低温组;E.针刺联合亚低温组

图 2 各组大鼠治疗后 Bcl-2、Bax、Caspase-3 的阳性细胞光镜观察图(×400)

表 2 各组大鼠治疗后 Bcl-2、Bax、Caspase-3 的阳性细胞数比较 ($n=5,\bar{x}\pm s$)

分组	Bcl-2 阳性细胞数	Bax 阳性细胞数	Caspase-3 阳性细胞数
假手术组	60.75±28.32	53.00±28.90	56.50±26.47
模型组	24.25±17.17♦♦	90.50±51.02*	120.25±39.68♦♦
针刺组	48.00±27.19▲	58.00±22.32▲	57.75±23.68▲▲
亚低温组	50.38±22.15▲	55.13±17.03▲	45.13±11.27▲▲
针刺联合亚低温组	61.50±14.58▲▲	50.88±25.45▲	41.88±14.90▲▲
F 值	3.84	2.15	13.08
P 值	0.01	0.08	0.00

注:与假手术组相比♦ $P<0.05$,♦♦ $P<0.01$;与模型组相比▲ $P<0.05$,▲▲ $P<0.01$ 。

3 讨论

凋亡是脑缺血后神经元死亡的重要方式^[11-12],大量研究表明^[13-15],脑 I/R 损伤后,凋亡细胞出现并逐渐增多。Bcl-2 家族基因与 Caspase 家族共同参与了细胞凋亡中由线粒体介导的“内源性途径”。Bcl-2 家族有众多成员,如 Mc1-1、NR-B、A1、Bcl-1-w、Bcl-1-x、Bax、Bad、Bim 等,它们分别既有抗凋亡作用,也有促凋亡的作用。王恒^[16]认为,Bcl-2 可以阻止 CytC 从线粒体释放,抑制随后发生的 caspase 激活,阻止神经元的凋亡。武登华等^[17]认为,在脑缺血后神经细胞凋亡过程中,Bcl-2 是重要的细胞凋亡抑制基因,而 Bax 蛋白具有促进细胞凋亡的作用。Caspase-3 位于细胞凋亡的下游,是各种凋亡通路的必经之路,因此,在细胞凋亡中发挥关键性作用^[18]。

缺血性脑损伤疾病的病位在脑,庞勇等^[19]提出“病变在脑,首取督脉”是治疗脑缺血性疾病的主要选穴原则。本实验主取督脉的百会、大椎、人中,是因为:百会穴位于头部巅顶,又称三阳五会,为百脉聚会处,内系于脑,取百会穴可以通督醒脑;大椎穴为督脉入脑之枢纽要穴,刺之可开通督脉,使气血流畅,上行于脑,而发挥活血化瘀的作用;人中穴居口鼻之间,为督脉、手足阳明之会,针刺此穴,可调督脉之阳气而醒脑神、开清窍。

根据国际惯用标准,目前通常将 32~35℃ 亚低温应用于脑保护的研究^[20]。朱军宝等^[21]对亚低温在脑 I/R 损伤中的神经保护机制概括如下:(1)降低脑组织耗氧量,减少脑组织乳酸蓄积;(2)抑制自由基的生成;(3)减少细胞内钙超载;(4)抑制兴奋性氨基酸的合成与释放;(5)减少神经细胞蛋白破坏,促进神经细胞功能恢复;(6)保护血脑屏障,减轻脑水肿及降低颅内压;(7)抑制脑 I/R 后的炎症反应;(8)抑制 I/R 损伤后神经元凋亡的发生。

在本实验中,通过研究显示脑 I/R 后脑梗死面积比增大,Bax 与 Caspase-3 阳性细胞数目增多,Bcl-2 阳性细胞数减少;经治疗后各治疗组的梗死面积比缩小及提高了 Bcl-2 蛋白表达,降低了 Bax 与 Caspase-3 的蛋白表达,且联合组有优于针刺组和亚低温组的趋势,这为缺血性脑损伤发生后介入针刺联合亚低温提供了一定的参考价值,待进一步深入研究其机制后宜及尽早介入临床治疗,实现对脑细胞的保护作用,提高患者的生活质量。

参考文献:

[1] 王维治.神经病学[M].北京:人民卫生出版社,2001,1:130.

- [2] 陈楚淘,田浩梅,张 泓,等.针刺对大鼠局灶性脑缺血后神经功能缺损及梗死面积的影响 [J]. 湖南中医药大学学报,2011,31(7):63-66.
- [3] 李宗敏,张婉婧,边 虹,等.局部亚低温对大鼠局灶性脑缺血再灌注后 β 淀粉样蛋白表达及梗死体积的影响 [J]. 国际内科学杂志,2009,36(7):378-381.
- [4] Zea Longa El, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. Stroke, 1989,20(1):84-91.
- [5] 李忠仁.实验针灸学[M].北京:中国中医药出版社,2003:425-431.
- [6] 华兴邦.大白鼠穴位图谱的研制[J].实验动物与动物实验,1991,1(1):1-5.
- [7] 舒 鑫.亚低温对脑出血大鼠 HIF-1 α 、SOCS-3、Caspase-3 表达影响的实验研究[D].泸州:泸州医学院,2013.
- [8] 殷玉华,李 明,贾 锋.亚低温干预对创伤性颅脑损伤后 N-甲基-D-天冬氨酸受体 1 表达的影响[J].上海医学,2013,36(4):361-365.
- [9] Swanson RA. A Semiautomated method for measuring brain infarct volume[J]. J ceveb Blood Flow Metab,1990,10(2):293-295.
- [10] 武登华,王光义.针刺结合亚低温对局灶性脑缺血再灌注大鼠 Bcl-2 及 Bax 蛋白表达的影响[J].中国中西医结合杂志,2011,31(11):1 506-1 509.
- [11] Bielewicz J, Kurzepa J, Lagowska-Lenard M, et al.The novel views on the patomechanism of ischemic stroke [J].Wiad Lek, 2010,63(3):213-220.
- [12] Broughton BR, Reutens DC, Sobey CG. Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia[J]. Stroke,2009,40(5):331-339.
- [13] 刘庆杰,白宏英,刘春岭.乌司他丁对脑缺血-再灌注大鼠脑组织细胞色素 C、凋亡诱导因子表达及凋亡细胞数的影响[J].临床神经病学杂志,2012,25(1):40-42.
- [14] Cao Q, Qian M, Wang XF, et al. Negative feedback regulation of Raf/MEK/ERK cascade after sublethal cerebral ischemia in the rat hippocampus[J]. Neurochem Res,2011,36(1):153-162.
- [15] Subramaniam S, Unsicker K. ERK and cell death: ERK1/2 in neuronal death[J]. FEBS,2010,277(1):22-29.
- [16] 王 恒. 脑部亚低温预处理对大鼠脑缺血再灌注损伤保护作用的研究[D].蚌埠:蚌埠医学院,2011.
- [17] 武登华,王光义.针刺结合亚低温对局灶性脑缺血再灌注大鼠 Bcl-2 及 Bax 蛋白表达的影响[J].中国中西医结合杂志,2011,31(11):1506-1508.
- [18] Huang X, Brown C, Ni W, et al. Critical role for the Ets transcription factor ELF-1 in the development of tumor angiogenesis[J]. Blood,2006,107(8):3 153.
- [19] 庞 勇,李保良.不同穴位治疗缺血性中风的临床研究[J].中国针灸,2000,20(2):69.
- [20] 陈 健,罗玉敏,吉训明,等.急性缺血性卒中的亚低温治疗研究[J].中国脑血管病杂志,2007,4(8):378-380.
- [21] 朱军宝,刘步平,陈楚淘,等.中医药与亚低温防治脑缺血再灌注损伤的实验研究进展[J].湖南中医药大学学报,2014,34(6):61-65.

(本文编辑 匡静之)