

·针灸推拿·

本文引用:林 燊,齐诗仪,章思佳,林 栋. 不同时长电针对小鼠大脑皮质区 BDNF 及 CREB 蛋白表达的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2020, 40(3): 333-336.

不同时长电针对小鼠大脑皮质区 BDNF 及 CREB 蛋白表达的影响

林 燊,齐诗仪,章思佳,林 栋*
(福建中医药大学,福建 福州 350122)

〔摘要〕 **目的** 观察不同干预时长电针对正常小鼠大脑皮质区环磷酸腺苷效应元件结合蛋白(cAMP-response element binding protein, CREB)及脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)蛋白表达的影响。**方法** 采用随机数字表法将 36 只正常小鼠分为空白组、手针组、电针 5 s 组、电针 10 s 组、电针 20 s 组、电针 60 s 组,每组 6 只。空白组仅模拟抓取过程;手针组针刺小鼠后海穴后立即取针不留针;电针组取后海穴透皮后分别向左右两侧沿皮针刺,针柄连接电针仪,按组别分别刺激不同时长(5 s、10 s、20 s、60 s),反复 15 次,频率 2 Hz,强度 2 mA,连续波。连续干预 7 d 后,采用 Western Blot 法检测各组小鼠大脑皮质区 BDNF 及 CREB 蛋白的表达。**结果** 电针 5 s 组及电针 10 s 组大脑皮质区 CREB 表达较空白组差异无统计学意义($P>0.05$);电针 20 s 组及电针 60 s 组 CREB 表达较空白组及手针组差异有显著统计学意义($P<0.001$);电针 20 s 组 CREB 表达升高较电针 5 s、10 s 组差异有显著统计学意义($P<0.001$);电针 60 s 组较电针 20 s 组差异有统计学意义($P<0.05$),且较其余各组差异均有显著统计学意义($P<0.001$)。大脑皮质区 BDNF 表达各组间差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 小鼠大脑皮质区 CREB 表达变化在电针 20 s 组(累积刺激 5 min)开始起效,而电针 5 s 组、电针 10 s 组刺激无法触发大脑皮质区响应蛋白的表达,初步推断电针 20 s 组为针刺响应时间。

〔关键词〕 大脑皮质区;电针;干预时长;环磷酸腺苷效应元件结合蛋白;脑源性神经营养因子

〔中图分类号〕R245

〔文献标志码〕A

〔文章编号〕doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2020.03.017

Effects of Different Electroacupuncture Durations on the Expression of BDNF and CREB Protein in Mice Cortex

LIN Shen, QI Shiyi, ZHANG Sijia, LIN Dong*

(Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, Fujian 350122, China)

〔Abstract〕 Objective To observe the effects of different intervention durations on the expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and cAMP-response element binding protein (CREB) in the cortex of normal mice. **Methods** A total of 36 normal mice were divided into a blank group, a hand acupuncture group, an electroacupuncture 5 s group, an electroacupuncture 10 s group, an electroacupuncture 20 s group and an electroacupuncture 60 s group with random number table method, with 6 rats in each group. The blank group only simulated the grasping process. The hand acupuncture group immediately acupunctured Houhai acupoint of the mice and then withdrew the needle without retaining the needle. The electroacupuncture groups acupunctured Houhai acupoint transdermally, and then acupunctured to the left and right side respectively. The needle handle was connected with the electroacupuncture instrument. The groups were stimulated for 5 s, 10 s, 20 s, 60 s, repeated 15 times, frequency 2 Hz, intensity 2 mA, with continuous wave. After continuous intervention for 7 days, Western Blot method was used to detect the expression of BDNF and CREB protein in the cerebral cortex of mice in each group. **Results** There was no significant difference in the expression of CREB between the electroacupuncture 5 s group and the electroacupuncture 10 s group ($P>0.05$). The expression of CREB in electroacupuncture 20 s group and the electroacupuncture 60 s group was significantly different than that in the blank group and the hand

〔收稿日期〕2019-09-05

〔基金项目〕福建省自然科学基金项目(2017J01540)。

〔作者简介〕林 燊,男,在读硕士研究生,研究方向:针灸临床作用机制研究。

〔通讯作者〕*林 栋,男,教授,博士,E-mail:blue1@sina.com。

acupuncture group ($P<0.001$). The increase of expression of CREB in the electroacupuncture 20 s group was significantly different than that of the electroacupuncture 5 s group and the electroacupuncture 10 s group ($P<0.001$). The difference between the electroacupuncture 60 s group and the electroacupuncture 20 s group was statistically significant ($P<0.05$), and the difference was statistically significant compared with the other groups ($P<0.001$). There was no significant difference in the expression of BDNF in the cerebral cortex between groups ($P>0.05$). **Conclusion** The change of CREB expression in the cerebral cortex of mice began to take effect in the electroacupuncture 20 s group (cumulative stimulation for 5 min), but the stimulation of the electroacupuncture 5 s and 10 s groups could not trigger the expression of response proteins in the cerebral cortex. The preliminary conclusion is that the electroacupuncture 20 s group is the acupuncture response time.

[**Keywords**] cerebral cortex; electroacupuncture; duration of intervention; cAMP-response element binding protein; brain-derived neurotrophic factor

关于针刺留针时间的现代研究大多围绕不同病种,采用不同留针时间,观察疗效差异,目前对于针刺时间量的研究多关注于针刺效应的“最大化”,寻找针刺效应的“最优”特征^[1-2],即大量实验旨在探寻最佳疗效的留针时间,而对于针刺响应时间的研究乏善可陈^[3-4]。针刺响应作为针刺效应的始动环节,是针刺效应的基础。故此本研究团队提出任何方式的体表刺激,首先是引起机体的生物响应(如简单的神经反射等),并在一定条件下继而产生生物学效应,但并非所有响应都能产生效应,只有产生足量的响应介质(或达到一定阈值)才能进一步激活效应系统。因此,本研究拟采用电针不同时长刺激正常小鼠后海穴,观察小鼠大脑皮质区环磷腺苷效应元件结合蛋白(cAMP-response element binding protein, CREB)及脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)蛋白的表达的影响,以期探究最短针刺响应环节中的最短作用时间,为指导临床制定治疗方案提供部分依据。

1 实验材料

1.1 实验动物

本实验采用 36 只 SPF 级成年雄性 ICR 小鼠,体质量为 25~30 g,喂养于福建中医药大学实验动物中心,许可证号:SYXK(闽)2014-005。参照国家实验动物饲养与使用指南,处于恒温恒湿环境(恒定温度(22±1)℃,湿度 50%),光照黑暗各 12 h 交替,每天定时给予清洁饲料和饮水。实验过程中对动物的处置符合中华人民共和国科技部颁布的《有关善待实验动物的指导性意见》要求,并通过福建中医药大学动物实验伦理委员会批准。动物实验全程麻醉、保温,并检测心率以确保麻醉深度,动物结束后过量麻醉处死。

1.2 实验试剂

RIPA 裂解液、PMSF 蛋白酶抑制剂、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、10%SDS-PAGE 聚丙烯酰胺凝胶、5x 蛋白上样缓释剂、SDS-PAGE 电泳液、Western Blot 转膜液、5%脱脂牛奶封闭液(上海碧云天生物技术有限公司),一抗 CREB、BDNF(Cell Signaling Technology 美国),内参 β -actin、二抗 Goat Anti-Rabbit IgG(Proteintech 生物技术有限公司)。

1.3 实验仪器

DK-8D 型电热恒温水槽(上海森信实验仪器有限公司);酶联免疫检测仪(华泰和合(北京)商贸有限公司);DYY-8 型稳压稳流电泳仪(上海谱振生物科技有限公司);VE-180 垂直电泳槽(上海郎赋实业有限公司);GS-6R Centrifuge 冷冻离心机(美国 Beckman 公司);GG/D2 凝胶成像系统(Gene Genius 公司);HANS-200A 韩氏穴位神经刺激仪(北京华运安科技有限责任公司);无菌针灸针(0.30 mm×13 mm,北京中研太和医疗器械有限公司)。

2 实验方法

2.1 动物分组及干预方法

本研究依照数字随机表法将 36 只成年雄性 I-CR 小鼠随机分为空白组、手针组、电针 5 s 组、电针 10 s 组、电针 20 s 组、电针 60 s 组,每组 6 只。

2.1.1 空白组 在干预过程中仅以双手轻缚模拟抓取过程,1 次/d,连续 7 d。

2.1.2 手针组 针刺小鼠后海穴(位于尾根与肛门之间的凹陷处),取法参照李忠仁主编的《实验针灸学》(新世纪第 2 版)中“常用实验动物针灸穴位图”确定小鼠后海穴的具体定位方法。直刺进针深度约 6~8 mm,针刺后立即取针不留针。1 次/d,连续 7 d。

2.1.3 电针组 沿后海穴透皮后分别向后海穴左右

两侧沿皮针刺,进针深度约 6~8 mm,将左针柄接正极、右针柄接负极至电针仪,频率 2 Hz,2 mA 连续波。设置不同的干预时间:(1)电针 5 s 组:电刺激 5 s,间歇 2 min,再刺激 5 s,反复 15 次;(2)电针 10 s 组:电刺激 10 s,间歇 2 min,再刺激 10 s,反复 15 次;(3)电针 20 s 组:电刺激 20 s,间歇 2 min,再刺激 20 s,反复 15 次;(4)电针 60 s 组:电刺激 60 s,间歇 2 min,再刺激 60 s,反复 15 次。进针及留针期间将小鼠以黑布蒙头,以手轻微束缚。1 次/d,连续 7 d。

2.2 Western Blot 法检测相关指标

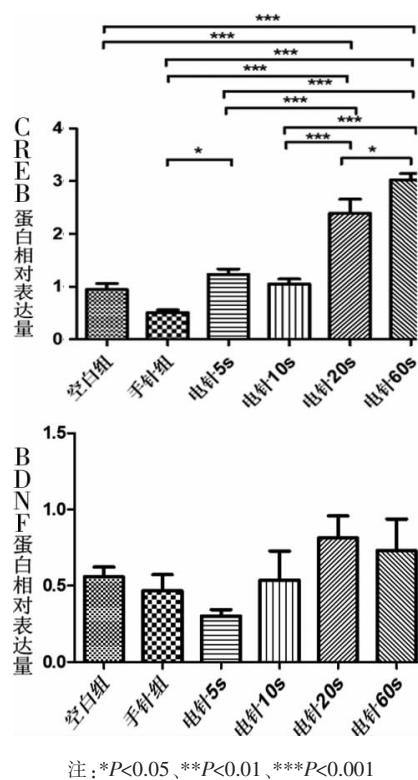
将样本置于新的 EP 管称重记录,按比例加入 RIPA 裂解液、PMSF 蛋白酶抑制剂后研磨、静置、离心,取上清液采用 BCA 蛋白浓度检测法定量检测。取出部分上清液加入 5x 蛋白上样缓冲液振荡混匀,放置在 95 °C 金属浴恒温仪器中加热 5 min 使得蛋白质变性。用 10% SDS-PAGE 聚丙烯酰胺凝胶在适当条件下进行电泳,结束后将蛋白从聚丙烯酰胺凝胶转印到 PVDF 膜上。取出转印好的 PVDF 膜用 TBST 清洗,5% 脱脂牛奶封闭液封闭、再用 TBST 清洗,而后加入按比例稀释的一抗 CREB(1:1 000)、BDNF(1:1 000)、内参 β -actin(1:1 000),在 4 °C 条件下孵育过夜。在 TBST 清洗后加入稀释过的二抗山羊抗兔 IgG 二抗(1:10 000),室温孵育。最后在暗室中用显影液反应 1 min 进行显影、定影。

2.3 统计学方法

采用统计学软件 SPSS 20 进行统计分析。计量资料结果以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,每组样本测得数据均行正态分布及方差齐性检验。组间差异性比较用方差分析,组间两两比较用 LSD 检验。

3 结果

如图 1 示,电针小鼠后海穴电针 5 s 组及电针 10 s 组皮质区 CREB 蛋白变化与空白组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$);电针 20 s 组及电针 60 s 组干预后皮质区 CREB 蛋白的表达与空白组及手针组比较差异有显著统计学意义 ($P < 0.001$),且电针 20 s 组皮质区 CREB 蛋白表达升高较电针 5 s、10 s 组差异有显著统计学意义 ($P < 0.001$),而电针 60 s 组与电针 20s 组比较存在显著性差异 ($P < 0.05$),与其余各组间均差异有统计学意义 ($P < 0.001$)。皮质区 BDNF 蛋白表达量各组间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。



注:* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$
图 1 不同干预时长对正常小鼠大脑皮质区 CREB 及 BDNF 蛋白表达的影响

4 讨论

目前,对于针刺时间因素上的量的效应关系研究旨在寻找针刺效应的“最优”特征^[1-2]。张栋等^[3]通过热像图研究周围性面瘫患者不同留针时间的时效差异发现,留针 20 min 相比于留针 10 min、留针 30 min,能获得局部温度提升和维持时间双优化的疗效。陈少宗等^[4]发现针刺期门穴对慢性胆囊炎低张力型患者留针 10 min 时起效,40 min 时最佳。

然而,本研究团队则认为针刺效应不同于针刺响应,针刺效应是基于针刺响应基础上达到生物机能调控,是机体对适当的体表刺激作出的深度反馈,这一过程固然存在一定的量效关系。但针刺响应作为针刺效应的始动环节,是体表穴位刺激的第一环节,从穴位反应到机体效应,有着复杂的干预因素及作用层次。这正如李鑫举等^[5]提出针刺反应与针刺效应不同,并非所有的针刺反应都能引起针刺效应。

本研究所讨论的最短针刺时长是基于针刺量效关系中的第一阶段针刺响应时间而言,而其最短响应时间则与干预时长、刺激方式、刺激强度等存在一定关系。本研究是基于项目组获得授权的专利成果“一种基于生物反馈技术的自闭症穴位刺激治疗仪”而展开的,电针组的时间设置是基于本团队前期对

于自闭症儿童的眼电监测研究,观察自闭症儿童在注视物体时瞳孔大小及眼球运动特征会发生变化,且监测眼电活动结果显示在2 min内至少可发现一次有意义的眼电活动特征。因此,本研究通过电针不同时长干预正常小鼠以观察针刺响应的表达,仅针对针刺激量关系第一阶段的针刺响应过程,并探讨其电针刺激后的响应时长。同时通过设立手针组观察不同针刺干预方式间的差异,本研究结果表明,手针组仅与电针5 s、20 s、60 s组之间CREB蛋白表达的差异有统计学意义($P<0.05$),而手针组与空白组间差异无统计学意义($P>0.05$),表明手针刺激并未起到显著性效应,仅作为干预方式的参考,比较刺激方式的不同,为后继实验提供参考依据。项目组拟计划在后继研究中进一步针对不同病理状态(如自闭症模型)、不同干预方式开展针刺响应到针刺效应之间的量效关系研究。

CREB位于胞内,介导了对神经的保护作用^[7]。CREB在作为继发于外源性刺激的信号蛋白,能应激的表达,在中枢神经系统的调节过程中承担重要的角色。齐诗仪等^[8]发现电针后海穴能促进FMR1基因敲除小鼠脑组织中CREB蛋白的表达。林栋等^[9]研究表明,针刺外关穴20 min能促进正常大鼠脑内CREB的表达,在针刺与无针刺之间有显著差异。既往研究结果发现针刺干预能激活正常大鼠及病理模型大鼠脑内响应蛋白CREB表达,因此,可认为CREB作为一种继发于针刺刺激的响应蛋白,能充分体现针刺干预的响应与否。本研究结果表明,电针20 s组皮质CREB蛋白表达较空白组、手针组、电针5 s、10 s组均存在差异,差异电针20 s(累积刺激5 min)起已开始起效,而以5 s及10 s为单位的刺激无法触发相关脑区的响应蛋白表达,故可初步推断电针20 s组为针刺响应时间。而电针60 s组与其余各组间差异均有统计学意义($P<0.05$),表明其已属针刺效应的上升期并非针刺响应时间。至于10~20 s之间是否存在响应时间,有待后续实验观察。

BDNF在中枢神经系统中合成并广泛存在于各种脑组织,其中以脑皮层及海马中含量最高^[10-11]。BDNF可选择性调节周围神经和中枢神经系统神经元的生长、发育、分化、存活、迁移。有研究表明^[12],针刺足三里30 min能促进端粒酶基因敲除小鼠小脑BDNF表达增加。王东岩等^[13]研究表明,电针大鼠前三里穴

和外关穴20 min能促进脑梗死大鼠缺血区BDNF表达上升。本研究结果表明,电针不同干预时长对于正常小鼠大脑皮质区BDNF蛋白表达各组间变化无显著性差异。研究团队认为其原因可能为BDNF是一种保护修复损伤脑组织的蛋白,其表达含量与实验模型疾病状态相关。同时也有研究发现^[14],针刺刺激能显著提升端粒酶敲除小鼠BDNF表达,而对于野生型小鼠并未发现该变化。这表明针刺响应所激活的效应物质与机体的病理状态相关,这一点是针刺效应与效应不同的基本特征。

参考文献

- [1] 崔建美,马树祥,武淑娟,等.针刺“后三里”穴不同留针时间对小鼠尾痛阈的影响[J].中国针灸,2009,29(8):653-654.
- [2] 张 栋,高惠合,魏正岫,等.针刺留针时间长短与针刺升温作用关系的热像图观察[J].针刺研究,1991(1):73-75.
- [3] 段建雪,李磊磊,杨翼豪.《内经》留针时间及临床应用初探[J].中国民族民间医药,2017,26(16):77-78.
- [4] 卢筱潇,梁颖芯,汤滴微,等.留针时间与针刺效应关系概述[J].亚太传统医药,2014,10(24):25-26.
- [5] 陈少宗,徐庆会,郭珊珊,等.针刺期门影响慢性炎性低张力胆囊运动的时效规律初步观察[J].针灸临床杂志,2014,30(7):48-49.
- [6] 李鑫举,赵 雪,郭 义,等.试论针刺反应与针刺效应的关系[J].中医学报,2017,32(1):155-158.
- [7] BARCO A, MARIE H. Genetic Approaches to Investigate the Role of CREB in Neuronal Plasticity and Memory[J]. Molecular Neurobiology, 2011,44(3):330-349.
- [8] 齐诗仪,黄晓真,林 燊,等.电针命门穴对FMR1基因敲除小鼠自主行为学及海马CREB蛋白表达的影响[J].福建中医药,2019,50(3):61-65.
- [9] 林 栋,赖新生,张 宏,等.基于多元统计分析的针刺效应对不同脑区CREB/p-CREB表达时空分布特征分析[J].中华中医药杂志,2014,29(10):3286-3291.
- [10] ZHANG L, NIE Q, SUN X. BDNF-TrkB signaling is involved in the histopathological damage, synaptic protein loss and inflammatory response caused by an electromagnetic pulse in rat brain cortex[J]. Neuroreport,2019,30(8):550.
- [11] 吴 莎,华清泉,杨 琨,等.脑源性神经营养因子研究进展[J].中华临床医师杂志(电子版),2013(9):3988-3990.
- [12] 林 栋,庄婉玉,黄晓真,等.针刺足三里对端粒酶基因敲除小鼠小脑BDNF及其受体表达的影响[J].时珍国医国药,2016(10):2528.
- [13] 王东岩,孙 艳,董 旭,等.电针对脑梗死大鼠缺血区BDNF及CREB表达影响的研究[J].针灸临床杂志,2016,32(10):84-86.
- [14] LIN D, WU Q, LIN X, et al. Brain-derived Neurotrophic Factor Signaling Pathway: Modulation by Acupuncture in Telomerase Knockout Mice[J]. Alternative Therapies in Health and Medicine, 2015,21(6):36-46.