

· 实验研究 ·

电针预处理对新生大鼠缺氧缺血性脑损伤保护作用的可能机制

江克文¹ 张 瑛² 水泉祥¹ R24 A

摘要 目的:观察新生大鼠缺氧缺血后大脑早期即刻基因 c-fos 和 c-jun 蛋白含量的变化,电针预处理及合用 ATP 敏感钾通道(K_{ATP})阻滞剂对其影响,以探讨电针预处理对缺氧缺血性脑损伤保护作用的可能机制。**方法:**采用免疫印迹方法,结合计算机图像处理,测定其积分光度值(ID)。**结果:**新生大鼠缺氧缺血后海马和皮层部位可同时诱导出 c-fos 和 c-jun 蛋白,2~4h 达到峰值;海马的表达较皮层高;电针预处理可以降低 K_{ATP}阻滞剂所致海马区域的持续高表达。**结论:**针刺预处理抗脑缺氧缺血作用可能与激活 K_{ATP}、抑制早期即刻基因诱发缺氧缺血后神经细胞凋亡有关。

关键词 电针 脑缺氧 脑缺血 动物模型 c-fos 蛋白 c-jun 蛋白 ATP 敏感钾通道

Possible Mechanism of Electroacupuncture Preconditioning for Hypoxia/Ischemic Brain Injury Protection Effect in Neonatal Rats JIANG Ke-wen, ZHANG Ying, SHUI Quan-xiang *Department of Neurology, Children's Hospital of Medical College, Zhejiang University, Hangzhou (310003)*

Objective: To explore the possible mechanism of electroacupuncture preconditioning (EAPC) and combined with ATP-sensitive potassium channel (K_{ATP}) blocker preconditioning for hypoxia/ischemic brain injury protection by observing the changes of the immediate genes (c-fos and c-jun protein content) in brain at the early stage after cerebral hypoxia/ischemic injury, and the effect of EAPC on these changes. **Methods:** Integrated density (ID) of c-fos and c-jun expression was measured by Western blot and computerized image processing. **Results:** Hypoxia/ischemia could induce c-fos and c-jun protein in both cerebral cortex and hippocampus simultaneously, with the peak appearing 2 - 4 hrs later, and the expression in hippocampus was higher than that in cortex. EAPC could lower K_{ATP} blocker induced permanent high expression in hippocampus. **Conclusion:** The effect of EAPC preconditioning in antagonizing cerebral hypoxia/ischemic injury may be related with its action in activating K_{ATP}, inhibiting the neuron apoptosis induced by the immediate genes at early stage of injury.

Key words electroacupuncture, cerebral hypoxia, cerebral ischemia, animal model, c-fos protein, c-jun protein, ATP sensitive potassium channel

新生儿缺氧缺血性脑损伤(hypoxic-ischemic brain injury, HIBI)是导致新生儿死亡或以后发生残疾的主要原因。脑缺氧缺血(hypoxic-ischemic, HI)损伤后神经元的死亡主要发生在两个不同的阶段,即 HI 后早期发生的原发性神经元死亡和迟发性神经元死亡即凋亡。电针对脑损伤的治疗作用已取得了肯定的疗效^[1],但有关其机制的研究报道甚少。

ATP 敏感钾通道(K_{ATP})是镶嵌在细胞和细胞内

细胞器质膜上的蛋白质,调节钾离子(K⁺)进出细胞或细胞器。将细胞代谢和细胞电活动偶联起来。中枢神经系统中 K_{ATP}对 HIBI 具有保护作用^[2]。而早期即刻基因(immediate early genes, IEGs)的启动是诱发 HI 后神经细胞凋亡的可能机制之一^[3]。本实验采用免疫印迹方法(Western blot),观察新生大鼠 HIBI 后大脑 c-fos 和 c-jun 蛋白含量的变化,及电针预处理、K_{ATP}阻滞剂、和电针配合 K_{ATP}阻滞剂对其影响,以探讨电针预处理对 HIBI 保护作用的可能机制。

材料与方 法

1 动物 新生 7 日龄 SD 大鼠 55 只,体重 12~14g,雌雄各半,由浙江省医学科学院实验动物中心

1. 浙江大学医学院附属儿童医院神经内科(杭州 310003);2. 浙江大学医学院附属妇产科医院新生儿科

通讯作者:江克文,在读博士生, Tel:0571-87061007, Fax:0571-87078641, E-mail:jiangkewen@21cn.com

提供。

2 试剂及仪器 Western blot 电泳仪、半干式电转移装置和硝酸纤维素膜(PVDF)由美国 Bio-Rad 公司生产;c-fos、c-jun 兔抗多克隆抗体由 Santa Cruz 公司提供;HRP 标记的羊抗兔 IgG、ECL Plus system 购于北京中山生物工程公司;格列本脲购自 Sigma 公司,用二甲基亚砜配成浓度为 500mg/ml 的贮存液;考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

人工脑脊液(ACSF)组成(mmol/L):NaCl 124, KCl 1.8, MgSO₄ 1.8, CaCl₂ 1.6, NaH₂PO₄ 1.25, D-glucose 10, NaHCO₃ 26, pH 为 7.4。

细胞裂解缓冲液(mmol/L):HEPES 10(pH7.9), KCl 10, DTT 1, PMSF 0.5, EDTA 0.1, NaF 50 和最终浓度为 0.06% 的 NP40。

TBS 液(mmol/L):Tris 20, NaCl 0.5, pH 为 7.5。

GB605-2 型多功能电针治疗仪,上海医用电子仪器厂。

3 实验方法

3.1 模型建立、分组及干预 参照 Rice JE^[4] 法制备新生大鼠 HIBI 模型。新生大鼠吸入异氟烷气体麻醉后永久性结扎左颈总动脉。恢复 2h 后将动物置于 8% 氧气的低氧仓内(置于 37℃ 的水浴箱中),持续 2h。将动物随机分为 11 组(每组 5 只动物):正常对照组(不做脑缺氧缺血及其他处理)、不同时间点 6 组(0h、1h、2h、4h、12h 和 24h)、不同预处理 4 组(HI 对照、电针预处理、电针加格列本脲预处理和格列本脲预处理)。HI 对照组不做任何预处理。电针预处理组于模型制备前 1h,将动物清醒固定,取穴方法参照《实验动物穴位图谱》^[6]并结合人体的模拟位置取穴。双侧合谷穴上插上电针,以 G8605-2 型多功能电针治疗仪给予疏密波(疏波约 2Hz,密波约 60Hz),强度以引起肢体微颤为宜,持续 30min。电针加格列本脲预处理组则在模型制备前 1h,脑立体定位仪下左侧脑室注入 5μl 的浓度为 1mg/ml 的格列本脲稀释液,注射部位为人字缝尖向嘴侧 2mm、左侧 1.5mm、颅骨表面垂直进针 2mm。以 1~2μl/min 的速度注入。30min 后加电针,方法同电针预处理组。格列本脲预处理组仅侧脑室注药,不加电针。不同时间点组在相应时间点收集标本,其余各组均于 HI 后 24h(正常对照组在同一时间点),断头取脑,冰上游离皮层、海马组织,迅速置于液氮中保存。

3.2 蛋白质提取和 Western bolt 方法 细胞核蛋白提取采用 Severine D 法^[6]。提取时每 100mg 缺血

侧皮层和海马组织加 1ml 预冷细胞裂解缓冲液,用玻璃匀浆器冰上研磨约 2min 至不见组织碎块,冰上孵育 15min,离心 12 000r/min, 30min(4℃)。弃上清,用裂解缓冲液(20mmol/L HEPES (pH7.9), 0.4mol/L NaCl, 1mmol/L DTT, 1mmol/L PMSF, 0.2mmol/L EDTA, 50mmol/L NaF 及 10% 甘油)重悬,混匀后冰上孵育 15min。12 000r/min, 10min 离心(4℃),上清液分装后 -70℃ 保存。蛋白浓度测定严格按照考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒说明书操作。每样本取 50μg 蛋白质,加入等量 2×SDS 加样缓冲液,混匀,于沸水中变性 5min,以 10% SDS-PAGE 凝胶电泳。蛋白质电转移到 PVDF 后,用 5% 脱脂奶粉(TBS 液溶解)封闭 1h(室温)。用兔抗 c-fos 和 c-jun 多克隆抗体(1:1 000)及 HRP 标记的羊抗兔 IgG(1:2 000)室温下进行孵育,时间分别为 2h 和 1h。取出膜,TBS-T 冲洗 10min, 3 次。用 ECL Plus system 在暗房中曝光、显影。

4 观察项目和检测方法 分两系列进行实验:(1)分别检测不同时间点 6 组皮层和海马 c-fos 和 c-jun 蛋白含量;(2)检测不同预处理 4 组(HI 对照、电针预处理、电针加格列本脲预处理和格列本脲预处理)海马 c-fos 和 c-jun 蛋白含量。均采用 Western bolt 法。同时每次凝胶电泳时,取 5 只正常对照组的皮层或海马蛋白质各 10μg(总量 50μg),混匀加样,作为半定量分析的标准。胶片经扫描后用 NIH 图像分析系统(Scion Image)半定量分析蛋白条带,即测量每条带的积分密度(Integrated density, ID),取其同标准 ID 的比值作为统计值。

5 统计学方法 所有测定值均用中位数(最小值-最大值)表示,用非参数检验 Kruskal-Wallis 法和 Mann-Whitney U 法对总体样本及组间差异进行检验,皮层和海马比较用 Friedman 法和 Wilcoxon signed ranks 法。均以 SPSS 10.0 统计软件分析处理。

结 果

1 皮层和海马不同时间点 c-fos、c-jun 蛋白含量的变化

1.1 皮层和海马不同时间点 6 组 c-fos 蛋白含量的变化及比较 见图 1。结果显示:皮层 c-fos 蛋白含量在 HI 后 2h 明显升高,之后维持在高水平,24h 基本恢复至正常水平;海马则在 HI 后 2h 大幅度升高,4h 达到峰值,12h 仍维持在较高水平,24h 基本恢复至正常水平。海马 c-fos 蛋白含量的变化较皮层明显,HI 后 4h 之间的差异有显著性($P < 0.05$)。

1.2 皮层和海马不同时间点 6 组 c-jun 蛋白含量的变化 见图 2。结果显示:c-jun 蛋白含量的变化不如 c-fos 明显。皮层 c-jun 蛋白含量在 HI 后 1h 明显升高,之后维持在高水平;海马则在 HI 后 1h 大幅度升高,2h 达到峰值,12h 仍维持在较高水平,24h 基本恢复至正常水平。海马 c-jun 蛋白含量的变化较皮层明显,HI 后 1h、2h 之间的差异有显著性($P < 0.05$)。

2 不同预处理对海马 c-fos 和 c-jun 蛋白含量的影响 见表 1。HI 后 24h 格列本脲预处理组 c-fos 和 c-jun 蛋白含量仍维持在很高水平,电针预处理组则水平最低,两者比较,差异有显著性($P < 0.05$)。电针加格列本脲预处理组水平较格列本脲预处理组低。c-fos 和 c-jun 蛋白含量的变化基本是一致的($r = 0.485$, $P < 0.05$)。

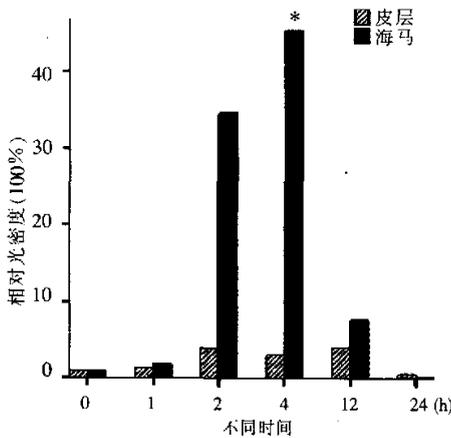


图 1 HI 后皮层和海马不同时间点 c-fos 蛋白含量的变化 (中位数)

注:与皮层比较,* $P < 0.05$; $n = 30$

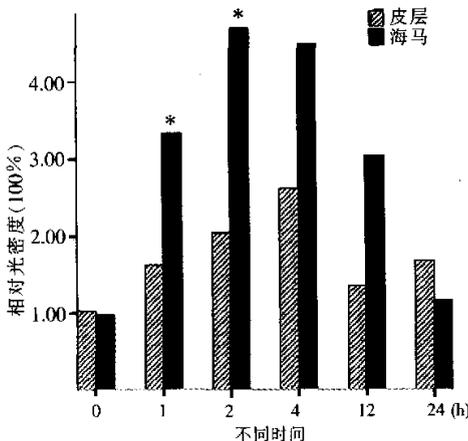


图 2 HI 后皮层和海马不同时间点 c-jun 蛋白含量的变化 (中位数)

注:与皮层比较,* $P < 0.05$; $n = 30$

表 1 不同预处理组海马 c-fos、c-jun 蛋白含量的比较*

组别	n	c-fos(100%)		c-jun(100%)	
		中位数(最小 最大)	中位数(最小 最大)		
HI 对照	5	4.70(2.97 65.28)	1.53(0.17-2.33)		
电针预处理	5	2.29(0.24-2.29)	1.69(1.00-2.00)		
格列本脲预处理	5	72.47(2.42-262.43)▲	4.49(1.88-5.88)△▲		
电针加格列本脲预处理	5	37.57(1.74-123.21)	3.04(1.56-4.56)△		

注:*总体样本经非参数检验(Kruskal-Wallis法),c-fos、c-jun 统计值分别为 8.16、10.27,均 $P < 0.05$;与 HI 对照组比较,△ $P < 0.01$;与电针预处理组比较,▲ $P < 0.05$

讨 论

目前对中枢神经系统 K_{ATP} 的生理作用还知之甚少。一般认为组织细胞 HI 时, K_{ATP} 开放,使细胞膜超极化,降低细胞兴奋性,抑制电压依赖性钙通道开放,减轻钙(Ca^{2+})超载和减少兴奋性神经递质的释放,从而起到对脑 HI 的保护作用^[2]。短暂的大脑缺血引起大鼠脑内一系列早期即刻基因 c-fos 和 c-jun 的高度表达,应用经典的 K_{ATP} 激动剂分别在缺血前、缺血再灌注期予以处理,发现 K_{ATP} 激动剂完全阻断了缺血引起的早期即刻基因 c-fos 和 c-jun 等基因的表达,对神经元的凋亡具有显著的保护作用,但被 K_{ATP} 阻滞剂消除^[7]。体外试验表明,激活 K_{ATP} 可抑制缺氧引起的细胞内 Ca^{2+} 超载^[8]。说明 K_{ATP} 在大脑缺血、缺氧的反应性保护作用中起重要作用。

在未受刺激的正常情况下脑细胞内 c-fos、c-jun 基因处于低水平的表达。当脑组织受到生理或病理因子刺激时,可迅速而短暂地表达增多,其表达产物 c-fos 蛋白可与 c-jun 蛋白结合成异源二聚体 AP-1,进一步调控目的基因的表达,发挥第三信使作用^[9]。暂时的一过性表达可能参与了细胞的保护修复及神经纤维的重塑再生,而持续过度的表达则可能与疾病的发生发展有关。

新生鼠脑持续缺血后再低氧在海马和皮层部位可同时诱导出 c-fos 和 c-jun 蛋白,提示新生鼠脑组织在细胞外刺激下具备特殊基因表达的功能,这种功能的存在可能对神经元的生长、分化、再生和重塑起着重要作用。同时皮层表达 c-fos 和 c-jun 蛋白明显低于海马,与 Gubits RM 等^[10]的实验结果相似。推测新生鼠脑皮层对 HI 的敏感性较海马高,低氧后短时间内部分细胞即丧失功能,无法表达特殊基因。

针刺作为我国传统医学中一种重要的治疗方法,其抗 HI 作用已得到确证。它的作用是多环节、多通道、多靶点的。我们的结果表明, K_{ATP} 阻滞剂预处理明显增加了海马 c-fos 和 c-jun 蛋白的表达。而配合电针预处理可以降低海马 c-fos 和 c-jun 蛋白的持续表

达。这提示针刺预处理抗 HI 作用可能与激活了 K_{ATP} 有关,即可能促进了 K_{ATP} 开放,抑制电压依赖性钙通道开放,减轻 Ca^{2+} 超载和减少兴奋性神经递质的释放;另外一方面,降低 c-fos 和 c-jun 蛋白的表达,抑制其诱发 HI 后神经细胞凋亡^[3],从而起到对 HIBI 的保护作用。提示结合 K_{ATP} 激动剂和电针预处理,可加强对神经细胞的保护作用。目前电针预处理对 K_{ATP} 的作用尚未见直接证据,有待进一步研究。

参 考 文 献

- 1 黄慧玲. 针刺法结合西医疗疗颅脑损伤的研究进展. 中国康复医学杂志 1998;13(3):132—134.
- 2 Yamada K, Ji JJ, Yuan H, et al. Protective role of ATP-sensitive potassium channels in hypoxia-induced generalized seizure. Science 2001;292(5521):1543—1546.
- 3 Akins PT, Liu PK, Hsu CY. Immediate early gene expression in response to cerebral ischemia: friend or foe? Stroke 1996;27:1682—1687.
- 4 Rice JE, Vannucci RC, Brierley JB. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. Annals of Neurology 1981;9(2):131—142.

- 5 罗勇,黄仲荪,徐晨,等. 针刺对缺血性脑梗塞大鼠皮层神经元线粒体影响的形态计量研究. 上海针灸杂志 1996;15(6):28—32.
- 6 Severine D, Nicole M, Karine D. Homocysteine decreases endothelin-1 expression by interfering with the AP-1 signaling pathway. Free Radical Biology & Medicine 2002;33(5):659—668.
- 7 Heurteaux C, Bertaina V, Widmann C, et al. K^+ channel openers prevent global ischemia-induced expression of c-fos, c-jun, heat shock protein, and amyloid beta-protein precursor genes and neuronal death in rat hippocampus. Proc Natl Acad Sci USA 1993;90(20):9431—9435.
- 8 Wan Q, Yao H, Wang F. Involvement of K^+ channels in the inhibitory effects of adenosine on anoxia-induced Ca^{2+} increase in cultured rat hippocampal CA1 neurons. Biol Signals Recept 1999;8(4/5):309—315.
- 9 Morgan JJ, Curran T. Immediate-early genes: ten years on. Trends 1995;18:200—201.
- 10 Gubits RM, Burke RE, Casey-McIntosh G, et al. Immediate-early genes induction after neonatal hypoxia-ischemia. Mol Brain Res 1993;18(3):228—238.

(收稿:2003-02-08 修回:2003-04-30)

谈中药药性理论有关术语的英译

袁洪仁

R2, H3 | B

中药药性理论的内容,包括四气、五味、升降浮沉和归经等。它是古代医家在长期的医疗实践中对药物作用的认识,其中四气、五味来自于自然界的气化,故以“司岁备物”(《素问·至真要大论》)之运气理论作指导。中药药性理论有关术语的英译应忠实于此事实,现分述如下。

1 四气的英译 四气是指寒、热、温、凉四种不同的药性,是古代医家在长期的医疗实践中总结出来的:能治热性病的药物多属寒凉性质,能治寒性病的药物多属温热性质。寒与凉、热与温仅是程度上的区别。故“四气”译作“four drug-Qi”,意为“四种药气”、“四种药性”。后缀“-Qi”既表达了作为中药四种药性的四气称呼,又表达了药性与自然界气化、药物临床功效(中医藏象学说中 Qi 有“功能”之意)的相关性。相应地,四气所包括的寒、热、温、凉四性分别译作“cold-Qi”“hot-Qi”“warm-Qi”“cool-Qi”。以“cool-Qi”为例,意为“寒性”、“气化之性寒”、“功效之性寒”,余类推。至于平性,是指药性平和,微有偏温偏凉之异,仍在四性之中,可译作“mild-Qi”。平性偏温或偏凉,分别译作“mild warm-Qi”、“mild cool-Qi”。因“mild”有“轻的、温和的、非极端的”之意。

2 五味的英译 五味指辛、甘、酸、苦、咸五种不同的药味。它与药物作用密切联系,人们又常据药物功效反过来推断

药味,与口尝不符。事实上,五味实质是天地四季五气气化产生的,即风化、热化、湿化、寒化、燥化的结果。故“五味”译作“five taste-Qi”,意为“五种气化之味”、“五种功效之味”。这种译法,前缀“-tase-”表达了药味原本是直接口尝感觉出的味道,后缀“-Qi”则不仅表达了药味是对药物功能的认识(藏象学说中 Qi 有“功能”之意),而且表达了药味来自于自然界的气化。相应地,五味所包括的辛、甘、酸、苦、咸,分别译作“acrid-Qi”、“sweet-Qi”、“sour-Qi”、“bitter-Qi”、“salty-Qi”。以“acrid-Qi”为例,意思就是指“气化之味辛”、“功效之味辛”,余类推。至于淡味、涩味,其作用近于甘味、酸味,仍在五味之中,分别译为“Tasteless-Qi”、“Astringent-Qi”。

3 升降浮沉和归经的英译 升降浮沉是药物在治疗作用中的趋向,升浮药主向上向外,沉降药主向下向内,故升、降、浮、沉分别译作 Upward-Qi, Downward-Qi, Outward-Qi, Inward-Qi。以“Upward-Qi”为例,意思为“升性”、“上升之效”,余类推。相应地,升浮药和沉降药,分别译作 Up-outward Qi drug, Down-inward-Qi drug。至于归经,是指药物归向以五脏为核心的经络联通的身体各组织部分,译作“Em-stem of neurovaso-Qiduot (SNVQ)”,意为“所入经脉”(袁洪仁. 谈经络学学术语的英译. 中国中西医结合杂志 2001;21(3):198)。与此相关的引经药,指某些具有引导其它药物到达病变部位之作用的药物,故译作“Guide-drug”,意为“向导药”。

(收稿:2003-06-06 修回:2003-09-18)