

· 基础研究 ·

电针对脑缺血再灌注大鼠内质网应激关键因子 GRP-78、Caspase-12 表达的影响

余琴华¹ 于涛² 徐建永³ 谢天炽⁴

摘要 **目的** 观察电针对脑缺血再灌注大鼠不同时间点脑缺血区神经细胞凋亡及内质网应激凋亡通路信号分子葡萄糖调节蛋白(GRP78)和 Caspase-12 影响。**方法** 126 只 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组、电针组,其中假手术组 6 只,模型组和电针组各 60 只。模型组和电针组再随机分为再灌注 6、12、24、48、72 h 组,每组 12 只,采用改良线栓法制备局灶性脑缺血再灌注模型。电针组电针百会和大椎,每次 30 min,每 12 h 治疗 1 次,假手术组和模型组大鼠捆绑固定 30 min,不做任何治疗。假手术组于手术后 24 h、各组大鼠于相应时间进行神经学分级评定后处死大鼠并提取脑组织,观察海马 CA1 区形态学改变。TUNEL 法检测各组神经细胞凋亡指数,免疫组化法和 Western blot 检测脑组织 GRP78、Caspase-12 蛋白表达的变化。**结果** 模型组和电针组海马 CA1 出现不同程度细胞凋亡变形。与本组前一时间点比较,模型组及电针组再灌注 12、24、48、72 h 神经功能评分降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),再灌注 12、24 h 神经细胞凋亡指数、Caspase-12 阳性细胞数、Caspase-12 蛋白表达升高($P < 0.05$, $P < 0.01$),再灌注 48、72 h 神经细胞凋亡指数、Caspase-12 阳性细胞数及蛋白表达降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),再灌注 12 h GRP78 阳性细胞数、GRP78 蛋白表达升高($P < 0.05$, $P < 0.01$),再灌注 24、48、72 h GRP78 阳性细胞数及蛋白表达降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与模型组同期比较,电针组再灌注 12、24、48、72 h 神经学评分、Caspase-12 阳性细胞数降低($P < 0.05$, $P < 0.01$);电针组各时间点神经细胞凋亡指数、GRP78 阳性细胞数及蛋白表达、Caspase-12 蛋白表达降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论** 缺血再灌注 24 h 为神经元凋亡高峰,Caspase-12 的免疫活性出现的时间晚于 GRP78。电针可能通过抑制 GRP78、Caspase-12 的释放和激活减轻脑缺血再灌注后不同时间所致缺血脑神经细胞凋亡。

关键词 电针;脑缺血再灌注损伤;细胞凋亡;内质网;葡萄糖调节蛋白 78;Caspase-12

Effects of Electroacupuncture on the Expression of the ERS Key Factor GRP78 and Caspase-12 in Focal Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury Rats YU Qin-hua¹, YU Tao², XU Jian-yong³, and XIE Tian-chi⁴ 1 Teaching and Research Section of Acupuncture and Tuina, College of Health Sciences, Guangzhou Medical University, Guangzhou (510925); 2 Department of Acupuncture and Moxibustion, Traditional Chinese Medicine Hospital of Guangdong Province, Guangzhou (510120); 3 Teaching and Research Section of Biochemistry, College of Health Sciences, Guangzhou Medical University, Guangzhou (510925); 4 Teaching and Research Section of Genetic and Cell Biology, Guangzhou Medical University, Guangzhou (511436)

ABSTRACT **Objective** To observe the dynamic changes of glucose regulated protein(GRP) 78 Caspase-12 in cerebral nerve cell apoptosis and endoplasmic reticulum stress apoptotic pathway at different time points after electroacupuncture(EA) in rats with cerebral ischemia and reperfusion. **Method** Totally 126 SD rats were randomly divided into sham-operation group, model group and EA group, inclu-

基金项目:广东省中医药局科研项目(No. 20141177),广州医科大学卫生职业技术学院科研基金项目(No. 2012007)

作者单位:1.广州医科大学卫生职业技术学院针灸推拿教研室(广州 510925);2.广东省中医院针灸科(广州 510120);3.广州医科大学卫生职业技术学院生物化学教研室(广州 510925);4.广州医科大学遗传与细胞生物学教研室(广州 511436)

通讯作者:余琴华, Tel: 020-87978410, E-mail: yuqinhua@126.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20180319.157

ding 6 rats in the sham-operation group, 60 in the model group and the rest 60 in the EA group. Rats in the model group and EA group were randomized into reperfusion groups of 6 h, 12 h, 24 h, 48 h, and 72 h, 12 rats in each group. Modified thread embolization method was used to establish focal cerebral ischemia-reperfusion model. In the EA group, EA were performed to rats at GV 20 (Baihui) and GV 14 (Dazhui) for 30 min every 12 hours, while rats in the sham-operation group and the model group were fixed for 30 min without any treatment. Rats in the sham-operation group were sacrificed 24 hours after operation, and rats in other groups were sacrificed after being evaluated neurological function scores at each time points. Brain tissues were extracted and the morphological changes of hippocampal CA1 region were observed. TUNEL method was utilized to detect the apoptosis index (AI) of nerve cells; immunohistochemistry and Western blot were utilized to determine protein expression changes of GRP78 and Caspase-12 in brain tissues. Results The model group and EA group showed different degrees of morphological changes of cells in hippocampal CA1 region. Compared with that of the previous time point in the same group, the neurological function scores of 12 h, 24 h, 48 h, and 72 h in the model group and the EA group were reduced ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The AI of nerve cell, the number of Caspase-12 positive cells and the expression of Caspase-12 protein of 12h and 24 h in the model group and EA group increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The AI of nerve cell, the number of Caspase-12 positive cells and the expression of Caspase-12 protein of 24 h and 72 h in model group and EA group reduced ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The number of GRP78 positive cells and the expression of GRP78 protein of 12h in model group and EA group increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The number of GRP78 positive cells and the expression of GRP78 protein of 24 h, 48 h and 72 h in the model group and the EA group decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the model group at the same time, the neurological function scores and the Caspase-12 positive cell number of 12 h, 24 h, 48 h and 72 h in EA group decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$); AI of nerve cell, the number of GRP78 positive cells, the expression of GRP78 protein and the expression of Caspase-12 protein at different time points in the EA group decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Conclusion The peak of neuronal apoptosis is 24 h after ischemia with reperfusion. The immune activity of Caspase-12 appears later than that of GRP78. EA may inhibit the release and activation of GRP78 and Caspase-12 to reduce the apoptosis of ischemic cerebral nerve cells in different time points after cerebral ischemia-reperfusion.

KEYWORDS electroacupuncture; cerebral ischemia /reperfusion injury; apoptosis; endoplasmic reticulum stress; glucose-regulated protein 78; Caspase-12

脑缺血后再灌注一方面会改善脑组织缺血缺氧程度,另一方面也会触发一系列复杂的级联反应,包括氧自由基产生、钙超载、线粒体损害等,从而导致多种形式的神经细胞凋亡。内质网应激(endoplasmic reticulum stress,ERS)反应性凋亡途径是一条有别于死亡受体介导和线粒体介导的新的信号通路^[1],它在多种疾病发生发展中都扮演重要角色^[2,3]。研究发现脑缺血再灌注后存在钙稳态失衡和过氧化损伤,由此可引起内质网应激反应,诱发细胞凋亡,内质网应激在脑缺血再灌注损伤的过程中,处于中心地位^[4]。针灸能从细胞、分子等多层面起到促进脑卒中脑功能恢复的作用,可能与其多靶点、多途径的作用特点有关^[5]。本实验观察了电针对大鼠脑缺血再灌注后 ERS 介导凋亡关键的信号分子葡萄糖调节蛋白 78(glucose-regulated protein 78,GRP78)和 Caspase-12 表达的影响,分析电

针对脑缺血再灌注后神经元凋亡信号通路干预的可能机制及其分子生物学作用机制。

材料与方法

1 动物 健康雄性 SPF 级 SD 大鼠 126 只,体重(200 ± 50)g。由广东省医学实验动物中心提供,动物合格证号:2013A008,许可证号:SCXK(粤)2013-0002。广州医科大学动物实验中心清洁级动物房饲养,室温设置:21 ~ 27 °C,湿度 50% ~ 70%,自由饮水、进食,适应性饲养 1 周。本实验方案经广州医科大学实验动物伦理委员会审核(No. GY20150028)。

2 试剂与仪器 TUNEL 试剂盒、蛋白酶 K、BCIP/NBT 显色液均购自武汉博士德生物工程有限公司,批号分别为:MK1020、AR0056、AR0043;核快红

复染液、鼠 SP kit 试剂盒均购自福州迈新生物技术开发有限公司,批号分别为:CTS-3099、KIT-9701;组织蛋白提取液、广谱蛋白 Marker 均购自碧云天生物技术有限公司,批号分别为:P0013G、P0010;羊抗兔 IgG-HRP 购自北京博奥森生物技术有限公司,批号:bs-0295G;GRP78 单克隆抗体、兔抗 Caspase-12 多克隆抗体均购自美国 Abcam,批号分别为:ab104369、ab104224;ECL 高灵敏度化学发光检测试剂盒购自广州赛哲生物科技有限公司,批号:G3308。手术显微镜及器械,苏州医疗器械总厂;BL2410 生物机能实验系统,成都泰盟科技有限公司;G6805 型电针仪,上海医疗仪器厂,批号:YZB/沪 0735-26-2012;华佗牌无菌针灸针(0.25 mm × 40 mm),苏州医疗用品有限公司,批号:150601。

3 动物造模及分组 使用 SPSS 制作随机数字将 126 只 SD 大鼠随机分为假手术组(6 只)、模型组(60 只)、电针治疗组(60 只)。模型组和电针组采用改良线栓法^[6]制备大鼠局灶性大脑中动脉阻断缺血再灌注模型,缺血 2 h 后将栓线退出直至头端达到颈总动脉分叉处(有阻力感),所有大鼠均造模成功。假手术组只分离神经和血管,不插入线栓。

4 干预方法 电针组选取督脉经穴百会和大椎,“百会”穴平刺,“大椎”穴斜刺(约 30°角),深度均为 5 mm,取穴标准及针刺深度参照“常用动物腧穴图谱”^[7]。捻转刺激 30 s 后,接 G 6805 型电针仪,采用疏密波,5~10 Hz,以穴周组织轻微抖动为度,约 3~5 V,每次时间 30 min,各组于再灌注 2 h 时间点开始电针治疗,以后每 12 h 治疗 1 次。假手术组和模型组大鼠每次均被抓取并且捆绑固定于针灸治疗台上 30 min,但不做任何治疗。

5 检测指标及方法 模型组和电针组大鼠于再灌注 6、12、24、48、72 h,假手术组于再灌注 24 h 进行神经学评分后,以 1 mL 10%水合氯醛注射麻醉至其深度昏迷,随机选取 6 只大鼠提取脑组织,取材方法:将麻醉大鼠迅速断头取出完整脑组织置于冰板上,从视交叉后 1.4 mm 处各切一刀,取中段迅速放入 EP 管中,投入液氮速冻,随后保存于 -80 °C 冰箱中,用于蛋白的提取。随机选取 6 只大鼠制作大鼠脑组织石蜡标本,取材方法:将深度麻醉大鼠用 100 mL 肝素生理盐水快速灌注冲洗,随后以 4%多聚甲醛 PBS 缓冲液(40 °C pH 7.4)经主动脉弓灌注约 30 min。立即取脑,所取部位与用来做 Western blot 检测部位同,置于 10%福尔马林溶液中 4 °C 固定 7 天,常规冲洗、脱水、透明、包埋,做成石蜡块,连续冠状切片,片厚 5 μm。

5.1 神经学评分 参照行为检查评分标准^[8],由不了解分组并经专业培训的研究人员(2 人)分别对大鼠进行评分,再将 2 人评分进行平均后计为最终得分。

5.2 病理组织学观察 取模型组及电针组再灌注 24 h 组石蜡切片,常规 HE 染色。于光镜下观察海马 CA1 区。

5.3 凋亡细胞检测 将石蜡切片脱蜡,按 TUNEL 试剂盒说明进行染色,二氨基联苯胺(DAB)显色。于光镜下观察,TUNEL 阳性细胞胞核中呈现蓝黑色颗粒。在 400 倍光镜下,随机选取缺血半暗带区(IP)相应部位 30 个视野,计数阳性细胞数及细胞总数,计算凋亡指数(AI) = TUNEL 阳性细胞数/细胞总数 × 100%。

5.4 免疫组化法检测 GRP78 及 Caspase-12 阳性细胞数 将石蜡切片常规脱蜡至水。枸橼酸盐微波修复,室温放置冷却;0.2 mol/L PBS 冲洗 3 次后滴加 GRP78 浓缩液 1:200 稀释液,或 Caspase-12 浓缩液 1:100 稀释液 50 μL 于玻片上,放于湿盒 4 °C 过夜;0.2 mol/L PBS 冲洗 3 min × 3 次后滴加二抗,室温静置 10 min;0.2 mol/L PBS 冲洗 3 min × 3 次后加第三抗体(S-A/HRP) 1:100,37 °C 放置 10 min;0.2 mol/L PBS 冲洗 2 min × 3 后滴加新鲜配制的 DAB 显色液,显微镜下观察,出现较强的棕黄色后终止染色,然后充分冲洗;苏木素淡染细胞核 3 min,水洗,酒精梯度脱水,二甲苯透明封片,显微镜下观察。每次实验均设立替代对照组(以免血清替代一抗)及空白对照组(以 PBS 替代一抗)。胞浆中出现棕黄色颗粒、胞核不着色者为免疫阳性细胞。每组每只动物随机取 3 张切片,随机选取缺血半暗带区相应部位 10 个不重复视野,计数阳性细胞数。

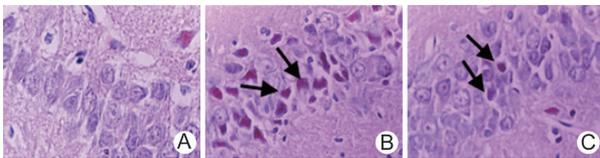
5.5 Western blot 检测 GRP78 及 Caspase-12 表达 取冷冻组织 50 mg,放入 1.5 mL 离心管。加入 500 μL 细胞裂解液,超声波破碎仪破碎后,补加 200 μL 裂解液至 700 μL,混匀后充分裂解 30 min。40 °C, 12 000 r/min, 15 min 离心。转移上清至新的离心管内, -70 °C 保存。按照 BCA 蛋白定量试剂盒使用说明测定蛋白浓度。取 40 μL 蛋白样品上样,用 12% SDS-PAGE 胶进行电泳分离,利用电转系统转至 PVDF 膜印迹。用 TBST 配制的 5%的脱脂奶粉作为封闭液封闭 1 h。将配制好的一抗:兔抗鼠 GRP78 单克隆抗体(1:1 000),兔抗鼠 Caspase-12 多克隆抗体(1:800)分别倒入塑料槽内,室温放置 30 min 后,4 °C 过夜。次日,分别加入羊抗兔 IgG-HRP,室温

孵育 1 h, TBST 漂洗 3 次后, 暗室内 ECL 化学发光显影、定影。将定影后的胶片照相, 并用 Quantity one 软件对结果进行灰度值分析。各目的条带与 β -action 的吸光度比值为目的蛋白的相对表达量。

6 统计学方法 采用 SPSS 19.0 软件包进行数据分析。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用多样本两两比较, 方差齐时采用 Tukey 法, 方差不齐采用秩和检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组海马 CA1 区病理形态观察(图 1) 再灌注 24 h, 假手术组海马 CA1 区结构清晰, 细胞排列整齐紧密、分布均匀, 胞浆丰富、均匀、淡染, 胞核淡染, 核呈圆形或椭圆形, 核仁清晰; 模型组海马 CA1 区细胞层次紊乱, 神经元嗜酸性变, 胞体和胞核固缩、深染, 核仁不清楚, 出现大量杆状或三角形外观神经元; 电针组海马 CA1 区有少量神经元嗜酸性变, 但细胞排列尚规整, 可见较多核膜完整、核仁清晰的神经元。



注:A 为假手术组; B 为模型组; C 为电针治疗组

图 1 各组海马 CA1 区病理形态变化 (HE, $\times 400$)

2 各组神经学评分的比较(表 1) 与假手术组同期比较, 模型组再灌注 24 h 神经学评分升高 ($P < 0.05$); 与本组前一时间点比较, 模型组及电针组再灌注 12、24、48、72 h 神经功能评分降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与模型组同期比较, 电针组再灌注 12、24、48、72 h 神经学评分降低 ($P < 0.05$)。

表 1 各组神经学评分比较 (分, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	神经学评分				
		6 h	12 h	24 h	48 h	72 h
假手术	6	—	—	0 ^{*△}	—	—
模型	12	6.56 ± 0.69	5.72 ± 0.89 [*]	4.13 ± 0.86 [*]	3.33 ± 0.46 [*]	2.15 ± 0.85 [*]
电针	12	6.47 ± 0.88	5.25 ± 1.03 ^{*△}	3.25 ± 0.75 ^{*△}	2.85 ± 0.45 ^{*△}	1.33 ± 0.65 ^{**△}

注: 与本组前一时间点比较, $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$; 与模型组同期比较, $^{\Delta}P < 0.05$

表 2 各组神经细胞 AI 比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

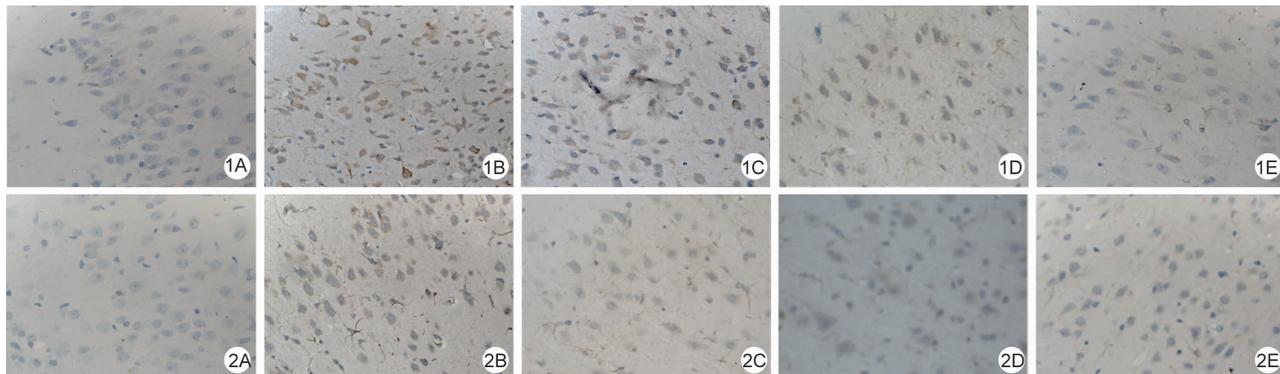
组别	n	AI				
		6 h	12 h	24 h	48 h	72 h
假手术	6	—	—	2.17 ± 0.68 ^{*△}	—	—
模型	6	20.16 ± 4.13	31.63 ± 7.21 [*]	54.23 ± 8.99 [*]	41.13 ± 6.28 [*]	28.16 ± 6.23 [*]
电针	6	15.02 ± 1.96 [△]	22.36 ± 3.56 ^{*△}	43.28 ± 2.06 ^{*△}	28.48 ± 2.23 ^{*△}	11.84 ± 3.64 ^{*△}

注: 与本组前一时间点比较, $^*P < 0.01$; 与模型组同期比较, $^{\Delta}P < 0.01$

3 各组神经细胞 AI 比较(表 2) 模型组和电针组神经细胞 AI 均在再灌注 24 h 到达高峰, 与假手术组同期比较, 模型组再灌注 24 h AI 升高 ($P < 0.01$); 与本组前一时间点比较, 模型组及电针组再灌注 12、24 h 神经细胞 AI 升高 ($P < 0.01$), 再灌注 48、72 h 降低 ($P < 0.01$)。与模型组同期比较, 电针组各时间点神经细胞 AI 降低 ($P < 0.01$)。

4 各组 GRP78、Caspase-12 阳性细胞数比较(表 3, 图 2) 模型组和电针组 GRP78 阳性细胞数在再灌注 12 h 到达高峰, Caspase-12 阳性细胞数在再灌注 24 h 到达高峰。与假手术组同期比较, 模型组再灌注 24 h GRP78 和 Caspase-12 阳性细胞数升高 ($P < 0.01$); 与本组前一时间点比较, 模型组及电针组再灌注 12 h GRP78 阳性细胞数升高 ($P < 0.01$), 再灌注 24、48、72 h GRP78 阳性细胞数降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 再灌注 12、24 h Caspase-12 阳性细胞数升高 ($P < 0.01$), 再灌注 48、72 h Caspase-12 阳性细胞数降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 与模型组同期比较, 电针组各时间点 GRP78 阳性细胞数降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 再灌注 12、24、48、72 h Caspase-12 阳性细胞数降低 ($P < 0.01$)。

5 各组 GRP78 和 Caspase-12 蛋白表达比较(表 4, 图 4、5) 模型组和电针组 GRP78 蛋白表达在再灌注 12 h 到达高峰, Caspase-12 蛋白表达在再灌注 24 h 到达高峰。与本组前一时间点比较, 模型组及电针组再灌注 12 h GRP78 蛋白表达升高 ($P < 0.05$), 再灌注 24、48、72 h GRP78 蛋白表达降低 ($P < 0.05$), 再灌注 12、24 h Caspase-12 蛋白表达升高 ($P < 0.05$), 再灌注 48、72 h Caspase-12 蛋白表达降低 ($P < 0.05$); 与模型组同期比较, 电针组各时间点 GRP78 和 Caspase-12 蛋白表达降低 ($P < 0.05$)。



注:A 为假手术组;B 为模型组再灌注 24 h;C 为电针组再灌注 24 h;D 为模型组再灌注 72 h;E 为电针组再灌注 72 h;1 为 CRP78;2 为 Caspase-12

图 2 各组 CRP78, Caspase-12 免疫阳性细胞表达 (DAB, ×400)

表 3 各组再灌注各时间点 GRP78、Caspase-12 阳性细胞计数比较 (个/高倍镜视野, $\bar{x} \pm s$)

组别	时间	n	GRP78	Caspase-12
假手术	24 h	6	2.12 ± 0.78 ^{△△}	1.46 ± 0.48 ^{△△}
模型	6 h	6	43.33 ± 8.35	8.81 ± 2.83
	12 h	6	65.67 ± 11.76 ^{**}	26.00 ± 6.67 ^{**}
	24 h	6	55.67 ± 7.45 ^{**}	43.33 ± 8.43 ^{**}
	48 h	6	42.89 ± 9.16 ^{**}	32.27 ± 2.25 [*]
	72 h	6	33.67 ± 12.87 ^{**△}	23.33 ± 1.63 ^{**}
电针	6 h	6	33.67 ± 9.54 ^{△△}	8.17 ± 2.23
	12 h	6	46.43 ± 11.67 ^{**△△}	21.45 ± 4.68 ^{**△△}
	24 h	6	33.39 ± 3.65 ^{*△△}	28.63 ± 4.75 ^{**△△}
	48 h	6	22.87 ± 3.32 ^{**△}	16.72 ± 1.44 ^{*△△}
	72 h	6	12.67 ± 11.67 ^{*△△}	8.67 ± 2.46 ^{**△△}

注:与本组前一时间点比较, *P < 0.05, **P < 0.01;与模型组同期比较, [△]P < 0.05, ^{△△}P < 0.01

表 4 模型组和电针组 GRP78、Caspase-12 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	时间	n	GRP78	Caspase-12
模型	6 h	6	0.56 ± 0.10	0.30 ± 0.02
	12 h	6	0.95 ± 0.02 [*]	0.35 ± 0.05 [*]
	24 h	6	0.89 ± 0.05 [*]	0.56 ± 0.15 [*]
	48 h	6	0.76 ± 0.10 [*]	0.51 ± 0.05 [*]
	72 h	6	0.64 ± 0.04 [*]	0.45 ± 0.04 [*]
电针	6 h	6	0.42 ± 0.05 [△]	0.12 ± 0.01 [△]
	12 h	6	0.74 ± 0.10 ^{*△}	0.24 ± 0.01 ^{*△}
	24 h	6	0.61 ± 0.01 ^{*△}	0.38 ± 0.10 ^{*△}
	48 h	6	0.47 ± 0.02 ^{*△}	0.29 ± 0.01 ^{*△}
	72 h	6	0.23 ± 0.05 ^{*△}	0.23 ± 0.05 ^{*△}

注:与本组前一时间点比较, *P < 0.05;与模型组同期比较, [△]P < 0.05

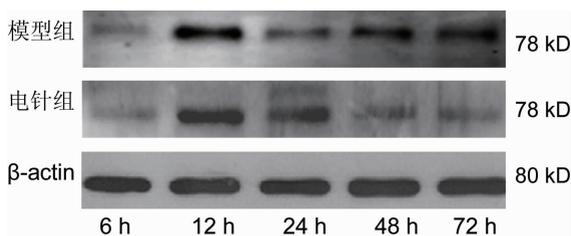


图 3 各组 GRP78 蛋白电泳图

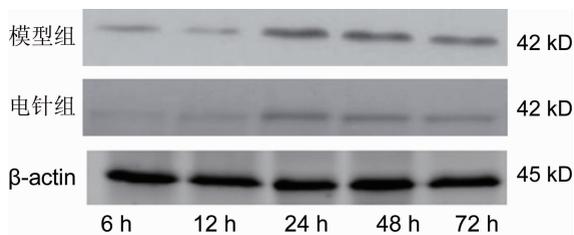


图 4 各组 Caspase-12 蛋白电泳图

讨 论

脑缺血再灌注是严重的应激条件,能够导致内质网应激而引发神经细胞凋亡^[9,10]。Nakka VP 等^[4]在局灶性脑缺血再灌注模型中,观察到脑缺血再灌注损伤诱导内质网应激反应,内质网应激凋亡通路关键蛋白 Caspase-12、GRP78 的表达会上调;实验进一步给予抑制剂抑制关键蛋白的活化,发现会减弱内质网应激反应,明显减轻脑缺血损伤,表现为脑梗塞面积减少,神经细胞凋亡减少。由此可见抑制内质网应激,保护内质网功能,是减轻脑缺血再灌注损伤的重要机制。近年诸多对内质网应激凋亡通路的干预性研究^[11,12]进一步证实了大鼠脑缺血/再灌注后内质网应激关键蛋白 GRP78、Caspase-12 mRNA 及蛋白表达均较假手术组明显增高,而且其动态变化与神经元凋亡的演变规律基本一致,说明内质网信号通路参与了脑缺血后神经元凋亡的调控。

针刺作为中国传统治疗手法,在脑缺血治疗及后遗症预防方面卓有成效,国内最早从细胞凋亡角度展开研究的见于 1998 年施静等^[13]的报道,随着神经分子生物学的发展,针刺抗凋亡作用的机制已成为众多学者关注的焦点,现在研究表明:电针对脑缺血再灌注大鼠有脑保护作用,其机制可能是与通过提高 P53 蛋

白、Bcl-2 蛋白等相关因子的表达和抑制 Caspase-3 和 Bax 基因表达来调节细胞凋亡有关^[14,15]。“病变在脑,首取督脉”的说法古已有之,今取督脉要穴——百会、大椎醒神开窍,活血行气。临床上,这两穴是治疗脑中风的常用穴位,不论在预防、急性期的中经络或中脏腑,还是在缓解期与后遗症皆可用^[16],是非常值得深入研究的穴位。已有研究发现针刺督脉治疗脑梗死,可能通过调节 FADD-Caspase-8 通路,减少脑细胞凋亡的发生,从而改善脑缺血再灌注损伤^[17];陈东风等^[18]发现电针刺刺激百会和大椎两穴可减轻大鼠脑缺血再灌注后神经细胞凋亡,能刺激 PI3-K/Akt 信号通路的表达;但对针灸干预两穴对脑缺血再灌注后内质网应激通路介导凋亡的研究尚未展开,所以本研究选用电针百会、大椎穴,探讨针刺治疗减轻脑缺血再灌注损伤的有效作用机制。

本研究对脑缺血再灌注 6、12、24、48、72 h 不同时间脑缺血区神经细胞损伤、凋亡及内质网应激凋亡通路信号分子 GRP78 和 Caspase-12 进行了动态研究,并对比了电针的干预效应。研究发现,再灌注 6 h 时间点有 TUNEL 阳性细胞出现,此时模型组在缺血半暗带区(IP 区)即有 GRP78 免疫阳性细胞表达,而此时 IP 区只有少量 Caspase-12 免疫阳性细胞出现;两者均随再灌注时间的延长表达不断增长,GRP78 再灌注 12 h 到达表达高峰,24 h 后表达开始减少,Caspase-12 再灌注 24 h 到达表达高峰,48 h 后表达开始减少,提示 Caspase-12 的免疫活性出现的时间晚于 GRP78,结果与 Nakka VP 等^[4]研究结果一致。以上研究显示,脑缺血再灌注引发神经元凋亡的高峰期在 24 h,内质网应激凋亡通路的关键蛋白表达有先后,提示临床上对于脑卒中患者在有效时间窗内溶栓后应尽早(24 h 内)实施抗凋亡治疗,以减轻脑缺血再灌注损伤;由于 Caspase-12 的免疫活性出现的时间晚于 GRP78,基于临床用药实际,研制 Caspase-12 抑制剂更有利用推广。

在电针组与模型组的比较中,笔者发现电针治疗对再灌注各时间点动物模型的神经学评分有不同程度的改善,对神经元凋亡高峰期——再灌注 24 h 组的病理形态学观察中,电针组神经细胞损伤在形态学上有明显改善,提示电针对脑缺血再灌注所致损伤有改善的作用;进一步研究发现,电针组的 GRP78、Caspase-12 的表达变化趋势时间上与假手术组相同,但在缺血再灌注 6、12、24、48、72 h,每个时间观察到的蛋白表达量均少于假手术组($P < 0.05$, $P < 0.01$),提示电针治疗对 GRP78、Caspase-12 的释放

和激活存在抑制作用,电针可通过干预内质网介导的 Caspase-12 依赖的细胞凋亡通路,抑制细胞凋亡的发生。提示临床上对于脑卒中的患者尽早使用电针有利于减少内质网应激,减轻脑缺血再灌注损伤。

综上所述,通过观察电针对脑缺血再灌注后不同时间所致脑缺血区神经细胞损伤、凋亡及凋亡信号关键分子的对比研究,笔者发现电针对脑缺血再灌注后不同时间所致缺血脑神经细胞凋亡有减轻作用,对内质网应激介导的凋亡通路有干预作用,主要是通过抑制 GRP78、Caspase-12 的释放和激活,降低凋亡率,发挥神经保护作用。这可能是针刺改善缺血再灌注损伤的部分作用机制。

利益冲突:无。

参 考 文 献

- [1] Walter P, Ron D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation [J]. *Science*, 2011, 334(6059): 1081–1086.
- [2] Ito D, Suzuki N. Seipinopathy: a novel endoplasmic reticulum stress-associated disease [J]. *Brain*, 2009, 132(Pt1): 8–15.
- [3] El-Sahar AE, Safar MM, Zaki HF, et al. Neuroprotective effects of pioglitazone against transient cerebral ischemia reperfusion injury in diabetic rats: Modulation of antioxidant, anti-inflammatory, and anti-apoptotic biomarkers [J]. *Pharmacol Rep*, 2015, 67(5): 901–906.
- [4] Nakka VP, Gusain A, Raghbir R. Endoplasmic reticulum plays critical role in brain damage after cerebral ischemia/reperfusion in rats [J]. *Neurotox Res*, 2010, 17(2): 189–202.
- [5] 陈坚, 陈汉平, 程介士. 缺血性脑损伤与针药超早期治疗 [J]. *中国针灸*, 2001, 21(1): 37–39.
- [6] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20(2): 84.
- [7] 余曙光, 徐斌主编. 实验针灸学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2012: 269–272.
- [8] 徐叔云, 卞如镰, 陈修主编. 药理学实验方法 [M]. 第 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 1066–1067.
- [9] Morimoto N, Oida Y, Shimazawa M, et al. Involvement of endoplasmic reticulum stress after middle cerebral artery occlusion in mice [J]. *Neuroscience*, 2007, 147(4): 957–967.
- [10] Xin Q, Ji BY, Cheng BH, et al. Endoplasmic reticulum stress in cerebral ischemia [J]. *Neurochem*

- Int, 2014, 68 (3), 18 - 27.
- [11] Kwan SK, Ahn M, Song HJ, et al. Nafamostat mesilate attenuates transient focal ischemia/reperfusion-induced brain injury via the inhibition of endoplasmic reticulum stress [J]. Brain Res, 2015, 1627(11): 12 - 20.
- [12] Zhao YM, Fang YL, Zhao HP, et al. Chrysophanol inhibits endoplasmic reticulum stress in cerebral ischemia and reperfusion mice [J]. Eur J Pharmacol, 2018, 818(1): 1 - 9.
- [13] 施静, 刘晓春, 张静, 等. 电针对脑缺血神经元凋亡影响的形态学研究 [J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 1998, 7 (3): 391 - 396.
- [14] 周红艳, 范军铭, 王军, 等. 电针对局灶性脑缺血大鼠海马神经细胞凋亡及 Bcl-2、Bax、Caspase-3 表达的影响 [J]. 辽宁中医杂志, 2009, 36(8): 1427 - 1429.
- [15] 沈梅红, 刘晓华, 李纓, 等. 电针调节脑缺血再灌注大鼠大脑皮层 Bcl-2 和 Bax mRNA 的表达 [J]. 辽宁中医杂志, 2012, 39(1): 155 - 157.
- [16] 程南方, 谭峰. 中风病“肾 - 肝 - 脑”轴及针刺督脉治疗研究 [J]. 世界科学技术 - 中医药现代化, 2014, 16 (8): 1824 - 1826.
- [17] 罗文舒, 吴永刚, 徐绍刚, 等. 针刺督脉对脑缺血再灌注大鼠 FADD-Caspase-8 通路的影响 [J]. 中国医药指南, 2012, 10 (3): 319 - 321.
- [18] 陈东风, 赖真, 张少君, 等. 电针刺刺激对大鼠脑缺血再灌注后 PI3-K/Akt 通路的影响 [J]. 中国康复医学杂志, 2009, 24(6): 502 - 504.
- (收稿: 2017 - 03 - 14 在线: 2018 - 05 - 02)
- 责任编辑: 邱 禹

欢迎订阅 2018 年《中国中西医结合杂志》

《中国中西医结合杂志》是由中国科学技术协会主管、中国中西医结合学会和中国中医科学院主办的中西医结合综合性学术期刊。1981 年创刊,由中国科学院院士陈可冀担任总编辑。设有述评、专家论坛、专题笔谈、临床论著、基础研究、临床报道、综述、学术探讨、思路与方法学、临床试验方法学、病例报告、中医英译、会议纪要等栏目。本刊多次获国家科委、中宣部、新闻出版署及国家中医药管理局颁发的全国优秀期刊奖;2001 年被新闻出版署评为“双效期刊”,列入中国期刊方阵;2002—2016 年连续 14 年被评为“百种中国杰出学术期刊”;3 次获中国科协择优支持基础性和高科技学术期刊专项资助;4 次获“国家自然科学基金重点学术期刊专项基金”资助;4 次获“中国科协精品科技期刊工程项目期刊”;2015 年 5 月荣获中国科协精品科技期刊 TOP 50 项目。并被多种国内外知名检索系统收录,如:中国科学引文数据库、中国生物医学文献数据库、美国医学索引 (Medline)、美国《化学文摘》(CA)、俄罗斯《文摘杂志》(AJ)、日本《科学技术文献速报》(JST)、美国《乌利希期刊指南》(Ulrich's PD)、波兰《哥白尼索引》(IC)、英国《国际农业与生物科学研究中心》(CABI)、WHO 西太平洋地区医学索引 (WPRIM) 等;为中国科技论文统计源期刊、中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊,被编入《中文核心期刊要目总览》,每年影响因子及总被引频次在中医药类期刊中均名列前茅。

《中国中西医结合杂志》为大 16 开本,月刊,128 页;铜版纸印刷,彩色插图。国内定价:30.00 元/期。全年定价:360.00 元。国际标准刊号:ISSN 1003 - 5370,国内统一刊号:CN 11 - 2787/R,国内邮发代号:2 - 52,国外代号:M640。国内外公开发行,在各地邮局均可订阅,也可直接汇款至本社邮购。

地址:北京市海淀区西苑操场 1 号,中国中西医结合杂志社,邮政编码:100091;电话:010 - 62886827, 62876547, 62876548;传真:010 - 62874291;E-mail:cjim@cjim.cn;网址: <http://www.cjim.cn>。