

· 基础研究 ·

# 电针刺激对大鼠脑缺血再灌注后 PI3-K/Akt 通路的影响\*

陈东风<sup>1</sup> 赖真<sup>2</sup> 张少君<sup>1</sup> 姚灿坤<sup>2</sup> 林婉娟<sup>1</sup>

**摘要** 目的:研究电针刺激百会和大椎两穴对脑缺血再灌注大鼠脑神经细胞凋亡的影响,并通过对皮质及纹状体缺血周围区 PI3-K 和 Akt 的检测,进一步探讨电针刺激减少神经细胞凋亡的分子机制。方法:雄性 SD 大鼠,采用 Zea Longa 线栓法制备大鼠大脑中动脉闭塞(MCAO)模型,缺血 3h 后再灌注。分为假手术组、模型组、电针组,分别于手术前 12h、手术前 30min、手术后每隔 12h 针刺百会、大椎穴 1min,再通以电针治疗仪予疏密波治疗 15min,直到 48h 后最后一批大鼠被处死;术后分第 12、24、48 小时三个时间点,采用神经功能评分观察神经功能缺损恢复程度;TUNEL 法观察凋亡的情况;免疫组化观察皮质及纹状体缺血周围区 PI3K 和 Akt 表达强度。结果:神经功能评分显示电针组恢复明显优于模型组( $P<0.05$ );电针组凋亡阳性细胞数少于模型组,差异有显著性意义( $P<0.05$ );PI3K 和 Akt 免疫阳性细胞表达水平明显增高;模型组平均阳性细胞数显著低于电针组( $P<0.01$ )。结论:电针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。

**关键词** 电针;脑缺血再灌注;凋亡;PI3-K/Akt;

中图分类号:R493,R741,R245 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2009)-06-0502-03

**Effects of electroacupuncture on PI3-K/Akt path in reperfused local cerebral ischemia rats/CHEN Dongfeng, LAI Zhen, ZHANG Shaojun, et al.//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2009, 24(6):502-504**

**Abstract Objective:** To study the effects of electroacupuncture(EA) on phosphatidylinositol 3-kinase(PI3-K), serine/threonine kinase (Akt) path and apoptosis in rats brains following local cerebral ischemia/reperfusion. **Method:** Male adult SD rats were randomly divided into three groups: the sham-operated group, the model group and the EA group. The model of middle cerebral artery occlusion (MCAO) was established by thread ligation method. Neurological system symptoms were evaluated at the 12<sup>th</sup>h, 24<sup>th</sup>h, 48<sup>th</sup>h after ischemia/reperfusion. Then the rats were sacrificed at the 12<sup>th</sup>h, 24<sup>th</sup>h, and 48<sup>th</sup>h after reperfusion, and rats brains were taken for histopathological, TUNEL and immunohistochemistry examinations. Positive reacted cells of apoptosis, PI3-K and Akt were counted under light microscope at different time points after ischemia/reperfusion. **Result:** EA could significantly alleviate the damage of neurological system; histopathological examination showed that the cerebral ischemic damage in the EA group was significantly milder than that in model group. As compared with sham-operated group and model group, positive reacted cell amounts of apoptosis were greatly declined in EA group( $P<0.05$ ). Positive immune reacted cell amounts of PI3-K and Akt were greatly enhanced in EA group as compared with model group and sham-operated group. **Conclusion:** The protective effects of EA therapy against cerebral ischemia/reperfusion injury might be associated with improving the positive expressions of PI3-K and Akt path.

**Author's address** The Second Clinical Medical College of Jinan University, Shenzhen People Hospital Physical Therapy Branch Guangdong Shenzhen,518020

**Key words** electroacupuncture; cerebral ischemia reperfusion; apoptosis; PI3-K/Akt

脑缺血再灌注损伤 (cerebral ischemia and reperfusion injury, CIRI) 是神经学领域亟待解决的难题。近年来,随着降纤、溶栓等治疗的建立,缺血性损伤及其后继性再灌注损伤在治疗过程中日益受到重视,如何降低缺血再灌注性脑损伤是当今研究的焦点和重点。针刺在临床治疗缺血性脑病中已被认为是行之有效的方法之一<sup>[1-4]</sup>。本实验采用大鼠脑缺血再灌注模型,观察电针刺激百会和大椎两穴对脑缺血再灌注后神经细胞凋亡和 PI3K/AKT 信号通路的影响,探讨其神经保护作用,为临床 CIRI 的防治提

供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 研究对象

健康成年雄性 SD 大鼠 72 只 (模型成功率

\* 基金项目:深圳市科技计划项目资助课题(200702132)

1 暨南大学第二临床医学院深圳市人民医院理疗科,深圳,518020

2 暨南大学第二临床医学院深圳市人民医院中医科

作者简介:陈东风,男,主任医师

收稿日期:2008-08-26

75%), 体重 200—250g (广东省实验动物中心提供)。随机分为 3 组: 假手术组、模型组、电针组, 各组根据缺血再灌注时间分为 12<sup>h</sup>、24<sup>h</sup>、48<sup>h</sup> 3 个亚组, 每组 6 只。TUNEL 凋亡检测试剂盒(MK1020)、PI3K 兔多抗、Akt 兔多抗、DAB 显色试剂盒系博士德公司所产; 即用型非生物素免疫组化 EliVision™ plus 检测试剂盒(福建迈新生物技术开发有限公司)。

## 1.2 方法

**1.2.1 电针刺刺激:** 根据华兴邦等<sup>[9]</sup>研制的“大鼠穴位图谱”, 选取百会、大椎穴。操作方法: 先直刺, 行提插捻转 1min, 通以上海产 G9805-C 电针治疗仪, 频率为 10Hz, 波形为疏密波, 刺激强度为 2V。持续时间为 15min。分别于手术前 12h、手术前 30min、手术后每隔 12h 针刺, 直到 48h 后最后一批大鼠被处死。

**1.2.2 动物模型制作:** 参考国外 Zea Longa 创立的模型制作<sup>[9]</sup>。线栓直径为 0.22—0.25mm 的钓鱼线, 将线的一端轻轻沾上硅胶作成线栓头, 直径约为 0.28—0.30mm。线栓进入血管的深度为 20mm。脑缺血 3h 后拔出尼龙线至有轻微阻力时止, 此时血流灌注成功。

**1.2.3 神经病学评分:** 按照 Longa 的 5 分法评分标准<sup>[9]</sup>, 手术动物清醒后进行评分。0 分: 无神经缺损; 1 分: 提尾时左前肢内收, 不能完全伸直; 2 分: 行走向左倾倒; 3 分: 向左旋转; 4 分: 不能自己行走或昏迷。1—4 分为有效模型。

**1.2.4 标本获取:** 分别于脑缺血 3h 再灌注第 12、24、48 小时各时间点用 10% 水合氯醛麻醉(0.35ml/100g) 大鼠。4% 的多聚甲醛灌注固定后断头取脑, 进行 24h 外固定, 自视交叉向前后 2mm 切取冠状脑片, 取第 3 片行石蜡包埋, 连续切片。

**1.2.5 TUNEL 检测凋亡:** 切片常规脱蜡入水。标本片加新鲜稀释 Proteinase K 37℃ 消化 15min。按每张切片取 TdT 和 DIG-d-UTP 各 1μl, 加入 18μl 标记缓冲液中, 混匀。加标记液, 20μl/片。置样品于湿盒中, 37℃ 标记 2h。加封闭液 50μl/片, 室温 30min。用抗体稀释液 1:100 稀释生物素化抗地高辛抗体, 混匀后 50μl/片加至标本片上。置样品于湿盒中, 37℃ 反应 30min。SABC 稀释混匀后 50μl/片加至切片。37℃ 反应 30min。DAB 显色, 显色 10min 左右。阴性对照: 用 PBS 代替 TdT 和 DIG-d-UTP, 其余步骤同前。阳性对照: 应用肠腺癌石蜡切片制作阳性对照片, 其余步骤同前。脱水, 透明, 封片。显微镜观察, 结果判断以细胞核呈棕黄色为阳性结果。200 倍视野下 3 张切片任选 6 个视野, 用 Image-ProPlus 5.0 图像分析处理系统进行阳性细胞计数, 计算出该切片

的平均阳性细胞数。

**1.2.6 免疫组织化学(非生物素法)检测磷脂酰肌醇 3-蛋白激酶(phosphatidylinositol-3 kinase, PI3-K)和丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (serine/threonine kinase, Akt) 石蜡切片脱蜡水化。**用柠檬酸 PBS 微波修复 20min。滴加 50μl 的 PI3K 兔多抗(1:50)或 Akt 兔多抗(1:50), 置湿盒中 4℃ 过夜; 冲洗后滴加 50μl 聚合物增强剂, 室温下孵育 20min; 冲洗后滴加 50ul 酶标抗兔聚合物, 室温下孵育 30min; 冲洗后 DAB 镜下显色。阴性对照: 用 PBS 代替鼠单抗, 其余步骤同前。阳性对照: 应用肠腺癌石蜡切片制作阳性对照片, 其余步骤同前。结果判断以细胞浆呈棕黄色颗粒状为阳性结果。200 倍视野下每张切片任选 6 个视野, 用 Image-ProPlus 5.0 图像分析处理系统进行阳性细胞计数, 计算出该切片的平均阳性细胞数。

## 1.3 统计学分析

有关变量用均数 ± 标准差表示, 结果用 SPSS13.0 统计软件, 进行 *t* 检验。

## 2 结果

### 2.1 神经功能评分

假手术组评分为 0; 模型组评分显著高于电针组( $P < 0.05$ ), 见表 1。

表 1 各组大鼠缺血再灌注各时间点神经学症状评分表( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别   | 动物数 | 再灌注       | 再灌注       | 再灌注       |
|------|-----|-----------|-----------|-----------|
|      |     | 第 12 小时   | 第 24 小时   | 第 48 小时   |
| 假手术组 | 18  | 0         | 0         | 0         |
| 模型组  | 18  | 3.00±0.82 | 2.67±0.82 | 2.33±0.52 |
| 电针组  | 18  | 2.50±0.63 | 2.10±0.52 | 1.56±0.58 |

### 2.2 再灌注第 24 小时 TUNEL 平均阳性细胞计数

阳性细胞核染色呈棕黄色, 凋亡细胞主要出现于缺血侧鼠脑组织中, 非缺血侧几乎无凋亡细胞出现, 假手术组中仅有零星分布(1.33±1.00), 模型组和电针组 TUNEL 阳性细胞主要分布在皮质和纹状体坏死灶的周边。电针组(18.65±3.14)阳性细胞数均少于模型组(42.33±6.68), 差异有显著性意义( $P < 0.01$ )。

### 2.3 PI3-K 和 Akt 平均阳性细胞计数

阳性细胞表达主要在缺血侧脑皮质、纹状体缺血半暗带区。假手术组只有极少数表达, 模型组、电针组阳性细胞计数随着再灌注时间的延长而增加。模型组、电针组平均阳性细胞数均显著高于假手术组( $P < 0.01$ ); 模型组平均阳性细胞数显著低于电针组( $P < 0.01$ ), 见表 2。

## 3 讨论

缺血性脑卒中主要是由于脑血管堵塞或痉挛引起血流供应不足。血液的一个最重要的功能就是携

表2 各组不同时间点 PI3K 和 p-AKT 平均阳性细胞计数

 $(\bar{x} \pm s)$ 

| 组别   | 动物数 | PI3K       |            |            | AKT        |            |            |
|------|-----|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
|      |     | 第 12 小时    | 第 24 小时    | 第 48 小时    | 第 12 小时    | 第 24 小时    | 第 48 小时    |
| 假手术组 | 18  | 3.33±0.50  | 1.33±1.00  | 0.33±0.50  | 2.00±0.87  | 0          | 0          |
| 模型组  | 18  | 13.57±2.94 | 20.17±3.63 | 17.50±2.43 | 11.43±1.89 | 17.17±2.62 | 14.00±2.22 |
| 电针组  | 18  | 21.25±3.92 | 27.00±4.32 | 30.61±4.18 | 18.82±2.18 | 21.15±2.86 | 22.47±2.95 |

带氧气,脑血液供应不足带来的直接后果就是造成大脑组织缺氧。机体缺氧作为一种急性的应激反应,必然会做出适应性的调整,因此细胞间的信息传导通路的改变必然会以缺氧为中心来诱导或抑制某种对缺氧敏感基因的表达,从而引起下游一系列基因表达的变化<sup>[7-8]</sup>。PI3K/Akt 信号通路是细胞的凋亡过程中的一条重要存活通路,当脑缺血再灌注发生后,细胞生长因子、整合素等先激活各自的具有酪氨酸激酶活性的受体,使受体自身磷酸化,PI3-K 的 P85 调节亚基与磷酸化的受体结合并被激活,活化的 PI3-K 转位到细胞膜的内表面,使膜上的磷酸肌醇磷酸化,生成 3-磷酸-磷酸肌醇,3,4-二磷酸-磷酸肌醇,3,4,5-三磷酸-磷酸肌醇,后两者可通过与 Akt 上的 PH 结构域结合、从而部分激活 Akt,并使 Akt 转位到细胞膜的内表面。PI3,4,5P3 可被磷酸酶转化为 PI3,4P2,激活位于细胞膜的内表面的磷脂酰肌醇依赖激酶-1(PDK-1)和磷脂酰肌醇依赖激-2(PDK-2),两者又可进一步激活 Akt。活化的 Akt 可通过抑制 GSK,FKHR 和 Caspase-9 的磷酸化等途径促进细胞的存活。活化的 Akt 还能够磷酸化 Bad 使它处于非活化状态,进而从 Bcl-2 和 14-3-3 受体蛋白的复合物中解离下来,起到抗细胞凋亡的作用<sup>[9]</sup>。最近通过对 Akt 在细胞代谢中作用的研究发现,Akt 还可以通过代谢途径来调节细胞的凋亡<sup>[10]</sup>,因此可以看出 PI3-K/Akt 信号转导途径在细胞的凋亡和存活中发挥重要的作用。

中医理论认为气血是脑生长发育和产生各种功能的物质基础,气血失常也是脑病发病的主要病机,而针灸有调理气血的作用。长期的科研和临床实践发现气虚血瘀是缺血性中风病的主要病机特点之一。脑缺血损伤血脑屏障,针灸具有抗氧化应激作用,减少氧自由基产生,抑制脂质过氧化反应,保护脑血管内皮细胞,有利于循环灌注,从而减轻组织损伤,在围绕保护血脑屏障的完整性方面达到改善脑缺血再灌注损伤<sup>[11-12]</sup>。针刺预处理使动物脑组织产生了某些具有抗组织缺血缺氧的生物活性物质;这些生物活性物质可提高组织器官尤其是脑组织对缺血缺氧的耐受性,发挥抗缺血缺氧损伤作用。并证实针灸预处理可以影响大鼠中枢下丘脑室旁核神经元促肾上腺皮质激素样蛋白表达,进而影响神经元的物质合成及代谢过程,维持缺血再灌注神经

元、中枢及机体的内环境稳定<sup>[4]</sup>。以上都有可能是针灸预处理脑保护作用的机制之一,而各机制之间是否有联系,有待进一步研究。

脑缺血再灌注损伤属中医“中风”范畴。是由脏腑功能失调,气血逆乱,脑脉闭阻而成,属本虚标实之证。百会、大椎穴隶属督脉,百会穴位于头部巅顶,是督脉、足太阳膀胱经、手少阳三焦经、足少阳胆经、足厥阴肝经五条经脉的交会处,古称“三阳五会”。百会、大椎穴不仅可以疏通局部的经络,而且可以熄风通络,平肝潜阳。两穴合用,共达醒脑开闭、平肝熄风、通经活络之功效。

在本实验中,电针组各时间点神经功能评分比模型组明显改善,阳性细胞数也显著下降,表明电针百会和大椎穴能明显改善脑缺血再灌注后症状,减少脑缺血再灌注后凋亡的发生。与假手术组比较,脑缺血再灌注组各时间点脑组织 PI3-K 和 Akt 表达显著升高,表明 PI3-K 和 Akt 参与了 CIRI 的发生。与模型组比较,电针组各时间点脑组织 PI3-K 和 Akt 表达显著升高,表明激活 PI3-K/Akt 信号通路,是电针缓解凋亡起到神经保护的机制之一。

## 参考文献

- [1] 赖新生,张家维,莫飞智.电针治疗血管性痴呆近期疗效分析[J].中医杂志,1997,38(6): 340-342.
- [2] 孔立红,毛娟娟.电针对局灶性脑缺血再灌注大鼠 uPA、PAI-1 的影响[J].中国康复医学杂志,2007,22(3):260-261.
- [3] 唐伟,孙忠人,王卓尔,等.针刺预处理对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用[J].中国中医药科技,2006,13(4):209-210.
- [4] 陈泽斌,袁芳,梁凤霞,等.针刺预处理脑组织提取液抗大鼠脑缺血再灌注损伤作用探讨[J].中国针灸,2004,24(5):347-350.
- [5] 华兴邦,李辞蓉,周浩良,等.大鼠穴位图谱的研制[J].实验动物与动物实验,1991,(1):1-3.
- [6] Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, et al. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination[J]. Stroke, 1986, 17(3):472-476.
- [7] 黄艳君,罗勇.电刺激小脑顶核对大鼠局灶性脑缺血再灌注后脑内神经干细胞增殖的影响[J].中国康复医学杂志,2008,23(3): 211-215.
- [8] Reynold BA, Weiss A. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system[J]. Science, 1992, 255(5052):1707-1710.
- [9] Chang F, Lee JT, Navolanic PM, et al. Involvement of PI3-K/Akt pathway in cell cycle progression, apoptosis, and neoplastic transformation: a target for cancer chemotherapy [J]. Leukemia, 2003, 17(3): 590-603.
- [10] Downward J. PI3K, Akt and cell survival [J]. Sem in Cell Dev Biol, 2004, 15 (2): 177-182.
- [11] 杨佳丹,董志.脑缺血再灌注损伤的病因学研究进展[J].中国康复医学杂志,2006,21(10):935-938.
- [12] Wu XD, Du LN, Wu GC, et al. Effects of electroacupuncture on blood-brain barrier after cerebral ischemia-reperfusion in rat [J]. Acupunct Electrother Res, 2001, 26(1-2):1-9.