

电针结合重复经颅磁刺激对局灶性脑缺血大鼠蛋白激酶表达的影响*

黄国付^{1,2} 黄晓琳^{1,3}

摘要

目的:探讨电针(EA)结合重复经颅磁刺激(rTMS)对局灶性脑缺血大鼠蛋白激酶 A(PKA)表达的影响及其治疗缺血性脑损伤的机制。

方法:Wistar 大鼠 75 只,采用线栓法制备大鼠大脑中动脉闭塞模型,随机分为正常组、模型组、EA 组、rTMS 组和 EA+rTMS 组,通过 Western 印迹检测脑缺血后第 7 天、第 14 天与第 28 天三个不同时间点大鼠海马胞核内 PKA 表达的变化,并观测其神经功能评分。

结果:脑缺血后不同时间点缺血侧海马 PKA 灰度值,模型组在第 7 天时高于正常组,第 28 天时低于正常组 ($P<0.05$),第 14 天时与正常组相比 $P>0.05$;EA 组、rTMS 组和 EA+rTMS 组 3 个时相均高于模型组,第 7 天、第 14 天时高于正常组,差异具有显著性意义 ($P<0.05$),第 28 天时与正常组相比 $P>0.05$,其中,EA+rTMS 组第 7 天、第 14 天时高于 EA 组、rTMS 组 $P<0.05$,EA 组和 rTMS 组各时间点均无显著性差异 ($P>0.05$)。EA 组、rTMS 组和 EA+rTMS 组各时间点神经功能评分均较模型组改善 ($P<0.01$),尤以 EA+rTMS 组为明显。

结论:EA 结合 rTMS 对脑卒中后神经功能的恢复具有显著的促进作用,PKA 蛋白的表达增强可能是其治疗缺血性脑卒中的机制之一。

关键词 脑缺血;电针;重复经颅磁刺激;蛋白激酶 A

中图分类号:R493,R741 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2010)-05-0401-04

Effects of electro-acupuncture combined with repetitive transcranial magnetic stimulation on expression of protein kinase A after focal cerebral ischemia in adult rats/HUANG Guofu,HUANG Xiaolin//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2010, 25(5): 401—404

Abstract

Objective: To investigate the effects of electro-acupuncture (EA) combined with repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) on protein kinase A(PKA) expression after focal cerebral ischemia in adult rats and to explore the mechanism of EA combined with rTMS in treating ischemic brain injury.

Method: The model of transient focal cerebral ischemia was made by occlusion of middle cerebral artery. Seventy-five Wistar rats were randomly divided into normal group, model group, EA group, rTMS group and EA+rTMS group. The expression of PKA in hippocampus was detected and the neurologic impairment rating was observed at the 7th, 14th and 28th d after infarction respectively.

Result: The average gray density of PKA expression in hippocampus after focal cerebral ischemia in model group was higher at the 7th d, lower at the 28th d than that in normal group ($P<0.05$); higher in EA group, rTMS group, EA+rTMS group than that in model group at each time point and normal group at the 7th and 14th d ($P<0.05$), higher in EA+rTMS group than that in EA group, rTMS group at the 7th and 14th d, and there was no difference

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2010.05.004

* 基金项目:国家自然科学基金资助课题(30672216);武汉市卫生科研基金项目(WX08A01,WZ08B02)

1 华中科技大学同济医学院附属同济医院康复医学科,武汉市,430030; 2 武汉市中西医结合医院针灸科; 3 通讯作者

作者简介:黄国付,男,博士,副主任医师; 收稿日期:2009-06-13

between EA group and rTMS group. The improvement of neural motor function was much better in EA group, rTMS group and EA+rTMS group compared with model group ($P<0.01$), and the improvement were the most obvious in EA+rTMS group.

Conclusion: EA combined with rTMS can promote the functional recovery after cerebral arterial thrombosis, enhance the expression of PKA in hippocampus after focal cerebral ischemia, which might be one of the important mechanisms of EA combined with rTMS in treating ischemia brain injury.

Author's address Department of Acupuncture and Moxibustion, Wuhan Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Wuhan, 430022

Key words cerebral ischemia; electro-acupuncture; repetitive transcranial magnetic stimulation; protein kinase A

缺血性脑卒中是中国最常见的脑血管疾病,致残率和致死率均较高。对于大多数脑缺血患者而言,神经元死亡不可避免,如何积极有效地促进缺血性脑卒中患者神经功能的恢复仍然是目前脑缺血的研究重点。研究表明,电针(electro-acupuncture, EA)结合重复经颅磁刺激(repetitive transcranial magnetic stimulation, rTMS)治疗能促进大鼠神经干细胞的增殖,改善大鼠学习记忆能力^[1]。在神经系统中,蛋白激酶 A(protein kinase A, PKA)对神经元的存活与生长及突触的可塑性起着重要的正调节作用。本研究采用 Western 印迹观察 EA 结合 rTMS 对局灶性脑缺血大鼠不同时相海马胞核内 PKA 表达的影响,以探讨其在脑缺血神经修复中的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物及分组: 选用健康雄性清洁级 Wistar 大鼠 75 只,体重为(200±20)g,由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供,在标准条件下适应性饲养 3 周后开始实验。随机分为正常组(Normal 组)、模型组(Model 组)、EA 组(EA 组)、rTMS 组(rTMS 组)和 EA 结合 rTMS 组(EA+rTMS 组),选取第 1 天作为开始治疗的时间点,按第 7、14、28 天 3 个时间点分为 3 个亚组,每个时间点 5 只。

1.1.2 主要仪器和试剂:石蜡切片机(Leica 2025 型,德国),生物显微镜(Olympus BS-50 型,日本),CCD 数码相机(Canon 970 型),图像分析系统(HPIAS21000),G6805-1 电针治疗仪(青岛华青仪器厂);PBS 购于北京中山生物技术公司;PKA 多克隆抗体,正常山羊血清,DAB,购于武汉 BOSTER 公司;去离子甲酰胺, TritonX-100 等。

1.2 实验方法

1.2.1 模型建立: 参照廖维靖等^[2]的大鼠大脑中动脉缺血模型造模方法采用线栓法制备大鼠大脑中动脉闭塞模型。术后 24h 采用 Bederson 标准^[3]初步评分并进行筛选。0 分:未见行为缺陷;1 分:左前肢屈曲(提尾悬空实验阳性);2 分:侧推抵抗力下降(侧向推力实验阳性),伴左前肢屈曲,无转圈行为;3 分:同 2 分行为,伴自发性旋转。选择评分为 1—3 分的大鼠纳入本研究。

1.2.2 干预方法: 正常组和模型组造模后当日开始按同等条件抓取,但不实施 EA 及 rTMS 处理;EA 组采用督脉电针的刺激方式,以橡皮筋将大鼠四肢固定在治疗台上,参照《实验针灸学》^[4]选取督脉经穴“百会”、“大椎”,以 30 号 1 寸毫针斜刺入“百会”10mm,直刺入“大椎”5mm,将针柄分别连接至电针仪上,选取连续波,频率为 20Hz,强度为 1—2mA。在手术 2h 后即进行第 1 次治疗,每次治疗 30min,1 次/d。rTMS 组采用丹麦 Dantec 公司生产的磁刺激器及圆形线圈,线圈的直径为 12cm,脉冲磁场的强度峰值为 2T。刺激时固定大鼠头部,线圈紧贴头皮,与大鼠右侧大脑半球相切,中心位于动物右耳前 9mm,在手术 2h 后即进行第 1 次治疗,刺激频率为 0.5Hz,强度为 70%最大输出强度,连续刺激 20 次为 1 组,2 组/d,至各时间点大鼠处死前 1 日结束。EA+rTMS 组参数与疗程分别同 EA 组和 rTMS 组。

1.2.3 神经功能缺损评分:参照 Bederson 等^[3]的评分方法,分别于第 7、14、28 天 3 个时间点处死前观察大鼠行为表现并进行神经功能缺损评分。

1.2.4 Western 印迹:快速断头取脑后,分离出海马组织(冰上操作),立即置液氮中保存。将海马组织按实验操作处理后暗室内 X 线片曝光,显影、定影处理,

结果以 HPIAS21000 图像分析软件测定 PKA 吸光度值。

1.3 统计学分析

每组细胞计数结果均以均数 $\pm$ 标准差表示,使用 SPSS10.0 软件包行方差分析及组间比较。

2 结果

2.1 各组大鼠缺血后神经行为学评分比较

Bederson 神经功能评定: 正常组得分均为 0, EA、rTMS、EA+rTMS 组与模型组在第 7、14、28 天相比均有显著性差异 ($P<0.01$), EA+rTMS 组与 EA、rTMS 组相比差异有显著性 ($P<0.01$), 见表 1。

2.2 海马胞核内 PKA 蛋白的免疫印迹

相对灰度值比较, 模型组在第 7 天时高于正常组, 第 28 天时低于正常组, 差异均有显著性意义 ($P<0.05$), 第 14 天时与正常组相比无显著性差异 ($P>0.05$); EA、rTMS、EA+rTMS 组 3 个时相均高于模型组, 第 7、14 天时高于正常组, 差异具有显著性意义 ($P<0.05$), 第 28 天时与正常组相比无显著性差异 ($P>0.05$), 其中 EA+rTMS 组第 7、14 天时高于 EA、rTMS 组, 差异具有显著性意义 ($P<0.05$), EA、rTMS 两组各时相均无显著性差异 ($P>0.05$)。见表 2, 图 1。

表 1 各组大鼠缺血后神经功能缺损评分比较 ($\bar{x}\pm s$, 分)

组别	例数	第 7 天	第 14 天	第 28 天
正常	5	0	0	0
模型	5	2.68 $\pm$ 0.06	2.52 $\pm$ 0.12	1.60 $\pm$ 0.13
EA	5	1.96 $\pm$ 0.09 ^①	1.68 $\pm$ 0.10 ^①	0.59 $\pm$ 0.15 ^①
rTMS	5	1.97 $\pm$ 0.09 ^①	1.64 $\pm$ 0.15 ^①	0.52 $\pm$ 0.14 ^①
EA+rTMS	5	1.28 $\pm$ 0.07 ^{①②}	1.01 $\pm$ 0.10 ^{①②}	0.30 $\pm$ 0.12 ^{①②}

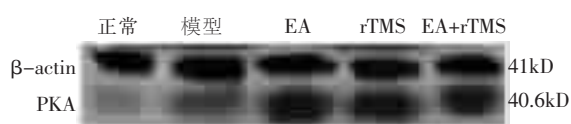
①与模型组比较 $P<0.01$; ②与 EA、rTMS 组比较 $P<0.01$

表 2 缺血后不同时间海马胞核内 PKA 免疫反应产物灰度值的比较 ($\bar{x}\pm s$, 分)

组别	例数	第 7 天	第 14 天	第 28 天
正常	5	58.23 $\pm$ 5.16	58.16 $\pm$ 5.09	58.25 $\pm$ 5.22
模型	5	86.39 $\pm$ 6.52	62.32 $\pm$ 5.26	31.26 $\pm$ 4.74
EA	5	148.61 $\pm$ 5.70 ^①	136.19 $\pm$ 10.46 ^①	89.02 $\pm$ 6.15 ^①
rTMS	5	146.95 $\pm$ 3.81 ^①	133.39 $\pm$ 8.22 ^①	85.15 $\pm$ 5.76 ^①
EA+rTMS	5	196.09 $\pm$ 14.46 ^{①②}	159.18 $\pm$ 8.02 ^{①②}	91.22 $\pm$ 6.32 ^{①③}

①与模型组比较 $P<0.05$; 与 EA 组、rTMS 组比较: ② $P<0.05$, ③ $P>0.05$

图 1 各组脑缺血 7d 后缺血侧海马 PKA 免疫印迹



3 讨论

研究表明, 脑卒中后积极采用针刺治疗, 明显有助于神经功能的恢复, 可促进海马神经元增殖^[9]。根据祖国传统医学的经验及国际上针刺循证医学的证据表明, 针刺治疗脑卒中后功能障碍的疗效是肯定的。rTMS 是一种现代无创、无痛临床证明又安全的新技术, 可以在皮质产生可传导性的感生电流, 从而对刺激位点或有突触联系的远处皮质兴奋性产生抑制或易化。研究表明 rTMS 不仅可作为脑卒中后功能评估和预测预后的方法, 并且对脑功能恢复有促进作用^[6-8]。在前期的研究工作中我们将中医传统的针刺治疗和现代经颅磁刺激技术相结合用于大鼠缺血性脑损伤的研究, 发现其对缺血后血管的新生和神经再生的微环境均有一定的影响^[9]。

在神经系统中, PKA 对神经元的存活与生长以及突触的可塑性起着重要的正调节作用。PKA 在哺乳类体内可表达 4 种调节亚基 (R I α 、R I β 、R II α 、R II β) 和 3 种催化亚基 (C α 、C β 、C γ), 每个亚基在神经元内均有表达, 其中 C α 、C β 亚基在神经元内表达丰富, 且为突触可塑性所必需。胞质 cAMP 浓度升高时, C 亚基和 R 亚基解离, 游离的 C 亚基除使细胞质组分磷酸化之外, 还进入细胞核, 对包括 CREB 在内的核组分起磷酸化作用, C 亚基在核内的主要靶蛋白是 CREB^[10]。当活性 PKA 催化亚基进入核内使 CREB 磷酸化而活化, 进而与相关基因的 cAMP 反应元件 (CRE) 结合, 调节多种基因的转录和表达, 影响其蛋白质的水平和功能, 从而介导 PKA 激活所引起的反应。且前期研究表明, EA 结合 rTMS 能促进缺血后海马 PKA-CREB 信号通路中 p-CREB 的表达^[11]。神经细胞内 pCREB 通过激活相关下游基因 (NGF、BDNF 等) 的转录, 在促进神经细胞的存活与修复中起着非常重要的作用^[12]。

在本实验中, 脑缺血后不同时间点缺血侧海马 PKA 平均灰度值, 模型组在第 7 天时高于正常组, 第 28 天时低于正常组, 第 14 天时与正常组相比无显著性差异; EA 组、rTMS 组和 EA 结合 rTMS 组三个时间点均高于模型组, 第 7、14 天时高于正常组, 第 28 天时与正常组相比无显著性差异, 其中 EA 结合 rTMS 组第 7、14 天时高于 EA 组、rTMS 组, EA 组和 rTMS 组各时间点均无显著性差异。EA 组、rTMS

组和 EA 结合 rTMS 组各时间点神经功能评分均较模型组改善,尤以 EA 结合 rTMS 组为明显。

4 结论

EA 结合 rTMS 对局灶性脑缺血大鼠神经行为的改善作用与其促进缺血侧海马 PKA 的表达密切相关,促进缺血后海马 PKA 的表达是其治疗缺血性脑卒中的作用机制之一。但其对上游信号和下游基因转录的影响,有待进一步研究。

参考文献

- [1] 彭力,黄晓琳,韩肖华,等.电针结合经颅磁刺激对脑缺血大鼠神经干细胞增殖和电跳台的影响[J].中国中医急症,2008,17(2):206—208.
- [2] 廖维靖,刘淑红,范明,等.线栓阻断大鼠脑中动脉制作缺血性脑损伤模型的改良[J].中华物理医学与康复杂志,2002,24(6):345—349.
- [3] Bederson JB,Pitts LH,Tsuiji 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.
- [4] 邓春雷,殷克敬.实验针灸学[M].北京:人民卫生出版社,1998.143.

- [5] Kim EH,Chung JH,Kim CJ.Auricular acupuncture increases cell proliferation in the dentate gyrus of Sprague-Dawley rats[J].Acupunct Electrother Res,2001,26:187—194.
- [6] McAllister TW.Repetitive transcranial magnetic stimulation after acute ischemic stroke[J].Curr Psychiatry Rep,2005,7:369.
- [7] Feng HL,Yan L,Guan YZ,et al.Effects of transcranial magnetic stimulation on motor cortical excitability and neurofunction after cerebral ischemia-reperfusion injury in rats[J].Chin Med Sci J,2005,20:226—230.
- [8] Khedr EM,Ahmed MA,Fathy N,et al.Therapeutic trial of repetitive transcranial magnetic stimulation after acute ischemic stroke[J].Neurology,2005,65:466—468.
- [9] 黄晓琳,韩肖华.电针联合经颅磁刺激对脑缺血大鼠碱性成纤维细胞生长因子和血管生成素及其受体表达的影响[J].中国康复医学杂志,2005,20(7):499—501.
- [10] Adams SR,Harootunian AT,Buechler YJ,et al.Fluorescence ratio imaging of cyclic-AMP in single cell[J].Nature,1991,349:694—697.
- [11] 黄国付,黄晓琳,郭铁成,等.电针结合经颅磁刺激对局灶性脑缺血大鼠 p-CREB 表达的影响[J].中国康复医学杂志,2009,24(4):289—292.
- [12] Sung JY,Shin SW,Ahn YS, et al.Basic fibroblast growth factor-induced cultivation of novel CREB kinase during the differentiation of immortalized hippocampal cells[J].J Biol Chem,2001,276:13858—13866.

(上接 400 页)

[Ca²⁺]_i 影响

Fluo-3 AM 是细胞内游离钙离子的特异性荧光分子探针,被特异性地标注到 SY5Y 细胞内的游离钙离子上,细胞内[Ca²⁺]_i 越高,在激光共聚焦显微镜下观察到的荧光强度就越强。换言之,在激光共聚焦显微镜下观察到的荧光强度大小反映了 SY5Y 细胞[Ca²⁺]_i 的高低。

本实验观察发现,经过大鼠血清孕育后,模型对照组 SY5Y 细胞[Ca²⁺]_i 显著高于空白对照组,而针刺治疗组虽然也高于空白对照组,但和模型对照组相比则显著降低(6h 组除外)。这表明大鼠颅脑损伤后[Ca²⁺]_i 呈逐渐上升趋势,至 24h 达最高水平,随后则逐渐降低;针刺治疗则可以减缓其升高趋势,使颅脑损伤大鼠升高的[Ca²⁺]_i 得到一定程度的降低。研究结果提示,颅脑损伤大鼠血清中可能含有某种可使脑组织细胞[Ca²⁺]_i 升高的物质,而针刺后则可能这种物质减少了或发生抑制[Ca²⁺]_i 升高的某种反应,从而使颅脑损伤大鼠脑组织升高的[Ca²⁺]_i 降低,抑制脑组织细胞钙超载的发生,对脑组织起到一定的保护作用。其中 6h 针刺组与模型组[Ca²⁺]_i 相比,差

异不显著,可能是由于针刺对颅脑损伤的早期治疗作用,主要是通过神经调节等途径发生作用的,而 6h 以后针刺才通过体液发挥明显的治疗作用。

参考文献

- [1] 张小年,张皓.创伤性颅脑损伤国内研究进展[J].中国康复理论与实践,2008,14(2):101—104.
- [2] 陈建良,何升学,吕文,等.针刺在开颅术中脑保护作用的临床研究[J].中国针灸,2003,23(6):321—324.
- [3] 赵永烈,刘强,史海霞.针刺对颅脑损伤后脑组织三磷酸腺苷酶影响的研究[J].中医药学刊,2003,21(4):546—548.
- [4] Dolmetsch CE, Xu K, Lewis RS. Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression[J]. Nature, 1998,392(30):933—936.
- [5] White BC,Sullivan JM,De Gracia DJ.Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury[J]. J Neurol Sci,2000,179(suppl 1—2):1—33.
- [6] Kekesi K.A,Szilagyi N, Nyittai G, et al.Persistent depolarization and glu uptake inhibition operate distinct osmoregulatory mechanisms in the mammalian brain[J]. Neurochem Int, 2000, 37:171—178.
- [7] Hardingham GE,Arnold LFJ, Bading H. A calcium microdomain near NMDA receptors: on switch for ERK-dependent synapse-to-nucleus communication[J]. Nature Neuroscience,2001,4(6):565—566.
- [8] 张金玲,郭莹,李瑞午,等.针刺血清对缺血再灌注模型大鼠海马神经元钙超载的保护作用[J].中国针灸,2009,29(1):45—47.