

头穴埋线疗法基于 PI3K/AKT/Beclin-1 通路调控脑梗死缺血再灌注损伤大鼠细胞自噬

Catgut embedding therapy at scalp points regulates autophagy in rats with cerebral infarction and reperfusion injury based on PI3K/Akt/Beclin-1 pathway

陈静 王琳晶 金泽 王玉琳 侯鑫磊

ChenJing WangLinjing JinZe WangYulin HouXinlei

(黑龙江中医药大学附属第二医院 黑龙江哈尔滨 150001)

(The second affiliated hospital of Heilongjiang University of traditional Chinese Medicine, Harbin, Heilongjiang 150001)

摘要:目的:观察头穴埋线疗法对脑梗死缺血再灌注损伤大鼠脑组织自噬过程的影响作用,探讨头穴埋线疗法保护脑组织的作用机制。方法:将36只小鼠随机分为空白组、模型组、头穴埋线组,每组12只。制备大鼠脑缺血再灌注模型,头穴埋线组取百会、风府进行埋线治疗。采用mNSS评分法评估大鼠神经功能缺损状态,TTC染色检测脑梗死范围,RT-qPCR法检测大鼠脑组织PI3K、AKT、Beclin-1的mRNA表达水平的变化。结果:模型组大鼠神经功能缺损评分显著升高($P<0.05$),而头穴埋线治疗后评分降低($P<0.05$),提示头穴埋线疗法可改善大鼠神经功能缺损情况;TTC结果提示模型组大鼠的脑梗死面积显著增加($P<0.05$),经头穴埋线治疗后,梗死面积显著降低($P<0.05$);模型组大鼠缺血侧脑组织PI3K、AKT、Beclin-1的mRNA表达上调($P<0.05$),而头穴埋线能显著下调自噬相关因子的mRNA的表达($P<0.05$)。结论:头穴埋线能抑制脑缺血再灌注大鼠的自噬因子的表达,进而减轻神经功能。

Abstract: objective: to observe the effect of catgut embedding therapy on autophagy in brain tissue of rats with cerebral infarction and reperfusion injury, and to explore the mechanism of catgut embedding therapy on protecting brain tissue. Methods: 36 mice were randomly divided into blank group, model group and acupoint catgut embedding group (N = 12 in each group). The model of cerebral ischemia reperfusion in rats was established, and catgut embedding therapy was performed in the scalp acupoint catgut embedding group. The neurological deficit was evaluated by mNSS score, the infarct size was detected by TTC staining, and the mRNA expression levels of PI3K, Akt and Beclin-1 were detected by RT-qPCR. Results: the neurologic deficit score of the model group was significantly increased ($P < 0.05$), while the neurologic deficit score of the scalp acupoint catgut embedding therapy was decreased ($P < 0.05$), suggesting that catgut embedding therapy can improve the neurologic deficit of the rats. The results of TTC showed that the infarct size of the model group increased significantly ($P < 0.05$), and the infarct size of the model group decreased significantly after catgut embedding therapy ($P < 0.05$). The mRNA expressions of PI3K, Akt and Beclin-1 were up-regulated ($P < 0.05$), while catgut embedding could significantly down-regulate the mRNA expressions of autophagy-related factors ($P < 0.05$). Conclusion: catgut embedding at Scalp Point can inhibit the expression of autophagy factor in rats with cerebral ischemia-reperfusion, and then relieve nerve function. Keywords: autophagy; Catgut embedding therapy; cerebral infarction; ischemia reperfusion

关键词: 自噬; 埋线疗法; 脑梗死; 缺血再灌注

Keywords: autophagy; Catgut embedding therapy; cerebral infarction; ischemia reperfusion

中风,也叫脑卒中,是严重危害人类健康的神经系统疾病。据我国卫生部统计数据,2009年城市脑卒中的死亡率为126.27/10万,占总死亡人数的20.36%。其中缺血性脑卒中占中风的60%~80%。据统计,在四分之三的存活脑血管病患者中,都存在不同程度地丧失劳动能力现象,其中重度致残者约占40%^[1]。中风的高发病率、高死亡率、高致残率,给社会造成沉重的负担。近年来,随着中风病机制及临床研究的深入,针灸疗法越来越引起人们的重视并被广泛用于临床实践。穴位埋线疗法是刺灸法的一个重要组成部分,也是一种结合多种疗法、多种效应于一体的复合性治疗方法,是将医用蛋白线植入相应腧穴,通过线体对腧穴的长期持续刺激作用,提高腧穴的兴奋性和传导性,达到良性、双向性调节的目的。在针灸疗法临床及实验疗效显著的基础上,我们致力于对穴位埋线疗法治疗脑卒中的进一步实验探讨,有利于将此治疗方法进一步推广,降低中风的发病率和死亡率,减少致残率,提高中风患者的生活质量。

1 材料与方

健康雄性SPF级SD(Sprague-Dawley,SD)大鼠36只,约3~4月龄,体重约300g~350g,由黑龙江中医药大学实验动物中心提供。动物均于造模前先在实验室适应环境一周,期间自由进食,饮水;保持正常湿度及温度,采用自然光照。

1.2 实验方法

1.2.1 缺血再灌注(MCAO/R)模型的建立

参照文献^[2-3],线栓的制作:单丝尼龙线直径0.22~0.24mm,每段约剪成4~5cm长。用酒精消毒后,放入肝素钠中浸泡,备用。

MCAO/R造模步骤:用10%水合氯醛(300mg/kg-1,体重)腹腔注射;待5min~10min麻醉后,用手捏大鼠皮肤、尾巴无反抗,用线将大鼠仰卧位固定;剪掉颈部正中鼠毛,用安尔碘消毒皮肤。取颈正中切口,自鼠下巴0.5cm处到胸骨角;用镊子钝性分离左侧颈

总动脉及颈外动脉,暴露左侧胸锁乳突肌,见颈总动脉(CCA)搏动后,分离左侧CCA;找到CCA分叉,分离内向行走的颈外动脉(ECA)和外向行走的颈内动脉(ICA);在ECA分支出枕动脉和甲状腺上动脉处用6-0缝合线结扎;先穿一套线备用在ICA,用动脉夹暂时夹闭CCA、ICA,于ECA近端扎一松结,小心再ECA主干血管上剪一小口,将备好的线栓沿切口插入ECA近心端,约3~5mm至CCA分叉处,然后拉紧结扎线,自远端剪断ECA;将插线拉向心脏方向,经CCA分叉处将线栓松至ICA后,再移去之前ICA上的动脉夹,缓慢将线栓推进,阻塞左侧MCA血流;缝合后留控线的尾端暴露在皮肤外,缺血60min后再灌注时缓慢拉出线栓至ECA。假手术组除不插入线栓外,其余步骤同模型组。

1.2.2 实验动物分组及治疗方法

健康雄性SPF级SD大鼠36只,随机分为3组,每组12只。

(1)空白组:不插入线栓,仅暴露大脑中动脉,不缺血及再灌注,不进行其他干预;

(2)模型组:制备MCAO/R模型,缺血60min,再灌注,不进行其他干预;

(3)头穴埋线组:制备MCAO/R模型,缺血60min,再灌注,于拔栓后对大鼠进行头穴埋线治疗。取穴:百会、风府。操作方法[13]:选用7#一次性埋线针和4-0蛋白线,将蛋白线剪成5mm长,平刺5mm,将蛋白线埋入穴位。

1.2.3 神经功能缺损评分

本研究根据mNSS评分法制定神经行为学评分标准,分数与神经功能障碍严重程度呈正比。各组在造模完成后2h、7d时间点由两组人员采用盲法进行评分、记录。

1.2.4 TTC染色

再灌注7d后,各组别大鼠给予过量麻醉,生理盐水心脏灌注,快速冰上取脑,将脑组织置于-20℃冰箱内保存20min,沿冠状面均

匀切片，每片 2mm 厚，共取 5-6 个，将组织置于 2%TTC 溶液中 30min，37℃恒温孵育 15min 进行染色。完成厚吸干表面液体，按顺序拍照。采用 Image J 分析计算脑梗死面积、大脑面积，计算缺血体积比例。

1.2.5 RT-qPCR 法检测 PI3K、AKT、Beclin-1 的 mRNA 表达

取 1ml Trizol 放置于冰上预冷，加入组织样本进行充分研磨，提取总 RNA 后反转录，95℃预变性 10min，95℃变性 15s，60℃退火 30s，共进行 40 个循环，RT-qPCR 检测自噬特征性指标 PI3K、AKT、Beclin-1 的表达。

1.3 统计学分析

利用 SPSS19.0 对数据进行统计学处理。所有计数数据都用 X ± S 表示，组间比较采用单因素方差分析(ANOVA)，P < 0.05 被认为有统计学差异。

2 结果

2.1 各组神经功能缺损评分

组别	n	神经功能缺损评分	
		缺血再灌注 2h	缺血再灌注 7d
空白组	12	0.22 ± 0.12	0.19 ± 0.10
模型组	12	8.58 ± 1.02	7.42 ± 1.24
头穴埋线组	12	8.42 ± 0.74	4.33 ± 0.61***

注：与治疗前比较：**P<0.01；与模型组比较：***P<0.01。

2.2 各组 TTC 染色比较

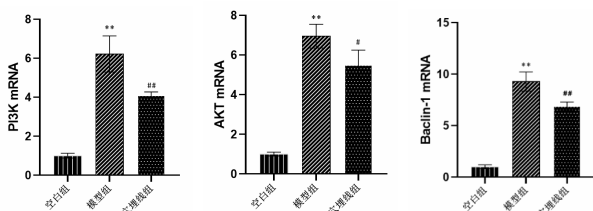
TTC 染色后，空白组大鼠脑组织未发生梗死，呈均匀红色；头穴埋线组和模型组在造模后均出现梗死灶，梗死部分呈苍白色；与模型组比较，头穴埋线组脑梗死体积较显著减小 (P<0.01)。

组别	n	脑梗死面积比值 (%)
空白组	6	0
模型组	6	32.17 ± 3.31**
头穴埋线组	6	18.67 ± 2.94**

注：与空白组比较：**P<0.01；与模型组比较：*P<0.05，**P<0.01。

2.3 RT-qPCR 测定 PI3K、AKT、Beclin-1 的 mRNA 表达水平

与空白组相比，模型组的 PI3K、AKT、Beclin-1 的 mRNA 表达均升高(P<0.05)；与模型组相比，头穴埋线组的 PI3K、AKT、Beclin-1 的 mRNA 表达均下调(P<0.05)。结果提示，头穴埋线可通过抑制自噬过程从而保护缺血再灌注后脑组织损伤情况。



注：与空白组比较：**P<0.01；与模型组比较：*P<0.05，**P<0.01。

3 讨论

中风病名最早见于《金匱要略》，然而中风症状早在《黄帝内经》就已有记载，“大厥”“薄厥”“煎厥”“仆击”“偏风”等出现在《内经》中的类似病名，与中风昏迷期和后遗症期的部分临床表现相类似，如《素问·调经论》说：“血之与气，并走于上，则为大厥，厥则暴死，气复反则生，不反则死。”汉·张仲景《金匱要略·中风历节病脉证并治第五》篇中：“寸口脉浮而紧，紧则为寒，浮则为虚，寒虚相搏，邪在皮肤”。“邪在于络，肌肤不仁；邪在于经，即重不胜；邪入于府，即不识人；邪入于藏，舌即难言，口吐涎。描述了中风病的病因及脉证。

自噬，全称为自体吞噬，是细胞受到刺激后吞噬自身的细胞质或细胞器，最终将吞噬物在溶酶体内降解的过程^[6]。自噬作为 II 型程序性细胞死亡，在肿瘤、老化和神经退化等细胞增殖和死亡紊乱疾病中发挥着重要的作用。

自噬基因 Beclin-1 可能是自噬的“守门人”，是自噬的直接执行者，可以成为人工干预自噬活性的靶点。有研究^[7]证实，在缺血缺

血后短时间内，海马区和皮质区自噬相关基因 Beclin-1 的表达增加明显。研究人员^[8]发现，单向缺氧缺血后，脑神经元中自噬相关标记 LC3 II 表达成年鼠是幼鼠的 3 倍，说明脑缺血缺血后可出现自噬。在缺血缺血中，发生纤维素沉积，受损神经元出现自体吞噬/溶酶体细胞死亡方式，皮质区神经元胞质中自体吞噬体和自身溶酶体增加明显，可引起脑缺血再灌注损伤。有研究进一步证实，严重缺氧-缺血既可导致皮质区和海马区自噬体增加，半暗带区 beclin-1 表达增高，也引起溶酶体活性的增加，自体吞噬泡的活性增强。对比诱导或抑制自噬的渠道，我们发现自噬抑制剂(3-MA)预处理后，明显减弱自噬基因如 Beclin-1、LC3- II 和 HSP70 的上调和 p62 的下调；自噬诱导剂(雷帕霉素)预处理可增加 LC3- II 和 Beclin-1 的蛋白水平，可见自噬蛋白 Beclin-1 通过调控自噬起到脑保护作用。Sheng 等发现缺血预处理能缓解脑水肿、减少脑梗死体积和改善行为损伤，减低自噬与神经保护作用相关。在对自噬基因 Atg5、Atg7 缺陷鼠与无基因缺陷鼠进行中枢神经系统缺血-缺氧实验时，研究人员发现基因缺陷鼠不发生自噬并且大脑和小脑大部分皮质神经元死亡，说明自噬对神经元有促存活作用。Yan 等用高压氧预处理治疗局灶性脑缺血，发现能加强自噬的活化，考虑高压氧预处理脑保护作用与自噬有关。Beclin-1 和 Bcl-2 共同参与组成 III 型 PI3 复合物调控自噬^[18]。研究表明，缺血再灌注中用 Bcl-2 能抑制 Beclin-1 依赖性自噬，降低的细胞死亡程度。Bcl-2 和 Bcl-xl 能结合到 Beclin-1 的功能性结构域上，诱导细胞自噬性死亡。Bcl-2 主要通过磷酸化及去磷酸化来执行对细胞自噬的调节作用。

本研究结果显示，模型组大鼠神经功能缺损评分显著升高，而头穴埋线治疗后评分降低，提示头穴埋线疗法可改善大鼠神经功能缺损情况；TTC 结果提示模型组大鼠的脑梗死面积显著增加，经头穴埋线治疗后，梗死面积显著降低；模型组大鼠缺血侧脑组织 PI3K、AKT、Beclin-1 的 mRNA 表达上调，而头穴埋线能显著下调 PI3K、AKT、Beclin-1 的 mRNA 的表达，说明自噬过程受到抑制。

综上所述，头穴埋线可抑制自噬过程，从而对脑缺血再灌注损伤的脑组织起到神经保护作用，为头穴埋线的临床应用提供理论依据。但头穴埋线抑制自噬发生的具体机制、自噬所产生的联级反应以及自噬程度，仍需进一步探究。

参考文献：

- [1] 饶明俐. 中国脑血管病防治指南[J], 中风与神经疾病杂志 2005, 22 (6).
- [2] Jassem W, Fuggie SV, R el a M, e t a l. Th a role of m itochondria in is-chem ia/ reperfus ion in ju ry[J].T ran sp lan tat ion, 2002, 73(4):493-439.
- [3] Xing B, Chen H, Zhang M, et a l. Ischem is postcondit ion ing inh ib its apoptos is after foca l cereb ral ischem is/reperfusion in jury in the rat[J].Strok e, 2008, 39(8):2362-2369.
- [4] Choi YS, Cho HY, Hoyt KR, et a l. IGF-1 Receptor-Mediated ERK/MAPK Signaling Couples Epilepticus to Progenitor Cell Proliferation in the Subgranular Layer of the Dentate Gyrus. Glia. 2008.56, 791-800.
- [5] Zhou, L., Del, VK., Dong, Z, et al. Neurogenesis response to hypoxia-induced cell death: MAP kinase signal transduction mechanisms. Brain Res.2004.1021, 8-19.
- [6] Sapunar D, Vilovic K, England M, et al. Morphological diversity of dying cells during regression of the human tail [J].Ann Anat, 2001; (183): 217-221.
- [7] Zhu C, Wang X, Xu F, et al. The influence of age on apoptotic and other mechanisms of cell death after cerebral hypoxia-ischemia[J].Cell Death Differ.2005,12(2):162-176.
- [8] Adhami F, Liao G, Morozov Y M, et al. Cerebral ischemia-hypoxia induces intravascular coagulation and autophagy[J].Am[J]Pathol.2006,169(2):556-583.

项目基金：黑龙江省中医药管理局面上项目 (NO: ZHY18-086)