

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2017.11.014

针刺对血管性痴呆模型大鼠大脑皮质神经元凋亡及 p-JNK 表达的影响

朱雯, 王雪蕊, 杨静雯, 杜斯琪, 刘存志*

(首都医科大学附属北京中医医院, 北京市东城区美术馆后街 23 号, 100010)

摘要 目的 探讨针刺治疗血管性痴呆的可能作用机制。方法 24 只大鼠随机分为假手术组、模型组、针刺组和非穴组, 每组 6 只。除假手术组外其余各组应用双侧颈总动脉永久性结扎方法制备血管性痴呆大鼠模型。应用 Nissl 染色观测其皮质神经元形态学改变, 应用 TUNEL 法观察皮质神经元凋亡情况, 应用免疫荧光技术观察磷酸化 c-Jun 氨基末端激酶 (p-JNK) 表达。结果 与假手术组比较, 模型组大鼠大脑皮质细胞排列散乱, 核固缩、深染, 且大脑皮质凋亡神经元增多, p-JNK 阳性细胞数增多 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 针刺组大鼠皮质神经元形态改善, 凋亡神经元较模型组显著减少, p-JNK 表达减少 ($P < 0.05$); 而非穴组无明显改善。结论 针刺可抑制血管性痴呆大鼠大脑皮质 p-JNK 表达, 减少大脑皮质凋亡神经元, 可能是其治疗血管性痴呆的机制之一。

关键词 血管性痴呆; 针刺; 细胞凋亡; 磷酸化 c-Jun 氨基末端激酶

血管性痴呆 (vascular dementia, VD) 是由脑血管疾病导致的脑功能损害的一类疾病, 主要表现为认知、学习记忆能力的下降。研究表明, 大约 25% ~ 41% 中风生还者在中风后 3 个月内发展成为血管性痴呆^[1]。随着人类社会的老龄化, 血管性痴呆发病有上升趋势, 流行病学调查显示, 血管性痴呆患者比例占痴呆患者总人数的 15%, 仅次于阿尔茨海默病^[2]。c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun NH2-terminal Kinase, JNK) 是丝裂原活化蛋白激酶 (MAPKs) 家族中的一员, 多种应激因素 (如营养因素撤除、DNA 损伤药物、活性氧等) 都能激活 JNK, 而作为细胞内重要的信号蛋白, JNK 的活化可引起细胞色素 C 的释放及 caspase 的激活, 启动细胞凋亡^[3]。JNK 信号通路在细胞凋亡、应激反应及多种疾病的发生发展中起着至关重要的作用。本研究采用双血管阻断法制备血管性痴呆大鼠模型, 观察针刺对血管性痴呆大鼠皮质神经元凋亡及磷酸化 c-Jun 氨基末端激酶 (p-JNK) 表达的影响, 旨在探讨针刺治疗血管性痴呆的可能机制。

1 材料及方法

1.1 动物

24 只 SPF 级 Wistar 健康雄性大鼠, 周龄 10 周, 体重 300 ~ 320 g, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 动物许可证号: SCXK (京 2016-0011)。

1.2 主要试剂和仪器

神经元 (Neun) 一抗, Abcam 公司, 批号: ab104224; p-JNK 一抗, cell science technology 公司, 货号: 9910; 尼氏 (Nissl) 染色液购自北京中杉金桥生物技术有限公司, 货号: C0117; 羊抗兔二抗 (货号: A23620)、羊抗鼠二抗 (货号: A23210) 均购自艾美捷科技有限公司; DeadEnd™ 荧光测定 TUNEL 试剂盒 (批号: G3250) 购自 Promega 公司, 内含蛋白酶 K、rTDT 酶、20XSSC 溶液; 4% 多聚甲醛 (货号: P1110)、DAPI (货号: D8200) 均购自索来宝科技有限公司。CM1850 恒冷箱冰冻切片仪, 德国 Leica 公司; BX53 型荧光显微镜、BX51 型光学显微镜, 均购自日本 Olympus 公司。

1.3 动物分组、造模和干预

24 只大鼠按随机数字表法分为假手术组、模型组、针刺组、非穴组, 每组 6 只。各组大鼠适应

基金项目: 北京市科技新星计划 (2014B063)

* 通讯作者: lcz623780@126.com

性喂养 3 天后,除假手术组外,其余各组采用永久性结扎双侧颈总动脉建立血管性痴呆模型^[4]。2.5%的戊巴比妥钠(0.2 ml/100 g)腹腔麻醉。待动物对疼痛刺激反应消失后,将大鼠仰卧位固定于鼠板。颈正中切开皮肤,剥离胸骨舌骨肌、肩胛舌骨肌与胸骨乳突肌,暴露双侧颈总动脉,分离双侧颈总动脉,然后仔细将血管与迷走神经分离,采用 5-0 丝线将双侧颈总动脉双重丝线永久性结扎。切口处滴 0.5 ml 庆大霉素,防止感染。假手术组除不结扎双侧颈总动脉外其他操作同手术组。

针刺组大鼠造模后针刺双侧足三里穴(大鼠后肢膝关节后外侧,腓骨小头下 5 mm,胫骨前嵴外侧 2 mm)、百会穴(大鼠顶骨正中,双耳与背部正中线的交点),百会斜刺 2 mm,足三里直刺 7 mm,施捻转补法(捻转角度 < 90°,每分钟 > 120 次),持续 30 s,留针 10 min。非穴组取双侧腋下 2 个固定非穴点(肋下髂嵴上 10 mm,上 15 mm),用平补平泻手法(捻转角度 90°~180°,每分钟 60~120 次),持续 30 s,留针 10 min。每日 1 次,治疗 6 天,休息 1 天,两周共治疗 12 次。模型组、假手术组与针刺组相同时间、相同程度的捉抓,但不针刺。

1.4 观察指标和方法

1.4.1 大鼠大脑皮质神经元形态 针刺 2 周后,每组取 6 只大鼠,大鼠经 2% 戊巴比妥钠(0.2 ml/100 g)腹腔麻醉后开胸,充分暴露心脏,在心尖部剪一开口,由该口插入灌胃针,依次进入左心室、升主动脉入口,固定心脏和针头,在右心耳用眼科剪剪一开口,打开灌注泵,先用生理盐水快速输入冲洗组织内血液,直至从右心耳流出血液变为生理盐水时,再用 4% 多聚甲醛固定液灌注,待大鼠身体完全僵直,断头取脑。经蔗糖梯度脱水后行脑组织切片(10 μm)。各组大鼠脑组织切片依次入透明剂、梯度乙醇浸泡,水洗后将切片入 Nissl 染色液中室温下 60 min,取出后蒸馏水冲洗除去浮色,酒精分色,经透明剂透明后,中性树胶封片。

BX51 型显微镜下观察皮质神经元形态。

1.4.2 大鼠大脑皮质神经元凋亡情况 每组取 6 只大鼠,脑组织经灌注、脱水切片后,进行 TUNEL 染色,脑组织切片经 4% 多聚甲醛固定后,由蛋白酶 K 溶液通透。透膜后滴加 rTDT 反应液,避光室温孵育 1 h,将 20 × SSC 溶液稀释成 2 ×,滴加 20 × SSC 溶液 50 μl,室温放置 15 min 以终止反应。洗涤样品,滴加 DAPI,封片。立即在 BX53 型荧光显微镜下分析样本,在 (520 ± 20) nm 的荧光下观察绿色荧光,在 460 nm 观察蓝色的 DAPI。每只大鼠选用 3 张切片,每个区域测 5 个视野,取平均值。所有测量均在相同光学条件下完成。

1.4.3 大鼠大脑皮质 p-JNK 表达 每组取 6 只大鼠采用免疫荧光双标法,p-JNK 一抗(1:50)与 Neun 一抗(1:400)共同孵育(4℃冰箱过夜),羊抗兔 IgG(1:400,红色)与羊抗鼠 IgG(1:400,绿色)两种荧光二抗同时孵育(37℃避光 60 min),洗涤样品,滴加 DAPI,封片。BX53 型荧光显微镜下拍照,观察大鼠皮质神经元中 p-JNK 的表达情况。

1.5 统计学方法

采用 SPSS17.0 统计软件进行分析。数据用均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间比较用单因素方差分析,并用 Tukey 法(方差齐时)或 Dunnett's T3(方差不齐时)作组间多重比较。

2 结果

2.1 各组大鼠皮质神经元形态学情况

图 1 示,假手术组大鼠皮质神经元细胞核大而圆。脑组织缺血损伤后,模型组神经元受损严重,细胞排列散乱,核固缩、深染,呈三角形、长条形、梭形或不规则形,核染色质聚集。针刺组较模型组神经元形态改善,核固缩、深染情况减少,而非穴组与模型组相比,神经元形态不规则,可见较多的核固缩、深染,核形态不规则,核染色质聚集。

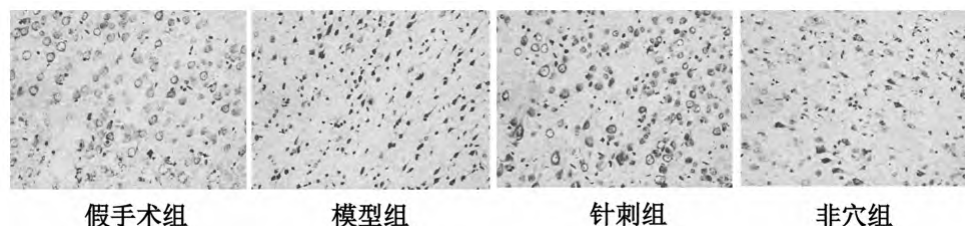


图 1 各组大鼠大脑皮质神经元形态 (Nissl 染色, ×200)

2.2 各组大鼠大脑皮质神经元凋亡及 p-JNK 表达比较

表 1 示,与假手术组比较,模型组大鼠皮质 TUNEL、p-JNK 阳性细胞数显著增多 ($P < 0.05$);与模型组比较,针刺组 TUNEL、p-JNK 阳性细胞数显著降低 ($P < 0.05$),而非穴组无显著改变 ($P > 0.05$),且非穴组 TUNEL、p-JNK 阳性细胞数明显多于针刺组 ($P < 0.05$)。

表 1 各组大鼠大脑皮质 TUNEL、p-JNK 阳性细胞数比较

组别	鼠数	TUNEL 阳性细胞数	p-JNK 阳性细胞数
假手术组	6	6.85 ± 0.99	4.29 ± 1.28
模型组	6	21.67 ± 4.28*	34.01 ± 3.98*
针刺组	6	7.38 ± 1.27 [△]	6.13 ± 1.81 [△]
非穴组	6	19.9 ± 4.17 [▲]	29.82 ± 1.77 [▲]

注: p-JNK,磷酸化 c-Jun 氨基末端激酶;与假手术组比较,

* $P < 0.05$;与模型组比较,[△] $P < 0.05$;与针刺组比较,[▲] $P < 0.05$

3 讨论

血管性痴呆可归属于中医学“痴呆”范畴。痴呆的基本病机为髓减脑消,神机失用,以气血、肾精亏虚为本,痰浊、瘀血为标,临床多见虚实夹杂之证。治疗多补肾填精益髓,益气养血,辅化痰、活血、开郁以开窍醒神。研究认为,血管性痴呆具有可防治性^[1],积极防治血管性痴呆具有重要的临床意义。临床研究表明,针灸可有效改善血管性痴呆患者的认知功能,提高生活质量^[6-7]。动物实验表明,针刺可提高血管性痴呆模型大鼠的空间学习和记忆能力,有效改善其行为学^[8-9]。百会位于巅顶“头者,身之元首,人神所在”,属督脉,历代医家素有“病变在脑,首取督脉”之说。足三里为足阳明胃经合穴,是补中益气之要穴,也是胃腑的下合穴,有和胃健脾、升清降浊、导痰行滞之功。针刺百会与足三里既可增加局部经脉之间的联系,激发经气,又可调整全身脏腑气血运行,濡养脑髓,醒脑开窍。

在慢性脑低灌注模型中,尽管海马被认为是主要的容易受到缺血性损伤的脑区,但与认知功能密切相关的脑皮质在神经退行性疾病的病理过程中也有着潜在作用^[10]。研究^[11]发现,在双侧颈总动脉结扎模型中,大鼠皮质、纹状体、海马及皮质下白质出现进行性神经元损害,且神经元损害与进行性认知功能损害相平行。赵建新等^[12]也观察到,在脑缺血再灌注模拟血管性痴呆模型中,小鼠大脑皮质变薄,并出现神经细胞核固缩,神经元数目减少等现象。本研究也发现,经双侧颈总动脉结扎后,

模型组神经元受损严重,出现神经元皱缩,核固缩、深染,凋亡神经元显著增多等现象。经针刺治疗后,可有效减少凋亡神经元数量,改善神经元形态。

JNK 信号转导通路是介导细胞凋亡的一条重要通路,与脑组织缺血再灌注损伤有密切联系。研究表明,缺血再灌注可激活 JNK 信号通路,而且 JNK 的激活在局灶和全脑缺血神经元凋亡过程中发挥重要作用^[13]。脑缺血可激活 JNK 信号通路中的 MAPKK 激酶 (MAPKKK),进而激活 MKK4 和 MKK7,引起 JNK 的磷酸化,从而激活 JNK^[14]。p-JNK 既可上调促凋亡相关蛋白的表达,激活死亡受体凋亡通路,又可通过调节 Bcl-2 家族成员的活性,参与由线粒体介导的细胞凋亡通路,激活 caspase-3,最终引发细胞凋亡^[15]。王雪笠等^[16]发现,血管性痴呆模型小鼠海马 JNK 阳性细胞数明显增多,该现象与血管性痴呆小鼠记忆、学习障碍相关。本研究发现,经双侧颈总动脉结扎后,模型组皮质大鼠 p-JNK 的阳性细胞数显著增多,而针刺可显著降低其阳性细胞数,表明针刺可抑制其激活。

综上所述,针刺治疗可抑制血管性痴呆大鼠皮质 p-JNK 的表达,减少皮质神经元凋亡,提示针刺治疗血管性痴呆的作用机制可能与抑制 JNK 信号通路、减少神经元凋亡有关。

参考文献

- [1] PAUL RH, COHEN RA, MOSER DJ, et al. Clinical correlates of cognitive decline in vascular dementia [J]. Cogn Behav Neurol, 2003,16(1):40-46.
- [2] O'BRIEN JT, THOMAS A. Vascular dementia [J]. Lancet, 2015,386(10004):1698-1706.
- [3] DAVIS RJ. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases [J]. Cell, 2000,103(2):239-252.
- [4] GOOCH J, WILCOCK DM. Animal models of vascular cognitive impairment and dementia (VCID) [J]. Cell Mol Neurobiol, 2016,36(2):233-239.
- [5] 高风超,陈翔,田新英. 血管性痴呆危险因素及发病机制的研究进展 [J]. 医学综述,2014,20(6):1068-1071.
- [6] SHI GX, LI QQ, YANG BF, et al. Acupuncture for vascular dementia: a pragmatic randomized clinical trial [J]. Scientific World Journal, 2015: 161439. doi: 10.1155/2015/161439.
- [7] 张亚敏,孙华,陈素辉. 针灸干预血管性痴呆的临床研究进展 [J]. 针灸临床杂志,2012,28(8):65-68.
- [8] WANG XR, SHI GX, YANG JW, et al. Acupuncture ameliorates cognitive impairment and hippocampus neuronal loss in experimental vascular dementia through Nrf2-mediated

- antioxidant response [J]. Free Radic Biol Med, 2015, 89: 1077-1084. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.10.426.
- [9] LI H, LIU Y, LIN LT, et al. Acupuncture reversed hippocampal mitochondrial dysfunction in vascular dementia rats [J]. Neurochem Int, 2016, 92: 35-42. doi: 10.1016/j.neuint.2015.12.001.
- [10] STANOJLOVIC M, ZLATKOVIC J, GUSEVAC I, et al. Repeated low-dose 17 β -estradiol treatment prevents activation of apoptotic signaling both in the synaptosomal and cellular fraction in rat prefrontal cortex following cerebral ischemia [J]. Neurochem Int, 2015, 83-84: 1-8. doi: 10.1016/j.neuint.2015.03.002.
- [11] NI JW, MATSUMOTO K, LI HB, et al. Neuronal damage and decrease of central acetylcholine level following permanent occlusion of bilateral common carotid arteries in rat [J]. Brain Res, 1995, 673(2): 290-296.
- [12] 赵建新, 田元祥, 李国明, 等. 脑缺血再灌注拟血管性痴呆小鼠皮层及海马细胞病理形态学动态观察 [J]. 中风与神经疾病杂志, 2000, 12(4): 200-202.
- [13] IRVING EA, BAMFORD M. Role of mitogen- and stress-activated kinases in ischemic injury [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2002, 22(6): 631-647.
- [14] BRUNET A, POUYSSEGUR J. Mammalian MAP kinase modules: how to transduce specific signals [J]. Essays Biochem, 1997, 32: 1-46.
- [15] 汪劼, 易静. JNK 介导的信号转导途径以及活性氧在其中的作用 [J]. 生命科学, 2006, 18(4): 361-367.
- [16] 王雪笠, 吕佩源, 冯连元, 等. 血管性痴呆小鼠海马神经元 JNK 的表达及意义 [J]. 实用医学杂志, 2010, 26(3): 379-381.

Impact of Acupuncture on Cortical Neuron Apoptosis and Phosphorylation c-Jun NH₂-terminal Kinase Expression in Vascular Dementia Model Rats

ZHU Wen, WANG Xuerui, YANG Jingwen, DU Siqi, LIU Cunzhi

(Beijing Hospital of Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing, 100010)

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of acupuncture treating vascular dementia (VD). **Methods** Twenty-four rats were randomized into sham operation group, model group, acupuncture group and non acupoint group with 6 rats in each group. Except the sham operation group rats in other groups were built VD rat models using permanent bilateral common carotid artery ligation method. Cortical neuron morphological changes were examined by Nissl stain. Cortical neuron apoptosis were examined by TUNEL method. The expression of phosphorylation c-Jun NH₂-terminal Kinase (p-JNK) was examined by immunofluorescence technique. **Results** Compared with the sham operation group, the model group rats' cortical cells were scattered, nucleus pyknosis and deep staining. Cortical neuron apoptosis and p-JNK expression increased ($P < 0.05$). Compared with the model group, the acupuncture group rats' cortical neuron morphology improved. Neuron apoptosis and p-JNK expression decreased ($P < 0.05$). There was no obvious improvement in the non acupoint group. **Conclusion** Acupuncture might inhibit the expression of p-JNK in cortex of VD rats. Reducing cortical neuron apoptosis might be one of the mechanisms of treating VD.

Keywords vascular dementia; acupuncture; apoptosis; phosphorylation c-Jun NH₂-terminal kinase

(收稿日期: 2016-12-11; 修回日期: 2017-03-05)

编辑: 王利芬

石家庄市桥西区炎黄针灸推拿专修学校

本校 1995 年成立, 是一所理论与实践相结合的全日制针灸推拿专修学校。现招生专业如下。

一、中医针灸推拿专修班: 2 月 19 日、7 月 1 日、11 月 1 日开学。开学、循环授课可随到随学, 一期学不会下学期免费学习。讲授中医基础理论、中医诊断学、解剖学、针灸学、推拿学、特色课程如: 腹诊与腹针、眼诊与眼针、锋针、舌三针、头皮针、梅花针的临床应用及高血压、半身不遂、心脏病、肠胃炎、妇科病、更年期综合征等疑难病症的缓解与治疗。

二、另开设高级针灸师进修班、高级按摩师培训班、小儿推拿班、中医正骨培训班; 经考试合格颁发证书。

招生电话: 0311-85876145、13131169949、15631134533

网址: WWW.YHZHENJIU.COM