

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2020.02.013

实验研究

针刺“百会”穴对缺血再灌注大鼠脑组织组蛋白去乙酰化酶的影响

傅淑平^{*}, 龚理², 李潇潇¹, 王亚玲¹, 袁璟¹, 卢圣锋¹

1. 南京中医药大学第二临床医学院, 江苏省南京市仙林大道 138 号, 210023; 2. 新疆医科大学附属中医医院

摘要 目的 探讨针刺百会穴治疗缺血再灌注脑损伤的可能作用机制。方法 将 54 只 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组和百会组, 每组 18 只。模型组和百会组大鼠采用大脑中动脉阻断手术建立缺血再灌注损伤模型, 假手术组仅分离结扎颈外动脉但不插线栓。缺血 2 h 拔出线栓分别于再灌注 1 min、20 h 时, 百会组给予“百会”穴电针刺激, 每次 30 min, 共 2 次, 模型组与假手术组仅用相同方式固定 30 min。用伊文氏蓝 (EB) 染色法检测各组大鼠血脑屏障致密性, TTC 染色法检测脑梗死体积, ELISA 染色法检测组蛋白去乙酰化酶 (HDACs) 活性, Western blot 法检测缺血侧大鼠组织 HDACs 亚型蛋白表达水平。结果 缺血再灌注 24 h 后, 与假手术组比较, 模型组大鼠缺血侧大鼠组织中出现明显的梗死区域, EB 渗出率及 HDACs 活性及组蛋白去乙酰化酶 3 (HDAC3)、组蛋白去乙酰化酶 6 (HDAC6)、组蛋白去乙酰化酶 11 (HDAC11) 蛋白表达显著增加, 组蛋白去乙酰化酶 1 (HDAC1)、组蛋白去乙酰化酶 2 (HDAC2) 及组蛋白去乙酰化酶 9 (HDAC9) 蛋白表达下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 而经电针干预后, 与模型组比较, 百会组 EB 渗出率、梗死体积、HDACs 活性及 HDAC3、HDAC6、HDAC11 蛋白表达显著下降, HDAC1、HDAC2、HDAC9 表达增高 ($P < 0.05$)。结论 电针“百会”穴可降低缺血再灌注损伤大鼠脑组织 HDACs 活性, 逆向调节缺血再灌注损伤所导致的 HDACs 表达失衡状态, 这可能是其抗缺血再灌注脑损伤的作用机制之一。

关键词 缺血再灌注; 脑卒中; 组蛋白去乙酰化酶; 血脑屏障; 百会穴

脑卒中为老年人的常见病、多发病, 是目前世界范围内导致死亡的第二大因素, 同时也是成年人致残的首因^[1-2]。针灸在中风后的康复治疗中显示出较好的疗效, 大量临床及实验研究均显示, 针刺可通过多靶点干预, 整体改善中风后的各种损伤, 促进脑组织形态及神经功能的恢复^[3], 但其作用机制及关键作用环节仍未明确。研究显示, 组蛋白去乙酰化酶 (histone deacetylases, HDACs) 表达及功能的异常与缺血性脑中风密切相关, 在缺血再灌注损伤实验动物脑内, 不同 HDACs 可出现显著的改变^[4-5]。人类全基因组关联分析结果亦显示, 组蛋白去乙酰化酶 9 (HDAC9) 基因变异可显著提高中风的发生机率, 是与大血管中风密切相关的基因区域^[6]。此外, 大量研究表明, HDACs 抑

制剂可维持甚至提高缺血脑组织组蛋白乙酰化水平, 缩小脑梗死体积, 降低细胞死亡率^[7-9]; 同时改善神经功能缺损, 促进损伤脑组织的再生修复^[10-12]。以上研究均提示, HDACs 在脑中风发生发展过程中占据着重要地位, 可能是揭示针刺多靶点干预的关键点^[13]。本实验通过观察电针“百会”穴对缺血再灌注大鼠脑内 HDACs 活性及相关 HDACs 蛋白表达水平的影响, 探讨针刺治疗缺血再灌注脑损伤的可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物

54 只 SPF 级雄性 SD 大鼠, 体质量 250 ~ 300 g, 由上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供, 实验动物许可证号: SCXK (沪) 2013-0016。大鼠分笼饲养, 实验过程中对动物的处置严格遵守中华人民共和国科学技术部《关于善待实验动物的指

基金项目: 国家自然科学基金 (81774403, 81403479); 江苏省自然科学基金 (BK20171492); 江苏省“六大人才高峰”项目 (YY-023)

* 通讯作者: shupingfu@njucm.edu.cn

导意见》。

1.2 主要试剂与仪器

异氟烷 (批号: H1998014, 河北一品制药有限公司); 伊文氏蓝 (EB, 货号: E2129)、戊巴比妥钠 (货号: P3761), 美国 Sigma 公司; 甲酰胺 (货号: 17899)、Pierce™ BCA 蛋白试验试剂盒 (货号: 23225)、蛋白裂解提取液 (RIPA, 货号: 89901), 美国 Thermo 公司; HDACs 活性检测试剂盒 (货号: 17-356), 美国 Millipore 公司; 一抗组蛋白去乙酰化酶 1 (HDAC1, 货号: 34589)、组蛋白去乙酰化酶 2 (HDAC2, 货号: 57156)、组蛋白去乙酰化酶 3 (HDAC3, 货号: 3949)、二抗羊抗小鼠 (货号: 7076)、羊抗兔 (货号: 7074), 美国 Cell Signaling 公司; 组蛋白去乙酰化酶 6 (HDAC6, 货号: ab82557)、HDAC9 (货号: ab18970)、组蛋白去乙酰化酶 11 (HDAC11, 货号: ab18973), 美国 Abcam 公司; ECL 发光检测试剂盒 (货号: 32209), Thermo Fisher 公司。

酶标仪 (型号: Synergy H1, 美国 Bio-Tek 公司); 无菌针灸针 (0.3 mm × 25 mm, 华佗牌, 苏州医疗用品厂有限公司); 韩氏电针治疗仪 (型号: Hans-200E, 南京济生医疗科技有限公司); 高速冷冻离心机 (型号: SorvallStratos, 美国 Thermo 公司)

1.3 动物分组、造模方法

54 只大鼠适应性饲养 1 周后, 采用随机数字表法分为假手术组、模型组和百会组各 18 只。模型组和百会组大鼠参照文献 [4] 采用改良的大脑中动脉阻断手术建立缺血再灌注大鼠模型, 缺血 2 h 后, 拔出线栓, 恢复血流。术后采用 Bederson 评分 [5] 评价神经功能缺损程度, 无明显神经功能缺损表现、手术时出血较多、出现蛛网膜下腔出血或其附近的 willis 环动脉有凝血块的大鼠均予以排除。假手术组大鼠仅分离结扎颈外动脉, 不插线栓, 然后缝合。

1.4 干预方法

百会组以“百会”穴作为针刺点, 穴位定位参照《实验针灸学》[6], 分别于缺血再灌注 1 min 及 20 h 时给予电针刺激, 具体操作如下: “百会”斜刺 3 ~ 5 mm, 采用双极针进行针刺, 针刺入后不行针, 接韩氏电针仪, 频率 2/15 Hz, 电流强度 1 ~ 1.2 mA。每次 30 min, 共 2 次。假手术组与模型组仅用相同的方式固定 30 min, 不给予电针刺激。

1.5 观察指标及方法

1.5.1 血脑屏障的致密性 采用 EB 染色法检测各组大鼠缺血再灌注 24 h 血脑屏障致密性, 每组根据随机数字表法选出 6 只大鼠。百会组大鼠于处死前 2 h 完成电针刺激处理, 随后各组动物在处死前 1 h, 采用异氟烷麻醉, 经股动脉注射 2% 的 EB 溶液 (3 ml/kg), 注射 1 h 后, 腹腔注射过量戊巴比妥钠处死动物, 并立即用生理盐水经心脏进行灌流冲洗, 待心耳处流出清亮的液体后, 快速将动物大脑在冰上取出, 并分为左右两侧大脑进行称重, 随后各自加入适量的甲酰胺 (3 ml/600 mg), 置于 60℃ 水浴锅内过夜, 24 h 后, 1000 r/min (半径 10 cm) 常温离心 5 min, 提取上清液; 随后将准备好的不同浓度的 EB 标准品溶液及各实验组上清液标记好后, 各取 200 μl 加入到 96 孔酶标板内, 每个标准品及样品均需要设置 3 个复孔, 在 632 nm 光波长处检测; 再根据不同浓度标准品的 OD 值得到 EB 标准曲线, 计算各组样品的 EB 渗透率。

1.5.2 TTC 染色法检测脑梗死体积 缺血再灌注 1 天后采用随机数字表法每组选出 6 只大鼠, 百会组大鼠于处死前 2 h 完成电针刺激处理, 随后腹腔注射过量戊巴比妥钠处死动物, 并立即用生理盐水经心脏进行灌流冲洗, 待心耳处流出清亮的液体后, 快速将动物大脑在冰上取出, 并迅速放入 -20℃ 冰箱中速冻 20 min 左右, 将冰冻后的大脑置于脑槽内进行切片, 随后将切片置于 2% TTC (2, 3, 5-氯化三苯基四氮唑) 溶液中, 用锡箔纸盖住放入 37℃ 温箱 20 min, 期间不时翻动脑片, 使其均匀接触到染色液。染色后正常组织中因脱氢酶反应而呈红色, 而缺血组织内脱氢酶活性下降不能反应, 故不会产生变化呈苍白。随后用 4% 多聚甲醛固定 2 h 后照相, 并用 Imag J V2.1.4.7 对梗死体积进行定量。

1.5.3 大脑组织 HDACs 活性 采用 ELISA 试剂盒检测各实验组缺血侧大脑组织 HDACs 活性, 每组 6 只。缺血再灌注 1 天后, 用生理盐水经心脏进行灌流冲洗, 待心耳处流出清亮的液体后, 快速将动物大脑在冰上取出, 分离缺血侧大脑, 并迅速放入液氮中研磨成粉, 随后收集样品, 并加入 RIPA 蛋白裂解提取液中 (约 20 mg 蛋白/200 μl RIPA 裂解液), 用玻璃匀浆器匀浆处理, 随后在冰上孵育 20 min, 使组织样品充分裂解; 14400 r/min (半径 10 cm)、4℃ 离心 10 min; 转移上清液至新管中, 利用 BCA 蛋白试验试剂盒对蛋白进行定量。随后

根据 HDACs 活性检测试剂盒操作说明检测样品 HDACs 活性, 样品上样量为 $100 \mu\text{g}/\text{孔}/15 \mu\text{l}$, 加入底物 $267 \mu\text{mol}/\text{L}$ HDAC 检测底物 $15 \mu\text{l}/\text{孔}$ 后, 放置于 37°C 避光孵育 30 min , 随后立即加入激发液 $20 \mu\text{l}/\text{孔}$, 于常温孵育 15 min 后, 将酶标板置于酶标仪中进行检测, 激发光 350 nm , 发射光 460 nm , 以光密度值大小反映 HDACs 活性。

1.5.4 大鼠组织 HDACs 蛋白表达 缺血再灌注 24 h 后, 收集各组缺血侧大鼠组织, 加入 RIPA 蛋白裂解提取液 (约 20 mg 蛋白/ $200 \mu\text{l}$ RIPA 裂解液), 提取组织总蛋白, 并进行蛋白定量, 随后利用 Western blot 法根据抗体说明书检测各组 HDAC1、HDAC2、HDAC3、HDAC6、HDAC9、HDAC11、GAPDH 蛋白表达水平。用 ECL 发光检测试剂盒曝光条带并照相记录结果, 采用 Image J V2.1.4.7 软件对条带进行半定量分析, GAPDH 作为内参蛋白以校正各实验组目的蛋白相对表达量, 随后以假手术组为对照, 计算模型组及百会组中各目的蛋白的相对表达量。

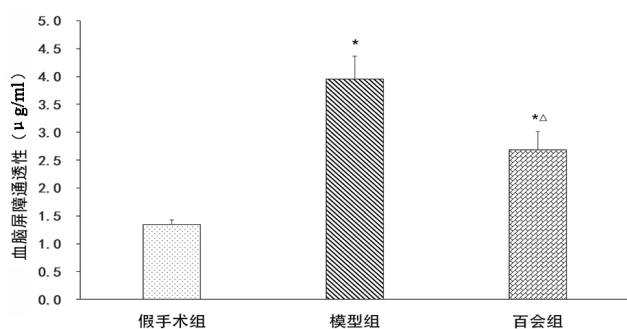
1.6 统计学方法

采用 SPSS 21.0 软件进行数据统计分析。计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 各组间数据比较采用单因素方差分析, 若方差齐性, 选用 Bonferroni 法进行组间比较; 若方差不齐性, 则选用 Tamhane 法进行组间比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠血脑屏障通透性比较

图 1 示, 与假手术组比较, 模型组及百会组血脑屏障通透性均显著提高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 百会组血脑屏障通透性显著降低 ($P < 0.05$)。

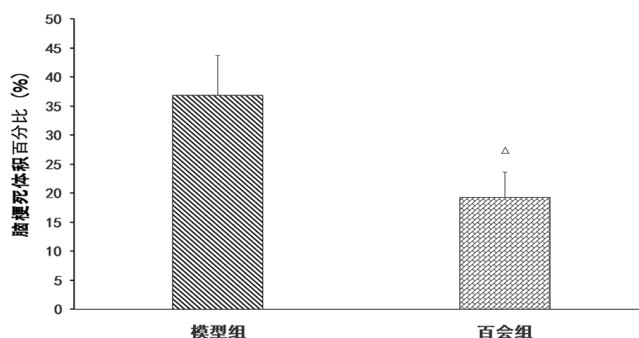


注: 与假手术组比较, $* P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$

图 1 各组大鼠血脑屏障通透性比较

2.2 各组大鼠脑梗死体积比较

假手术组大鼠脑组织无脑梗死表现, 而模型组、百会组脑组织因缺血再灌注损伤, 损伤侧呈现轻重不一的坏死白色区域。图 2 示, 百会组大鼠脑梗死体积百分比显著少于模型组 ($P < 0.05$)。

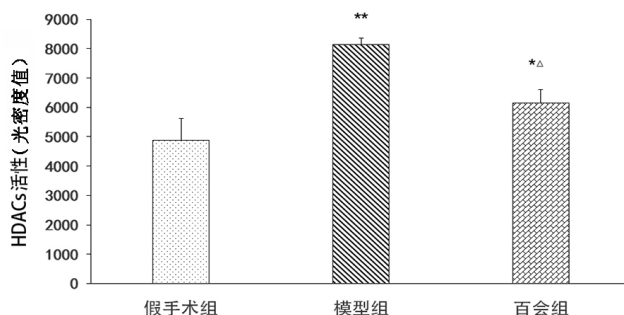


注: 与模型组比较, $* P < 0.05$

图 2 各组大鼠脑梗死体积比较

2.3 各组大鼠脑组织 HDACs 活性比较

图 3 示, 与假手术组比较, 缺血再灌注 24 h 后, 模型组大鼠缺血侧脑组织的 HDACs 活性显著增加 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 百会组 HDACs 活性显著下降 ($P < 0.05$), 但亦高于假手术组 ($P < 0.05$)。



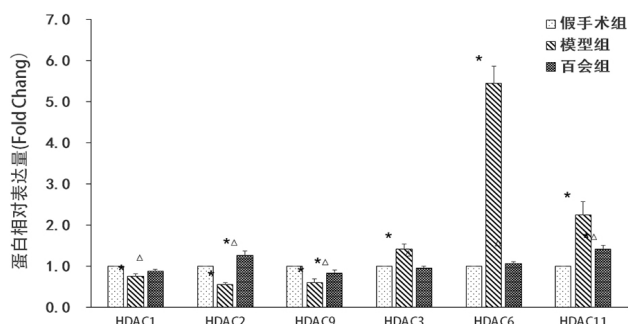
注: HDACs, 组蛋白去乙酰化酶; 与假手术组比较, $* P < 0.05$,

$** P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$

图 3 各组大鼠缺血侧脑组织 HDACs 活性比较

2.4 各组大鼠脑组织 HDACs 蛋白表达比较

图 4 示, 缺血再灌注 24 h 后, 与假手术组比较, 模型组 HDAC1、HDAC2、HDAC9 蛋白表达降低, HDAC3、HDAC6、HDAC11 蛋白表达量显著升高 ($P < 0.01$); 百会组 HDAC9 蛋白表达下降, HDAC2、HDAC11 表达增加 ($P < 0.01$), HDAC1、HDAC3、HDAC6 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与模型组比较, 电针治疗后, 百会组 HDAC1、HDAC2、HDAC9 表达量显著上调, 而 HDAC3、HDAC6、HDAC11 表达水平则明显下降 ($P < 0.05$)。



注: HDAC1, 组蛋白去乙酰化酶 1; HDAC2, 组蛋白去乙酰化酶 2; HDAC9, 组蛋白去乙酰化酶 9; HDAC3, 组蛋白去乙酰化酶 3; HDAC6, 组蛋白去乙酰化酶 6; HDAC11, 组蛋白去乙酰化酶 11; 与假手术组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$

图 4 各组大鼠脑组织不同 HDACs 蛋白相对表达量比较

3 讨论

百会穴作为督脉的重要穴位,亦是“三阳五会”之穴,其位于巅顶,具有醒脑开窍、安神益智等作用。根据大脑皮质功能区在头皮的投影,百会透前顶为皮质运动、感觉区上部的投影区,同时也是大脑前动脉主干投影区,因此,百会穴在临床脑损伤治疗中选用频次较高^[17]。有研究显示,无论是单穴还是配穴使用,单次或多次重复刺激百会穴均可显著减轻脑缺血再灌注损伤^[18-19]。本实验结果显示,针刺百会穴治疗后,大鼠缺血侧大脑 EB 渗透率与脑梗死体积均显著减少,说明针刺“百会”穴可以减轻缺血再灌注损伤对血脑屏障完整性的破坏,减轻缺血再灌注对脑组织的损害,具有抗脑损伤作用,这与既往文献结果^[18-21]是一致的。

HDACs 是组蛋白乙酰化修饰的主要蛋白酶之一,它与组蛋白乙酰转移酶 (HATs) 共同调控组蛋白乙酰化水平,分为 Zn^{2+} 依赖型和 NAD^{+} 依赖型两大类,其中 Zn^{2+} 依赖型含 11 种酶,分为 I 类 (HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC8)、II 类 (HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC9, HDAC10) 和 IV 类 (HDAC11)。 Zn^{2+} 依赖型 HDACs 不仅催化组蛋白去乙酰化,还能催化非组蛋白如转录因子、细胞骨架蛋白、热休克蛋白 90 (Hsp90)、热休克蛋白 70 (Hsp70) 等分子伴侣和核因子去乙酰化,参与细胞基本活动的调节,故 HDACs 功能的异常可导致多种疾病的发生^[2]。有研究证实,HDACs 表达及功能的异常与缺血性脑中风密切相关,缺血再灌注损伤可诱使 HDAC1、HDAC2、HDAC9 在术后 48 h 明显下降,HDAC3、

HDAC6 及 HDAC11 在术后 3h 先出现明显上升,随后出现下降的趋势^[4-5]。HDACs 抑制剂可通过抑制 HDACs 活性,有效阻断缺血脑组织内组蛋白乙酰化水平降低,多靶点发挥抗脑损伤的作用^[7-12]。本实验结果显示,缺血再灌注 24 h 后,模型组大鼠缺血侧脑内 HDACs 活性与假手术组相比提高,HDAC1、HDAC2、HDAC9 蛋白表达量显著降低,同时 HDAC3、HDAC6、HDAC11 蛋白表达量明显上升,此结果与既往文献报道^[4-5]一致。

Montgomery 等^[23]认为,HDAC1 是神经细胞凋亡与否的分子开关,HDAC1 若被 HDAC3 募集结合形成复合物,将促使神经细胞走向凋亡;若与 HDAC9 的异构体组蛋白去乙酰化酶相关蛋白 HDRP 形成复合物,则可抑制 JNK/c-Jun 信号通路,促进细胞的存活;HDAC1 或 HDAC3 的失活均可有效阻断由 HDAC1-HDAC3 复合物所诱发的细胞损伤。Yang 等^[24]研究发现,HDAC3 特异性抑制剂可通过减少 HDAC3 在 70kDa 热休克蛋白 1A (hspa1a)、Bcl-2 样蛋白 1 (Bcl2l1) 及过氧化还原酶 2 (Prdx2) 基因启动子区的聚集,显著减轻大鼠大脑中动脉阻断术后 24 h 及 7 天的神经功能损伤及脑梗死体积。此外,有研究表明,HDAC1 与 HDAC2 可通过调控 Notch 与 Wnt 信号通路,控制运动神经元的形成、迁移及突触的生长,参与神经功能康复^[25];在发育过程敲除 HDAC1 及 HDAC2 将导致胚胎鼠海马结构异常,小脑叶缺失,皮层神经元无序分布,最终在出生后 7 天内死亡^[26]。缺血性中风诱发 HDAC6 蛋白表达的上调,可导致 Hsp90、proxiredoxin-1、proxiredoxin-2、 α -tubulin 等蛋白去乙酰化,加剧中风后脑内细胞炎症反应、氧化应激反应与兴奋性毒性反应,并降低神经元细胞的迁移生长,促进细胞凋亡发生^[27];而 HDAC6 抑制剂的使用则可以显著减轻中风后的神经损伤^[28]。本研究结果表明,电针大鼠“百会”穴可显著逆向调节因缺血再灌注损伤而导致的 HDACs 蛋白表达异常状况,即上调缺血侧脑内 HDAC1、HDAC2 及 HDAC9 蛋白的表达,同时下调 HDAC3、HDAC6 及 HDAC11 的表达,提示针刺“百会”穴对中风后脑损伤多靶点保护作用的实现可能与其同时调节多种 HDACs 蛋白的表达,调节不同下游靶蛋白乙酰化修饰或靶基因转录活性密切相关。

综上所述,我们认为电针“百会”穴可以降低缺血再灌注大鼠脑内 HDACs 活性,并调节由缺血再灌注损伤所诱发的 HDACs 蛋白异常表达,这

可能是其发挥抗脑缺血再灌注损伤的作用机制之一。本研究目前仅在脑缺血再灌注损伤 24 h 时,检测到针刺“百会”穴可以逆向调节 HDACs 表达的异常,但根据文献^[1-3]报道,中风后脑内不同 HDACs 亚型随着病程的进展呈现不同的动态变化趋势,这些变化与其在中风病理发展过程中所扮演的角色密切相关,因此,在后续的研究中,通过结合特定 HDACs 在中风病理进展过程中所发挥的主要作用,动态地观察针刺对其基因蛋白表达的调控作用,以及其对下游关键细胞因子修饰作用的调节机制,会更有助于阐释针刺抗脑缺血再灌注损伤的机制。

参考文献

- [1] ROGER VL, GO AS, LLOYD-JONES DM, et al. Heart disease and stroke statistics: 2011 update: a report from the American Heart Association [J]. *Circulation*, 2011, 123(4): e18-e209.
- [2] LIU L, WANG D, WONG KS, et al. Stroke and stroke care in China: huge burden, significant workload, and a national priority [J]. *Stroke*, 2011, 42(12): 3651-3654.
- [3] 张晨蕾,李永峰,惠建荣,等. 针刺调控不同信号通路防治缺血性脑血管病的研究进展 [J]. *针刺研究*, 2018, 43(8): 531-536.
- [4] CHEN YT, ZANG XF, PAN J, et al. Expression patterns of histone deacetylases in experimental stroke and potential targets for neuroprotection [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2012, 39(9): 751-758.
- [5] BALTAN S, BACHLEDA A, MORRISON RS, et al. Expression of histone deacetylases in cellular compartments of the mouse brain and the effects of ischemia [J]. *Transl Stroke Res*, 2011, 2(3): 411-423.
- [6] International Stroke Genetics Consortium (ISGC), Wellcome Trust Case Control Consortium 2 (WTCCC2), BELLENGUEZ C, et al. Genome-wide association study identifies a variant in HDAC9 associated with large vessel ischemia stroke [J]. *Nat Genet*, 2012, 44(3): 328-333.
- [7] GIBSON CL, MURPHY SP. Benefits of histone deacetylase inhibitors for acute brain injury: a systematic review of animal studies [J]. *J Neurochem*, 2010, 115(4): 806-813.
- [8] ZHENG Z, KIM JY, MA H, et al. Anti-inflammatory effects of the 70kDa heat shock protein in experimental stroke [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2008, 28(1): 53-63.
- [9] WANG Z, LENG Y, TSAI LK, et al. Valproic acid attenuates blood-brain barrier disruption in a rat model of transient focal cerebral ischemia the roles of HDAC and MMP-9 inhibition [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2011, 31(1): 52-57.
- [10] WU JY, NIU FN, HUANG R, et al. Enhancement of glutamate uptake in 1-methyl-4-phenylpyridinium-treated astrocytes by trichostatin A [J]. *Neuroreport*, 2008, 19(12): 1209-1212.
- [11] KIM HJ, LEEDS P, CHUANG DM. The HDAC inhibitor, sodium butyrate, stimulates neurogenesis in the ischemic brain [J]. *J Neurochem*, 2009, 110(4): 1226-1240.
- [12] 韩丽娟,徐运. 组蛋白去乙酰化酶抑制剂在缺血性卒中的神经保护机制 [J]. *国际脑血管病杂志*, 2012, 18(5): 358-362.
- [13] 傅淑平,卢圣锋,沈卫星,等. 组蛋白去乙酰化酶:缺血性脑中风治疗的一个潜在新靶点 [J]. *中国老年学杂志*, 2014, 34(19): 5599-5601.
- [14] LONGA EZ, WEINSTEIN PR, CARLSON S, et al. Reversible middle cerebral Artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91.
- [15] BEDERSON JB, PITTLIS LH, TSUJI M, et al. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurology examination [J]. *Stroke*, 1986, 17(3): 472-476.
- [16] 余曙光,郭义. 实验针灸学 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2009: 152.
- [17] 寇任重,陈鸿,蒋钰,等. 针刺治疗脑病的主穴规律分析 [J]. *广州中医药大学学报*, 2015, 32(3): 547-551.
- [18] 王冠,孙晓伟,邹伟. 百会穴透曲鬓穴对大鼠中动脉缺血再灌注大鼠神经功能评分和 NF- κ B 表达的影响 [J]. *针灸临床杂志*, 2009, 25(10): 37-39.
- [19] 劳宁,熊利泽,路志红,等. 百会穴在电针刺激预处理诱导脑缺血耐受中的作用 [J]. *第四军医大学学报*, 2003, 24(5): 418-420.
- [20] 林咸明,陈丽萍,姚旭. 不同时程电针预处理对脑缺血再灌注大鼠血脑屏障基质金属蛋白酶-9、血管内皮生长因子的影响 [J]. *针刺研究*, 2015, 40(1): 40-44.
- [21] HWANG IK, CHUNG JY, YOO DY, et al. Effects of electroacupuncture at Zusanli and Baihui on brain-derived neurotrophic factor and cyclic AMP response element-binding protein in the hippocampal dentate gyrus [J]. *J Vet Med Sci*, 2010, 72(11): 1431-1436.
- [22] SWEATT JD. Experience-dependent epigenetic modifications in the CNS [J]. *Biol Psychiatry*, 2009, 65(3): 191-197.
- [23] MONTGOMERY RL, HSIEH J, BARBOSA AC, et al. HDACs 1 and 2 control the progression of neural precursors to neurons during brain development [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2009, 106(19): 7876-7881.

- [4] YANG X, WU Q, ZHANG L, et al. Inhibition of histone deacetylase3(HDAC3) mediates ischemic preconditioning and protects cortical neurons against ischemia in rats [J]. Front Mol Neurosci, 2016,9: 131. doi: 10. 3389/fnmol. 2016. 00131.
- [5] BARDAI FH, PRICE V, ZAAZYMAN M, et al. Histone Deacetylase-1 (HDAC1) is a molecular switch between neuronal survival and death [J]. J Biol Chem, 2012, 287 (42) : 35444-35453.
- [6] YE F, CHEN Y, HOANG TN, et al. HDAC1 and HDAC2 regulate oligodendrocyte differentiation by disrupting the beta-catenin TCF interaction [J]. Neuroscience, 2009, 12(7) : 829-839.
- [7] 张琛琛, 卢芳, 梁嘉强, 等. 组蛋白去乙酰化酶 6 抑制剂治疗缺血性脑卒中的研究进展 [J]. 生理学报, 2018, 70(3) : 301-309.
- [8] WANG Z, LENG Y, WANG J, et al. Tubastatin A, an HDAC6 inhibitor, alleviates stroke-induced brain infarction and functional deficits: potential roles of α -tubulin acetylation and FGF-21 up-regulation [J]. Sci Rep, 2016, 6: 19626. doi: 10. 1038/srep19626.

Effects of Acupuncture at “Baihui” (GV20) on Histone Deacetylases Expression in Ischemia-reperfusion Injury Model Rats

FU Shuping¹, GONG Li², LI Xiaoxiao¹, WANG Yaling¹, YUAN Jing¹, LU Shengfeng¹

1. Second Clinical Medicine College, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, 210023; 2. The Affiliated Hospital of Traditional Chinese Medicine, Xinjiang Medical University

ABSTRACT Objective To explore the possible action mechanism of acupuncture at Baihui (GV20) on ischemia-reperfusion injury. **Methods** A total of 54 SD rats were randomized into a sham operation group, a model group and a Baihui group, with 18 rats in each group. The ischemic stroke model was established by middle cerebral artery occlusion (MCAO) surgery in the model group and the Baihui group. In the sham operation group, only the external carotid artery was ligated and no plug was inserted. Two hours after ischemia, the plug was pulled out and reperfusion was performed for 1 min and 20 h, respectively. The Baihui group was given “Baihui” (GV20) electroacupuncture stimulation, 30 min each time, for 2 times. The model group and the sham operation group were only fixed for 30 min in the same way. Evans blue (EB) staining was used to detect the density of the blood-brain barrier. TTC staining was used to detect the volume of cerebral infarction. ELISA staining was used to detect the activity of histone deacetylases (HDACs). The expression levels of HDACs subtype protein in ischemic brain tissue were detected by real-time quantitative PCR and Western blot. **Results** After 24 hours of ischemia-reperfusion, compared with the sham operation group, the infarct area occurred significantly in the ischemic side of the brain in the model group. EB exudation rate, HDACs activity, and the protein expression of histone deacetylase 3 (HDAC3) histone deacetylase 6 (HDAC6) and histone deacetylase 11 (HDAC11) were increased significantly, and histone deacetylase 1 (HDAC1), histone deacetylase 2 (HDAC2), and histone deacetylase 9 (HDAC9) protein expression decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); after electroacupuncture intervention, compared with the model group, EB exudation rate, infarct volume, HDACs activity and HDAC3, HDAC6, and HDAC11 protein expressions decreased significantly in the Baihui group, and HDAC1, HDAC2, and HDAC9 expressions increased ($P < 0.05$). **Conclusion** Electroacupuncture at “Baihui” (GV20) can reduce the activity of HDACs in the brain tissue of rats with ischemia-reperfusion injury, and reversely regulate the unbalanced expression of HDACs caused by ischemia-reperfusion injury, which may be one of its mechanisms of anti-brain injury.

Keywords ischemia-reperfusion injury; stroke; histone deacetylase; blood brain barrier; Baihui (GV20)

(收稿日期: 2019-03-22; 修回日期: 2019-07-24)

编辑: 王利芬