

• 基础研究 •

针刺对缺血缺氧大鼠海马自噬蛋白表达的影响

刘 威¹ 王翔锋¹ 郑晓彬² 林 芬¹

【摘要】 目的 探究电针对缺血缺氧大鼠海马神经损伤的保护机制。**方法** 选择 SPF 级老年雄性大鼠 18 只, 采用随机数字表法分为空白组、模型组及长强组, 每组 6 只。模型组及长强组制作缺血缺氧大鼠模型, 造模成功后, 长强组行电针刺激。采用 Morris 水迷宫实验评价大鼠认知功能; 采用免疫印迹技术检测 LC3-I、LC3-II、LC3-II/LC3-I 和 p62 蛋白的表达。**结果** Morris 水迷宫实验: 与模型组相比, 空白组及长强组大鼠潜伏期明显减少 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 长强组大鼠穿越平台次数明显增加 ($P < 0.05$); 与空白组相比, 模型组海马 LC3-I、LC3-II 蛋白表达明显增加, LC3-II/LC3-I 比值明显增高, p62 蛋白表达明显较少 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 长强组大鼠海马 LC3-I、LC3-II 蛋白表达明显减少, LC3-II/LC3-I 比值明显降低, p62 蛋白表达明显增加 ($P < 0.05$)。**结论** 电针刺激可改善缺血缺氧老年大鼠的认知功能, 这可能与电针刺激改善了缺血缺氧老年大鼠海马区 LC3-I、LC3-II、p62 蛋白和 LC3-II/LC3-I 的表达, 调控脑组织自噬反应有关。

【关键词】 脑缺血缺氧; 电针; 海马; 自噬**【中图分类号】** R614; R651.1 **【文献标识码】** B **【文章编号】** 1002-2600(2024)04-0100-03

缺血缺氧性脑损伤是较为常见的神经系统疾病。缺血缺氧导致的脑器质性结构变化的机制之一可为海马神经元损伤, 这种损伤的形式可以是: 细胞自噬、凋亡和炎性坏死^[1-2]。细胞自噬通过清除受损的细胞器和神经元, 从而阻止凋亡向炎性坏死的进一步转变, 起到了神经保护作用^[3]。针刺是传统中医的疗法, 在治疗缺血缺氧性脑损伤的疗效上卓有成效, 且副作用少, 但其机制不明。该研究观察针刺是否通过调控缺血缺氧大鼠海马自噬相关蛋白的表达从而起到脑保护作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物 选择 SPF 级老年雄性大鼠 18 只, 体重 (220.0 ± 20.0) g, 由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供, 动物质量合格证号: 2022000510392, 实验动物饲养于福建中医药大学实验动物中心。饲养环境为 SPF 级, 饲养条件需要保持温度 $18 \sim 26$ °C、湿度 $40\% \sim 70\%$, 并给予充足饮水和已灭菌饲料。所有实验动物操作均严格遵循动物实验减少、替代、优化原则。

1.2 试剂及仪器 电子针疗仪 (江苏医疗用品有限公司, 型号: SDZ-V 型), Morris 水迷宫视频跟踪技术系统 (成都泰盟科技有限公司, 型号:

WMT-100S), 线栓 (广州佳灵生物技术有限公司, L3800), 高速冷冻离心机 (美国 Beckman Coulter 公司, 型号: Allegra64R Centrifuge), 蛋白印迹成像系统 (ImageQuant 800, 型号: Cytiva), RIPA 裂解液 (碧云天生物技术有限公司, P0013B), 蛋白浓度测定试剂盒 (碧云天生物技术有限公司, P0012), 缓冲液 (武汉塞维尔生物技术有限公司, G0002)

1.3 分组 所有大鼠按照 1~18 号进行编号, 采用随机数字表法将 18 只大鼠分为空白组、模型组及长强组, 每组各 6 只。

1.4 建模 使用线栓法制作大脑中动脉闭塞模型。大鼠麻醉后放置于木板上固定, 结扎颈总动脉和颈外动脉, 动脉夹夹闭颈内动脉远心端。在颈总动脉血管壁上剪出一“V”型小口, 将线栓插入, 结扎颈内动脉以固定线栓。缺血 2 h 后, 进行再灌注。待大鼠清醒参考 Zea-Longa 5 级评分制^[4]进行神经功能损伤评分, 评分过程至少由两人完成, 评分取平均值, 2~3 分说明模型成功。

1.5 干预方法 “长强”穴的选择参照《实验针灸学》中大鼠穴位定位方法选取。电针治疗: “长强”组使用 30 号 0.5 寸一次性不锈钢毫针 (江苏

基金项目: 福建省中医药科研项目 (2021zyjc19)**作者单位:** 1 福建中医药大学附属人民医院医院麻醉科, 福州 350004; 2 福建中医药大学附属人民医院医院手术室, 福州 350004**DOI:** 10.20148/j.fmj.2024.04.029

医疗用品有限公司, 型号: SDZ-V 型), 直刺模型组大鼠“长强”穴 0.3 寸, 予电针连续刺激(连续波, 频率为 2 Hz, 强度为 0.2 mA) 20 min 后出针, 连续治疗 10 天作为 1 个疗程, 总共治疗 1 个疗程; 模型组只给予同等条件抓取, 不予任何治疗。

1.6 检测指标

1.6.1 MRI 检测脑梗死体积 将大鼠放入麻醉盒, 通入异氟烷麻醉, 使用核磁共振成像仪对大鼠脑部进行脑梗死体积的评估。

1.6.2 Morris 水迷宫测试 Morris 水迷宫实验分为定向航行实验和空间探索实验, 用于检测大鼠的空间学习记忆能力。适应性训练: 在实验前 3 d, 将大鼠按编号从 I 至 IV 象限依次放入水池中, 60 s 后将大鼠捞出并擦干身体, 训练 3 d, 避免大鼠因对实验环境陌生而产生误差。定向航行实验: 按顺时针方向依次从 4 个象限将大鼠面向池壁放入水池中, 每天放入大鼠的起始象限都进行更换。若大鼠爬上逃生平台并在 60 s 内停留 10 s 以上, 则认为大鼠找到平台, 大鼠入水至找到平台的时间即为逃避潜伏期; 若大鼠在 60 s 内未能找到逃生平台, 则引导大鼠至平台上停留 10 s, 逃避潜伏期记为 60 s。空间探索实验: 将逃生平台撤走, 将大鼠从原平台对侧象限面向池壁放入水池中, 记录大鼠在 60 s 内穿过原平台所在象限的次数。

1.6.3 免疫印迹检测 水迷宫实验后处死大鼠, 取其海马组织置于冰袋上, 快速分离大脑皮质。取样后, 将其置于 -80°C 冰箱中, 以待后续用于免疫印迹实验, 检测步骤如下: 提取组织蛋白并定量, 采用 BCA 法检测蛋白浓度, 将待测蛋白样品与蛋白上样缓冲液按照 4:1 比例混匀, 然后进行离心, 100°C 恒温孵育 10 min, 冷却至室温。随后进行 SDS-PAGE 电泳。目的蛋白的表达量用各组蛋白的灰度值与正常对照组蛋白的灰度值比值表示。

1.7 统计学方法 采用 SPSS 27.0 软件对数据进行统计分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间数据采用单因素方差分析, 服从正态且方差齐, 采用 LSD 法检验, 方差不齐, 采用 Games-Howell 法检验, 若不服从正态分布, 采用非参数检验。若 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MRI 检测结果 见图 1。

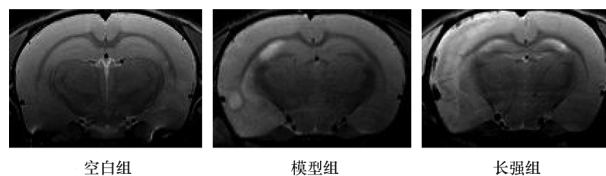


图 1 3 组 MRI 检测结果

2.2 Morris 水迷宫实验 3 组大鼠 Morris 水迷宫实验结果比较: 3 组大鼠水迷宫实验运动轨迹见图 2。与模型组相比, 空白组及长强组大鼠潜伏期明显减少, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 长强组大鼠穿越平台次数明显增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

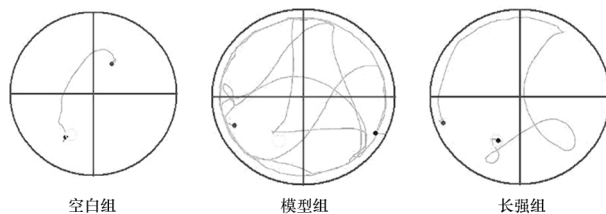


图 2 3 组水迷宫实验运动轨迹图

表 1 3 组水迷宫实验结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	潜伏期/s	穿越平台次数/次
空白组	6	$4.92 \pm 1.96^{\text{①}}$	8.33 ± 1.86
模型组	6	70.74 ± 13.58	6.00 ± 1.79
长强组	6	$8.65 \pm 5.36^{\text{①}}$	$8.23 \pm 1.94^{\text{①}}$

注: 与模型组比较, ① $P < 0.05$ 。

2.3 LC3-I、LC3-II、LC3-II/LC3-I 和 p62 表达的比较 3 组大鼠免疫印迹技术检测结果比较: 与空白组相比, 模型组海马 LC3-I、LC3-II 蛋白表达明显增加, LC3-II/LC3-I 比值明显增高, p62 蛋白表达明显较少, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 长强组大鼠海马 LC3-I、LC3-II 蛋白表达明显减少, LC3-II/LC3-I 比值明显降低, p62 蛋白表达明显增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 3 组大鼠海马区 LC3-I、LC3-II、LC3-II/LC3-I 和 p62 蛋白平均灰度值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	LC3-I	LC3-II	p62	LC3-II/LC3-I
空白组	6	$1.00 \pm 0^{\text{①}}$	$1.00 \pm 0^{\text{①}}$	$1.00 \pm 0^{\text{①}}$	$1.00 \pm 0^{\text{①}}$
模型组	6	$1.86 \pm 0.25^{\text{②}}$	$2.44 \pm 0.13^{\text{②}}$	$0.40 \pm 0.23^{\text{②}}$	$1.33 \pm 0.16^{\text{②}}$
长强组	6	$0.84 \pm 0.04^{\text{①}}$	$0.96 \pm 0.02^{\text{①}}$	$1.01 \pm 0.31^{\text{①}}$	$1.14 \pm 0.07^{\text{①}}$

注: 与模型组比较, ① $P < 0.05$; 与空白组比较, ② $P < 0.05$ 。

3 讨论

本研究针刺组潜伏期及穿越平台次数明显改善,其差异性的产生是由于学习记忆能力造成^[5]。表明针刺可以有效改善神经损伤大鼠的认知功能。这与督脉论治脑病有其直接理论依据,“长强”穴,是督脉的一大要穴。研究显示针刺“长强”穴可改善智障患儿的学习记忆能力^[6],通过“长强”穴的循经远治作用,针刺长强穴可用于脑瘫的治疗^[7],有助于提高脑瘫患儿言语能力的康复效果^[8]。

缺血缺氧对大鼠脑部的影响不仅限于海马区域。缺血缺氧状态会引起整个脑部的损伤,包括但不限于海马区域。其他脑部区域也可能受到不同程度的影响和损伤,针对大鼠进行颅脑磁共振检查是一种常见的非侵入性方法,可以在活体动物中获取脑部结构和功能信息。通过该检查,可以获得有关大鼠脑部各个区域的详细信息,包括是否存在缺血缺氧引起的损伤以及其他可能的变化。本研究显示针刺在一定程度上改善了缺血缺氧脑损伤。

水迷宫实验主要用于评估实验动物学习和记忆的能力,通过观察动物在水迷宫中学习寻找平台的过程来了解其空间定位和记忆能力。这种实验可以反映动物的认知功能和学习能力,对研究认知行为提供了重要的数据。确实,缺血缺氧脑病会对动物的学习和记忆产生影响,这是因为缺氧缺血可能导致脑部细胞损伤、炎症反应以及神经递质失衡等,进而影响动物的认知功能。除了学习和记忆方面,缺血缺氧还可能影响动物的运动能力、情绪状态和社会行为等多个方面。因此,水迷宫实验作为一种评估学习和记忆能力的方法在研究中具有重要作用,但在研究缺血缺氧脑病时,我们结合 MRI 以及分子生物学分析等多种手段,以全面了解缺血缺氧对动物脑部的影响。

LC3 可作为自噬形成的标志^[9],LC3 是自噬反应激活的关键指标。LC3-II 是由 LC3-I 转化的,一般用 LC3-II / LC3-I 的比值作为鉴定自噬活性的指标。p62 蛋白是细胞选择性自噬的特异性底物,当自噬发生时,p62 可将错误折叠的蛋白泛素化后送至自噬体内,与定位于自噬体内膜上的 LC3 相互作用形成复合物,最终在自噬溶酶体内降解,p62 随着自噬的进行,被不断地在自噬体内降解,逐渐降低;当自噬活性下降时,则会出现 p62 聚集,表

达增强^[10]。与空白组相比,模型组大鼠海马 LC3-I、LC3-II 蛋白表达明显增加,LC3-II / LC3-I 比值明显增高,p62 蛋白明显下降,提示缺血缺氧性的脑损伤激活了大鼠过度自噬;与模型组相比,长强组大鼠海马 LC3-I、LC3-II 蛋白表达明显减少,LC3-II / LC3-I 比值明显降低,p62 蛋白明显增加,提示针刺“长强”穴下调了大鼠因缺血缺氧脑损伤引起的过度自噬。

本研究显示,针刺“长强”穴可改善缺血缺氧脑损伤大鼠海马细胞的自噬,从而改善认知功能,但本研究并未能在荧光显微镜或透射电镜下观察和示踪自噬形成,下一步还需从此微观形态进一步研究,以期能为针刺治疗提供依据。

参考文献

- [1] CLAIRE T, BRYAN L, CARINA M. Cell death in the developing brain after hypoxia-ischemia [J]. *Front Cell Neurosci*, 2017, 8 (11): 248.
- [2] GINA H, AIN A N, YVONNE C. The role of the endoplasmic reticulum stress response following cerebral ischemia [J]. *Int J Stroke*, 2018, 13 (4): 379-390.
- [3] WANG L, XIONG X, ZHANG X. Sodium Tanshinone II A Sulfonate Protects Against Cerebral Ischemia-reperfusion Injury by Inhibiting Autophagy and Inflammation [J]. *Neuroscience*, 2020, 1 (441): 46-57.
- [4] LI Y, TAN L, YANG C. Distinctions between the Koizumi and Zea Longa methods for middle cerebral artery occlusion (MCAO) model: a systematic review and meta-analysis of rodent data [J]. *Sci Rep*, 2023, 13 (1): 10247.
- [5] OTHMAN M, HASSAN Z, HAS A. Morris water maze: a versatile and pertinent tool for assessing spatial learning and memory [J]. *Experimental Animals*, 2022, 71 (3): 264-280.
- [6] 黄晓真,林栋,庄婉玉. 针刺长强穴对 FMR1 基因敲除小鼠学习能力及皮质区 CREB、BDNF 基因表达的影响 [J]. *时珍国医国药*, 2017, 28 (8): 2039-2042.
- [7] 张学君,沈雪勇,魏建子. 长强穴治疗脑瘫的可行性探讨 [J]. *时珍国医国药*, 2018, 29 (12): 2984-2986.
- [8] 洪霖,吴强,杨勇. 针刺长强穴治疗小儿脑瘫的临床效果观察 [J]. *中外医学研究*, 2020, 18 (31): 34-36.
- [9] PUGSLEY H R. Quantifying autophagy: Measuring LC3 puncta and autolysosome formation in cells using multispectral imaging flow cytometry [J]. *Methods*, 2017, 11 (1): 112-147.
- [10] MA S, ATTARWALA I Y, XIE X. SQSTM1/p62: A Potential Target for Neurodegenerative Disease [J]. *ACS Chem Neurosci*, 2019, 10 (5): 2094-2114.