实验研究

基于 Notch 信号通路探讨针刺曲池、足三里对 MCAO 大鼠的神经保护机制

于雪萍[1] 袁秀丽[2]

(1 四川中医药高等专科学校,绵阳,621000; 2 绵阳市中医医院,绵阳,621000)

摘要 目的:观察针刺曲池穴及足三里穴对 MCAO 大鼠的行为学干预效应,同时评价其对 Notch 信号通路标志性蛋白的影响。方法:将 36 只 SD 大鼠随机分成空白组、模型组及针刺组,各 12 只。模型组及针刺组大鼠均接受改良线栓法建立左侧大脑中动脉局灶性缺血(MCAO)再灌注模型,空白组大鼠仅进行血管分离术,术后空白组及模型组大鼠每日接受模拟捉拿 1 次,针刺组大鼠予针刺曲池穴及足三里穴,连续干预 14 d,用神经行为学评分评估大鼠行动能力,TTC 染色法观察脑梗死体积变化,HE 染色法观察大鼠脑组织细胞形态和结构,Western blotting 法检测各组大鼠脑组织 Notch1、Hes1 蛋白表达变化。结果:1)与模型组比较,针刺组大鼠神经行为学评分明显提高,并缩小了脑梗死体积;2)针刺可明显改善 MCAO 术大鼠脑组织细胞形态和结构;3)Western blot 结果显示针刺可明显上调大鼠脑组织 Notch1、Hes1 的蛋白水平。结论:电针曲池穴及足三里穴可改善 MCAO 大鼠行为能力,其作用机制可能与介导 Notch 通路有关。

关键词 局灶性脑缺血;针刺;曲池穴;足三里穴;Notch 信号通路

Mechanism for Neuroprotection against MCAO Rats of Acupuncturing at Quchi (LI 11) and Zusanli (ST 36) based on Notch Signaling Pathway

Yu Xueping[1], Yuan Xiuli[2]

(1 *Sichuan College of Traditional Chinese Medicine*, *Mianyang* 621000, *China*; 2 *Mianyang City Hospital of Traditional Chinese Medicine*, *Mianyang* 621000, *China*)

Abstract **Objective:** To observe the behavioral effects of acupuncture at Quchi (LI 11) and Zusanli (ST 36) acupoints on MCAO rats and to evaluate the effects on Notch signaling pathway marker proteins. **Methods:** A total of 36 SD rats were randomly divided into blank group, model group and acupuncture group, with 12 rats in each group. The rats in the model group and the acupuncture group received the modified suture method to establish the model of left middle cerebral artery occlusion (MCAO) reperfusion. The rats in the blank group were only subjected to vascular segmental surgery. The postoperative blank control group and model group rats were subjected to simulated catching once a day. Rats in acupuncture group were given acupuncture at Quchi and Zusanli points for continuous intervention for 14 days. Neurobehavioral scores were used to assess the ability of rats to exercise. TTC staining was used to observe changes of cerebral infarction volume. HE staining was used to observe morphology and structure of rat brain cells. The expression of Notch1 and Hes1 protein in brain tissue of each group was detected by Western blotting. **Results:** 1) Compared with the model group, neurobehavioral score of acupuncture group was significantly increased and the volume of cerebral infarction was reduced; 2) Acupuncture significantly improved the morphology and structure of brain cells in MCAO rats; 3) Western blotting results showed that acupuncture significantly increased the protein levels of Notch1 and Hes1 in rat brain. **Conclusion:** Electroacupuncture at Quchi and Zusanli points can improve the behavioral abilities of MCAO rats, which may be related to the mechanism of Notch pathway.

Key Words Focal cerebral ischemia; Needling; Quchi (LI 11); Zusanli (ST 36); Notch signal pathway

中图分类号: R245.3 **文献标识码:** A **doi:** 10.3969/j.issn.1673-7202.2018.03.037

运动功能障碍是缺血性脑卒中最常见的后遗症,严重制约了患者日常生活及工作能力,大量动物及临床研究[1-4]均证实刺激曲池穴及足三里穴可明显改善脑卒中的运动功能,但其机制尚未完全阐明。分子生物学是近年来研究针刺作用机制的热点,有资料显示 Notch 信号通路在脑组织缺血时可被激

基金项目:高校青年自然基金重点项目(JZ160443)

作者简介:于雪萍(1985.10—),女,硕士研究生,研究方向:针刺治疗脑卒中的实验研究,E-mile:363752341@qq.com

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

活，从而调控缺血后神经的再生及修复过程，实现了神经保护效应，由此，针刺曲池穴及足三里穴改善脑卒中病情的机制是否通过 Notch 信号通路介导？我们建立了 MCAO 大鼠模型模拟临床缺血性脑卒中，证实电针曲池穴及足三里穴确可明显改善 MCAO 大鼠的神经行为学能力，我们亦进行一系列分子生物学技术检测，以期探讨其作用机制，报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 36 只清洁级 SD 大鼠均购自上海斯莱克实验动物责任有限公司，鼠龄 10 ~ 12 周，平均(11.23 ± 0.24) 周，体重 220 ~ 280 g，平均(250.42 ± 4.23) g。

1.1.2 主要试剂及仪器 10% 水合氯醛(青岛宇龙海藻有限公司)，液氮(凯福达化工有效公司)，环球牌不锈钢毫针(苏州针灸用品有限公司)、2% TTC 染色液(Solarbio 公司)、Notch1 一抗(CST 公司)、Hes1 一抗(CST 公司)、β-actin 抗体(CST 公司)。

1.2 方法

1.2.1 分组与模型制备 1) 分组：适应性饲养 7 d 后对 36 只大鼠进行随机数字编号，造模后将造模大鼠随机分为模型组及针刺组，各组均 12 只大鼠。3 组大鼠在鼠龄、体重等方面差异无统计学意义($P > 0.05$)，可进行比较。2) 模型制备[5]：适应性饲养 7 d 后禁食不禁水 12 h，称重后使用 10% 水合氯醛以 0.3 mL/kg 比例对各组大鼠进行充分麻醉，参照 Zea-Longa 法进行 MCAO 模型制备，将大鼠固定于手术台上于颈部正中处切开皮肤，左侧颈总动脉充分暴露于术者视野中，使用显微镊逐步分离出颈内动脉及颈外动脉，并于颈内动脉及颈外动脉分叉口处对颈外动脉进行充分结扎，随后用血管夹夹闭颈内动脉，在颈内动脉做一切口插入线栓，随后取出血管夹至线栓插入约 2.0 mm 为度，随后缝合皮肤。空白组大鼠仅进行皮肤切开及血管分离术后缝合皮肤。所有大鼠均注意保暖。

1.2.2 干预方法 造模次日对针刺组大鼠进行电针曲池穴及足三里穴，穴位定位参考李忠仁主编的《实验针灸学》，针刺深度达到约 6 mm 时接入电针仪，选用疏密波，频率 2 ~ 10 Hz，以大鼠肢体轻微抖动为度，30 min/次，1 次/d。空白组及模型组大鼠均仅接受模拟捉拿，1 次/d。连续干预 14 d 后处死所有大鼠，并进行取材。

1.2.3 检测指标与方法

1.2.3.1 神经行为学评分 对大鼠神经缺损症状进行评估，具体如下：大鼠未出现任何神经缺损症状视为 0 分；造模后大鼠出现右侧肢体伸展不利视为 1 分；造模后大鼠行走时向右侧转圈视为 2 分；造模后大鼠行走时向右倾倒视为 3 分；造模后大鼠无法行走视为 4 分。

1.2.3.2 TTC 染色 利用 TTC 染色法对各组大鼠脑梗死体积的测量，各组大鼠干预结束后处死取出脑组织，均匀切成厚度约 2 mm 的脑片，利用 2,3,5-氯化三苯基四氮唑进行染色，正常脑组织可与 2,3,5-氯化三苯基四氮唑进行脱氢酶反应最终显示鲜红色，而梗死脑区域因无法进行脱氢酶反应或者反应减弱而呈现白色。利用 Image-Pro Plus 6.0 分析软件对白色区域进行计算，得出脑梗死体积百分比(%) =(脑片白色区域面积总和 × 2 mm) / 全脑片面积 × 2 mm × 100%。

1.2.3.3 HE 染色 于腹主动脉注入 4% 的多聚甲醛进行脑组织灌流固定，冰上取出脑组织后均匀分成 4 等份，分别置于 70%、80%、95%、100% 梯度乙醇液体中进行脱水，再用二甲苯透明，再用石蜡进行包埋，待蜡块充分冷却后切成厚度约 5 μm 薄片，固定于载玻片上备用。随后将切片固定 10 ~ 30 s，再用苏木精-伊红染色，采用光学显微镜对样本进行读取。

1.2.3.4 Western blot 充分麻醉后取出左侧脑组织约 100 mg，加入蛋白裂解液充分裂解后将样本置于 4 ℃、14 000 g/min 条件下离心 10 min，抽取上清液，利用 BCA 试剂盒进行蛋白浓度测定并计算出各组上样量。将上述总蛋白分装于 1.5 mL EP 管中，在 100 ℃水浴中煮沸变性 5 min，充分冷却后根据事先计算的上样量加至 SDS-PAGE 凝胶孔道中，80 V 恒压电泳，再用 PVDF 膜转膜目标蛋白，再用 5% 脱脂奶粉进行封闭 2 h，再分别加入一抗(羊抗 Notch1 1∶1 000，羊抗 Hes1 1∶1 000，β-actin 1∶1 000)，孵育过夜，随后用 TBST 洗涤 3 次，5 min/次，再用 HRP 标记的二抗(1∶5 000) 室温反应 2 h，加入 ECL 显影液，反应 60 s 后于显影仪器中进行条带扫描，得出灰度值。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 22.0 统计软件进行数据分析，所有数据运用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$) 表示，数据符合正态分布使用 t 检验，偏态分布采用秩和检验，检验标准为 $\alpha = 0.05$，以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 电针曲池穴及足三里穴可降低 MCAO 大鼠神经行为学评分 接受造模的 2 组大鼠神经行为学评

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

分均明显升高，进行为期 14 d 干预后，针刺组大鼠神经行为学评分明显提高，与模型组比较差异有统计学意义（$P<0.05$）。见表 1。

表 1　各组大鼠神经行为学评分比较（$\bar{x}\pm s$，分）

组别	评分	
	干预前	第 14 天
空白组	0	0
模型组	2.16±0.43	1.76±0.21*
针刺组	1.98±0.58	1.01±0.11*△

注：组内比较，* $P<0.05$；与模型组干预第 14 天比较，△ $P<0.05$

2.2　电针曲池穴及足三里穴可缩小 MCAO 大鼠脑梗死体积　接受造模的 2 组大鼠脑组织可见明显白色区域，进行为期 14 d 干预后，针刺组大鼠区域较模型组明显缩小，差异有统计学意义（$P<0.05$）。见表 2、图 1。

表 2　各组脑梗死体积比较（$\bar{x}\pm s$，%）

组别	步行速度（cm/s）	
	干预前	第 7 天
空白组	0	0
模型组	35.20±0.34	24.03±0.68*
针刺组	34.87±0.67	9.98±0.15*△

注：组内比较，* $P<0.05$，与模型组干预第 14 天比较，△ $P<0.05$

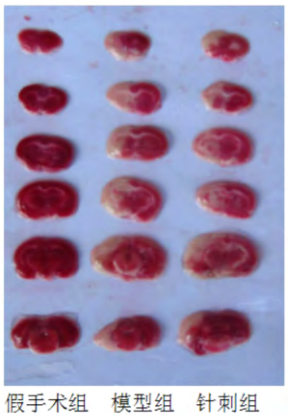

图 1　各组大鼠脑片 TTC 染色结果

2.3　电针曲池穴及足三里穴可明显改善 MCAO 大鼠脑组织结构及形态　空白组大鼠脑组织细胞排列整齐有序，细胞核完整。模型组大鼠脑片可见神经元细胞排列错乱及皱缩，存在明显坏死现象；针刺组大鼠脑组织部分神经元细胞结构尚可，排列较模型组整齐，部分神经元细胞出现浓染。见图 2。

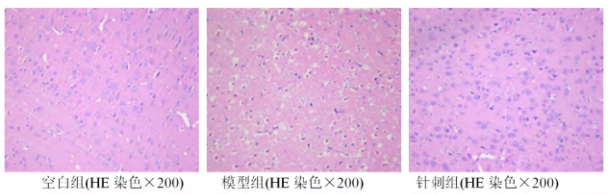

图 2　各组 MCAO 大鼠脑组织结构及形态

2.4　电针曲池穴及足三里穴可明显改善上调 MCAO 大鼠脑组织 Notch1、Hes1 蛋白浓度　使用 Western blot 法对各组大鼠脑组织 Notch1、Hes1 的蛋白水平进行检测，结果发现 MCAO 术后模型组及针刺组大鼠 Notch1、Hes1 的蛋白表达均降低，与空白组比较差异有统计学意义（$P<0.05$）。经过 14 d 干预后针刺组大鼠 Notch1、Hes1 的蛋白水平有所上调，与模型组比较差异有统计学意义（$P<0.05$）。见图 3。

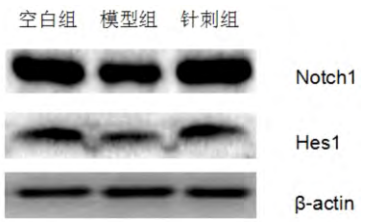

图 3　各组大鼠 Western blot 结果

3　讨论

脑卒中属于古籍中“中风”“痿证”等范畴，认为脑脉痹阻、脑髓失养使其主要病机，由此导致半身不遂等诸症[6-8]。此病病位在头部，《景岳全书》曰：“凡病此者……阴亏于前而阳损于后……以致阴阳相失，……卒然仆倒”，《灵枢·根结》亦记载“太阳为开，阳明为合，少阳为枢……合折则气所止息，而痿疾起矣。故痿疾者，取之阳明”，故调节阳明经是治疗脑卒中的关键。曲池穴为手阳明大肠经合穴，足三里是足阳明胃经合穴，两穴均是阳明经要穴，乃阳明经气汇聚之所，故使用二穴治疗脑卒中由来已久，正如《针灸逢源·中风门》中认为“瘫痪，此由将息失宜，……猝倒无知也，曲池……足三里”，此外，亦有学者[9]总结近年来中西医手段治疗脑卒中的相关文献后发现曲池穴及足三里穴是使用频率最高的穴位，因此本研究选用曲池穴及足三里穴对 MCAO 大鼠进行干预具有理论可行性。在对各组大鼠神经行为学评分统计中我们发现经过 MCAO 造模后大鼠平很明显升高，这提示 MCAO 术使大鼠产生了明显神经缺损症状，经过针刺干预后大鼠神经行为学评分下降，提示针刺曲池穴及足三里穴可明显改善大鼠神经缺损症状，与此同时我们还发现模型组及针刺组大鼠脑片 TTC 染色后出现明显白色区域，这提示本研究造模是成功的，且经过针刺干预后大鼠脑梗死体积明显缩小，这提示电针能够减 MCAO 造模大鼠脑梗死体积，这一数据与国内外诸多文献结果一致。

研究中我们还发现 MCAO 术后大鼠神经元细胞

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

排列错乱及皱缩，存在明显坏死现象，经过针刺干预后大鼠脑组织神经元细胞结构及形态有明显改善，这说明针刺曲池穴及足三里穴具有明显的脑保护作用。在进一步研究中我们对各组大鼠脑组织 Notch 信号通路上的标志性蛋白 Notch1、Hes1 进行检测，结果显示 MCAO 术后模型组及针刺组大鼠 Notch1、Hes1 的蛋白表达均降低，与空白组比较差异有统计学意义（$P < 0.05$）。经过 14 d 干预后针刺组大鼠 Notch1、Hes1 的蛋白水平有所上调，与模型组比较差异有统计学意义（$P < 0.05$）。Notch 信号通路在机体中扮演信号装置的角色，相邻的神经元细胞通过 Notch 受体与相应配体结合，从而产生自我更新效应，亦有学者[10]认为 Notch 信号通路是决定神经元细胞增殖或凋亡的关键。Notch 受体与配体结合后释放大量的活性物质，促进 Notch 1 因子出现核移位，与细胞核内的 DNA 相结合，由此激活其下游因子 Hes 家族，而 Hes 家族尤其是 Hes1 是调控神经干细胞增殖分化的重要因子，并可促进胶质生成而发挥神经元保护作用[11-15]，由此看来，针刺曲池穴及足三里穴发挥神经元保护效应的作用机制可能通过 Notch 信号通路进行介导。

本实验发现针刺曲池穴及足三里穴可明显改善 MCAO 大鼠神经缺损症状，通过激活 Notch 信号通路发挥脑保护作用，但本研究对 MCAO 大鼠进行为期 14 d 干预，大鼠具有极强的自愈能力，可能对本研究结果产生一定偏倚，下阶段将进行更严格的实验设计以期更为客观研究针刺的作用机制。

参考文献

[1] 何华. 缺血性中风后遗症神经功能重建的可能机制 [J]. 山东医药，2006，46(7)：81-82.

[2] Kim EH，Kim YJ，Lee HJ，et al. Acupuncture increases cell proliferation in dentate gyrus after transient global ischemia in gerbils [J]. Neurosci Lett，2001，297：21-24.

[3] Sato C. An experience note in attending Global Aging Initiative [J]. Nihon Ronen Igakkai Zasshi，2013，50(5)：669-670.

[4] 洪震. 脑卒中的流行病学及其危险因素 [J]. 中国卒中杂志，2006，1(8)：559-563.

[5] Longa EZ，Weinstein PR，Carlson S，et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. Stroke，1989，20(1)：84-91.

[6] 游咏梅，薛偕华，陶静，等. 电针曲池穴及足三里穴对脑缺血再灌注损伤大鼠神经细胞线粒体凋亡途径的影响 [J]. 中华物理医学与康复杂志，2014，36(10)：745-750.

[7] 付彩红，李匡时，邹忆怀. 针刺阳陵泉对中风偏瘫患者感觉运动网络影响的 fMRI 研究 [J]. 天津中医药，2016，33(5)：260-264.

[8] 杨娟. 通督调神针刺法治疗缺血性中风偏瘫的临床研究 [D]. 广州：广州中医药大学，2011.

[9] 劳沛良，江洁慈，原林. 针刺治疗脑卒中后遗症取穴规律探究 [J]. 吉林中医药，2011，31(4)：342-343.

[10] Shimada IS，Borders A，Aronshtam A，et al. Proliferating reactive astrocytes are regulated by Notch-1 in the peri-infarct area after stroke [J]. Stroke，2011，42(11)：3231-3237.

[11] Shimada IS，LeComte MD，Granger JC，et al. Self-renewal and differentiation of reactive astrocyte-derived neural stem/progenitor cells isolated from the cortical peri-infarct area after stroke [J]. J Neurosci，2012，32(23)：7926-7940.

[12] Woo SM，Kim J，Han HW，et al. Notch signaling is required for maintaining stem-cell features of neuroprogenitor cells derived from human embryonic stem cells [J]. BMC Neurosci，2009，10：97.

[13] Borghese L，Dolezalova D，Opitz T，et al. Inhibition of notch signaling in human embryonic stem cell-derived neural stem cells delays G1/S phase transition and accelerates neuronal differentiation in vitro and in vivo [J]. Stem Cells，2010，28(5)：955-964.

[14] Liu J，Sato C，Cerletti M，et al. Notch signaling in the regulation of stem cell self-renewal and differentiation [J]. Curr Top Dev Biol，2010，92：367-409.

[15] Zhou ZD，Kumari U，Xiao ZC，et al. Notch as a molecular switch in neural stem cells [J]. IUBMB Life，2010，62(8)：618-623.

（2017－12－30 收稿　责任编辑：王明）

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net