

· 论 著 ·

针刺对发育期脑损伤大鼠脑组织细胞凋亡及 Bcl-2、Bax 蛋白表达的影响

吴至凤, 温恩懿[△], 赵聪敏, 赵雪晴, 赵永娇

(第三军医大学新桥医院儿科, 重庆 400037)

摘要:目的 观察针刺疗法对宫内缺血脑损伤大鼠脑组织细胞凋亡及其凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax 表达的影响, 为针刺疗法应用于发育期脑损伤提供实验依据。方法 采用结扎孕鼠双侧子宫动脉, 完全阻断血供 25 min 娩出胎鼠, 制成宫内窘迫脑损伤模型, 将成功的模型随机分为针刺组和模型组, 每组各 8 只; 正常组剖宫产取出胎鼠, 8 只; 其余胎鼠丢弃。正常组和模型组不治疗, 针刺组于出生后 7~30 d 行针刺治疗, 每日针刺 1 次, 不留针。30 d 实验结束后断头取脑, 运用 TUNEL 法检测脑细胞凋亡, SABC 法测脑组织 Bcl-2、Bax 蛋白表达。结果 正常组大鼠脑细胞凋亡数极少, 而模型组较高, 针刺组介于两者之间, 3 组差异有统计学意义 ($P < 0.05$); Bcl-2 染色指数正常组或针刺组比模型组增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); Bax 染色指数正常组或针刺组比模型组降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 针刺可以减少宫内窘迫脑损伤大鼠脑组织神经细胞凋亡, 提高 Bcl-2 蛋白的表达, 降低 Bax 蛋白的表达, 这可能是应用针刺疗法治疗发育期脑损伤的机制之一。

关键词: 缺氧缺血; 脑损伤; 细胞凋亡; Bcl-2; Bax; 针刺疗法

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2010.21.019

中图分类号: R245; R446.61

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2010)21-2898-03

Acupuncture Effect on apoptosis and Bcl-2, Bax protein expression in brain damage rats of intrauterine ischemia

WU Zhi-feng, WEN En-yi[△], ZHAO Cong-min, et al.

(Department of Pediatrics, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: **Objective** To observe the acupuncture effect on apoptosis and Bcl-2, Bax protein expression in intrauterine ischemic brain damage rats' brain cells, so as to provide experimental evidence in application of acupuncture to treat developmental brain damage. **Methods** To ligate bilateral uterine arteries of the pregnant rats, for completely blocking the blood supply for 25 min, then deliver fetus rats to make the intrauterine ischemic brain damage models. The successful-models were randomly divided into the acupuncture group and the model group, 8 rats each. 8 rats in the normal group were delivered by caesarean section. The remaining fetal rats were discarded. Normal group and model group were not treated, the acupuncture group's rats were given acupuncture treatment from 7-30 d, once a day, without remaining needles. On 30 d which was the end of the experiment, all the rats' brains were removed. Using TUNEL assay apoptosis of brain cells, SABC method to measure brain Bcl-2, Bax protein expression. **Results** The index of Bcl-2 staining in the model group or acupuncture group comparing with the normal group was significantly different ($P < 0.05$), while there was a significant difference between the acupuncture group and the model group ($P < 0.01$). Comparing brain cells' apoptosis of the 3 groups, the normal group was the fewest, while the model group was the highest, the acupuncture group was between the two groups, the three groups had significant difference ($P < 0.05$). **Conclusion** Acupuncture can reduce the apoptosis of the brain neuronal cells in intrauterine ischemic brain damage rats, and can also improve the Bcl-2 protein expression and reduce the Bax protein expression of the brain neuronal cells, which may be one of the mechanisms how acupuncture therapy treating the developmental brain damage.

Key words: hypoxic-ischemic; brain damage; apoptosis; Bcl-2; Bax; acupuncture

胎儿的脑代谢最旺盛, 其氧耗量占全身氧耗量的一半, 缺氧时间过长可造成新生儿脑部缺氧缺血性脑损伤 (hypoxic-ischemic brain damage, HIBD), 重者可导致胎儿死亡, 幸存的幼儿往往遗留永久性神经功能缺陷, 如脑性瘫痪、智力低下等后遗症^[1-2], 引起这一系列临床症候的根本病灶在于部分脑组织神经细胞的凋亡与坏死^[3-4]。细胞凋亡已被公认为是 HIBD 神经死亡的重要形式。本研究试图探讨宫内一过性缺血缺氧后 (对于幸存的胎儿为非致命性缺氧缺血) 是否引起胎儿脑组织神经细胞凋亡, 探讨针刺疗法能否抗凋亡及其相关部分机制。

1 材料与与方法

1.1 模型制备及分组 购买妊娠精确到 18 d 的无特定病原

体 (specific pathogen free, SPF) SD 母鼠 10 只 (广州中医药大学实验动物中心提供), 参照宫内窘迫脑损伤模型制作方法^[5-6]: 妊娠 21 d 雌鼠腹部明显可摸到胎鼠, 这时采取 CO₂ 麻醉 9 只孕鼠, 分离并结扎双侧子宫动脉, 完全阻断血供 25 min 娩出胎鼠, 存活胎鼠 20 只, 再随机分为针刺组和模型组, 每组各 8 只; 取孕鼠 1 只 CO₂ 麻醉, 手术过程中仅用止血钳夹住孕鼠子宫颈, 马上取出胎鼠, 存活胎鼠 9 只, 随机选取 8 只作为正常组; 实验胎鼠均由代乳鼠喂养, 其余新生鼠丢弃。

1.2 干预方法 针刺组于出生后 14 d 开始针刺治疗, 治疗至 30 d。取穴参照文献^[7]结合同身寸类比法。组穴参照“靳三针疗法”^[8-9]: A、四神针 (顶骨正中定百会, 前后旁开 1.5 寸)、

[△] 通讯作者, 电话: (023)68755602; Email: medwey@gmail.com。

合谷(前肢第 1、2 掌骨之间)、太冲(后肢足背第 1、2 跖骨间凹陷处取)。B、颞三针(耳根上 1.5 寸及左右旁开 1 寸)、劳宫(前肢掌心正中)、足三里(在膝关节后外侧,腓骨小头下前下方)。C、脑三针(头顶部枕骨后缘正中中线上枕骨粗隆凹陷处及左右旁开 2.5 寸)、曲池(桡骨近端的关节外侧前方的凹陷中)、涌泉(后肢掌心前正中)。D、智三针(内眦连线中点上 4 寸及左右旁开 2 寸)、外关(前肢外侧,离腕关节约 2 寸左右的尺桡骨缝间)、三阴交(后肢内踝直上 3 寸)。取苏州天一针灸器械有限公司生产“天协”牌一次性毫针刺(规格 0.30 mm×13 mm),每日针刺 1 次,每日 1 个穴组,上述 4 组穴组交替轮换,头部穴位平刺,四肢部穴位直刺,每个穴位刺入皮下后捻转 5 s,不留针。正常组和模型组未予任何治疗。

1.3 主要仪器及试剂 图像分析系统(广州亿鸣图像分析软件)、光学显微镜(Olympus BX50 生物组织显微镜)、徕卡 2245 型半自动石蜡切片机、徕卡 EG1140 型石蜡包埋机、徕卡 TP1020 型生物组织脱水机(德国)、徕卡 RM2255 型全自动石蜡切片机(德国)、徕卡 5010 型石蜡切片染色机(德国)、恒温水箱(型号 700,中国)、摊烘片机(型号 ZMN200,中国)等。凋亡试剂盒(TUNEL-AP,批号 12571200,美国宝灵曼公司),BCIP-NBT 显色液(批号 61120,中国北京中杉公司);水溶性封片剂(批号 095071,中国广州晶美公司)等。Bax 羊抗兔免疫组化试剂盒(批号 BA0319,中国武汉博士德),Bcl-2 羊抗兔免疫组化试剂盒(批号 BA0417,中国武汉博士德)等。

1.4 实验方法 新生大鼠 30 d 时实验结束,断头取脑,快速在冰盘上剥离脑组织,切取冠状脑片,放入 4% 多聚甲醛液固定,经脱水、透明、石蜡包埋。TUNEL 法检测脑组织细胞凋亡、免疫组化 SABC 法检测 Bcl-2、Bax 的表达,具体操作按试剂盒说明书进行。

1.5 结果判断

1.5.1 凋亡细胞计数 每张切片在 10×20 倍光镜下随机观察每一组动物同一部位切片,选择 5 个不重复视野进行观察,并连接图像分析系统,测出每张切片内脑组织细胞凋亡的数目,以平均值代表各区计数结果。凋亡小体呈黑色或紫蓝色位于细胞核内,背景无色。

1.5.2 Bcl-2、Bax 免疫组化染色结果判断 每张切片在 10×20 倍光镜下随机观察每一组动物同一部位切片,选择 5 个不重复视野进行观察,并连接图像分析系统,测出每张切片内脑组织 Bcl-2、Bax 染色百分比,即染色面积。阳性物质在胞浆(膜上)内呈棕黄色细颗粒状,细胞核为浅蓝色。免疫组化染色后发现染色强度各有差异,有的呈棕黄色,有的呈淡黄色,因此采用染色指数计数法,该方法综合考虑了阳性细胞百分比及细胞染色强度两方面。染色指数=染色面积×染色强度。阳性细胞染色强弱按显色强度分为无色、淡黄、黄色、棕黄色,分别计为 0、1、2、3 分,上述两项乘积即为该例病变的染色指数。如在同一病变中存在不同评分标准的视野,则取最大值和最小值的平均值作为其染色指数评分,算出每个视野的均数及标准差。

1.6 统计学方法 采用 SPSS13.0 统计软件对实验数据进行统计学处理,所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析,方差不齐时采用近似 F 检验,组间两两比较采用 S-N-K 检验。P<0.05 为差异有统计学意义

2 结 果

2.1 正常组大鼠脑细胞凋亡数极少,而模型组较高,针刺组介于两者之间,组间两两比较差异有统计学意义,提示宫内一过性缺氧缺血后会引引起胎儿脑组织神经细胞凋亡,而针刺疗法可以抑制宫内缺血缺氧后引起的神经细胞凋亡,见表 1。

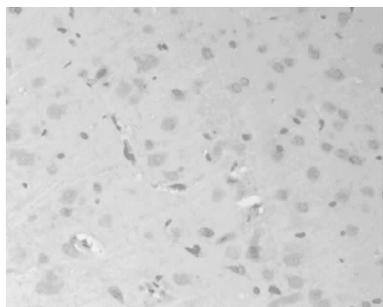


图 1 正常组脑细胞凋亡 (TUNEL 法 10×20)

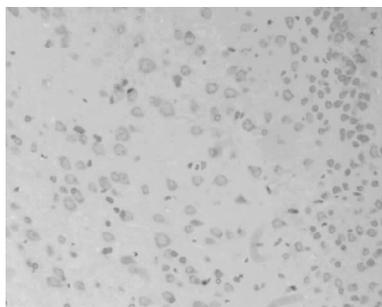


图 2 针刺组脑细胞凋亡 (TUNEL 法 10×20)

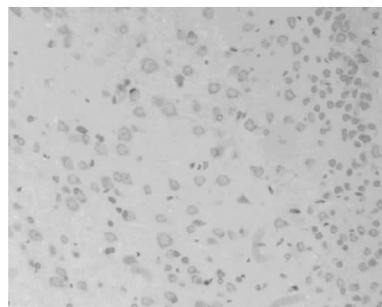


图 3 模型组脑细胞凋亡 (TUNEL 法 10×20)

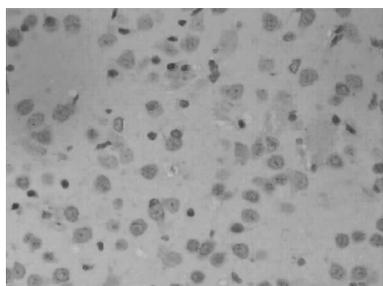


图 4 正常组 Bcl-2 蛋白表达 (SABC 法 10×20)

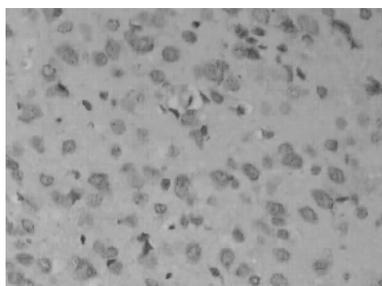


图 5 针刺组 Bcl-2 蛋白表达 (SABC 法 10×20)

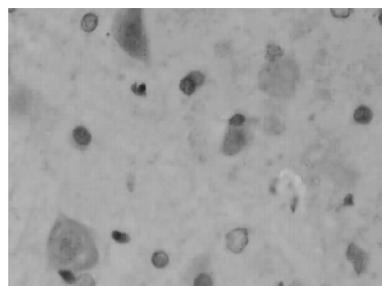


图 6 模型组 Bcl-2 蛋白表达 (SABC 法 10×20)

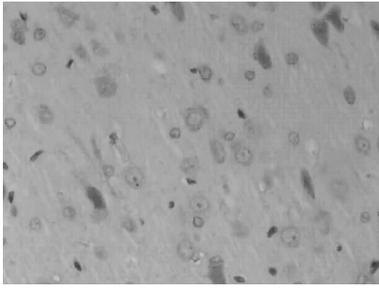


图 7 正常组 Bax 蛋白表达
(SABC 法 10×20)

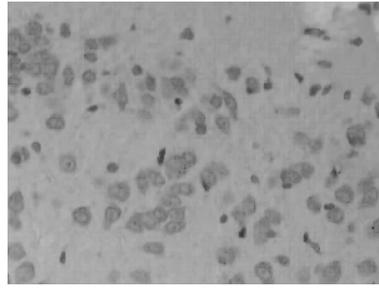


图 8 针刺组 Bax 蛋白表达
(SABC 法 10×20)

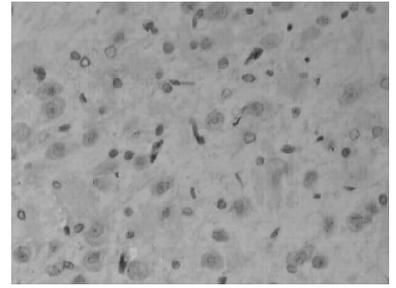


图 9 模型组 Bax 蛋白表达
(SABC 法 10×20)

表 1 针刺对脑组织细胞凋亡阳性细胞及 Bcl-2、Bax 蛋白染色指数的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	细胞凋亡数	Bcl-2	Bax
正常组	8	1.0±0.21	0.51±0.24	1.03±0.27
模型组	8	20.00±3.18▲	0.26±0.06*	1.54±0.17*
针刺组	8	9.05±2.07*#	1.21±0.24*△	1.06±0.23#

与正常组比较,* : $P < 0.05$,▲ : $P < 0.01$;与模型组比较,# : $P < 0.05$,△ : $P < 0.01$ 。

2.2 正常组脑组织几乎不表达 Bcl-2 和有较低的 Bax 表达,但 30 d 时模型组 Bax 升高,Bcl-2 降低;针刺组 Bax、Bcl 均升高。Bcl-2 染色指数模型组或针刺组与正常组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),针刺组与模型组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$),提示针刺能引起 Bcl-2 表达的升高。缺血刺激能升高 Bax 蛋白的表达,模型组 Bax 蛋白与正常组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),针刺组与模型组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),提示针刺能控制 Bax 蛋白的表达,从而保护神经细胞,见表 1 和图 1~9。

3 讨论

宫内窘迫脑损伤属新生儿缺氧缺血性脑病(hypoxic-ischemic encephalopathy, HIE),有研究结果显示,20%~50%的窒息患儿在新生儿期即死亡;幸存者中,高达 25%患有永久性的神经精神障碍,如脑性瘫痪、智力低下、癫痫等^[10-12]。国内儿科医生在脑病的康复方面做了不少的工作,除了吸纳国外的治疗方法外,还融进了传统医学疗法,以针灸为主体的传统中医药疗法,在国内逐渐成为治疗儿童脑病的一种重要手段^[13]。

传统医学疗法应用于儿童脑瘫的治疗,其理论依据为:脑瘫的病位在脑,表现为行为的异常及不同程度的智力障碍。《素问·脉要精微论》曰:“头者精明之府”,头为诸阳之会,是气汇集的重要部位,选用头部穴位可以调整五脏六腑之经气、疏通经络、健脑益髓、调整脑的异常病理状态;在头部穴组的基础上选用体针可反射性地调节大脑中枢神经,协调机体阴阳平衡,恢复肢体的感觉,逐步改善运动功能。诸穴合用、上下配穴能发挥机体的良性双向调节作用,故而可改善脑性瘫痪、智力低下、肢体瘫痪、感觉运动认知障碍等缺氧缺血性脑损伤引起的后遗症。

但传统医学疗法应用于儿童脑瘫所得的结果多为临床证据^[14-15],其实验研究较少开展。而本实验采取结扎双侧子宫动脉制备宫内窘迫脑损伤模型,从脑组织细胞凋亡、凋亡相关基因 Bcl-2、Bax 蛋白表达方面探讨针刺对发育期脑损伤的影

响。现代神经科学研究表明,细胞凋亡是因生理性或病理性刺激引起的一种受基因调控的自身程序性细胞死亡,已被公认为是 HIBD 神经元死亡的重要形式。如何减少神经元死亡的发生,寻找抑制神经细胞凋亡的干预措施将为 HIBD 的治疗开拓新思路^[16]。Bcl-2 家族相关基因是脑缺血神经元凋亡调控基因的重要组成部分,分为 3 个亚族,一类是抑制细胞凋亡,代表者为 Bcl-2,主要参与神经细胞的分化、发育调节,并可通过直接作用促进细胞轴突的生长和再生,有明显的抑制细胞凋亡和神经保护作用。另一类是促进细胞凋亡,分别是 Bax and BH3 亚族。在正常细胞中,存在 Bax 与 Bcl-2 微量表达。

本实验结果揭示,宫内缺血所致发育期脑损伤可能与脑组织缺血后神经细胞凋亡有关;而针刺可以提高宫内窘迫脑损伤大鼠脑组织 Bcl-2 蛋白的表达,降低 Bax 蛋白的表达。作者推测,一方面可能与针灸刺激保护神经细胞,避免神经细胞过早凋亡;另一方面对已受损变性的神经细胞具有一定的恢复作用,与提高神经细胞的活性有关。这些都可能是针刺疗法应用于临床治疗发育期缺氧缺血性脑损伤的机制之一,但针刺调节细胞凋亡的机制是非常复杂的,参与的分子也非常多,还有很多不为所知的机制需要进一步的探索。

参考文献:

- [1] 柳逸斌,黄恒良,邓宏达,等. 92 例小儿脑瘫的病因分析及防治探讨[J]. 广西医学,2008,30(3):408.
- [2] 董艳臣,常全忠,张淑玲. 新生鼠缺氧缺血性脑损伤脑细胞凋亡的研究[J]. 新乡医学院学报,2000,17(2):87.
- [3] Skoff RP, Bessert D, Barks JD, et al. Plasticity of neurons and glia following neonatal hypoxic-ischemic brain injury in rats[J]. Neuro-chem Res,2007,32(2):331.
- [4] Backesjo CM, Li Y, Lindgren U, et al. Activation of Sirt1 decreases adipocyte formation during osteoblast differentiation of mesenchymal stem cells[J]. J Bone Miner Res, 2006,21(7):993.
- [5] 薄涛,严超英,霍淑芳,等. 结扎孕鼠双侧子宫动脉复制围产期缺氧缺血性脑损伤动物模型[J]. 中风与神经疾病杂志,2001,18(1):40.
- [6] Trescher WH, Lehman RA, Vannucci RC. The influence of growth retardation on perinatal hypoxic-ischemic brain damage[J]. Early Hum Dev,1990,21(3):165.
- [7] 李忠仁. 实验针灸学[M]. 北京:中国中医药出版社,2003:327.

类胚胎期大脑皮质的发育已经达到了比较好的水平。比较之下,关于大鼠 CNS 发育中的 NeuN 表达研究却未见系统报道。本实验通过 Western blot 免疫印迹检测表明:大鼠脑 NeuN 蛋白自出生时有少量表达,P2~P15 迅速增加,P30 达高峰,随后逐渐下降。但在免疫组化检测中 P90 与 P30 的阳性细胞数及积分光密度值并无显著差异。这种矛盾的结果可能与 P30 后脑白质发育占优势,灰质相对体积下降,白质相对体积增加有关。这种灰白质相对体积的变化在既往研究中多有报道,Juraska 和 Markham^[5]报道雌性大鼠 P30~P90 灰质相对体积逐渐下降。在人类亦有报道 4~12 岁灰质相对体积是逐渐增加的,12 岁以后即开始逐渐下降^[6],到老年期灰/白质比降至更低。Enrique 等^[7]亦曾报道老年大鼠脊髓 NeuN 免疫反应性下降,但具体机制尚不明确。

由此可见,与人类比较,大鼠出生时脑的成熟程度较人类明显偏低。根据 Sarnat 等^[4]的研究,人类胎儿在 24 周胎龄时皮质的大多数细胞已经表达,出生时 NeuN 已在大脑多部位的神经元表达。而本实验表明,大鼠出生时脑 NeuN 阳性染色少见。这与 Stadlin 等^[8]的研究结果相符。该研究指出 P0 新生大鼠脑的发育成熟度相当于人类孕龄 18~20 周出生的可存活早产儿。另外,从本研究结果可以看出,大鼠脑的发育是灰质优先于白质。在作者前期研究中曾报道大鼠脑白质的发育,也就是脑的髓鞘化在 P8~P20 进展最快,到 P25 大鼠脑髓鞘化完成了成熟大脑髓鞘量的 1/2^[9~10]。而本研究中不论是通过免疫组化还是免疫印迹检测,NeuN 的表达在 P15 与 P30 时已无显著差异,说明大鼠脑皮质、海马神经元在 P15 已基本发育成熟,提示大鼠脑神经元的成熟早于髓鞘的成熟。

NeuN 作为成熟神经元特异性核蛋白,已在研究中被较为广泛地使用。然而,目前有少数研究对 NeuN 的标记物角色提出了质疑,原因包括 NeuN 并不标记所有的神经元,例如脑干下橄榄核、小脑普肯耶细胞、内颗粒细胞等就不能被 NeuN 标记。Unal-cevik 等^[11]报道,在缺氧缺血脑损伤时,且其他检测方法检测到细胞核结构尚未破坏的情况下,NeuN 的免疫反应性出现不匹配的下降,不能真实反映脑缺血后神经元的损害情况。因此,有学者提出在使用 NeuN 作为神经元标记物时,宜同时采用其他的鉴定方法^[7]。总之,NeuN 是一个较为新兴的标志蛋白,人们对它的特性和功能尚不十分了解,有待更加深入的研究。

参考文献:

[1] 包新民,舒斯云.大鼠脑立体定位图谱[M].北京:人民卫

(上接第 2900 页)

- [8] 袁青.靳三针疗法解说[M].上海:上海科学技术文献出版社,2004:39.
- [9] 袁青.靳瑞针灸传真[M].北京:人民卫生出版社,2006.
- [10] 韩玉昆,许植之,虞人杰.新生儿缺氧缺血性脑病[M].北京:人民卫生出版社,2000:24.
- [11] 赵聪敏.围生期缺氧缺血损伤的治疗进展[J].中国医药指南,2008,6(12):17.
- [12] 吴君仓,群森,张持,等.脑出血的病理损伤机制研究及相关治疗进展[J].安徽医学,2009,30(4):490.
- [13] 牛小梅.中医对新生儿缺氧缺血性脑病的认识及治疗研究展望[J].现代中医药,2004,11(3):57.

生出版社,1991:19.

- [2] Mullen RJ, Buck CR, Smith AM, et al. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates[J]. Development, 1992,116:201.
- [3] Kumar SS, Buckm PS. Neuron-specific nuclear antigen NeuN is not detectable in gerbil substantia nigra pars reticulata[J]. Brain Res, 2007,1142(20):542.
- [4] Sarnat HB, Nochlin D, Born DE, et al. Neuronal nuclear antigen (NeuN): a marker of neuronal maturation in the early human fetal nervous system[J]. Brain Dev, 1998,20(2):8829.
- [5] Juraska JM, Markham JA. The cellular basis for volume changes in the rat cortex during puberty: white and gray matter[J]. Ann NY Acad Sci, 1994,1021:431.
- [6] Pfefferbaum A, Mathalon DH, Sullivan EV, et al. A quantitative magnetic resonance imaging study of changes in brain morphology from infancy to late adulthood[J]. Arch Neurol, 1994,51:874.
- [7] Enrique LP, Claudio GB, Eduardo J, et al. Loss of NeuN immunoreactivity in rat spinal cord neurons during aging[J]. Exp Neurol, 2006,202:519.
- [8] Stadlin A, James A, Fiscus R, et al. Development of a postnatal 3-day-old rat model of mild hypoxic-ischemic brain injury[J]. Brain Res, 2003,993(1-2):101.
- [9] 张雨平,黄其林,赵聪敏,等.不同发育阶段大鼠脑髓鞘化的研究[J].第三军医大学学报,2009,31(22):2189.
- [10] Watson RE, Desesso JM, Hurtt ME, et al. Postnatal growth and morphological development of the brain: a species comparison[J]. Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol, 2006,77(5):471.
- [11] Unal-cevik I, Kilinc M, Gursoy Y, et al. Loss of NeuN immunoreactivity after cerebral ischemia does not indicate neuronal cell loss; a cautionary note[J]. Brain Res, 2004,1015:169.

(收稿日期:2010-05-25)

- [14] 于海波,靳瑞.针刺治疗 142 例小儿脑瘫的疗效观察[J].内蒙古中医药,1996,15(3):26.
- [15] Duncan B. Parental perceptions of the therapeutic effect from osteopathic manipulation or acupuncture in children with spastic cerebral palsy[J]. Clin Pediatr, 2004,43(4):349.
- [16] Lihua Li, Yi Qu, Jinhui Li, et al. Relationship between HIF-1 α expression and neuronal apoptosis in neonatal rats with hypoxia-ischemia brain injury[J]. Brain Res, 2007,1180(14):133.

(收稿日期:2010-05-25)