

ISSN 1006-2963
CN11-3552/R

CHINESE JOURNAL OF
NEUROIMMUNOLOGY AND NEUROLOGY

中国神经免疫学和 神经病学杂志

- ◇中国科技论文统计源期刊
- ◇中国科学引文数据库来源期刊
- ◇中国学术期刊综合评价数据库来源期刊



第11卷 第2期 Vol.11 No.2

主管 中华人民共和国卫生部
主办 卫生部北京医院
中国免疫学会神经免疫学分会
协办 西安高新医院

2 / 2004

ISSN 1006-2963



9 771006 296001

ZHONGGUO SHENJINGMIANYIXUE HE SHENJINGBINGXUE ZAZHI

中国神经免疫学和神经病学杂志

第 11 卷

2004 年 4 月

第 2 期

目 次

论 著

- 重症肌无力患者甲状腺功能和甲状腺抗体情况的临床分析 矫毓娟, 许贤豪, 张 华, 等(63)
- 心血管危险因子与广西汉族迟发性阿尔茨海默病之间的相关性研究 郑卫东, 郑怀竟, 杨 泽, 等(68)
- 化学点燃癫痫大鼠在水迷宫中学习记忆能力与海马中 bFGF 表达的关系 朱丹彤, 肖 波, 杨晓芬, 等(72)
- 癫痫大鼠海马中神经肽 Y 表达的动态观察及其作用探讨 陈丽丽, 杨晓芬, 肖 波, 等(76)
- 假肥大型肌营养不良症患者 HLA-A、B、DR 基因表达研究 陈 维, 肖露露, 谭恩勤, 等(80)
- 脱氢异雄酮对大鼠星形胶质细胞 CD80、CD86 和 MHC- I 分子表达及其细胞增生
影响的研究 段瑞生, 肖保国, 窦迎春(84)
- 脑缺血再灌注后 IL-8 与微血管炎症损伤关系的实验研究 狄政莉, 万 琪, 王洪典, 等(87)
- 大鼠局灶性脑缺血/再灌注后 Ku70mRNA 的表达 刘竞丽, 董为伟, 李劲频(91)
- 急性实验性脑出血大鼠缺血皮质区炎症因子的表达 曾锦旗, 彭泽峰(94)
- 针刺对缺血再灌注大鼠海马源性神经营养因子 mRNA 的影响 张雪朝, 孙国杰(98)
- 睡眠剥夺对大鼠血清 MBP 及皮质醇含量的影响 吴兴曲, 杨来启, 李拴德, 等(102)
- 重型颅脑损伤患者血浆纤维结合蛋白变化初步研究 杨术真, 李拴德, 李丽娜, 等(105)
- 肾上腺脑白质营养不良蛋白 ATP 结合区的原核表达与鉴定 黄梁洪, 郑德柱, 谢 飞, 等(107)

综 述

- 老年性痴呆的免疫机制研究进展(综述) 刘江红, 许贤豪(111)
- 上睑下垂的病因、诊断和鉴别诊断(综述) 谢球臣, 许贤豪, 张 华(115)

论著摘要

- 复方丹参对急性脑梗死血浆 ET、CGRP 的影响 盛文化, 李晓红, 姚海燕, 等(121)

病例报告

- 神经白塞病一例报告 王 琳, 朱以诚, 崔丽英(123)
- 以小舞蹈样发作为表现的烟雾病一例报告 岳连修, 戚晓昆, 姜树军, 等(124)

消 息

- 第四届老年期痴呆与有关疾病研讨会即将召开 (67)
- 《中国神经免疫学和神经病学杂志》由 2004 年下半年起改为双月刊及专题报道内容调整预告 (122)

针刺对缺血再灌注大鼠海马脑源性神经营养因子 mRNA 的影响

张雪朝, 孙国杰

(湖北中医学院针推系, 湖北 武汉 430061)

摘要: **目的** 探讨针刺对缺血再灌注大鼠海马内脑源性神经营养因子(BDNF)基因表达的影响,推测针刺改善缺血再灌注的可能机制。**方法** 采用 4-血管阻断法制备大鼠全脑缺血再灌注模型,电针刺百会、肾俞、足三里穴后,利用 RT-PCR 检测 BDNF mRNA。**结果** 正常组大鼠海马 BDNF mRNA 表达极低;缺血再灌注组大鼠海马 BDNF mRNA 表达明显增高,治疗 15 d 的针刺 1、2 组大鼠海马 BDNF mRNA 表达较缺血再灌注组更高,及早治疗且治疗时间为 20 d 的针刺 3 组大鼠海马 BDNF mRNA 表达降低。**结论** 缺血再灌注大鼠海马 BDNF 水平增高有利于损伤的神经元存活、恢复,针刺促进脑内细胞分泌内源性 BDNF 可能是针刺有效治疗缺血再灌注的机制之一。

关键词: 针刺; 缺血再灌注; 脑源性神经营养因子; 海马; 反转录 PCR

中图分类号: R743; R338 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-2963 (2004)02-0098-04

Effections of Acupuncture on the Rat of Transient Focal Brain Ischemia and Reperfusion and the Brain-derived Neurotrophic Factor mRNA

ZHANG Xue-zhao, SUN Guo-jie

(Department of Acupuncture, Hubei College of Traditional Chinese Medicine, Hubei Wuhan 430061, China)

ABSTRACT: Objective To study the change of the brain-derived neurotrophic factor mRNA (BDNF mRNA) in hippocampus of transient focal brain ischemia and reperfusion of rat after by acupuncture therapy. **Methods** The transient focal brain ischemia and reperfusion model rat was performed by 4-vessel occlusion method. The study chose three acupuncture points Baihui, Shenyu and the Zusanli to treat transient focal brain ischemia and reperfusion rat. The level of BDNF mRNA in rat hippocampus was measured using reverse transcription PCR. **Results** The level of the BDNF mRNA in hippocampus was very low in the normal rat. But it increased in transient focal brain ischemia and reperfusion model rat. And after acupuncture treatment, it had a significant increase. An earlier begining of therapy which should last long enough for 20 days could make BDNF and mRNA expressions decreased. **Conclusions** Our demonstration of acupuncture increasing secretin of high level of endogenous BDNF in hippocampus which favoures the survival of injured neuron cells may serve to explain the mechanism of the effective treatment of acupuncture for brain ischemua and reperfusion.

Key words: acupuncture; brain ischemia and reperfusion; brain-derived neurotrophic factor; hippocamp; RT-PCR

收稿日期:2001-06-29; 修订日期:2001-07-25

基金项目:贵州省教委 2000 年度科研基金资助项目(黔教科 200015)

作者简介:张雪朝(1966-),女(苗族),山东省人,博士,讲师(主治医师),主要从事血管性痴呆的针刺研究。现通讯地址:贵州省安顺市西秀区自强路 73 号 1 栋 1 号,安顺 561000。联系电话:013661671126。

脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 是神经生长因子家族的重要成员。BDNF 广泛分布于中枢神经系统 (CNS), 特别是海马及皮层神经元, 能促进胆碱能、多巴胺能及运动性神经元存活、分化和轴突再生。作为一种作用广泛而有效的神经营养因子, BDNF 对多种神经疾病尤其是神经退行性疾病如癫痫、老年性痴呆、血管性痴呆等具有治疗潜能, 但在过渡到临床之前, 存在着给药途径和安全给药问题。BDNF 作为一种碱性蛋白质, 难以通过血-脑脊液屏障, 不能通过全身给药治疗 CNS 疾病。而颅内直接给药尚存在许多问题。已有实验发现, BDNF 脑室给药会带来体重减轻、饮水减少、活动过度等副作用^[1]。基因治疗虽前途无量, 但目前仍然不能应用到临床。值得注意的是已有实验证实, 针刺可使脑内神经营养因子表达大量增加, 是提高脑内源性 BDNF 表达的途径之一^[2]。鉴于大量临床实验报道以及作者既往实验证实, 针刺可以有效治疗血管性痴呆, 并能影响其脑内一些蛋白及基因的表达^[3,4]。因此, 此实验拟以 4-血管阻断法建立缺血再灌注大鼠模型, 在电针刺激百会、肾俞、后足三里穴位后, 用 RT-PCR 技术, 观察大鼠海马 BDNF mRNA 的改变, 旨在探讨针刺调节 BDNF 基因的改变是否是针刺治疗缺血再灌注的分子机制之一, 从分子水平为临床针刺治疗缺血再灌注提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 试剂 总 RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒、Taq DNA 聚合酶 (5 000 U/L)、dNTP (10 mmol/L)、DEPC、琼脂糖, 均为 Promega 公司产品。其他为国产分析纯。

1.2 仪器 PTC-100 型 PCR 仪 (MJ 公司)、H V3000 多用电泳仪 (北京东方仪器厂)、Eppendorf 台式冰冻离心机 (美国 Eppendorf 公司) 及凝胶紫外扫描图像分析仪 (上海 Tanon 仪器公司)。

1.3 实验动物分组 SD 大鼠, 480~520 g, 12 月龄左右, 雄性, 50 只。分为针刺 1 组 10 只, 针刺 2 组 10 只, 针刺 3 组 10 只, 缺血再灌注模型组 10 只, 对照组 10 只。所用大鼠由上海中医药大学动物中心提供。

1.4 模型建立 采用改良的 Pulsinelli 4-血管阻断全脑缺血法 (4-vessel occlusion, 4-VO) 建立缺血再灌注大鼠模型: 用 0.1 kg/L 水合氯醛 (按体重

0.5 mL/100 g) 腹腔麻醉大鼠, 背侧正中切口, 用电凝针经第一颈椎横突翼小孔闭塞双侧椎动脉。腹侧颈正中切口, 分离双侧颈总动脉, 24 h 后可逆性夹闭双侧颈总动脉 3 次, 每次 5 min, 间隔 1 h。

1.5 针刺操作及材料处理 根据华兴帮提供的动物穴位定位和针刺方法^[5], 定位大鼠百会、肾俞、足三里 3 穴, 28 号 1 寸毫针接 G6805 电针仪, 施以连续波, 频率为 2 Hz, 强度以肢体抖动为度。针刺治疗 1 次/d, 每次 30 min。针刺 1 组在 4-VO 术 10 d 后方进行针刺治疗, 治疗时间为 15 d; 针刺 2、3 组均在 4-VO 术后立即针刺治疗, 治疗时间分别为 15、20 d。各组治疗结束后, 断头, 取脑, 在冰盘上迅速分离大鼠大脑双侧海马, -70 °C 保存备用。对照组和模型组均与针刺 2 组同期取材。

1.6 反转录 PCR (reverse transcription PCR, RT-PCR) (1) 关于引物设计及合成, 根据 GeneBank 的序列设计 BDNF、GAPDH 引物。扩增 BDNF cDNA 序列的 463-826 (364 bp) 片段, 其上游引物为 5'-CACTCCGACCCTGCCCGCCG-3', 下游引物为 5'-TCCACTATCTTCCCCTTTTA-3'。扩增内参照 GAPDH 序列的 220-825 (606 bp) 片段, 其上游引物为 5'-CCCACGGCAAGTTCA-ACGGCA-3', 下游引物为 5'-TGGCAGGTTTCTCCAGGCG GC -3'。引物由美国 Gibco, BRL 公司合成。(2) 采用异硫氰酸胍一步法 (Ambion 提取试剂盒) 提取海马组织中总 RNA。(3) 通过紫外分光光度计检测 RNA 含量; 以 $D(\lambda)_{260}/D(\lambda)_{280}$ 的比值检测样品 RNA 的纯度。(4) 用 10% (体积分数) 甲醛变性凝胶电泳, 鉴定 RNA 的完整性。(5) 关于反转录, 按反转录试剂盒 (Promega) 说明书进行。(6) 有关 PCR 扩增, 按 PCR 试剂盒 (Promega) 说明书进行。反应条件为: 预变性 94 °C 3 min, 然后变性 94 °C 1 min, 退火 58 °C 1 min, 延伸 72 °C 1.5 min, 共 35 次循环, 末次循环延伸 72 °C 10 min。(7) 以 15 g/L 琼脂糖电泳。(8) 将凝胶电泳的特异性扩增条带在紫外分析仪下扫描。

2 结果

2.1 总 RNA 的鉴定 经紫外分光光度计检测各组样品 $D(\lambda)_{260}/D(\lambda)_{280}$ 的比值均在 1.7~2.1 之间。表明所得 RNA 纯度符合实验要求。甲醛凝胶变性电泳上可清晰看到 RNA 28S 和 18S 两条带, 其亮度比值约为 2:1, 并隐约可见 5S 条带, 表明 RNA 完整, 没有降解 (图 1)。

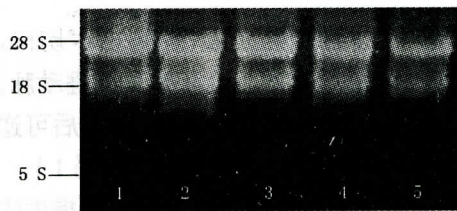


图 1 RNA 甲醛凝胶变性电泳

Fig 1 Agarose gel electrophoresis of total RNA extracted

Lane 1: comparison group; Lane 2: transient focal brain ischemia and reperfusion model rat group; Lane 3: acupuncture 1 group; Lane 4: acupuncture 2 group; Lane 5: acupuncture 3 group

2.2 RT-PCR 结果 利用 RT-PCR 技术和设定的两对引物,在上述实验条件下,分别得到各组大鼠 BDNF(图 2)和 GAPDH 的扩增产物(图 3)。图 2 示,通过兼并引物获得片段长 364、242、196 bp 的 3 条 BDNF 扩增条带,其与设计的 BDNF 扩增片段长相一致。分析扩增产物发现,正常组大鼠海马 BDNF mRNA 表达很低,缺血再灌注组大鼠海马 BDNF mRNA 表达明显增高,针刺 1、2 组大鼠海马 BDNF mRNA 表达较缺血再灌注组更高,针刺 3 组大鼠海马 BDNF mRNA 表达降低,尤其 364、242 bp 扩增片段变化最为明显。图 3 示,各组大鼠 GAPDH 表达量无差异。

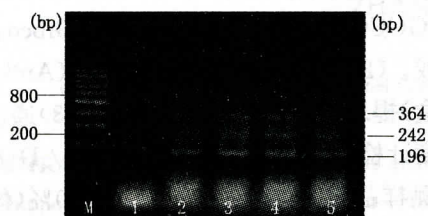


图 2 各组大鼠 BDNF 的扩增产物

Fig 2 PCR products of BDNF in each of groups rats

M: PCR marker; Lane 1, 2, 3, 4, 5 the same as Fig 1

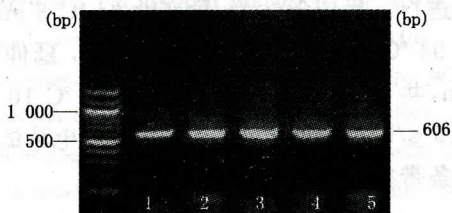


图 3 各组大鼠 GAPDH 的扩增产物

Fig 3 PCR products of GAPDH in each of groups rats

Lane 1, 2, 3, 4, 5 the same as Fig 1

3 讨论

RT-PCR 是在 mRNA 反转录之后以 cDNA 为模板进行的 PCR 扩增,是一种检测 mRNA 分子的良好方法^[6]。RT-PCR 具有很高的敏感性,可以

用来分析不同组织 mRNA 表达状态。一般说来,细胞中某种 mRNA 的数量,是其编码基因活性的直接反映。所以,某种 mRNA 的定量随不同时空状态下编码基因表达活性的变化而不同。此实验选用 RT-PCR 来观察针刺治疗缺血再灌注后大鼠脑内海马区 BDNF mRNA 的变化,借以了解其所编码基因表达活性的变化,并从基因水平分析针刺治疗缺血再灌注的可能分子机制。

BDNF 是由神经元自身所支配的靶组织产生的特异蛋白质分子,通过神经元轴突逆行运输到神经元胞体,与特异的神经细胞受体结合而发挥其生理功能。在发育阶段脑组织中 BDNF 大量表达,成年后表达水平较低,但是在脑外伤、癫痫发作、脑缺血等诸多因素影响下,其表达水平发生很大的变化。此实验结果显示,缺血再灌注大鼠海马内 BDNF mRNA 表达较正常组增加,提示大鼠因缺血再灌注而刺激脑内大量表达 BDNF mRNA,以便参与神经元的修复,是海马细胞对损伤的一种保护性反应。近年国外实验证实在脑缺血情况下 BDNF 及其受体 trkB 表达均增加^[7]。脑缺血损伤调节 BDNF mRNA 表达的机制仍不清楚。已有证据表明脑缺血损伤刺激谷氨酸释放、兴奋性氨基酸受体激活和钙离子内流均可诱导 BDNF 及其受体 trkB 在脑内表达增加^[8]。另有实验发现:缺血再灌注损伤均能升高 BDNF mRNA 水平,而且 BDNF mRNA 水平高及反应高的区域病理改变轻,认为 BDNF mRNA 水平增高有利于损伤的细胞存活、生长、恢复^[9]。

此实验结果尚显示,针刺治疗 15 d 后大鼠海马内 BDNF mRNA 表达大量增加,其增加量较缺血再灌注模型组高,提示针刺促进了脑内细胞大量分泌内源性 BDNF,抑制神经元的凋亡,改善了脑内神经元生存环境而促进神经元再生、修复。有研究表明用电针刺激 MCAO 大鼠百会等穴,则大鼠脑内 BDNF 表达增加^[2],与此实验结果一致。利用脑室内注射外源性 BDNF 发现,足量的外源性 BDNF 可对海马细胞缺血损伤后的死亡起到保护作用^[10],而且外源性 BDNF 能提高突触效应和海马的 AMP 和 IP₃ 水平。细胞培养亦显示 BDNF 能促进海马神经元细胞生长。结合已有的实验结果,可以推测针刺增加 BDNF 的表达,可能对缺血再灌注神经元保护的机制有以下几个途径:(1)阻止神经元细胞凋亡。近年不少动物实验研究揭示了缺血再灌注脑内除神经元坏死外,还存在细胞凋亡的

证据^[11]。现已证实在 CNS 内 Bax、Bcl-x_s、P75 NGFR 等产物均可激活细胞死亡基因促进细胞凋亡, BDNF 与其低亲和力受体 P75 NGFR 结合而保护神经元^[12,13]。(2) 刺激 c-fos、c-jun 等既早基因的表达。有实验报道针刺肾俞穴可诱导脑内 c-Fos 表达增加。作者已往实验也发现^[2], 针刺可以改善缺血再灌注大鼠学习记忆, 同时提高海马 CA₁ 区 c-fos 基因表达。c-fos 基因的表达产物 Fos 蛋白通过亮氨酸拉链区结合构成异构二聚体, 与许多基因的激活蛋白 1(AP-1) 结合位点结合, 调节靶基因表达和转录。NTFs 基因家族成员神经生长因子(NGF) 基因具有 AP-1 结合位点^[14], 鉴于 BDNF 基因与 NGF 基因结构和功能都十分相似, BDNF 基因可能也具有 AP-1 结合位点。因此可以推测, 针刺治疗缺血再灌注, 大鼠海马内内源性 BDNF mRNA 的表达增加可能通过针刺诱导 c-fos 等既早基因的表达而启动, c-fos 作为第三信使或潜在的转录因子启动机体对 CNS 的刺激或损伤发生保护性反应, 从而使海马神经元免受缺血等刺激的损害。

此实验还发现, 在及早治疗且治疗时间足够长的针刺 3 组大鼠海马中 BDNF mRNA 表达水平降低, 提示缺血再灌注损伤的海马神经在针刺作用下已得到修复。这与 BDNF mRNA 在体内生长发育过程中表达的特点相似^[15]。另外实验得到 3 条不同大小 BDNF 片段, 其各自的功能有待进一步研究, 此实验中 364、242 bp 两条片段各组间变化较为明显, 推测它们与该病的关系更为密切。

参考文献:

- [1] Sauer H, Fischer W, Nikkhah G, *et al.* Brain-derived neurotrophic factor enhances function rather than survival of intrastriatal dopamine cell-rich grafts [J]. *Brain Res*, 1993, 626(12):37-41.
- [2] 陈英辉, 黄显奋. 累加电针对脑缺血大鼠皮层脑源性神经营养因子表达及脑梗塞体积的影响[J]. 针刺研究, 2000, 25(3):165-169.
- [3] 张雪朝, 吕明庄, 贺志光, 等. 针刺改善 VD 大鼠记忆障碍及 c-fos mRNA 和蛋白的表达[J]. 中国康复医学杂志, 2001, 16(2):74-77.
- [4] 张雪朝, 肖茂磊, 孙国杰, 等. 耳针改善血管性痴呆大鼠记忆与 nNOS 表达的关系[J]. 上海针灸, 2001, 19(1):39-41.
- [5] 华兴帮, 李辞蓉, 周浩良, 等. 大鼠穴位图谱的研制[J]. 实验动物与动物实验, 1991, 1:1-5.
- [6] 吴乃虎. 基因工程原理[M]. 北京:北京科学出版社, 1995. 99-112.
- [7] Ferrer I, Ballabriga J, Mark E, *et al.* BDNF up-regulates trkB protein and prevents the death of CA₁ neurons following transient forebrain ischemia [J]. *Brain Pathol*, 1998, 8:253-261.
- [8] Tsukahara T, Yonekawa Y, Tanaka K. The role of brain derived neurotrophic factor in transient forebrain ischemia in the rat brain [J]. *Neurosurgery*, 1994, 34(2):323-331.
- [9] 石向群, 陆兵勋, 米瑞发, 等. 脑缺血再灌注后脑内脑源性神经营养因子的基因表达与调节[J]. 卒中与神经疾病, 2000, (7)1:1-3.
- [10] Ohara O, Yonekawa Y, Tanaka K, *et al.* The role of brain-derived neurotrophic factor in transient forebrain ischemia in rat brain [J]. *Neurosurg*, 1994, 34:323-339.
- [11] Von C, Williams R, Lefcort F, *et al.* Retrograde transport of neurotrophins from the eye to the brain in chick embryos: roles of the p75^{NTR} and trkB receptors [J]. *J Neurosci*, 1996, 16(9):2995-3008.
- [12] Sendtner M, Hotmann B. BDNF prevents the death of motoneurons in newborn rat after nerve section [J]. *Nature*, 1992, 360:757-761.
- [13] Lindvall O, Kokaia Z, Bengtzen J, *et al.* Neurotrophins and brain insults [J]. *TINS*, 1994, 17:490-496.
- [14] Hsu C, An G, Liu J, *et al.* Expression of immediate early gene and growth factor mRNA in a focal cerebral ischemia model in the rat [J]. *Stroke*, 1993, 24(12):178-181.
- [15] Yan Q, Rosenfeld R, Matheson C. Expression of brain derived neurotrophic factor protein in the adult rat central nervous system [J]. *Neuroscience*, 1997, 78:431-448.