

# 电针对脑缺血大鼠海马 CA3 区 NGF 和 Gas7 表达的影响

丁 见 吴 锋 繆化春 李怀斌 熊克仁

(皖南医学院 人体解剖学教研室 安徽 芜湖 241002)

**【摘要】**目的: 观察电针对脑缺血大鼠 CA3 区神经生长因子(NGF)和生长休止特定蛋白 7(Gas7)表达的影响,分析其可能的保护机制。方法: 24 只雄性 SD 大鼠随机分为正常组、假手术组、模型组和造模后电针治疗组,采用线栓法复制右侧大脑中动脉栓塞(MCAO)模型。造模成功 1 周后,电针组给予电针“百会”和左侧“足三里”穴,每天 1 次,每次 30 min,连续 21 d。采用尼氏染色法观察各组缺血侧 CA3 区神经元形态,并用免疫组织化学方法检测 CA3 区 NGF 和 Gas7 的表达。结果: ①尼氏染色结果显示正常组与假手术组 CA3 区神经元轮廓清晰、淡染;模型组 CA3 区神经元形态周缘不规则,细胞核固缩;电针组神经元形态与正常组接近。②免疫组化结果: 正常组、假手术组大鼠海马 CA3 区 NGF 和 Gas7 的免疫反应阳性表达强度差异无统计学意义( $P > 0.05$ );模型组 CA3 区 NGF 和 Gas7 的免疫反应阳性表达比正常组增强( $P < 0.01$ );电针组 CA3 区 NGF 和 Gas7 的免疫反应阳性表达比模型组增强( $P < 0.01$ )。结论: 电针可通过上调缺血侧海马 CA3 区 NGF 和 Gas7 的表达,对神经元起到一定保护作用。

**【关键词】**电针;脑缺血;CA3;神经生长因子;生长休止特定蛋白 7

**【中图分类号】**R 245.97 **【文献标志码】**A

**【DOI】**10.3969/j.issn.1002-0217.2018.03.002

## Effect of electroacupuncture intervention on NGF and Gas7 expression in hippocampal CA3 region in cerebral ischemia rats

DING Jian, WU Feng, MIU Huachun, LI Huaibin, XIONG Keren

Department of Anatomy, Wannan Medical College, Wuhu 241002, China

**【Abstract】Objective:** To observe the effect of electroacupuncture(EA) on the expression of nerve growth factor(NGF) and growth arrest-specific protein 7 (gas7) in the right hippocampal CA3 region in rat models with focal cerebral ischemia for potential mechanism of EA intervention. **Methods:** Twenty-four healthy adult male Sprague-Dawley (SD) rats were randomized into groups of normal control, sham operation, models and electroacupuncture intervention. Rat models were prepared by middle cerebral artery occlusion(MCAO). One week after model establishment, rats in the EA group were treated with EA at the point of *Baihui* and *Zusanli* in the left leg once a day for 30 min for consecutive 21 days. Nissl staining was performed to observe the morphology of neurons in the CA3 region in rats of each group, and immunohistochemistry was used to determine the expression of NGF and Gas7 in the CA3 region. **Results:** ①Nissl staining indicated clear structure and lightly stained neurons in the CA3 region in rats of normal control and sham operation groups, and irregular neurons with nuclear pyknosis in peripheral CA3 area in model rats. The neurons in rats treated with EA remained similar to those of normal controls; ②Immunohistochemistry showed that there was no significant difference in the immunoreactive expression of NGF and Gas7 protein in the right CA3 area between sham group and normal control group( $P > 0.05$ ), yet increased positive immunoreaction of NGF and Gas7 protein was seen in the CA3 region in model rats and rats treated with EA as compared with the normal controls or model group( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** EA can significantly up-regulate the expression of NGF and Gas7 in hippocampal CA3 region in rat cerebral ischemia, and may produce protective effect on the neurons in the affected areas.

**【Key words】** electroacupuncture; cerebral ischemia; CA3; nerve growth factor; growth arrest-specific protein 7

脑缺血是临床常见疾病,具有高致残率、高病死率的特点,其病理过程较为复杂,缺血病灶区局部甚至远离缺血区部位都会出现不同程度的损伤<sup>[1]</sup>。

大脑内不同部位对缺血缺氧损害敏感程度有差异,海马是其中较为敏感的部位,也是大脑内具有重要功能的结构<sup>[2]</sup>。针刺作为中国传统的“非药物”治

基金项目:安徽省高等学校自然科学研究重点项目(KJ2015A227);皖南医学院重点科研培育基金项目(WK2016Z09)

收稿日期:2018-02-01

作者简介:丁见(1987-),男,助教,硕士,(电话)13965165065,(电子信箱)dj140027@163.com;

李怀斌,男,教授,硕士生导师,(电子信箱)1515053540@qq.com,通信作者。

疗手段,对脑缺血后神经、血管再生具有显著的临床效应<sup>[3]</sup>。神经生长因子(nerve growth factor,NGF)和生长休止特定蛋白7(growth arrest-specific protein 7,Gas7)对中枢神经系统的再生和修复有着重要的作用,具有维持神经元存活、参与受损神经元修复等功能<sup>[4-5]</sup>。前期研究显示,电针可通过上调大鼠缺血侧丘脑腹后外侧核 NGF 和 Gas7 的表达,从而对神经元起到一定保护作用<sup>[6]</sup>,但电针对海马 CA3 区 NGF 和 Gas7 表达的影响尚未见报道。本研究通过建立大脑中动脉栓塞(middle cerebral artery occlusion,MCAO)大鼠模型,观察电针刺激“百会”和左侧“足三里”穴对脑缺血损伤后海马 CA3 区 NGF 和 Gas7 表达的影响,探讨电针对大鼠脑缺血后损伤的保护作用及可能机制。

## 1 材料与方法

1.1 实验动物及分组 SD 大鼠 24 只,清洁级成年雄性,体质量(200 ± 20)g,许可证号:SCXK(苏)2014-0007。适应性饲养 7 d 后,大鼠随机分为正常组、假手术组、模型组和电针组,每组 6 只。

1.2 药品及试剂 戊巴比妥钠,美国 Sigma 公司;NGF 一抗,北京博奥森生物技术有限公司;Gas7 一抗,Santa Cruz 公司;浓缩型 SABC-POD 试剂盒,武汉博士德生物工程有限公司;PBS 漂洗缓冲液,武汉博士德生物工程有限公司;多聚赖氨酸(Poly-L-lysine),武汉博士德生物工程有限公司;DAB 底物显色试剂盒,北京天根生化科技有限公司。

1.3 模型制备 参照本研究前期建立的 MCAO 模型制作方法<sup>[6]</sup>,大鼠经腹腔注射戊巴比妥钠麻醉后仰卧于实验台上,颈部剃毛、消毒后做正中切口,分离出右侧颈总动脉(CCA),分离颈外动脉(ECA)、颈内动脉(ICA)颅外段。将 CCA 近心端结扎,ECA 结扎。于右侧颈总动脉近分叉处作一小切口,插入预先准备的直径 0.26 mm 尼龙线,深度(18.5 ± 0.5)mm,用备线扎紧,清创,缝合皮肤。同时制备假手术组作为对照,仅暴露右侧 CCA、ECA 及 ICA,逐层缝合,正常进食。

1.4 干预方法 造模成功 1 周后,电针组参照中国针灸学会实验针灸委员会制定的实验动物穴位图谱,以 30 号 1 寸毫针取“百会”穴斜刺入头皮 1 mm,直刺左侧“足三里”穴 2 mm。针柄连接至电针仪(苏州医疗用品厂有限公司,型号:SDZ-II),给予低频(2 Hz)电流刺激,强度为 2 V,波宽为 1 ms,持续 30 min,每日 1 次,连续 3 周。其余 3 组不予干预。

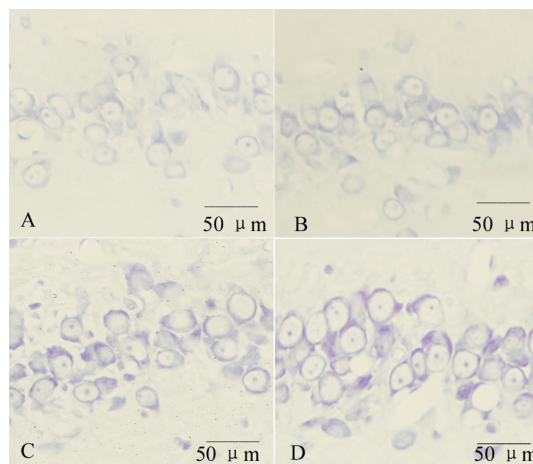
1.5 标本采集与形态学检测 以 1% 戊巴比妥钠

腹腔注射麻醉,开胸,用插管经左心室-升主动脉灌注 4% 多聚甲醛,灌注后取脑,参照大鼠脑立体定位图谱<sup>[7]</sup>进行分段,将分段后的脑组织放入 4% 甲醛固定 24 h 后石蜡包埋。常规石蜡切片(厚 5 μm),以涂有多聚赖氨酸的载玻片贴片后按 SABC 免疫组织化学染色试剂盒步骤进行操作,DAB 显色,中性树胶封片。切片中选取相同冠状切面,每组 10 张,在光学显微镜采用 400 倍视野对 CA3 区进行观察拍照,采集照片相同区域内用 Image J 软件对 NGF 和 Gas7 阳性神经细胞进行计数并测量平均灰度值。

1.6 统计分析 用 SPSS 18.0 统计软件进行统计分析,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD 检验,结果以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 神经元形态学比较 正常组及假手术组 CA3 区尼氏染色后镜下结构境界清晰,淡染,排列较为整齐,神经元形态完整,胞核居中,胞质丰富。模型组大鼠患侧海马锥体细胞层次减少、排列紊乱,神经细胞形态不规则增多。电针组大鼠神经元细胞形态有改善,缺血侧细胞萎缩状况较模型组减少(见图 1)。



A. 正常组;B. 假手术组;C. 模型组;D. 电针组。

图 1 各组大鼠右侧海马 CA3 区神经元尼氏染色

## 2.2 NGF 蛋白在各组右侧海马 CA3 区表达的比较

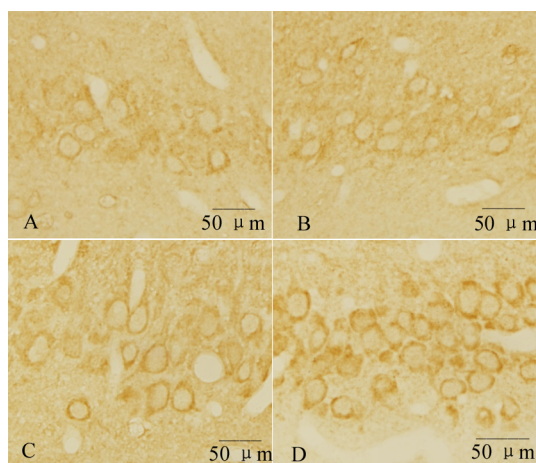
各组大鼠右侧海马 CA3 区均有 NGF 的表达。NGF 免疫阳性产物主要着色部位为神经元的胞膜与胞质,阳性神经元着色呈棕黄色。正常组可见少许淡染的 NGF 阳性神经元;模型组 CA3 区 NGF 阳性神经元数量增多( $P < 0.01$ ),染色加深,细胞平均灰度值较正常组降低( $P < 0.01$ );电针组与模型组比较,CA3 区 NGF 阳性神经元数量均增多( $P < 0.01$ ),免疫阳性细胞平均灰度值降低( $P < 0.01$ );与正常组比较,假手术组右侧 CA3 区 NGF 阳性表

达差异无统计学意义( $P > 0.05$ ) ,见表 1、图 2。

表 1 大鼠海马 CA3 区的 NGF 和 Gas7 免疫阳性细胞数及平均灰度值( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	NGF		Gas7	
	细胞数 (个/高倍视野)	灰度值	细胞数 (个/高倍视野)	灰度值
正常组	26.93 ± 3.94	164.05 ± 3.62	28.23 ± 3.86	167.74 ± 4.90
假手术组	25.67 ± 2.99 <sup>a</sup>	162.90 ± 3.55 <sup>a</sup>	27.85 ± 2.93 <sup>a</sup>	165.16 ± 7.27 <sup>a</sup>
模型组	35.09 ± 3.53 <sup>a1</sup>	149.74 ± 2.51 <sup>a1</sup>	41.93 ± 2.77 <sup>a1</sup>	153.79 ± 5.66 <sup>a</sup>
电针组	44.62 ± 5.21 <sup>b1</sup>	135.19 ± 3.66 <sup>b1</sup>	52.62 ± 4.33 <sup>b1</sup>	138.44 ± 6.06 <sup>b</sup>
F	28.740	39.268	96.643	29.373
P	0.000	0.000	0.000	0.000

与正常组比较 a  $P < 0.01$ ;与模型组比较 b  $P < 0.01$ ;与正常组比较 c  $P > 0.05$ 。



A. 正常组;B. 假手术组;C. 模型组;D. 电针组。

图 2 NGF 在大鼠右侧海马 CA3 区的表达

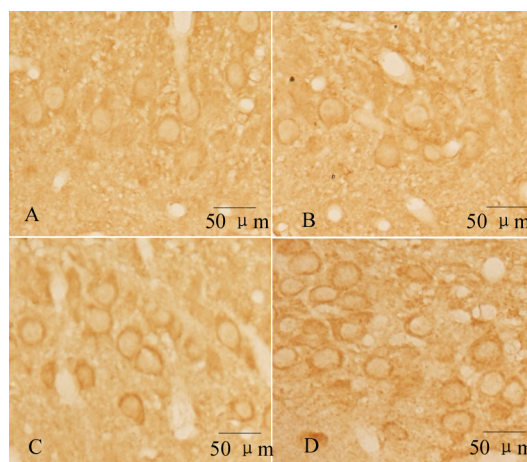
### 2.3 Gas7 蛋白在各组右侧海马 CA3 区表达的比较

Gas7 阳性神经元呈棕黄色,着色部位主要为胞膜和胞质,细胞多呈圆形,少数呈椭圆形。正常组 CA3 区可见少量淡染的 Gas7 阳性神经元。模型组 Gas7 阳性细胞数较正常组增多 ( $P < 0.01$ ),细胞染色加深,细胞平均灰度值降低 ( $P < 0.01$ );电针组 Gas7 阳性神经元呈深染状态,与模型组比较,细胞数增多 ( $P < 0.01$ ),平均灰度值降低 ( $P < 0.01$ );与正常组相比较,假手术组 CA3 区 Gas7 阳性表达差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见表 1、图 3。

### 3 讨论

缺血性脑血管病是临床常见疾病,具有致残率高的特点,严重威胁着人类的健康及生存质量,防治缺血性脑血管病一直是临床关注的重点,也是目前医学研究的热点。针灸作为中医学治疗手段,受到各国临床医学界的高度重视,其可明显改善脑缺血后神经功能损害症状,提高患者生活质量,现已广泛

应用于脑缺血后的治疗<sup>[8]</sup>。传统观念认为,中枢神经系统损伤后不能修复,但人们近年对神经干细胞的研究发现,在海马终身存在着内源性神经干细胞,脑损伤可刺激体内神经再生区的神经干细胞增殖、分化,进行自我修复。但大脑的自身修复能力有限,而电针可通过改善机体血氧代谢方面对脑缺血起治疗作用<sup>[9]</sup>,发挥延缓脑损伤的保护作用,使大脑神经的功能和形态损害减轻。本研究探讨脑缺血后电针“百会”、“足三里”穴对脑的保护作用并研究其中可能的作用机制。通过尼氏染色观察到模型组大鼠患侧海马 CA3 区神经元出现损伤,以此验证了模型的成功与稳定性,可以用于研究电针对 MCAO 模型大鼠海马 CA3 区 NGF 和 Gas7 表达的影响。通过为期 21 d 的电针干预治疗以后,电针组大鼠缺血区神经元萎缩状况明显好转,说明电针具有较好的良性调节作用,可在一定程度上减少脑缺血对神经元带来的损害。



A. 正常组;B. 假手术组;C. 模型组;D. 电针组。

图 3 Gas7 在大鼠右侧海马 CA3 区的表达

神经干细胞终身存在于哺乳动物脑内,脑缺血缺氧后神经细胞存在一定的自身保护机制,机体可上调一些内源性神经营养因子的表达,降低脑神经细胞损伤程度。NGF 是发现最早的一类神经营养因子,具有抗氧化、抗凋亡、抑制兴奋性氨基酸神经毒性等多种作用,可保护效应神经元,促使损伤神经再生。局灶性缺血损伤后 NGF 的表达会上调,参与神经元再生的调节。NGF 是具有神经营养和促突起生长双重生物学功能的一种神经细胞生长调节因子,可促进缺血后神经元的存活和生长发育并能够防止它们受损死亡,改善神经元的病理状态,促进受损神经元再生及分化成熟,在损伤修复中具有重要作用<sup>[10]</sup>。大量研究表明,NGF 对缺血缺氧导致的脑损伤具有保护作用,海马是大脑内合成 NGF 的重要场所<sup>[11]</sup>。本课题组前期对局灶性脑缺血大鼠的

研究发现 在海马的缺血侧出现了 Nestin 阳性神经元的增强表达 ,Nestin 是神经干细胞的特征性标志物 ,在海马区出现神经干细胞的增殖 ,说明具有一定的自身代偿性修复作用。本实验观察到模型组大鼠缺血侧海马 CA3 区 NGF 的表达与正常组相比出现明显增高 ,而 NGF 的高表达则可促进 Nestin 的表达 ,有利于缺血后海马产生的神经干细胞增殖和分化。说明 NGF 的表达增高可促进脑缺血后大鼠的自身代偿性修复 ,可以在一定程度上改善神经功能缺损状况。

Gas7 蛋白主要表达于脑组织 ,可调节神经细胞的生长分化 ,有报道显示 Gas7 的高表达对缺氧造成的神经元受损有保护作用 ,在慢性复合应激模型可诱导海马齿状回的神经干细胞向神经细胞分化等 ,从多方面参与了神经系统的损伤修复。神经系统对缺血缺氧异常敏感 ,尤其在大脑皮质 ,在缺血缺氧环境下会最先出现损伤<sup>[12]</sup> ,引起细胞受损甚至凋亡。海马是大脑皮质边缘系统的一部分 ,属易受缺血影响的区域。既往研究表明 Gas7 在海马的发生和发育过程中起重要作用<sup>[13]</sup> ,本研究通过免疫组化染色发现模型组海马 CA3 区的 Gas7 蛋白表达明显增高 ,说明缺血条件下可能激活了海马 CA3 区 Gas7 基因的转录 ,使 Gas7 在 CA3 区蛋白合成增多。Gas7 在模型组海马 CA3 区的表达 ,提示其可能对缺血缺氧的 CA3 区神经元具有保护作用 ,促进受损神经元的修复。

有临床研究显示 ,针刺对改善脑梗塞患者的致残率有较好疗效 ,我室曾研究表明电针可通过显著增加 MCAO 大鼠海马 CA3 区 Nestin 和 BDNF 的表达诱导神经干细胞的增殖 ,从而对缺血后海马具有保护作用<sup>[14]</sup>。本实验对 MCAO 大鼠电针治疗中选取“百会”和“足三里”两穴位 ,“百会”归属督脉 ,与中枢神经系统有密切联系 ;“足三里”穴与血管、神经等联系密切。电针此二穴位 ,既可增强脑皮层兴奋性 ,又可对远隔部位起到明显治疗作用。实验结果发现电针可上调 MCAO 模型大鼠 CA3 区 NGF 和 Gas7 的表达 ,结合既往电针对脑缺血后神经系统的保护及修复作用的相关资料 ,NGF 和 Gas7 的表达上调可以促进内源性神经干细胞的增殖和分化 ,促进神经功能的进一步修复。在本实验室前期的研究中发现电针可上调缺血侧丘脑 NGF 和 Gas7 的表达 ,提示电针在脑缺血后对神经系统的保护是通过多个部位神经元的调控发挥作用的 ,本结果可为临床上治疗脑缺血提供一定的实验依据 ,其分子机制

有待今后进一步的研究。

#### 【参考文献】

- [1] ARABIAN M ,ABOUTALEB N ,SOLEIMANI M *et al.* Activation of mitochondrial KATP channels mediates neuroprotection induced by chronic morphine preconditioning in hippocampal CA-1 neurons following cerebral ischemia[J]. *Adv Med Sci* 2017 63(2) :213 - 219.
- [2] KIM HA ,LEE KH ,LEE BH. Neuroprotective effect of melatonin against kainic acid-induced oxidative injury in hippocampal slice culture of rats[J]. *Int J Mol Sci* 2014 15(4) :5940 - 5951.
- [3] XU MS ,ZHANG SJ ,ZHAO D *et al.* Electroacupuncture-induced neuroprotection against cerebral ischemia in rats: role of the dopamine D2 receptor [J]. *Evid Based Complement Alternat Med* , 2013 2013(4) :137631.
- [4] FERREIRA RS ,DOS SANTOS NA ,MARTINS NM *et al.* Non-cytotoxic concentration of cisplatin decreases neuroplasticity-related proteins and neurite outgrowth without affecting the expression of NGF in PC12 cells [J]. *Neurochem Res* ,2016 41(11) :2993 - 3003.
- [5] HUNG FC ,SHIH HY ,CHENG YC *et al.* Growth-arrest-specific 7 gene regulates neural crest formation and craniofacial development in zebrafish [J]. *Stem Cells Dev* 2015 24(24) :2943 - 2951.
- [6] 丁见 ,吴锋 ,缪化春 ,等. 电针对脑缺血大鼠丘脑腹后外侧核神经生长因子和生长休止特定蛋白 7 表达的影响 [J]. *针刺研究* 2017 42(2) :125 - 130.
- [7] 诸葛启钊. 大鼠脑立体定位图谱 [M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社 2005:92 - 94.
- [8] 王涛. 缺血性脑卒中的外科防治策略 [J]. *血管与腔内血管外科杂志* 2016 2(4) :286 - 287.
- [9] 张超 ,樊小农 ,孟智宏 ,等. 同时间不同频率针刺内关穴对 MCAO 大鼠脑血流量及神经行为学的影响 [J]. *吉林中医药* , 2012 32(5) :487 - 489.
- [10] LIN R ,YU K ,LI X *et al.* Electroacupuncture ameliorates post-stroke learning and memory through minimizing ultrastructural braindamage and inhibiting the expression of MMP-2 and MMP-9 in cerebral ischemia-reperfusion injured rats [J]. *Mol Med Rep* , 2016 14(1) :225 - 233.
- [11] LIU X ,WANG D ,LIU Y *et al.* Neuronal driven angiogenesis: The role of NGF in retinal neovascularization in an oxygen-induced retinopathy model [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010 51(7) :3749 - 3757.
- [12] LIU R ,ZHANG S ,YANG H *et al.* Characterization and therapeutic evaluation of a Nestin + CNP + NG2 + cell population on mouse spinal cord injury [J]. *Exp Neurol* 2015 269(1) :28 - 42.
- [13] 侯良芹 ,熊克仁 ,赵健 ,等. Gas7 在大鼠海马和齿状回发育过程中的动态表达 [J]. *中国组织化学与细胞化学杂志* ,2011 20(6) :567 - 571.
- [14] 缪化春 ,吴锋 ,丁见 ,等. 电针联合天麻多糖对脑缺血大鼠海马 CA3 区 Nestin、BDNF 表达的影响 [J]. *中国组织化学与细胞化学杂志* 2014 23(1) :35 - 39.