论著

文章编号:1000-5404(2010)23-2488-04

PI3K/AKT通路在电针促进局灶脑缺血再灌注大鼠脑内血管再生中的作用

张珊珊,罗 勇,武 磊 (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院神经内科,重庆市神经病学重点实验室)

【摘要】 目的 观察电针对PI3K/AKT信号转导通路激活的影响,探讨电针促进脑内缺血区血管再生的可能机制。方法 采用线栓法制备SD大鼠局灶脑缺血再灌注模型。取双侧"合谷"穴(LI 4)为电针穴位,将80只SD大鼠完全随机分为正常组($n=10$)、模型组($n=30$)、电针组($n=30$)、电针+LY294002组($n=10$)。模型组和电针组分别包括再灌注1、3、7 d 3个时相点,每个时相点10只。采用免疫组化法检测各时间点大脑缺血半影区p-AKT1、AC133蛋白的表达;逆转录聚合酶链法检测AC133 mRNA的表达;免疫印迹法定量检测总AKT1、p-AKT1蛋白的表达。结果 与正常组比较,模型组和电针组大鼠脑缺血组织p-AKT1蛋白表达增加($P<0.05$),AKT1蛋白表达无明显差异($P>0.05$),AC133蛋白和mRNA表达增加($P<0.05$)。与模型组比较,电针组p-AKT1蛋白表达于再灌注3、7 d有明显增高($P<0.05$),再灌注3、7 d AC133蛋白和mRNA表达增加($P<0.05$)。在PI3K/AKT信号转导通路特异性阻断剂LY294002作用下,大鼠p-AKT1蛋白的表达较电针组显著减少($P<0.05$),AC133蛋白表达阴性,AC133 mRNA表达减少,与正常组比较无明显差异($P>0.05$)。结论 电针可能加强PI3K/AKT信号转导通路的激活,促进EPCs归巢至缺血组织区,从而促进血管再生。

【关键词】 电针;局灶脑缺血再灌注;PI3K/AKT;AC133;血管再生;"合谷"穴
【中图法分类号】 R743.31;R364.33;R394.2 【文献标志码】 A

Role of phosphoinositide 3-kinase/AKT signaling pathway in promoting angiogenesis in rats with focal cerebral ischemia/reperfusion using electrical acupuncture

Zhang Shanshan, Luo Yong, Wu Lei (Department of Neurology, Chongqing Key Laboratory of Neurology, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

【Abstract】 Objective To study the role of electrical acupuncture (EA) in activating the PI3K/AKT signaling pathway and its mechanism underlying the angiogenesis in rats with focal cerebral ischemia/reperfusion. Methods A focal cerebral ischemia/reperfusion model was established by filament occlusion. Heku point (LI 4) was selected for electrical acupuncture. Eighty SD rats were randomly divided into control group ($n=10$), model group ($n=30$), EA group ($n=30$), and EA + LY294002 group ($n=10$). Rats in model and EA groups accepted reperfusion on days 1, 3 and 7. Expression of p-AKT1 and AC133 was detected by immunohistochemistry (IHC). Expression of AC133 mRNA was detected by PCR. Expression of p-AKT1 and AKT1 was detected by Western blotting. Results The expression level of p-AKT1, AC133 and AC133 mRNA was higher in model and EA groups than in control group ($P<0.05$) with no significant difference in expression of AKT1 between the 2 groups. The expression level of p-AKT1, AC133 and AC133 mRNA was significantly higher in EA group than in control group in 3 and 7 d after reperfusion ($P<0.05$). The expression level of p-AKT1, AC133 and AC133 mRNA was significantly lower in EA + LY294002 group than in EA group ($P<0.05$), with no difference between EA + LY294002 group and control group. Conclusion EA can activate the PI3K/AKT signaling pathway, promote EPC homing to the ischemic zone, and thus lead to angiogenesis.

【Key words】 electrical acupuncture; focal cerebral ischemia/reperfusion; PI3K/AKT; AC133; angiogenesis; Heku point

Supported by the Special Fund for Scientific Research of Doctorial Subjects in Colleges and Universities of Ministry of Education (20095503110003) and the Program of the Traditional Chinese Medicine Research of Chongqing Municipal Health Bureau (2005-B-24). Corresponding author: Luo Yong, E-mail: Luoyong1998@163.com

脑缺血后,缺血组织区的修复需新生血管提供营养物质,维持其正常的组织代谢。近年研究发现,内皮前体祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)与脑缺血后的血管再生密切相关[1,2]。在脑缺血后血管再生机制研究中,对于电针促进脑缺血后EPCs动员、迁移归巢形成新生血管的机制研究较少。本研究通过制作大鼠局灶脑缺血再灌注模型,采用穴位电针作为治疗

【基金项目】 教育部"高等学校博士学科点专项科研基金"(20095503110003);重庆市卫生局中医药科研项目(2005-B-24)
【通信作者】 罗 勇,E-mail:Luoyong1998@163.com

手段,观察电针作用下 AC133 标记的 EPCs 表达的时空变化规律;观察电针是否增强了影响 EPCs 增殖、迁移、归巢的 PI3K/AKT 信号转导通路的激活,观察在 PI3K/AKT 信号转导通路特异性阻断剂 LY294002 作用下电针对 PI3K/AKT 信号转导通路激活作用是否减弱。初步明确电针刺激促进 EPCs 归巢形成新生血管,减轻脑缺血再灌注损伤的机制,为电针治疗脑缺血提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

清洁级成年 SD 大鼠 80 只,雄性,体质量 250 ~ 300 g,由重庆医科大学实验动物中心提供,动物使用许可证号:SYXK(渝)2007-0001。大鼠完全随机分为正常组(n = 10)、模型组(n = 30)、电针组(n = 30)、电针 + LY294002 组(n = 10)。以局灶脑缺血 2 h 再灌注后为观察的时间点,模型组和电针组分为 1、3、7 d 3 个时间点。

1.2 主要试剂和仪器

p-AKT1、AKT1 抗体均购自美国 cell signalling 公司,AC133 抗体、生物素化羊抗兔 IgG 二抗购自北京博奥森生物有限公司,S-P 二抗试剂盒、DAB 显色试剂盒购自北京中杉公司,LY294002 购自美国 Sigma 公司,PCR 试剂盒购自 TaKaRa 宝生物公司,Western 相关试剂购自上海碧云天公司,MZY-1A 型电针治疗仪购自北京精工仪器厂。

1.3 动物模型制备

采用改良的 Longa 等[3] 线栓大脑中动脉法,并结合罗勇等[4] 介绍的经验制备 SD 大鼠局灶脑缺血再灌注模型。用 3.5% 水合氯醛(1 ml/100 g)腹腔麻醉后仰卧固定、消毒、切口,暴露大鼠右侧颈总动脉,分离颈外、颈内动脉颅外段,将颈外动脉结扎烧灼断离后剪一小口,将事先做好的线栓(聚氨酯预先处理的尼龙钓丝,直径 0.25 ~ 0.27 mm)插入颈外动脉,经颈总动脉分叉进入颈内动脉 18 ~ 20 mm,遇阻力即表明线栓头端已进入大脑中动脉起始处,结扎颈外动脉。清理手术野,缝合皮肤。缺血 2 h 后拔出线栓,实现再灌注。待大鼠完全清醒后,采用 Zea-Longa 5 分法进行神经功能的评分,0 分为无神经功能缺失症状;1 分为提尾倒悬时,左前肢不能完全伸直;2 分为行走时原地向左侧转圈;3 分为行走时向左侧倾倒;4 分为不能自发的行走,意识丧失。评分为 2 ~ 3 分者视为造模成功,入选实验。

1.4 电针刺激方法

根据实验动物穴位图谱及华兴邦等[5] 介绍的大鼠穴位图谱,选择双侧“合谷”穴(LI 4)为进针穴位。进针深度 0.4 ~ 0.6 cm,针间距 0.4 cm,每次 15 min,每日治疗 1 次,最长 7 d。首次刺激于再灌注 1 h 时进行,刺激参数:疏密波 F1 = 40 Hz,F2 = 60 Hz,刺激强度以大鼠肢体轻微震颤为度,空载输出电压为 1.5 V[6]。

1.5 侧脑室给药

大鼠用 3.5% 水合氯醛腹腔麻醉后,鼠头固定于脑立体定位仪上保持前后囟在同一水平位上,头顶部去毛、消毒后,做一正中切口,暴露前囟,根据大鼠的立体定位图谱进行定位,于前囟点后 2.0 cm,中线旁开 1.2 cm 处钻一小孔,将装有 LY294002 的微量注射器固定于脑立体定位仪上,垂直插入小孔深度为 5.5 mm(达侧脑室),LY294002 溶于二甲亚砜(DMSO)中,终浓度为 25 mmol/L,给药体积 5 μl,于缺血 2 h 后,电针刺激前 1 h 进行侧脑室给药。

1.6 免疫组织化学检测

大鼠麻醉后,开胸暴露心脏,经升主动脉插管,用 PBS 快速灌洗,再用 4% 多聚甲醛灌流固定,断头取脑,取视交叉前后 2 mm 的脑组织,常规包埋切片,脱蜡,3% H_2O_2 室温孵育 5 ~ 10 min,抗原修复 30 min,血清封闭 30 min,加一抗(p-AKT1 抗体稀释浓度为 1∶200,AC133 为 1∶100),同时滴加 PBS 代替一抗作阴性对照,过夜,复温 1 h,PBS 液冲洗后加二抗,37 ℃烤箱孵育 30 min,加辣根酶标记链霉卵白素工作液,37 ℃烤箱孵育30 min,PBS 液冲洗,DAB 显色,自来水充分冲洗,苏木精复染,脱水,透明,封片。

1.7 RT-PCR 检测

据 PubMed 上 GenBank:AF386758.1 提供序列,扩增大鼠 AC133 上游引物 5′-AGTTCTTATCTGCGTCATCCTG-3′,下游引物 5′-GAATGCCTTGTTCTTGGTTGTG-3′,产物大小为 358 bp。扩增大鼠 β-actin 上游引物 5′-CACCCGCGAGTACAACCTTC-3′,下游引物 5′-CCCATACCCACCATCACACC-3′,产物大小 207 bp。准确称取 100 mg 缺血区大脑皮质,每 100 mg 新鲜脑组织中加入 1 ml 的 Trizol 试剂提取总 RNA;用琼脂糖凝胶电泳法检测 RNA 的完整性。取 1 μl 总 RNA 逆转录为 20 μl cDNA。分别按退火温度 57 ℃、60.4 ℃,30 个循环进行 AC133、内参的 PCR 反应;配胶、上样、电泳、照相。

1.8 Western blot 检测

准确称取 100 mg 缺血区大脑皮质提取全蛋白。BCA 蛋白定量法测蛋白浓度。据所测浓度将剩下的蛋白用 4 × loading buffer 稀释成相同浓度,封闭后 100 ℃水浴 10 min,-80 ℃保存。按照每个样本蛋白总量 20 μg 上样进行 SDS-PAGE 凝胶电泳(分离胶 10%,浓缩胶 12%),恒压(浓缩胶 80 V,分离胶 100 V);转模至 PVDF 模上;5% 脱脂奶粉封闭 30 min;孵一抗(抗体稀释浓度为 1∶500),4 ℃过夜,37 ℃复温 30 min;TBST 漂洗后,孵二抗(羊抗小鼠,抗体稀释浓度为 1∶2 500);TBST 洗后,膜与 ECL 孵育,经 X 胶片曝光显像,凝胶成像系统照相,采用灰度值进行分析。

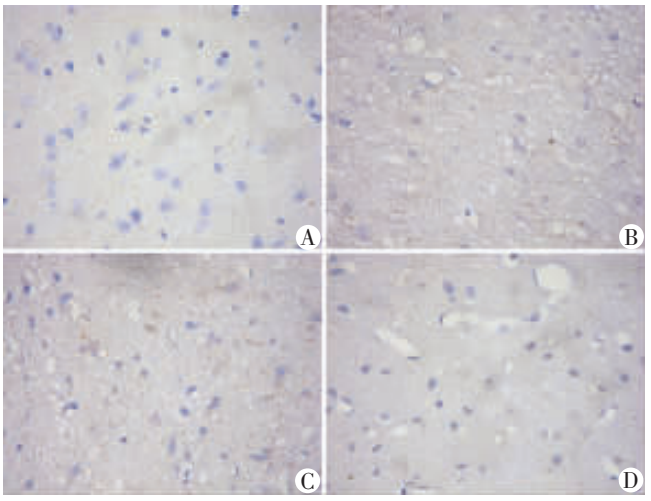
1.9 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 13.0 统计软件处理,方差齐性资料采用单因素方差分析,方差非齐性资料采用秩和检验。

2 结果

2.1 电针对 AC133 蛋白和 mRNA 表达的影响

免疫组化结果示:正常组 AC133 蛋白表达阴性。模型组于再灌注 3 d 在脑缺血半影区发现少量 AC133 蛋白表达,其余各时间点均为阴性。电针组再灌注 3、7 d 发现 AC133 蛋白表达增多,与同时相模型组比较有统计学意义(P < 0.05)。在 PI3K/AKT 信号转导通路阻断剂 LY294002 作用下,AC133 蛋白表达为阴性。见图 1、表 1。



A:正常组;B:模型组再灌注3 d;C:电针组再灌注3 d;D:电针+LY294002组

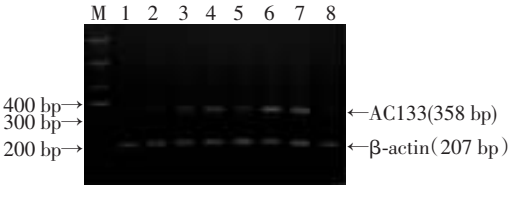
图1 免疫组织化学检测各组AC133蛋白在脑缺血半影区的表达变化 (S-P ×400)

表1 各组AC133蛋白、AC133 mRNA和p-AKT蛋白表达水平($n=5, \bar{x}\pm s$)

组别		AC133蛋白	AC133 mRNA	p-AKT蛋白
正常组		–	0.838 0±0.170 3	0.171 8±0.031 6
模型组	1 d	–	0.841 7±0.168 6	0.727 1±0.054 2^{b}
	3 d	2.733 3±0.593 6	1.014 2±0.232 6^{ae}	0.455 0±0.043 2^{bf}
	7 d	–	1.418 0±0.206 5^{b}	0.205 8±0.051 6^{a}
电针组	1 d	–	0.858 4±0.292 4	0.723 6±0.033 0^{b}
	3 d	4.466 7±0.915 5^{b}	1.698 7±0.292 1^{bdf}	0.932 1±0.058 5^{bdf}
	7 d	6.866 6±1.087 3^{b}	1.638 7±0.334 8^{be}	0.413 3±0.037 2^{bd}
电针+LY294002组		–	0.825 9±0.196 2	0.188 5±0.030 7

a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与正常组比较;c:$P<0.05$,d:$P<0.01$,与模型组对应时相点比较;e:$P<0.05$,f:$P<0.01$,与电针+LY294002组比较

RT-PCR结果示:正常脑组织中有少量AC133 mRNA表达,再灌注1、3、7 d,模型组AC133 mRNA表达呈单峰,于再灌注第7天达峰值。电针组AC133 mRNA表达于再灌注3、7 d高于模型组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。而在阻断剂LY294002作用下,AC133 mRNA表达明显低于电针组($P<0.05$),与正常组比较无明显差异($P>0.05$)。见图2和表1。

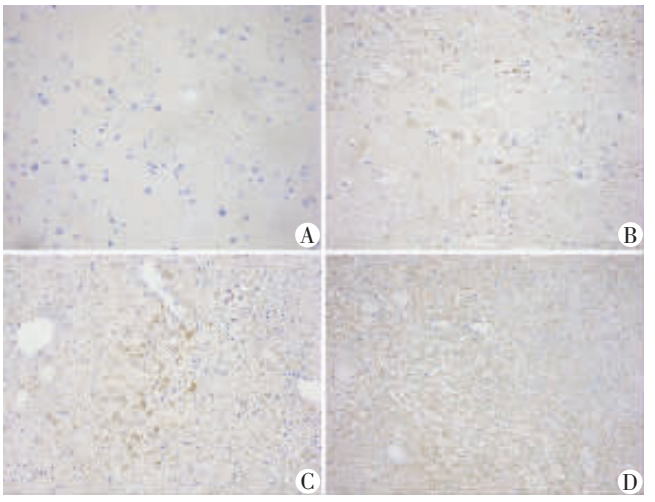


M:标准;1:正常组;2:模型组再灌注1 d;3:模型组再灌注3 d;4:模型组再灌注7 d;5:电针组再灌注1 d;6:电针组再灌注3 d;7:电针组再灌注7 d;8:电针+LY294002组

图2 RT-PCR检测各组大脑皮质AC133 mRNA的表达

2.2 电针对PI3K/AKT信号转导通路的影响

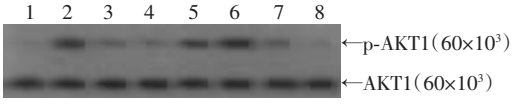
免疫组化示正常组、电针+LY294002组p-AKT1表达为阴性,模型组、电针组p-AKT1主要表达于大鼠大脑缺血半影区神经元,胶质细胞的细胞膜、细胞质内。与模型组相比较,电针组在缺血半影区可见大量棕黄色细胞,且着色明显加深(图3)。



A:正常组;B:模型组再灌注3 d;C:电针组再灌注3 d;D:电针+LY294002组

图3 免疫组织化学检测各组p-AKT1蛋白在脑缺血半影区的表达变化 (S-P ×200)

免疫印迹检测结果示:p-AKT1蛋白为一60×10^{3}的条带,与实际相对分子质量大小符合。正常脑组织中,脑内有少量p-AKT1表达,与正常组比较,模型组p-AKT1的表达增加,于再灌注1 d时达高峰($P<0.01$),3 d时开始下降($P<0.01$),7 d时仍高于正常($P<0.05$)。电针组在再灌注后3、7 d时p-AKT1的表达明显增加,于再灌注3 d时表达达高峰,7 d时表达开始下降,与同时相的模型组比较具统计学意义($P<0.01$)。在LY294002作用下,再灌注3 d时,大鼠p-AKT1蛋白表达较电针组显著减少($P<0.01$),与正常组比无显著差异($P>0.05$)。而AKT1蛋白表达各组间比较无明显差异($P>0.05$)。见图4及表1。



1:正常组;2:模型组再灌注1 d;3:模型组再灌注3 d;4:模型组再灌注7 d;5:电针组再灌注1 d;6:电针组再灌注3 d;7:电针组再灌注7 d;8:电针+LY294002组

图4 Western blot检测各组p-AKT1、AKT1蛋白的表达

3 讨论

缺血性脑血管病在老年人群中是一种多发病,是临床和基础研究的重点。近年来,"神经血管单元"概念的提出,强调以血管、神经修复和再生为切入点,血管的重建将有利于神经的发生。因此通过干预促进脑缺血半影区的血管形成将有利于神经功能的恢复和保持。研究发现,脑缺血后,部分新生血管可来源于血管发生[7]。血管发生是指血管内皮细胞来源于血管内皮干/祖细胞。在生理情况下,EPCs主要存在于骨髓中,外周血中EPCs的数量相当有限,而在组织发生缺血性损伤及修复过程中,可在一些因子的作用下(如SDF-1、VEGF),通过相关的信号转导通路所发生的一

系列级联反应，促进其向外周血的动员并归巢[8,9]。PI3K/AKT是具有代表性的与EPCs增殖、迁移、归巢相关的信号转导通路。PI3K被激活后，可诱导无活性的AKT和磷脂酰肌醇依赖的激酶-1(PDK-1)转位至浆膜的内表面，实现AKT的活化。AKT可以使其下游信号分子eNOS的丝氨酸磷酸化，增加NO的生成，介导血管内皮祖细胞的迁移[10]。药物LY294002可以通透细胞，特异性抑制PI3K，影响其下游通路的激活，包括AKT的磷酸化，从而特异性的阻断PI3K/AKT信号转导通路。

我们既往研究发现，电针可上调血管内皮生长因子(VEGF)、血管生成素(Ang-1)等血管生成因子、下调内皮抑素(Endostatin)等血管抑制因子，有利于血管的形成；电针可上调基质细胞衍生因子-1α(SDF-1α)，SDF-1α与CXCR4结合可激活下游信号转导通路，促进骨髓EPCs释放入血并归巢到脑缺血区，从而促进血管再生[11,12]。近来有研究发现，电针可加速EPCs在骨髓中的动员和EPCs的迁移入血[13]。但电针对于脑内EPCs的作用以及促进EPCs向脑内归巢的机制研究报道甚少，本实验从这一问题出发进行探讨。

AC133是干细胞表面标志物，它选择性表达于成人的骨髓、胎肝、脐带血和外周血等造血组织的干细胞和循环EPCs，而不表达于成熟的血管内皮细胞[14]。本实验发现AC133蛋白主要表达在脑组织的缺血半影区微血管及其周围的细胞。我们推测在脑组织中发现的这些AC133阳性细胞(AC133$^+$细胞)可能来源于循环EPCs，这与胡湘蜀等[15]的研究结果相符合。AC133$^+$细胞在模型组再灌注3 d有少量表达，电针组再灌注3、7 d表达增多。RT-PCR检测发现模型组再灌注3 d，电针组再灌注3、7 d AC133 mRNA的表达明显高于正常组，与免疫组化结果相符，但是在其他的时间点上未发现相似的结果。我们推测：一种可能是EPCs在分化为成熟内皮细胞的过程中，表面标志物AC133会逐渐地消失，导致了其蛋白与mRNA检测结果的不一致性，但EPCs具体是在何时何处分化，目前尚不清楚；另一种可能是AC133 mRNA转录、翻译成蛋白的过程中还受到其他因素的影响。但本实验发现，电针组AC133$^+$细胞和AC133 mRNA的表达都明显高于模型组，故我们推测电针可能通过某种途径加强了EPCs的骨髓动员并向脑内缺血组织区归巢使其表达增多。

我们认为，脑缺血后，可通过加强内源性的EPCs动员、迁移、归巢至脑缺血区促进血管再生。本研究发现，模型组于再灌注3 d时发现AC133$^+$细胞，正常组未见表达，p-AKT1在再灌注1、3 d时表达增加，高于正常组，故我们推测，缺血半影区的神经元细胞膜、细胞质内的AKT1磷酸化增多，激活PI3K/AKT通路，可促进EPCs归巢。在电针刺激作用下，AC133$^+$细胞于再灌注3、7 d表达增多，高于模型组，p-AKT1于再灌注3、7 d表达增多，与模型组比较具有统计学意义($P<0.05$)。在LY294002的作用下，电针的作用被减弱，AC133$^+$细胞、p-AKT1的表达较电针组明显减少。因此，我们初步推测，电针可提高p-AKT1表达水平，加强PI3K/AKT通路激活，促进EPCs归巢至缺血组织区，从而促进血管再生。

参考文献：

[1] Chu K, Jung K H, Lee S T, *et al*. Circulating endothelial progenitor cells as a new marker of endothelial dysfunction or repair in acute stroke [J]. Stroke, 2008, 39(5): 1441-1447.
[2] Yip H K, Chang L T, Chang W N, *et al*. Level and value of circulating endothelial progenitor cells in patients after acute ischemic stroke [J]. Stroke, 2008, 39(1): 69-74.
[3] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, *et al*. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91.
[4] 罗勇，董为伟. Wistar大鼠插线法局灶性脑缺血/再灌注模型的实验研究[J]. 重庆医科大学学报，2002，27(1)：1-4.
[5] 华兴邦，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，1991，3(1)：1-5.
[6] 罗勇，黄仲荪，徐晨. 针刺对缺血性脑梗塞大鼠皮层神经元线粒体影响的形态计量研究[J]. 上海针灸杂志，1996，15(6)：28-30.
[7] Zhang Z G, Zhang L, Jiang Q, *et al*. Bone marrow-derived endothelial progenitor cells participate in cerebral neovascularization after focal ischemia in the adult mouse [J]. Circ Res, 2002, 90(3): 284-288.
[8] Eguchi M, Masuda H, Asahara T. Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis [J]. Clin Exp Nephrol, 2007, 11(1): 18-25.
[9] 尹扬光，黄岚，赵晓辉，等. SDF-1对内皮祖细胞增殖迁移的影响及AMD3100对其的干预[J]. 第三军医大学学报，2007，6(29)：475-478.
[10] Zheng H, Fu G, Dai T, *et al*. Migration of endothelial progenitor cells mediated by stromal cell-derived factor-1 alpha/CXCR4 *via* PI3K/AKT/eNOS signal transduction pathway [J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2007, 50(3): 274-280.
[11] 马璟曦，罗勇. 电针对大鼠局灶脑缺血再灌注后脑内血管生长因子和血管抑制因子表达的影响[J]. 中国针灸，2007，27(2)：129-133.
[12] 赵旺，罗勇. 电针对局灶脑缺血再灌注大鼠大脑皮质基质细胞衍生因子-1α表达的影响及其促进脑内血管再生的作用[J]. 中华物理医学与康复杂志，2010，32(6)：409-413.
[13] 蔡绍晢，于文娟，张莉，等. 电针对脑缺血再灌注大鼠外周血内源性内皮祖细胞的作用[J]. 针刺研究，2009，34(2)：114-119.
[14] 王燕宁，徐建民. 造血干细胞表面标志物AC133的研究进展[J]. 中国新药与临床杂志，2007，26(9)：708-714.
[15] 胡湘蜀，周东，罗祖明. 大鼠局灶脑缺血后内皮前体细胞的相关实验研究[J]. 四川医学，2009，30(3)：323-325.

(收稿 2010-07-11 修回 2010-09-12)
(编辑 邓强庭)