

doi:10.3969/j.issn.1005-3697.2024.02.001

❖ 基础研究 ❖

电针预处理抑制脑缺血后神经胶质细胞缝隙连接通讯功能及其作用机制

邢学良^{1,2}, 曲阳^{1,2}, 辛贵乐^{1,2}, 周海纯^{1,3}

(1. 黑龙江中医药大学; 2. 黑龙江中医药大学附属第二医院; 3. 黑龙江中医药大学附属第四医院, 黑龙江 哈尔滨 150001)

【摘要】目的: 探讨电针预处理对脑缺血后神经胶质细胞缝隙连接通讯功能的影响及其作用机制。**方法:** 将 96 只雄性大鼠随机分为 4 组, 即假手术组(A 组)、大脑中动脉闭塞模型(MCAO)组(B 组)、电针预处理 + MCAO 组(C 组)及缝隙连接抑制剂甘珀酸(CBX) + MCAO 组(D 组), 每组各 24 只。A 组大鼠不接受 MCAO 模型构建; B 组大鼠仅接受 MCAO 模型构建; C 组大鼠于电针治疗 3 周后, 接受 MCAO 模型构建; D 组大鼠于术前 2 h 预先侧脑室注射 10 μ L CBX (5 μ g/ μ L), 接受 MCAO 模型构建。分别于再灌注 12 h、再灌注 3 d 进行取材, 每次每组取 12 只大鼠。采用免疫荧光双标法观察星形胶质细胞上 Cx43 表达情况, 采用 Western blot 法检测缺血半暗区神经胶质细胞缝隙连接通讯相关蛋白(Cx43、p-Cx43-S368、p-Cx43-S262、GFAP、PKC、Neun、eNOS、AT1R)表达情况。**结果:** Cx43 主要表达于星形胶质细胞膜表面及突起部位。再灌注 12 h, B 组、C 组、D 组 Cx43、GFAP 荧光强度均高于 A 组($P < 0.05$)。再灌注 3 d, B 组、C 组、D 组 Cx43、GFAP 荧光强度均高于 A 组($P < 0.05$); C 组、D 组 Cx43、GFAP 荧光强度均低于 B 组($P < 0.05$)。再灌注 12 h, B 组、C 组、D 组 Cx43、p-Cx43-S368、p-Cx43-S262、GFAP、PKC、AT1R 均高于 A 组($P < 0.05$), NeuN、eNOS 均低于 A 组($P < 0.05$)。再灌注 3 d, B 组、C 组、D 组 Cx43、p-Cx43-S368、p-Cx43-S262、GFAP、PKC、AT1R 均高于 A 组($P < 0.05$), NeuN、eNOS 均低于 A 组($P < 0.05$); C 组、D 组 Cx43、p-Cx43-S368、p-Cx43-S262、GFAP、PKC、AT1R 均低于 B 组($P < 0.05$), NeuN、eNOS 均高于 B 组($P < 0.05$)。**结论:** 电针预处理可能通过调节神经胶质细胞缝隙连接通讯相关蛋白的表达, 促进脑缺血后神经血管重构, 发挥脑保护作用。

【关键词】 电针; 脑缺血; 神经胶质细胞; 缝隙连接; Cx43

【中图分类号】 R743 **【文献标志码】** A

Analysis of electroacupuncture pretreatment inhibiting gap junction communication function of glial cells after cerebral ischemia and its mechanism of action

XING Xue-liang^{1,2}, QU Yang^{1,2}, XIN Gui-le^{1,2}, ZHOU Hai-chun^{1,3}

(1. Heilongjiang University of Chinese Medicine; 2. The Second Affiliated Hospital of Heilongjiang University of Chinese Medicine; 3. The Fourth Affiliated Hospital of Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150001, Heilongjiang, China)

【Abstract】Objective: To investigate the effect of electroacupuncture pretreatment on the gap junction communication function of glial cells after cerebral ischemia and analyze its mechanism of action. **Methods:** 96 male rats were randomly divided into four groups, namely sham surgery group (group A), middle cerebral artery occlusion model (MCAO) group (group B), electroacupuncture pretreatment + MCAO group (group C), and gap junction inhibitor carbenoxolone (CBX) + MCAO group (group D), with 24 rats in each group. Rats in the group A underwent various surgical procedures similar to those in the treatment group, but did not undergo MCAO model construction, group B rats only received MCAO model construction, rats in the group C received MCAO model construction after 3 weeks of electroacupuncture treatment, group D rats were pre injected into the lateral ventricle 2 hours before surgery 10 μ L CBX (5 μ g/ μ L), then accepted MCAO model construction. Samples were taken at 12 h and 3 d of reperfusion, with 12 rats taken from each group. Immunofluorescence double labeling method was used to observe the expression of Cx43 on astrocytes, and Western blot method was used to detect the expression of gap junction communication related proteins (Cx43, p-Cx43-S368, p-Cx43-S262, GFAP, PKC, Neun, eNOS, AT1R) in glial cells of ischemic penumbra. **Results:** Cx43 was mainly expressed on the surface and protrusions of astrocyte membranes. After 12 hours of reperfusion, the fluorescence intensity of Cx43 and GFAP in groups B, C, and D was higher than that in group A ($P < 0.05$). After 3 days of reperfusion, the fluorescence intensity of Cx43 and GFAP in groups B, C, and D was higher than

基金项目: 黑龙江省中医药管理局科研项目 (ZHY2022-185); 黑龙江省自然科学基金项目 (LH2021H089)

作者简介: 邢学良 (1983 -), 男, 硕士, 主治医师。E-mail: xingyi918@126.com

通讯作者: 周海纯, 博士。E-mail: 732727021@QQ.com

that in group A ($P < 0.05$), the fluorescence intensity of Cx43 and GFAP in group C and group D was lower than that in group B ($P < 0.05$). After 12 hours of reperfusion, the levels of Cx43, p-Cx43-S368, p-Cx43-S262, GFAP, PKC, and AT1R in groups B, C, and D were higher than those in group A ($P < 0.05$), while NeuN and eNOS were lower than those in group A ($P < 0.05$). After 3 days of reperfusion, the levels of Cx43, p-Cx43-S368, p-Cx43-S262, GFAP, PKC, and AT1R in groups B, C, and D were higher than those in group A ($P < 0.05$), while NeuN and eNOS were lower than those in group A ($P < 0.05$). The levels of Cx43, p-Cx43-S368, p-Cx43-S262, GFAP, PKC, and AT1R in groups C and D were lower than those in group B ($P < 0.05$), while NeuN and eNOS were higher than those in group B ($P < 0.05$). **Conclusion:** Electroacupuncture pretreatment may regulate the expression of gap junction communication related proteins in glial cells, promote neurovascular remodeling after cerebral ischemia, and exert a neuroprotective effect.

[Key words] Electroacupuncture; Cerebral ischemia; Neuroglial cells; Gap connection; Cx43

脑缺血指由于脑血管病变或其他原因导致脑部血流量减少,使脑组织缺乏足够的氧和营养,引起功能障碍或损伤的一种病理状态^[1]。神经胶质细胞之间通过缝隙连接形成功能网络,实现物质和信息的交换^[2]。缝隙连接是一种由两个半通道组成的细胞间连接结构,在正常情况下,缝隙连接对维持细胞内稳态和组织功能有重要作用^[3]。然而,在一些病理情况下,如缺血、创伤、感染等,缝隙连接可能发生异常改变,引起细胞内外离子与小分子平衡失调,从而加重细胞损伤或死亡^[4]。研究^[5]发现,缝隙连接通讯在脑缺血后星形胶质细胞的活化及血管反应中发挥重要作用。因此,调控缝隙连接通讯功能是防治脑缺血的有效策略。

研究^[6]表明,药物、高压氧、亚低温等预处理方式都能诱导脑缺血耐受现象,但上述预处理措施仍存在一定局限性^[7]。电针是一种利用微弱的电流刺激针刺腧穴以防治疾病的中医疗法,临床可操作性强,应用前景广阔。前期预实验发现,电针预处理可诱导脑缺血耐受,降低脑缺血区皮层细胞凋亡及炎症反应。本研究旨在探讨电针预处理对大鼠局灶性脑缺血后神经胶质细胞缝隙连接通讯功能的影响及其作用机制,以期探寻脑缺血防治的新靶点,为电针作为脑缺血的防治措施提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

选取 96 只成年雄性大鼠,体重 220 ~ 250 g,饲养于标准 SPF 级鼠房的鼠笼内,温度 22 ~ 24 ℃,湿度 50%,每 6 只大鼠饲养于一个鼠笼中;适应性喂养 1 周,在此期间大鼠可以自由进食和饮水,每日 12 h 明暗交替光照。本实验方案已获黑龙江中医药大学实验动物伦理委员会批准 (ZHY-L-2022015)。

1.2 试剂与仪器

1.2.1 主要仪器 MSZ25 荧光显微镜 (日本尼康)、CRYOCUT-1800 冰冻切片机 (德国徕卡)、JW-3021HR 高速冷冻离心机 (安徽嘉文)、TXDRB 恒温加热板 (湖北天鑫)、Western blots 蛋白电泳仪 (美国/伯乐)、VE-186 转膜仪 (上海天能)、SDZ-III 电针

仪 (苏州华佗)。

1.2.2 主要试剂 生理盐水、氯胺酮 (人福医药集团股份有限公司)、PVDF 膜 (美国西格玛奥德里奇公司)、Trizol、RIPA 裂解液及 BCA 测定试剂盒 (美国赛默飞世尔科技公司)、Western blot 检测试剂盒 (美国/伯乐)、缝隙连接通讯阻滞抑制剂 CBX (四川省维克奇生物科技有限公司)。山羊抗兔二抗 (货号 ab6721, Abcam, 英国)。见表 1。

表 1 特异性一抗及内参的种类、浓度、货号、厂家

一抗种类	浓度	货号	厂家
Cx43	1:1 000	ab217676	Abcam, 英国
p-Cx43-S368	1:1 000	ab30559	Abcam, 英国
p-Cx43-S262	1:1 000	sc-24541	Santa Cruz, 美国
GFAP	1:10 000	ab7260	Abcam, 英国
PKC	1:5 000	ab32376	Abcam, 英国
Neun	1:5 000	ab177487	Abcam, 英国
eNOS	1:1 000	ab252439	Abcam, 英国
AT1R	1:5 000	ab124734	Abcam, 英国
β-actin	1 μg/mL	ab8226	Abcam, 英国

1.3 方法

1.3.1 大鼠分组及 MCAO 模型构建 (1) 实验大鼠分组:假手术组 (A 组)、大脑中动脉闭塞模型 (MCAO) 组 (B 组)、电针预处理 + MCAO 组 (C 组)、缝隙连接抑制剂甘珀酸 (CBX) + MCAO 组 (D 组), 每组各 24 只。A 组大鼠不进行 MCAO 模型构建。B 组大鼠仅接受 MCAO 模型构建;C 组大鼠于电针治疗 3 周后,接受 MCAO 模型构建;D 组大鼠于术前 2 h 向大鼠侧脑室注射 10 μL 浓度为 5 μg/μL 的 CBX,接受 MCAO 模型构建。(2) 电针预处理方法:选取大鼠百会穴,45 °进针,深度 2 mm,连接电针治疗仪,正极接百会穴,负极夹在大鼠耳朵上,选取疏密波,频率、刺激强度分别设置 2/15 Hz、1 mA,刺激 30 min,每周治疗 5 d,1 次/d。(3) CBX 注射方法:将大鼠在鼠脑立体定位仪上固定,将其切开头皮,暴露项骨找到 Bregma 点,保持原点和 Bregma 点对齐,缓慢移动定位仪,向后 0.8 mm 旁开 1.4 mm 处钻孔,直至钻破颅骨,固定微量注射器,自项骨起,进针深度 3.8 mm,进针正确指回抽可见清亮液体。将 CBX 缓慢注射后,停留约 15 min,将枕头缓慢拔出后对头

皮进行缝合。(4)MCAO 大鼠模型构建方法:对大鼠进行术前 12 h 禁食处理,采用水合氯醛进行全身麻醉,同时保持其体温 (37.0 ± 0.5) $^{\circ}\text{C}$;在消毒颈部正中进行切口,露出颈总动脉、颈外动脉及颈内动脉,将颈总动脉和颈外动脉进行结扎,于颈总动脉分叉下方做一小切口,向颈内动脉内插入 3.0 尼龙单丝线(一头末端烤成圆头),深度 17 ~ 18 mm;采用激光多普勒流量计,观测并确认大鼠的脑血流阻断情况。模型构建成功的标志是中脑动脉脑血流下降至基线值的 30% 以下;对颈内动脉进行结扎,并等待 120 min 以形成脑缺血,然后移除尼龙线以使血流恢复。

1.3.2 取材 分别于再灌注 12 h、再灌注 3 d 进行取材,每次每组取 12 只大鼠。快速断头取脑,分离右侧大脑皮层,置于冰箱 - 80 $^{\circ}\text{C}$ 冻存备用。

1.3.3 免疫荧光双标法观察星形胶质细胞上 Cx43 表达情况 采用冰冻切片机将大鼠脑组织制成 10 μm 的连续切片,贴附于玻片上(已采用多聚赖氨酸包被过)。放置 3 min 晾干,保存于 - 80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱待测。采用 SP 法双重染色,进行 Cx43、GFAP 双标,观察 Cx43 在星形胶质细胞上的表达量及表达位置的变化。具体方法参照试剂盒说明。采用 500 mL/L 的甘油封片,于荧光显微镜下观察并拍摄照片。设置阴性对照,采用山羊血清稀释液替代一抗,二抗与实验组相同。

1.3.4 Western blot 检测缺血半暗区神经胶质细胞缝隙连接通讯相关蛋白表达情况 根据试剂盒说明书进行蛋白提取和浓度测定。使用预冷蛋白提取液对样本进行稀释后,保存在 - 80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中。从每个样本中取等量蛋白,进行 SDS-PAGE 以将蛋白分离后,将蛋白转膜,加入一抗、二抗进行免疫反应,DAB

染色反应,将完成染色并干燥的膜拍照,并分析结果。

1.4 统计学分析

本研究数据采用 SPSS 23.0 统计软件进行处理。计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异存在统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠星形胶质细胞上 Cx43 表达情况

Cx43 主要在星形胶质细胞膜表面与突起部位表达。再灌注 12 h,B 组、C 组、D 组 Cx43、GFAP 荧光强度均高于 A 组 ($P < 0.05$);B 组、C 组、D 组各组间比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。再灌注 3 d,B 组、C 组、D 组 Cx43、GFAP 荧光强度均高于 A 组 ($P < 0.05$);C 组、D 组 Cx43、GFAP 荧光强度均低于 B 组 ($P < 0.05$);C 组与 D 组比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 1 及图 2。

2.2 各组大鼠缺血半暗区神经胶质细胞缝隙连接通讯相关蛋白表达情况

再灌注 12 h,B 组、C 组、D 组 Cx43、p-Cx43-S368、p-Cx43-S262、GFAP、PKC、AT1R 均高于 A 组 ($P < 0.05$),NeuN、eNOS 均低于 A 组 ($P < 0.05$);B 组、C 组、D 组各组间比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。再灌注 3 d,B 组、C 组、D 组 Cx43、p-Cx43-S368、p-Cx43-S262、GFAP、PKC、AT1R 均高于 A 组 ($P < 0.05$),NeuN、eNOS 均低于 A 组 ($P < 0.05$);C 组、D 组 Cx43、p-Cx43-S368、p-Cx43-S262、GFAP、PKC、AT1R 均低于 B 组 ($P < 0.05$),NeuN、eNOS 均高于 B 组 ($P < 0.05$);C 组与 D 组比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 3。

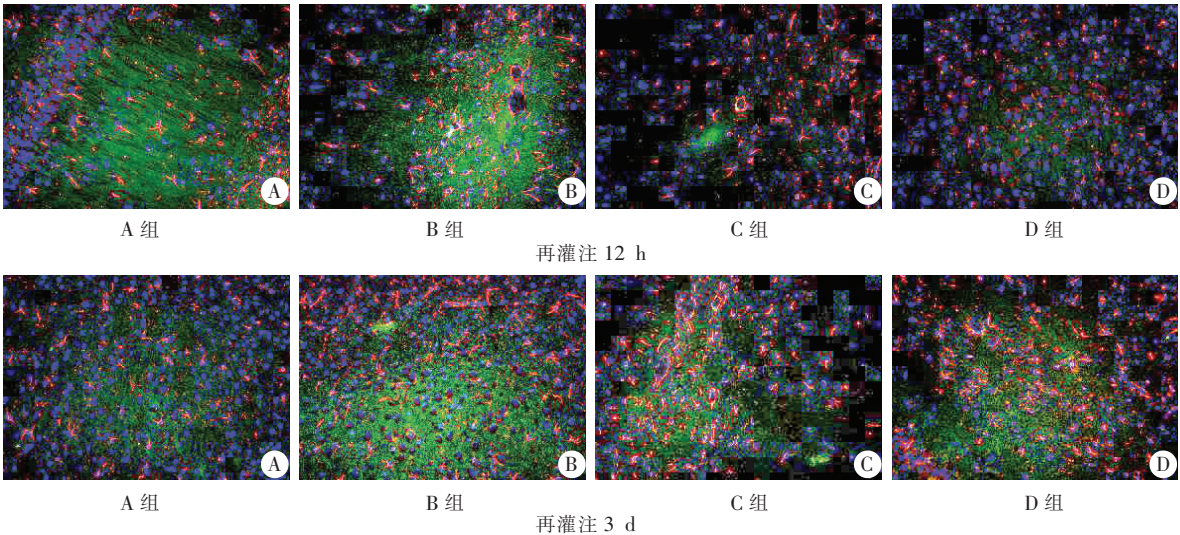


图 1 各组大鼠星形胶质细胞 Cx43、GFAP 表达情况

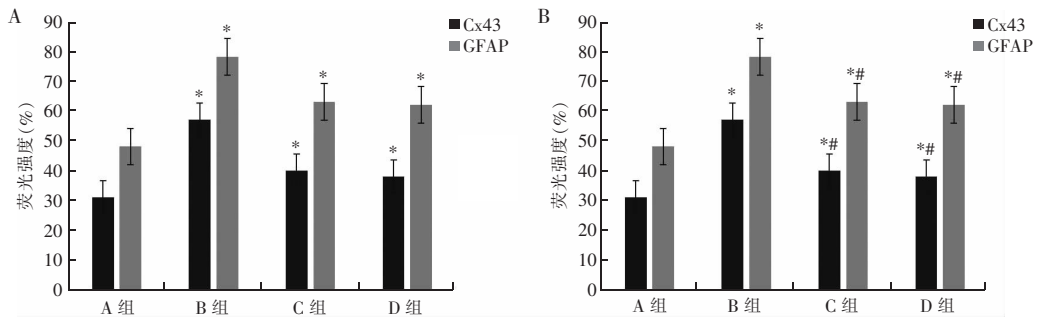


图 2 各组大鼠星形胶质细胞 Cx43、GFAP 荧光强度
A. 再灌注 12 h; B. 再灌注 3 d。* $P<0.05$,与 A 组比较;# $P<0.05$,与 B 组比较。

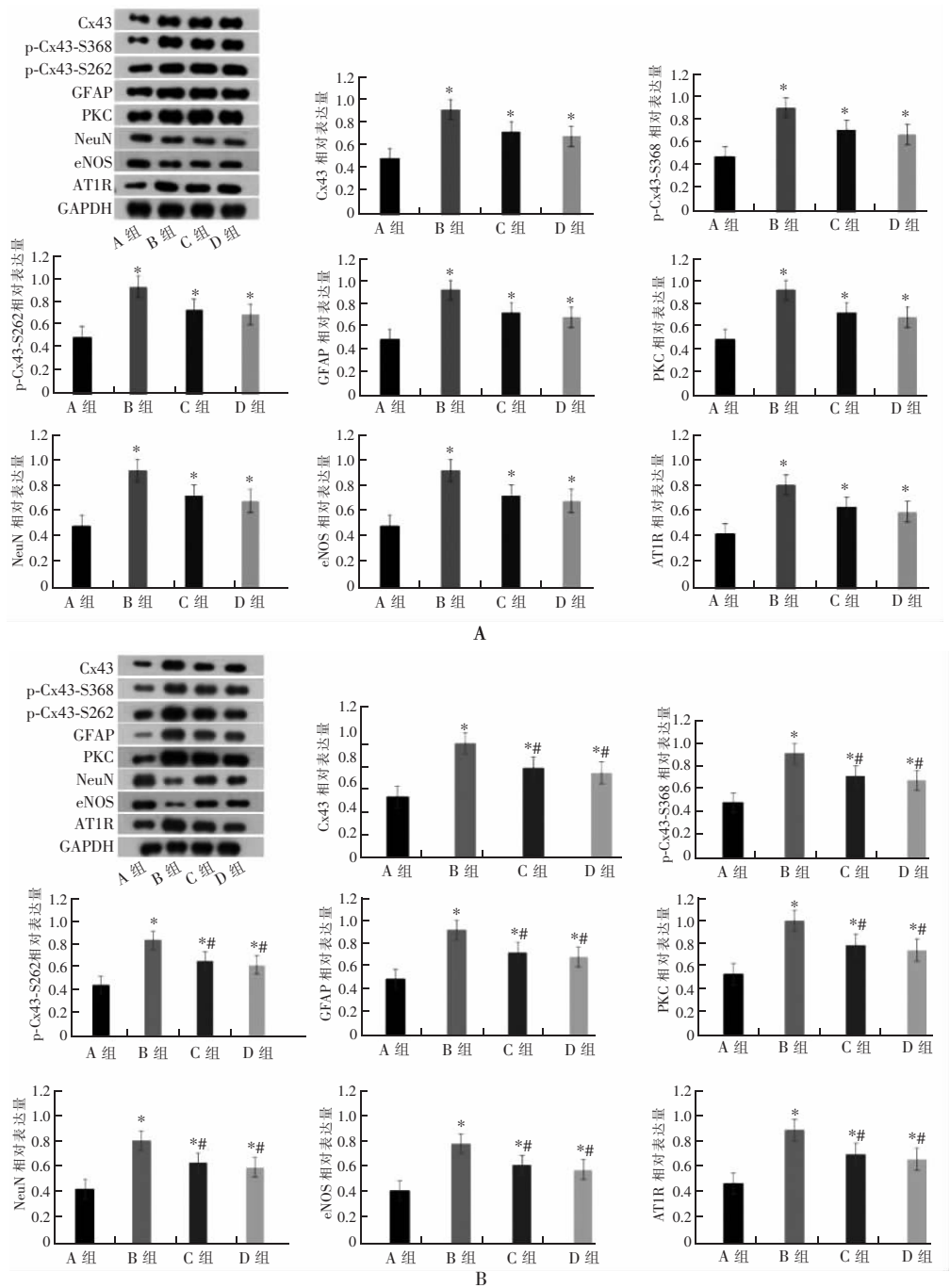


图 3 各组大鼠缺血半暗区神经胶质细胞缝隙连接通讯相关蛋白表达情况
A. 再灌注 12 h; B. 再灌注 3 d。* $P<0.05$,与 A 组比较;# $P<0.05$,与 B 组比较。

3 讨论

大量研究证实^[8-10],电针百会穴对脑缺血后神经元具有保护作用,但其作用机制尚未完全明确。星形胶质细胞主要功能包括支持神经元存活、维持中枢神经系统稳态等^[11]。相邻星形细胞之间、相邻脚板之间存在缝隙连接。缝隙连接通讯是指细胞间缝隙连接通道,允许第二信使、离子和其他分子量<1.5KDa的分子通过,直接介导细胞间的信息交流^[12]。Cx43是星形胶质细胞上最常见的缝隙连接蛋白,其在维持神经组织的组织稳定及物质调控方面发挥重要作用。在脑缺血再灌注损伤中,Cx43的作用及其影响仍然存在争议。

部分研究^[13-15]认为Cx43具有神经保护作用,如任文鑫等^[13]以24只雄性SD大鼠为实验对象,发现缺血再灌注组大鼠相较假手术组Cx43表达下调、分布紊乱;另有研究认为Cx43具有作用促进凋亡的作用,李保龙等^[14]指出,MCAO模型组大鼠缺血侧皮层脑组织中Cx43表达水平明显高于假手术组;Zhang等^[15]通过构建小鼠缺氧/复氧体外模型发现,缺氧/复氧损伤导致小胶质细胞活化增加,Cx43水平明显增加,而丙泊酚治疗可通过下调胶质细胞中Cx43水平而降低MCAO大鼠梗死体积与细胞凋亡程度。本研究中,再灌注12h,B组、C组、D组Cx43、GFAP荧光强度及Cx43、p-Cx43-S368、p-Cx43-S262、GFAP、PKC、AT1R蛋白表达水平平均高于A组($P<0.05$),NeuN、eNOS蛋白表达水平平均低于A组($P<0.05$),提示MCAO模型构建成功后,缝隙连接通讯功能异常活跃,影响星形胶质细胞中Cx43表达;而再灌注3d时上述差异更为明显,这可能是由于随着时间的推移,大鼠缺血灶会逐渐扩大,缝隙连接通讯将梗死中心区的死亡信号逐渐传递至梗死周边区,进一步影响上述缝隙连接通讯相关蛋白表达水平。进一步比较发现,再灌注3d,C组、D组Cx43、GFAP荧光强度及Cx43、p-Cx43-S368、p-Cx43-S262、GFAP、PKC、AT1R蛋白表达水平平均低于B组($P<0.05$),NeuN、eNOS表达水平平均高于B组($P<0.05$),提示电针预处理可能通过调节上述蛋白的表达,发挥了脑保护作用,推测其作用机制可能由于电针百会穴预处理通过调控细胞间缝隙连接通讯功能,影响Cx43等缝隙连接通讯相关蛋白分子通过,从而改善脑缺血/再灌注大鼠神经功能缺损,减轻缺血侧皮质区病理损伤,缩小脑梗死体积,抑制缺血区细胞凋亡及脑缺血/再灌注期间炎症级联反应,发挥神经保护作用。魏静静^[16]以MCAO大鼠为实验对象,提出电针百会穴有利于改善其神经功能缺损症状,具有脑保护作用,并推测其作用机制可能与调节Cx43的表达相关,与本文研究结论相似。

综上,电针预处理可能通过调节神经胶质细胞缝隙连接通讯相关蛋白的表达,促进脑缺血后神经血管重构,发挥脑保护作用。

参考文献

[1] Kapanova G,Tashenova G,Akhenbekova A,et al. Cerebral ischemia reperfusion injury: from public health perspectives to mechanisms[J]. Folia Neuropathol,2022,60(4):384-389.

[2] Xu S,Lu J,Shao A,et al. Glial Cells: Role of the Immune Response in Ischemic Stroke[J]. Front Immunol,2020,11:294.

[3] 刘卫东,孔文洁,高峰. 缝隙连接蛋白调节机制的研究进展[J]. 生理科学进展,2021,52(4):275-279.

[4] 李保龙,梁润玉,裴飞,等. 基于缝隙连接蛋白-43调控的运动预处理促进大鼠脑缺血再灌注后神经血管单元重构的机制研究[J]. 中国康复医学杂志,2023,38(3):299-304.

[5] Dong R,Han Y,Jiang L,et al. Connexin 43 gap junction-mediated astrocytic network reconstruction attenuates isoflurane-induced cognitive dysfunction in mice[J]. Journal of Neuroinflammation,2022,19(1):64.

[6] Zhao Y,Yang H,Shan W,et al. Moderate ethanol-preconditioning offers ischemic tolerance against focal cerebral ischemic/reperfusion: role of large conductance calcium-activated potassium channel[J]. Neurochemical Research,2022,47(12):3647-3658.

[7] Yang H,Qi C,Su F,et al. Cerebral ischemia/reperfusion injury and pharmacologic preconditioning as a means to reduce stroke-induced inflammation and damage[J]. Neurochemical Research,2022,47(12):3598-3614.

[8] 刘丹妮,孙光华,周桂娟,等. 电针水沟、百会穴对脑缺血再灌注损伤大鼠大脑皮质神经元凋亡的影响[J]. 中国组织工程研究,2022,26(35):5620-5625.

[9] 何凯峰,王丽芬. 针刺百会穴治疗脑缺血再灌注损伤的作用机制研究进展[J]. 中医药导报,2022,29(7):198-202.

[10] 张思琪,杨添淞,马帅,等. 电针“百会”“神庭”对脑缺血再灌注不同时间点大鼠炎症因子的影响[J]. 针灸临床杂志,2023,39(7):79-84.

[11] Gao W,Ning Y,Peng Y,et al. LncRNA NKILA relieves astrocyte inflammation and neuronal oxidative stress after cerebral ischemia/reperfusion by inhibiting the NF- κ B pathway[J]. Molecular Immunology,2021,139:32-41.

[12] Totland MZ,Rasmussen NL,Knudsen LM,et al. Regulation of gap junction intercellular communication by connexin ubiquitination: physiological and pathophysiological implications[J]. Cellular and Molecular Life Sciences,2020,77(4):573-591.

[13] 任文鑫,马艺宸,高鸿,等. 电针后处理对大鼠缺血再灌注室室肌电传导和缝隙连接蛋白43表达的影响[J]. 针灸临床杂志,2023,39(2):81-85.

[14] 李保龙,梁润玉,裴飞,等. 基于缝隙连接蛋白-43调控的运动预处理促进大鼠脑缺血再灌注后神经血管单元重构的机制研究[J]. 中国康复医学杂志,2023,38(3):299-304.

[15] Zhang T,Wang Y,Xia Q,et al. Propofol Mediated Protection of the Brain From Ischemia/Reperfusion Injury Through the Regulation of Microglial Connexin 43[J]. Frontiers in Cell and Developmental,2021,9:637233.

[16] 魏静静. 电针对脑缺血/再灌注大鼠小凹蛋白-1和缝隙连接蛋白43表达的影响[D]. 温州医科大学,2016.

(收稿日期:2023-10-09 修回日期:2023-11-10)