

针刺对缺血脑组织谷氨酸含量及其代谢型受体 5mRNA 表达水平影响的实验研究

赵海军¹ 王 媛¹ 卢 岩¹ 韩冰冰¹ 李 燕^{1,2} 王世军¹

(1.山东中医药大学,山东济南 250355; 2.齐鲁工业大学化学与制药工程学院,山东济南 250353)

摘 要 目的:观察针刺对局灶性脑缺血模型大鼠缺血脑组织谷氨酸含量及其代谢型受体 5(metabotropic glutamate receptor5, mGluR5)mRNA 表达水平的影响。方法:采用线栓法复制大脑中动脉栓塞 (middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型,将造模成功大鼠随机分为模型组、曲池组、内关组及地机组,并设置假手术组、空白组,每组 6 只。针刺 14d 后,脑组织取材,利用酶化学法检测缺血脑组织中谷氨酸的含量,利用 RT-PCR 检测 mGluR5 mRNA 的表达水平。结果:与假手术组及空白组相比,内关组、曲池组及模型组大鼠脑组织谷氨酸含量明显升高;与模型组、地机组相比,内关组、曲池组大鼠脑组织内谷氨酸含量明显下降。与假手术组及空白组相比,地机组及模型组大鼠脑组织 mGluR5 mRNA 表达明显升高;与模型组及地机组大鼠相比,内关组与曲池组大鼠脑组织 mGluR5 mRNA 表达明显升高。结论:针刺可降低缺血性脑组织谷氨酸含量,上调 mGluR5 mRNA 的表达水平,从而达到保护缺血性脑组织的作用。

关键词 脑缺血 针刺疗法 谷氨酸 mGluR5

中图分类号 R743.310.5

文献标识码 A

文章编号 1672-397X(2014)10-0070-03

谷氨酸是中枢神经系统主要的兴奋性氨基酸,在突触兴奋传递中及神经元生理功能方面具有重要的作用,同时它又具有很强的神经毒性,参与了缺血性脑中风时神经功能和结构损伤的病理生理过程。有研究报道,其代谢型受体 5 (mGluR5)亦与该过程有关。因此,我们拟从缺血性脑组织谷氨酸含量及 mGluR5 mRNA 表达方面进行研究,检测针刺对脑中动脉栓塞(MCAO)模型大鼠上述指标的影响,进而探讨针刺对缺血性脑中风的保护机制。

1 实验材料

1.1 实验动物 雄性 SPF 级 Wistar 大鼠 36 只,体重(220±20)g,购自北京维通利华实验动物有限公司,许可证号:SCXK(京)2012-0001。SPF 级大鼠饲料购自北京科澳协力公司,合格证号:SUXK(京)2009-0012。

1.2 主要实验试剂 谷氨酸测定试剂盒,批号 A074,购自南京建成生物工程研究所;蛋白含量测定试剂盒,批号 A045-2,购自南京建成生物工程研究所。Trizol 及 RT-PCR 试剂盒由 Invitrogen(美国)公司生产。

1.3 主要实验仪器 GS-15R 型高速低温离心机,Beckman;UV-7504 型单光束紫外可见分光光度计,上海欣茂仪器有限公司;7500 Fast 型 qPCR 仪,Applied biosystems 公司;EPS300 型电泳仪,Tanon 公司;2500 型凝胶成像仪,Tanon 公司。韩式电针仪,南京济生医疗技术有限公司;I5 独立通风大鼠饲养笼,苏州苏杭技术设备有限公司。

1.4 引物合成及序列 mGluR5 及 GAPDH 上下游引物委托

北京信利来科技有限公司合成,mGluR5 上游引物 5'-GCAGGGAGCTCTGCTACATTAT-3',下游引物 3'-TGGGCTTCTTGGTACAGATTTT-5';GAPDH 上游引物 5'-CATTGTCACCAACTGGGACGATA-3',下游引物 3'-GGAGGCTACGTACATGGCTG-5'。

2 实验方法

2.1 造模与分组 采用文献[1]记载的方法进行 MCAO 模型复制及假手术操作,并在大鼠苏醒后参照文献[2]进行神经体征评分,将评分为 1~3 分的大鼠随机配伍分组为模型组、内关组、曲池组、地机组,每组 8 只。进行假手术操作的大鼠 8 只作为假手术组。另取 8 只大鼠作为空白组。

2.2 针刺方法 依据文献[3]制定的标准对“内关”、“曲池”及“地机”取穴,前两穴作为治疗穴,以地机穴作为无关对照穴,该穴定位于阴陵泉穴下 3mm,内踝最尖部与阴陵泉穴的连线上。针刺内关时,直刺 1mm;针刺曲池和地机时,直刺 4mm。提插捻转行针后连接在韩式电针仪上。电针仪参数设置同参考文献[2]。造模完成后,于每日上午针刺 1 次,连续针刺 14d。对模型组及假手术组大鼠实施抓取、捆绑等假针刺操作。空白组不做任何操作。

2.3 取材 末次针刺 2h 后,处死取脑,于缺血侧大脑中动脉起始端前后 8mm 切一脑片。

2.4 脑组织谷氨酸含量测定 制备脑组织匀浆,用于谷氨酸含量检测,检测方法按照试剂盒说明书进行。

2.5 脑组织 mGluR5 mRNA 的表达水平检测 参照试剂盒

基金项目:国家自然科学基金项目(81303053,81373723,81202765,81102652,81072762);博士点基金博导类资助项目(20103731110006);山东省自然科学基金项目(ZR2010HM079,ZR2009CQ007)

说明书提取上述脑组织匀浆的总 RNA, 核酸测定仪测 A_{260}/A_{280} , 要求在 1.8~2.0 之间, 以保证 RNA 纯度。

逆转录反应: 取 RNA 0.2 μg 作为反应模板, 加入 RNAase-free 水补充至 10 μL , 加入 Oligo(dT) 1 μL , 随机引物 1 μL , 以上反应体系于 65 $^{\circ}\text{C}$ 反应 5 min, 冰浴 2 min 后在该体系中继续加入 dNTP (10 $\mu\text{mol/L}$) 1 μL , 0.1 mol/L DTT 1 μL , 5 $\times$ 逆转录缓冲液 1 μL , 逆转录酶 1 μL , 以上反应体系在 50 $^{\circ}\text{C}$ 温育 5 min。

qPCR 扩增反应: 在 ABI 7500 Fast qPCR 仪上进行扩增反应, 反应体系中加入 cDNA 模板 1 μL , 10 倍扩增反应缓冲液 1 μL , MgCl_2 (25 mmol/L) 1 μL , 上游引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 1 μL , 下游引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 1 μL , Sybgreen (20 $\times$) 1 μL , DEPC 水 12.8 μL , 聚合酶 0.2 μL 。反应体系参数为 95 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s。PCR 扩增反应共进行 40 个循环。实验结果以空白组作为参照, 以 GAPDH 作为内参, 以 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法进行相对定量分析。

2.6 统计学方法 实验结果采用 SPSS 19.0 软件包进行统计分析, 结果采用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 针刺治疗后各组间两两比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异具有显著性。

3 实验结果

3.1 针刺对缺血脑组织谷氨酸含量的影响 结果见表 1。模型组缺血脑组织中的谷氨酸含量明显升高, 与假手术组相比差异具有显著性 ($P < 0.05$)。内关组与曲池组脑组织内谷氨酸含量明显下降, 与模型组及地机组相比差异具有显著性 ($P < 0.05$); 内关组与假手术组及空白组相比没有显著性差异 ($P > 0.05$)。

3.2 针刺对脑缺血组织 mGluR5 mRNA 表达的影响 结果见表 1。与假手术组比较, 内关组、曲池组及模型组大鼠脑组织 mGluR5 mRNA 表达明显升高 ($P < 0.05$); 与模型组、地机组比较, 内关组、曲池组大鼠 mGluR5 mRNA 表达明显升高 ($P < 0.05$); 内关组又明显高于曲池组 ($P < 0.05$); 地机组与模型组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 1 各组大鼠脑组织谷氨酸及 mGluR5 mRNA 含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数(只)	谷氨酸含量($\mu\text{mol/gprot}$)	mGluR5 mRNA 含量
空白组	8	121.17 $\pm$ 22.65	1.00 $\pm$ 0.00
假手术组	8	126.56 $\pm$ 21.16	1.05 $\pm$ 0.05
模型组	6	221.74 $\pm$ 33.81*	2.62 $\pm$ 0.83*
内关组	6	147.22 $\pm$ 34.65*#	5.56 $\pm$ 2.49*##
曲池组	6	188.44 $\pm$ 49.42*#	3.56 $\pm$ 2.26*#
地机组	6	269.93 $\pm$ 51.04*	1.99 $\pm$ 1.70*

注: * 与假手术组比较, $P < 0.05$; # 与模型组比较, $P < 0.05$;

☆ 与曲池组比较, $P < 0.05$; # 与地机组比较, $P < 0.05$ 。

4 讨论

谷氨酸是中枢神经系统主要的兴奋性氨基酸, 在突触兴奋传递及神经元生理功能方面具有重要的作用, 同时它又具有很强的神经毒性。正常条件下, 细胞外谷氨酸水平较低, 仅有少量谷氨酸参与信号传递; 血脑屏障对谷氨酸的通透性极低, 在脑内必须通过糖代谢的中间产物如草酰乙酸、 α -酮戊二酸和其他前体经多条化学途径合成^[4]。由于能量代谢紊乱, 谷氨酸从胞内释出, 进入突触间隙激活谷氨酸受体^[5]。从而诱使大量 Ca^{2+} 内流, 引起细胞内钙超载, 激活相应级联反应而引

发神经毒性^[6-7]。同时, 某些氧自由基生成的酶类被激活, 氧自由基大量生成, 则进一步加剧了谷氨酸对细胞的损伤^[8]。这种损伤使得细胞膜及线粒体进一步损伤, 细胞内 K^{+} 更多的从细胞内释出, 引起去极化扩散即梗死周围去极化, 继而产生神经元过度兴奋性损害作用^[9]。

谷氨酸主要通过离子型受体 (iGluR) 和代谢型受体 (mGluR) 而发挥作用^[10]。其中, mGluR 有 8 种亚型, 根据其结构、功能及药理特点可以分为 I、II、III 三组。mGluR1 和 mGluR5 共同组成了 I 组, II 组包括 mGluR2 和 mGluR3, 其余亚型组成了 III 组^[11]。

目前学者们对 mGluR5 在缺血性脑损伤中作用和机制的认识并不一致。一部分学者认为, I 组 mGluR 可与磷脂酶 C 结合, 水解磷脂酰肌醇为 DAG 和 IP3 产生相应效应^[12]。一方面, DAG 在脑缺血时可被水解形成花生四烯酸, 这被认为是谷氨酸参与缺血性脑损伤的机制之一。另一方面, IP3 则介导了钙超载的产生。对 mGluR5 的研究发现, 它参与了诸如脑缺血、痴呆等多种疾病过程^[13]。

还有研究者发现, mGluR5 的激活可减少缺血组织细胞凋亡, 起保护作用^[14]。陈继军等^[15]利用 mGluR5 激动剂 2-氯-4-羟苯基甘氨酸对创伤性神经元损伤作用进行了实验研究, 发现其可减轻创伤性神经元损伤, 这种保护作用可能是由 ERK 和 Akt 信号通路介导的。

在本实验中, 模型组大鼠脑组织谷氨酸浓度升高, 其 mGluR5 mRNA 含量上调, 与空白组及假手术组相比具有显著性差异, 提示缺血性脑损伤可引起脑组织的谷氨酸含量上升, 而 mGluR5 mRNA 的表达上调可能与谷氨酸的诱导有关。但经针刺后, 与模型组及地机组相比, 内关组及曲池组大鼠脑组织谷氨酸浓度降低, 此时 mGluR5 mRNA 表达水平反而升高。该实验结果与刘悦等^[16]的研究结果存在差异, 其针刺干预脑缺血的研究结果显示, 针刺可以降低缺血脑组织 mGluR1、mGluR3、mGluR8 的水平, 但研究中并没有包括 mGluR5, 但包括了 I 组 mGluRs 的另外一个亚型即 mGluR1, 其针刺时间为 24 h。本课题的针刺天数为 14 d, 因此, 我们推测这种差异可能与针刺时间的长短有关。

以上实验结果提示, 针刺能够减轻兴奋性氨基酸的神经毒性, 从而发挥对缺血脑组织的神经保护作用, 而表达升高的 mGluR5 可能与针刺的神经保护作用有关, 但其表达上调的机制及在缺血性脑中风中的作用仍需进一步研究。

5 参考文献

- [1] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*, 1989, 20(1): 84
- [2] 赵海军, 王媛, 卢岩, 等. 针刺改善脑缺血“血行不畅、壅遏经脉”血瘀证候的实验研究. *辽宁中医杂志*, 2013, 40(12): 2587
- [3] Feeney DM, Gonzalez A, Law WA. Amphetamine, haloperidol and experience interact to affect rate of recovery after motor cortex injury. *Science*, 1982, 217(4562): 855
- [4] 梅和珊, 王永利. 脑缺血时谷氨酸释放机制. *中国药理学通报*, 2005, 21(4): 393
- [5] 胡鸣, 李芳, 徐丹令, 等. 缺血性脑损伤与兴奋性氨基酸. *同济大*

疏肝健脾方对慢性应激糖尿病大鼠甲状腺功能及组织形态的影响

雷永华¹ 李红² 徐蓉娟² 范崇信¹

(1.郑州市第一人民医院,河南郑州 450000; 2.上海中医药大学附属龙华医院,上海 200032)

摘要 目的:观察疏肝健脾方对糖尿病大鼠慢性应激状态下甲状腺功能及组织形态的影响。方法:将 75 只 SD 大鼠随机分为正常组 15 只和造模组 60 只,造模组 60 只大鼠诱发糖尿病后再次随机分为模型组、中药组、西药组和中西药结合组,除正常组以外其余各组大鼠在施以慢性不可预知温和刺激以诱发应激状态(4 周)同时分别给予蒸馏水、疏肝健脾方、左洛复混悬液、疏肝健脾方+左洛复混悬液灌胃,正常组亦给予蒸馏水灌胃。治疗 12 周后测定各组大鼠三碘甲状腺原氨酸(T₃)、四碘甲状腺原氨酸(T₄)、游离甲状腺素 T₃(FT₃)、游离甲状腺素 T₄(FT₄)、促甲状腺激素(TSH)水平,并观察甲状腺组织改变。结果:与正常组比较,其余各组大鼠的 T₃、T₄、FT₃、FT₄ 均明显降低;中西药结合组大鼠的 T₃、中药组和中西药结合组的 T₄ 均明显高于模型组和西药组。模型组大鼠甲状腺组织有不同程度损伤,各用药组损伤情况介于正常组与模型组之间。结论:疏肝健脾方能对抗链脲佐菌素(STZ)诱导的糖尿病大鼠应激状态下并发的甲状腺功能减退,可能对糖尿病大鼠应激状态及下丘脑-垂体-甲状腺轴(HPT)有一定的调节作用。

关键词 糖尿病 甲状腺 疏肝健脾 中药复方 实验研究

中图分类号 R587.105 文献标识码 A 文章编号 1672-397X(2014)10-0072-03

“疏肝健脾方”由上海中医药大学附属龙华医院徐蓉娟教授及其博士生李红主任医师经多年临床实践研制而成,广泛用于临床。该方具疏肝解郁、健脾安神之功效,拓展了应用疏肝健脾法治疗糖尿病及其合并症的临床思路。前期研究表明,疏肝健脾方具有改善糖尿病大鼠甲状腺功能减退的治疗作用^[1],本实验通过观察疏肝健脾方对应激状态下糖尿病大

鼠甲状腺功能及病理改变的影响,进一步探讨疏肝健脾方对应激状态下糖尿病大鼠合并甲状腺功能减退的干预作用,并进而探索其相关机制。

1 实验材料

1.1 动物 SPF 级 SD 雄性大鼠 75 只,体重(180±10)g,由上海中医药大学实验动物中心提供。

基金项目:国家自然科学基金项目(30772800)

- 学学报(医学版),2001,22(3):73
- [6] 赵刚,李树清.兴奋性氨基酸毒性与缺血性脑损伤.国外医学(脑血管疾病分册),2004,12(6):426
- [7] 牛文民,李忠仁.缺血性脑血管病自由基损伤病理学及抗氧化治疗研究进展.上海针灸杂志,2005,24(1):43
- [8] 虞希冲.谷氨酸转运体、谷氨酸/胱氨酸转运体与谷氨酸神经细胞毒作用.中国临床药理学与治疗学,2003,8(5):490
- [9] 樊敬峰,王伟斌,吕佩源,等.谷氨酸受体通路及其功能研究进展.疑难病杂志,2005,4(5):313
- [10] 宋文婷,徐立,刘建勋,等.脑缺血后谷氨酸及其受体介导的神经细胞损伤及相关药物研究进展.中国药理学通报,2012,28(6):747
- [11] 陆钦池,陈生弟.代谢型谷氨酸受体与癫痫的研究进展.神经病学与神经康复学杂志,2006,3(2):104
- [12] 张毅,苏敏,秦洁行,等.缺血再灌注大鼠脑内代谢型谷氨酸受体 I 和代谢型谷氨酸受体 5 的 mRNA 水平变化.脑与神经疾病杂志,2005,13(4):264
- [13] Dölen G,Bear MF. Role for metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5) in the pathogenesis of fragile X syndrome. J Physiol,2008,586(6):1503
- [14] 杨巧莲,张茂林,刘莺,等.局灶脑缺血大鼠代谢型谷氨酸受体 5mRNA 表达及意义.中风与神经疾病杂志,2008,25(6):684
- [15] 陈继军,李随芬,李超,等.选择性代谢性谷氨酸受体 5 激动剂 CHPG 对创伤性神经元损伤的保护作用研究.现代生物医学进展,2011,11(24):4808
- [16] 刘悦,杨海涛,邱伟川,等.针刺对缺血性脑血管病模型大鼠脑组织代谢型谷氨酸受体的影响.世界中医药,2013,8(2):193
- 第一作者:赵海军(1978-),男,博士,讲师,研究方向:血瘀证及活血化瘀治法机制研究。
- 通讯作者:王世军,pathology@163.com
- 收稿日期:2014-05-09
- 编辑:吴宁