

基于 NF- κ B 通路动态观察通督调神针刺对动脉硬化性脑梗死模型大鼠 Chemerin 水平的影响 *

吴海洋, 王 颖[△], 韩 为, 王海涛

(安徽中医药大学第二附属医院, 安徽 合肥 230000)

摘要: **目的** 基于 NF- κ B 通路观察通督调神针刺方法对动脉硬化性脑梗死模型大鼠 Chemerin 水平的动态变化, 寻找针刺最佳干预时间点。 **方法** 选取 96 只 Wistar 雄性大鼠随机分为对照组(基础饲料喂养)、假手术组(基础饲料喂养+颈动脉分离)、模型组(高脂饲料喂养+线栓法造脑梗死模型)和针刺组(高脂饲料喂养+线栓法造脑梗死模型+针刺)4 组。根据缺血再灌注 6、24、48 h 各分为 3 个亚组, 每组 8 只。其中模型组和针刺组采用 Zea Longa 线栓法造模成功后, 根据 Zea Longa 的神经功能评分, 将评分 1~3 分大鼠收入相应组别。4 组采用流式细胞仪测定血清中 NF- κ B 的表达活性; 运用酶联免疫吸附试验(ELISA)法测定血清中 Chemerin 水平。 **结果** ① Zea Longa 的神经功能评分, 针刺 6 h 组神经功能缺损评分较同组其他时间点降低更为显著($P<0.01$); ②假手术组血清中 Chemerin 和 NF- κ B 的水平与对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$); ③模型组血清中 Chemerin 和 NF- κ B 的水平与对照组和假手术组比较显著上调($P<0.01$)。④缺血再灌注 6 h NF- κ B 水平开始升高, 缺血再灌注 24 h 和 48 h NF- κ B 水平仍在持续升高, 缺血再灌注 6 h 针刺组血清中 NF- κ B 水平与同组不同时间点水平相比下调最为显著($P<0.01$); ⑤缺血再灌注 6 h 针刺组血清中 Chemerin 水平与同时时间点模型组相比差异具有统计学意义 ($P<0.01$)。缺血再灌注 24 h 和 48 h 针刺组血清中 Chemerin 水平与同时时间点模型组相比差异无统计学意义($P>0.05$)。 **结论** ①通督调神针刺对于动脉硬化性脑梗死模型大鼠神经功能缺损具有显著修复作用。②通督调神针刺可以抑制动脉硬化性脑梗死模型大鼠血清中 NF- κ B 活性, 降低 Chemerin 水平。在缺血再灌注 6 h 为最佳针刺时间点。

关键词: 通督调神; 针刺; NF- κ B; Chemerin; 动脉硬化性脑梗死

中图分类号: R245

文献标志码: A

文章编号: 1000-2723(2018)01-0020-05

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2018.01.005

Effect of Tongdu Tiaoshen Acupuncture on Chemerin Level in Rats with Arteriosclerotic Cerebral Infarction Based on Dynamic Observation of NF- κ B Pathway

WU Haiyang, WANG Ying, HAN Wei, WANG Haitao

(The Second Affiliated Hospital of Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230000, China)

ABSTRACT: **Objective** To observe the dynamic changes of Chemerin levels in rats with arteriosclerotic cerebral infarction treated by Tongdu Tiaoshen acupuncture method based on the NF- κ B pathway and to find the optimal time for acupuncture intervention. **Methods** Ninety-six adult Wistar male rats were randomly divided into four groups: control group, sham operation group, model group and acupuncture group. According to ischemia-reperfusion 6 h, 24 h, 48 h each is divided into 3 subgroups, 8 in each group. According to the neurological function score of Zea Longa, the standard rat income will be matched to the corresponding group, and the expression activity of NF- κ B in peripheral blood mononuclear cells will be determined by flow cytometry. After enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) Determination of Chemerin levels in peripheral blood. **Results** ① Neurological score of Zea Longa; ② Chemerin and NF- κ B levels in sham group were not significantly different from those in blank group ($P>0.05$); ③ Chemerin and The level of NF- κ B was significantly up-regulated compared with the blank group and the sham operation group ($P<0.01$). ④ The level of NF- κ B began to increase at 6 h after ischemia-reperfusion, and the levels of NF- κ B in 24 h and 48 h after ischemia-reperfusion continued to increase. But the level of

* 基金项目: 安徽中医药大学科研项目(2016qn022)

收稿日期: 2017-12-16

作者简介: 吴海洋(1986-), 男, 主治医师, 研究方向: 针刺临床应用及机理研究。

[△]通信作者: 王颖, Email: zhenjiu205@126.com

NF- κ B in acupuncture group at 6 h after ischemia-reperfusion was the most significant ($P<0.01$). ⑤ Chemerin levels in the acupuncture group at 6 h after ischemia-reperfusion were significantly different from those in the model group at the same time point ($P<0.01$). The levels of Chemerin in the acupuncture group at 24 h and 48 h after ischemia-reperfusion were not significantly different from those in the model group at the same time point ($P>0.05$). **Conclusion** ① Tongdu Tiaoshen acupuncture can significantly reduce atherosclerosis cerebral infarction Neurological deficit in model rats. ② Tongdu Tiaoshen acupuncture can inhibit NF- κ B activity and reduce Chemerin in peripheral blood of rats with atherosclerotic cerebral infarction. Acupuncture at 6 h after ischemia-reperfusion was the best treatment time point.

KEY WORDS: Tongdu Tiaoshen; acupuncture; NF- κ B; Chemerin; arteriosclerotic cerebral infarction

动脉硬化性脑梗死,又称动脉硬化血栓形成性脑梗死。主要为脑部动脉粥样硬化使脑血管管腔狭窄或闭塞,导致急性脑缺血,引起局部脑组织缺血性坏死。Chemerin 为重要的脂肪细胞因子,相关研究显示^[1-4]血清 Chemerin 因子不仅与动脉粥样硬化性病变的发生、发展及严重程度存在相关性,而且与炎症反应关系密切。但鲜有报道动脉硬化性脑梗死与 Chemerin 水平关系,同时未将与炎症反应联系观察。此前有报道显示^[5-6]Chemerin 水平受上游 NF- κ B(Nuclear factor- κ B)通路调控,同时 NF- κ B 通路对于炎症反应具有显著影响。笔者在此前文章中阐述通督调神针刺对于脑缺血再灌注模型大鼠炎症因子下调作用显著,本文将进一步研究通督调神针刺对于动脉硬化性脑梗死模型大鼠 Chemerin 的影响,同时观察 Chemerin 水平与 NF- κ B 的相关性,进一步确定针刺最佳干预时间点。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组 雄性 Wistar 大鼠 96 只,体质量 120~150 g,鼠龄 2~3 月,基础饲料饲养 4 周,随机分为 4 组,分别为对照组、假手术组、模型组和针刺组,每组 24 只。每组内部再按 6、24、48 h 时间点分为 3 个亚组,每个亚组 8 只。大鼠自由饮水和摄食,更换食水 1 次/d,维持 6 周。基础饲料配方(安徽中医药大学动物中心提供):面粉 20%,豆粕 22%,小麦 10.2%,麦麸 4%,鱼粉 6%,草粉 8%,玉米 25.6%,酵母 2%,氨基酸 2.2%及盐、多种维生素。高脂饲料配方:白糖 7%,胆固醇 3%,丙基硫氧嘧啶 0.2%,猪油 10%,牛胆酸钠 0.5%,基础饲料 79.3%。其中对照组大鼠给予基础饲料配方喂养;假手术组在基础饲料喂养+颈动脉分离;模型组大鼠给予高脂饲料喂养+线栓法制造脑梗死模型大鼠;针刺组在模型组基础上在脑梗死后 6 h、48 h、2 周时间点运用通督调神针刺。针刺组和模型组在开始喂养时予以腹腔注射维生素 D600 000IU/kg,对照组和假手

术组给予等体积生理盐水。

1.2 大鼠脑缺血再灌注模型制备 参照 Zea Longa^[7]线栓法制作大鼠左侧 MCAO/R 模型。

1.3 模型评估标准 根据 Zea Longa 级标准评分^[7]:待大鼠清醒后进行评分,1~3 分为造模成功,饲养期间出现死亡大鼠予以剔除并补足。

1.4 针刺组方法 在造模清醒后根据相应时间点针刺,选取穴位根据新编《实验针灸学》^[8]选取百会、大椎、风府 3 穴。百会穴采用平刺;风府穴采用直刺,针尖朝鼻尖方向;大椎采用向下斜刺,留针 30 min,期间行针 1 次,运用平补平泻手法,治疗后即刻取材检测指标。

1.5 动物取材及检测

1.5.1 采用流式细胞仪测定外周血单个核细胞 NF- κ B 的表达活性 ①各组大鼠根据相应时间点取材,取眼眶后静脉血 2 mL,单个核细胞通过淋巴细胞分离液分离获取,离心获取细胞悬液,通过流式细胞仪检测 NF- κ B 活性,具体步骤严格按照说明书。

1.5.2 外周血中 Chemerin 检测方法 抽取大鼠眼眶后静脉血 2 mL,半小时内于 2~8 ℃1 000 r/min,离心 15 min,采用酶联免疫吸附试验(ELISA)法(武汉优尔科技股份有限公司)检测 Chemerin 水平。

1.6 统计学处理 实验数据采用 SPSS17.0 软件进行统计学分析。组间比较采用 t 检验,计量数据采用均数表示,多组间数据比较采用单因素方差分析,而相关性比较运用 spearman 秩相关系数分析, $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

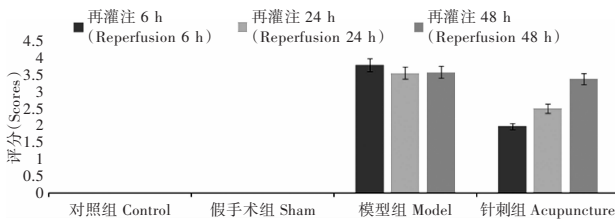
2 实验结果

2.1 各组大鼠根据 Zea Longa 的神经功能评分 对照组和假手术组未见神经功能缺损症状,评分为 0;模型组与对照组和假手术组相比显著升高($P<0.01$);针刺组与模型组相比有差异,且差异具有统计学意义($P<0.01$);针刺 6 h 组神经功能缺损评分较同组其他时间点降低更为显著($P<0.01$)。见表 1、图 1。

表 1 各组大鼠神经功能缺损评分($\bar{x} \pm s, n=24$, 分)

组别	再灌注 6 h	再灌注 24 h	再灌注 48 h
对照组	0±0	0±0	0±0
假手术组	0±0	0±0	0±0
模型组	3.76±0.49 ^{▲*}	3.52±0.51 ^{▲*}	3.54±0.54 ^{▲*}
针刺组	1.96±0.71 ^{▲*▽}	2.48±0.68 ^{▲*}	3.35±0.57 ^{▲*}

注:与对照组相比, [▲] $P<0.01$;与假手术相比, ^{*} $P<0.01$;与同组不同时段相比, [▽] $P<0.01$

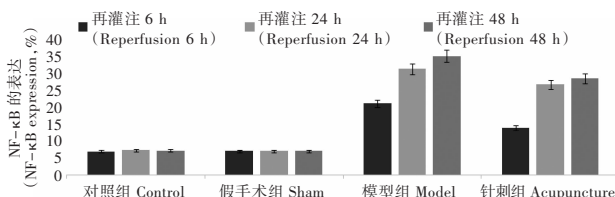
图 1 各组大鼠神经功能缺损评分($\bar{x} \pm s, n=24$, 分)

2.2 各组大鼠外周血单个核细胞 NF- κ B 的表达活性 假手术组血清中 NF- κ B 水平与对照组点对点比较差异无统计学意义($P>0.05$);模型组血清中 NF- κ B 水平分别与对照组和假手术组比较差异具有统计学意义($P<0.01$)。缺血再灌注 6 h NF- κ B 水平开始升高,缺血再灌注 24 h 和 48 h 仍在持续升高;针刺组 NF- κ B 水平与模型组点对点比较差异具有统计学差异($P<0.01$)。针刺组在同组不同时间比较均有差异($P<0.01$),在缺血再灌注 6 h 针刺组 NF- κ B 水平下调最为显著。见表 2、图 2。

表 2 各组大鼠外周血单个核细胞 NF- κ B 的表达活性($\bar{x} \pm s, n=24$, %)

组别	再灌注 6 h	再灌注 24 h	再灌注 48 h
对照组	7.21±2.21	7.51±2.08	7.36±2.14
假手术组	7.31±2.18 [*]	7.26±2.11 [*]	7.28±2.16 [*]
模型组	21.76±2.19 [▲]	32.22±2.14 [▲]	36.12±2.24 [▲]
针刺组	14.36±2.21 ^{▲*▽}	27.48±2.68 ^{▲*▽}	29.25±2.37 ^{▲*▽}

注:与同时段对照组相比, ^{*} $P>0.05$;与同时段假手术和对照组相比, [▲] $P<0.05$;与同时段模型组相比, ^{*} $P<0.01$;与同组不同时段相比具有显著差异, [▽] $P<0.01$

图 2 各组大鼠外周血单个核细胞 NF- κ B 的表达活性($\bar{x} \pm s, n=24$, %)

2.3 各组大鼠外周血中 Chemerin 水平 假手术组 Chemerin 水平与对照组点对点比较差异无统计学意义($P>0.05$);模型组血清中 Chemerin 水平分别与对照组和假手术组比较差异具有统计学意义($P<0.01$)。缺血再灌注 6 h 针刺组血清中 Chemerin 水平与模型组点对点比较具有统计学差异($P<0.01$)。缺血再灌注 24 h 和 48 h 针刺组血清中 Chemerin 水平与模型组点对点比较差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 3、图 3。

表 3 各组大鼠外周血中 Chemerin 水平($\bar{x} \pm s, n=24$, ng/mL)

组别	再灌注 6 h	再灌注 24 h	再灌注 48 h
对照组	95.31±17.10	95.21±17.08	95.36±17.23
假手术组	96.43±16.45 [*]	95.46±16.89 [*]	96.28±17.13 [*]
模型组	108.76±17.35 [▲]	105.28±17.14 [▲]	106.23±17.24 [▲]
针刺组	101.32±17.21 ^{▲*▽}	105.26±17.68 [▲]	105.21±17.37 [▲]

注:与同时段对照组相比, ^{*} $P>0.05$;与同时段假手术和对照组相比, [▲] $P<0.05$;与同时段模型组相比, ^{*} $P<0.01$;与同组不同时段相比, [▽] $P<0.01$

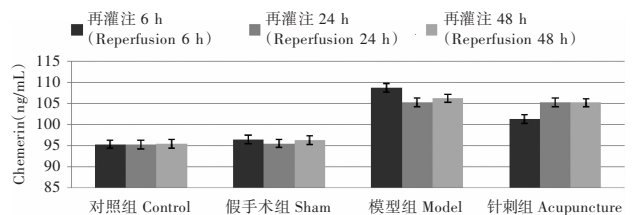
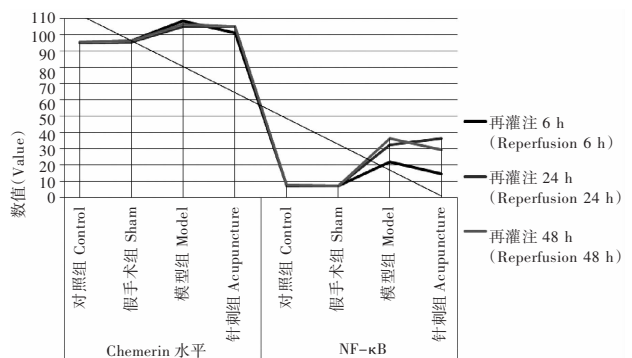


图 3 各组大鼠外周血中 Chemerin 水平

2.4 各组大鼠外周血中 Chemerin 水平与 NF- κ B 活性相关性 综上数据分析可见缺血再灌注 6 h 针刺组对于 NF- κ B 水平和 Chemerin 水平影响最为显著,二者之间线性关系密切,故缺血再灌注 6 h 针刺为动脉硬化性脑梗死模型最佳干预点,疗效显著。见图 4。

图 4 Chemerin 水平与 NF- κ B 活性相关性

3 讨论

动脉硬化性脑梗死属于缺血性脑血管疾病,脑缺

血后在短时间难以恢复血供,脑细胞功能出现严重障碍,称之为脑缺血再灌注损伤(cerebral is chemia-reperfusion injury, CIRI),对于 CIRI 发生机制虽然涉及广泛,但最为关注的依旧是缺血再灌注后炎症反应造成神经功能缺损的理论^[9-11]。此前文章中我们通过实验研究得出通督调神针刺对于脑缺血再灌注模型大鼠炎症因子 TNF- α 和 CRP 水平具有下调作用^[12],但在研究中我们发现只有控制炎症因子上游通路才能积极调控下游众多炎症因子。其中 NF- κ B 被称为是脑缺血后炎症级联反应的始动因素,可以对多种炎症因子转录起到调节作用,并贯穿于脑缺血后损伤的始终^[13]。NF- κ B 是一种基因表达的重要转录因子,广泛存在于真核细胞内,具有传递信息的作用。它在机体免疫和炎症反应、分化和凋亡等有关基因转录过程中具有重要的调控作用^[14]。于凌志^[15]通过总结发现活化的 NF- κ B 主要通过介导自由基损伤、促进炎症的发生发展和诱导细胞凋亡等几种机制共同作用加重了脑缺血损伤。万东^[16]等通过观察电针对于缺血再灌注模型大鼠小脑顶核组织中 NF- κ B 影响,结果显示 NF- κ B 活性抑制对于修复缺血再灌注损伤具有重大意义。在本课题研究中我们将 Chemerin 因子纳入其中,主要为 Chemerin 参与动脉粥样硬化形成的发病过程,它对于形成动脉硬化性脑梗死具有促进作用,同时也是参与炎症反应的重要因素之一,但是国内相关研究很少。Chemerin 是 2007 年是新确认的一种脂肪细胞因子,主要通过相关受体实现其生物功能^[17]。最近相关研究表明 Chemerin 参与脂质代谢,并与高血压病、糖尿病及代谢综合征等疾病密切相关^[18-19]。彭清^[20]等探讨动脉粥样硬化大鼠血浆 Chemerin 及主动脉 Chemerin 基因和 Chemerin 受体基因表达与炎症的相关性,结果显示 Chemerin-Chemerin 受体通路与炎症反应和动脉硬化关系密切。徐正琴^[20]探讨急性脑梗死(ACI)Chemerin 检测的临床意义,结果显示:ACI 患者 Chemerin 水平升高,Chemerin 可能通过炎症反应和动脉粥样硬化等机制在脑梗死的发生中起重要作用。因此,动脉硬化性脑梗死,即脑缺血再灌注损伤时,Chemerin 和 NF- κ B 均被激活,它们通过多途径共同参与脑缺血损害,而调节和改善 Chemerin 和 NF- κ B 水平可以减轻脑缺血损害。

“通督调神针法”是在我院长期开展的主要针对

中风患者,通过针刺督脉经穴以调节脏腑功能,达到阴阳平衡以防治疾病。我院在动物实验及临床研究中通过通督调神针法对于中风后神经功能恢复均起到促进作用^[21-23]。故本课题依旧选取选取“百会”“大椎”“风府”等穴作用于缺血性脑血管病大鼠。百会为多条经脉交会穴,又称“三阳五会”,具有醒脑开窍,通条阴阳之功。大椎穴为阳中之阳,为提升阳气要穴。风府穴为治风要穴,内外风皆可治。方共奏通督调神,醒脑开窍之功。

本实验研究结果主要为通督调神针刺可以通过下调 NF- κ B 活性,进而降低 Chemerin 水平,达到保护神经功能和促进神经功能的修复。在缺血再灌注 6 h 针刺即为动脉硬化性脑梗死模型大鼠最佳干预点,疗效显著。这与前人在研究缺血性脑血管病机制方面有所不同,对于我们临床工作具有重要的指导意义。

参考文献:

- [1] SPIROGLOU S G, KOSTOPOULOS C G, VARAKIS J N, et al. Adipokines in periaortic and epicardial adipose tissue: differential expression and relation to atherosclerosis [J]. *J Atheroscler Thromb*, 2010, 17(2): 115-130
- [2] MCCARTHY T C, ZUNIGA L A, ZABEL B A, et al. The novel adipokine chemerin significantly increases cholesterol uptake in human macrophages [J]. *FASEB J*, 2008, 22(4): 948-952.
- [3] 仲英洁, 张子为, 徐郁, 等. 阿托伐他汀对 ApoE-/-小鼠动脉粥样硬化和钙化的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2013, 21(4): 305-310.
- [4] 宋海彬, 张羽, 关坤萍, 等. 瑞舒伐他汀对人单核-巨噬细胞组织因子表达的影响[J]. *中国医师杂志*, 2012, 14(2): 173-176.
- [5] 杨俊, 岳增辉, 谢涛, 等. 动脉粥样硬化易损斑块与 TLR4/NF- κ B 信号通路关系的研究进展[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2014, 12(6): 747-749
- [6] 谢霆, 陈新忠, 董念国, 等. NF- κ B 途径介导 Chemerin 抑制 THP-1 源性巨噬泡沫细胞 ABCA1 表达和降低胆固醇外流[J]. *华中科技大学学报(医学版)*, 2012, 41(4): 389-394.
- [7] LONGA E Z, WEINSTEIN P R, CARLSON S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. *Stroke*, 1989(1): 84-91.
- [8] 郭义. 实验针灸学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2008: 414-417.

- [9] 李伟君, 李应东. 心肌缺血再灌注损伤钙超载及中医药防治策略[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2013, 11(2): 217-218.
- [10] 陈蓓蕾, 李晓波, 李军, 等. 短暂性脑缺血发作与 IL-6、IL-8 和 IL-10 的关系 [J]. 脑与神经疾病杂志, 2013, 21(4): 247-250.
- [11] BROWN G C. Nitric oxide and neuronal death [J]. Nitric Oxide, 2010, 23(3): 153-165.
- [12] 吴海洋. 通督调神针刺对脑缺血再灌注模型大鼠 TNF- α 和 CRP 水平的动态观察[D]. 合肥: 安徽中医药大学, 2014.
- [13] ZHANG S, QI Y, XU Y, et al. Protective effect of flavonoid-rich extract from *Rosa laevigata* Michx on cerebral ischemia-reperfusion injury through suppression of apoptosis and inflammation [J]. Neurochem Int, 2013, 63(5): 522-532.
- [14] ZHANG X, ZHANG X, WANG C, et al. Neuroprotection of early and short-time applying berberine in the acute phase of cerebral ischemia: up-regulated pAkt, pGSK and pCREB, down-regulated NF- κ B expression, ameliorated BBB permeability[J]. Brain Research, 2012, 1459: 61-70.
- [15] 于凌志, 左艳丽, 贾孟辉, 等. 核转录因子 NF- κ B 对脑缺血再灌注干预机制的研究进展 [J]. 中国民族医药杂志, 2015(7): 42-44.
- [16] 万东, 罗勇, 谢鹏. 电刺激小鼠顶核对缺血/再灌注大鼠脑组织内 NF- κ B 活性及其活化的影响 [J]. 中华物理医学与康复杂志, 2006, 28(10): 660-665.
- [17] LUANGSAY S, WITTAMER V, BONDUE B, et al. Mouse ChemR23 Is expressed in dendritic cell subsets and macrophages, and mediates an anti-inflammatory activity of chemerin in a lung disease model[J]. J Immunol, 2009, 183(10): 6489-6499.
- [18] ROMAN A A, PARLEE S D, SINAL C J. Chemerin: a potential endocrine link between obesity and type 2 diabetes [J]. Endocrine, 2012, 42(2): 243-251.
- [19] RHEE E J. Chemerin: a novel link between inflammation and atherosclerosis[J]. Diabetes Metab J, 2011, 35(3): 216-218.
- [20] 张玲, 张国庆, 朱玲玲, 等. 通督调神针刺法治疗风痰瘀阻型急性脑梗死临床观察 [J]. 安徽中医药大学学报, 2017, 36(4): 59-62.
- [21] 郑仕平, 韩为, 储浩然, 等. 通督调神针灸预处理对脑缺血再灌注大鼠 miRNA664 及 MMP9 调控机制的研究 [J]. 上海针灸杂志, 2016, 35(1): 76-80.
- [22] 孙培养, 储浩然, 李佩芳, 等. 通督调神针法对脑卒中后抑郁模型大鼠血浆单胺类神经递质的影响 [J]. 针灸临床杂志, 2013, 29(11): 33-36.
- [23] 孙培养, 储浩然, 李佩芳, 等. 通督调神针刺干预对药物治疗脑卒中后抑郁的影响[J]. 中国针灸, 2015, 35(5): 753-757.

(上接第 6 页)

- [18] KOPRICH J B, RESKE-NIELSEN C, MITHAL P, et al. Neuroinflammation mediated by IL-1 β increases susceptibility of dopamine neurons to degeneration in an animal model of Parkinson's disease [J]. J Neuroinflammation, 2008, 5(1): 8.
- [19] WU D, TSENG IJ, YUAN RY, et al. Memory consolidation and inducible nitric oxide synthase expression during different sleep stages in Parkinson disease [J]. Sleep Medicine, 2014, 15(1): 116-120.
- [20] HUO Y, RANGARAJAN P, LING EA, et al. Dexamethasone inhibits the Nox-dependent ROS production via suppression of MKP-1-dependent MAPK pathways in activated microglia[J]. BMC Neurosci, 2011, 12(1): 49.
- [21] LANGSTON JW, IRWIN I, LANGSTON EB, et al. 1-Methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP⁺): identification of a metabolite of MPTP, a toxin selective to the substantia nigra[J]. Neurosci Lett, 1984, 48(1): 87-92.