

电针对糖尿病模型大鼠脊髓前角 Bax 与 Bcl-2 蛋白表达的影响^①

王薇,吴锋,赵健^②,朱秀玲

(皖南医学院解剖学教研室,安徽 芜湖 241001 E-mail:wangweiaqhn@163.com)

摘要: **目的** 观察糖尿病模型大鼠脊髓前角中凋亡相关基因 Bax 与 Bcl-2 表达变化及电针对两者表达的影响,探讨电针改善糖尿病神经系统损伤的可能机制。**方法** 32 只雄性 Wistar 大鼠随机分为正常组、溶剂组、模型组和电针组,每组 8 只。模型组和电针组腹腔注射链脲佐菌素制备糖尿病大鼠模型。电针组于糖尿病造模成功 1 周后取“足三里”“胰俞”穴给予电针刺激,每次治疗 30 min,每天 1 次,共 4 周。观察造模后及治疗后各组大鼠空腹血糖水平;用免疫组织化学染色方法检测脊髓前角的 Bax 与 Bcl-2 的蛋白表达。**结果** 与正常组相比,模型组血糖水平显著升高,脊髓前角 Bax 蛋白表达明显增加 ($P < 0.05$),而 Bcl-2 蛋白表达则明显减少 ($P < 0.05$);与模型组相比,电针组大鼠血糖水平明显降低,脊髓前角 Bax 蛋白表达明显降低 ($P < 0.05$),而 Bcl-2 蛋白表达则明显升高 ($P < 0.05$);电针组与溶剂组和正常组大鼠的 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达水平相接近 ($P > 0.05$)。**结论** 糖尿病模型大鼠脊髓前角神经元凋亡增加;电针可明显拮抗糖尿病模型大鼠脊髓前角神经元的凋亡,从而改善糖尿病大鼠脊髓前角损伤。

关键词: 糖尿病;电针;脊髓;前角;Bax;Bcl-2

中图分类号: R-332

文献标识码: A

文章编号: 1001-5817(2016)03-0250-04

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2016.03.003

Effects of electroacupuncture on Bax and Bcl-2 protein expression in anterior horn of spinal cord in diabetic rat models

Wang Wei, Wu Feng, Zhao Jian, Zhu Xiuling

(Department of Anatomy, Wannan Medical College, Wuhu 241001, Anhui

E-mail: wangweiaqhn@163.com)

Abstract: **Objective** To observe the changes of apoptosis related gene Bax and Bcl-2 expressions in anterior horn of spinal cord in diabetic rat models and the effects of electroacupuncture (EA) on both Bax and Bcl-2, so as to explore the possible mechanism of electroacupuncture in improving the damage of diabetic nervous system. **Methods** Thirty-two male Wistar rats were randomly divided into a normal group, a vehicle group, a model group and an EA group (each group $n=8$). The rat models of diabetes (the model group and the EA group) were established by intraperitoneal injection a dosage of streptozotocin. One week after the successful establishment of diabetic rats, the EA group rats were given electroacupuncture “Zusanli” and “Yishu” points for 30 minutes, once daily for 4 weeks. After the diabetic rats being successfully established and at the end of EA treatment, the fasting blood glucose levels of all rats were observed; and an immunohistochemical method was used to detect Bax and bcl-2 protein expressions of anterior horn of spinal cord. **Results** In comparison with the normal group, the blood glucose levels and the protein expression of Bax in anterior horn of the spinal cord in the model group significantly increased ($P < 0.05$), but the expression of Bcl-2 protein significantly decreased ($P < 0.05$). In comparison with the model group, the blood glucose levels and the Bax protein expression of anterior horn of spinal cord in EA group remarkably decreased ($P < 0.05$), but the expression of Bcl-2 protein significantly increased ($P < 0.05$), and expressions of Bcl-2 and Bax proteins of EA group were close to the vehicle group and the normal group ($P > 0.05$). **Conclusion** The neuron apoptosis of anterior horn of spinal cord in diabetic rat models were increased; EA could significantly antagonize the neuron apoptosis of anterior horn of spinal cord in diabetic rat models, so as to improve the anterior horn injury of diabetic rats.

Key words: diabetes mellitus; electroacupuncture; spinal cord; anterior horn; Bax; Bcl-2

① 基金项目:皖南医学院中青年科研基金(WK201108);安徽省高等学校优秀人才基金项目(2012SQRL120ZD)

② 通讯作者,E-mail:309778721@qq.com

糖尿病常损害神经系统,其中脊髓前角损害多累及前角运动神经元至肌肉运动终板途中一个或几个环节,临床上出现进行性四肢近端肌肉萎缩及肌张力降低,由于其发病率高、发病早、致残率高等特点,常影响患者的生活质量和预后^[1-2]。目前,对于糖尿病脊髓前角损伤的具体发病机制尚未明确,有研究认为糖尿病神经系统损伤的发生可能与细胞凋亡密切相关^[3-5],而糖尿病脊髓前角损伤与细胞凋亡的相关研究还未见报道。促凋亡基因 Bax 与抗凋亡基因 Bcl-2 为参与细胞凋亡调控的两个经典基因,两者的表达水平反映细胞凋亡的程度。近年来,临床研究资料证实电针刺激可治疗糖尿病神经系统损伤^[6],但其作用机制尚未完全明确。因此,本实验以链脲佐菌素诱导的糖尿病大鼠模型为研究对象,从电针对脊髓前角凋亡相关基因 Bax 与 Bcl-2 表达水平的影响角度,探讨电针改善糖尿病脊髓前角损伤的可能机制并为其临床治疗提供基础形态学实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 成年健康雄性 Wistar 大鼠 32 只,体质量 180~220 g,SPF 级,购自苏州工业园区爱尔麦特科技有限公司,动物生产许可证号:SCXK(苏)-2014-0007。动物置于安静温暖的环境中自由进食和饮水。实验操作和处理过程均严格按照有关善待动物的规定。

1.1.2 主要试剂及仪器 链脲佐菌素(STZ,Streptozotocin,美国 Sigma 公司);兔抗大鼠 Bax 和 Bcl-2 多克隆抗体(北京博奥森生物技术有限公司);SP 免疫组化试剂盒(北京中山金桥生物技术有限公司);DAB 显色液(武汉博士德生物技术有限公司);G6805-2 型电针仪(上海医用电子仪器厂理疗分厂);JPS-6 型全血葡萄糖测试仪(北京怡成生物电子技术有限公司);Olympus 显微镜及成像系统(日本)。

1.2 方法

1.2.1 造模方法 参照已报道的方法^[7],待大鼠禁食 24 h 后,将链脲佐菌素溶解于 1 ml pH4.4 的柠檬酸缓冲液中制成混合溶液(置于冰浴中),对大鼠按 55 mg/kg 腹腔注射刚配制好的混合溶液,5 d 后尾静脉采血,用血糖仪测定大鼠空腹血糖水平,以血糖大于 16.6 mmol/L 者作为成功的糖尿病大鼠模型^[8]。溶剂组大鼠在相同条件下腹腔注射等体积的柠檬酸缓冲液。

1.2.2 分组及处理方法 按随机数字表法将实验大鼠分为正常组、溶剂组,两组大鼠造模成功,每组 8 只。正常组和溶剂组不作任何处理,常规饲养。建立糖尿病大鼠模型,将两组造模成功大鼠随机分成模型组和电针组。模型组正常喂养,不再给予任何处理。电针组大鼠取一侧“足三里”“胰俞”穴,用 30 号 1 寸的不锈

钢毫针刺并接电针仪,选连续波,双侧穴位交替进行,频率为 10 Hz,强度 3 V,以大鼠肢体出现轻微抖动为度,留针 30 min,每天 1 次,连续治疗 4 周。各组大鼠均在相同环境下饲养。

1.2.3 空腹血糖检测 待电针治疗结束后,各组大鼠禁食 24 h,然后进行尾静脉采血,用血糖仪检测大鼠的空腹血糖水平。

1.2.4 组织切片制备及染色反应 各组大鼠经 1%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,再经左心室-升主动脉插管用生理盐水 150 ml 灌流冲洗,再灌注 4%多聚甲醛溶液 300 ml 进行固定,开椎管后切取出与坐骨神经相连的脊髓节段(L_{4~6}),固定、脱水、透明、石蜡包埋。参照大鼠的脑立体定位图谱,连续切片,片厚 5 μm,常规脱蜡至水。分别按相关试剂的说明书进行 Bax、Bcl-2 免疫组织化学染色反应,常规脱水、透明、中性树胶封片,光镜下观察结果。

1.2.5 Bax 及 Bcl-2 阳性细胞计数 随机选取每组各只大鼠的脊髓组织切片 2 张,在 400 倍光学显微镜下,观察前角的背内侧、背外侧、腹内侧、腹外侧 4 个视野内 Bax 和 Bcl-2 免疫阳性细胞并计数,取其均数为单个样本量。

1.2.6 统计学方法 采用 SPSS 16.0 统计软件中的单因素方差分析(ANOVA)对实验数据进行处理和分析,结果用($\bar{x} \pm s$)表示;组间两两比较用 q 检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠的一般状况 实验期间,正常组和溶剂组大鼠神经状况良好,活动灵敏,反应迅速,进食正常,毛色呈有光泽的乳白色,大小便正常。造模成功大鼠于 3 d 后出现多尿、多饮、多食的症状;3 周后,大鼠精神萎靡,反应迟缓,运动缓慢,毛色发黄,进食增多,大便变稀。电针组大鼠随着治疗天数的增加,上述症状较模型组大鼠有所改善,但还未完全恢复到正常组大鼠水平。

2.2 各组大鼠空腹血糖水平的变化 与正常组比较,模型组大鼠的血糖水平明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);经过电针治疗后发现电针组大鼠的血糖水平较模型组明显降低,两组之间的差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

表 1 各组大鼠空腹血糖水平的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	血糖水平(mmol/L)
正常组	6.54±1.34 ^b
溶剂组	6.42±1.18 ^b
模型组	19.93±2.62 ^a
电针组	10.55±0.92 ^b

注:与正常组比较,a: $P < 0.05$;与模型组比较,b: $P < 0.05$

2.3 各组大鼠脊髓前角内 Bax 与 Bcl-2 表达 免疫组织化学结果显示,各组大鼠脊髓前角中均有 Bax 与 Bcl-2 免疫阳性神经元,呈棕黄色,着色部位均定位于细胞浆。与正常组比较,模型组大鼠脊髓前角的 Bax 阳性细胞数目明显增多;但 Bcl-2 阳性细胞数目明显减少,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。与模型组比较,电针组大鼠脊髓前角的 Bax 阳性细胞数目明显减少,Bcl-2 阳性细胞数目明显增多,差异均有统计学意义($P < 0.05$);但电针组、溶剂组和正常组之间的 Bax 与 Bcl-2 阳性细胞数目相互比较的结果差异均无统计学意义($P > 0.05$),见表 2、图 1。

表 2 各组大鼠脊髓前角的 Bax、Bcl-2 阳性细胞数及平均灰度值 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	Bax		Bcl-2	
	细胞数	灰度值	细胞数	灰度值
	(个/400 倍视野)		(个/400 倍视野)	
正常组	21.88±5.19 ^b	131.84±11.30 ^b	47.25±8.41 ^b	65.59±9.17 ^b
溶剂组	21.75±4.59 ^b	119.37±19.53 ^b	50.38±6.84 ^b	74.05±8.85 ^b
模型组	51.13±6.03 ^a	68.30±10.65 ^a	19.75±2.92 ^a	99.83±11.83 ^a
电针组	23.38±3.85 ^b	113.37±11.88 ^b	43.38±5.50 ^b	71.81±4.52 ^b

注:与正常组比较,a: $P < 0.05$;与模型组比较,b: $P < 0.05$

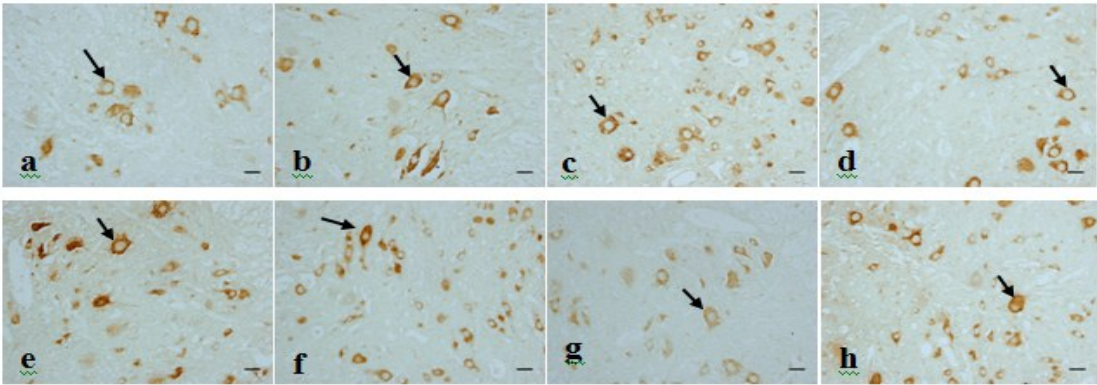


图 1 各组大鼠脊髓前角 Bax 与 Bcl-2 蛋白的表达(SP 法,×400)

注:a 为正常组 Bax 蛋白的表达;b 为溶剂组 Bax 蛋白的表达;c 为模型组 Bax 蛋白的表达;d 为电针组 Bax 蛋白的表达;e 为正常组 Bcl-2 蛋白的表达;f 为溶剂组 Bcl-2 蛋白的表达;g 为模型组 Bcl-2 蛋白的表达;h 为电针组 Bcl-2 蛋白的表达

3 讨论

既往研究资料表明,糖尿病发生时可通过胰岛素缺乏、糖代谢紊乱、氧化应激、血流动力学的改变、微循环的改变等等一些病理因素,导致细胞线粒体功能异常,激活由线粒体介导的内源性细胞凋亡途径,诱导细胞凋亡。糖尿病导致过度的氧化应激,进而产生大量的氧自由基,而氧自由基可使 DNA 内碱基丢失,DNA 断裂、交联,这些变化导致细胞氧化损伤,Ca⁺内流增加及能量耗尽,最终诱发细胞凋亡的产生^[9]。胰岛素缺乏可促进神经细胞线粒体断裂,加速细胞色素 C 从线粒体释放入细胞浆,诱导天冬氨酸特异性的半胱氨酸蛋白水解酶(caspase)的激活,从而发生细胞凋亡^[10-11]。糖尿病发生时,细胞凋亡最常累及神经系统,并引起相应的临床症状^[12]。最近资料发现糖尿病脊髓前角损害的患者出现四肢近端肌肉及双手肌肉萎缩,肌张力及腱反射减低,同时伴有肌束颤动,EMG 提示以前角损害为主的神经源性损害^[2]。那么糖尿病患者四肢出现的肌肉萎缩和肌张力的低下是否与前角神经元的凋亡有关?本实验结果显示链脲佐菌素诱导的糖尿病模型大鼠与正常大鼠相比,脊髓前角神经元凋

亡增加,提示糖尿病发生后脊髓前角运动神经元损伤增加,所支配的四肢骨骼肌有可能出现萎缩,从而引发运动迟缓。

Bax 和 Bcl-2 都为 Bcl-2 基因家族成员,两者都参与线粒体介导的细胞凋亡途径的调控,但两者的作用相反,Bax 为促凋亡基因,而 Bcl-2 为抗凋亡基因。在正常细胞中,Bax 与 Bcl-2 保持一定的比例,从而使细胞能维持正常的数量和寿命。一旦细胞中 Bax 基因表达增加,它的表达产物拮抗 Bcl-2 基因的表达,细胞将执行凋亡命令,启动凋亡程序;若 Bcl-2 表达增多,将能阻止细胞发生凋亡,维持细胞正常的数量和寿命^[13-14]。有研究发现,当糖尿病发生时,细胞在高血糖状态下,促凋亡基因 Bax 表达过度增加,抗凋亡基因 Bcl-2 表达降低,Bax 与 Bcl-2 比值增大,细胞得不到 Bcl-2 的保护而进入凋亡状态,故认为糖尿病高血糖引起的代谢紊乱改变了促凋亡基因与抗凋亡基因之间的平衡,诱导细胞凋亡增加^[15-16]。因此,本实验采用 Bax 和 Bcl-2 作为凋亡检测指标来观察糖尿病模型大鼠及给予电针治疗后脊髓前角中细胞凋亡的变化情况。

在我国针灸治疗糖尿病历史久远,《史记·扁鹊仓公列传》中就记载了世界上最早针灸治疗糖尿病的案例^[17]。糖尿病属中医学“消渴”范畴,消渴病是以多饮、多食、多尿及身体消瘦为主要特征。“足三里”为治疗糖尿病主要穴位,并且针刺“足三里”能引起细胞增殖^[18]。而“胰俞”又名“胃脘下俞”,是治疗糖尿病的经验穴位^[19]。Kim 等发现,电针能促进胰岛素的分泌^[18, 20],所以通过电针治疗能够降低患者的血糖水平。本次实验观察到电针可降低糖尿病大鼠的血糖水平,这与其他学者的研究结果一致^[21]。实验中电针治疗糖尿病大鼠后发现脊髓前角神经元凋亡基因 Bax 的蛋白表达明显降低,抗凋亡基因 Bcl-2 的蛋白表达明显增加,Bcl-2/Bax 的比值上调,接近于正常大鼠 Bcl-2/Bax 的表达水平。说明电针能够上调脊髓前角内抗凋亡基因 Bcl-2 的表达,下调凋亡基因 Bax 的表达,从而逆转由糖尿病导致的神经细胞凋亡。然而,有关电针发挥抗凋亡作用的分子机制尚未完全明了,有研究表明电针阻止细胞凋亡的发生可能与促进胰岛 β 细胞分泌胰岛素、降低糖尿病大鼠体内氧化应激水平及促进神经营养因子的生成等有关^[20-23]。本实验结果显示电针可阻止糖尿病模型大鼠脊髓前角神经元凋亡,这可能是电针改善糖尿病前角损伤的重要作用机制之一,但其具体的作用机制有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] Al-Nimer MS, Al-Ani FS, Ali FS. Role of nitrosative and oxidative stress in neuropathy in patients with type 2 diabetes mellitus[J]. J Neurosci Rural Pract, 2012, 3(1):41-44.
- [2] 李凤友,温秀莲,段建钢.糖尿病性脊髓病[J].卒中与神经疾病,2004,11(1):39-41.
- [3] Kojima H, Kim J, Chan L. Emerging Roles of Hematopoietic Cells in the Pathobiology of Diabetic Complications[J]. Trends Endocrinol Metab, 2014,25(4):178-187.
- [4] 朱智耀,高彦彬,邹大成,等.糖络宁对糖尿病大鼠背根神经节细胞凋亡的影响[J].中国中医基础医学杂志,2012,18(6):616-618.
- [5] 郑小兰,陈陵,徐国海,等.鞘内注射重比重布比卡因对糖尿病神经病变大鼠脊髓神经元凋亡的影响[J].临床麻醉学杂志,2014,30(6):598-601.
- [6] 王玉萍,计磊,李军体,等.针刺对糖尿病周围神经病变的影响[J].中国针灸,2005,25(8):542-544.
- [7] 崔卫刚,郭灵,邓祥发,等.1型糖尿病脑病大鼠学习记忆及侧脑室室管膜下区神经发生的变化[J].四川解剖学杂志,2006,14(3):7-9.
- [8] 黄丽娟,黄彦锋,王映,等.茴香提取液对糖尿病大鼠血清 NO、MDA 和 SD 的影响[J].右江民族医学院学报,2016,38(1):14-16.
- [9] 邱有波,谢少华,杨拯,等.电针联合依达拉奉对糖尿病周

围神经病大鼠坐骨神经传导速度和氧化应激的影响[J].中国康复理论与实践,2012,18(11):1036-1039.

- [10] 卢岩,赵海军,王媛,等.针刺对局灶性脑缺血大鼠血糖和胰岛素水平的影响[J].针刺研究,2013,38(6):435-440.
- [11] Cusi K, Maezono K, Osman A, et al. Insulin resistance differentially affects the PI3-kinase and MAP kinase-mediated signaling in human muscle[J]. J Clin Invest, 2000,105(3):311-320.
- [12] Schmeichel AM, Schmelzer JD, Low PA. Oxidative injury and apoptosis of dorsal root ganglion neurons in chronic experimental diabetic neuropathy[J]. Diabetes, 2003, 52(1):165-171.
- [13] Pepper C, Hoy T, Bentley DP, et al. Bcl-2/Bax ratios in chronic lymphocytic leukaemia and their correlation with in vitro apoptosis and clinical resistance[J]. British Journal of Cancer,1997,76(7):935-938.
- [14] 涂杰,梁东科,刘国锋,等.远程缺血预处理对大鼠体外循环后肺泡上皮细胞凋亡与相关蛋白 Bax、Bcl-2 表达的影响[J].右江民族医学院学报,2015,37(2):180-182.
- [15] Ekshyyan O, Aw TY. Apoptosis:a key in neurodegenerative disorders[J]. Curr Neurovasc Res, 2004,1(4):355-371.
- [16] Srinivasan S, Stevens M, Wiley JW. Diabetic peripheral neuropathy: evidence for apoptosis and associated mitochondrial dysfunction[J]. Diabetes,2000,49(11):1932-1938.
- [17] 林亚平,万全荃,彭艳,等.电针对糖尿病胃轻瘫大鼠胃窦促生长素 mRNA,生长脊髓促分泌素受体 mRNA 表达的影响[J].针刺研究,2015,40(4):290-295.
- [18] Kim EH, Jang MH, Shin MC, et al. Acupuncture increases cell proliferation and neuropeptide Y expression in dentate gyrus of streptozotocin induced diabetic rats[J]. Neurosci Lett, 2002, 327(1):33-36.
- [19] 晋志高,何原芳,景向红.针刺对糖尿病大鼠海马和杏仁核 CREB 表达的影响[J].中国中医基础医学杂志,2011,17(1):102-105.
- [20] 孙娜,崔健美,刘慧娟,等.针刺预防及治疗对糖尿病大鼠血糖血脂的影响[J].中国老年学杂志,2015,32(1):167-168.
- [21] 马萍,纪中,于航,等.电针对糖尿病大鼠学习记忆障碍及海马 NT-3 表达的影响[J].中国比较医学杂志,2008,18(8):14-17.
- [22] 张业贵,熊克仁.电针联合复方丹参片对慢性脑缺血大鼠海马 CA1 区脑源性神经营养因子和血管内皮生长因子表达的影响[J].中国中西医结合杂志,2012,32(5):643-646.
- [23] Pacher P, Szabó C. Role of Poly(ADP-Ribose) Polymerase-1 Activation in the Pathogenesis of Diabetic Complications: Endothelial Dysfunction, as a Common Underlying Theme[J]. Antioxidants & Redox Signaling, 2005, 7(11-12):1568-1580.

收稿日期:2016-02-22;修回日期:2016-03-23