电针曲池-阳陵泉对脑卒中痉挛大鼠的解痉作用

郭 斌¹, 王彭汉¹, 黄麟苻¹, 谢志强¹, 谢丽娜¹, 刘未艾², 易丽贞¹, 刘 欣¹, 岳增辉^{1*}

1 湖南中医药大学针灸推拿学院, 湖南 长沙 410208;

2 湖南中医药大学第二附属医院, 湖南 长沙 410208

* 通信作者: 岳增辉, E-mail: 624755064@qq.com

收稿日期: 2019-10-07; 接受日期: 2019-12-11

基金项目: 国家自然科学基金项目(81673886); 国家重点基础研究发展计划“973”中医专项(2014CB543102); 湖南省自然科学基金

基金项目(2018JJ2294); 湖南省中医药科研计划项目(201862); 2018 年湖南省研究生科研创新项目(CX2018B488)

DOI: 10.3724/SP.J.1329.2020.01011

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

摘要 目的: 观察电针曲池-阳陵泉对脑卒中痉挛状态(SCA)下 SD 大鼠神经损伤与肌张力情况、海马区突触超微形态变化、脑源性神经营养因子(BDNF)、酪氨酸蛋白激酶 B(TrkB)蛋白及基因表达等变化的影响, 揭示电针缓解痉挛的中枢作用机制。**方法:** 将 36 只 SD 大鼠通过随机数字表法分为电针组、假手术组、模型组、空白对照组, 每组 9 只。采用改良 Zea-Longa 线栓法+内囊注射 N-甲基-D-天冬氨酸受体(NMDA)法制备脑卒中肢体痉挛大鼠模型, 行为学评分确认造模成功后, 开始在双侧曲池、阳陵泉行电针治疗, 密波, 100 Hz, 电压 20 V, 每次 30 min, 每日 1 次, 持续 5 d。行为学检测治疗后的神经功能与肌张力情况, 电镜观察海马内突触的超微结构变化, 采用 RT-PCR 和 Western blot 分别检测海马中 BDNF-TrkB 相关基因与蛋白的表达。**结果:** ① 模型组与空白对照组、假手术组比较, 神经功能和肌张力评分明显增高($P<0.01$); 电针组与模型组比较, 神经功能和肌张力评分下降($P<0.05$)。② 模型组突触数目明显减少, 前后膜及间隙边界模糊, 突触囊泡数目显著减少、密度不均, 突触后细胞终末胞质严重破坏, 突触后致密带密度降低; 电针组较模型组突触密集, 突触形态较接近假手术组, 突触囊泡数量较模型组增多, 凹形突触增加, 突触后细胞终末胞质变性溶解显著减轻, 致密物增厚, 间隙减小。③ 电针组与模型组比较, BDNF-TrkB 蛋白及基因的表达明显升高($P<0.05$); 而模型组与空白对照组、假手术组比较, BDNF-TrkB 蛋白及基因的表达均明显降低($P<0.01$)。**结论:** 电针曲池-阳陵泉可以调节脑卒中肢体痉挛, 其作用机制可能是通过调节大脑海马体内 BDNF-TrkB 的基因与蛋白的表达, 促进海马区神经突触的重塑而实现的。

关键词 脑卒中; 痉挛; 电针; 曲池; 阳陵泉; 脑源性神经营养因子; 酪氨酸蛋白激酶 B

脑卒中是危害中老年人群体生命健康的常见病和多发病之一。在我国城乡脑卒中中每年发病率在 200 万以上人次, 年死亡人数在 80~120 万左右, 70% 的存活者中有不同程度的功能障碍, 一定程度上影响了患者以后的生活质量^[1]。脑卒中痉挛状态(spasticity of cerebral apoplexy, SCA)属于上运动神经元综合征的组成部分, 表现为肌张力增高, 因牵张反射兴奋性增高导致了以速度依赖性肌肉张力增高并伴随腱反射亢进的运动障碍^[2]。中医针对

其采用了多种方法进行治疗^[3], 其中临床上电针治疗效果显著已有报道^[4-5]。密波能降低神经应激能力, 先对感觉神经起抑制作用, 接着对运动神经也产生抑制作用, 临床上常用于缓解肌肉和血管的痉挛^[6]。实验过程中我们发现 100 Hz 时大鼠肢体抖动明显, 治疗效果较佳, 但并未有实验研究深入说明其作用机制。

大量研究发现, 缺血性卒中后初期中枢神经系统的脑源性神经营养因子(brain derived neurotroph-

引用格式: 郭斌, 王彭汉, 黄麟苻, 等. 电针曲池-阳陵泉对脑卒中痉挛大鼠的解痉作用[J]. 康复学报, 2020, 30(1): 52-57, 63.

GUO B, WANG P H, HUANG L X, et al. Mechanism of electroacupuncture Quchi (LI 11)- Yanglingquan (GB 34) in rats with spasticity of cerebral apoplexy [J]. Rehabilitation Medicine, 2020, 30(1): 52-57, 63.

DOI: 10.3724/SP.J.1329.2020.01011

ic factor, BDNF)表达明显增高,从而显著减轻大脑的损伤,抑制神经元的坏死^[7]。成熟的 BDNF 与酪氨酸蛋白激酶 B (TrkB)相结合,是长时程增强(long-term potentiation, LTP)的关键与必要条件^[8]。相关神经电生理研究认为 LTP 是神经损伤后调节功能恢复与突触相关的机制。1973 年 BLISS 和 LOMO 第一次报道了海马体 LTP 作用,随后人们发现缺血缺氧诱导海马 LTP 发生,病理状态下 LTP 下降导致 Ca^{2+} 的增高,锥体细胞内多巴胺、N-甲基-D-天冬氨酸受体(N-methyl-D-aspartic acid receptor, NMDA)等神经递质表达使得皮质兴奋增强。针刺可以提高海马区 LTP 的幅度^[9],提示 BDNF 能够促进海马区 LTP,从而影响皮质突触的可塑性进而对皮质投射的重建起作用^[10]。我们前期试验结果显示,电针曲池-阳陵泉可以通过改善谷氨酸、 γ -氨基丁酸、多巴胺等神经递质的分泌表达来调节 SCA^[11-12],但还未深入说明其作用机制。本研究拟通过实验研究,揭示电针治疗脑卒中痉挛的作用机制与脑可塑性的相关性。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康成年的 SPF 级 SD 雄性大鼠共 36 只,体重(240±30)g,由具有相关资格的湖南中医药大学实验动物中心提供,合格证编号[XC XK(湘)2009-0004],投喂普通饲料。实验前将动物置于动物房 1 周以适应环境,室温(25±2)℃,相对湿度 65%~70%。自然光照,自由进食、饮水。

1.2 药品与仪器

水合氯醛(北京索莱宝); β -actin(Bioswamp); SYN (abcam); PSD95 (abcam); GABA Transporter 1 (abcam); DL2000 DNAMarker (Genstar); 逆转录试剂盒 (Fermentas); PVDF 转移膜(millipore); 引物(上海生工); 荧光定量 PCR 仪(Bio-Rad); PCR 仪(Eppendorf 公司);电泳仪(Bio-Rad);酶标仪(雷勃);全自动化学发光分析仪(上海天能)。

1.3 动物分组

将 36 只大鼠采用 Rand 函数随机分入 4 组,即空白对照组、假手术组、模型组、电针组(模型+电针刺双侧阳陵泉、曲池),每组 9 只。

1.4 造模方法

采用改良 Zea-Longa 线栓法+内囊注射 NMDA 法制作 SCA 大鼠模型^[13]。10%水合氯醛 3 mL/kg 腹腔注射进行麻醉。大鼠麻醉成功后,仰卧位固定在

操作台上,备皮、消毒、铺巾,沿颈部正中偏右切口,钝性分离大鼠右侧颈总动脉和迷走神经,再向上暴露颈总动脉分叉处、颈内动脉与颈外动脉;在颈总动脉远心端、颈内动脉近心端、颈外动脉近心端备用 6-0 丝线,分别结扎颈外动脉近心端、颈总动脉远心端,动脉夹夹闭颈内动脉;离颈总动脉分叉膨大 5 mm 处做一小切口,将栓线经切口插入颈内动脉,松开动脉夹,栓线深度约 18~20 mm 时稍感阻力停止插线;插线完毕后,将颈内动脉近心端和栓线一起结扎,逐层缝合切口;大鼠清醒后纳入 Zea-Longa 评分为 1~3 分的大鼠第 2 天再行内囊注射 NMDA 法^[14]。麻醉成功后,将大鼠以俯卧固定于大鼠脑立体定位仪上,大鼠头顶部备皮、消毒、铺巾;沿大鼠颅顶矢状缝作纵行切口,长约 2 cm,逐层分离暴露前囟,止血钳向两侧拉开,暴露右侧顶骨和额骨交界骨缝;按《大鼠立体定位图谱》确定内囊位置,用牙科钻在标记点上钻一直径约 2 mm 小孔,将微量注射器垂直插入 7 mm,缓慢注射 5 μ L NMDA,注射时间维持 5 min。注射完毕后拔出微量注射器,之后用明胶海绵小心压迫止血,并用碘伏消毒;逐层缝合切口。术后均予以青霉素抗感染;按 0.1 mg/kg 剂量腹腔注射速尿,防止脑水肿;术后予葡萄糖水及饲料喂养,单笼饲养,保持呼吸道通畅。大鼠苏醒后, Ashworth 肌张力评分 ≥ 1 分, Zea-Longa 评分 1~3 分,说明脑卒中后肢体痉挛模型成功。

1.5 各组处置

1.5.1 模型组 进行造模手术后,饲料喂养,投喂葡萄糖注射液,青霉素 80 万 U/d 肌肉注射,共 4 d。

1.5.2 假手术组 同模型组,只做分离,不结扎也不插线。

1.5.3 电针组 大鼠捆绑束缚于鼠板上,采用华佗牌 0.30 mm×13 mm 一次性使用针灸针,75%乙醇棉签常规消毒,得气后选用 SDZ-V 电针治疗仪导线的正负极,密波,100 Hz,电压 20 V,连接刺激电极,正极接在肢体一侧的阳陵泉穴毫针针柄,负极接在同侧曲池穴毫针针柄,以形成刺激回路,以大鼠肢体轻微抖动为度。每次 30 min,每天 1 次,连续治疗 5 d。

1.5.4 空白对照组 常规饲养,不做任何处理。

除空白对照组外,各组均同电针组一样束缚 30 min,连续 5 d。

1.6 穴位定位

结合解剖学知识,根据郭义主编《实验针灸学实验指导》^[15]的“动物针灸穴位图谱”进行大鼠穴位

定位。① 阳陵泉:距足三里(大鼠膝关节下侧腓骨小头下约 3 mm)上外侧 5 mm,直刺 3 mm。② 曲池:桡骨近端的关节外侧前方的凹陷中,直刺 3 mm。

1.7 动物行为学检测

治疗 5 d 后,结合 Zea-Longa 神经功能评分标准^[16]与改良 Ashworth 肌张力评分标准^[17]进行评分,见表 1 和表 2。

表 1 Zea-Longa 神经功能评分法

Table 1 Zea-Longa neurological score method

等级	标准
0	无神经功能缺损,可正常活动
1	神经功能轻微缺损,不能完全伸展患侧的前爪
2	神经功能中度缺损,向患侧转圈
3	神经功能重度缺损,向患侧倾斜
4	不能自发行走,意识水平下降,甚至意识丧失
5	死亡

表 2 改良 Ashworth 肌张力评分法

Table 2 Modified Ashworth muscle tone score method

等级	标准
0	无肌张力增高,活动自如
1	肌张力轻微增加,抓握中被动屈伸至最后有小的阻力
1+	肌张力轻度增加,抓握至一半关节活动度(ROM)以上有轻度阻力增加
2	肌张力在大部分 ROM 中都有较大增加,但肢体被动运动容易
3	肌张力明显增高,被动活动明显困难
4	受累部分肢体强直性屈曲或伸直

1.8 电镜观察大鼠海马突触超微结构变化

冰盘上取患侧大脑半球迅速剥离出海马,切成体积为 1 mm³左右大小的米粒状,置于 2%戊二醛混合固定液固定、脱水、渗透、包埋后,制成 70 nm 的超薄切片,行醋酸铀-柠檬酸铅双染色,H7650 透射电镜观察并采集照片。

1.9 RT-PCR 检测大脑海马 BDNF-TrkB 基因表达

行为学检测后断头处死动物,冰盘上取患侧大脑半球迅速剥离出海马,切取一部分称取质量后加 Trizol 匀浆离心(12 000 r/min,15 min)后转移上清液至防冻管,放液氮中迅速降温 1 d,随后放入 -80 ℃冰箱储存,供 RT-PCR 检测。经提取组织总 RNA;mRNA 逆转录成 cDNA;梯度 PCR 技术扩增目的基因;数据采用仪器自带软件 Qbase Plus 分析,计算 PCR 产物的 RQ 值,见表 3。

表 3 BDNF-TrkB 受体引物设计

Table 3 BDNF-TrkB receptor primer design

BDNF 受体(DRD1)	TrkB 受体(NTRK2)
上游:TCACAGCGGCAGAT AAA 下游:TGGGTAGTTCGGCA TT 产物长度为 193 bp	上游:CTTATGCTTGCTGGT CTT 下游:CTCTGGGTCAATGC TGT 产物长度为 148 bp

1.10 Western blot 检测大脑海马 BDNF-TrkB 蛋白表达

行为学测试结束后,麻醉断头,在冰盒上取大鼠患侧海马,切取一部分称取质量后加 Trizol 匀浆离心(12 000 r/min,15 min)后转移上清液至防冻管,放液氮中迅速降温 1 d,随后放入 -80 ℃冰箱储存,供 Western blot 检测。对海马组织进行蛋白提取,并进行蛋白定量,制胶,上样跑电泳,转膜,孵育显色后利用 Tanon GIS 软件获取相关条带灰度值。

1.11 统计学方法

所有数据采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析。全部计量资料用样本含量、($\bar{x}\pm s$)或中位数(四分位间距)[$n, M(Q)$]表示,所有数据均进行正态性和方差齐性检验。组内治疗前后比较,满足正态性及方差齐性时,采用配对 t 检验;不满足正态性或方差齐性时,则采用非参数检验。多组间计量资料采用单因素方差分析(One-Way ANOVA),方差不齐时采用 Dunnett T3 法,方差齐时采用 LSD- t 法;不满足正态性时采用秩和检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 大鼠的一般情况

整个实验进行期间,空白对照组精神状况尚可,活动敏捷,摄食摄水量均正常。造模手术过程中部分大鼠发生死亡,随即补充相应数量大鼠纳入保证每组数量为 9 只。模型组精神欠佳,活动严重受限,体质量逐渐降低、摄食摄水量明显减少。电针组治疗第 3 天开始出现活动受限程度、精神状况、摄食摄水量均较前改善。

2.2 行为学检测结果

见表 4 和表 5。

表 4 4 组大鼠神经功能评分情况比较[M(Q)]

Table 4 Comparison of neurological scores in four rat groups [M(Q)]

组 别	n	治疗前	治疗后
空白对照组	9	0(0) ¹⁾	0(0) ¹⁾
假手术组	9	0(0) ¹⁾	0(0) ¹⁾
模型组	9	3(1)	3(1)
电针组	9	3(1)	0(2) ²⁾

注:与模型组比较,1) $P<0.01$,2) $P<0.05$ 。

Note: Compared with the model group, 1) $P<0.01$, 2) $P<0.05$.

表 5 4 组大鼠肌张力 Ashworth 评定情况[M(Q)]

Table 5 Ashworth assessment of muscle tension in four rat groups [M(Q)]

组 别	n	治疗前	治疗后
空白对照组	9	0(0) ¹⁾	0(0) ¹⁾
假手术组	9	0(0) ¹⁾	0(0) ¹⁾
模型组	9	3(1)	3(1)
电针组	9	3(0)	1(1) ²⁾

注:与模型组比较,1) $P<0.01$,2) $P<0.05$ 。

Note: Compared with the model group, 1) $P<0.01$, 2) $P<0.05$.

表 4 和表 5 结果提示本实验中脑卒中肢体痉挛大鼠的模型是成功的;电针治疗能够明显降低神经损伤的症状和缓解大鼠肌张力紧张的症状,从而可以抗痉挛。

2.3 4 组大鼠海马突触超微结构的变化

见图 1(A 为突触细胞;B 为前后膜及间隙;C 为突触后致密带;D 为凹形突触)。

图 1 4 组大鼠海马突触超微结构的变化比较

Figure 1 Comparison of changes of synaptic ultrastructure in rat hippocampus of four groups

电镜下观察,模型组较空白对照组、假手术组突触数量减少明显,囊泡数量减少密度不均,前后膜及间隙发生融合界限模糊,突触后细胞终末胞质变性溶解显著,突触后致密带的密度也下降;电针组较模型组的突触数量明显增多也相对密集,囊泡数量增多,新生的凹形突触增加,突触后致密物增厚,间隙变得规则紧致。

2.4 电针对 4 组大鼠大脑海马内 BDNF-TrkB 基因表达的影响

见图 2 和表 6。

注:与模型组比较,1) $P<0.01$,2) $P<0.05$ 。

Note: Compared with the model group, 1) $P<0.01$, 2) $P<0.05$.

图 2 电针对 4 组大鼠大脑海马内 BDNF-TrkB 基因表达的影响

Figure 2 Effect of electroacupuncture on BDNF-TrkB gene expression in rat hippocampus of four groups

表 6 电针对 4 组大鼠大脑海马内 BDNF-TrkB 基因表达的影响($\bar{x}\pm s$)

Table 6 Effect of electroacupuncture on BDNF-TrkB gene expression in rat hippocampus of four groups ($\bar{x}\pm s$)

组 别	n	BDNF mRNA 相对表达量	TrkB mRNA 相对表达量
空白对照组	9	1.00±0.00 ¹⁾	1.00±0.00 ¹⁾
假手术组	9	0.96±0.04 ¹⁾	0.94±0.04 ¹⁾
模型组	9	0.42±0.10	0.43±0.03
电针组	9	0.62±0.05 ²⁾	0.53±0.05 ²⁾

注:与模型组比较,1) $P<0.01$,2) $P<0.05$ 。

Note: Compared with the model group, 1) $P<0.01$, 2) $P<0.05$.

图 2 和表 6 结果提示电针可以提高 BDNF-TrkB 基因的活性,二者结合激活 Ras-MEK-MAPK-ERK 通路,通过促进核转录因子 CAMP 反应元件结合蛋白(CREB)的磷酸化,促进相关基因表达,引起抗凋亡蛋白 Bcl-2 的激活^[18],恢复神经细胞,从而减轻痉挛的状况,使机体患肢的运动状况得到改善。

2.5 电针对 4 组大鼠大脑海马内 BDNF-TrkB 蛋白表达的影响

见图 3、图 4 和表 7。结果提示电针可以提高 BDNF-TrkB 蛋白在大脑海马内的表达。

注:与模型组比较,1) $P<0.01$,2) $P<0.05$ 。
Note: Compared with the model group, 1) $P<0.01$, 2) $P<0.05$ 。

图 3 电针对 4 组大鼠大脑海马内 BDNF-TrkB 蛋白表达的影响

Figure 3 Effect of electroacupuncture on expression of BDNF-TrkB protein in rat hippocampus of four groups

图 4 4 组大鼠大脑海马内 BDNF-TrkB 蛋白条带结果
Figure 4 Results of BDNF-TrkB protein bands in rat hippocampus of four groups

表 7 电针对 4 组大鼠大脑海马内 BDNF-TrkB 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 7 Effect of electroacupuncture on expression of BDNF-TrkB protein in rat hippocampus of four groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	BDNF	TrkB
空白对照组	9	$0.56 \pm 0.01^{1)}$	$0.93 \pm 0.05^{1)}$
假手术组	9	$0.56 \pm 0.01^{1)}$	$0.89 \pm 0.04^{1)}$
模型组	9	0.30 ± 0.00	0.37 ± 0.01
电针组	9	$0.41 \pm 0.02^{2)}$	$0.52 \pm 0.04^{2)}$

注:与模型组比较,1) $P<0.01$,2) $P<0.05$ 。
Note: Compared with the model group, 1) $P<0.01$, 2) $P<0.05$ 。

3 讨论

BDNF 广泛参与脑卒中的恢复过程^[19]。BDNF

作为神经系统发育过程中的关键信号分子,是在脑内合成的一种小分子的碱性蛋白,对神经系统的发育非常重要^[20]。它主要分布在海马、大脑皮质等区域,能够维持神经元的存活,促进新生神经元的生长、分化以及突触的形成,是人体自出生之后神经系统中最活跃的化学因子之一^[21]。TrkB 是 BDNF 的特异性受体,其高度结合后所引发的 BDNF 信号通路可以通过参与调节突触功能和结构的可塑性来促进神经的发育与再生^[22]。同时,通过研究证明了针灸能调节 BDNF 信号,促使其与突触相关蛋白协助促进神经功能恢复。BDNF-TrkB 蛋白是神经元受损中保护其存活和促进其再生的必需因子,其可以修复神经元细胞调节突触细胞的恢复,促进新神经元的生长、发育、分化、存活,调节突触结构等中枢神经系统的多种神经可塑性^[23],使得神经功能恢复,最终使机体的运动状况得到改善。

SCA 发生的物质基础是神经递质的失衡和紊乱。GABA 作为抑制性递质的代表性物质,在大脑中枢中含量很高,与机体运动系统密不可分。本课题组前期对电针调节 GABA 进行了相关研究^[11-12],结果表明电针可以调节 GABA 及其 mRNA 的表达。脑卒中时大脑出现缺血缺氧状况,敏感性高的海马中神经细胞大量死亡,神经元细胞的大量损伤直接影响了各种神经递质在突触的交换以及细胞内外离子的交换,从而使下元神经抑制作用丧失或部分丧失,呈现高肌张力的痉挛状态。而其他研究表明,BDNF-TrkB 与 GABA 之间可以相互调节,GABA 能够促进 BDNF 的转运与表达^[24],BDNF 也可以促进 GABA 的转录活性^[25],BDNF 通过与 GABA 之间的关系间接地影响了 SCA。

海马是大脑中更容易受缺血损伤的部位之一。在海马的 CA1 区,LTP 的产生需要激活 NMDA 受体和增加细胞内钙离子的浓度。在生理条件下诱导 LTP 是由 NMDA 受体介导,但 LTP 的表达是由 AMPA 受体介导的持久稳固增加的突触电流产生。当 SCA 发生时,海马发生缺血性 LTP,诱导锥体神经元的选择性和延迟性恶化。只有通过神经营养因子发生作用,LTP 的频率才会高表达,进而促进突触的功能重塑,使得皮质相关的突触传递恢复正常,运动功能得到恢复。

本实验通过行为学检测证明了电针曲池-阳陵泉可以缓解 SCA,在电镜下观察发现电针曲池-阳

陵泉能够促进海马突触发生重构,RT-PCR 和 Western blot 分别检测发现海马中 BDNF-TrkB 蛋白与基因呈现高表达,其促进海马区 LTP 的高频率表达,影响神经递质,调节皮质运动区神经兴奋功能,使得运动功能恢复正常,从而缓解 SCA。

参考文献

- [1] 沈显山,吴建贤,洪永锋,等.局部振动在脑卒中康复的应用进展[J].中国康复医学杂志,2018,33(11):1370-1373.
- [2] 李瑞青,任亚锋,吴明莉,等.脑卒中后肢体痉挛的评定研究进展[J].中国康复医学杂志,2018,33(6):742-745.
- [3] 刘未艾,岳增辉,陈建宏,等.脑卒中肢体痉挛状态的中医药研究进展[J].时珍国医国药,2018,29(4):953-955.
- [4] 徐蓉贞,卢建新,王天然.电针结合康复疗法对脑卒中后肌肉痉挛状态的影响观察研究[J].临床医药文献电子杂志,2018,5(102):163.
- [5] 田梦,娄天伟,冷军.手针联合电针治疗脑卒中手痉挛患者的临床疗效观察[J].中国针灸,2017,37(9):932-935,937.
- [6] 毛雪莲,秦思,金荣疆,等.电针对脑卒中肢体痉挛大鼠 γ -氨基丁酸代谢酶的影响[J].中国康复医学杂志,2018,33(1):22-28.
- [7] 官俏兵,韩晨阳,储志远,等.丁苯酞通过激动 cAMP-CREB-BDNF 信号通路改善小鼠缺血再灌注后认知障碍的作用机制[J].中国临床药理学与治疗学,2019,24(2):152-157.
- [8] PHILLIPS C. Brain-derived neurotrophic factor, depression, and physical activity: making the neuroplastic connection [J]. Neural Plast, 2017, 2017: 7260130.
- [9] 徐振华. 针刺不同刺激量对脑缺血后功能恢复及突触可塑性促进作用的研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2005: 73-74.
- [10] 张媛媛,张校军,杨骏,等.化癥通络灸对血管性痴呆大鼠学习记忆能力及海马 BDNF-TrkB 表达的影响[J].中国针灸,2019,39(1):65-71.
- [11] 郭斌,岳增辉,谢志强,等.电针对脑卒中痉挛状态大鼠大脑皮质中谷氨酸与 γ -氨基丁酸二者受体表达的影响[J].中华中医药杂志,2019,34(1):325-327.
- [12] 郭斌,岳增辉,谢志强,等.针刺调节大鼠在脑卒中痉挛状态下黑质纹状体内相关神经兴奋-抑制因子受体的研究[J].中华中医药杂志,2019,34(7):3201-3203.
- [13] 岳增辉,谢志强,谢莉娜,等.脑卒中后肢体痉挛大鼠模型制备方法[J].中国中医药现代远程教育杂志,2019,17(5):129-131.
- [14] 刘鸿燕,周奇志,蔡定均,等.构建大鼠内囊电毁损痉挛模型[J].四川生理科学杂志,2008,30(2):61-63.
- [15] 郭义.实验针灸学实验指导[M].北京:中国中医药出版社,2012:47-48.
- [16] 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.
- [17] BOHANNON R W, SMITH M B. Interrater reliability of a modified Ashworth scale of muscle spasticity [J]. Phys Ther, 1987, 67(2): 206-207.
- [18] 樊凌,吕爱平,符文彬,等.针刺对抑郁症大鼠海马 5-HT、NE、BDNF 水平和神经元细胞凋亡相关基因表达的影响[J].中华中医药杂志,2016,31(8):3204-3207.
- [19] 黄健婷,罗晓舟,崔韶阳,等.针刺结合康复训练对缺血性脑卒中患者吞咽障碍临床疗效观察及对血清 BDNF 的影响[J].中华中医药杂志,2019,34(2):830-833.
- [20] 于广石,周小荣.鼠神经生长因子对脑梗死患者 VEGF、BDNF、IGF-1 及血清细胞因子水平的影响[J].中国临床研究,2019,32(3):381-384.
- [21] 姬文晨,蒋婉婷,马兴,等.稳定过表达 BDNF 和 NT-3 基因的脂肪干细胞系的建立及其意义[J].西安交通大学学报(医学版),2019,40(3):393-398.
- [22] 丁宁.基于杏仁核 BDNF-TrkB-ERK 信号通路探究“安神醒脑调肾”电针法对 PTSD 大鼠恐惧记忆的影响[D].成都:成都中医药大学,2018:14-15.
- [23] 呼日乐巴根,松林,乌兰其其格,等.肉苁蓉五味丸对慢性应激性抑郁症大鼠学习记忆能力及海马 BDNF-TrkB 蛋白表达的影响[J].中华中医药杂志,2017,32(8):3797-3800.
- [24] FUKUCHI M, KIRIKOSHI Y, MORI A, et al. Excitatory GABA induces BDNF transcription via CRTCL and phosphorylated CREB-related pathways in immature cortical cells [J]. J Neurochem, 2014, 131(2): 134-146.
- [25] COLINO-OLIVEIRA M, ROMBO D M, DIAS R B, et al. BDNF-induced presynaptic facilitation of GABAergic transmission in the hippocampus of young adults is dependent of TrkB and adenosine A2A receptors [J]. Purinergic Signal, 2016, 12(2): 283-294.

(下转第 63 页)

Betulinic Acid Inhibits the Metastasis of Colon Cancer Cells through Regulating TGF- β /Smad Signaling Pathway

LIN Xiaoying^{1,2}, SHEN Ailing^{1,2}, WU Meizhu^{1,2}, CHENG Ying^{1,2}, CHEN Xiaoping^{1,2}, LIU Huixin^{1,2}, LIU Liya^{1,2}, SHEN Zhiqing^{1,2}, WU Xiangyan^{1,2}, XU Nanhui^{1,2}, CHU Jianfeng^{1,2}, CHEN Youqin^{1,2,3*}, PENG Jun^{1,2*}

¹ Academy of Integrative Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, Fujian 350122, China;

² Fujian Key Laboratory of Integrative Medicine on Geriatrics, Fuzhou, Fujian 350122, China;

³ School of Medicine of Case Western Reserve University, Cleveland, Ohio 44106, USA

*Correspondence: CHEN Youqin, E-mail: yxc571@case.edu; PENG Jun, E-mail: pjunlab@hotmail.com

ABSTRACT Objective: To explore the effect of betulinic acid (BA) on the growth and metastasis of colon cancer cell line HCT116 and the underlying possible mechanism. **Methods:** HCT116 cells were cultured with McCoy's 5A medium containing 10% fetal bovine serum and 1% penicillin/streptomycin mixed solution in a 37 °C, 5% CO₂ incubator. HCT116 cells were seeded at a density of 0.2×10^5 cells/mL in a 96-well plate and cultured overnight. Then the cells were treated with different concentrations (0, 10, 20, and 40 $\mu\text{mol/L}$) of BA for 24, 48 and 72 h, respectively. And then CCK8 was added to detect its absorbance (*A* value) at 450 nm. HCT116 cells were seeded at a density of 0.4×10^5 cells/mL in a 12-well plate and cultured overnight. The cells were then collected by digestion and centrifugation, and stained with trypan blue after treating with different concentrations (0, 10, 20, and 40 $\mu\text{mol/L}$) of BA for 48 h. The total number of cells was calculated by using a Countstar BioMed automatic cell counter. HCT116 cells were seeded at a density of 0.4×10^5 cells/mL in a 12-well plate and cultured overnight. Then the cells were collected by digestion and centrifugation after treating with different concentrations (0, 10, 20, and 40 $\mu\text{mol/L}$) of BA for 48 h. 1.0×10^5 cells/mL cell suspension was used for the Transwell experiment of cell migration and invasion, respectively. The effects of different concentrations of BA intervention for 48 h on the migration and invasion ability of HCT116 were analyzed. Western blot was used to detect the effect of BA on the protein expression of TGF- β and Smad2/3 in HCT116 cells after treated with BA for 48 h. **Results:** (1) CCK8 assay showed that the cell viability in each group was significantly reduced after treatment with different concentrations of BA for 24, 48 and 72 h, and the differences were statistically significant compared with the 0 $\mu\text{mol/L}$ group respectively ($P < 0.05$); The cell count results showed the number of cells in each group was remarkably decreased, and the differences were statistically significant compared with the 0 $\mu\text{mol/L}$ group respectively ($P < 0.05$). (2) Transwell assay showed that the number of cells that migrated or invaded into the membrane was profoundly inhibited in each group after treatment with different concentrations of BA for 48 h, and the differences were statistically significant compared with the 0 $\mu\text{mol/L}$ group respectively ($P < 0.05$). (3) Western blot assay showed that the protein expression of TGF- β and Smad2/3 was obviously decreased in each group after treated with different concentrations of BA for 48 h compared with the 0 $\mu\text{mol/L}$ group. **Conclusion:** BA can inhibit the growth and metastasis of colon cancer cells, and its mechanism may be achieved by regulating the TGF- β /Smad signaling pathway.

KEY WORDS colon cancer; betulinic acid; transfer; TGF- β /Smad signaling pathway

DOI: 10.3724/SP.J.1329.2020.01012

(上接第 57 页)

Mechanism of Electroacupuncture Quchi (LI 11)-Yanglingquan (GB 34) in Rats with Spasticity of Cerebral Apoplexy

GUO Bin¹, WANG Penghan¹, HUANG Linxing¹, XIE Zhiqiang¹, XIE Lina¹, LIU Weiai², YI Lizhen¹, LIU Xin¹, YUE Zenghui^{1*}

¹ The School of Acupuncture, Moxibustion & Tuina, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China;

² Second Affiliated Hospital of Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China

*Correspondence: YUE Zenghui, E-mail: 624755064@qq.com

ABSTRACT Objective: The purpose of this study is to analyze the effects of electroacupuncture Quchi (LI 11)-Yanglingquan (GB 34) in Sprague-Dawley (SD) rats with spasticity of cerebral apoplexy (SCA) on the nerve injury, ultrastructural changes in synapses, and brain derived neurotrophic factor (BDNF), tyrosine protein kinase B (TrkB) and receptor gene expression levels in hippocampus, so as to reveal the efficacy and mechanism of electroacupuncture. **Methods:** A total of thirty-six SD rats were randomly divided into electroacupuncture group, sham operation group, model group and blank group, with nine SD rats in each group. A rat model of stroke and limb paralysis was prepared by modified Zea-Longa suture method and internal capsule injection of NMDA receptor method. The behavioral scoring confirmation model was followed by electroacupuncture treatment for five days. The ultrastructural changes of synapses in hippocampus were observed by electron microscopy. The expressions of BDNF and TrkB related genes in hippocampus were detected by RT-PCR. The expression of BDNF and TrkB protein in hippocampus was detected by Western blot. **Results:** (1) The neurological scores and Ashworth assessment of muscle tension in the model group were significantly higher compared with those in the blank group and the sham operation group respectively ($P < 0.01$). Compared with the model group, the neurological scores and Ashworth assessment of muscle tension in the electroacupuncture group were statistically significant ($P < 0.05$). (2) The number of synapses in the model group was significantly reduced and the anterior and posterior membranes and gaps were blurred. Besides, the number of synaptic vesicles was significantly reduced, the density uneven, the terminal cytoplasm of the postsynaptic cells severely damaged, and the dense density of postsynaptic bands decreased; The electroacupuncture group was denser than the model group, and the synaptic shape was closer to the sham operation group. The number of synaptic vesicles, the concave synapses increased, while the post-synaptic cell terminal cytoplasmic degeneration was significantly reduced compared with the model group. In addition, the dense substance thickened and the gap was narrowed. (3) The expression of BDNF-TrkB protein and gene in the electroacupuncture group increased significantly compared with that in the model group ($P < 0.05$). The expression of BDNF-TrkB protein and gene in the model group decreased significantly compared with that in the blank group and the sham operation group respectively ($P < 0.01$). **Conclusion:** Electroacupuncture Quchi (LI 11)-Yanglingquan (GB 34) regulate the expression of BDNF-TrkB gene and protein in hippocampus of the brain. High expression of the neurotrophic factor in hippocampus may promote the remodeling of synapses and improve the motor function of the central nervous system, thus achieving the relief of spasticity.

KEY WORDS stroke; spasm; electroacupuncture; Quchi (LI 11); Yanglingquan (GB 34); brain derived neurotrophic factor; tyrosine protein kinase B

DOI: 10.3724/SP.J.1329.2020.01011