· 基础研究 ·

电针联合康复训练调控 PI3K/Akt 信号通路
介导脑缺血后血管新生相关因子的表达姚文超¹, 李梦醒², 刘 箐³, 童明月³, 何 鹏³, 唐 巍^{2*}

1 安徽中医药大学体育部, 安徽 合肥 230012;

2 安徽中医药大学针灸推拿学院(康复医学院), 安徽 合肥 230012;

3 安徽中医药大学研究生院, 安徽 合肥 230012

* 通信作者: 唐巍, E-mail: tangwei2633@163.com

收稿日期: 2020-06-14; 接受日期: 2020-07-15

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81373711、81874500); 安徽省自然科学基金青年项目(1808085QH268); 安徽

省教育厅自然科学基金重点项目(KJ2019A0430); 安徽中医药大学校级探索性科研项目(2016ts027)

DOI: 10.3724/SP.J.1329.2020.05007

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

摘要 **目的:** 基于磷脂酰肌醇-3 激酶(PI3K)/蛋白激酶 B(Akt)信号通路探讨电针联合康复训练对脑缺血后血管新生的调控机制。**方法:** 将 81 只 SPF 级雄性 SD 大鼠按随机数字表法分为假手术组、模型组和电针联合康复训练组(针康联合组)。采用 Zea Longa 颈外动脉线栓法建立右侧大脑中动脉缺血(MCAO)模型, 假手术组仅作颈动脉分离, 不结扎不插线。假手术组、模型组不予任何治疗, 针康联合组于术后 4 h 即给予电针百会、风府、心俞、内关以及跑台训练, 每日 1 次, 共治疗 14 d。透射电镜观察缺血区神经元超微结构, 免疫组织化学法检测缺血侧脑组织微血管密度(MVD), Western blot 法和 RT-PCR 法分别检测大鼠脑缺血半暗带周围组织血管内皮生长因子(VEGF)、脑源性神经营养因子(BDNF)、PI3K、Akt 的相对表达水平。**结果:** ① 模型组大鼠神经元形态不规则, 细胞空泡样变, 胞质内核糖体、自噬泡减少, 线粒体肿胀, 细胞核固缩; 与模型组比较, 治疗 3、7、14 d, 针康联合组神经元胞膜呈逐渐修复趋势, 各细胞器结构、空泡样变程度有较为明显改善。② 治疗 3、7、14 d, 脑缺血区域 MVD 计数在不同分组间差异具有明显统计学意义($F_{\text{Intergroup}}=141.762, P<0.001$), 针康联合组 MVD 计数高于其他 2 组, 差异均有统计学意义($P<0.01$); 不同时间点的变化趋势差异均有明显统计学意义($F_{\text{Time}}=81.920, P<0.001$), 针康联合组 14 d 时增加明显, 差异具有统计学意义($P<0.01$); MVD 计数组别 $\times$ 时间有明显交互作用($F_{\text{Interaction}}=44.960, P<0.001$)。③ 大鼠缺血区脑组织 VEGF、BDNF、PI3K、Akt 蛋白重复测量的方差分析, 各变量在不同分组间差异均具有明显统计学意义($F_{\text{Intergroup}}=398.772, 903.082, 2\,312.264, 1\,581.880, P<0.001$), 针康联合组蛋白表达量高于其他 2 组, 差异均有统计学意义($P<0.01$); 各变量在不同时间点的变化趋势差异均有统计学意义($F_{\text{Time}}=100.462, 53.714, 106.552, 75.381, P<0.001$), 模型组 7 d 时 VEGF、Akt 蛋白表达量增加, 与 3、14 d 比较, 差异有统计学意义($P<0.05$); 模型组 7 d 时 BDNF、PI3K 表达量增加, 与 3 d 时比较, 差异具有统计学意义($P<0.01$); 针康联合组 14 d 时 VEGF、BDNF、PI3K、Akt 蛋白表达增加, 与 3、7 d 比较, 差异均有统计学意义($P<0.05$); 蛋白表达组别 $\times$ 时间均有明显交互作用($P<0.001$)。④ 大鼠缺血区脑组织 VEGF、BDNF、PI3K、Akt mRNA 重复测量的方差分析, 各变量在不同分组间差异均具有明显统计学意义($F_{\text{Intergroup}}=445.845, 427.743, 918.388, 543.814, P<0.001$), 针康联合组 mRNA 表达高于其他 2 组, 差异均有统计学意义($P<0.01$); 各变量在不同时间点的变化趋势差异均有明显统计学意义($F_{\text{Time}}=100.343, 13.984, 9.162, 32.931, P<0.001$), 模型组 7 d 时 BDNF、PI3K mRNA 表达增多, 与 3 d 时比较, 差异有统计学意义($P<0.05, P<0.01$); 模型组 7 d 时 VEGF mRNA 表达增多, 与 14 d 时比较, 差异有统计学意义($P<0.01$); 针康联合组 7 d 时 VEGF、BDNF、PI3K、Akt mRNA 表达增加, 与 3、14 d 比较, 差异均有统计学意义($P<0.05, P<0.01$); mRNA 表达组别 $\times$ 时间均有明显交互作用($P<0.001$)。**结论:** 在干预效应、时间效应及两者的交互作用影响下, 针康联合疗法发挥缺血后脑保护作用, 这可能与调控血管新生相关因子 VEGF、BDNF 的表达及下游转导通路 PI3K/Akt, 介导脑缺血后的血管新生有关。

关键词 脑缺血; 血管新生; 电针; 康复训练; PI3K/Akt 信号通路

引用格式: 姚文超, 李梦醒, 刘箐, 等. 电针联合康复训练调控 PI3K/Akt 信号通路介导脑缺血后血管新生相关因子的表达[J]. 康复学报, 2020, 30(5): 377-386.

YAO W C, LI M X, LIU Q, et al. Angiogenesis regulated by electroacupuncture combined with rehabilitation training in cerebral ischemia involved in PI3K/Akt signaling pathway [J]. Rehabilitation Medicine, 2020, 30(5): 377-386.

DOI: 10.3724/SP.J.1329.2020.05007

缺血性脑卒中是影响全球健康的主要公共卫生问题,我国 40~74 岁居民首次脑卒中标化发病率平均每年增长 8.3%^[1]。脑缺血后神经功能的恢复一直是学科领域研究热点。研究发现,有效时间内恢复缺血半暗带区血供,重建神经血管单元可为脑卒中恢复提供新的机会^[2]。本项目组致力于综合康复手段对脑缺血大鼠神经功能改善的研究,观察到以针刺联合丰富康复训练效果更优^[3-4],且在改善神经功能方面涉及血管新生相关因子的表达^[5-6],但这些因子如何影响到血管新生的具体环节尚未深入研究。故本实验在前期研究基础上,建立右侧大脑中动脉缺血(middle cerebral artery occlusion, MCAO)大鼠模型,拟通过观察电针联合康复训练(针康疗法)在促进脑功能恢复中对血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)及下游转导通路磷脂酰肌醇-3 激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶 B(protein kinase B, Akt)的影响,深入阐释针康疗法促进脑缺血后血管新生的机制,以期针康疗法应用于治疗脑缺血损伤提供实验参考。

1 实验材料

1.1 实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 81 只,购于安徽省实验动物中心[许可证号 SCXK(皖)2019_002],体质量(300±20)g。实验大鼠术前 1 周常规喂养,术前 12 h 禁食不禁水。实验遵守科技部制定的《关于善待实验动物的指导性意见》和安徽中医药大学动物使用和管理委员会有关章程。

1.2 实验试剂

Anti-VEGF、Anti-BDNF(英国 Abcam 公司);山羊抗小鼠 IgG、兔抗山羊 IgG FITC 二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司);小鼠抗大鼠 IgG、CD34-PE(ICO115-PE)(Santa Cruz, 美国);Anti-FLK-1、PI3K、phospho-Akt(Ser473)(美国 CST 公司);总 RNA 提取试剂(trizol TaKaRa 公司);RT-PCR 技术盒(TaKaRa 公司);PCR Mix(重庆升博生物科技有限公司)。

1.3 主要仪器

双极电凝器(北京贝林电子有限公司);H-800 透射电镜、Leica RM2135 切片机、TK-218I 恒温摊片烤片机、包埋机(德国 Leica);显微镜(日本 Nikon);DP-801 形态学显微图像分析系统(江苏捷达科技发展有限公司);PowerPac 1000 电泳系统、凝

胶成像仪(美国 Bio-Rad 公司);华佗牌针灸针(苏州医疗用品厂有限公司);华佗牌 SDZ-V 多功能电针治疗仪(江苏省苏州华佗医疗器械有限公司)。

2 实验方法

2.1 模型制备及分组

将 81 只实验大鼠按随机数字表法分为假手术组、模型组和电针联合康复训练组(针康联合组),每组 27 只。参照 Zea Longa 等^[7]线栓法建立 MCAO 模型。大鼠经异氟烷(诱导浓度 4%,维持浓度 2%)吸入麻醉后,大鼠颈部正中稍靠右处做一纵行切口,逐层分离皮下组织,暴露颈总动脉、颈外动脉和颈内动脉,尼龙线从颈外动脉与颈内动脉分叉处起始插入,稍遇阻力即停止,打结、固定。假手术组仅作颈动脉分离,不插线。

术后待大鼠清醒后,采用改良 mNSS18 分制评分标准^[8]评估神经功能缺损程度,选取评分为 2~18 分的大鼠入模型组和针康联合组。

2.2 干预方法

选取百会、风府、心俞(左侧)和内关(左侧)4 个穴位(定位参考《大鼠穴位图谱的研制》^[9])。待术后 4 h 即予电针治疗,皮筋固定大鼠于鼠板,0.30 mm×25 mm 毫针针刺,接电针治疗仪。百会、风府为 1 组,心俞、内关为 1 组,近心端膈穴接正极,远心端膈穴接负极。电针参数:疏密波,频率 4~20 Hz,输出电压 2 V,输出电流 0.5 mA,1 次/d,时间 20 min,连续治疗 14 d。造模前,将针康联合组大鼠置于跑台进行适应性跑步 3 d,速度分别设置 12 m/min,时间 30 min/d。术后当日,针康联合组给予 5 m/min、30 min/d 跑台训练,术后 1~3 d 跑台速度为 8 m/min,3 d 后调整至 12 m/min。

假手术组和模型组均同等条件抓取、固定,不给予任何治疗。

2.3 观察指标及检测方法

2.3.1 透射电镜观察缺血区神经元超微结构 干预结束后取大鼠,异氟烷吸入麻醉后,断头取脑,冰上分离缺血侧海马组织,预冷的生理盐水充分漂洗,取出吸干后迅速置入避光戊二醛溶液中。双蒸水洗 2 次,逐级丙酮脱水,浸透、包埋、修块,超薄切片机切取厚度 60 nm,枸橼酸铅、醋酸铀双重染色,H-800 透射电镜观察神经元结构并摄片。

2.3.2 免疫组化法和 Weidner 法观察微血管密度 (microvessel density, MVD) 同上述麻醉步骤后,0.9%氯化钠溶液快速灌冲心脏,断头、取脑,4%多

聚甲醛溶液保存脑组织。48 h 后取出,行脱水、石蜡包埋、切片(厚约 4 μm)、摊片、烤片等常规步骤,添加 CD34 一抗、二抗,孵育、显色、封片。高倍镜($\times 400$ 倍)观察,以棕黄色颗粒沉积物为 CD34 阳性表达。镜下随机取 5 个视野中 CD34 阳性细胞的平均值表示微血管密度。

2.3.3 Western blot 法检测 VEGF、BDNF、PI3K、Akt 的相对表达量 同上述麻醉步骤后,断头、冰浴下取脑缺血半暗带组织,加入 RIPA 细胞裂解液,研磨后冰上静置,4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 15 min 后提取组织总蛋白质,-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。按 BCA 蛋白定量试剂盒说明,测定蛋白浓度。以 1:4 比例将 5 $\times$ SDS-PAGE 凝胶加入蛋白样品中,沸水加热至蛋白充分变性。SDS-PAGE 电泳分离目的蛋白(120 V,1 h),转膜,用 5%脱脂奶粉封闭 1 h 后,将膜转移至含有检测蛋白一抗的封闭液中,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。TBST 液洗膜后按一抗标签加入相应的二抗,室温孵育 2 h,洗膜。采用 ECL 进行显色,压片曝光、定影,最终进行条带分析。运用 Image J 软件分析目标条带灰度值,以各目的条带蛋白与内参蛋白 β -actin 表达量比值作为其相对表达量。

2.3.4 RT-PCR 法检测 VEGF、BDNF、PI3K、Akt mRNA 的相对表达水平 取部分上述-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存的脑缺血半暗带组织,采用 Trizol 法提取总 RNA 后进行反转录,将反转录出的 cDNA 保存于-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。荧光定量 PCR 测定 VEGF、BDNF、PI3K 及 Akt mRNA 的相对表达量。反应步骤为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 1 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 10 s,共循环 40 次。 β -actin 为内参基因,按照 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法处理、分析数据,计算各实验指标 mRNA 的相对表达水平。

2.4 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析。计量资料用($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较采用方差分析,两两比较采用 LSD- t 检验,组内前后比较采用配对 t 检验,采用重复测量方差分析检验各指标随时间的变化情况。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 3 组大鼠各时间点脑缺血区神经元超微结构比较

假手术组神经元胞质内细胞器、自噬泡、溶酶体排列清晰,细胞核饱满、染色质均匀,核膜完整、内外结构清晰。模型组神经元形态不规则,细胞空泡样变,核糖体、自噬泡减少,线粒体肿胀、空泡,细

胞核固缩、核膜皱缩间隙增宽,染色质高度聚集,细胞边界不清。针康联合组各时间点(3、7、14 d)神经元胞膜趋向完整,线粒体、粗面内质网、自噬泡分布均匀,仍可见部分萎缩的细胞器,但结构及空泡样变较模型组有较大改善。见图 1。

3.2 3 组大鼠各时间点脑缺血区 MVD 计数比较

以棕黄色 CD34 阳性细胞为新生血管标记物。脑缺血区域 MVD 计数在不同分组间差异具有统计学意义($F_{\text{Inter group}}=141.762, P<0.001$),不同时间点的变化趋势差异具有统计学意义($F_{\text{Time}}=81.920, P<0.001$),两者具有明显交互作用($F_{\text{Interaction}}=44.960, P<0.001$)。

控制时间因素,进行组间比较,结果显示,针康联合组在 3、7、14 d 时,均高于其他 2 组,差异有统计学意义($P<0.01$),说明缺血、缺氧环境启动内源性机制,诱导缺血半暗区微血管新生,但鉴于其自身修复能力有限,介入电针联合康复训练可增加新生微血管密度计数,促进血管再生。控制分组因素,进行组内各时间点比较,结果显示,假手术组和模型组各时间点差异无统计学意义($P>0.05$),针康联合组 3 d 与 7、14 d 比较,差异均具有统计学意义($P<0.01$)。假手术组和模型组改变趋势为先上升后下降,针康联合组为持续上升趋势,据此推断,无外界干预刺激的情况下,新生微血管增长速度比较缓慢,康复手段的早期介入,可持续、有效促进缺血损伤后血管新生。同时,有效时间内治疗效果与疗程呈正相关性,提示适当延长疗程利于脑缺血后的康复。见图 2、表 1。

3.3 3 组大鼠各时间点脑缺血区 VEGF、BDNF、PI3K、Akt 蛋白表达比较

大鼠缺血区脑组织 VEGF、BDNF、PI3K、Akt 蛋白重复测量的方差分析,各变量在不同分组间差异均具有统计学意义($P<0.001$),不同时间点的变化趋势差异均具有统计学意义($P<0.001$),两者具有明显交互作用($P<0.001$)。

控制时间因素,进行组间比较,针康联合组在 3、7、14 d 时的蛋白表达,均高于其他 2 组,差异均有统计学意义($P<0.01$),提示脑卒中后的缺血、缺氧微环境,可诱导 VEGF、BDNF、PI3K、Akt 因子的表达,参与脑缺血后神经、血管系统重构,针康疗法的介入使得机体自行修复效果得以增强。控制分组因素,进行组内各时间点比较,结果显示,假手术组各时间点差异均无统计学意义($P>0.05$);模型组 7 d 时 VEGF、Akt 蛋白表达增加,与 3、14 d 比较,差异均具

注:蓝色箭头表示神经元细胞;黄色箭头表示细胞器;紫色箭头表示空泡样变。
Note: Blue arrows indicate neuron cells; Yellow arrows indicate organelles; Purple arrows indicate vacuolation.

图 1 3 组各时间点脑缺血区神经元超微结构的比较
Figure 1 Comparison of ultrastructure of neurons in cerebral ischemic area of three groups at each time point

有统计学意义 ($P<0.05$); 模型组 7 d 时 BDNF、PI3K 蛋白表达高于 3 d 时,差异均具有统计学意义 ($P<0.01$); 针康联合组 14 d 时 VEGF、BDNF、PI3K、Akt 蛋白表达增加明显,与 3、7 d 比较,差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。假手术组和模型组呈先上升后下降趋势,针康联合组则持续攀升,提示在 14 d 的疗程范围内,相关因子表达在针康疗法作用下,随治疗时间累积。见图 3 和表 2~5。

3.4 3 组大鼠各时间点脑缺血区 VEGF、BDNF、PI3K、Akt mRNA 表达比较

大鼠缺血区脑组织 VEGF、BDNF、PI3K、Akt mRNA 重复测量的方差分析,各变量在不同分组间差异均具有统计学意义 ($P<0.001$),不同时间点的变化趋势差异均具有统计学意义 ($P<0.001$),两者具有明显交互作用 ($P<0.001$)。

控制时间因素,进行组间比较,针康联合组在 3、7、14 d 时的 mRNA 表达,均高于其他 2 组,差异均有统计学意义 ($P<0.01$)。在控制分组因素方面,进

行组内各时间点比较,结果显示,假手术组 3、7、14 d 时 VEGF、BDNF、PI3K、Akt mRNA 表达差异均无统计学意义 ($P>0.05$);模型组 VEGF mRNA 表达 7 d 与 14 d 时比较,差异具有统计学意义 ($P<0.01$); BDNF mRNA 表达 3 d 与 7、14 d 时比较,差异均具有统计学意义 ($P<0.05$);PI3K mRNA 表达 3 d 与 7 d 时比较,差异具有统计学意义 ($P<0.01$);针康联合组中,VEGF、BDNF mRNA 表达,7 d 与 3、14 d 时比较,差异均具有统计学意义 ($P<0.01$);PI3K mRNA 表达 3 d 与 7 d 比较,差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。针康联合组 7 d 时 VEGF、BDNF、PI3K、Akt mRNA 表达增加明显,与 3、14 d 比较,差异均有统计学意义 ($P<0.05, P<0.01$);各变量 mRNA 表达组别 $\times$ 时间均有明显交互作用 ($P<0.001$)。

以上结果表明,脑缺血后机体通过上调 VEGF、BDNF、PI3K、Akt 因子表达,诱导血管新生。模型组和针康联合组均呈现先上升后下降趋势,于 7 d 时表达至峰值,说明在治疗 7 d 时相关因子表达进入

注:箭头所指棕黄色颗粒或条索状物表示 CD34 阳性细胞。
Note: Brown yellow granules or cords indicated by the arrow show CD34 positive cells.

图 2 3 组各时间点脑缺血区 MVD 计数的比较
Figure 2 Comparison of MVD counts in cerebral ischemic area of three groups at each time point

图 3 3 组各时间点脑缺血区 VEGF、BDNF、PI3K、Akt 蛋白表达比较
Figure 3 Expression of VEGF, BDNF, PI3K and Akt protein in cerebral ischemic area of three groups at each time point

旺盛期,提示可选择 7 d 作为疗效观察点,虽然在 14 d 时有所衰减,但血管新生因子的表达及作用随疗程延长而持续发挥,此与 MVD 计数和相关蛋白表达结果趋同。见表 6~9。

4 讨 论

缺血性脑卒中属中医学“中风”范畴,基本病机为脏腑阴阳失调,气血逆乱,上犯于脑。脑缺血再灌

注后神经元水肿、坏死,线粒体、内质网等细胞器结构和功能异常,造成神经功能障碍。本实验通过透射电镜发现,模型组神经元多见空泡样变,线粒体肿胀,细胞核固缩,提示缺血可造成神经元结构损伤,模型建立成功。同时,神经元启动自身修复机制,细胞结构趋于改善,但仍存在一定局限性,电针联合康复训练对缺血区神经元结构改善有积极的促进作用。

表 1 3 组各时间点脑缺血区 MVD 计数比较 ($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Comparison of MVD counts in the cerebral ischemic area of three groups at each time point ($\bar{x}\pm s$)

组 别	<i>n</i>	3 d	7 d	14 d
假 手 术 组	3	7.33±0.58	7.67±0.58	7.00±1.00
模 型 组	3	16.00±1.00 ¹⁾	19.00±1.73 ¹⁾	17.67±2.08 ¹⁾
针康联合组	3	20.00±1.73 ¹⁾²⁾	27.33±2.08 ¹⁾²⁾³⁾	29.33±1.15 ¹⁾²⁾³⁾
干预措施(<i>F</i> 值, <i>P</i> 值)			141.762, 0.000	
时间(<i>F</i> 值, <i>P</i> 值)			81.920, 0.000	
交互作用(<i>F</i> 值, <i>P</i> 值)			44.960, 0.000	

注:与假手术组同一时间点比较,1) $P<0.01$;与模型组同一时间点比较,2) $P<0.01$;与组内 3 d 比较,3) $P<0.01$ 。

Note: Compared with the sham operation group at the same time point, 1) $P<0.01$; Compared with the model group at the same time point, 2) $P<0.01$; Compared with the time point of 3 d in group, 3) $P<0.01$.

表 2 3 组各时间点脑缺血区 VEGF 蛋白的表达 ($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Expression of VEGF protein in the cerebral ischemic area of three groups at each time point ($\bar{x}\pm s$)

组 别	<i>n</i>	3 d	7 d	14 d
假 手 术 组	3	0.290±0.023	0.313±0.109	0.262±0.035
模 型 组	3	0.454±0.014 ¹⁾	0.625±0.040 ¹⁾³⁾	0.471±0.034 ¹⁾⁴⁾
针康联合组	3	0.804±0.036 ¹⁾²⁾	1.175±0.018 ¹⁾²⁾³⁾	1.391±0.050 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾
干预措施(<i>F</i> 值, <i>P</i> 值)			398.772, 0.000	
时间(<i>F</i> 值, <i>P</i> 值)			100.462, 0.000	
交互作用(<i>F</i> 值, <i>P</i> 值)			85.121, 0.000	

注:与假手术组同一时间点比较,1) $P<0.01$;与模型组同一时间点比较,2) $P<0.01$;与组内 3 d 比较,3) $P<0.01$;与组内 7 d 比较,4) $P<0.01$ 。

Note: Compared with the sham operation group at the same time point, 1) $P<0.01$; Compared with the model group at the same time point, 2) $P<0.01$; Compared with the time point of 3 d in group, 3) $P<0.01$; Compared with the time point of 7 d in group, 4) $P<0.01$.

表 3 3 组各时间点脑缺血区 BDNF 蛋白的表达 ($\bar{x}\pm s$)

Table 3 Expression of BDNF protein in the cerebral ischemic area of three groups at each time point ($\bar{x}\pm s$)

组 别	<i>n</i>	3 d	7 d	14 d
假 手 术 组	3	0.369±0.036	0.387±0.032	0.360±0.045
模 型 组	3	0.523±0.014 ¹⁾	0.739±0.012 ¹⁾³⁾	0.622±0.042 ¹⁾
针康联合组	3	0.927±0.041 ¹⁾²⁾	1.155±0.034 ¹⁾²⁾⁴⁾	1.556±0.101 ¹⁾²⁾³⁾⁵⁾
干预措施(<i>F</i> 值, <i>P</i> 值)			903.082, 0.000	
时间(<i>F</i> 值, <i>P</i> 值)			53.714, 0.000	
交互作用(<i>F</i> 值, <i>P</i> 值)			41.797, 0.000	

注:与假手术组同一时间点比较,1) $P<0.01$;与模型组同一时间点比较,2) $P<0.01$;与组内 3 d 比较,3) $P<0.01$,4) $P<0.05$;与组内 7 d 比较,5) $P<0.05$ 。

Note: Compared with the sham operation group at the same time point, 1) $P<0.01$; Compared with the model group at the same time point, 2) $P<0.01$; Compared with the time point of 3 d in group, 3) $P<0.01$, 4) $P<0.05$; Compared with the time point of 7 d in group, 5) $P<0.05$.

脑卒中发生后促进血管的生成利于神经发生和功能恢复。目前,诸多学者对神经血管单元相关靶点开展研究^[10],认为促进脑缺血后血管新生,尽快恢复缺血区的血液供应,挽救濒临死亡的神经元、神经胶质细胞和血管内皮细胞,可能成为一种保护缺血脑组织、促进功能恢复的新手段^[11-12]。

针刺治疗脑卒中疗效肯定,多项研究表明电针可促进 MCAO 大鼠血管新生相关因子表达^[13-14]。病变在脑,首取督脉。张锡纯在《医学衷中参西录》中指出:“神明之体藏于脑,神明之用发于心”,提出心脑相通的理论,心脑共主神明,心脑疾病可通过心脑同治进行治疗^[15]。百会为手足少阳、足太阳、足

表 4 3 组各时间点脑缺血区 PI3K 蛋白表达 ($\bar{x} \pm s$)Table 4 Expression of PI3K protein in cerebral ischemic area of three groups at each time point ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	3 d	7 d	14 d
假手术组	3	0.445±0.011	0.479±0.007	0.456±0.024
模型组	3	0.563±0.012 ¹⁾	0.763±0.006 ¹⁾³⁾	0.620±0.069 ¹⁾
针康联合组	3	1.101±0.009 ¹⁾²⁾	1.410±0.057 ¹⁾²⁾⁴⁾	1.713±0.035 ¹⁾²⁾³⁾⁵⁾
干预措施(<i>F</i> 值, <i>P</i> 值)			2 312.264,0.000	
时间(<i>F</i> 值, <i>P</i> 值)			106.552,0.000	
交互作用(<i>F</i> 值, <i>P</i> 值)			76.208,0.000	

注:与假手术组同一时间点比较,1) $P<0.01$;与模型组同一时间点比较,2) $P<0.01$;与组内 3 d 比较,3) $P<0.01$,4) $P<0.05$;与组内 7 d 比较,5) $P<0.05$ 。

Note: Compared with the sham operation group at the same time point, 1) $P<0.01$; Compared with the model group at the same time point, 2) $P<0.01$; Compared with the time point of 3 d in group, 3) $P<0.01$, 4) $P<0.05$; Compared with the time point of 7 d in group, 5) $P<0.05$.

表 5 3 组各时间点脑缺血区 Akt 蛋白表达 ($\bar{x} \pm s$)Table 5 Expression of Akt protein in cerebral ischemic area of three groups at each time point ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	3 d	7 d	14 d
假手术组	3	0.411±0.242	0.427±0.021	0.431±0.031
模型组	3	0.602±0.021 ¹⁾	0.848±0.013 ¹⁾⁴⁾	0.653±0.047 ²⁾⁶⁾
针康联合组	3	1.205±0.032 ¹⁾³⁾	1.555±0.009 ¹⁾³⁾⁴⁾	1.922±0.117 ²⁾³⁾⁵⁾⁶⁾
干预措施(<i>F</i> 值, <i>P</i> 值)			1 581.880,0.000	
时间(<i>F</i> 值, <i>P</i> 值)			75.381,0.000	
交互作用(<i>F</i> 值, <i>P</i> 值)			58.594,0.000	

注:与假手术组同一时间点比较,1) $P<0.01$,2) $P<0.05$;与模型组同一时间点比较,3) $P<0.01$;与组内 3 d 比较,4) $P<0.01$,5) $P<0.05$;与组内 7 d 比较,6) $P<0.05$ 。

Note: Compared with the sham operation group at the same time point, 1) $P<0.01$, 2) $P<0.05$; Compared with the model group at the same time point, 3) $P<0.01$; Compared with the time point of 3 d in group, 4) $P<0.01$, 5) $P<0.05$; Compared with the time point of 7 d in group, 6) $P<0.05$.

表 6 3 组各时间点脑缺血区 VEGF mRNA 相对表达量 ($\bar{x} \pm s$)Table 6 Relative expression of VEGF mRNA in cerebral ischemic area of three groups at each time point ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	3 d	7 d	14 d
假手术组	3	1.00±0.09	1.00±0.10	1.01±0.13
模型组	3	1.38±0.19 ¹⁾	1.52±0.06 ¹⁾	1.41±0.02 ¹⁾⁴⁾
针康联合组	3	2.28±0.20 ¹⁾²⁾	3.44±0.12 ¹⁾²⁾³⁾	2.35±0.16 ¹⁾²⁾⁴⁾
干预措施(<i>F</i> 值, <i>P</i> 值)			445.845,0.000	
时间(<i>F</i> 值, <i>P</i> 值)			100.343,0.000	
交互作用(<i>F</i> 值, <i>P</i> 值)			72.631,0.000	

注:与假手术组同一时间点比较,1) $P<0.01$;与模型组同一时间点比较,2) $P<0.01$;与组内 3 d 比较,3) $P<0.01$;与组内 7 d 比较,4) $P<0.01$ 。

Note: Compared with the sham operation group at the same time point, 1) $P<0.01$; Compared with the model group at the same time point, 2) $P<0.01$; Compared with the time point of 3 d in group, 3) $P<0.01$; Compared with the time point of 7 d in group, 4) $P<0.01$.

厥阴与督脉之会,有补神益智、开窍启闭之功;风府为督脉、足太阳、阳维之会穴,可通督醒脑,调动五脏六腑之精气;心俞属足太阳膀胱经,为调理“心”脏要穴;内关为八脉交会穴之一,主阴主血,可使

心、脉、血及神相互联系,具有宁心安神之效。依据以上理论,本研究针刺处方选用督脉经穴百会、风府,辅以心俞、内关,电针治疗以醒神开窍、调督通络。跑台训练能促进梗死灶边缘神经血管单元超

表 7 3 组各时间点脑缺血区 BDNF mRNA 相对表达量 ($\bar{x}\pm s$)

Table 7 Relative expression of BDNF mRNA in cerebral ischemic area of three groups at each time point ($\bar{x}\pm s$)

组 别	<i>n</i>	3 d	7 d	14 d
假 手 术 组	3	1.00±0.07	1.00±0.06	1.01±0.12
模 型 组	3	1.24±0.02 ¹⁾	1.34±0.06 ²⁾⁵⁾	1.28±0.02 ¹⁾⁴⁾
针康联合组	3	2.17±0.32 ²⁾³⁾	3.00±0.20 ²⁾³⁾⁴⁾	2.36±0.32 ²⁾³⁾⁶⁾
干预措施(<i>F</i> 值, <i>P</i> 值)			427.743, 0.000	
时间(<i>F</i> 值, <i>P</i> 值)			13.984, 0.000	
交互作用(<i>F</i> 值, <i>P</i> 值)			10.317, 0.000	

注:与假手术组同一时间点比较,1) $P<0.05$,2) $P<0.01$;与模型组同一时间点比较,3) $P<0.01$;与组内 3 d 比较,4) $P<0.01$,5) $P<0.05$;与组内 7 d 比较,6) $P<0.01$ 。

Note: Compared with the sham operation group at the same time point, 1) $P<0.05$, 2) $P<0.01$; Compared with the model group at the same time point, 3) $P<0.01$; Compared with the time point of 3 d in group, 4) $P<0.01$, 5) $P<0.05$; Compared with the time point of 7 d in group, 6) $P<0.01$.

表 8 3 组各时间点脑缺血区 PI3K mRNA 相对表达量 ($\bar{x}\pm s$)

Table 8 Relative expression of PI3K mRNA in cerebral ischemic area of three groups at each time point ($\bar{x}\pm s$)

组 别	<i>n</i>	3 d	7 d	14 d
假 手 术 组	3	1.01±0.10	1.01±0.11	1.01±0.13
模 型 组	3	1.23±0.05 ¹⁾	1.36±0.07 ¹⁾³⁾	1.29±0.05 ¹⁾
针康联合组	3	2.59±0.06 ¹⁾²⁾	2.94±0.28 ¹⁾²⁾⁴⁾	2.61±0.07 ¹⁾²⁾
干预措施(<i>F</i> 值, <i>P</i> 值)			918.388, 0.000	
时间(<i>F</i> 值, <i>P</i> 值)			9.162, 0.003	
交互作用(<i>F</i> 值, <i>P</i> 值)			4.354, 0.017	

注:与假手术组同一时间点比较,1) $P<0.01$;与模型组同一时间点比较,2) $P<0.01$;与组内 3 d 比较,3) $P<0.01$,4) $P<0.05$ 。

Note: Compared with the sham operation group at the same time point, 1) $P<0.01$; Compared with the model group at the same time point, 2) $P<0.01$; Compared with the time point of 3 d in group, 3) $P<0.01$, 4) $P<0.05$.

表 9 3 组各时间点脑缺血区 Akt mRNA 相对表达量 ($\bar{x}\pm s$)

Table 9 Relative expression of Akt mRNA in cerebral ischemic area of three groups at each time point ($\bar{x}\pm s$)

组 别	<i>n</i>	3 d	7 d	14 d
假 手 术 组	3	1.00±0.08	1.01±0.15	1.00±0.08
模 型 组	3	1.31±0.06 ¹⁾	1.47±0.19 ¹⁾	1.34±0.09 ¹⁾
针康联合组	3	2.17±0.21 ¹⁾²⁾	3.32±0.28 ¹⁾²⁾³⁾	2.57±0.20 ¹⁾²⁾⁴⁾
干预措施(<i>F</i> 值, <i>P</i> 值)			543.814, 0.000	
时间(<i>F</i> 值, <i>P</i> 值)			32.931, 0.000	
交互作用(<i>F</i> 值, <i>P</i> 值)			21.426, 0.000	

注:与假手术组同一时间点比较,1) $P<0.01$;与模型组同一时间点比较,2) $P<0.01$;与组内 3 d 比较,3) $P<0.01$;与组内 7 d 比较,4) $P<0.01$ 。

Note: Compared with the sham operation group at the same time point, 1) $P<0.01$; Compared with the model group at the same time point, 2) $P<0.01$; Compared with the time point of 3 d in group, 3) $P<0.01$; Compared with the time point of 7 d in group, 4) $P<0.01$.

微结构的修复^[16-17]。电针与康复训练的联合应用,是中医康复方法与现代康复技术的优化结合^[18]。故本实验采用电针联合康复训练治疗脑缺血大鼠,具备“针康同步、整体康复”的优势。实验发现,针康联合组细胞膜逐渐趋向完整,多数细胞器分布均匀、

结构较模型组有较大改善,治疗 14 d 时部分细胞结构趋于完整,损伤程度较其他时间点有所减轻,提示针康联合疗法可改善梗死区神经元的坏死情况,增强其缺血区神经元的结构恢复,减轻缺血缺氧所致的脑组织损伤,这与刘荣等^[19]的研究结果相一致。

前期研究已证实,应用综合康复方法治疗脑缺血,可通过上调血管新生相关因子 VEGF、VEGFR₂、bFGF 的表达,下调血管新生抑制因子 ES、TSP-1 表达,促进血管新生;但这些因子在血管新生的具体环节中是如何作用,尚未有深入研究。VEGF 联系众多信号通路,在血管新生过程中发挥无可替代的作用^[20]。BDNF 是一种神经营养类因子,支持多种神经元的存活、分化及生长发育,同时可诱导内皮细胞血管新生及 Akt 的磷酸化,由其介导的血管新生与 PI3K/Akt 信号通路关系密切。新血管的形成可通过内皮细胞表面特异性标记物来识别,主要表达于新生血管内皮中的 CD34 特异性高,重复性好,用于脑缺血后血管新生的判断更为可靠。因此本实验通过检测 CD34 阳性细胞的表达计算 MVD,用于观察 MCAO 大鼠缺血区血管新生情况。

本实验结果显示:VEGF、BDNF、PI3K、Akt 蛋白及 mRNA 相对表达量和 MVD 计数,在不同分组间具有明显统计学意义,说明针康联合疗法在促血管新生相关因子、CD34 表达方面有明显优势,可使表达时相前移。各组不同时间点的变化趋势差异明显,以 7 d 为重要观察点,针康联合疗法的介入使机体在自行修复基础上,效果得以最大化,且在有效时间内治疗效果与治疗时程呈正相关。贾蓝羽等^[21]研究发现缺血 7~12 d 后可观察到毛细血管分支的内皮细胞 24 h 开始增殖并持续至少 7 d 的研究结果与本实验趋同。干预措施与时间均具有明显交互作用给予启示,临床治疗缺血性脑卒中,康复手段的介入和有效治疗时间的选取,至关重要。

本实验表明:电针联合康复训练可通过调控脑缺血后血管新生相关因子 VEGF、BDNF 的表达,激活下游 PI3K/Akt 信号通路,介导血管新生,以促进神经功能恢复。这在一定程度上明确了 PI3K/Akt 信号通路的关键作用,为脑内血管新生与神经功能恢复的关系,丰富脑缺血功能恢复的生物学机制研究,提供实验依据。针康联合疗法促进脑内血管新生机制中,有无涉及 MicroRNA 信号调控尚不清楚,这也是下一步需要深入研究、探讨的重要内容。

参考文献

- [1] 王陇德,刘建民,杨弋,等.我国脑卒中防治仍面临巨大挑战:《中国脑卒中防治报告 2018》概要[J].中国循环杂志,2019,34(2):105-119.
- [2] DEL ZOPPO GREGORY J. Relationship of neurovascular elements to neuron injury during ischemia [J]. Cerebrovasc Dis, 2009, 27(Suppl 1):65-76.
- [3] 李梦醒,陈朝晖,刘启,等.针刺联合丰富康复训练对脑缺血大鼠神经功能、勿动蛋白及其受体的影响[J].康复学报,2016,26(4):23-27,38.
- [4] 龚丽,唐巍,邱镇,等.电针联合丰富康复训练对脑缺血再灌注损伤大鼠海马神经细胞的保护机制[J].康复学报,2019,29(5):33-39,45.
- [5] 咎兴淳,唐巍,李斯亮,等.电针联合康复训练对脑缺血大鼠血管新生相关因子的影响[J].针刺研究,2019,44(8):547-553.
- [6] 李斯亮,唐巍,龚丽,等.电针对局灶性脑缺血大鼠缺血皮层区内皮抑素、血小板反应蛋白-1 表达的影响[J].安徽中医药大学学报,2019,38(1):39-43.
- [7] 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.
- [8] CHEN J, LI Y, WANG L, et al. Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats [J]. Stroke, 2001, 32(4):1005-1011.
- [9] 华兴邦,李辞蓉,周浩良,等.大鼠穴位图谱的研制[J].实验动物与动物实验,1991,1(1):1-5.
- [10] 罗刘军,祝美珍.中医药对缺血性脑损伤神经血管单元影响的研究进展[J].时珍国医国药,2016,27(5):1195-1197.
- [11] 韦克克,张琛,王雅婷,等.中药有效成分及配伍抗缺血性脑损伤诱导的神经血管单元损伤作用机制研究进展[J].中华中医药学刊,2019,37(12):2951-2954.
- [12] 孟木琳.头穴丛刺法对脑梗死大鼠半暗带 CD11b 表达影响的研究[D].北京:北京中医药大学,2017:12-15.
- [13] 刘莉,王念宏,张群,等.微小核糖核酸参与电针治疗缺血性脑卒中研究概况[J].针刺研究,2019,44(9):686-692.
- [14] 黄馨仪,杨卓霖,麻秋雷,等.针刺对脑出血模型大鼠 MMP-2/9、VEGF 表达的影响[J].康复学报,2018,28(4):32-36.
- [15] 赵继宗,郭彩霞,破楚汉界,立新学科:谈谈“脑心同治”[J].中华医学杂志,2019,99(39):3041-3042.
- [16] LI C J, DU X X, YANG K, et al. Effects of professional rehabilitation training on the recovery of neurological function in young stroke patients [J]. Neural Regen Res, 2016, 11(11):1766-1772.
- [17] 吕梦,王海洲,邵珠平.康复训练活动分析法对老年脑卒中偏瘫患者下肢运动功能的影响[J].康复学报,2020,30(2):145-148,161.
- [18] 唐强,朱路文.脑卒中康复新策略:针康法[J].中国康复医学杂志,2015,30(10):1071-1073.
- [19] 刘荣,许能贵,杨忠华,等.电针百会、大椎对局灶性脑缺血大鼠神经细胞形态学的影响[J].中华中医药杂志,2018,33(8):3276-3279.
- [20] GREENBERG D A, JIN K. Vascular endothelial growth factors (VEGFs) and stroke [J]. Cell Mol Life Sci, 2013, 70(10):1753-1761.
- [21] 贾蓝羽,杜元灏,李晶,等.电针“水沟”穴对脑缺血大鼠缺血脑组织血管新生相关因子表达的影响[J].针刺研究,2019,44(10):715-721.

Angiogenesis Regulated by Electroacupuncture Combined with Rehabilitation Training in Cerebral Ischemia Involved in PI3K/Akt Signaling Pathway

YAO Wenchao¹, LI Mengxing², LIU Qing³, TONG Mingyue³, HE Peng³, TANG Wei^{2*}

¹ P.E Department, Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei, Anhui 230012, China;

² College of Acupuncture-moxibustion (Rehabilitation Medical College), Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei, Anhui 230012, China;

³ Graduate School, Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei, Anhui 230012, China

* Correspondence: TANG Wei, E-mail: tangwei2633@163.com

ABSTRACT Objective: Based on the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt) signal pathway, to explore the regulatory mechanism of electroacupuncture combined with rehabilitation training on angiogenesis after cerebral ischemia. **Methods:** A total of 81 SPF male SD rats were randomly divided into three groups: sham operation group, model group and electroacupuncture combined with rehabilitation training group (combined acupuncture group). The right middle cerebral artery occlusion (MCAO) model was established by using Zea longa external carotid artery thread occlusion method. In the sham operation group, only the carotid artery was separated without ligation or insertion. The sham operation group and the model group were not given any treatment. The combined acupuncture group was given electroacupuncture at acupoints of Baihui, Fengfu, Xinchu and Neiguan, and treadmill training 4 hours after operation, once a day for 14 days. The ultrastructure of neurons in ischemic area was observed by transmission electron microscope. Microvessel density (MVD) of ischemic side was detected by immunohistochemistry. The relative expression levels of vascular endothelial growth factor (VEGF), brain-derived neurotrophic factor (BDNF), PI3K and Akt were detected by Western blot and RT-PCR respectively. **Results:** (1) The neurons in the ischemic area of the model group were irregular in morphology, vacuolation, reduction of glycosomes and autophagic vesicles in the cytoplasm, swelling of mitochondria and pyknosis of nucleus; Compared with the model group, on day 3, 7 and 14 of treatment, the neuron cell membrane of the combined acupuncture group showed a tendency to repair, and the structure of organelles and the degree of vacuolation were significantly improved. (2) On day 3, 7 and 14 of treatment, the MVD count of cerebral ischemia area was statistically significant in different groups ($F_{\text{Inter-group}}=141.762$, $P<0.001$), the MVD count of the combined acupuncture group was higher than that of the other two groups, the difference was statistically significant respectively ($P<0.01$); On day 3, 7 and 14 of treatment, there was significant difference in the change trend of different time points respectively ($F_{\text{Time}}=81.920$, $P<0.001$), the combined acupuncture group increased significantly on the 14th day of treatment, and the differences were statistically significant ($P<0.01$); MVD count had group $\times$ time obvious interaction ($F_{\text{Interaction}}=44.960$, $P<0.001$). (3) The variance analysis of repeated measurements of VEGF, BDNF, PI3K, Akt proteins in the brain tissue of the ischemic area showed that the variables were statistically significant among different groups respectively ($F_{\text{Inter-group}}=398.772$, 903.082, 2 312.264, and 1 581.880, $P<0.001$). The expression of protein in the combined acupuncture group was higher than that of the other two groups, and the difference was statistically significant respectively ($P<0.01$); the trend of each variable at different time points was significantly different respectively ($F_{\text{Time}}=100.462$, 53.714, 106.552, 75.381, $P<0.001$), the expression of VEGF and Akt protein in the model group increased on the 7th day, and the difference was statistically significant compared with 3 d and 14 d respectively ($P<0.05$); the expression of BDNF and PI3K increased on the 7th day in the model group, compared with that on the 3rd day, the difference was statistically significant ($P<0.01$); the expression of VEGF, BDNF, PI3K, Akt protein increased significantly on the 14th day of the combined acupuncture group, and the difference was statistically significant compared with 3 d and 7 d respectively ($P<0.05$); The expression group $\times$ time all had a significant interaction ($P<0.001$). (4) The analysis of variance of repeated measurements of VEGF, BDNF, PI3K, Akt mRNA in rat brain tissues in ischemic area showed that the variables were statistically significant in different groups respectively ($F_{\text{Inter-group}}=445.845$, 427.743, 918.388, 543.814, $P<0.001$), the combined acupuncture group expression was higher than the other two groups, the difference was statistically significant respectively ($P<0.01$); the change trend of each variable at different time points was significantly different ($F_{\text{Time}}=100.343$, 13.984, 9.162, 32.931, $P<0.001$), the expression of BDNF and PI3K mRNA in the model group increased on the 7th day, and the difference was statistically significant respectively ($P<0.05$, $P<0.01$); the expression of VEGF mRNA in the model group increased on the 7th day, compared with that on the 14th day, the difference was statistically significant ($P<0.01$); the expression of VEGF, BDNF, PI3K, Akt mRNA increased significantly on the 7th day in the combined acupuncture group, and the difference was statistically significant compared with 3 d and 14 d respectively ($P<0.05$, $P<0.01$); the mRNA expression group $\times$ time had significant interaction ($P<0.001$). **Conclusion:** Under the influence of intervention effect, time effect and the interaction of the two, the combination of electroacupuncture and rehabilitation training can play a protective role in cerebral ischemia, which may be related to the control of the expression of VEGF and BDNF and the downstream transduction pathway PI3K/Akt, which mediates the angiogenesis after cerebral ischemia.

KEY WORDS cerebral ischemia; angiogenesis; electroacupuncture; rehabilitation training; PI3K / Akt signal pathway

DOI: 10.3724/SP.J.1329.2020.05007