

研究论文

针刺对去卵巢大鼠脑内胆碱乙酰转移酶基因表达的影响

田淑君^{1,*}, 尹岭¹, 孙锦平¹, 田庆华¹, 祖英秋², 郑一¹, 李毅¹, 李玉荣²¹解放军总医院神经信息中心, 北京 100853; ²哈尔滨医科大学生理教研室, 哈尔滨 150086

摘要: 本工作旨在探讨雌激素对脑内乙酰胆碱生成的影响和电针刺激“足三里”穴对去卵巢大鼠脑内乙酰胆碱生成的调整作用。实验选用成年 Wistar 雌性大鼠, 将动物分为正常对照组(INT)、去卵巢组(OVX)和去卵巢针刺组(OVX+AC)。用放射免疫分析方法测定血中雌二醇含量, 采用 RT-PCR 方法获得大鼠脑内胆碱乙酰转移酶(ChAT) mRNA 的逆转录表达产物——cDNA, 用琼脂糖凝胶电泳方法检测, 并通过原位杂交方法观察海马 ChAT mRNA 阳性神经元的表达, 然后用计算机图像分析系统进行统计分析。实验结果显示: 去卵巢组大鼠体内雌激素水平明显降低, 脑内 ChAT mRNA 的 RT-PCR 产物和海马 ChAT mRNA 阳性表达产物的平均面积、平均积分光度值均明显减少, 与对照组和针刺组比较有显著性差异; 去卵巢针刺“足三里”穴组与去卵巢组相比, 大鼠血中雌激素水平明显升高, 脑内 ChAT mRNA RT-PCR 产物明显增多, 海马的 ChAT mRNA 表达阳性神经元增多。以上结果提示: 脑内 ChAT 基因表达与体内雌激素水平有密切关系, 去卵巢后针刺“足三里”穴对 ChAT 的调节作用可能是针刺增强脑内乙酰胆碱含量的机制之一。

关键词: 针刺; 雌激素; 胆碱乙酰转移酶(ChAT)

中图分类号: Q 492.5; R339.3

Effect of acupuncture on the expression of choline acetyltransferase mRNA in the brain of ovariectomized ratsTIAN Shu-Jun^{1,*}, YIN Ling¹, SUN Jin-Ping¹, TIAN Qing-Hua¹, ZU Ying-Qiu², ZHENG Yi¹, LI Yi¹, LI Yu-Rong²¹Neuroinformatics Center of PLA, General Hospital, Beijing 100853, China; ²Physiology Department of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang 150086, China

Abstract: The purpose of the present study was to investigate the mechanism of the effect of estrogen on the production of acetylcholine in the brain and to study the regulatory role of acupuncture of Zusanli acupoint in acetylcholine production in the brain of ovariectomized rats. Experimental female Wistar rats were divided into three groups: intact group (INT), ovariectomized group (OVX), and ovariectomy and acupuncture group (OVX+AC). Radioimmunoassay (RIA) was used to measure the estrogen content in plasma. The mRNA expression of choline-acetyltransferase (ChAT) and glyceraldehyde phosphate dehydrogenase (GAPDH) in the brain of rats was measured by the RT-PCR technique and was tested by the method of agarose gel electrophoresis. The ChAT mRNA positive neurons in the hippocampus were observed by using *in situ* hybridization and the results were processed with a computerized image analysis system. The results are as follows. Compared with the control animals, the plasma estrogen level was significantly lowered in ovariectomized animals. However, the plasma estrogen level was higher in the OVX+AC group than that of the OVX group. The ChAT mRNA expression level of OVX+AC group was higher than that of the OVX group. The area and integral optical density of the ChAT mRNA positive neurons in the hippocampus increased more obviously in OVX+AC group than in the OVX group. The experimental results observed indicate that the expression of ChAT gene in the brain is possibly related to the estrogen level in the body. The expression of ChAT gene in the brain of the ovariectomized rat can be regulated by acupuncture of Zusanli acupoint and it may be one of the mechanisms that acupuncture increases acetylcholine content in the brain.

Key words: acupuncture; estrogen; choline acetyltransferase (ChAT)

Received 2003-09-15 Accepted 2004-03-18

This work was supported in part by grant from NSFC (30170321) and MOST (2001CCA0070).

*Corresponding author. Tel: +86-451-86674538; E-mail:tianshujun2003@yahoo.com.cn

雌激素对中枢神经系统具有保护作用,老年女性腺萎缩和中枢神经系统功能减退可能有一定的关系^[1]。近年来,针灸对神经内分泌系统的调整及其抗衰老作用已引起了人们的关注。在临床上,针灸对治疗老年妇女认知功能障碍有一定的疗效,但其作用机制并不十分清楚。有研究报道,针刺可维持衰老时脑内胆碱乙酰转移酶的含量,并调节胆碱能系统的功能活动^[2],改善学习记忆功能。脑内胆碱乙酰转移酶的生成量,胆碱酯酶决定乙酰胆碱降解量。有研究表明,针刺可使老化小鼠胆碱酯酶的活性降低,海马及纹状体内乙酰胆碱含量增加^[3]。但关于针刺在雌激素减少的情况下对ChAT的调节作用未见报道。有研究表明,针刺“足三里”穴有抗衰老作用^[4]。为此,本实验采用去卵巢大鼠动物模型,造成体内雌激素降低,观察针刺“足三里”穴后去卵巢大鼠体内雌激素的变化及对脑内ChAT生成的影响,探讨雌激素对脑内胆碱能系统的影响及针刺对其的调节作用,旨在为临床针灸治疗脑衰提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物处理 Wistar 雌性大鼠 48 只(4 月龄)由解放军总医院动物试验中心提供,实验动物分为正常对照组(intact group, INT)、去卵巢组(ovariectomy group, OVX)、去卵巢针刺组(acupuncture after ovariectomy group, OVX+AC),每组 16 只(8 只用于取血和 RT-PCR, 8 只用于原位杂交)。去卵巢的大鼠用乙醚麻醉,以腰背部切口取出双侧卵巢,针刺组于切除卵巢 6d 后给予电针刺激。根据中国针灸学会实验针灸研究会制定的动物针灸穴位图谱,确定大鼠双侧“足三里”穴,刺入 5 mm 深,接电针仪(WQ 1002K 型济生多用治疗仪,北京安隆光电技术公司)。刺激参数为:疏密波,频率为 4 Hz。参照沈晓明等的方法^[5]调节刺激强度,以使大鼠后爪微颤为宜,15 min / 次,隔日 1 次。每组大鼠在同样条件下饲养 40 d 后处死。

1.2 血中雌激素的测定 对照组、去卵巢组、去卵巢针刺组分别取 8 只大鼠,断头取血后离心分离血清。使用卫生部上海生物制品所提供的放射免疫试剂盒。按照试剂盒说明书操作,测定血清中雌二醇 E₂ 的含量,结果以 $\times 1$ pmol/L 表示。质量控制标准,批内变异系数 < 10%,批间变异系数 < 15%。

1.3 RT-PCR (1) 提取 RNA: 动物断头取血后,迅速取

出以双侧海马为中心约为 0.8 cm \times 0.6 cm \times 0.6 cm 的脑组织。采用异硫氰酸胍-酚-氯仿抽提方法,提取组织的 RNA,使用日本产 U2001 型双光束分光光度计,测定样品中 260、280 nm 吸收峰的 OD 值,鉴定 RNA 的纯度和含量。(2) 逆转录: 将提取的 RNA 用 DEPC 水稀释,向离心管内加入 RNA、oligoDT、dNTP、DEPC,放入 PCR 仪,在逆转录酶 Superscript II 的催化下获得 cDNA。(3) PCR: 待检测基因 ChAT 引物由解放军总医院内分泌实验室协助设计,北京赛百盛公司提供产品。ChAT 上游引物序列为: 5' > CTG GTG AAC CCC TTA AGC < 3', 下游引物序列为: 5' > GTC GAA AAG GGA CAC AGC < 3', 长度为 357 bp, 变性温度为 95 $^{\circ}$ C, 退火温度为 59.5 $^{\circ}$ C, 循环次数为 32 个。选择在大多数细胞内均为高表达的磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)作为内对照,其上游引物为: 5' > TGC TTC ACC ACC TTG TTG AT < 3', 下游引物为: 5' > CCC ATC ACC ATC TTC CAG GA < 3'。(4) PCR 产物检测: 采用琼脂糖凝胶电泳方法,取 mRNA RT-PCR 反应产物 10 μ l, 以 1 \times TAE 为电泳缓冲液,在 1% 琼脂糖凝胶上电泳约 1 h (电压为 50 V),电泳时每条带代表一只鼠 RT-PCR 产物的结果,三条带为一组,每个样本重复电泳 3 次。放入 BIO-RAD 公司产的 Gel Doc 1000 型凝胶图像系统分析仪,紫外灯下显影,数码相机拍照,用 Image-glub 4.0 分析软件测得电泳图谱上每条基因条带的光密度值,计算每只大鼠 ChAT mRNA 与 GAPDH mRNA 产物的光密度比值,再比较各组间 ChAT/GAPDH 值的大小,进行统计学分析。

1.4 原位杂交 每组 8 只大鼠,用水合氯醛 0.3 g/kg 行腹腔注射,麻醉后手术开胸经左心室主动脉插管,快速推进生理盐水 200 ml,然后快速滴注 4% 多聚甲醛 500 ml,脑组织置于 10% 甲醛固定液内,过夜,石蜡包埋,矢状切片,厚度为 20 μ m。按照武汉博士德试剂公司提供的 ChAT 原位杂交试剂盒说明书操作, DAB 显色。每组 8 个标本,每个标本取相同部位 6 张切片。光镜下(放大 4 倍、10 倍)数码相机拍照,结果以计算机图像分析系统处理。ChAT mRNA 阳性细胞胞浆呈棕黄色。

1.5 统计学方法 实验数据用 SPSS 10.0 for Windows 统计软件进行分析,组间比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 各组大鼠血中雌激素含量

放射免疫分析方法测得, 对照组为 403.22 ± 44.62 pmol/L, 去卵巢组为 88.22 ± 9.70 pmol/L, 两组间比较有显著性差异, 去卵巢针刺“足三里”组为 198.19 ± 21.79 pmol/L, 与去卵巢组比较有显著差异, 但仍然明显低于正常组(图1)。

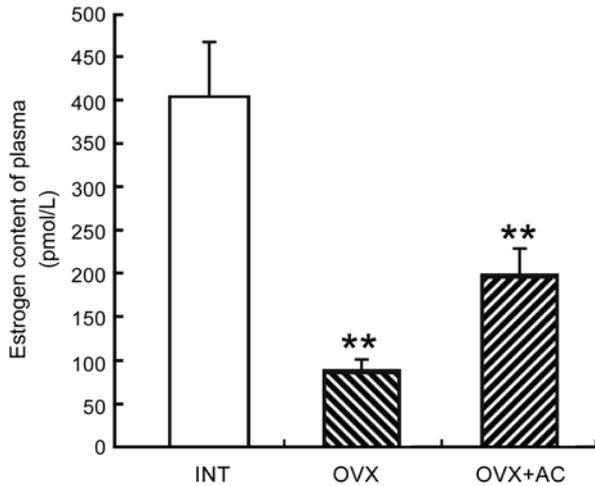


图 1. 大鼠血中雌二醇含量的放射免疫分析

Fig. 1. Radioimmunoassay of estradiol levels in rat plasma. INT, intact group; OVX, ovariectomy group; OVX+AC, acupuncture after ovariectomy group. OVX vs INT, $**P < 0.01$; OVX+AC vs OVX, $**P < 0.01$, $n=8$.

2. 2 大鼠脑内 ChAT mRNA RT-PCR 产物的表达

图 2A 为各组中 3 只大鼠脑组织 ChAT mRNA 和 GAPDH mRNA 的 RT-PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图, 分别测得每只大鼠 ChAT mRNA 和 GAPDH mRNA 的 RT-PCR 产物电泳的光密度, 计算二者之间的比值, 并将每组 8 个样本的比值进行统计学处理, 各组间的结果比较见图 2B。去卵巢组比值为 0.469 ± 0.07 , 明显低于正常对照组的比值 0.962 ± 0.14 ($P < 0.01$)。而去卵巢针刺组比值为 0.826 ± 0.12 , 明显高于去卵巢大鼠组的比值。

2.3 海马组织 ChAT mRNA 的表达

从原位杂交结果可见(图 3A), 正常对照组大鼠海马各区 ChAT mRNA 均有表达, CA1 区和齿状回更加明显, 去卵巢组各区表达均减少, 而去卵巢针刺组较去卵巢组明显增强。在放大 40 倍光镜下可见阳性反应物着色较浅, 近细胞膜周围尤为显著。

取每组 8 只大鼠相同部位的 6 张切片, 将海马 CA1 区视野输入计算机进行分析, 图 3B 显示了各组的阳性反应神经元平均面积和平均积分光度值的统计结果。

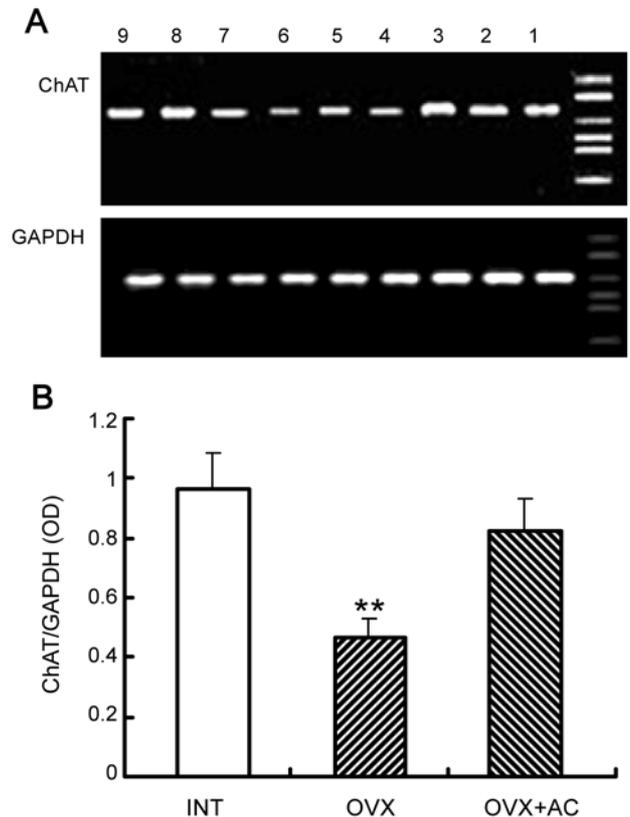


图 2. 大鼠脑内 ChAT mRNA RT-PCR 产物的电泳及分析

Fig. 2. Electrophoresis and analysis of ChAT mRNA RT-PCR products in the rat brain. A: Agarose gel electrophoresis of ChAT mRNA RT-PCR and GAPDH mRNA products in the rat brain. Lanes 1, 2, 3: INT. Lanes 4, 5, 6: OVX. Lanes 7, 8, 9: OVX+AC. B: Expression of ChAT mRNA RT-PCR products in the rat brain. OVX vs OVX+AC, OVX vs INT, $**P < 0.01$, mean \pm SD, $n=8$.

3 讨论

研究性激素对脑高级功能的影响, 可为阐明衰老机制提供有用的资料。本实验采用的去卵巢大鼠动物模型, 已被广泛应用于观察体内雌激素减少对机体功能活动影响的实验中。动物在去除卵巢后, 血中雌激素水平明显降低, 表明体内的雌激素主要来源于卵巢的分泌, 其它部位产生的雌激素仅能维持在一个较低的水平。雌激素对中枢神经系统具有保护作用^[6], 并能影响学习和记忆过程。乙酰胆碱是和学习、记忆有关的重要神经递质, 海马的胆碱能神经元活动与学习、记忆也有密切关系^[7]。本实验观察到, 在去卵巢大鼠体内雌激素减少的同时, 脑内催化乙酰胆碱合成的酶——胆碱乙酰转移酶(ChAT)在 mRNA 水平上的生成明显减少, 海马中 ChAT mRNA 阳性神经元的面积、数目及光密度减少, 说明体内

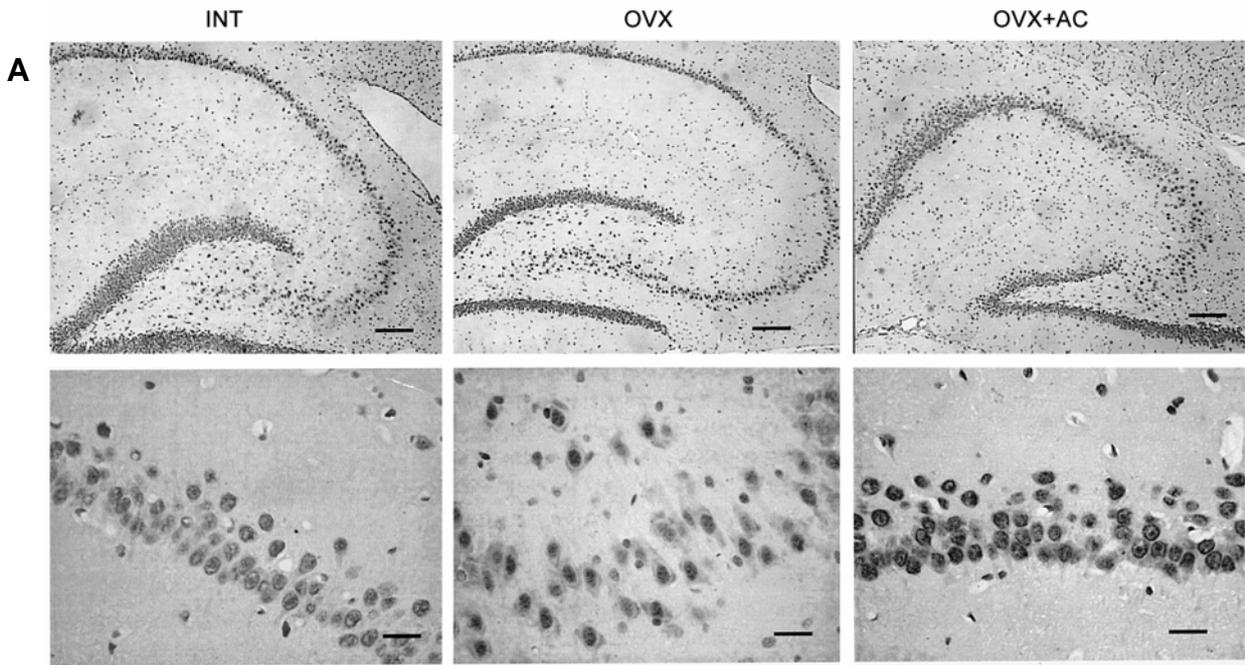


图 3. 大鼠海马组织 ChAT mRNA 的表达及分析

Fig. 3. Expression and analysis of ChAT mRNA of hippocampus in the rats. A: Expression of ChAT mRNA of the hippocampus in the rats with the method of *in situ* hybridization. Scale bars (top), 100 μ m; scale bars (bottom), 25 μ m. B: Data of of ChAT mRNA expression levels in the rat hippocampus with *in situ* hybridization presented by computerized image analysis system, and represented by average area and integral optical density (IOD) of ChAT mRNA positive neurons. OVX vs OVX+AC; OVX vs INT, * $P < 0.05$; $n = 8$.

雌激素减少影响脑内 ChAT mRNA 生成,而海马的 ChAT mRNA 生成减少,将导致乙酰胆碱合成受到影响。本研究提示,老年妇女认知功能减退可能与卵巢萎缩、体内雌激素生成减少,使脑内 ChAT 在 mRNA 水平上表达下降以及由此导致的乙酰胆碱生成减少有关。

研究针刺对衰老过程中神经内分泌的调节作用,可为临床上采用针灸方法延缓衰老、治疗脑功能衰退提供依据。本实验发现,电针刺激去卵巢大鼠“足三里”穴后,脑内 ChAT mRNA 表达较去卵巢未针刺组明显增加。针刺调节 ChAT 生成的机制可能与多种因素有关,本实验中针刺可使去卵巢大鼠血中雌激素水平在一定程度上升高,脑组织 ChAT mRNA 的表达随之增加,提示针刺可通过调节内分泌功能(雌激素的水平)影响 ChAT 的生成。胆碱能神经元是雌激

素作用的靶细胞^[8],雌激素可通过基因调节机制控制细胞内蛋白质及酶蛋白的表达;通过非基因组机制影响细胞内神经营养因子和其他神经递质的功能^[9]。至于针刺使去卵巢大鼠体内雌激素增加的原因,已有报道证实,针刺对正常大鼠血中雌激素无明显影响,但能使去卵巢大鼠肾上腺皮质内侧区的活动增强,甾体激素的合成增加^[10],同时脑、脂肪等组织的芳香化酶活性增强,促进雄激素转变为雌激素^[11]。本实验结果提示,脑内 ChAT 基因表达与体内雌激素水平有密切关系;卵巢切除后,针刺“足三里”穴能在基因水平上调节脑内 ChAT 的生成可能是针刺增强乙酰胆碱含量、改善老年妇女学习记忆功能的机制之一。

致谢:感谢解放军总医院内分泌实验室母义明、李明老师和病理室张笑明、刘凤荣老师给予本工作的帮助。

参考文献

- 1 Paganini-Hill A, Hebbers V M. Estrogen-deficiency and risk of AD in women. *Am J Epidemiol* 1994; 140:256~261
- 2 Gong X(宫星), Wang YJ. Research overview of regulation effect of acupuncture and moxibustion on endocrine function. *Chin Acup Maxib (中国针灸)* 1997; 9: 135~137 (Chinese, English abstract).
- 3 Zhao LH(赵利华). Advances in experimental research on acupuncture and moxibustion cerebral aging . *Acup Res (针刺研究)* 2001; 26: 77~79 (Chinese, English abstract).
- 4 Sun ZR(孙忠人), Zhao Y, Bi KB. Experimental study on the effect of acupuncture Zusanli resisting aging. *J Clin Acup Moxib (针灸临床杂志)* 1996; 12(2): 33~35 (Chinese, English abstract).
- 5 Shen XM(沈晓明), Li YY, Shi XM. Effect of acupuncture therapy of regulating mentality and supplementing kidney on the expression of proopiomelanocortin mRNA in hypothalamus of climacteric rats. *J Anhui Tradit Chin Med Coll* 2002; 21: 31~34.
- 6 Xulin AR, Michael H. Spatial exploration induces a persistent reversal of long-term potentiation in rat hippocampus. *Nature* 1998; 394: 891
- 7 Chen BY(陈伯英), Chen LH, Gao H, Ji SZ. Effects of electroacupuncture on the expression of estrogen receptor protein and mRNA in rat brain. *Acta Physiol Sin (生理学报)* 1998; 50: 495~500 (Chinese, English abstract).
- 8 Gibbs RB. Effects of gonadal hormone replacement of measures of basal forebrain cholinergic function. *Neuroscience* 2000; 101: 931~938
- 9 Arancio O, Kiehl M, Lee CJ. Nitric oxide acts directly in the presynaptic neuron to produce long-term potentiation in cultured hippocampus neurons. *Cell* 1996; 87: 1025~1027
- 10 Chen LN(陈丽娜), Du GZ, Chen BY. The biochemical mechanism of electro-acupuncture regulation of dysfunctional hypothalamic-pituitary-ovarian axis in ovariectomized rats. *Shanghai J Acu-Mox(上海针灸杂志)* 2001; 12: 32~34 (Chinese, English abstract).
- 11 Tobet SA, Baum MJ, Tang HB. Aromatase activity in the perimatal rat forebrain: effects of age, sex and intracutaneous position. *Brain Res* 1985; 23: 171~174.