

·针灸推拿·

本文引用:贺平,颜虹,蒋素容,武姿含,陈楚洵,田浩梅.针刺大椎、人中、百会穴对脑缺血再灌注损伤大鼠脑线粒体超微结构的影响[J].湖南中医药大学学报,2018,38(1):55-58.

针刺大椎、人中、百会穴对脑缺血再灌注损伤大鼠 脑线粒体超微结构的影响

贺平,颜虹,蒋素容,武姿含,陈楚洵,田浩梅*
(湖南中医药大学,湖南长沙 410208)

[摘要] **目的** 观察针刺大椎、人中、百会穴对脑缺血再灌注后大鼠脑线粒体超微结构的影响,探讨针刺对脑缺血再灌注损伤的部分作用机制。**方法** 40只大鼠随机挑选10只为假手术组,其余30只大鼠造模后随机分为模型组、针刺对照点组、针刺穴位组3组,每组10只。大鼠造模成功后,模型组、假手术组只捆绑不针刺,针刺穴位组针刺大椎、人中、百会三穴,针刺对照点组针刺穴位左侧旁开0.3 cm处,每12小时针刺1次,6次治疗后处死大鼠,取缺血海马组织电镜下观察线粒体超微结构。**结果** 治疗后,除假手术组外其余各组大鼠神经功能缺损评分均下降($P<0.05$);与模型组比较,针刺穴位组和针刺对照点组均下降更明显($P<0.05$)。电镜观察结果显示,假手术组线粒体结构正常;模型组线粒体肿胀明显,嵴断裂,空泡结构明显;针刺对照点组线粒体肿胀,可见嵴断裂,少量空泡结构;针刺穴位组线粒体稍肿胀,嵴断裂及空泡化不明显。**结论** 针刺能减轻脑缺血再灌注损伤,其机制可能与改变缺血再灌注局灶的线粒体超微结构损伤有关。

[关键词] 针刺;线粒体超微结构;脑缺血再灌注损伤

[中图分类号]R245;R743 **[文献标志码]**A **[文章编号]**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2017.01.015

Effects of Acupuncture Dazhui, Renzhong, Baihui Points on Ultrastructure of Cerebral Mitochondria in Rats with Cerebral Ischemia Reperfusion

HE Ping, YAN Hong, JIANG Surong, WU Zihan, CHEN Chutao, TIAN Haomei*
(Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

[Abstract] **Objective** To observe the effect of acupuncture Dazhui, Renzhong, Baihui on the ultrastructure of cerebral mitochondria after cerebral ischemia reperfusion in rats and explore its mechanisms. **Methods** Ten rats were randomly selected from 40 rats as sham-operation group, the remaining 30 rats after modeling were randomly divided into 3 groups: model group, acupuncture control point group and acupuncture point group, 10 rats in each group. After successfully modeling of rats, the model group and the sham operation group were only bundled without acupuncture, the acupuncture point group was acupunctured of Dazhui, Renzhong, Baihui point, the acupuncture control point group was acupunctured of the point left side 0.3 cm, once every 12 hours, and killed the rats after 6 times of treatment. The hippocampus mitochondria ultrastructure was observed by electron microscope. **Results** After treatment, the neurological deficit scores in different groups besides sham-operation group decreased ($P<0.05$); compared with the model group, the decrease in acupuncture control point group and acupuncture point group was obvious ($P<0.05$). Electron microscope showed that the structure of mitochondrial was normal in the sham-operation group, the mitochondria in the model group showed apparent swelling, disrupted cristae and vacuoles were obvious, cristae broken and slightly vacuolization was observed in the acupuncture control group; swelling, cristae broken, and the vacuolization of the mitochondria in the acupuncture point group

[收稿日期]2017-10-15

[基金项目]湖南自然科学基金(81303051);湖南省自然科学基金(2016JJ3131);中医内科学省部共建教育部重点实验室开放课题。

[作者简介]贺平,女,在读硕士研究生,研究方向:针灸推拿临床应用及机理研究。

[通讯作者]*田浩梅,女,博士,副教授,硕士研究生导师,E-mail:451358104@qq.com。

was not obvious. **Conclusion** Acupuncture could relieve the injury of cerebral ischemia reperfusion, its mechanism may be related to the alteration of ultrastructural damage of mitochondria in ischemia-reperfusion injury.

[**Keywords**] acupuncture; mitochondria ultrastructure; cerebral ischemia reperfusion

脑缺血一定时间后,血流恢复供应,过量的血流冲击会形成内源性的损伤因子,从而启动一系列的病理生理过程,加重脑缺血损伤,出现更加严重的脑功能障碍,称为脑缺血再灌注损伤^[1-3]。在脑缺血再灌注损伤中,线粒体介导的缺血半暗带区的神经细胞凋亡被认为是导致损伤的重要因素^[4]。因而抑制缺血半暗带区的神经细胞凋亡,挽救缺血半暗带区的神经元成为了治疗脑缺血再灌注损伤的关键。针刺作为缺血性脑卒中的一种有效的治疗手段,能够通过抑制缺血半暗带区神经元凋亡从而有效减轻脑缺血再灌注损伤^[5]。其作用机制可能与针刺减轻线粒体超微结构损伤,从而挽救缺血半暗带区神经细胞有关。本实验通过探讨针刺对脑缺血再灌注损伤大鼠线粒体超微结构的影响,从而研究针刺减轻脑缺血再灌注损伤的部分机制,为临床治疗脑缺血提供新的思路。

1 资料与方法

1.1 实验动物及分组

SD大鼠共48只,SPF级,雄性,体质量230~250 g,由湖南中医药大学动物实验中心提供[许可证号:scxk(湘)2013-0004]。实验动物常规饲养1周后,随机选取10只为假手术组,其余38只大鼠共造模成功30只,30只大鼠随机分为模型组10只,针刺对照点组10只,针刺穴位组10只。

1.2 造模方法及模型成功判断

造模方法参照Zea Longa方法^[6]并加以改良。大鼠禁食不禁水24 h后,用10%的水合氯醛按0.3 mL/100 g体质量剂量腹腔麻醉。采用尼龙线(直径0.3 mm)阻断大鼠大脑中动脉(栓线深度约19 mm),2 h后,将栓线拔出1 cm左右。模型成功的判断采用Zea Longa五级4分法^[6]标准,1~3分者纳入实验。心脏灌注处死后取脑可见大鼠脑梗塞灶位于缺血侧颞叶皮质区,即大脑中动脉供血区域,代表实验大鼠造模成功。取脑时发现有明显蛛网膜下腔出血者剔

除出实验。假手术组拴线时拴线深度约为5 mm,线栓进入颈内动脉但不阻断大脑中动脉。

1.3 选穴及针刺方法

选穴根据《实验针灸学》^[7]及华兴邦制定的实验动物穴位图谱^[8]提供的方法,并模拟人体腧穴骨度分寸法量取。针刺穴位组由“大椎”“人中”“百会”3穴组成。大椎直刺5 mm;人中向鼻中隔方向斜刺2 mm;百会平刺10 mm。针刺对照点组针刺方法与针刺穴位组相同,取穴为穴位左侧旁开0.3 cm处非经非穴点。

1.4 治疗方法

实验动物造模完成后,待大鼠呼吸、心跳等生命体征平稳,假手术组与模型组大鼠只捆绑不针刺,捆绑时间30 min;针刺穴位组与针刺对照点组扎针后捻针3 min,中间捻针1次,留针30 min。捆绑及针刺每隔12 h进行1次,6次治疗后心脏灌注处死大鼠。

1.5 神经功能缺损评分

神经功能缺损评分参照Zea Longa五级4分法^[6]标准对实验大鼠进行评分,评分于大鼠首次治疗前及末次治疗后进行。

1.6 透射电镜观察线粒体超微结构

实验大鼠完成治疗后,心脏灌注处死大鼠,取缺血侧海马组织块,大小约1 mm×1 mm×3 mm,于2.5%戊二醛磷酸缓冲液中固定,固定时间为2 h或更长时间。按常规电镜样本制备过程固定、脱水、浸泡、包埋、固化,超薄切片后,用3%醋酸铀以及硝酸铅双染色,于日立H7700透射电镜下观察,拍片。

1.7 统计学处理

所有数据使用SPSS 17.0软件进行统计处理,数据行正态性检验后,符合正态分布的数据用“ \bar{x} ”进行统计描述,多组计量资料采用单因素方差分析(One-way ANOVA),方差齐者用LSD,方差不齐者用Tamhane's T2法。不符合满足正态分布者,采用非参数检验,用中位数与四分位间距进行统计描述(M(Q))。以 $P < 0.05$ 作为检验水准。

2 结果

2.1 针刺对脑缺血再灌注大鼠神经功能缺损评分的影响

治疗前,与假手术组相比,模型组、针刺对照点组、针刺穴位组神经功能缺损评分较高,差异有统计学意义($P<0.05$),模型组、针刺对照点组、针刺穴位组之间大鼠神经功能缺损评分差异无统计学意义($P>0.05$)。治疗后,造模各组大鼠神经功能缺损评分均有下降,差异有统计学意义($P<0.05$);与模型组相比,针刺穴位组及针刺对照点组大鼠神经功能缺损评分均下降明显,差距有统计学意义($P<0.05$);与针刺对照点相比,针刺穴位组大鼠神经功能评分有下降,差距无统计学意义($P>0.05$)。详见表1。

表1 针刺对脑缺血再灌注大鼠神经功能评分的影响 [n,M(Q)]

分组	n	神经功能缺损评分(分)	
		治疗前	治疗后
假手术组	10	0.00(0.00)	0.00(0.00)
模型组	10	2.00(1.50)*	2.00(1.00)*
针刺对照点组	10	2.00(1.50)*	1.50(1.00)**
针刺穴位组	10	2.00(1.50)*	1.00(0.00)**

注:与假手术组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,# $P<0.05$ 。

2.2 针刺对脑缺血再灌注大鼠线粒体超微结构的影响

电镜观察结果显示(图1),假手术组神经元线粒体结构无明显改变,线粒体呈椭圆形或长条状,外形大小正常,双层膜结构清晰可见,细胞核核仁明显,核膜完整,细胞胞浆无水肿,粗面内质网等细胞器清晰可见。模型组线粒体肿胀明显,线粒体嵴断裂变形,线粒体膜完全破坏,大量空泡形成,细胞胞膜溶解坏死,核仁溶解,胞浆水肿,细胞器少见。针刺对照点组线粒体肿胀,嵴断裂变形明显,线粒体膜破坏,其内可见空泡化改变,细胞胞膜出现溶解,胞浆外泄,轻度水肿,粗面内质网等细胞器明显减少。针刺穴位组线粒体稍肿胀,少部分线粒体出现嵴断裂现象,双层膜结构欠完整,细胞核核仁可见,核膜基本完整,细胞胞浆轻度水肿,未出现明显空泡化改变,粗面内质网结构等细胞器尚清晰。

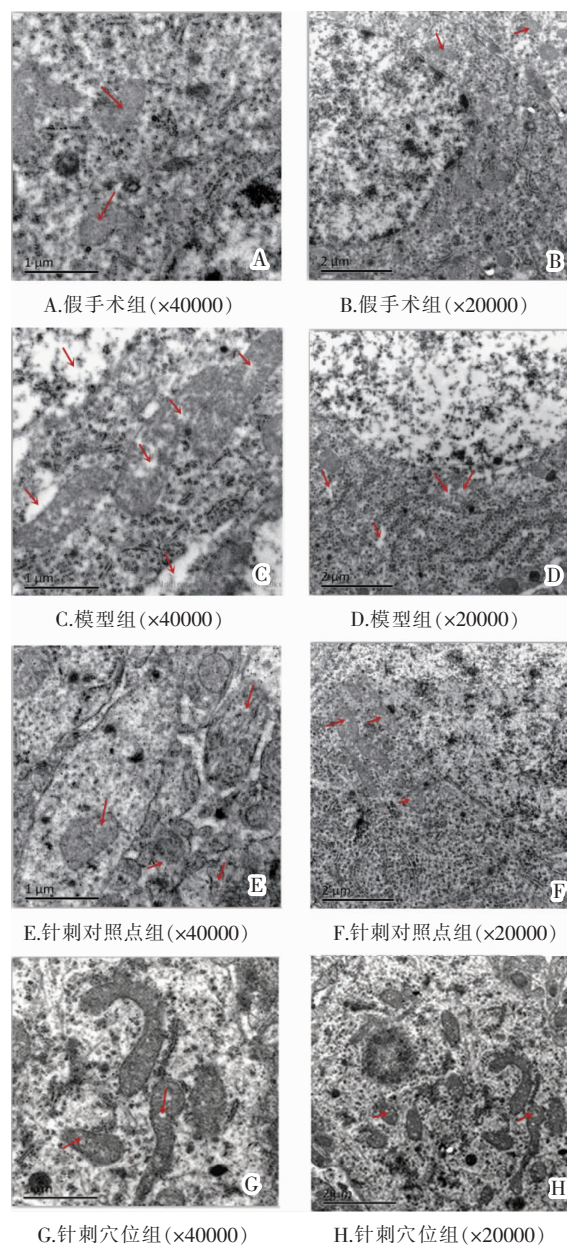


图1 针刺对脑缺血再灌注大鼠线粒体超微结构电镜图

3 讨论

脑缺血再灌注损伤属中医“中风”病范畴。中风病病位在脑,督脉“行于后背正中,上至风府,入属于脑,上巅”,且历代医家多有“病变在脑,首取督脉”之说。本实验所选用的“大椎”“百会”和“人中”三穴为督脉要穴,三穴同用,治疗中风。现代大量研究也证明针刺督脉(穴)对脑缺血再灌注损伤疗效显著。梁艳桂等^[9]发现电针督脉穴位“大椎”“百会”可以通过减轻脑细胞超微结构的损害、下调中枢神经轴突再生抑制因子的表达等达到对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用。王伟等^[10]发现电针百会、人中两穴能

够促进缺血区 HSP70 的表达,从而保护缺血半影区神经元,达到脑保护作用。导师实验组^[11-13]前期研究也表明针刺大椎、百会、人中(穴)能通过改善脑缺血再灌注大鼠神经功能缺损、减少脑梗死面积而达到脑保护作用。

脑缺血后,缺血中心的细胞不可逆的坏死,缺血半暗带区神经细胞则以可逆性的凋亡为主。挽救缺血半暗带区可逆性的细胞凋亡为治疗脑缺血再灌注损伤提供了新的思路,也成为了治疗脑缺血再灌注损伤的关键。在神经细胞凋亡过程中,线粒体起着很关键的作用。在凋亡过程中,由于凋亡信号的刺激,使线粒体膜的完整性受到破坏,线粒体内膜对氢离子的通透性增加引起线粒体膜电位消失^[14];从而导致线粒体内膜的通透性发生变化,使原本位于线粒体内的相关促凋亡因子如细胞色素、凋亡诱导因子、B 细胞淋巴瘤-2 家族等从线粒体释放到胞质中,引起染色质浓缩、DNA 断裂等,最终引起神经细胞凋亡^[15-16]。本实验研究发现,针刺可以减轻大鼠脑缺血再灌注损伤后神经功能缺损评分,同时能有效的维持线粒体超微结构。与模型组比较,针刺对照组及针刺穴位组大鼠线粒体超微结构改变较小,其中针刺穴位组更为明显。即针刺可以通过减轻线粒体超微结构的改变,有效的保持线粒体结构的完整性,从而减少线粒体膜电位的丢失,抑制线粒体内各种促凋亡因子的释放,从而使缺血半暗区细胞凋亡减少,起到对脑组织的保护作用。

参考文献:

[1] 王光胜.脑缺血再灌注损伤机制研究进展[J].医学综述,2011,17(24):3753-3756.
[2] BIELEWICZ J, KURZEPA J, LAGOWSKA-LENARD M, Bartosik-Psujek H.The novel views on the patomechanism of is-

chemic stroke[J].Wiad Lek,2010,63(3):213-220.

- [3] BROUGHTON B R, REUTENS D C, SOBEY C G. Apoptotic mechanisms after cerebbral ischemia.rotoke [J]. 2009,40(5):331-539.
[4] 陈玉敏,陈涛平,冯浩楼.脑缺血再灌注损伤机制与治疗现状[J].医学研究与教育,2012,29(6):47-54.
[5] 陈楚洵,田浩梅,张泓,等.针刺对大鼠局灶性脑缺血后神经功能缺损及梗死面积的影响[J].湖南中医药大学学报,2011,31(7):63-66.
[6] 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.
[7] 李忠仁.实验针灸学(新世纪第二版)[M].北京:中国中医药出版社,2007.
[8] 华兴邦,周浩良.大鼠穴位图谱的研制[J].实验动物与动物实验,1991(1):1-5.
[9] 梁桂艳,谭峰,陈杰,等.电针对脑缺血再灌注大鼠脑皮层超微结构及 Nogo-A 表达的影响[J].中国中西医结合杂志,2012,32(2):209-213.
[10] 王伟,闫也.电针对局灶性脑缺血再灌注大鼠大脑皮层HSP70蛋白的影响[J].中华中医药学刊,2010(2):360-362.
[11] TIAN H, ZHANG H, ZHU J, et al. Acupuncture activates signal transduction pathways related to brain-tissue restoration after ischemic injury [J]. Neural Regeneration Research, 2012,7(24):1866-1872.
[12] 张雨辰.针刺对缺血性损伤脑组织相关蛋白磷酸化及 MAPK/ERK 信号通路的影响[D].长沙:湖南中医药大学,2012.
[13] 蔡何凝.针刺对缺血性脑损伤模型大鼠 TNF- α 、Caspase-3 表达的影响[D].长沙:湖南中医药大学,2012.
[14] 蒋春笋,肖伟明,陈佳.线粒体分裂、融合与细胞凋亡[J].生物物理学报,2007,23(4):256-264.
[15] 栾坤,倪光夏.脑梗死后线粒体介导的细胞凋亡通路及针刺干预作用的研究进展[J].世界科学技术—中医药现代化,2015,17(12):2627-2631.
[16] 刘晓婷,王延让,张明.线粒体介导细胞凋亡的研究进展[J].环境与健康杂志,2013,30(2):182-185.

(本文编辑 匡静之)