

本文引用:颜虹,贺平,武姿含,蒋素容,田浩梅,陈楚淘.针刺大椎、百会、人中穴对大鼠脑缺血再灌注损伤后不同时间点海马脑红蛋白表达的影响[J].湖南中医药大学学报,2018,38(2):165-168.

针刺大椎、百会、人中穴对大鼠脑缺血再灌注损伤后不同时间点海马脑红蛋白表达的影响

颜虹,贺平,武姿含,蒋素容,田浩梅,陈楚淘*
(湖南中医药大学针灸推拿学院,湖南长沙410208)

[摘要] **目的** 观察针刺大椎、百会、人中穴对大鼠脑缺血再灌注损伤后不同时间点海马脑红蛋白(neuroglobin, Ngb)表达的影响,探讨其脑保护作用的部分作用机制。**方法** 采用线栓法制备MCAO模型,将40只雄性SD大鼠随机分为假手术组、模型组、对照点组、穴位组4大组,每组再根据再灌注后时间分为24 h、72 h组,每组5只。完成治疗后,先行神经功能缺损评分再处死大鼠,再采用Western Blot法检测大鼠缺血侧海马Ngb的表达水平。**结果** 神经功能缺损评分:与假手术组比较,模型组、对照点组及穴位组神经功能缺损评分均升高,差异有统计学意义($P<0.05, P<0.01$);模型组、对照点组、穴位组三组神经功能缺损评分差异无统计学意义($P>0.05$)。与24 h组比较,72 h模型组神经功能缺损评分差异无统计学意义($P>0.05$);72 h对照点组及穴位组神经功能缺损评分均下降,差异有统计学意义($P<0.05$)。Ngb:与假手术组比较,模型组Ngb的表达水平明显降低($P<0.01$);与模型组比较,对照点组及穴位组Ngb的表达水平均明显升高($P<0.01$);与对照点组比较,穴位组Ngb的表达水平有升高,但差异无统计学意义($P>0.05$)。与24 h组比较,72 h假手术组、模型组及对照点组Ngb的表达水平均有下降,但差异无统计学意义($P>0.05$);72 h穴位组Ngb的表达水平下降明显,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 针刺能降低脑缺血再灌注损伤大鼠神经功能缺损评分,并可上调海马Ngb的表达水平,从而实现脑保护作用。

[关键词] 脑缺血再灌注;针刺;大椎;百会;人中;海马组织;脑红蛋白

[中图分类号] R245; R743

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2018.02.011

Effect of Acupuncture Dazhui, Baihui and Renzhong Acupoints on Expression of Neuroglobin at Different Time Points in Hippocampus of Rats with Cerebral Ischemia Reperfusion Injury

YAN Hong, HE Ping, WU Zihan, JANG Surong, TIAN Haomei, CHEN Chutao*

(College of Acupuncture and Massage, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

[Abstract] **Objective** To observe the effects of acupuncture Dazhui, Baihui and Renzhong acupoints on hippocampus neuroglobin (Ngb) expression at different time points in rats with middle cerebral artery occlusion (MCAO), and to explore the part mechanism of brain protection. **Methods** MCAO model was established by thread embolism method. 40 male SD rats were randomly divided into 4 groups: sham operation group, model group, control point group and acupoint group. Each group was then divided into two groups according to reperfusion time at 24 h and 72 h, 5 rats in each group. After treatment, the nerve function defect score was measured, then the rats were executed. The expression of Ngb in the ischemic side of hippocampus of rats was determined by Western Blot. **Results** The neurological deficit score: compared with sham operation group, nerve function defect in model group, control group and acupuncture group increased, the difference was statistically significant ($P<$

[收稿日期] 2017-11-01

[基金项目] 国家自然科学基金(81303051);湖南省自然科学基金(2016JJ3101);中医内科学省部共建教育部重点实验室(ZYNK201501)。

[作者简介] 颜虹,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] *陈楚淘,男,博士,副教授,硕士研究生导师, E-mail: 314458702@qq.com。

0.05, $P < 0.01$), while neural function defect score between the model group, control group and acupuncture group was not statistically significant ($P > 0.05$). There was no significant difference in neurological deficit scores at 24 h and 72 h of model group ($P > 0.05$). The neurological deficit scores at 72 h in control group and acupoint group all decreased, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). NgB: compared with the sham group, the expression level of NgB in the model group decreased significantly ($P < 0.01$); compared with the model group, the expression of NgB in the control group and acupuncture group significantly increased ($P < 0.01$); and compared with the control group, the expression of NgB in acupuncture group increased, but the difference was not statistically significant ($P > 0.05$). Compared with the time at 24 h, the expression level of NgB at 72 h in sham operation group, model group and control group decreased, but the difference was not statistically significant ($P > 0.05$); the expression level of brain erythropoietin at 72 h in acupuncture group decreased significantly, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** Acupuncture could reduce the neurological deficit score in rats with cerebral ischemia-reperfusion injury, and up-regulate the expression level of erythropoietin in hippocampus to achieve the protective effect on brain.

[**Keywords**] cerebral ischemia reperfusion; acupuncture; Dazhui; Baihui; Renzhong; hippocampus; neuroglobin

脑卒中是导致人类致残和致死的主要病因之一,在我国每年新发中风患者人数约170万,而以大脑中动脉或其分支梗塞为主的脑缺血大约占所有脑血管疾病的80%左右^[1]。缺血性脑卒中发生后,一定时间内缺血缺氧的脑组织获得血液再供应时,其功能不但没有减轻或恢复反而加重,这种现象称为脑缺血再灌注损伤(cerebral ischemia reperfusion injury, CIRI)。课题组前期研究^[2-3]表明针刺大椎、百会、人中(穴)能通过改善 CIRI 大鼠神经功能缺损、减少脑梗死面积从而达到脑保护作用。脑红蛋白(neuroglobin, NgB)是继血红蛋白、肌红蛋白之后发现的第三类具有运输与储存氧的球蛋白,广泛分布于脑组织的各个区域及周围神经系统。NgB 的发现为临床治疗脑缺血缺氧疾病提供重要思路。有研究表明:电针预处理能上调脑缺血再灌注大鼠缺血半暗带 NgB 表达,诱导脑缺血耐受,从而减轻 CIRI^[4],也有实验证实 CIRI 大鼠脑组织 NgB 于 24 h 后表达达高峰^[5]。因此,本实验研究针刺大椎、百会、人中穴对 CIRI 大鼠海马 NgB 的表达影响,探讨其可能机制。

1 资料与方法

1.1 实验动物及分组

SD 雄性大鼠 40 只,体质量 230~250 g,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供。许可证编号:scxk(湘)2009-004。实验动物常规饲养 1 周后,随机分为假手术组、模型组、对照点组、穴位组 4 组,每组再根据再灌注后时间随机分为 24 h、72 h 组,每组 5 只。

1.2 动物模型的建立及纳入实验标准

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,以 10%的水合氯醛按 0.3 mL/100 g 行腹腔麻醉,颈部备皮,常规消毒后,行钝性分离皮下结构暴露颈总动脉,于颈总动脉近分叉处剪开一小口,插入尼龙线栓[长度 45 mm,直径 0.26 mm,头端直径(0.36±0.02) mm],线栓沿颈内动脉推进,当进入约 19 mm 时,可有轻微阻力感,证明线栓头端达到大脑中动脉处,扎紧备线,缝合皮肤,线栓尾部固定于皮肤上。缺血 2 h 后小心抽出线栓约 10 mm,即形成再灌注模型。假手术组仅插入尼龙线栓约 5 mm,不栓塞大脑中动脉,其余步骤同造模组。待大鼠生命体征平稳后,参考 Zea Lonnga 五级 4 分法^[6]标准评分,造模大鼠神经功能缺损评分为 1~3 分者,且处死后取脑可见大鼠脑梗塞灶位于缺血颞叶皮质区,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。剔除不符合实验标准大鼠后,按相同方法予以补充。

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、百会、人中三穴组成。大椎直刺 5 mm;百会平刺 10 mm;人中向鼻中隔方向斜刺 2 mm。对照点组取穴为穴位左侧旁开 0.3 cm 处非经非穴点,针刺方法与针刺穴位组相同。

1.4 干预方法

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,捆绑时间为 30 min;穴位组与对照点组扎针后每穴捻转 1 min,中间捻转 1 次,留针 30 min。捆绑及针刺每隔 12 h/次,24 h 后每组随机选取 5 只处死,72 h 后处死剩余大鼠。

1.5 观察指标及检测方法

1.5.1 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。大鼠再灌注后并且麻醉清醒后,完成治疗后进行神经功能缺损评分。0 分,无神经功能缺损症状;1 分,提尾时左侧前肢不能伸直;2 分,行走时向左侧转圈;3 分,行走时向左侧倾倒;4 分,不能自发行走,有意识障碍。

1.5.2 Western blot 法检测 各组大鼠缺血侧海马 Ngb 的表达水平 大鼠造模 24 h 后,每组随机取 5 只大鼠,从海马组织中提取总蛋白,检测蛋白浓度,再电泳,转膜,用 1×TBST 配制 5%脱脂奶粉封闭,一抗 (Anti-Ngb Rabbit-13499-1-AP,β-actin Mouse-60008-1-Ig) 孵育,4 ℃过夜,二抗 (HRP goat anti-mouse.HRP goat anti-rabbit)孵育 45~60 min,ECL 显色曝光。将曝光后的底片扫描,并用 quantity one 专业灰度分析软件进行分析,测定目标带的灰度值,并计算出目标带与 β-actin 的比值。

1.6 统计学分析

所有数据使用 SPSS 22.0 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“ $\bar{x}\pm s$ ”进行统计描述,多组计量资料采用单因素方差分析,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 $P<0.05$ 作为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 针刺大椎、百会、人中穴对脑缺血再灌注损伤大鼠神经功能缺损评分的影响

组间比较:与假手术组比较,模型组、对照点组及穴位组神经功能缺损评分均升高,差异有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$);模型组、对照点组、穴位组三组神经功能缺损评分差异无统计学意义($P>0.05$),但对照点组及穴位组神经功能缺损评分有下降趋势。组内比较:与 24 h 比较,72 h 模型组神经功能缺损评分差异无统计学意义($P>0.05$);对照点组及穴位

组神经功能缺损评分均明显下降,差异有统计学意义($P<0.05$)。结果见表 1。

表 1 大鼠脑缺血再灌注损伤后不同时间点神经功能

分组	n	缺损评分 [M(Q)]	
		24 h	72 h
假手术组	5	0.00(0.00)	0.00(0.00)
模型组	5	3.00(1.00)**	2.00(1.00)**
对照点组	5	3.00(0.50)**	1.00(1.00)* [△]
穴位组	5	2.00(1.50)*	1.00(1.00)* [△]

注:组间比较:与假手术组比较,★ $P<0.05$,★★ $P<0.01$;组内比较:与 24 h 比较,△ $P<0.05$ 。

2.2 针刺大椎、百会、人中穴对脑缺血再灌注损伤大鼠海马 Ngb 表达的影响

采用 Western blot 法对各组大鼠缺血侧海马中 Ngb 的表达水平进行检测,各组显影结果如图 1 所示。组间比较:与假手术组比较,模型组 Ngb 的表达水平明显降低($P<0.01$);与模型组比较,对照点组及穴位组 Ngb 的表达水平均明显升高($P<0.01$);与对照点组比较,穴位组 Ngb 的表达水平差异无统计学意义($P>0.05$)。组内比较:与 24 h 比较,72 h 假手术组、模型组及对照点组 Ngb 的表达水平均有下降,但差异无统计学意义($P>0.05$);72 h 穴位组 Ngb 的表达水平下降明显,差异有统计学意义($P<0.05$)。结果见表 2。

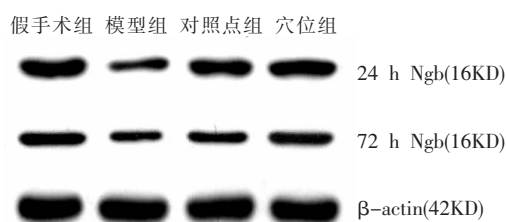


图 1 不同时间点各组大鼠缺血侧海马 Ngb 电泳图

表 2 大鼠脑缺血再灌注损伤后不同时间点海马 Ngb 的表达 ($\bar{x}\pm s$, Ngb/β-actin)

分组	n	24 h	72 h
假手术组	5	0.46±0.03	0.43±0.03
模型组	5	0.24±0.02**	0.21±0.05**
对照点组	5	0.35±0.04** ^{△△}	0.33±0.03** ^{△△}
穴位组	5	0.37±0.03** ^{△△}	0.33±0.02** ^{△△▲}

注:组间比较:与假手术组比较,★★ $P<0.01$;与模型组比较,△△ $P<0.01$ 。组内比较:与 24 h 比较,▲ $P<0.05$ 。

3 讨论

针刺治疗 CIRI 的疗效已被广泛肯定,并且针刺

治疗无副作用、安全、经济,临床越来越多患者接受有中医特色的针刺治疗方法。课题组前期研究^[2-3]表明针刺大椎、百会、人中(穴)能通过改善 CIRI 大鼠神经功能缺损、减少脑梗死面积从而达到脑保护作用。也有研究表明^[9]针刺水沟穴能抑制细胞凋亡促进神经功能重塑、减轻病理损伤、缩小梗死面积、抑制炎症因子表达、减轻钙超载与自由基损伤、调节脑血管舒缩功能、改善脑循环等。针刺督脉大椎、百会,可调节局灶性脑缺血性大鼠缺血后脑组织中的 NO(一氧化氮)、NOS(一氧化氮合酶)及 ET(内皮素)水平,从而改善脑血流量,有利于避免缺血后神经元的进一步损伤^[10]。

研究证实 Ngb 可保护神经元对抗缺血/缺氧损伤,抑制神经元凋亡^[11-12]。尚爱加等^[13-14]发现沙鼠前脑缺血后 10 min Ngb mRNA 表达低于正常水平,免疫组化染色显示沙鼠 CIRI 24 h 后海马各区的 Ngb 阳性细胞数量明显降低。本实验结果表明:CIRI 后大鼠海马 Ngb 表达的明显减少,这与尚爱加等人的研究结果一致。本实验中 CIRI 大鼠经针刺治疗后海马 Ngb 的表达明显上调,但穴位组与对照点组比较,脑红蛋白的表达水平差异无统计学意义。72 h 与 24 h 比较,Ngb 的表达呈下降趋势,假手术组、模型组及对照点组差异无统计学意义,穴位组差异有统计学意义,说明针刺对上调 CIRI 大鼠海马脑红蛋白表达的效应 24 h 强于 72 h,因此临床上治疗 CIRI 要尽早开始针刺治疗。本实验同时也表明:针刺大椎、百会、人中能降低 CIRI 大鼠神经功能缺损评分,在本实验中,与 24 h 比较,72 h 假手术组、模型组神经功能缺损评分差异无统计学意义,对照点组及穴位组神经功能缺损评分差异有统计学意义,表明针刺能降低 CIRI 大鼠神经功能缺损评分,穴位组神经功能缺损评分降低趋势更明显。

综上所述,针刺能上调 CIRI 大鼠海马 Ngb 的表达水平,能降低 CIRI 大鼠神经功能缺损评分,从

而实现脑保护作用。但是针刺上调海马 Ngb 表达水平的机制尚不完全清楚,有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 邓容.电针任督脉对脑缺血再灌注大鼠炎症反应的影响[D].广州:广州中医药大学,2016:1-2.
- [2] 陈楚淘,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.
- [3] 刘琴,林亚平,陈文,等.针刺联合亚低温对脑缺血再灌注损伤大鼠脑组织 p-Raf1, p-ERK1/2 的影响[J].湖南中医药大学学报,2016,36(1):58-62.
- [4] 谢亚宁,王枫,王强,等.电针对脑缺血再灌注大鼠脑红蛋白的影响[J].针刺研究,2012,37(5):380-384.
- [5] 陈秀莲,陈瑞,高春锦,等.短暂前脑缺血小鼠海马脑红蛋白表达的动态变化[J].动物学杂志,2008,43(1):147-152.
- [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[M].北京:中国中医药出版社,2003:425-431.
- [8] 华兴邦.大白鼠穴位图谱的研究[J].实验动物与动物实验,1991(1):13-15.
- [9] 王晓光,樊小农,常女子,等.针刺水沟穴治疗脑梗死机制的研究进展[J].针灸临床杂志,2014,30(7):74-76.
- [10] 许能贵,易玮,赖新生,等.电针对局灶性脑缺血大鼠 NO、NOS 和 ET-1 的影响[J].广州中医药大学学报,2002,19(1):61-69.
- [11] ZHANG L, LI LH, QU Y, et al. Neuroglobin and hypoxic-ischemic brain damage.[J]. Chinese journal of contemporary pediatrics, 2008, 10(2):265-268.
- [12] WANG X, LIU J, ZHU H, et al. Effects of Neuroglobin Overexpression on Acute Brain Injury and Long-Term Outcomes After Focal Cerebral Ischemia [J]. Stroke; a journal of cerebral circulation, 2008, 39(6):1869-1874.
- [13] 尚爱加,周定标,高艳,等.沙鼠前脑缺血后脑红蛋白的表达变化[J].中华医学杂志,2004,84(16):1390-1392.
- [14] 尚爱加,周定标,孟祥辉,等.脑缺血再灌注损伤后大脑皮质和海马区脑红蛋白的表达变化[J].解放军医学杂志,2006,31(11):1060-1062.

(本文编辑 匡静之)