

本文引用:武姿含,蒋素容,陈芯仪,高音来,肖山峰,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ES蛋白表达的影响[J].湖南中医药大学学报,2019,39(4):507-510.

针刺大椎、百会、人中穴对大鼠脑缺血再灌注损伤后ES蛋白表达的影响

武姿含,蒋素容,陈芯仪,高音来,肖山峰,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** 探讨针刺大椎、百会、人中穴对内皮抑素(Endostatin, ES)作用于大鼠脑缺血再灌注损伤后的表达变化及影响,研究ES作用于脑保护的部分机制。**方法** 将50只SD大鼠随机分为正常组、假手术组各10只,其余30只大鼠参照ZeaLonga线栓法制作大鼠中动脉缺血模型,造模成功后再随机分为模型组、依达拉奉组、针刺组,10只/组。正常组、假手术组、模型组仅捆绑,依达拉奉组以3 mg/kg(稀释至1 mL)腹腔注射,针刺组行大椎、人中、百会穴针刺,每12 h行1次治疗,6次后行神经功能缺损评分,再行Western Blot法检测ES表达。**结果** (1)神经功能缺损评分对比:治疗后,与正常组、假手术组比较,其余3组评分较高($P<0.01$);与模型组比较,依达拉奉组及针刺组评分下降,差异均有统计学意义($P<0.01$);治疗前后依达拉奉组及针刺组组内比较,差异有统计学意义($P<0.01$)。(2)ES比较:治疗后与正常组及假手术组比较,其余3组差异均有统计学意义($P<0.01$);与模型组比较,依达拉奉组及针刺组差异均有统计学意义($P<0.01$)。**结论** 大鼠脑缺血再灌注损伤后,针刺能使神经功能缺损评分下降,并能在一定程度上减少缺血区域海马组织ES的表达,达到减轻脑缺血再灌注损伤的作用机制,促进脑组织的修复。

[关键词] 脑缺血再灌注;针刺;大椎穴;百会穴;人中穴;内皮抑素

[中图分类号] R245

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2019.04.015

Effects of Acupuncture Dazhui (DU14), Baihui (GV20), Renzhong (GV26) on ES Protein Expression after Cerebral Ischemia Reperfusion Injury in Rats

WU Zihan, JIANG Surong, CHEN Xinyi, GAO Yinlai, XIAO Shanfeng, TIAN Haomei, CHEN Chutao*
(College of Acupuncture, Moxibustion and Massage, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the changes and effects of acupuncture Dazhui (DU14), Baihui (GV20), Renzhong (GV26) on the expression of Endostatin (ES) after cerebral ischemia reperfusion injury in rats and the mechanism of ES on brain protection. **Methods** A total of 50 SD rats were randomly divided into the normal group and the sham operation group, with 10 rats in each group. The other 30 rats were used to establish cerebral ischemia model according to the ZeaLonga method. After successful modeling, they were divided into the model group, the edaravone group, and the acupuncture group, with 10 rats in each group. The normal group, the sham operation group and the model group were only bundled. The edaravone group was injected with 3mg/kg (diluted to 1 mL) by intraperitoneal injection. In the acupuncture group, acupuncture at Dazhui (DU14), Baihui (GV20), Renzhong (GV26) was performed for 1 time in every 12 h, and neurological function defect score was performed after 6 times, and then the expression of ES was detected by Western Blot. **Results** (1) Comparison of neurological defects scores between groups: After treatment, compared with the normal group, and the sham operation group, the scores of other 3 groups were higher. Compared with the model group, the scores of the edaravone group and the acupuncture group decreased. The differences were statistically significant ($P<0.01$). Comparing among the groups before and after the treatment, the differences were statistically significant ($P<0.01$). (2) Comparison of ES: After treatment, compared with the normal group and the sham operation group, the differences among the other 3 groups were statistically significant ($P<0.01$). Compared with the model group, the difference between the edaravone group and the acupuncture group was statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** After cerebral ischemia reperfusion injury in rats, acupuncture can reduce the score of nerve function defect and reduce the expression of ES in the hippocampus tissue in the ischemia area to a certain extent, so as to reduce the mechanism of cerebral ischemia

[收稿日期] 2018-11-26

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81303051,81874508);大学生创新创业训练计划(2017-8397)。

[作者简介] 武姿含,女,在读硕士研究生,研究方向:经脉-脏腑相关机制研究。

[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。

reperfusion injury and promote the repair of brain tissue.

[**Keywords**] cerebral ischemia reperfusion; acupuncture; Dazhui (DU14); Baihui (GV20); Renzhong (GV26); endothelial inhibition

缺血性脑卒中 (ischemic stroke, IS) 又名脑梗死, 本病多由脑血管严重的狭窄、痉挛或完全阻塞导致。发生缺血性脑卒中后, 在一定时间内, 脑梗死区域获得再次的血液灌注时, 组织损伤非但没有减轻或恢复反而进行性加重, 这种现象为脑缺血再灌注损伤 (cerebral ischemia reperfusion injury, CIRI)^[1]。大脑中动脉栓塞后, 缺血半暗区神经生长抑制因子表达明显上升, 如内皮抑素 (endostatin, ES)。课题组前期研究发现: 穴位组 ES 蛋白磷酸化显著下调至 4%^[2-5], 同时文献显示: ES 是一种内源性血管生成抑制剂^[6], 是最有效的血管生成抑制因子之一, 可抑制内皮细胞的迁移和生长, 且能在 bFGF 刺激血管内皮细胞增殖过程中, 诱导内皮细胞凋亡, 抑制血管新生的各个环节^[7]。ES 能下调促血管形成基因的表达, 上调抗血管形成基因的表达, 双向调节病理性血管发生。故本实验观察针刺大椎、百会、人中(穴)72 h 后鼠脑梗死区域海马组织中蛋白的表达情况, 从 ES 表达程度分析探讨针刺对脑组织缺血损伤部分作用机制。

1 资料与方法

1.1 动物及分组

SD 大鼠 50 只, SPF 级, 雄性, 体质量 200~250 g, 湖南中医药大学动物实验中心提供[动物许可证号: SCXK(湘)2016-0002]。20 ℃环境下, 常规进食、饮水 3 d 并保持 12 h 的昼/夜循环之后, 随机分为正常组 10 只、假手术组 10 只, 剩余 30 只造模成功后再随机分成模型组、依达拉奉组、针刺组, 10 只/组。

1.2 动物模型建立及纳入试验标准

需造模 30 只大鼠参照 Zea Longa 方法^[8]并加以改良制成局灶性脑缺血再灌注损伤模型。大鼠禁食、常规饮水 24 h 后, 用 10% 的水合氯醛按 0.3 mL/100 g 剂量腹腔注射, 仰卧位在右侧距前中线 0.3 cm 处, 切 1 cm 小口, 用止血钳行钝性剥离皮下筋膜, 暴露颈总动脉 (CCA) 及分支颈内动脉 (ICA)、颈外动脉 (ECA), 分离以上动脉及迷走神经并挂线, 于近心端结扎 CCA 与 ECA, 动脉夹夹住 ICA, 在距 CCA 分支形成 ICA、ECA 分叉约 3 mm 处剪一小口, 将尼龙线栓由 CCA 插入, 松开动脉夹, 到达 19 mm 时感到稍许阻挡, 表明线栓头侧已到达大脑中动脉, 紧紧结

扎 ICA 远心端细线后将伤口缝合, 在皮肤上固定好线栓末端。缺血 120 min 后拔出 1 cm 左右线栓, 造成再灌注模型。术后 20 ℃环境下常规进食、水及饲养。假手术组造成缺血状态但不作再灌注, 其余操作及步骤与造模组一致。待麻醉醒后, 生命各体征稳定, 参照 Zea Longa 五级 5 分标准^[9]评分, 评分为 1~3 分者入组, 解剖后取脑可见梗塞区域在缺血颞叶皮质, 与大脑中动脉供血区域一致, 提示模型成功。取脑时若有显著的蛛网膜下腔出血的大鼠则剔除试验。剔除不符合试验标准者后, 以同样的造模方式进行补齐。

1.3 选穴及针刺方法

穴位选取参照《实验针灸学》^[9]《实验动物穴位图谱》^[10]及人体骨度分寸法。大椎: 直刺 0.5 cm; 百会: 平刺 0.1 cm; 人中: 向鼻中隔方向斜刺 0.2 cm。

1.4 干预方法

正常组不做任何处理, 其他组成功造模后待大鼠呼吸、心率等生命体征稳定之后处理如下: 假手术组与模型组动物仅做绑扎, 时间为 0.5 h; 依达拉奉组捆绑并腹腔注射 3 mg/kg (稀释至 1 mL), 时间为 0.5 h; 针刺组于绑扎后行针刺治疗, 每个穴位行针捻转 60 s, 每 15 min 行针 1 次, 留针 0.5 h 后松绑。各组大鼠每隔 12 h 行 1 次捆绑/治疗, 72 h 后行神经功能缺损评分, 再用 10% 水合氯醛麻醉并处死。

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 5 分法^[9], 将实验大鼠评分后, 再行再灌注, 待大鼠清醒后, 完成治疗对其再次做神经功能缺损评分。具体如下: 0 分, 无神经功能损伤症状; 1 分, 提尾时栓塞动脉对侧前肢不能伸直; 2 分, 行走时向栓塞动脉对侧旋转; 3 分, 行走时向栓塞动脉对侧倾倒; 4 分, 不能自发行走, 意识丧失。

1.5.2 Western blot 法检测 ES 表达 大鼠完成治疗并腹腔麻醉致死, 断头后分离缺血区海马的组织块, 冰 NaCl 10% 冲洗后取 5 mm×5 mm 大小, 固定于 4% 多聚甲醛 24 h 后石蜡包埋、切片。剪取 0.025 g 组织块, 冰预冷 PBS 洗组织, 加入 200 μL RIPA 裂解液于匀浆器中反复研磨组织直至看不见组织块, 冰上, 蛋白裂解 10 min, 离心后分装置于离心管中; 测定蛋白浓度后电泳、转膜后, 用 1×TBST 配制的 5%

脱脂奶粉,将膜浸入后,室温放置 90 min。一抗(Rabbit-bs-0547R)与膜共同孵育,4 °C 过夜;二抗(HRP Proteintech-Rabbit)与膜共同孵育90 min,洗色后 ECL 显色并曝光,显影冲洗,底片扫描后用 quantity one 专业灰度分析软件进行分析,计算结果。

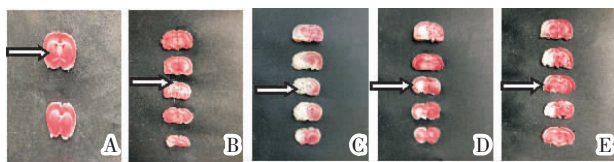
1.6 统计学分析

所有数据使用 SPSS 23.0 软件进行处理,符合正态分布的数据用“ $\bar{x}\pm s$ ”表示;多组计量资料采用单因素方差分析(One-way ANOVA),方差齐者用 LSD 和 SNK 法,方差不齐者用 Tamhane's T_2 或 Dunnett's T_3 法,计数资料采用 χ^2 检验。不满足正态分布的数据,采用非参数检验,用中位数和四分位间距[M(Q)]描述。

2 结果

2.1 针刺对脑缺血再灌注损伤大鼠神经功能缺损评分的影响

治疗后,各组大鼠大脑组织行切片后用 TTC 染色,红色的染色区为正常组织区域,白色的染色区为梗死灶,正常组与假手术组未见梗死区,其余 3 组均有大小不同的梗死灶。治疗前,与正常组及假手术组比较,其余 3 组神经功能缺损评分均较高,差异具有统计学意义($P<0.01$),提示造模成功。各组治疗前后比较,依达拉奉组与针刺组显著下降,差异具有统计学意义($P<0.01$),且依达拉奉组、针刺组低于模型组($P<0.01$)。见图 1、表 1。



注:A.正常组;B.假手术组;C.模型组;D.依达拉奉组;E.针刺组

图 1 大鼠缺血再灌注损伤治疗后脑梗死面积 TTC 染色图

表 1 大鼠脑缺血再灌注损伤后不同组神经功能缺损评分[M(Q),分]

组别	n	治疗前	治疗后
正常组	10	0.00(0.00)	0.00(0.00)
假手术组	10	0.00(0.00)	0.00(0.00)
模型组	10	2.00(2.00)**	2.00(1.00)**
依达拉奉组	10	2.00(2.00)**	1.00(1.00)** $\Delta\Delta\Delta\#$
针刺组	10	2.00(2.00)**	1.00(0.25)** $\Delta\Delta\Delta\#$

注:与正常组、假手术组比较,** $P<0.01$;与模型组比较, $\Delta\Delta\Delta P<0.01$;治疗前后组内比较, $\#P<0.01$

2.2 针刺对脑缺血再灌注损伤大鼠海马 ES 表达的影响

与正常组及假手术组比较,模型组、针刺组和依达拉奉组 ES 的表达程度均上升,差异具有显著统计学意义($P<0.01$)。与模型组比较,针刺组、依达拉奉组 ES 的表达水平均降低,差异有统计学意义($P<0.01$);与针刺组比较,依达拉奉组 ES 表达降低,但依达拉奉组与针刺组之间 ES 表达差异无统计学意义($P>0.05$)。见图 2、表 2。

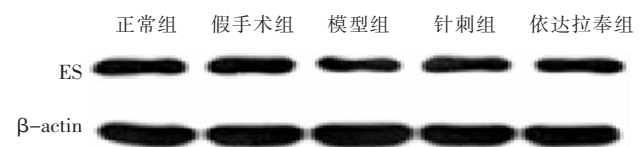


图 2 大鼠脑缺血再灌注损伤后缺血侧 ES 的电泳图

表 2 大鼠脑缺血再灌注损伤后不同组缺血侧海马 ES 的表达($\bar{x}\pm s$)

组别	n	ES/ β -action
正常组	10	0.10 \pm 0.03
假手术组	10	0.12 \pm 0.03
模型组	10	0.50 \pm 0.11 $\Delta\Delta\Delta\#$
依达拉奉组	10	0.22 \pm 0.04 $\Delta\Delta\Delta\#$
针刺组	10	0.26 \pm 0.06 $\Delta\Delta\Delta\#$

注:与正常组比较, $\Delta\Delta P<0.01$;与假手术组比较, $\#\# P<0.01$;与模型组比较, $\Delta\Delta\Delta P<0.01$

3 讨论

ES 可抑制内皮细胞生长,诱导内皮细胞凋亡,在下调血管内皮组织再生与增殖有着重要的作用。研究表明:大脑中动脉栓塞后,缺血半暗区 ES 显著上升,并随着时间的延长呈增长趋势^[1]。针刺可抑制炎症反应,抑制脑水肿形成,抑制细胞凋亡,促进神经与血管再生等^[2],这与针刺能抑制促凋亡因子的表达有密切关系。丁玲^[3]研究发现电针百会、水沟、足三里可促进 MCAO 大鼠内血管新生,其作用机制可能与下调 ES 表达有关。同时针刺“百会”“大椎”穴可有效挽救半影区缺血神经元,修复损伤神经元,防止其发生坏死,促进梗死灶周围正常神经元出芽、再生,并形成新的突触^[4]。针刺可促进脑缺血区血管新生,增加微血管密度,下调血管再生因子蛋白表达,其机制可能为通过多条通路对细胞凋亡蛋白、增生与分化蛋白、周期蛋白进行调控,抑制缺血脑组织细胞的凋亡、促进细胞增殖来实现对缺血损伤脑组

织的保护作用^[15]。头针可抑制 ES 表达^[16-17],促进血管内皮细胞增殖、迁移、降解血管基底膜,诱导心血管形成,加速周围侧枝循环的建立,从而减轻脑缺血损伤。电针能抑制 MCAO 大鼠脑内血管内皮细胞 ES 表达^[18],从而促进血管再生,增加脑供血。

本实验结果证明:脑缺血再灌注损伤后,大鼠神经功能缺损的评分在针刺治疗后降低($P<0.01$),且针刺组治疗后脑组织 ES 的表达降低($P<0.05$),提示针刺能促进 ES 的抑制生长,使脑缺血再灌注损伤后大鼠神经功能缺损评分降低,同时能明显降低大鼠 ES 表达,降低脑缺血再灌注损伤风险。其效应机制可能与通过针刺下调 ES 表达,促进脑血管新生有关。针刺组与依达拉奉组 ES 的表达差异无统计学意义($P>0.05$),说明针刺治疗与依达拉奉对 CIRI 后大鼠下达 ES 表达效应相当。由此推测,针刺大椎、百会、人中穴能更有效地下调 CIRI 大鼠大脑缺血侧海马 ES 的表达水平,从而实现脑保护的作用。

参考文献

- [1] 涂雪松.缺血性脑卒中的流行病学研究[J].中国临床神经科学,2016,24(5):594-599.
- [2] HAOMEI TIAN, HONG ZHANG, JUNBAO ZHU, et al. Acupuncture activates signal transduction pathways related to brain-tissue restoration after ischemic injury[J]. Neural Regeneration Research, 2012,7(24):1866-1872.
- [3] 陈文,林亚平,杨茜云,等.针刺对脑缺血再灌注大鼠相关 miRNA 数目的影响[J].湖南中医药大学学报,2015,35(11):61-64.
- [4] 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.
- [5] 朱军宝,刘步平,张泓,等.应用蛋白芯片技术筛选针刺对脑缺血再灌注损伤大鼠的凋亡相关蛋白[J].中南医学科学杂志,2014,42(3):222-225.
- [6] 李晓华.rAAV 载体介导内皮抑素抑制鼻咽癌生长和转移的实验研究[D].广州:第一军医大学,2005.
- [7] 丁玲,陈邦国,张晓明,等.电针对局灶性脑缺血再灌注大鼠脑组织 bFGF、ES 表达的影响[J].光明中医,2012,27(5):879-881.
- [8] 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.
- [9] 李忠仁.实验针灸学[M].北京:中国中医药出版社,2003:425-431.
- [10] 华兴邦,周浩良.大鼠穴位图谱的研制[J].中国中西医结合杂志,2012,32(2):209-213.
- [11] 郭峰,王欢,马贤德,等.眼针脑缺血再灌注模型大鼠脑组织 VEGF、Ang-1 及内皮抑素表达的影响[J].实用中医内科杂志,2011,25(5):22-23.
- [12] 杨杨,孙华.近 10 年针刺治疗脑缺血再灌注损伤的研究进展[J].中国针灸,2015,35(7):749-752.
- [13] 丁玲.电针对局灶性脑缺血再灌注大鼠脑组织 bFGF、ES 表达的影响[D].武汉:湖北中医药大学,2012.
- [14] 许能贵,汪帼斌,余世锋,等.针刺百会、大椎穴对局灶性脑缺血大鼠皮层脑源性神经营养因子表达的影响[J].广州中医药大学学报,2004,21(6):439-442.
- [15] 杨敏,陈邦国,梁超.头针对大鼠局灶性脑缺血再灌注后脑组织 VEGF 及 ES 表达的影响[J].中国中医急症,2014,23(6):1012-1013.
- [16] 张红星,王琼,周利,等.头针抗大鼠急性脑缺血再灌注炎症损伤的作用机制[J].中西医结合学报,2009,7(8):769-774.
- [17] 杨敏,陈邦国,梁超.头针对大鼠局灶性缺血再灌注后脑组织 VEGF 及 ES 表达的影响[J].中国中医急症,2014,23(8):1012-1013.
- [18] 万秋霞,王威威,刘冬冬,等.电针预处理对大鼠脑缺血再灌注损伤后颈静脉血糖及脑水肿的影响[J].同济大学学报(医学版),2014,35(2):39-42.

(本文编辑 匡静之)