

头穴透刺对急性脑缺血大鼠海马齿状回 nestin 影响的研究

吴洪阳,王华,吴绪平

【摘要】 目的:通过观察头穴透刺对急性脑缺血大鼠海马齿状回 Nestin 表达的变化,探讨头穴透刺抗脑缺血损伤的作用机理。方法:雄性 SD 大鼠 32 只,随机分为正常组、脑缺血组、假手术组、头穴透刺组各 8 只。采用改良线栓法制作大鼠大脑中动脉栓塞局灶性脑缺血模型,头穴透刺组大鼠待清醒后 1h,取百会透前顶、率谷透悬厘进行针刺治疗。治疗后对各组大鼠进行神经功能缺损评分,采用免疫组化法检测海马齿状回神经巢蛋白(nestin)的表达。结果:治疗 7d 后,头穴透刺组大鼠神经缺损评分明显低于较脑缺血组($P<0.01$);脑缺血组与正常组及假手术组比较,nestin 表达明显增加($P<0.01$);与脑缺血组比较,头穴透刺组 nestin 阳性表达明显增加($P<0.01$)。结论:头穴透刺可以使急性脑缺血大鼠受损神经功能明显恢复,能使脑缺血大鼠海马齿状回 nestin 的表达明显增加,提示头穴透刺有显著抗脑缺血损伤的作用。

【关键词】 脑缺血;头穴透刺;神经巢蛋白

【中图分类号】 R49;R743.3 **【DOI】** 10.3870/zgkf.2013.02.002

Effect of scalp-point penetration needling on the expression of nestin in hippocampal dentate gyrus of rats with acute cerebral ischemia WU Hong-yang, WANG Hua, WU Xu-ping. Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430061, China

【Abstract】 Objective: To investigate the effect of scalp-point penetration needling on the expression of nestin in hippocampal dentate gyrus of rats with acute cerebral ischemia, and the mechanism for scalp-point penetration needling resisting the injury of acute cerebral ischemia. Methods: All 32 SD rats were randomly divided into four groups, with 8 rats in each group: normal group, sham-operated group, cerebral ischemia group and scalp-point penetration needling group. Focal cerebral ischemia model of rats was made by middle cerebral artery occlusion using a thread block technique. The rats in scalp-point penetration needling group were subjected to electro-acupuncture (EA) at Baihui (GV20) through Qinding (GV21) and Shuaigu (GB8) through Xuanli (GB6) with G6805-Ⅱ electro-acupuncture instrument after the rats woke up. After treatment, the neurologic deficit score was recorded and nestin in hippocampal dentate gyrus was detected by using immunohistochemistry. Results: After treatment for 7 days, the neurologic deficit score in scalp-point penetration needling group was obviously higher than in cerebral ischemia group ($P<0.01$). As compared with sham-operated group and normal control group, the expression of nestin in hippocampal dentate gyrus of scalp-point penetration needling group was increased greatly ($P<0.01$). As compared with cerebral ischemia group, the expression of nestin in scalp-point penetration needling group was significantly increased ($P<0.01$). Conclusion: The neurologic impairment of rats with cerebral ischemia was improved obviously and the expression of nestin in hippocampal dentate gyrus increased by scalp-point penetration needling, indicating that scalp-point penetration needling can resist cerebral ischemia injury.

【Key words】 cerebral ischemia; scalp-point penetration needling; nestin

脑缺血的治疗一直是临床上的一大难题,大量的临床和实验研究表明,头穴透刺治疗脑缺血具有较好的疗效^[1-3]。神经巢蛋白(nestin)是公认的早期原始神经细胞的标志,与提高脑的抗损伤能力有关^[4-5]。

研究拟探讨头穴透刺对急性脑缺血大鼠海马齿状回 nestin 表达的影响。

1 材料与方法

1.1 材料 ①实验动物:选用雄性 SD 大鼠 32 只(华中科技大学同济医学院实验动物中心提供,SCXK(鄂)2010-0007),体质量 200~250g。②试剂及仪器:水合氯醛、0.9%氯化钠、多聚甲醛(国药集团化学试剂

基金项目:湖北省自然科学基金资助项目(2006ABA061)

收稿日期:2013-01-02

作者单位:湖北中医药大学,武汉 430061

作者简介:吴洪阳(1984-),女,博士研究生,主要从事针灸效应基础方面的研究。

有限公司),BS110 天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司),TB-718E 型生物组织自动包埋机(湖北泰维医疗科技有限公司),Axiovert 40CFL 显微镜(德国 ZWISS),电热恒温水温箱(北京长安科学仪器厂生产)。

1.2 方法 ①分组:将大鼠随机分为 4 组各 8 只:正常组、假手术组、脑缺血组和头穴透刺组。②造模:术前大鼠均禁食 12h,按改良线栓法制作大鼠大脑中动脉栓塞模型^[6]。取 3/0 号单尼龙线,直径约 0.20~0.25mm,一端加热融化成光滑球面,直径约 0.28mm,做成一段长 50mm 的线栓,用酒精清洁后置于生理盐水中备用。取大鼠,天平称量体质量,用 10%水合氯醛腹腔麻醉(300mg/kg 体质量)后仰卧于手术台,将上门齿、四肢远端固定于手术台上,颈部常规备皮消毒,行正中切口,长约 3cm,分离出右侧颈总动脉(common carotid artery, CCA)、颈外动脉(external carotid artery, ECA)、颈内动脉(internal carotid artery, ICA),由 CCA 分叉处向头端依次游离,电凝 ECA 分支以及 ECA 与 ICA 的交通支,沿 ICA 向下分离至翼腭动脉(pterygopalatine artery, PPA),结扎游离 ECA 主干,在 ICA 近 PPA 处及 CCA 各放置一动脉夹,于 ECA 残端剪约 0.2mm 的小口,将线栓缓缓插入。松开 ICA 上动脉夹,轻推尼龙线尾端经 CCA 分叉处通过 ICA 入颅,至大脑中动脉(middle cerebral artery, MCA)。尼龙线插入深度于 CCA 分叉部平均为(18.0±0.5)mm,剪断多余栓线,松开 CCA 上动脉夹,缝合切口。造模大鼠在自然苏醒后,按照 Zea Longa 神经病学评分评定神经功能缺损^[7],评分为 1~4 分则为造模成功。③处理方法:脑缺血组,按照前述方法造模,不进行针刺;假手术组,手术步骤基本同脑缺血组,不插线栓,不进行针刺;正常组,同步喂养,不针刺;头穴透刺组,造模方法同脑缺血组,按照中国针灸学会实验针灸研究会 1992 年制定的《实验动物穴位定位标准》^[7],造模清醒后 1h 起开始针刺,取百会(GV20)、前顶(GV21)、右侧率谷(GB8)及悬厘(GB6),用华佗牌 1cm 毫针进行针刺,百会透前顶,沿皮刺入 10mm,率谷透悬厘,沿皮刺入 10mm,接通上海产 G6805-II 型治疗仪,选用疏密波,强度为 1mA,频率为 2~15Hz,留针 30min。每天 1 次,连续 7d。④标本采集:大鼠麻醉后迅速开胸,暴露心脏,用眼科剪剪破心尖部,用灌胃针头经左心室穿刺至主动脉,用止血钳固定好灌胃针,同时剪开右心耳,慢流速水冲洗。先用生理盐水(4℃)250ml 快速冲管,清除血液,再灌注 4%多聚甲醛溶液(4℃)500ml,用 150ml 快速灌注,再用 350ml 缓慢滴注。灌注完成后,迅速断头取脑,

修块后入 4%多聚甲醛溶液 4℃固定过夜,石蜡包埋切片。

1.3 评定标准 ①Zea Longa 神经缺损体征评分标准^[8]:分为 1~5 级,分别为 0~4 分。分值越高,神经功能缺损症状越明显。②免疫组织化学 SABC 法检测 nestin:石蜡切片在二甲苯中脱蜡 20min,再行无水、95%、90%、80%、70%、30%乙醇脱蜡及水中浸泡,每级 1~2min;将脑切片漂洗,流水、H₂O₂ 冲洗各 30s,0.01MPBS 冲洗 15min;用 3% H₂O₂ 溶液孵育 10min,PH7.4 PBS 振洗 5min×3 次,微波抗原修复 10min,4%牛血清白蛋白室温孵育 15min, PBS 洗 3min×3 次;滴加一抗兔抗大鼠 nestin 抗体(1:100),孵育 120min,加入 0.01M 的 PBS 洗 5min×3 次;滴加生物素化山羊抗兔 IgG(1:300),37℃孵育 1h,0.01M 的 PBS 冲洗 5min×3 次,滴加辣根过氧化物酶复合 SABC 复合物(1:200)37℃孵育 1h。滴加葡萄糖氧化酶-DAB 显色 5~10min,流水冲洗 10min,蒸馏水振洗 5min。苏木素轻度复染、脱水、二甲苯透明、中性树脂胶封片。设阴性对照组,用稀释液代替一抗,组织细胞质显示棕色者为阳性,不显色者为阴性。采用 Axiovert 40CFL 显微镜和 HPIAS-2000 彩色病理图像分析系统进行图象采集和分析,测量大脑海马齿状回 nestin 免疫阳性反应物的平均光密度值(mean optic density, MOD),每张切片的每个部位测 3 个视野,100 倍镜下检测各片的 OD 值,分别测定,累加取均值。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 16.0 软件进行统计学处理,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,单因素方差分析,SNK-q 检验数据处理。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

治疗 7d 后,头穴透刺组大鼠神经缺损评分明显低于脑缺血组[(1.31±0.79)分、(2.44±0.81)分, $P < 0.01$]。治疗 7d 后,脑缺血组与正常组及假手术组比较, nestin 表达明显增加($P < 0.01$)。与脑缺血组比较,头穴透刺组 nestin 阳性表达明显增加($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 4 组大鼠海马齿状回 nestin 表达量的比较 $\bar{x} \pm s$

组别	n	平均光密度值
正常组	8	0.2358±0.0369
假手术组	8	0.2463±0.0504
脑缺血组	8	0.3426±0.0628 ^a
头穴透刺组	8	0.4541±0.0749 ^{ab}

与正常组及假手术组比较, ^a $P < 0.01$;与脑缺血组比较, ^b $P < 0.01$

3 讨论

急性脑缺血属中医学“中风”的范畴,其病机关键

在于气血并逆,气虚血瘀;瘀血闭阻于脑为其标,正气虚弱、阴阳失调为其本。治以醒脑开窍、通经活络之法。头部是人体全身经络密集的部位,《灵枢·邪气藏府病形篇》记载:“十二经脉,三百六十五络,其血气皆上于面而走空窍”。头穴透刺是针刺一穴后向另一穴或数穴透刺治疗疾病的一种方法^[9]。本实验针刺所取的“百会”、“前顶”均为督脉经穴,《难经·二十八难》:“督脉者,起于下极之俞,并于脊里,上至风府,入属于脑”。“脑为元神之府”,督脉通于脑,病变在脑首取督脉,督脉有“总督诸阳”和“阳脉之海”之说。“百会”居头之颠,为手足少阳、足太阳、督脉及足厥阴之会穴,统领一身之阳,内系于脑;“百会”与“前顶”合用,可起到通调督脉、醒脑开窍之功。“率谷”是足少阳胆经穴,又是足少阳、足太阳交会穴,“悬厘”为足少阳胆经的穴位,手少阳三焦经的经脉经过于此,两穴合用可以起到疏通手足少阳精气,通经活络之功。王冠等^[10-11]研究表明,头穴透刺百会透曲鬓可明显减小脑梗死体积,减轻大鼠的神经功能缺损程度,并下调缺血侧脑组织 NF- κ B、Cyt-c、Caspase-3 表达水平,对脑缺血再灌注大鼠具有明显的神经保护作用。

nestin 是一类主要在神经前体细胞呈一过性表达的中间丝蛋白,在神经系统发育过程中, nestin 中间丝蛋白是公认的早期原始神经细胞的标志, nestin 的功能与维持神经前体细胞的正常形态结构有关^[12]。当神经前体细胞完成迁移和分化后便停止表达,在神经细胞发生的成年脑区一般无表达。研究表明^[13],脑缺血损伤后,内源性神经干细胞大量增殖、迁移和分化,参与神经再生和脑组织功能的恢复。nestin 是神经干细胞所表达的一种特异性标志物。在病理情况下,受损脑组织神经上皮干细胞蛋白 nestin 表达水平,可作为监测神经干细胞发生水平的敏感性标志之一^[14-15]。既往研究表明^[16],局灶性成年大鼠脑缺血损伤后脑内有明显的神经再生现象,而 nestin 重新表达在缺血脑周围可能增强脑组织的抗缺血能力,有利于细胞的存活及细胞骨架的稳定和重建。

本实验结果表明,头穴透刺可以使急性脑缺血大鼠受损神经功能明显恢复,能明显增加脑缺血大鼠海马齿状回 nestin 的表达,提示头穴透刺可通过促进 nestin 蛋白的重新表达,有助于脑缺血后神经组织的重建,从而发挥抗脑缺血损伤的作用。

【参考文献】

[1] 桑鹏,王顺,赵佳辉.头穴透刺治疗急性脑梗死 40 例临床疗效观察[J].中国中医药科技,2011,18(4):330-331.

[2] 刘建浩,鲍春龄,朱文增,等.头穴透刺治疗急性中风病针刺部位特异性观察[J].中国针灸,2010,30(4):275-278.

[3] 李红颖,朱文增,东贵荣,等.头穴透刺对急性脑梗死大鼠神经丝蛋白-200 的影响[J].上海针灸杂志,2007,26(8):40-42.

[4] Krum JM, Rosenstein JM. Transient coexpression of nestin, GFAP, and vascular endothelial growth factor in mature reactive astroglia following neural grafting or brain wounds[J]. Experimental Neurology, 1999, 160(2):348-360.

[5] 徐曦,肖新莉,郑建云,等.脑缺血组织 nestin 蛋白重新表达及其与碱性成纤维细胞生长因子表达的关系[J].西安交通大学学报(医学版),2004,25(4):319-320.

[6] Wunderlich MT, Ebert AD, Kratz T, et al. Early neurobehavioral outcome after stroke is related to release of neurobiochemical markers of brain damage[J]. Stroke, 1999, 30(6):1190-1195.

[7] 李辞蓉,华兴邦,周浩良,等.豚鼠针灸穴位图谱的研制[J].上海针灸杂志,1992,10(2):28-30.

[8] Longa E, Weinstein PR, Calson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20(1):84-91.

[9] 王延兆,张德芹.透针刺法在中风病治疗中的应用与研究概况[J].吉林中医药,2003,23(3):47-48.

[10] 王冠,孙晓伟,邹伟.百会穴透曲鬓穴对大鼠中动脉缺血再灌注大鼠神经功能评分和 NF- κ B 表达的影响[J].针灸临床杂志,2009,25(10):37-39.

[11] 王冠,孙晓伟,邹伟.头针对大鼠中动脉缺血再灌注模型大鼠 Cyt-c、Caspase-3 表达的影响[J].针灸临床杂志,2009,25(8):45-46.

[12] Ciaroni S, Cecchini T, Ferri P, et al. Neurogenesis by progenitor cells in the ischemic adult rat hippocampus[J]. Stroke, 2001, 32(8):1890-1996.

[13] 彭力,黄晓琳,韩肖华,等.电针结合经颅磁刺激对脑缺血大鼠功能及神经干细胞的影响[J].中华物理医学与康复杂志,2008,30(9):598-602.

[14] Bengzon J, Kokaia Z, Elmer E, et al. Apoptosis and proliferation of dentate gyrus neurons after single and intermittent limbic seizures[J]. PNAS, 1997, 94(19):10432-10437.

[15] Parent JM, Valentin VV, Lowenstein DH. Prolonged seizures increase proliferating neuroblasts in the adult rat subventricular zone-01 factory bulb pathway[J]. Neurosci, 2002, 22(8):3174-3188.

[16] Cameron HA, Tanapat P, Could E. Adrenal steroids and N-methyl-D-aspartate receptor activation regulate neurogenesis in the dentate gyrus of adult rats through a common pathway[J]. Neuroscience, 1998, 82(2):349-354.