

电针对 MCAO 大鼠脑皮质 EPO 表达和脑血流量的影响

梁超, 陈邦国, 李昂

【摘要】 目的:观察电针疗法对局灶性脑缺血大鼠脑皮质 EPO 表达和缺血局部组织血流量的影响,探讨其作用机制。方法:SD 大鼠 80 只,随机分为正常组和假手术组各 10 只、模型组和电针组各 30 只;模型组和电针组又各按缺血再灌注 24h、48h 和 72h 分别分为 3 个亚组,每组 10 只。假手术组仅分离血管而不插线栓,模型组和电针组制备大鼠中动脉缺血再灌注模型(MCAO),电针组采用电针治疗。采用免疫组化组法及免疫印迹法检测大鼠脑皮质中促红细胞生成素(EPO)蛋白的表达,用激光多普勒血流仪检测大鼠脑组织血流量(rCBF)的变化。结果:EPO 免疫组化及 Western 结果比较,模型组及电针组 EPO 阳性细胞及蛋白表达均在脑缺血再灌注 24h 开始增加,48h 达到峰值,72h 开始下降,且电针组在 3 个时间点均高于同时间点模型组($P<0.05, 0.01$)。rCBF 比较,模型组和电针组随着 24、48、72h 3 个时间点呈明显增加趋势,且电针组各时间点 rCBF 均较模型组明显升高($P<0.05, 0.01$)。结论:电针能使脑缺血再灌注脑组织中 EPO 表达增加,明显提高局部脑组织血流量,有助于减轻脑缺血再灌注后脑组织损伤。

【关键词】 脑缺血再灌注;电针;促红细胞生成素;脑血流量

【中图分类号】 R49;R743.3 **【DOI】** 10.3870/zgkf.2013.05.001

Effects of electroacupuncture on expression of EPO and cerebral blood flow in rats with MCAO LIANG Chao, CHEN Bang-guo, LI Ang, *Acupuncture and Bone Fracture College, Hubei University of TCM, Wuhan 430065, China*

【Abstract】 Objective: To observe the influence of electroacupuncture therapy on cortex regional cerebral blood flow (rCBF) and EPO expression of SD rats after cerebral ischemia reperfusion. Methods: Eighty SD rats were randomly divided into normal group ($n=10$), sham-operation group ($n=10$), model group ($n=30$) and electroacupuncture group (EA group) ($n=30$). The later two groups were further divided into 24-h, 48-h and 72-h subgroups respectively, with 10 cases each. The model of focal cerebral ischemia reperfusion was established by inserting nylon thread into the middle cerebral artery occlusion (MCAO) and reperfusion except control group and sham-operation group in which the artery was separated only. EA group was treated with electroacupuncture therapy. The expression of EPO was detected by using immunohistochemistry and Western blotting. The rCBF was measured using a Doppler laser blood stream detector. Results: The expression of EPO in model group and EA group was increased at 24 h, peaked at 48 h, and decreased at 72 h, and that in EA group was significantly increased as compared with that in model group at the 3 time points ($P<0.05$ or 0.01). The rCBF in model group and EA group was consecutively increased at the three time points, and that in EA group significantly increased as compared with that in model group at the 3 time points ($P<0.05$ or 0.01). Conclusion: Electroacupuncture in rats can promote the expression of EPO and increase the rCBF in ischemic brain tissue after focal cerebral ischemia reperfusion, which may be helpful to alleviate the damage of brain tissue.

【Key words】 cerebral ischemia reperfusion; electroacupuncture; EPO; cerebral blood flow

缺血性脑血管病 (ischemic cerebrovascular disease, ICVD), 具有高发病率、高死亡率、高致残率和高

复发率的特点, 严重威胁人类健康。针灸在 ICVD 的治疗中占有重要的地位。本研究观察电针对局灶性脑缺血再灌注大鼠缺血区脑皮质中促红细胞生成素 (erythropoietin, EPO) 表达和脑血流量的影响, 报道如下。

基金项目: 教育部高等学校博士学科点专项科研基金(20094230110002)
收稿日期: 2013-05-22

作者单位: 湖北中医药大学针灸骨伤学院, 武汉 430065

作者简介: 梁超(1984-), 女, 住院医师, 主要从事针灸治疗神经系统疾病的研究。

1 材料与方法

1.1 材料 ①动物:清洁级健康成年 SD 大鼠 80 只,由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供,许可证号:SCXK(鄂)2010-0009,雌雄不拘,体质量(200.0 ± 20.0)g。②试剂:兔抗大鼠 EPO 多克隆抗体、HRP 标记山羊抗兔、DAB 显色剂、组化试剂盒均购自 DAKO 公司;BSA(Sigma)、Bradford 蛋白浓度测定试剂盒(碧云天生物技术研究);SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒、蛋白抽提试剂盒均购自谷歌生物公司。③材料与仪器:华佗牌 30 号 0.5cm 不锈钢毫针、LH-202H 型韩氏仪、脑立体定位仪、离心机、VMS 激光多谱勒血流仪。

1.2 方法 ①分组:随机分为模型组、电针组各 30 只(2 组又各按缺血再灌注 24h、48h 和 72h 分别分为 3 个亚组,每组 10 只)、假手术组和正常组各 10 只。②干预:模型组和电针组均采用线栓法建立大脑中动脉缺血再灌注(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型^[1],栓塞时间 30min;电针组给予电针治疗;假手术组大鼠仅分离右侧颈总动脉(common carotid artery, CCA)及膈下动脉(inferior phrenic arteries, IPA)至翼腭动脉(ptyerygopalatine artery, PPA),不插线栓;正常组不予任何处理。③电针治疗:电针组的 3 个亚组分别在缺血再灌注 24h、48h 和 72h 后开始治疗。取百会(顶骨正中,平刺 2mm)、水沟(唇裂正中、鼻尖下 1mm 处,向上斜刺 2mm)、足三里(后肢膝关节外下方当腓骨小头下约 5mm 处,直刺 7mm)穴^[2]。采用 LH202H 型韩氏仪,疏密波,频率 2Hz/100Hz,强度 2mA,每次持续刺激 30min,中间间隔 24h,共治疗 1 次。

1.3 评定标准 实验后检测 3 个指标:①大脑皮质 EPO 免疫组化检测。大鼠灌注后迅速取脑,剥离脑膜,除去嗅球、延髓和小脑,在视交叉平面前后 2mm 处将脑冠状切开,实验步骤按照试剂盒步骤操作,一抗(EPO 抗体)稀释浓度为 1:200。以细胞浆出现棕黄色颗粒为阳性细胞;在高倍光学显微镜下,随机选取 5 个视野,计算阳性细胞总数。②大脑皮质 EPO 蛋白含量 Western blot 检测:大鼠断头取脑,冰盘分离右侧大脑皮质,仔细切取缺血灶区域大脑皮质组织块(即右侧顶颞叶皮质组织)约 1mm³,准确称取 100mg 缺血区大脑皮质提取全蛋白。按试剂盒步骤操作,孵一抗(1:5000),二抗(辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔抗体,1:3000);经 X 胶片曝光显像,凝胶成像系统照相,采用灰度值进行分析。③缺血局部脑血流量(regional cerebral blood flow, rCBF)测定:大鼠麻醉,俯卧位固

定于脑立体定位仪上,在前囟右旁开 3mm,向后移 3mm 处用牙科钻钻一直径 1mm 的圆孔,暴露脑组织。激光多谱勒血流仪的光纤探头固定在脑立体定位仪上,与脑皮质相接触,检测血流量,每次检测 5min。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 16.0 统计学软件进行分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,方差分析和 q 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

EPO 免疫组化及 Western blot 结果比较,假手术组与正常对照组间比较差异无统计学差异;模型组及电针组 EPO 阳性细胞及蛋白表达均在脑缺血再灌注 24h 开始增加,48h 达到峰值,72h 开始下降,且均高于假手术组($P < 0.05, 0.01$);电针组 3 个时间点 EPO 阳性细胞及蛋白表达均高于同时间点模型组($P < 0.05, 0.01$)。见表 1,图 1,2a~h。

rCBF 比较,假手术组与正常对照组间比较差异无统计学差异;模型组和电针组在 24、48、72h 3 个时间点 rCBF 呈增加趋势,但均低于假手术组($P < 0.05, 0.01$);电针组各时间点 rCBF 均较模型组明显升高($P < 0.05, 0.01$)。见表 1。

表 1 各组大鼠实验后 EPO 蛋白阳性细胞个数、蛋白含量及 rCBF 比较 $\bar{x} \pm s$

| 组别 | n | EPO 阳性细胞 个数(个/视野) | EPO 蛋白含量 | rCBF(Pu) |
|---------|----|---------------------------|--------------------------|----------------------------|
| 正常组 | 10 | 11.00±1.48 | 0.30±0.38 | 248.45±0.70 |
| 假手术组 | 10 | 13.00±0.97 | 0.34±0.59 | 247.39±0.55 |
| 模型组 24h | 10 | 29.00±1.21 ^a | 0.85±0.09 ^a | 127.28±0.78 ^a |
| 48h | 10 | 48.00±0.87 ^{ad} | 1.40±0.07 ^{ad} | 150.57±0.89 ^{ad} |
| 72h | 10 | 32.00±1.62 ^{af} | 0.52±0.12 ^{af} | 182.72±0.46 ^{af} |
| 电针组 24h | 10 | 34.00±0.62 ^{ab} | 1.27±0.52 ^{ab} | 133.45±0.81 ^{ab} |
| 48h | 10 | 66.00±0.36 ^{ac} | 1.92±0.29 ^{acd} | 169.60±0.44 ^{abd} |
| 72h | 10 | 51.00±0.89 ^{acf} | 1.59±1.09 ^{ac} | 215.00±0.85 ^{neg} |

与假手术组比较,^a $P < 0.05$;与同时间点模型组比较,^b $P < 0.05$,^c $P < 0.01$;与同组 24h 组比较,^d $P < 0.05$,^e $P < 0.01$;与同组 48h 比较,^f $P < 0.05$,^g $P < 0.01$

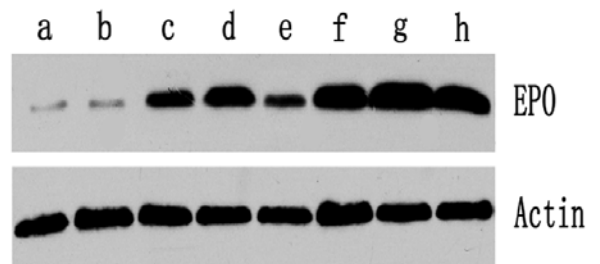


图 1 各组大鼠缺血脑组织 EPO 蛋白表达 western blot 图 a 代表正常组;b 代表假手术组;c~e 依次代表模型组中缺血再灌注 24h、48h、72h 亚组,f~h 依次代表电针组中缺血再灌注 24h、48h、72h 亚组

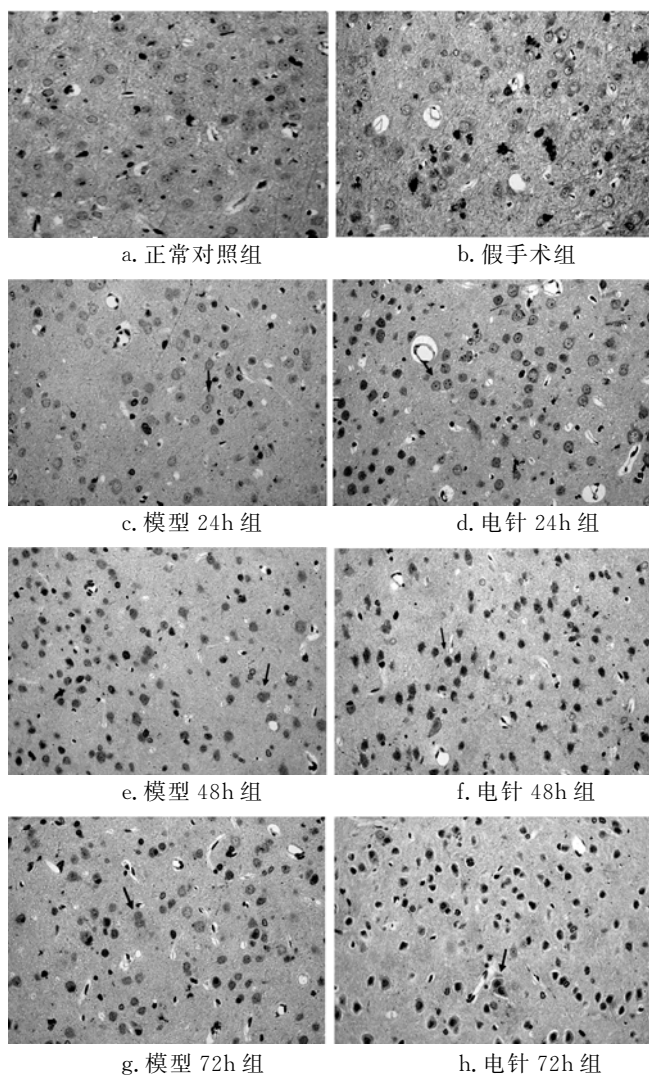


图 2a~h 各组大鼠缺血脑组织 EPO 免疫组化图($\times 400$)

3 讨论

早在上世纪就有国外学者报道过 EPO 及促红细胞生成素受体(erythropoietin receptor, EPOR)与缺血缺氧疾病的关系,EPOR 广泛存在于皮质、海马、中脑等脑组织中,缺血缺血后通过机体自身分泌 EPO 与其受体结合产生一系列保护作用^[3]。近年关于 EPO 更多的报道多见于缺血性疾病而不单纯是贫血的应用^[4]。何娅等^[5]就用重组 EPO 治疗局灶性脑缺血大鼠,发现经腹腔注射后其神经损伤体征明显改善,缺血局部脑组织水肿情况好转;经过此处理,可抑制脑梗塞炎症反应及免疫损伤,减少神经细胞凋亡,而起到神经保护、改善预后的作用^[6]。杨续艳等^[7]发现针刺后大鼠缺血局部脑组织 EPO 表达明显增多,脑缺血后外源性给予或内源性生成的 EPO 能够可以透过血脑屏障(blood brain barrier, BBB),与其特异性受体结合,使缺血区微血管周围的神经元、星形胶质细胞、血管内皮细胞内表达增加,具有神经保护和血管修复双重功能,

起到保护受损脑组织的作用。进一步研究明确表明脑缺血后数小时内 EPO 含量开始增加,2d 左右到达峰值,随即开始下降^[8-9];这与本研究结果一致。而且本研究还发现,在局灶性脑缺血后 EPO 蛋白含量有不同程度增加,经电针治疗后,大鼠缺血脑组织中 EPO 表达量在缺血后期虽有所下降,但仍处于较高水平。

脑缺血后缺血局部脑组织血流量的减少是导致脑损伤的一个重要因素,一般而言在缺血早期的数小时内血流量会明显下降,而随着周边微血管侧枝循环的重建,在中后期有一定程度的恢复。由于“血管瀑布”现象的出现导致大量微血管的破坏及血流供应受阻,在这样的血液复灌环境下局部组织缺血缺氧进一步加重。因此尽快恢复缺血区的血流对减轻缺血后脑组织损伤是十分必要的。电针在改善急性脑缺血后局部组织脑血流量方面疗效独特,特别是在梗死后即刻、缺血半小时、1h、2h 和 3h 时,局部组织脑血流显著下降,电针治疗后,这几个时间点的脑血流显著升高,而且时间不同,提高的程度有所不同^[10]。本研究发现,电针增加脑缺血局部脑组织血流量效果明显,且这种作用在缺血 24h 内已经出现,在缺血的后期局部脑血流量仍可以维持较高水平。

本研究选用百会穴调节全身各经脉之经气,通畅气血,充盛脑髓,上荣于脑;水沟穴调节督脉,督统阳气、驾御神机、开窍启闭,二穴合用以输注气血精华濡养脑腑;足三里穴促进气血生长,营养脑部血管,促进血管再生;三穴在“疏通经络”、“去瘀生新”的同时又“益气活血”。对照本研究结果可以看出在脑缺血再灌注后随着 EPO 的表达增加,局部脑组织血流量也在逐渐增加,但两者的变化是否有一定相关性,且局部缺血脑组织是否出现血管新生现象,这仍需要进一步研究。

【参考文献】

- [1] Zausinger S, Hungerhuber E, Baethmann A, et al. Neurological impairment in rats after transient middle cerebral artery occlusion: a comparative study under various treatment paradigms[J]. *Brain Res*, 2000, 863(1): 94-94.
- [2] 华兴邦, 李辞蓉, 周浩良, 等. 大鼠穴位图谱的研制[J]. *实验动物与动物实验*, 1991, (1): 1-5.
- [3] Maxwell PH, Ferguson D JP, Nicholls LG, et al. Sites of erythropoietin production[J]. *Kidney International*, 1997, 51(1): 393-401.
- [4] Hasnaoui-Saadani R, Pichon A, Marchant D, et al. Cerebral adaptations to chronic anemia in a model of erythropoietin-deficient mice exposed to hypoxia[J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2009, 296(3): 801-811.
- [5] 何娅, 陈松盛, 王辉, 等. EPO 对大鼠脑缺血再灌注后脑水

- 肿一及 MMP-9 的影响[J]. 山西医科大学学报, 2012, 43(7):481-484.
- [6] 杨云龙, 周伟宏, 柳荫. 促红细胞生成素对急性脑梗塞患者 NSE 及炎性细胞因子的影响[J]. 黑龙江医药, 2012, 25(2):210-211.
- [7] 杨续艳, 王锐, 郭淑颖, 等. 电项针疗法对大鼠脑缺血再灌注模型脑组织 EPO 表达的影响[J]. 针灸临床杂志, 2009, 25(5):24-26.
- [8] Nakano M, Satoh K, Fukumoto Y, et al. Important role of erythro-poietin receptor to promote VEGF expression and angiogenesis in peripheral ischemia in mice[J]. Circ Res, 2007, 100(5):662-669.
- [9] Li Y, Lu ZY, Ogle M, Wei L. Erythropoietin prevents blood brain-barrier damage induced by focal cerebral ischemia in mice[J]. Neurochem Res, 2007(12):2132-2141.
- [10] 石磊, 杜元灏. 脑梗死急性期局部血流量变化及电针干预效应研究[J]. 天津中医药大学学报, 2012, 31(2):85-87.

• 经验交流 •

关节松动术结合超短波治疗膝关节半月板损伤

王洪涛

【关键词】 膝关节半月板损伤; 关节松动术; 超短波

【中图分类号】 R49; R687.4 【DOI】 10.3870/zgkf.2013.05.033

2009~2012年在我科住院和门诊接受治疗的膝关节损伤患者76例,均经MRI检查确诊并排除其他膝关节病损。76例分为2组,①观察组40例,男22例,女18例;年龄19~58岁;病程1周~2年。②对照组36例,男20例,女16例;年龄18~55岁;病程1周~2年。2组一般资料比较差异无统计学意义。观察组采用关节松动术结合超短波治疗^[1]:关节松动术,患者取仰卧位,医者采用按揉膝关节、分离髌股关节、滑动与旋转髌骨、前后滑动股胫关节、旋转股胫关节、牵拉股胫关节等手法,30min,每日1次;超短波,采用上海产LDT-CD31型落地式超短波治疗机,频率40.68MHz,波长7.3m,最大输出功率200W,2个20cm×29cm电极,膝部对置,间隙2~3cm,微热量,15min,每日1次。对照组给予双氯芬酸钠口服,每次50mg,每天2次,并给予膝关节红外线照射,微热量,20min,每日1次。

治疗1个月后,观察组治愈3例^[2]:膝关节肿胀、跛行、疼痛消失,肌力正常,关节功能活动度(ROM>120°)恢复正常;显效11例:膝关节肿胀、跛行、疼痛明显减轻,ROM恢复至90~120°;好转19例:膝关节疼痛减轻,ROM恢复至60~90°;无效7例:临床症状及关节功能较治疗前未改善。对照组分别为1、3、7及25例。观察组总有效率明显优于对照组(82.5%、30.6%, $P<0.01$)。治疗后2组患者受累关节ROM与治疗前比较均有提高(106.3±12.5与31.2±11.1,73.1±8.6与32.1±10.0),且观察组较对照组提高更明显($P<0.01$)。

Dehaven^[3]报道,部分膝半月板损伤可经非手术的康复治

疗获得良好的效果。亦有报道说明膝半月板非血运区裂伤有愈合可能,但应借助外界刺激,以激发具有修复功能的滑膜细胞、成纤维细胞及软骨细胞的分裂增殖,改善局部营养,以促进损伤的愈合^[4]。关节松动术不仅可以改善关节局部血液循环,减轻疼痛,亦具有改善关节活动度、松解粘连组织和增加本体反馈的作用^[5];超短波治疗产生温热效应可深达肌层与骨,能改善局部血液循环,加强组织血供,加速炎症产物和代谢产物的清除,减轻水肿,缓解超短波还可降低神经兴奋性,升高痛阈而达到镇痛作用,温热效应还可缓解骨骼肌痉挛,使疼痛缓解^[6]。本文结果表明,采用关节松动术结合超短波治疗的观察组效果明显优于对照组,提示在诊断明确的前提下,关节松动术结合超短波治疗对大部分膝关节半月板损伤可起到理想的治疗效果。

【参考文献】

- [1] 燕铁斌. 现代康复治疗技术[M]. 安徽:科学技术出版社,1994,98-101.
- [2] 容国安,龙耀斌. 综合康复治疗膝关节功能障碍的疗效[J]. 中华物理医学与康复杂志,2004,26(1):43-44.
- [3] Darlene H, Randolph M. Management of Common Musculoskeletal Disorders[M]. 2nd ed philadelphia JB. Lippincott Company, 1990, 342-345.
- [4] 梁翼, 邵红, 张世明. 非手术治疗膝半月板损伤的实验研究[J]. 中国运动医学杂志, 1998, 17(3):259-260.
- [5] 曾海辉, 燕铁斌. 关节松动手法治疗颈椎病临床疗效对照研究[J]. 中国康复医学杂志, 1997, 12(5):216-218.
- [6] 南登昆. 康复医学[M]. 北京:人民卫生出版社,2001,111-112.

收稿日期:2013-05-15

作者单位:武汉市东西湖区人民医院康复科,武汉 430040

作者简介:王洪涛(1974-),男,主治医师,主要从事骨关节病康复方面的研究。