

针刺百会、四神聪对 MCAO 模型大鼠缺血半暗带脑组织中 IL-1、IL-6、TNF- α 的影响

赵秋阳¹, 马贤德²

【摘要】 目的:通过观察针刺百会、四神聪干预 MCAO 模型大鼠脑组织的病理及脑缺血半暗带组织中 IL-1、IL-6、TNF- α 表达水平的检测,探讨针刺百会、四神聪穴对 MCAO 模型大鼠的抗炎作用。方法:SPF 级 SD 大鼠 60 只,采用分层随机法分为假手术组(15 只)、造模组(45 只)。模型复制成功后,将造模组大鼠随机分为非穴区对照组和针刺组。针刺组给予百会、四神聪穴针刺干预;非穴区对照组于穴区周边 5mm 处进行针刺皮肤干预。末次针刺后 1h,评定神经功能缺损评分;处死大鼠,取脑组织,显微镜下观察其病理改变,并检测缺血半暗带脑组织 IL-1、IL-6、TNF- α 含量检测。结果:干预后,3 组神经功能缺损评分比较,非穴区对照组高于针刺组($P < 0.01$),针刺组高于假手术组($P < 0.01$)。假手术组脑组织病理切片未见异常,针刺组梗死灶局限,梗死灶周围炎性细胞数量较非穴区对照组明显减少。缺血半暗带组织中 IL-1、IL-6、TNF- α 含量:与假手术组比较,非穴区对照组和针刺组显著升高($P < 0.01$),与非穴区对照组比较,针刺组显著降低($P < 0.01$)。结论:针刺百会、四神聪穴可明显降低 MCAO 模型大鼠神经功能缺损评分,减小梗死百分比,减轻炎症浸润程度,降低半暗带脑组织中细胞因子含量,具有一定的抗炎作用。

【关键词】 脑缺血再灌注;百会;四神聪;炎症反应

【中图分类号】 R49;R743.3 **【DOI】** 10.3870/zgkf.2019.03.001

Effects of Acupuncture at Baihui and SiShenCong on IL-1, IL-6 and TNF- α in Ischemic Penumbra Brain Tissue of MCAO Rats Zhao Qiuyang, Ma Xiande. Second Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shengyang 110034, China

【Abstract】 **Objective:** To explore the anti-inflammatory effect of acupuncture at Baihui and Sishengcong on MCAO model rats by observing the pathological changes of brain tissue and the expression level of IL-1, IL-6 and TNF- α in penumbra tissues in MCAO rats. **Methods:** Sixty SPF SD rats were randomly divided into sham operation group ($n = 15$) and model group ($n = 45$) by the stratified random sampling method. After successful replication of the model, model group rats were randomly divided into non-acupoint control subgroup and acupuncture subgroup. The acupuncture subgroup was given the acupuncture at Baihui and SishenConong, and the non-acupoint control subgroup was treated with acupuncture skin intervention at 5 mm around the acupoint area. At 1 h after the last acupuncture, the scores of nerve function defect were evaluated; the rats were killed, the pathological changes were observed under a microscope, and the contents of IL-1, IL-6 and TNF- α in ischemic penumbra tissues were measured. **Results:** After intervention, the scores of nerve function defect in non-acupoint control subgroup were significantly higher than in acupuncture subgroup ($P < 0.01$), and those in acupuncture subgroup were significantly higher than in sham operation group ($P < 0.01$). The pathological sections of the brain tissue in the sham operation group had no abnormal changes, the infarction focus was localized in the acupuncture subgroup, and the number of inflammatory cells around the infarction focus was significantly less in acupuncture subgroup than in non-acupoint control subgroup.

The contents of IL-1, IL-6 and TNF- α in ischemic penumbra tissues of non-acupoint control subgroup and acupuncture subgroup were significantly increased as compared with those in sham operation group (all $P < 0.01$), and those in acupuncture subgroup were significantly decreased as compared with those in non-acupoint control sbugroup ($P < 0.01$). **Conclusion:** Acupuncture at Baihui and SiShenCong can significantly reduce the

基金项目:国家自然科学基金面上项目(8167150734);国家自然科学基金青年基金(81703993);辽宁省科技厅博士启动基金(20180540074);辽宁省教育厅项目(L201714);2018 年中医学开放基金(11020163180002)

收稿日期:2017-11-24

作者单位:1 辽宁中医药大学附属第二医院,沈阳 110034;2 辽宁中医药大学,沈阳 110847

作者简介:赵秋阳(1982-),女,主治医师,主要从事中医脑病及针灸康复研究方面的研究。

通讯作者:马贤德,15640235233@163.com

neurological deficit score, the percentage of infarction, the degree of inflammatory infiltration and the contents of cytokines in the penumbra brain tissues of MCAO model rats, which has certain anti-inflammatory effect.

【Key words】 cerebral ischemia reperfusion; Baihui; SishenCong; inflammatory reaction

脑梗死属缺血性脑病之一,又叫做缺血性卒中,中医称为中风。近年来的研究表明,炎症、凋亡、氧化应激等均在脑梗死的发生发展过程中发挥了重要作用^[1-2]。这一研究成果为脑梗死的多靶点治疗提供了理论依据。百会穴具有醒脑开窍,回阳固脱之功效。四神聪位于百会前、后、左、右各开1寸处,名为四神聪。《图翼》中记载:前神聪主治中风、风痫……后神聪同。研究显示,百会、四神聪配合针刺,对脑梗死患者认知功能障碍具有一定的改善作用^[3]。另有文献报道,针刺百会穴对线栓法大鼠大脑中动脉缺血(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型大鼠血清细胞因子具有一定调控作用,此外该穴位在癫痫等疾病的治疗中也具有调控细胞因子的作用^[4-6]。本研究拟通过线栓法制备局灶性脑缺血再灌注大鼠模型,然后给予针刺百会、四神聪穴干预,观察缺血半暗带脑组织中白细胞介素1(interleukin-1, IL-1)、白细胞介素6(interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor, TNF- α)的含量,探讨针刺百会、四神聪穴对MCAO模型大鼠的抗炎作用。

1 材料和方法

1.1 材料 ①实验动物:SPF级SD大鼠60只,购自辽宁长生生物科技有限公司(实验动物生产许可证号:SCXK(辽)2010-0001),体质量270~330g。实验动物购入后,于辽宁中医药大学实验动物中心饲养,饲养环境为SPF级,实验动物饲养许可证号:SYXK(辽)2013-0009。以常规颗粒饲料喂养,自由饮水,12h昼夜节律,适应性饲养1周。②实验试剂及仪器设备:IL-1、IL-6、TNF- α 检测试剂盒均由武汉优尔生商贸有限公司生产,货号分别为:SEA563Ra、SEA079Ra、SEA133Ra。酶标仪, Thermo生产;移液器, Thermo生产;恒温水浴振荡器,常州国华仪器设备厂生产。

1.2 方法 ①实验分组:首先将大鼠按照体质量进行标记1~60号,然后采用随机数字法,将大鼠分为假手术组(15只)和造模组(45只)。然后采用改良线栓法对造模组45只大鼠进行CIRI模型复制,评价模型成功后,再将成功的动物模型随机分为2组:非穴区对照组和针刺组。最终实验分为3组:即假手术组、非穴区对照组和针刺组。②模型复制:造模组大鼠采用线栓法复制脑缺血再灌注模型,方法参考马贤德等^[7]的文献,假手术组大鼠实施相同术式,但钓鱼线插入深度为

1cm,不造成实质性栓塞。③模型评价:再灌注后2h,大鼠完全苏醒后,参考Bederson等^[8]的5分制神经功能缺损评价标准进行评分,评分标准如下:0分为无症状;1分为不能完全伸展对侧前爪;2分为向对侧转圈;3分为向对侧倾倒;4分为不能自发行走,意识丧失。评分为1~3分者纳入实验组,未达标准者排除。再灌注2h后,从假手术组和造模组中各随机抽取1只,进行TTC染色,观察梗死灶形成情况,以评价模型复制是否成功。④针刺干预:模型复制成功后,假手术组不做干预。大鼠取穴参考“大鼠穴位图谱”及“中国兽医针灸学”确定^[9-10]。针刺组大鼠给予百会、四神聪穴针刺干预,间隔8小时一次,至再灌注72h结束;非穴区对照组大鼠分别于百会、四神聪穴区周边5mm处进行针刺皮肤干预,间隔8小时一次,至再灌注72h结束。

1.3 检测指标 ①神经功能缺损评分:末次针刺后1h,对各组大鼠进行神经功能缺损评分,评分采用双盲法,邀请不知情实验技术人员单独进行评分,按照各大鼠编号记录评分。②病理(苏木素-伊红染色):末次针刺后1h,各组随机抽取2只大鼠,采用过量麻醉法处死,迅速于冰面上取出完整大脑组织,并迅速浸泡于4%多聚甲醛溶液中固定24h以上,常规制备石蜡切片,并行苏木素-伊红染色,数码显微镜下观察病理改变,拍摄照片。③缺血半暗带脑组织中IL-1、IL-6、TNF- α 含量测定:末次针刺后1h,各组剩余大鼠,采用过量麻醉法处死,迅速于冰面上取出完整大脑组织,并用眼科镊去除缺血区域液化坏死的脑组织,沿缺血灶走行,剥离缺血灶周边2mm区域内半暗带组织,置于2ml冻存管中, -80℃保存,用于检测IL-1、IL-6、TNF- α 含量测定。假手术组取相应部位脑组织进行检测。采用ELISA法检测各组大鼠缺血半暗带脑组织中IL-1、IL-6、TNF- α 含量,并进行统计分析。

1.4 统计学方法 采用SPSS16.0软件进行统计学分析,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,先进行方差的齐性检验,然后采用完全随机设计方差分析(One-way ANOVA法),组间两两比较采用LSD法。以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 模型评价

2.1.1 神经功能缺损评分 模型复制后,手术意外及

栓塞过重死亡共计4例,假手术组剩余15只,造模组剩余41只,完全清醒后进行神经功能缺损评分,结果显示:假手术组大鼠神经功能缺损评分均为0分,造模组大鼠2例评分为0分,不符合实验要求,予以剔除,剩余39只。与假手术组比较,造模组大鼠神经功能缺损评分显著增高($P<0.01$)。见表1。

表1 造模后2组大鼠神经功能缺损评分比较 分, $\bar{x}\pm s$

组别	n	神经功能缺损评分
假手术组	15	0
造模组	39	2.49±0.60 ^a

与假手术组比较,^a $P<0.01$

2.1.2 TTC染色 再灌注后2h,从假手术组和造模组中各随机抽取1只大鼠,过量麻醉处死取脑,进行TTC染色,结果显示:假手术组大鼠脑组织呈鲜红色,未见明显苍白区;造模组大鼠右侧颞叶区呈苍白色,为梗死灶所在(见图1)。



图1 再灌注后2组大鼠脑组织梗死灶TTC染色

2.2 大鼠一般状态观察

2.2.1 生存情况 模型评价后,将模型复制成功的39只大鼠随机分为2组,非穴区对照组20只、针刺组19只。针刺干预期间,非穴区对照组死亡5只,针刺组死亡3只。假手术组大鼠伤口基本愈合,活动度良好,毛色纯白,富有光泽。非穴区对照组大鼠精神状态较差,毛色枯槁无光泽,活动较少。针刺组大鼠精神状态尚可,活动范围较小,但活动度明显好于非穴区对照组。

2.2.2 神经功能缺损评分 针刺干预后,各组大鼠神经功能缺损评分统计结果显示:与假手术组比较,非穴区对照组和针刺组大鼠神经功能缺损评分显著升高($P<0.01$);与非穴区对照组比较,针刺组大鼠神经功能缺损评分显著降低($P<0.01$)。见表2。

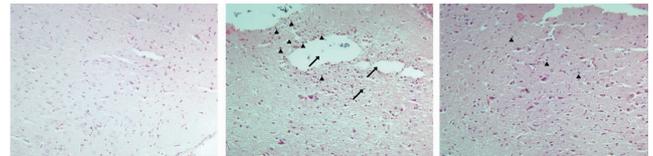
表2 干预后3组大鼠神经功能缺损评分比较 分, $\bar{x}\pm s$

组别	n	神经功能缺损评分
假手术组	14	0
非穴区对照组	15	2.60±0.63 ^a
针刺组	16	1.63±0.72 ^{ab}

与假手术组比较,^a $P<0.01$;与非穴区对照组比较,^b $P<0.01$

2.3 3组大鼠脑组织病理变化 各组大鼠脑组织HE

染色结果显示:假手术组大鼠脑组织未见异常;非穴区对照组大鼠脑组织因液化坏死而出现局部脱片现象(照片中箭头所示),高倍镜下可见大量炎性细胞浸润(照片中黑色三角所示),梗死区内可见细胞萎缩坏死,半暗带组织中可见细胞水肿等改变;针刺组大鼠脑组织梗死灶区域也出现脱片现象,但与非穴区对照组比较,范围明显变小,高倍镜下炎性细胞浸润程度减轻(见图2)。



假手术组
(×200倍)

非穴区对照组
(×200倍)

针刺组
(×200倍)

注:黑色三角所示为炎性细胞浸润;黑色箭头所示为液化坏死部位。

图2 3组大鼠脑缺血半暗带组织病理照片

2.4 3组大鼠缺血半暗带脑组织中IL-1、IL-6、TNF- α 含量比较 检测结果显示:与假手术组比较,非穴区对照组和针刺组大鼠缺血半暗带脑组织中IL-1、IL-6、TNF- α 含量显著升高($P<0.01$);与非穴区对照组比较,针刺组大鼠缺血半暗带脑组织中IL-1、IL-6、TNF- α 含量显著降低($P<0.01$)。见表3。

表3 干预后3组大鼠缺血半暗带脑组织中IL-1、IL-6、TNF- α 含量比较 $\bar{x}\pm s$

组别	n	IL-1	IL-6	TNF- α
假手术组	6	330.07±37.03	153.12±22.25	343.61±33.67
非穴区对照组	6	801.86±124.97 ^a	379.17±78.24 ^a	752.20±121.56 ^a
针刺组	6	546.05±65.94 ^{ab}	235.53±30.93 ^{ab}	555.12±45.39 ^{ab}

与假手术组比较,^a $P<0.01$,与非穴区对照组比较,^b $P<0.01$

3 讨论

脑梗死因高发病率、高致死率和高致残率而受到脑血管病研究者的高度重视。早在1986年,Bederson等^[8]就采用线栓法成功复制出与临床脑梗死疾病高度相似的动物模型。本研究采用的动物模型复制方法为改良线栓法。结果证明,造模组大鼠神经功能缺损评分显著高于假手术组,并且随机抽取的大鼠脑组织TTC染色也在造模组大鼠脑切片上检测到明显的苍白区,证实模型复制成功。

本实验结果验证了针刺百会、四神聪穴对缺血性脑病的良好疗效:与假手术组比较,非穴区对照组和针刺组大鼠神经功能缺损评分及脑组织梗死百分比显著升高;与非穴区对照组比较,针刺组显著降低了MCAO模型大鼠神经功能缺损评分及脑组织梗死百

分比。病理结果显示:假手术组大鼠脑组织未见异常;非穴区对照组大鼠脑组织因液化坏死而出现局部脱片现象,高倍镜下可见大量炎性细胞浸润,梗死区内可见细胞萎缩坏死,半暗带组织中可见细胞水肿等改变;针刺组大鼠脑组织梗死灶区域也出现脱片现象,但与非穴区对照组比较,范围明显变小,高倍镜下炎性细胞浸润程度减轻。结果提示,针刺百会、四神聪穴对MCAO模型大鼠的脑保护作用主要在于能够减轻梗死区及缺血半暗带脑组织中的炎症反应。

免疫细胞的增殖、分化以及生物学作用的发挥受到一系列细胞因子的调节。根据细胞因子结构的同源性可将其分为几个蛋白质家族:如IL-1家族、IL-6家族、肿瘤坏死因子家族、IL-10家族和造血因子家族等^[11]。IL-1是一种致炎细胞因子,广泛参与了人体组织破坏、水肿形成等多种病理损伤过程。研究表明,IL-1具有明显的促炎作用,又被称为前沿性细胞因子。IL-1在脑梗死发生的早期,发挥着重要的致炎作用^[12-13]。IL-6主要由活化的T淋巴细胞和成纤维细胞分泌,其最主要的生物学作用也是促炎作用,此外还具有刺激B淋巴细胞产生抗体等免疫学功能。研究表明,IL-6在脑梗死发生发展过程中也发挥着重要的促炎作用^[14]。TNF,主要由活化的巨噬细胞分泌,后续研究发现,TNF- α 具有介导炎症反应和调节细胞增殖分化的功能。近年来的研究表明,在脑梗死的发生早期,也有TNF- α 参与其中,主要发挥介导炎症反应的作用^[15]。

本研究结果显示,非穴区对照组和针刺组大鼠缺血半暗带脑组织中IL-1、IL-6、TNF- α 含量显著升高,针刺百会、四神聪穴干预后,含量显著降低。结果提示,当脑缺血损伤发生时,缺血半暗带脑组织中迅速发生了炎症反应,缺血半暗带脑组织中IL-1、IL-6、TNF- α 含量迅速升高。而针刺百会、四神聪穴干预后,IL-1、IL-6、TNF- α 含量显著降低,说明针刺百会、四神聪穴对IL-1、IL-6、TNF- α 的分泌具有一定的抑制作用,从而发挥针刺对MCAO模型大鼠的脑保护作用。

综上所述,针刺百会、四神聪穴对MCAO模型大鼠具有一定的抗炎作用,该作用可能是通过抑制缺血半暗带脑组织中IL-1、IL-6、TNF- α 分泌而实现的,但

其抑制IL-1、IL-6、TNF- α 分泌的具体机制尚需进一步研究。

【参考文献】

- [1] 王玉,杨洁红,何昱,等. 养阴通脑颗粒对大鼠脑缺血/再灌注损伤的保护作用及其抑制NF- κ B信号通路的作用机制[J]. 中华中医药杂志,2017,32(8):3713-3717.
- [2] 张鑫,耿诗涵,王萍,等. 苦碟子注射液对大鼠脑缺血再灌注损伤炎症及TLR-4/NF- κ B信号的影响[J]. 药物评价研究,2017,40(7):892-896.
- [3] 宋书昌,卢智,陈华,等. 梅花针叩刺百会、四神聪治疗急性期脑梗死合并认知功能障碍的临床研究[J]. 针灸临床杂志,2014,30(1):26-28.
- [4] 柳成刚,姜元辉,石栏. 针刺百会、腰奇穴对癫痫大鼠血清IL-1 β 、IL-6表达及海马神经元凋亡因子的影响[J]. 针灸临床杂志,2016,32(6):78-81.
- [5] 俞坤强,李晓洁,彭洪卫,等. 电针百会、神庭穴对MCAO大鼠学习记忆能力及IL-1 β 、TNF- α 表达的影响[J]. 中国中医急症,2015,24(11):1891-1894,1914.
- [6] 陈磊,魏惠芳,仲大磊,等. 针灸百会穴对束缚应激模型大鼠血清TNF- α 及IL-1含量变化的影响[J]. 吉林中医药,2012,32(1):76-78.
- [7] 马贤德,孙宏伟,柴纪严,等. 线栓法制备大鼠脑缺血再灌注模型的方法研究[J]. 中华中医药学刊,2009,27(6):1200-1201.
- [8] Bederson JB, Pitts H, Tsuji M, et al. Rat middle cerebral artery occlusion evaluation of the model and development of a neurologic evaluation[J]. Stroke, 1986, 17(3):472-476.
- [9] 华兴邦. 大白鼠穴位图谱的研制[J]. 实验动物与动物实验, 1991, 1(1):1-6.
- [10] 于船. 中国兽医针灸学[M]. 北京:农业出版社,1984:26-28.
- [11] 单保恩. 白细胞介素23研究进展[J]. 国外医学临床生物化学与检验学分册, 2005, 26(6): 335-337.
- [12] 朱振洪,黄小飞,王玉,等. 丹红注射液与羟基红花黄色素A对大鼠脑缺血再灌注后IL-1 β 、TNF- α 和Caspase-3 mRNA表达的影响[J]. 中华中医药杂志,2016,31(4):1390-1393.
- [13] 李静,陈永顺,蒋建平,等. 冰七片对脑缺血再灌注大鼠脑组织IL-1 β 、TNF- α 影响[J]. 中外医学研究,2016,14(2):156-157.
- [14] 葛建彬,卢红建,宋新建,等. 枸杞多糖对小鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用及其抑制NF- κ B、TNF- α 、IL-6和IL-1 β 表达的机制[J]. 中国中药杂志,2017,42(2):326-331.
- [15] 李俊杰,蒋海燕,邵建林. 脑缺血-再灌注损伤大鼠脑组织中TNF- α 、IL-6和IL-1 β 的表达[J]. 昆明医科大学学报,2016,37(9):31-35.

欢 迎 投 稿