

• 研究报告 •

# 头针对急性脑缺血/再灌注损伤大鼠脑组织髓过氧化物酶表达的影响

郭壮丽 裴海涛 韩迪 纪晓军 李红云

【关键词】 头针； 缺血/再灌注损伤，脑； 髓过氧化物酶

随着分子生物学和分子免疫学的发展，研究发现，脑缺血或缺血/再灌注(I/R)损伤后的炎症反应在缺血性脑损害的发生发展中起重要作用，可引起血流改变、水肿等，最终引起神经元死亡<sup>[1]</sup>。在缺血后脑内炎症反应中白细胞被激活、黏附、聚集于受损组织，释放有害物质，进一步加重组织损伤<sup>[2-3]</sup>，且随年龄增加，炎症级联反应持续时间更长，不易恢复<sup>[3]</sup>。髓过氧化物酶(MPO)是中粒细胞功能标志和激活标志。针刺治疗脑血管病已得到公认，关于其机制研究已有很多报道<sup>[4-6]</sup>，但有关在脑血管疾病发病超早期脑 I/R 后针刺与 MPO 的关系尚鲜见报道，为此本研究拟在大鼠脑 I/R 模型基础上，观察头穴电针对 I/R 后脑组织 MPO 表达及组织病理学变化的影响，探讨电针对脑 I/R 损伤的保护作用及其机制。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物分组及模型制备：**清洁级雌性 SD 大鼠 15 只(中国医学科学院上海实验动物中心提供，动物批号 SCXK [沪]2002-0010)，体重 230~270 g。按随机数字表法分为假手术组、模型组和针刺组，每组 5 只。参照李胜和雷征霖<sup>[7]</sup>介绍的方法制备大鼠中动脉闭塞(MCAO)模型，大鼠中动脉缺血 2 h 后，轻轻外拉尼龙线，使尼龙线头端回至颈外动脉(ECA)残端，恢复大鼠中动脉的血供，实现 I/R。假手术组手术步骤同模型组，但不阻塞大鼠中动脉，插线深度为 12 mm 左右。

**1.2 针刺方法：**于缺血后 10 min 在大鼠头顶相当于人体百会、风府穴处常规剪毛消毒。用 29 号毫针于百会穴处向左前方(相当于人体曲鬓穴处)平刺，

进针深度约 0.8 cm；风府穴处直刺，深度约 0.5 cm。连接电麻仪，百会穴接阳极，风府穴接阴极；电针频率 7 Hz，强度 6 mA，刺激 30 min。

## 1.3 检测指标及方法

**1.3.1 MPO 蛋白的免疫组化检测：**于再灌注 12 h 后深麻醉大鼠，迅速打开胸腔，左心室插管经升主动脉快速灌注生理盐水 200 ml，再持续灌注 4%多聚甲醛水溶液 300 ml，断头取脑，多聚甲醛水溶液后固定 1 h。自视交叉神经处开始向后取冠状切片，石蜡包埋，连续切片，片厚约 7 μm。裱片于涂有多聚赖氨酸(北京中山生物工程公司)的载玻片。采用免疫组化法检测 MPO 蛋白，按试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司)说明书进行操作。阴性对照不加探针，其余步骤相同。MPO 阳性细胞胞质着色呈棕黄色；阴性对照细胞不着色。观察缺血区周围皮质及纹状体阳性细胞表达，应用图像分析系统对实验结果进行处理，测定吸光度(A)值。

**1.3.2 脑组织病理观察：**将脑组织标本常规行苏木素-伊红(HE)染色，光镜下观察病变区组织病理变化。

**1.4 统计学处理：**所有数据以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示，应用 SPSS 8.0 统计软件进行 *t* 或 *χ*<sup>2</sup> 检验，*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 MPO 蛋白免疫组化结果(表 1)：**假手术组皮质及纹状体 MPO 蛋白有低水平表达。模型组缺血区皮质及纹状体 MPO 蛋白表达明显增强，与假手术组比较差异有统计学意义(均 *P* < 0.01)。针刺组皮质及纹状体 MPO 蛋白表达较模型组明显减弱，但仍高于假手术组(均 *P* < 0.01)。

**2.2 光镜下脑组织病理观察：**假手术组细胞结构层次清晰，排列整齐，可见细胞核大而圆、淡染，有 1~2 个明显的核仁，血管内无明显的白细胞聚集及附壁现象。模型组于再灌注后 12 h 脑组织变性、坏死程度较重，神经元变性、坏死，胶

质细胞呈空泡样变性，可见血管内有明显的白细胞聚集及附壁现象，血管周围亦有明显白细胞浸润。针刺组仅有少量神经元变性、坏死及胶质细胞空泡样变，血管内的细胞聚集减少。

表 1 针刺对缺血/再灌注损伤大鼠脑组织 MPO 蛋白表达的影响( $\bar{x} \pm s$ )

组别	动物数	MPO 蛋白(A 值)	
		皮质	纹状体
假手术组	5	0.301±0.012	0.318±0.016
模型组	5	0.374±0.024 <sup>a</sup>	0.401±0.018 <sup>a</sup>
针刺组	5	0.332±0.013 <sup>ab</sup>	0.357±0.018 <sup>ab</sup>

注：MPO：髓过氧化物酶；与假手术组比较，<sup>a</sup>*P* < 0.01；与模型组比较，<sup>b</sup>*P* < 0.01

## 3 讨论

**3.1 头穴治疗急性脑缺血损伤的选穴依据：**头针疗法在脑梗死恢复期的治疗中起着很大作用，这一点已得到普遍认可。但头针疗法在脑梗死急性期也起着不可忽视的作用<sup>[4-5,10]</sup>，而且目前主张发病越早治疗越好。这一点和现代医学的早期康复观点不谋而合。我国古代医家就有头针治疗脑梗死方面的记载，《针灸大成·玉龙歌》载有：“中风不语最难医，发际顶门穴要知，更向百会明补泻，即时苏醒免灾危。”百会穴居头之颠，是督脉之要穴，为手足三阳、督脉及足厥阴之会，统领一身之阳，内系于脑；曲鬓穴为足太阳、少阳之会，3 条阳经从头至足，纵贯全身，具有统领一身阳气的功能。《普及方》中明确指出：“凡忽中风，言语蹇涩，半身不遂……穴百会、耳前发际(即曲鬓)……神效。”风府穴是督脉、阳维之会，《千金方》有“风府、腰膂手足不仁”的记载。《行针指要歌》更有“或针风，先向风府、百会中”的记载。“百会透曲鬓”是导师孙申田教授等人在长期临床实践中进行了大量对比研究，而总结出的治疗卒中效果较理想的经验要穴。以上穴位合用，贯穿了多条经脉，起到了一经带多经、一穴带多穴的整合作用，起到通调督脉、醒脑开窍、宁神定志之功

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2010.04.014  
 基金项目：山东省中医药科技计划项目(2003-129)  
 作者单位：266003 山东，青岛大学医学院附属医院急诊神经科

效,这些都为头穴针刺疗法提供了理论依据。

3.2 针刺对急性脑 I/R 大鼠脑组织 MPO 表达的影响, MPO 是存在于中性粒细胞中的特异性标志酶,可作为中性粒细胞在组织中浸润程度的可靠指标。本实验中采用免疫组化法测定能反映组织中白细胞数量的脑组织中 MPO 表达阳性细胞,结果显示,脑 I/R 后 MPO 表达明显增强,说明脑 I/R 后脑组织中存在中性粒细胞的大量浸润。中性粒细胞浸润并不代表感染,而是对脑缺血组织的一种反应,脑缺血区的白细胞浸润在脑 I/R 损伤的发生发展中起着重要作用。中性粒细胞通过穿越血管的移动和侵入缺血组织直接诱发细胞毒性作用,这将加重低灌注和坏死,尤其在缺血半暗带区<sup>[11]</sup>。白细胞计数增高是脑梗死的危险因素,与预后不良相关。临床研究表明,“醒脑开窍”针刺疗法治疗脑梗死,可使外周血白细胞计数、中性粒细胞明显下降,神经功能缺损程度评分(NDS)明显下降<sup>[5]</sup>,也支持白细胞促进了再灌注损伤的观点。去除中性粒细胞也能减轻再灌注时脑水肿,增加脑血流量。用抗中性粒细胞单克隆抗体 RP3 处理可以使 MPO 活性下降<sup>[12]</sup>,而 MPO 活性下降与梗死灶的缩小相关,除能改善脑血流、缩小梗死灶、减轻中性粒细胞浸润外,全身中性粒细胞减少还能改善神经功能<sup>[13]</sup>。但临床试验效果不理想,反而使病情恶化,并伴随着感染和发热等副作用<sup>[14]</sup>。

针刺在治疗脑血管病方面有着可靠的疗效,尤其在急性期,是公认的绿色疗法。本研究结果显示,脑 I/R 后皮质及纹状体 MPO 表达均增强,针刺组 MPO 表达较模型组明显减弱,说明针刺可明显抑制 I/R 损伤后脑组织中 MPO 的表达,减轻白细胞在脑组织中的浸润程度。

本研究中同时进行的病理组织学观察也显示,针刺后缺血区神经变性、坏死及脑胶质空泡变性也明显减轻,微血管内白细胞聚集、附壁现象及血管周围白细胞浸润也明显减少。针刺可有效抑制 MPO 的表达,从而阻止其生物学作用的发挥,减少白细胞向缺血脑组织的浸润,从而减轻脑缺血后的炎症级联反应。故推测,针刺减少脑 I/R 损伤的机制可能与其调节 MPO 的过表达有关。另有研究表明,针刺预处理可抑制脑 I/R 损伤大鼠顶叶皮质神经元 N-甲基-D-门冬氨酸受体亚单位 NR2A 和 NR2B 的蛋白表达<sup>[6]</sup>,或是通过上调腺苷水平<sup>[7]</sup>,或是通过抑制神经元内钙超载<sup>[8]</sup>,或是通过抑制脑内白细胞介素-1 $\beta$ 蛋白表达<sup>[15]</sup>等机制,参与脑保护作用,但具体机制有待于进一步研究。

参考文献

[1] Stanimirovic D, Satoh K. Inflammatory mediators of cerebral endothelium; a role in ischemic brain inflammation. *Brain Pathol*, 2000, 10: 113-126.  
 [2] Kochanek PM, Hallenbeck JM. Polymorphonuclear leukocytes and monocytes/macrophages in the pathogenesis of cerebral ischemia and stroke. *Stroke*, 1992, 23: 1367-1379.  
 [3] 李建生, 高剑峰, 周友龙, 等. 老年脑缺血/再灌注大鼠炎症级联反应变化及其意义. *中国危重病急救医学*, 2006, 18: 278-281.  
 [4] 李汉先, 高观月, 程汉兰, 等. 针刺对脑缺血性损害的防治作用与机制的初探. *针刺研究*, 1994, 19: 26-28.  
 [5] 蒙树煜, 程守强, 张辉, 等. “醒脑开窍”针法治疗脑梗死疗效观察. *中国中西医结合急救杂志*, 2006, 13: 306-308.  
 [6] 陈泽斌, 邹峰, 袁芳, 等. 针刺预处理对脑缺血/再灌注大鼠顶叶皮质 NR2A 和 NR2B 蛋白表达的影响. *中国中西医结合急救杂志*, 2005, 12: 79-83.

[7] 唐伟, 邹枫枫. 针刺预处理对脑缺血/再灌注大鼠脑水肿及腺苷水平的影响. *中国中西医结合急救杂志*, 2007, 14: 166-168.  
 [8] 姚凯, 郭义, 胡利民, 等. 针刺对大鼠脑缺血超早期脑细胞内外游离钙离子浓度的影响. *中国中西医结合急救杂志*, 2005, 12: 303-305.  
 [9] 李胜, 雷征霖. 大鼠大脑中动脉区局灶性脑缺血模型. *国外医学脑血管疾病分册*, 1998, 6: 3-6.  
 [10] DeGraba TJ. The role of inflammation after acute stroke; utility of pursuing anti-adhesion molecule therapy. *Neurology*, 1998, 51: S62-68.  
 [11] 高晶, 郭玉璞. 缺血后脑组织损伤中的炎细胞作用. *中华神经科杂志*, 1999, 32: 303-305.  
 [12] Matsuo Y, Onodera H, Shiga Y, et al. Correlation between myeloperoxidase-quantified neutrophil accumulation and ischemic brain injury in the rat; effects of neutrophil depletion. *Stroke*, 1994, 25: 1469-1475.  
 [13] Connolly ES Jr, Winfree CJ, Springer TA, et al. Cerebral protection in homozygous null ICAM-1 mice after middle cerebral artery occlusion; role of neutrophil adhesion in the pathogenesis of stroke. *J Clin Invest*, 1996, 97: 209-216.  
 [14] Enlimomab Acute Stroke Trial Investigators. Use of anti-ICAM-1 therapy in ischemic stroke; results of the enlimomab acute stroke trial. *Neurology*, 2001, 57: 1428-1434.  
 [15] 郭壮丽, 裴海涛. 急性脑缺血/再灌注大鼠脑内 IL-1 $\beta$  蛋白表达及针刺对其抑制作用的研究. *中华物理医学与康复杂志*, 2005, 27: 16-19.

(收稿日期: 2009-09-13)  
(本文编辑: 李银平)

• 科研新闻速递 •

脓毒性休克时应用活化蛋白 C 可改善患者预后

美国学者对接受活化蛋白 C 早期治疗和未接受治疗的脓毒性休克患者的预后进行了比较。研究人员选取了 33 749 例严重脓毒症患者进行回顾性队列研究,患者在入院 2 d 内均应用抗生素和升压药,主要观察患者院内病死率、颅内和胃肠出血、大量输液等情况。结果显示,与接受活化蛋白 C 早期治疗的患者比较,未接受治疗的患者更需要机械通气(77%比 48%),需给 2 次以上的升压药(68%比 41%),更需要接受肺动脉导管术(9%比 4%),院内病死率更高(46.6%比 40.7%);在接受活化蛋白 C 治疗的患者中,4 例(0.25%)发生颅内出血,107 例(6.80%)发生胃肠出血,5 例(0.30%)需要大量输液。研究人员认为,早期应用活化蛋白 C 治疗不仅可有效降低脓毒性休克患者的院内病死率,且较少出现并发症,应予推广。

杨明星, 编译自《Crit Care Med》, 2010-02-11(电子版); 胡森, 审校

## 的影响

作者: 郭壮丽, 裴海涛, 韩迪, 纪晓军, 李红云  
作者单位: 青岛大学医学院附属医院急诊神经科, 山东, 266003  
刊名: 中国危重病急救医学 ISTIC PKU  
英文刊名: CHINESE CRITICAL CARE MEDICINE  
年, 卷(期): 2010, 22(4)  
被引用次数: 0次

## 参考文献(15条)

1. 李汉先;高观月;程汉兰 针刺对脑缺血性损害的防治作用与机制的初探 1994
2. 李建生;高剑峰;周友龙 老年脑缺血/再灌注大鼠炎症级联反应变化及其意义[期刊论文]-中国危重病急救医学 2006(5)
3. Kochanek PM;Hallenbeck JM Polymorphonuclear leukocytes and monocytes/macrophages in the pathogenesis of cerebral ischemia and stroke 1992
4. 李胜;雷征霖 大鼠大脑中动脉区局灶性脑缺血模型 1998(06)
5. 姚凯;郭义;胡利民 针刺对大鼠脑缺血超早期脑细胞内外游离钙离子浓度的影响[期刊论文]-中国中西医结合急救杂志 2005(5)
6. Stanimirovic D;Sato K Inflammatory mediators of cerebral endothelium:a role in ischemic brain inflammation 2000
7. 郭壮丽;裴海涛 急性脑缺血/再灌注大鼠脑内IL-1 $\beta$ 蛋白表达及针刺对其抑制作用的研究[期刊论文]-中华物理医学与康复杂志 2005(1)
8. Enlimomab Acute Stroke Trial Investigators Use of anti-ICAM-1 therapy in ischemic stroke:results of the enlimomab acute stroke trial 2001
9. Connolly ES Jr;Winfree CJ;Springer TA Cerebral protection in homozygous null ICAM-1 mice after middle cerebral artery occlusion:role of neutrophil adhesion in the pathogenesis of stroke 1996
10. Matsuo Y;Onodera H;Shiga Y Correlation between myeloperoxidasequantified neutrophil accumulation and ischemic brain injury in the rat:effects of neutrophil depletion 1994
11. 高晶;郭玉璞 缺血后脑组织损伤中的炎细胞作用[期刊论文]-中华神经科杂志 1999(5)
12. DeGraba TJ The role of inflammation after acute stroke:utility of pursuing anti-adhesion molecule therapy 1998
13. 唐伟;邹飒枫 针刺预处理对脑缺血/再灌注大鼠脑水肿及腺苷水平的影响[期刊论文]-中国中西医结合急救杂志 2007(3)
14. 陈泽斌;邹峰;袁芳 针刺预处理对脑缺血/再灌注大鼠顶皮质NR2A和NR2B蛋白表达的影响[期刊论文]-中国中西医结合急救杂志 2005(2)
15. 蒙树煜;程守强;张辉 "醒脑开窍"针法治疗脑梗死疗效观察[期刊论文]-中国中西医结合急救杂志 2006(5)

本文链接: [http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical\\_zgwzbjyxx201004013.aspx](http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_zgwzbjyxx201004013.aspx)

授权使用: qkzgz16(qkzgz16), 授权号: bf0ba662-6eb5-43b5-8ac0-9ede015aa638

下载时间: 2011年5月9日