

· 基础研究 ·

电针对大鼠脑缺血后早期半暗带区 Caspase-3 表达的影响

崔宝娟 江森 王珊珊 孙强三

【摘要】目的 观察电针刺激对大鼠脑缺血后早期半暗带区 Caspase-3 表达的影响。**方法** 将 100 只 Wistar 大鼠随机分为假手术组、造模组及电针组。采用手术方法将造模组及电针组大鼠制成大脑中动脉梗死模型,假手术组大鼠给予相同处理,但不梗塞大脑中动脉。分别于脑缺血后 24 h、48 h 及 72 h 时应用免疫组化法检测各组大鼠缺血侧半暗带区 Caspase-3 阳性细胞的表达情况。**结果** 假手术组大鼠偶见 Caspase-3 阳性细胞,造模组和电针组大鼠缺血侧半暗带区在各观察时间点均可见大量 Caspase-3 阳性细胞,且阳性细胞数量均以脑缺血 24 h 时最多;造模组、电针组缺血侧半暗带区阳性细胞数量在各观察时间点均较假手术组明显增多($P < 0.01$);造模组半暗带区 Caspase-3 阳性细胞在缺血 24 h、48 h 时均较电针组明显增多($P < 0.05$);在缺血 72 h 时,发现造模组、电针组半暗带区 Caspase-3 阳性细胞数量间差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 实验大鼠脑缺血后半暗带区 Caspase-3 阳性细胞表达存在时间规律性,电针刺激可有效减少 Caspase-3 阳性细胞数量。

【关键词】 脑缺血; 电针; Caspase-3

Effects of electroacupuncture on the expression of caspase-3 in the ischemic penumbra in the early stage of cerebral ischemia CUI Bao-juan, JIANG Miao, WANG Shan-shan, SUN Qiang-san. Department of Rehabilitation, The Second Hospital, Medical College of Shandong University, Jinan 250033, China
Corresponding author: SUN Qiang-san, Email: sunqsan@126.com

【Abstract】Objective To observe the effects of electroacupuncture on expression of caspase-3 in the ischemic penumbra in the early stage of cerebral ischemia in rats. **Methods** 100 Wistar rats were randomly divided into a sham-operated group, a model group and an electroacupuncture group. The middle cerebral artery was experimentally occluded in the rats in the model and electroacupuncture groups, while a sham operation without cerebral artery occlusion was carried out on the rats in the sham-operated group. Immunocytochemistry was employed to detect the expression of caspase-3 in the ischemic penumbra at 24 h, 48 h and 72 h after cerebral ischemia. **Results** There was almost no positive expression of caspase-3 in the sham-operated rats. Numerous caspase 3-positive cells were found in the ischemic penumbra in the model and electroacupuncture groups. The peak of expression was reached 24 hours after cerebral ischemia. The number of caspase 3-positive cells was significantly greater in the model group than in the electroacupuncture group at 24 h and 48 h. **Conclusion** The increase of caspase 3-positive cells in the ischemic penumbra is time-dependent. Electroacupuncture can significantly decrease the expression of caspase-3.

【Key words】 Cerebral ischemia; Electroacupuncture; Caspase-3

脑缺血是严重危害人类健康的常见病之一,其高致残率已引起社会各界广泛关注。电针作为一种促进肢体功能恢复的治疗手段,其临床疗效肯定。对于电针的确切治疗机制,已有大量学者从不同角度进行了探索性研究^[1],但始终未得出肯定性结论。本研究将实验大鼠制作成大脑中动脉梗死(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型,并观察电针刺激对大鼠缺血早期半胱氨酸水解酶-3(Caspase-3)的影响,以探讨

电针刺激的相关作用机制,为电针治疗脑缺血提供实验依据。现报道如下。

材料与方法

一、实验动物及分组

共选取清洁级健康 Wistar 大鼠 100 只,雄性,体重(250 ± 20)g,由山东大学医学院实验动物中心提供;将上述大鼠饲养于安静、温暖且避强光环境中,室温(22 ± 2)℃,期间自由饮水、进食。所有实验大鼠于造模前 24 h 禁食,但不禁水。遵循随机化原则,将上述大鼠分为假手术组(15 只)和实验组(85 只)。

基金项目:山东省中医药管理局资助项目(2005-046)

作者单位:250033 济南,山东大学第二医院康复医学科

通讯作者:孙强三,Email:sunqsan@126.com

二、实验动物造模

参考 Longa 介绍的线栓法^[2]将实验组大鼠制作成 MCAO 模型。将长 30 mm、直径 0.235 mm 的“千羽”牌鱼线制成线栓,浸泡于 75% 酒精中备用。选用 10% 水合氯醛按 35 mg/kg 体重进行大鼠腹腔麻醉,待麻醉剂生效后将其固定于仰卧位,颈部正中切口,依次分离组织,暴露右侧颈总动脉(common carotid artery, CCA),分离出颈内动脉(internal carotid artery, ICA)、颈外动脉(external carotid artery, ECA)。结扎 ECA 主干尽量靠近分叉处,分离 ICA 主干至翼腭动脉(ptyergopalatine artery, PPA),并在其起始部置一动脉夹;先将 CCA 用动脉夹夹住,而后在离分叉约 10 mm 处结扎 CCA,再于结扎线前方血管处用眼科剪剪一小口,将栓线轻轻插入;轻推尼龙线尾端经 CCA 分叉部沿 ICA 入颅,至大脑中动脉(MCA)遇阻力时即停止。鱼线插入深度约为 18 mm,结扎鱼线尾端,清理伤口,依次缝合创面,手术过程中注意保持动物肛温在 37℃。假手术组大鼠操作过程基本同上,但线栓插入深度仅为 10 mm,尚未入颅。

三、模型筛选

待实验组大鼠清醒后,参照 Zea Longa 法^[2]进行神经功能评分,0 分为无神经功能缺陷;1 分为左侧前肢内收、屈曲;2 分为自主运动时身体向左侧划圈;3 分为身体向左侧倾倒;4 分为不能自主行走并伴有意识障碍。评分为 1~3 分的大鼠纳入本研究,共有 58 只入选(剩下的 27 只大鼠因不符合实验要求而被剔除),将其随机细分为电针组及造模组,每组 29 只。

四、实验干预方法

待电针组大鼠清醒半小时后,立即将其置于自制治疗台上进行电针刺激。取百会、大椎、曲池、足三里穴,针具为“华佗牌”不锈钢毫针,规格为 0.35 mm × 25 mm。百会穴沿皮斜刺,大椎穴向下颌方向缓慢斜刺,曲池、足三里则垂直刺入,深度均为 0.5 寸。选用上海产 G6805 型电针仪,电刺激参数如下:疏密波,频率 80~100 Hz,刺激强度以使针刺局部有轻微抖动为度(电流强度多为 1~3 mA,电压为 1~3 V),持续电刺激 60 min,每天 2 次。假手术组和造模组大鼠也同样固定于治疗台上,但期间不给予电针刺激。

五、取材制片

各组实验大鼠分别于实验进行 24、48 及 72 h 时各取约 1/3 数量的大鼠进行标本制作,选用 10% 水合氯醛按 3.5 ml/kg 体重进行麻醉,开胸暴露心脏,将灌注针从心尖部位插入升主动脉,剪开右心耳,依次迅速灌注 0.9% 生理盐水(20℃)200 ml、4% 多聚甲醛(4℃)200 ml,待灌注完毕后迅速取脑组织。在视交叉平面前、后 2 mm 处行脑冠状切面切开,留取中间部分

并置于 4% 多聚甲醛固定液(4℃)中过夜。经常规脱水、透明后用石蜡包埋、连续切片,切片厚 5 μm,然后在 60℃ 左右温水中充分展开,用玻片贴片,每份组织取不相邻的 3 张切片待用。

六、Caspase-3 免疫组化染色

免疫组化切片经常规脱蜡、脱水、3% 过氧化氢灭活内源性酶、微波抗原修复、正常山羊血清封闭、滴加 1 滴标记有 Caspase-3 单克隆抗体一抗(1:100, Boster 公司产品)处理后,于湿盒(37℃)中孵育过夜;滴加二抗, SABC 反应,二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)显色,苏木素轻度复染、脱水、透明、中性树脂封片。以上各步骤间除特殊说明外,均用磷酸盐缓冲液振荡洗涤 5 min,共 3 次。阴性对照采用正常山羊血清代替一抗。

七、图像分析

将切片标本置于 Olympus BX40 型光学显微镜下观察,以脑组织中胞浆呈黄色或棕黄色为 Caspase-3 免疫反应阳性细胞。每只大鼠取 3 张非连续切片,在相同光照情况下,于高倍镜(×400)视野下选取各切片中缺血侧缺血半暗带区 8 个非重叠视野进行 Caspase-3 免疫反应阳性细胞计数,取平均数纳入统计,采用 Olympus Microimage 4.0 图像分析仪进行数据分析。

八、统计学分析

研究所得数据以($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 12.0 版统计学软件处理,组间比较采用单因素方差分析,组内两样本比较采用配对 *t* 检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

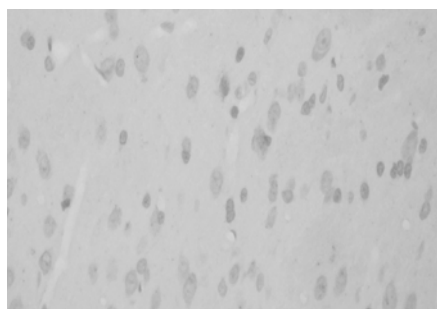
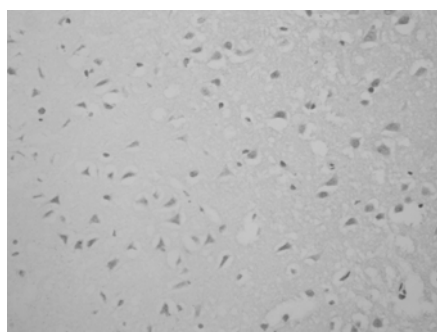
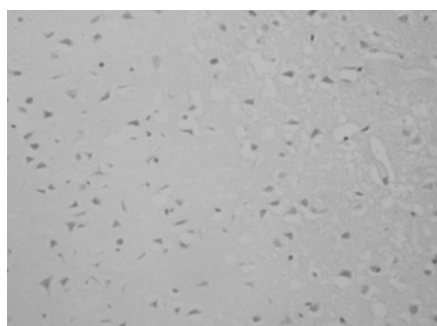
结 果

各组实验大鼠脑缺血 24 h、48 h 及 72 h 时缺血侧 Caspase-3 阳性细胞数结果详见表 1。染色结果显示,假手术组大鼠各观察时间点偶见 Caspase-3 阳性细胞表达(图 1);造模组和电针组大鼠 Caspase-3 阳性细胞主要位于脑缺血梗死灶边缘区(即半暗带区),梗死灶中心区、远离梗死灶区域以及对侧脑组织中均少见 Caspase-3 阳性表达细胞,且 2 组大鼠 Caspase-3 阳性细胞的时间分布规律相近,均为缺血 24 h 后 Caspase-3 阳性细胞数量最多(图 2、3),缺血 48 h 及 72 h 时则逐渐减少。造模组及电针组大鼠缺血侧半暗带 Caspase-3 阳性细胞在脑缺血 24 h 及 48 h 时均较假手术组明显增多,差异具有统计学意义($P < 0.05$),并且造模组大鼠缺血侧半暗带 Caspase-3 阳性细胞数量显著多于电针组($P < 0.01$);在脑缺血 72 h 后,发现造模组和电针组大鼠 Caspase-3 阳性细胞数量仍显著多于假手术组,但此时造模组与电针组 Caspase-3 阳性细胞数量间差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 1 各组实验大鼠缺血半暗带区 Caspase3 阳性细胞数量比较(个/高倍镜视野, $\bar{x} \pm s$)

组 别	只数	Caspase3 阳性细胞数量		
		缺血 24 h	缺血 48 h	缺血 72 h
电针组	29	50.43 $\pm$ 3.42 ^{ab}	44.69 $\pm$ 3.65 ^{ab}	38.94 $\pm$ 1.26 ^a
造模组	29	64.02 $\pm$ 2.37 ^a	52.75 $\pm$ 1.44 ^a	39.12 $\pm$ 3.45 ^a
假手术组	15	1.02 $\pm$ 0.51	0.78 $\pm$ 1.15	0.58 $\pm$ 0.95

注:与假手术组相同时间点比较,^a $P < 0.01$;与造模组相同时间点比较,^b $P < 0.05$

**图 1** 假手术组缺血 24 h 后半暗带 Caspase-3 阳性细胞(HE 染色, $\times 400$)**图 2** 造模组缺血 24 h 后半暗带 Caspase-3 阳性细胞(HE 染色, $\times 400$)**图 3** 电针组缺血 24 h 后半暗带 Caspase-3 阳性细胞(HE 染色, $\times 400$)

讨 论

机体脑组织对缺血、缺氧非常敏感,即使是短暂时间的缺血、缺氧都能引起一系列复杂反应,最终诱发脑细胞死亡或凋亡^[3]。脑缺血中心区域细胞死亡以坏死为主,而周围半暗带区域细胞则以凋亡为主,凋亡对脑缺血的发展有促进作用。相关研究表明,在缺血神

经元的凋亡机制中,Caspase-3 处于核心地位,如细胞凋亡的最后过程都是通过激活 Caspase-3 而实现的^[4]。正常脑组织中持续表达低水平的 Caspase-3^[5]。Caspase-3 以无活性酶原形式存在于正常细胞中,经细胞内、外两条途径激活^[6]。当启动凋亡信号后,Caspase 9 或 Caspase 8 激活并切割 Caspase-3,使之转化为具有酶催化作用的活性形式。活化后的 Caspase-3 可切割许多蛋白质底物,最终引起细胞死亡^[7],完成其“瀑布式”级联反应。

电针作为一种传统非药物治疗手段,在脑卒中早期临床康复中具有显著疗效^[8]。目前临床对于电针穴位选择、留针时间、刺激参数等尚未达成共识。《采艾编》云:“三阳五会,五之为言百也”。百会、大椎两者相配,共奏疏通气血、醒脑开窍、回阳救逆、平衡阴阳之效^[9,10]。“治萎独取阳明”,运用足三里、曲池这两个合穴上下相配,具有平调阴阳、疏通经络作用。根据以上理论,本研究选取百会、大椎、曲池、足三里等给予电针刺激,以观察电针对脑缺血后神经元的保护作用。研究表明,假手术组大鼠各观察时间点偶可见 Caspase-3 阳性细胞表达;造模组和电针组大鼠 Caspase-3 阳性细胞主要位于缺血侧半暗带区,梗死灶中心区、远离梗死灶区域以及对侧脑组织均少见 Caspase-3 阳性细胞表达,且造模组和电针组大鼠 Caspase-3 阳性细胞的时间分布规律相同,都表现为缺血后 24 h 阳性细胞数量最多,缺血 48 h、72 h 则逐渐减少。造模组及电针组 Caspase 3 阳性细胞出现的时间规律表明,有 Caspase-3 参与的细胞凋亡过程在脑缺血后很快出现,且迅速达到高峰,随后逐渐减弱。这与以往研究结果相似,如陈元新等^[11]发现,实验大鼠脑缺血半暗带在缺血 8 h 时 Caspase-3 mRNA 表达开始升高,24 h 时达到峰值,1 周后恢复正常水平。鉴于此,在脑缺血损伤后的有效时间窗内,通过给予积极干预措施有可能减少 Caspase-3 阳性细胞数量,从而抑制细胞凋亡并减小脑梗死面积。Yang 等^[12]通过向侧脑室注射 Caspase-3 特异性抑制剂 DEVD-fmk 以降低 Caspase-3 蛋白酶活性,发现不仅能显著减少神经细胞凋亡数量,缩小脑梗死灶,还可明显改善缺损神经功能。

电针组大鼠缺血侧半暗带 Caspase-3 阳性细胞数量在脑缺血 24 h、48 h 时均少于造模组,表明电针刺激能有效抑制 Caspase-3 参与细胞凋亡过程。当机体神经元细胞受到缺血、缺氧损伤时,能引起凋亡相关基因(如 Bcl-2、Fas、P53 基因)激活,使相关蛋白表达水平增高,从而启动凋亡过程。Bcl-2 抗细胞凋亡的作用机制为抑制 Ca^{2+} 释放,通过阻止促细胞凋亡基因信号传递,进而促进神经元存活^[12,14]。电针刺激能显著降低

脑组织 Ca^{2+} 含量,促进半暗带区抑凋亡因子 Bcl-2 的表达,同时电针刺激还可下调 Fas、P53 表达,从而切断或减弱凋亡程序执行^[15],这可能是电针刺激减少半暗带区 Caspase-3 阳性细胞数量的一个重要机制。在另一方面,马景曦等^[16]发现,实验大鼠经电针刺激后,其缺血半暗带区血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF) mRNA、血管生成素-1 蛋白明显增加,而内皮抑素(Endostatin)蛋白表达水平下降,表明电针具有整体的良性双向调节作用,即上调血管生长因子及下调血管抑制因子;对缺血半暗带区而言,新形成的血管可明显改善脑组织灌流,减少细胞凋亡。黄晓琳等^[17]研究亦证实,电针刺激能增强急性脑缺血大鼠梗死灶周围 VEGF164 mRNA 表达,而 VEGF 对血管再生极为重要。由此可见,电针刺激对脑缺血可发挥多环节、多水平、多层次、多途径调节作用。另外,脑缺血 72 h 后造模组与电针组 Caspase-3 阳性细胞数量间差异无统计学意义($P > 0.05$),进一步表明电针治疗在抑制细胞凋亡方面存在治疗“时间窗”效应,因此选择合适的电针刺激时间具有重要意义。

综上所述,脑缺血大鼠缺血半暗带区 Caspase-3 阳性细胞表达具有时间分布规律,早期电针刺激能显著减少 Caspase-3 阳性细胞数量,这为临床早期应用电针治疗脑卒中患者提供了理论依据,但确切的治疗机制还有待进一步探讨。

参 考 文 献

- [1] DING DG, LI H, SUN GJ, et al. Effects of electroacupuncture on the neuronal apoptosis and the expression of NF- κ B protein in cerebral ischemia area of cerebral ischemia-reperfusion rats. *Inform TCM J*, 2007, 14; 28-30.
- [2] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniotomy in rats. *Stroke*, 1989, 20; 84-91.
- [3] Kao H, Takasawa R, Fukuda K, et al. DNA fragmentation in ischemic core and penumbra in focal cerebral ischemia in rats. *Mol Brain Res*, 2001, 91; 112-118.
- [4] Harrison DC, Medhurst AD, Bond BC, et al. The use of quantitative RT-PCR to measure mRNA expression in a rat model of focal ischemia caspase3 as a case study. *Mol Brain Res*, 2000, 75; 143-149.
- [5] Schmidt-Kastner R, Truettner J, Zhao W, et al. Differential changes of bax, caspase-3 and p21 mRNA expression after transient focal brain ischemia in the rats. *Mol Brain Res*, 2000, 79; 88-101.
- [6] Zhao H, Yenari MA, Cheng D, et al. Bcl-2 over expression protects against neuron loss within the ischemic margin following experimental stroke and inhibits cytochrome C translocation and caspase3 activity. *J Neurochem*, 2003, 85; 1026-1036.
- [7] Harrison DC, Davis RP, Bond BC, et al. Caspase mRNA expression in a rat model of focal cerebral ischemia. *Mol Brain Res*, 2001, 89; 133-146.
- [8] 陆敏, 张苏明, 常立英, 等. 运动训练结合电针治疗对脑缺血再灌注大鼠海马齿状回区巢蛋白表达的影响. *中华物理医学与康复杂志*, 2007, 29; 292-295.
- [9] 狄忠达, 许能贵, 赖新生. 电针督脉对缺血性脑损伤大鼠神经细胞凋亡的影响. *安徽中医学院学报*, 2002, 121; 27-29.
- [10] 何扬子, 韩冰, 胡静, 等. 不同留针时间对针刺治疗缺血性中风疗效的影响. *新中医*, 2005, 37; 58-60.
- [11] 陈元新, 林祥通, 沈冰, 等. 大鼠永久性脑缺血及缺血再灌注后半暗带 caspase3 mRNA 表达变化. *复旦学报*, 2001, 28; 490-493.
- [12] Yang Y, Zhang SM, Fang SY, et al. Role of activation of caspase in cerebral ischemia and reperfusion injury. *Nat Med J*, 2004, 84; 1037-1039.
- [13] 吴伟, 汪洋, 邱阳, 等. 高压氧对持续性局灶性脑缺血细胞凋亡的影响及其作用机制. *中华物理医学与康复杂志*, 2003, 25; 458-461.
- [14] 李琳, 张志强. 脑缺血再灌注损伤中细胞凋亡的研究进展. *中华物理医学与康复杂志*, 2005, 27; 60-62.
- [15] 郁洁, 章薇, 郭卫军, 等. 电针人中穴对大鼠中动脉阻塞大鼠脑神经细胞凋亡及其相关基因表达的干预. *中国临床康复*, 2006, 10; 90-92.
- [16] 马景曦, 罗勇. 电针对大鼠局灶脑缺血再灌注后脑内血管生长因子和血管抑制因子表达的影响. *中国针灸*, 2007, 27; 129-133.
- [17] 黄晓琳, 韩肖华. 电针结合经颅磁刺激对脑缺血大鼠 VEGF164 mRNA 和 CD31 表达的影响. *中华物理医学与康复杂志*, 2006, 28; 10-13.

(修回日期:2008-02-25)

(本文编辑:易 浩)

· 消息 ·

《中华物理医学与康复杂志》再次喜获 “中国科协精品科技期刊工程”项目资助

在日前公布的“中国科协 2008 年精品科技期刊工程资助项目”的评审结果中,《中华物理医学与康复杂志》继 2006 年申报中标之后,再次喜获该项目 C 类资助。

“中国科协精品科技期刊工程”项目始于 2006 年,每年一度进行评审。今年经专家评审委员会初审和终审,全国共有 101 种科技期刊获得资助。其中有 16 种“中华医学会系列杂志”榜上有名。

《中华物理医学与康复杂志》编辑部