

· 基础研究 ·

针刺对脑缺血再灌注损伤后星形胶质细胞增生的影响

宋铁山 周明凤

【摘要】目的 探讨针刺对脑缺血再灌注损伤后星形胶质细胞增生的影响。方法 建立大鼠大脑中动脉阻塞(MCAO)再灌注模型,随机分为对照组、模型组和针刺组,应用免疫组化和免疫印迹方法检测脑缺血再灌注后 2 d 和 7 d 损伤侧海马细胞周期素 D1 和胶质纤维酸性蛋白(GFAP)的表达。结果 脑缺血再灌注后 2 d,损伤侧海马细胞周期素 D1 蛋白表达明显增强,与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.01$),脑缺血再灌注后 7 d,损伤侧海马 GFAP 的表达明显增强,与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.01$);给予针刺治疗后,细胞周期素 D1 蛋白和 GFAP 表达明显减弱,与模型组比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。结论 针刺可抑制胶质细胞增生,从而有可能为神经再生和功能重建提供更有利的生存环境。其机制可能与其调控细胞周期有关。

【关键词】 针刺; 大脑中动脉阻塞; 星形胶质细胞; 细胞周期素 D1; 胶质纤维酸性蛋白

The effects of acupuncture on astrocyte proliferation after cerebral ischemia-reperfusion injury in rats

SONG Tie-shan*, ZHOU Ming-feng. * Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035, China

【Abstract】 Objective To investigate the effects of acupuncture on astrocyte proliferation in hippocampus of rats after cerebral ischemia-reperfusion. Methods Ischemia-reperfusion injury was induced by temporary middle cerebral artery occlusion (MCAO) in 36 Sprague-Dawley rats, who were divided randomly into a control group, a model group and an acupuncture group. The expression level of Cyclin D1 and glial fibrillary acidic protein (GFAP) was analyzed by immunoreactivity and Western blot. Results It was shown that the expression of Cyclin D1 and GFAP increased significantly ($P < 0.01$) at 2 and 7 days after cerebral ischemia-reperfusion, respectively. It was also shown that application of acupuncture could inhibit Cyclin D1 and GFAP ($P < 0.01$). Conclusion Acupuncture may inhibit glial proliferation by regulating cell cycle factor.

【Key words】 Acupuncture; Middle cerebral artery occlusion; Astrocyte; CyclinD1; Glial fibrillary acidic protein

海马与学习、记忆、动机及情绪等功能密切相关。局灶性脑缺血可引起损伤远隔部位的海马出现神经元丢失及神经胶质细胞增生^[1],形成一种类似海马硬化的病理改变。脑缺血后胶质细胞对神经元的营养支持作用主要发生在早期^[2],如释放胶质源性神经营养因子的高峰在缺血后的 6~12 h,而胶质细胞的大量增生却是有害的,其高峰期在缺血后的 1 周,且持续 1~2 个月^[3]。关于针刺对脑缺血的保护作用研究较多,但以前的研究多集中在针刺对神经元本身的保护作用,对胶质细胞的作用研究较少。为此,我们建立大鼠大脑中动脉阻塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)再灌注模型,探讨针刺对海马星形胶质细胞增生的作用及其机制。

材料与方法

一、实验动物分组与造模

1. 动物分组:成年健康雄性 SD 大鼠 36 只,体重为 200~250 g,清洁级,由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供。随机分为对照组、模型组和针刺组,每组 12 只。

2. 脑缺血再灌注模型的建立:参照 Koizumi 等^[4]的方法制作大鼠左侧大脑中动脉阻塞及再灌注模型。采用 10% 水合氯醛(3 ml/kg 体重)麻醉,术中维持动物肛温(36.6 ± 0.5)℃,颈部正中切口,分离并结扎左侧颈总动脉、颈外动脉,注意避免刺激迷走神经。从颈总动脉分叉处插入 4.0 丝线,沿颈内动脉进入距颈总动脉分叉处约 1.8~2.0 cm 略感阻力时停止;30 min 后拔出丝线进行缺血再灌注。术后在约 20℃ 的空调环境下单笼饲养,自由进食、进水。对照组只暴露血管。

二、针刺方法

根据《实验针灸学》^[5]大鼠针灸穴位定位方法及拟人比照法进行穴位定位,选取水沟、内关、曲池、足三里 4 个穴位,直刺进针,提插捻转,4 个穴位交替行针

5 min, 共 20 min, 再灌注后开始, 每天 1 次。对照组及模型组仅作相应时间点捆扎, 不进行针刺。

三、标本采集和处理

分别于再灌注后 2 d 和 7 d 取手术侧脑海马, 每组取 6 只灌注固定石蜡切片作免疫组化, 另 6 只取新鲜脑海马组织, -80°C 冰箱冻存备用进行 Western blot 检测细胞周期素 D1 (Cyclin D1) 和胶质纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP) 表达。

四、神经功能缺损评分

参照 Bederson 等^[6]的评分方法, 分别于再灌注后 2 d 和 7 d 处死大鼠前进行神经功能缺损评分。评分标准: 0 分——无明显神经功能障碍; 1 分——提鼠尾, 前肢不能完全伸直, 持续屈曲; 2 分——脑损伤对侧前肢屈曲, 对侧肩内收但无旋转, 侧推抵抗力弱, 行走偏向一侧; 3 分——脑损伤对侧前肢屈曲、对侧肩内收、扭转、侧推无抵抗力, 一侧旋转行走。

五、免疫组化染色及图像分析

3% H_2O_2 孵育 10 min, 0.01 mol/L 枸橼酸盐缓冲液 (pH 6.0) 中微波修复 ($96 \sim 98^{\circ}\text{C}$) 10 min, 自然冷却至室温。正常血清封闭 30 min, 倾去血清, 滴加 GFAP 兔多克隆抗体, 4°C 孵育过夜。滴加生物素标记的二抗, 室温孵育 60 min; 滴加辣根酶标记的链酶卵白素, 室温孵育 60 min, 二氨基联苯氨 (diaminobenzidine, DAB) 显色, 双蒸水终止显色反应。脱水、透明并封片。常规设立阴性对照。将染色后的涂片放于显微镜下, 对所测细胞通过摄像机将星形胶质阳性细胞转换成数字图像, 转入计算机系统, 然后标定组织片空白处入射光的 OD 值, 最后在监视器上采用不同的分割方法和编辑功能, 计算阳性细胞的平均 OD 值, 其值代表切片中相应抗原性的相对强度。

六、Western blot 检测 Cyclin D1 和 GFAP 表达

依次行海马样品制备、蛋白浓度测定、SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳以及转移电泳, 最后进行化学发光法显影, GFAP 检测过程大致如下: 0.1% TBS 洗 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉封闭 2 h, 1:1000 兔多克隆 Cyclin D1 和 GFAP 一抗 4°C 孵育过夜; 0.1% TBS 洗膜, 1:2000 稀释的 HRP 抗兔二抗室温孵育 1 h, 0.1% TBS 洗 15 min $\times 4$ 次, DAB 显色, 最后在暗室中进行化学发光法显影, 高敏感胶片摄片、洗片。Cyclin D1 蛋白检测过程大致为: 灌制 12% 的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶, 每道上样 40 μg 。按常规方法电泳, 将凝胶上的蛋白转至 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉封闭 1 h 后, 用一抗为鼠抗人 Cyclin D1 单克隆抗体进行孵育, 再用碱性磷酸酶标记的马抗鼠 Ig 孵育, 最后以 NBT 和 BCIP 显色。

七、统计学分析

所有实验数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示。采用 SPSS 13.0 版

统计软件处理。各组组间差异比较采用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、针刺组和模型组脑缺血再灌注后 2 d 与 7 d 的神经功能缺损评分比较

脑缺血再灌注后 2 d 和 7 d, 对照组大鼠未出现任何神经功能缺损体征; 模型组大鼠出现不同程度的神经功能缺损, 针刺组大鼠的神经功能缺损体征相对于模型组有所改善, 但脑缺血再灌注后 2 d 模型组和针刺组之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 脑缺血再灌注后 7 d 针刺组大鼠的神经功能缺损体征明显轻于模型组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 1。

表 1 脑缺血再灌注后 2 d 与 7 d 的神经功能缺损评分比较 ($\bar{x} \pm s$)

组 别	只数	缺血再灌注后 2 d	缺血再灌注后 7 d
模型组	12	2.56 ± 0.36	2.03 ± 0.31^a
针刺组	12	2.24 ± 0.28	1.26 ± 0.45^{bc}

注: 与组内缺血再灌注后 2 d 比较, $^a P < 0.05$, $^b P < 0.01$; 与模型组比较, $^c P < 0.05$

二、脑缺血再灌注 7 d 后 GFAP 免疫组化 OD 值比较

对照组海马可见阳性着色的星形胶质细胞, 其分布较稀疏, 细胞胞体较小, 突起细小。MCAO 再灌注后 7 d 海马存在密集的胞体较大、表面粗糙的星形胶质细胞, OD 值高于对照组, 而针刺组 OD 值低于模型组。详见图 1, 表 2。

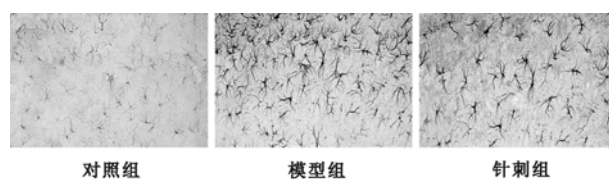


图 1 大鼠脑缺血再灌注后 7 d 损伤侧海马 GFAP 表达 (SP, $\times 400$)

表 2 脑缺血再灌注后 7 d GFAP 免疫组化 OD 值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组 别	只数	GFAP
对照组	6	4.85 ± 1.05
模型组	6	16.24 ± 2.85^a
针刺组	6	9.04 ± 1.42^b

注: 与对照组比较, $^a P < 0.01$; 与模型组比较, $^b P < 0.01$

三、Western blot 检测 Cyclin D1 蛋白和 GFAP 表达比较

Western blot 检测显示出分子量为 34 kU Cyclin D1 蛋白和 50 kU GFAP。模型组 MCAO 再灌注后 2 d, 海马 Cyclin D1 蛋白表达量较对照组明显增加 ($P <$

0.01), 针刺组 Cyclin D1 蛋白表达明显下降 ($P < 0.01$)。模型组 MCAO 再灌注后 7 d, 海马 GFAP 表达量较对照组明显增加 ($P < 0.01$), 而针刺组 GFAP 表达量明显低于模型组 ($P < 0.01$)。详见图 2 ~ 5 及表 3。

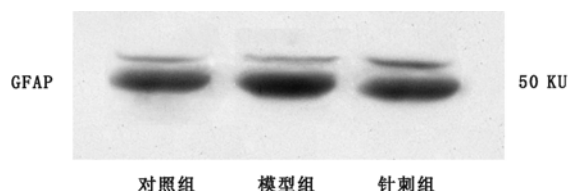
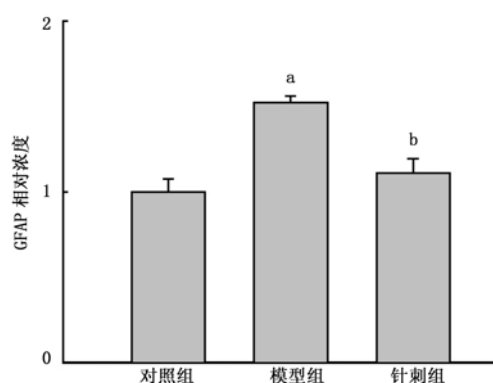


图 2 Western blot 检测大鼠 MCAO 再灌注后 7 d 损伤侧海马 GFAP 表达



注: 与对照组比较, $^a P < 0.01$; 与模型组比较, $^b P < 0.01$

图 3 Western blot 检测大鼠 MCAO 再灌注后 7 d GFAP 定量分析

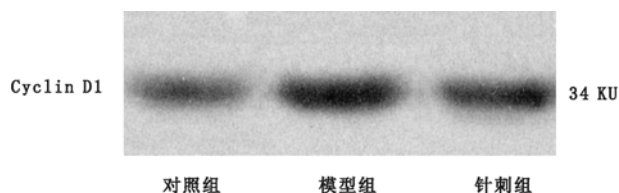
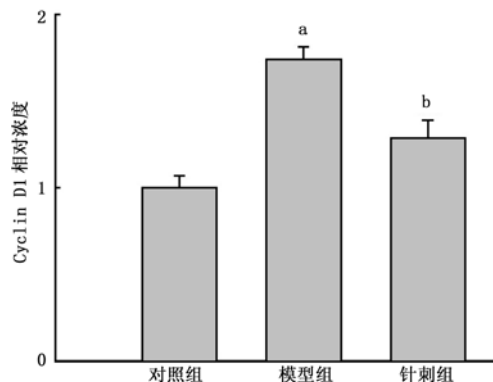


图 4 Western blot 检测大鼠 MCAO 再灌注后 2 d 损伤侧海马 Cyclin D1 蛋白表达



注: 与对照组比较, $^a P < 0.01$; 与模型组比较, $^b P < 0.01$

图 5 Western blot 检测大鼠 MCAO 再灌注后 2 d 损伤侧海马 Cyclin D1 蛋白定量分析

表 3 脑缺血再灌注后 2 d Cyclin D1 蛋白相对浓度和脑缺血再灌注后 7 d GFAP 相对浓度比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	Cyclin D1	GFAP
对照组	6	1.0000 $\pm$ 0.07356	1.0000 $\pm$ 0.08824
模型组	6	1.7397 $\pm$ 0.0917 ^a	1.5172 $\pm$ 0.0386 ^a
针刺组	6	1.2867 $\pm$ 0.1167 ^b	1.1564 $\pm$ 0.1025 ^b

注: 与对照组比较, $^a P < 0.01$; 与模型组比较, $^b P < 0.01$

讨 论

有关研究表明,脑缺血期间缺血边缘区及缺血侧海马大量胶质细胞活化增生,活化的胶质细胞对维持脑微环境以及防止神经元死亡起一定的作用,但过度活化的胶质细胞可以释放有害因子如肿瘤坏死因子、白介素、干扰素^[7]等,导致迟发性神经元死亡。过度增生的胶质细胞尤其是胶质疤痕的形成不仅可影响到神经元轴突的生长、突触的重建及阻断脑组织微循环^[8],而且是癫痫发病的根源,因此胶质细胞对神经元的作用具有双重性。脑缺血后胶质细胞对神经元的营养支持作用主要发生在早期,如释放胶质源性神经营养因子的高峰在缺血后的 6 ~ 12 h,而胶质细胞的大量增生却是有害的,其高峰期在缺血后 1 周,且持续 1 ~ 2 个月。因此,抑制脑缺血后过度的胶质细胞增生成为脑缺血后神经功能重建的重要途径之一。GFAP 是星形胶质细胞中间丝蛋白的主要组成部分,其表达量的增加通常被作为星形胶质细胞在中枢神经系统损伤后活化和增生的标志。Cyclin D1 是真核细胞有丝分裂的重要亚基之一,正向调节细胞周期,推动细胞周期进展。研究表明,脑缺血后 Cyclin D1 蛋白表达升高,其高峰出现在 48 ~ 72 h,此后逐渐下降至正常^[9]。

针刺作为有效的治疗手段,对许多疾病都有显著疗效,在促进内分泌、改善脑循环、镇痛和神经调节中发挥着重要的作用^[10]。研究表明,针刺对脑缺血有保护作用^[11,12]。本研究证实,脑缺血再灌注后大鼠出现明显的神经功能缺损,针刺治疗后神经功能缺损程度明显减轻,说明针刺对脑缺血后神经功能的重建非常有利,与上述的研究结果基本一致。

由于脑缺血后 Cyclin D1 蛋白表达高峰在 48 ~ 72 h,胶质细胞增生高峰在缺血后 7 d,所以本研究检测 Cyclin D1 的时间点选择在缺血后第 2 天,而检测 GFAP 的时间点选择在第 7 天。本研究结果显示,脑缺血再灌注后 2 d Cyclin D1 蛋白表达明显升高,针刺后表达明显降低,表明针刺对细胞周期具有调节作用。脑缺血后 7 d GFAP 表达明显升高,针刺后表达明显降低,表明针刺能抑制胶质细胞增生。细胞的增生离不开细胞周期的推动,由于针刺能抑制脑缺血后 Cyclin

D1 蛋白的表达,因此我们推断针刺对 GFAP 和胶质增生的抑制作用与其对 Cyclin D1 的调控有关,可能通过下调 Cyclin D1 的表达而减少 GFAP 的表达,从而抑制星形胶质细胞增生和胶质增生。但针刺调控 Cyclin D1 蛋白的确切机制尚不清楚,还有待于今后进一步探讨。

本研究结果初步显示,大鼠脑缺血再灌注后,给予针刺治疗可以使 Cyclin D1 蛋白和 GFAP 表达明显降低,促进神经细胞的代偿性恢复,减轻神经功能缺损程度,从而为神经再生和功能重建提供更有利的生存环境。

参 考 文 献

- [1] Butler TL, Kassid CA, Senberg PR, et al. Neurodegeneration in the rat hippocampus and striatum after middle cerebral artery occlusion. *Brain Res*, 2002, 929:252-254.
- [2] Song SJ, Wu GP, Wen SQ, et al. The changes of serum bFGF in patients with acute cerebral infarction and its clinical significance. *Chin J Emerg Med*, 2003, 12:400-402.
- [3] Cheung WM. Changes in the level of glial fibrillary acidic protein (GFAP) after mild and severe focal cerebral ischemia. *Chin J Physiol*, 1999, 42:227-235.
- [4] Koizumi J, Yoshida Y, Nakazawa T, et al. Experimental studies of ischemic brain edema: a new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemia area. *Jpn J Stroke*, 1986, 8:1-8.
- [5] 李忠仁. 实验针灸学. 北京:中国中医药出版社, 2003:327-329.
- [6] Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, et al. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke*, 1986, 17:472-476.
- [7] Loddick SA, Turnbull AV, Rothwell NJ. Cerebral interleukin-6 is neuroprotective during permanent focal cerebral ischemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1998, 18:176-179.
- [8] Zhang ZG, Bower L, Zhang RL, et al. Three-dimensional measurement of cerebral microvascular plasma perfusion, glial fibrillary acidic protein and microtubule associated protein-2 immunoreactivity after emboli stroke in rats: a double fluorescent labeled laser-scanning confocal microscopic study. *Brain Res*, 1999, 844:55-56.
- [9] Li Y, Chopp M, Powers C, et al. Immunoreactivity of cyclin D1/cdk4 in neurons and oligodendrocytes after focal cerebral ischemia in rat. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1997, 17:846-856.
- [10] Jang MH, Shin MC, Koo GS, et al. Acupuncture decreases nitric oxide synthase expression in periaqueductal gray area of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Neurosci Lett*, 2003, 337:155-158.
- [11] 郭壮丽, 裴海涛. 急性脑缺血再灌注大鼠脑内 IL-1 β 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.
- [12] 沐榕, 李菁. 针刺配合康复训练对脑卒中偏瘫患者早期功能恢复的影响. *中华物理医学与康复杂志*, 2006, 28:128-129.

(修回日期:2007-08-27)

(本文编辑:熊芝兰)

· 消息 ·

中华医学会第十次全国物理医学与康复学学术会议征文通知

中华医学会第十次全国物理医学与康复学学术会议定于 2008 年 11 月 7 日至 11 日在广州珠江宾馆召开。本次会议的主题是“继往开来,共创物理医学与康复学新时代”,将邀请国内外著名专家就康复医学领域的热点问题作专题演讲;评选优秀论文;搭建学术平台,交流学科发展思路;举办先进设备展览。本次会议由中华医学会物理医学与康复学分会主办,广东省医学会物理医学与康复学分会承办,诚挚邀请物理医学与康复科、康复医学科、理疗科、骨科、神经内科、神经外科、老年医学科及其它相关学科的医生、治疗师、护士参加。

征文范围:神经系统疾病康复、骨与关节疾病康复、心肺疾病的康复、儿童脑瘫的康复、语言、吞咽与认知障碍的康复;针灸、按摩、各种自然及人工物理因子的应用;疼痛、痉挛的评估与治疗;矫形器的制作与应用等康复实践方面的成功经验;社区康复的理论与实践;学科设置和建设、康复医学教育及康复护理;康复理疗仪器设备的研制与应用等。**征文要求:**论文摘要 1 份,800~1000 字。要求科学性强,数据真实可靠,文字表达准确精炼,稿件请注明单位名称、作者姓名及通讯地址、邮编、E-mail 地址。**文稿格式:**Word 文档格式,文件名以文章题目命名。第 1 行文题,字号为宋体小三加粗,第 2 行作者及工作单位,通讯地址,联系电话及 E-mail 地址,第 3 行论文摘要(包括目的、方法、结果和结论),字号为宋体小 4 号字,“目的”、“方法”、“结果”和“结论”等字加粗。**投稿方式:**请以网上在线方式投稿,投稿网址为 www.capmr.org,或电子邮件投稿,电子邮箱为:zjhong@fimmu.com。邮件主题为“广州全国年会投稿”。非电子邮件投稿恕不接收。**优秀论文:**本次大会将分别设中英文优秀论文一、二、三等奖若干名。参加优秀论文评选的作者报送 4000 字以内中文或英文全文 2 份和电子邮件文稿,来稿注明“优秀论文征文”。**截稿时间:**2008 年 9 月 15 日。**联系人:**广东省医学会物理医学与康复学分会 兰月(医师)13711161667;张建宏(医师)13380092979

中华医学会学术会务部