

· 基础研究 ·

电针对脑缺血再灌注大鼠脑微血管内皮细胞间黏附分子-1 和 P-选择素表达的影响

毛庆菊 李厚秀 孔立红 陈邦国

【摘要】 目的 探讨电针对脑缺血再灌注大鼠脑内微血管内皮组织的保护作用及其相关机制。**方法** 采用大脑中动脉线栓法制备脑缺血再灌注模型,应用免疫组化法观察脑缺血再灌注后及经电针刺激百会、水沟穴对大鼠缺血脑区微血管内皮细胞间黏附分子-1(ICAM-1)、P-选择素(P-selectin)表达水平的影响。**结果** 实验大鼠在脑缺血再灌注后,其缺血侧脑基底核区微血管内皮细胞 ICAM-1、P-选择素表达水平明显增加,与正常组、假手术组比较,差异均有统计学意义($P < 0.01$);电针治疗组大鼠缺血侧脑基底核区微血管内皮细胞 ICAM-1、P-选择素表达水平均较模型组显著降低,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 电针穴位治疗可降低大鼠缺血侧脑基底核区微血管 ICAM-1、P-选择素表达水平;早期电针穴位治疗对脑缺血再灌注损伤具有治疗作用,可能是通过抑制脑缺血再灌注区炎症反应来实现的。

【关键词】 脑缺血再灌注; 电针; 细胞间黏附分子-1; P-选择素; 免疫调节

Effects of electroacupuncture on the expression of microvascular endothelial ICAM-1 and P-selectin in rats with cerebral ischemia-reperfusion MAO Qing-ju*, LI Hou-xiu, KONG Li-hong, CHEN Bang-guo. * Department of Traditional Chinese Medicine, Affiliated Hospital of Wuhan University of Science and Technology, Wuhan 430064, China

【Abstract】 Objective To investigate the protective effects of electroacupuncture on the endothelial tissues of microvessels in the basal ganglia in the rats with cerebral ischemia-reperfusion. **Methods** The MCAO model was established by using Longa's method. The immunohistochemistry SABC (strepto-avidin-biotin-peroxidase complex) method was employed to detect the expression of ICAM-1, P-selectin in the microvessel of rats' ipsilateral basal ganglia. **Results** The number of positive ICAM-1 and P-selectin endothelial cells of model group were significantly increased, as compared to normal group and sham operated group ($P < 0.05$). After electroacupuncture treatment, ICAM-1 and P-selectin immune positive expression were significantly decreased as compared to those of the other groups ($P < 0.01$). **Conclusion** Electroacupuncture might down-regulated the expression of ICAM-1 and P-selectin in the ischemic basal ganglion. The early neuroprotection of electroacupuncture might be through the inhibition of the inflammation reaction after cerebral ischemia.

【Key words】 Cerebral ischemia reperfusion; Electroacupuncture; Intercellular adhesion molecule-1; P-selectin; Immunol regulation

机体脑缺血再灌注损伤机制十分复杂,目前有大量研究表明,炎症反应是造成脑缺血再灌注损伤的主要原因之一。炎症反应的关键步骤之一是白细胞与血管内皮细胞(endothelium cell, EC)黏附、外渗,而这一过程的始动因素部分由位于白细胞与血管内皮细胞表面的细胞间黏附分子及其配基介导,黏附分子在脑缺血后炎症级联反应中具有重要作用^[1],如直接下调或拮抗黏附分子表达均可减轻脑缺血再灌注损伤^[2],故研究黏附分子在脑缺血再灌注中的表达及其作用机制对脑缺血损伤防治具有重要意义。目前研究发现,与脑缺血再灌注损伤有关的黏附分子主要有两类,即选

择素家族和免疫球蛋白超家族,其中以 P-选择素(P-selectin)和细胞间黏附分子-1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)所起的作用尤为重要,P-选择素和 ICAM-1 上调共同参与炎症反应过程,介导白细胞浸润,引起脑缺血再灌注损伤^[3]。本研究采用大脑中动脉阻塞法(middle cerebral artery occlusion, MCAO)制备脑缺血再灌注模型,并同时观察电针刺激百会、水沟穴对其脑缺血再灌注区 ICAM-1、P-选择素表达水平的影响,以探讨电针治疗脑缺血再灌注损伤的可能作用机制。现将结果报道如下。

材料与方法

一、实验材料

共选取健康 SD 大鼠 40 只,雌雄不拘,体重(200 ± 20)g,由湖北中医学院实验动物中心提供。本实验

基金项目:2005 年湖北省教育厅资助项目(D200516003)

作者单位:430064 武汉,武汉科技大学附属医院中医科(毛庆菊);武汉汉口铁路医院眼科(李厚秀);湖北中医学院针灸骨伤系(孔立红、陈邦国)

试剂主要包括:ICAM-1、P-选择素免疫组化试剂盒(北京中山生物技术有限公司提供),多聚甲醛(德国 E·Merk 公司产品)。实验设备包括:日产 Olympus 光学显微镜、电热烧灼器(上海医疗器械厂生产)、日产 Nikon 数码相机、华佗牌 28 号 0.5 寸不锈钢毫针、DM-A 定量电麻仪(北京产)。

二、实验方法

1. 动物分组及处理:按随机分组原则将 40 只大鼠分成假手术组、模型组、电针治疗组及正常对照组,每组各 10 只大鼠。假手术组大鼠于麻醉后切开颈部皮肤、钝性分离肌层,仅分离颈总动脉及颈内动脉至翼腭动脉处;模型组大鼠采用 MCAO 法制备脑缺血再灌注模型,大脑中动脉栓塞时间为 30 min;电针治疗组大鼠采用 MCAO 法制备脑缺血再灌注模型,大脑中动脉栓塞时间为 30 min,分别于再灌注 1 h 及再灌注 23 h 时给予电针刺激;正常对照组大鼠未给予特殊处理。

2. 局灶性脑缺血再灌注模型制备:参照 Longa 等^[4]报道的线栓法并加以改进,栓线采用直径 0.26 ~ 0.28 mm、长度为 6.0 cm 的尼龙鱼线。以 10% 水合氯醛(300 mg/kg 体重)腹腔注射麻醉后进行仰卧位固定,分离并暴露右侧颈总及颈内外动脉,栓线从颈内动脉插入大脑中动脉时遇阻力即停止插入,进线长度约为(18.0 ± 0.5) mm。大脑中动脉栓塞成功的实验大鼠于脑缺血 0.5 h 后拔除尼龙鱼线至颈外动脉残端内进行再灌注,随即缝合切口,将实验大鼠置于室温下禁食、给水喂养。造模后的大鼠于自然苏醒后参照 Zea-Longa^[4]5 级评分标准对其神经障碍程度进行评分,其中 0 级代表无神经功能丧失;1 级代表左前肢不能充分伸展;2 级代表向左侧环行运动,轻度局灶神经功能丧失;3 级代表向左侧倾倒,中度局灶神经功能丧失;4 级代表不能自然行走,重度局灶神经功能丧失。只有神经功能障碍程度在 1 级以上的大鼠才纳入本实验。经严格筛选后,模型组和电针治疗组正式纳入实验的大鼠数量分别有 8,9 只。

3. 电针治疗方法:电针治疗组大鼠选取百会、水沟穴对其进行电针刺激,于脑缺血再灌注 1 h 后针刺第 1 次,取材前 1 h 针刺最后 1 次,电针治疗共 2 次,每次持续刺激 30 min。大鼠取穴标准及针刺深度参照中国针灸学会实验针灸研究会华兴邦等制定的《常用动物腧穴图谱》标准^[5]。选用 28 号 0.5 寸毫针针刺,经刺入两穴后,百会接正极,水沟接负极,采用疏密波,频率 4 Hz/16 Hz,刺激强度从 1 V 开始,每 10 min 增加 1 V,最终刺激强度为 3 V。

4. 标本采集与处理:各组实验大鼠分别于再灌注 24 h 后进行再次麻醉,依次迅速灌注 20 ℃ 生理盐水 200 ml、4℃ 的 4% 多聚甲醛 200 ml[含 0.1% 焦碳酸二

乙酯(diethylpyrocarbonate, DEPC)],随即取脑并对视交叉前、后 2 mm 区域组织行冠状切片,将中间部分脑组织置于 4℃ 的 4% 多聚甲醛固定液中过夜。将固定后的脑组织常规脱水、透明、浸蜡、包埋后行连续冠状石蜡切片,片厚约 5 μm,每隔 10 张取 1 张,在温水中充分展开、贴片。每份标本组织取 4 张切片,分别用于检测 ICAM-1、P-选择素含量。

5. 观察指标检测:采用免疫组化用链酶亲合素-生物素-酶复合物法(strept avidin-biotin-enzyme complex, SABC)检测 ICAM-1、P-选择素在缺血脑组织微血管内皮细胞中的阳性表达。每只实验大鼠各取进行过 ICAM-1、P-选择素反应的不相邻切片 2 张(间隔约 50 μm)。于高倍镜(×400 倍)视野下对切片进行观察,沿右侧大脑基底核区域将胞质中含棕黄色染色颗粒的内皮细胞视为阳性细胞,从阳性细胞丰富处随机选取 8 个非重叠的高倍镜视野,用计算机图像分析仪(HPIAS-1000 型,由华中科技大学同济医学院千屏影像公司出品)对各组动物 ICAM-1、P-选择素反应阳性内皮细胞进行计数,并计算阳性细胞百分率[阳性细胞百分率 = 阳性细胞数/(阳性细胞数 + 阴性细胞数) × 100%]。

三、统计学分析

本研究所得数据以($\bar{x} \pm s$)表示,所有数据经方差齐性检验后,采用单因素方差分析进行统计学比较,选用 SPSS 11.0 版统计学软件进行数据分析, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

结 果

各组大鼠右侧大脑基底核区域微血管内皮细胞 ICAM-1、P-选择素阳性细胞率比较详见表 1。

表 1 各组实验大鼠右侧大脑基底核区微血管内皮细胞 ICAM-1、P-选择素阳性细胞率比较(%, $\bar{x} \pm s$)

组 别	只数	ICAM-1 阳性细胞率	P-选择素 阳性细胞率
假手术组	10	2.56 ± 1.08	4.33 ± 1.15
正常对照组	10	3.28 ± 0.95	3.33 ± 0.89
模型组	8	23.33 ± 3.07 ^a	20.71 ± 2.89 ^a
电针治疗组	9	14.09 ± 3.01 ^{ab}	11.88 ± 3.43 ^{ab}

注:与假手术组、正常对照组比较,^a $P < 0.01$;与模型组比较,^b $P < 0.05$

正常对照组、假手术组大鼠右侧大脑基底核区微血管内皮细胞 ICAM-1、P-选择素阳性表达细胞数量极少(图 1,2),模型组缺血侧脑基底核区微血管内皮细胞 ICAM-1、P-选择素阳性表达细胞数量明显增多(图 3,4),与正常对照组、假手术组比较,差异均具有统计学意义($P < 0.01$),表明实验大鼠在急性脑缺血再灌注后,其缺血侧脑基底核区微毛细血管内皮细胞

ICAM-1、P-选择素表达水平急剧上升。对脑缺血再灌注大鼠进行电针刺激干预,发现其缺血侧脑基底核区微血管内皮细胞 ICAM-1、P-选择素阳性表达细胞数量显著减少(图 5,6),电针治疗组 ICAM-1、P-选择素阳性表达细胞数量与模型组比较,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

讨 论

采用血管内栓线阻断法制备 MACO 大鼠脑缺血模型,是研究局灶性脑缺血最常用的实验方法之一。该模型具有缺血灶恒定、可再灌注、对缺血及再灌注时间易控制、手术损伤小等诸多优点,现已被国内、外研究者广泛采纳并用于脑缺血再灌注等基础研究中。

急性脑血管病属于祖国医学的“中风”病范畴。缺血性脑卒中患者急性期以痰瘀互阻、毒损脑络、气机逆乱、清窍被蒙为病机特点。根据中医急则治其标,缓则治其本的思想,所以在急性期多配合开窍、化痰、通络、清热解毒等法综合治疗患者^[6]。针刺对缺血性脑损伤具有多水平、多通道、多靶点的保护及干预作用。督脉是奇经八脉主体之一,是机体诸阳之总汇,有“总督诸阳”和“阳脉之海”之说,病变在脑、首取督脉为治疗脑缺血性疾病的首选方案^[7]。对清朝以前记载有完整处方的 28 部中医著作研究后发现,在对中风病急性期患者的穴位治疗中,以针刺百会穴位居第一,人中穴位居第二^[8],故本实验采取对百会、水沟穴进行针刺,以观察电针刺激对脑缺血再灌注大鼠缺血脑区黏附分子表达水平的影响。

脑缺血再灌注可加重脑缺血损伤,脑缺血区的炎症反应是再灌注损伤的重要机制之一,而 P-选择素和 ICAM-1 在缺血再灌注损伤后的炎症反应中具有关键作用^[9]。ICAM-1 是机体中最重要的白细胞-内皮细胞间黏附分子之一,ICAM-1 在体内分布范围较广泛,其在血管内皮细胞中的表达最为突出。在正常情况下,内皮细胞表面仅有少量 ICAM-1 黏附分子表达,白细

胞及内皮细胞间的黏附行为很少而且作用时间短暂,不会引发机体病理性损伤;但在脑缺血等病理情况下,ICAM-1 分子的数量和功能均明显上调,一旦缺血区域血流恢复,ICAM-1 即可作为配基与白细胞上的淋巴细胞功能相关抗原-1 (lymphocyte function associated antigen-1, LFA-1) 和巨噬细胞活化趋化因子-1 (Mac-1) 结合,致使大量白细胞与微血管内皮细胞黏附,进而引发一系列病理反应导致再灌注损伤。P-选择素通常表达于活化的血小板和内皮细胞表面,具有介导、活化血小板或促使内皮细胞与中性粒细胞、单核细胞黏附的功能。在机体正常情况下,P-选择素表现为低水平表达或不表达;但在炎症等病理状况下,P-选择素受炎症因子等刺激而呈现高水平表达并参与多种病理过程。P-选择素可以介导脑缺血区血液中白细胞与激活的血管内皮细胞发生反应,并促使其在微血管内皮上滚动,在其它黏附分子的协助下使白细胞穿出血管壁进入脑实质内,导致缺血区脑组织损伤。本研究通过对大鼠 MCAO 缺血再灌注模型进行观察,发现大脑中动脉栓塞和再灌注可使缺血侧脑基底核区微血管内皮细胞 ICAM-1、P-选择素阳性表达显著增加,说明脑缺血刺激了 ICAM-1、P-选择素阳性表达微血管数量的增加,启动黏附因子表达,促进炎症细胞进一步黏附并透过内皮细胞膜进入脑组织,加重脑损伤。而脑缺血再灌注后给予电针干预可明显降低缺血侧基底核区微血管内皮细胞 ICAM-1、P-选择素阳性表达水平,从而减轻 ICAM-1、P-选择素对脑组织的损伤作用,即针刺治疗可能通过下调脑缺血区黏附分子 ICAM-1 和 P-选择素的蛋白表达水平而抑制脑缺血再灌注炎症损伤。这与以往研究结果基本一致^[10-13]。

脑缺血再灌注损伤是一个十分复杂的病理、生理过程,适当的脑保护治疗可以有效提高脑组织对缺血损伤的耐受力。脑缺血再灌注后脑组织局部过度炎症反应是造成脑再灌注损伤的主要原因之一,阻断脑缺血再灌注后的炎症级联反应是改善缺血后脑损伤的理

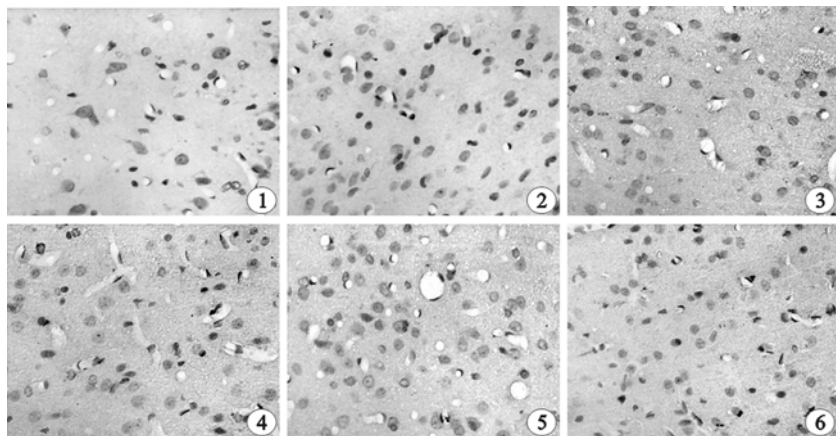


图 1 正常对照组右侧基底核区微血管内皮细胞 P-选择素阳性表达 (SABC 法, $\times 400$); 图 2 假手术组右侧基底核区微血管内皮细胞 ICAM-1 阳性表达 (SABC 法, $\times 400$); 图 3 模型组脑缺血 30 min 再灌注 24 h 后缺血脑区基底核微血管内皮细胞 P-选择素阳性表达 (SABC 法, $\times 400$); 图 4 模型组脑缺血 30 min 再灌注 24 h 后缺血脑区基底核微血管内皮细胞 ICAM-1 阳性表达 (SABC 法, $\times 400$); 图 5 电针治疗组脑缺血 30 min 再灌注 24 h 后缺血脑区基底核微血管内皮细胞 P-选择素阳性表达 (SABC 法, $\times 400$); 图 6 电针治疗组脑缺血 30 min 再灌注 24 h 后缺血脑区基底核微血管内皮细胞 ICAM-1 阳性表达 (SABC 法, $\times 400$)

想策略之一^[14]。当实验大鼠发生脑缺血再灌注后,采用电针穴位刺激能有效降低 ICAM-1 和 P-选择素表达水平,提示电针穴位治疗能抑制炎症黏附分子表达,阻断白细胞在内皮上的聚集与黏附,保护脑血管内皮细胞功能,改善脑缺血再灌注损伤。

参 考 文 献

- [1] Pantoni L, Sarti C, Inzitari D. Cytokines and cell adhesion molecules in cerebral ischemia experimental bases and therapeutic perspective. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1998, 18:503-513.
- [2] Vemuganti R, Dempsey RJ, Bowen KK. Inhibition of intercellular adhesion molecule-1 protein expression by antisense oligonucleotides is neuroprotective after transient middle cerebral artery occlusion in rat. *Stroke*, 2004, 35:179-184.
- [3] 张国红, 王春霖, 吕平, 等. 大鼠局灶性脑缺血再灌注后不同时间 E-选择素、P-选择素和细胞间黏附分子-1 的表达. *中国药理学通报*, 2005, 21:1218-1223.
- [4] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*, 1989, 20:84-91.
- [5] 华兴邦, 李辞蓉, 周浩良, 等. 大鼠穴位图谱的研制. *实验动物与动物实验*, 1991, 15:1-3.
- [6] 马云枝, 武继涛. 活血化瘀法在脑血管病中的应用. *北京中医药大学学报*, 2001, 24:57-59.
- [7] 庞勇, 李保良. 不同穴位治疗缺血性中风的临床研究. *中国针灸*, 2000, 20:69-72.
- [8] 徐以增, 毕臻. 古代中风病针灸文献探讨. *上海针灸杂志*, 1998, 17:42-43.
- [9] 李力仙, 杨忠. 黏附分子与脑缺血再灌注损伤. *国外医学免疫学分册*, 2003, 26:132-134.
- [10] Zhang RL, Chopp M, Zolota C, et al. The temporal profiles of ICAM-1 protein and mRNA expression after transient MCA occlusion in the rat. *Brain Res*, 1995, 682:182-188.
- [11] Suzuki H, Abe K, Tojo S, et al. Postischemic expression of P-selectin immunoreactivity in rat brain. *Neurosci Lett*, 1997, 228:151-154.
- [12] 狄政莉, 万琪, 王洪典, 等. P-选择素在大鼠全脑缺血再灌注微血管内皮细胞损伤中的作用. *卒中与神经疾病杂志*, 2002, 19:194-196.
- [13] 刘玉珍, 韩景献, 姜文, 等. 醒脑开窍针法对脑缺血再灌注后细胞间黏附分子-1 和 P-选择素表达调节的实验研究. *天津中医药*, 2005, 22:462-466.
- [14] 叶心国, 余绍祖, 李承晏. 亚低温对脑缺血再灌注大鼠的 ICAM-1 表达、MPO 活性和脑梗死体积的影响. *中华物理医学与康复杂志*, 2005, 27:442-444.

(修回日期:2007-06-29)
(本文编辑:易 浩)

· 短篇论著 ·

推拿、Maitland 手法及电针联合治疗神经根型
颈椎病的疗效观察

杜广中 卜彦青 张磊

神经根型颈椎病是颈椎病中最常见的类型,约占总数的 60% 以上^[1],有迹象显示其发病率仍在不断上升,已引起人们高度关注。目前临床针对神经根型颈椎病患者的治疗多采用非手术疗法,其中以传统推拿、Maitland 手法及针灸治疗较为常见,已被临床广泛采用,并具有良好疗效;但仍有部分患者经治疗后效果不够理想。为寻求更有效治疗方法,本研究于 2003 年 8 月至 2007 年 4 月间联合传统推拿、Maitland 手法及电针刺激综合治疗神经根型颈椎病患者,并同时与传统推拿配合电针刺激进行疗效对比,发现前者疗效明显优于后者。现将结果报道如下。

一、资料与方法

入选对象均为在本单位针灸推拿科门诊接受治疗的颈椎病患者,共计 271 例,均符合神经根型颈椎病诊断标准^[2]。患者以颈肩背部酸胀痛、一侧或双侧麻木疼痛为主要症状,并经颈椎 CT 或 MRI 检查确诊。将上述患者随机分为 2 组,其中治疗组 142 例,对照组 129 例,采用张鸣生等^[3]介绍的颈椎病临床评价量表对患者入选时状况进行评定,2 组患者性别、年龄、

病程以及颈椎病临床评分结果详见表 1,经统计学分析,组间差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。

表 1 2 组患者一般情况及病情比较

组 别	例数	性别(例)		年龄 (岁, $\bar{x} \pm s$)	病程 (月, $\bar{x} \pm s$)	颈椎病临床 评分(分, $\bar{x} \pm s$)
		男	女			
治疗组	142	57	85	37.9 $\pm$ 12.4	5.3 $\pm$ 4.8	64.37 $\pm$ 8.87
对照组	129	51	78	35.7 $\pm$ 10.6	6.1 $\pm$ 5.3	66.05 $\pm$ 9.32

2 组患者均给予电针穴位治疗,采用华佗牌毫针,取天柱、风池、大椎、肩井、天宗、至阳、手三里、后溪、昆仑、束骨等穴,待针刺得气后接 6805-II 型电针仪,留针 20 min,每天治疗 1 次,每周治疗 6 d,治疗 12 次为 1 个疗程。

治疗组患者同时加用传统推拿与 Maitland 手法治疗^[3],患者取坐位,头稍前屈,医者立于患者侧后方。治疗步骤如下:(1)放松准备,采用 法施于颈项、肩背及患侧上肢等肌肉,从项枕开始, 风府至大椎、风池至肩井、肩髃至外关、肩井至后溪,依次 斜方肌、头最长肌、肩胛提肌、冈上肌及上肢肌群;再用揉法沿上述部位操作 1 遍。两法作用频率均为 60 ~ 90 次/min,力度以患者舒适为度,时间约持续 5 min。(2)分筋点穴,包括:拿法,拿颈椎棘突旁斜方肌、头夹肌群,拿颈侧斜角

作者单位:250012 济南,山东大学齐鲁医院针灸推拿科(杜广中、张磊);山东省中医药研究院(卜彦青)