

· 基础研究 ·

电针对脑缺血再灌注大鼠海马区胰岛素样生长因子-1 表达的影响

孔立红 毛庆菊 陈邦国 金镇国

【摘要】目的 观察电针对大鼠脑中动脉缺血再灌注大鼠缺血脑组织海马区神经细胞凋亡及胰岛素样生长因子-1(IGF-1)的影响。**方法** 采用大鼠脑中动脉线栓法制备大鼠脑中动脉闭塞(MCAO)再灌注模型,分别应用TUNEL染色法、免疫组化法观察脑缺血再灌注及电针对大鼠缺血脑组织海马区神经细胞凋亡及 IGF-1 的影响。**结果** 脑缺血再灌注后大鼠缺血侧海马 CA1 区凋亡细胞数显著增多(模型组与正常组、假手术组比较, $P < 0.01$), IGF-1 阳性表达数目少量增加,胞浆染色呈轻-中度阳性(模型组与正常组、假手术组比较, $P < 0.05$),电针组大鼠缺血侧海马 CA1 区的凋亡细胞数减少, IGF-1 的阳性表达数目增加,胞浆染色呈中-强阳性(电针组与模型组比较, $P < 0.01$)。**结论** 电针可降低大鼠缺血侧海马 CA1 区的凋亡细胞数,增强 IGF-1 的阳性表达;早期电针治疗对脑缺血损害的有效防治作用,可能是通过上调 IGF-1 表达、抑制神经元凋亡的机制实现的。

【关键词】 脑缺血再灌注; 电针; 海马; 凋亡; 胰岛素样生长因子-1

The effects of electroacupuncture on the expression of insulin like growth factor 1 in the hippocampal CA1 region after ischemia-reperfusion KONG Li-hong, MAO Qing-ju, CHEN Bang-guo, JIN Zhen-guo. Hubei College of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430061, China

【Abstract】 Objective To investigate the effects of electroacupuncture on cell apoptosis (CA) and the expression of insulin like growth factor 1 (IGF₁) in the hippocampal CA1 region of rats' brains after cerebral ischemic-reperfusion (CIR). **Methods** Middle cerebral artery obturation (MCAO) was established by the suture embolic method. CA and the expression of IGF₁ in the hippocampal CA1 region were detected by immunohistochemical methods and TUNEL staining, respectively. **Results** Compared with those in the normal and sham operation groups, apoptotic cells were significantly increased in the hippocampal CA1 region of the model group ($P < 0.01$), while the expression of IGF₁ was slightly enhanced and plasma staining was also slightly positive ($P < 0.05$). Apoptotic cells in the CA1 region in the electroacupuncture group were obviously fewer in comparison with the normal group ($P < 0.01$), while the expression of IGF₁ was distinctly increased and the plasma staining was also obviously positive ($P < 0.01$). **Conclusion** Electroacupuncture treatment has preventive and therapeutic effects on ischemia-reperfusion injury, and its mechanism might be related with up-regulating the expression of IGF₁ and inhibiting CA.

【Key words】 Cerebral ischemia; Electroacupuncture; Hippocampus; Apoptosis; IGF₁

脑血管病已成为当今危害人类,特别是中老年人健康的重症疾病之一,在全球已成为第一致残和第三致死原因。由于缺血性脑卒中的发病率远高于出血性脑卒中,因此,研究和防治缺血性脑损伤是基础医学和临床医学的重点。脑缺血缺氧及再灌注损伤后,缺血半暗带迟发性神经元死亡的主要形式是凋亡,抢救“半暗带区”神经细胞,阻断细胞凋亡的发生、发展显得尤为重要。最近越来越多的研究证实,胰岛素样生长因子-1(insulin-like growth factor-1, IGF-1)是神经元的存活因子,IGF-1可抑制细胞凋亡,有助于神经细胞受损后的功能恢复^[1,2]。本研究旨在观察电针对大鼠脑中动脉缺血再灌注大鼠缺血脑组织海马区神经细胞及 IGF-1 的影响。

材料与方法

一、实验材料

健康 SD 大鼠 40 只,雌雄不拘,体重为(200 ± 20)g,由湖北中医学院实验动物中心提供。IGF-1 免疫组化试剂盒(博士德生物试剂有限公司),TUNEL 试剂盒(深圳晶美生物有限公司),多聚甲醛(德国 E·Merk 公司产品),日产 Olympus 光学显微镜,电热烧灼器(上海医疗器械厂),日产 Nikon 数码照相机,华佗牌 28 号 1 寸不锈钢毫针,G6805I 电针治疗仪(苏州产)。

二、实验方法

1. 动物分组:按随机分组原则将 40 只大鼠分成假手术组(大鼠麻醉切开颈部皮肤后,仅分离颈总动脉及颈内动脉至翼腭动脉)、模型组(栓塞 30 min 后再灌注 48 h)、电针组(栓塞 30 min 后再灌注 48 h + 电针治

疗)和正常对照组,每组 10 只。

2. 局灶性脑缺血再灌注模型制备:参照 Longa 等^[3]报道的线栓法,加以改进。栓线采用直径为 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,仰卧固定,分离并暴露右侧颈总及颈内外动脉,栓线从颈外动脉至颈内动脉插入大脑中动脉遇阻即止,进线长度为(18±0.5)mm。栓塞成功的大鼠在缺血 0.5 h 后拔除尼龙鱼线至颈外动脉残端内进行再灌注。缝合切口后,室温下禁食给水喂养。

3. 电针方法:电针组大鼠选取大椎、内关穴进行治疗。取穴标准及针刺深度参照华兴邦等^[4]制定的《常用动物腧穴图谱》标准而定。用 28 号 1 寸毫针针刺,大椎穴与缺血侧(右侧)的内关穴接通 G-6805I 电针治疗仪,采用连续波,频率为 120 次/min,强度为 1 mA,以局部肌肉轻微抖动为度,每次持续刺激 30 min。于缺血再灌注后 3 h 给予第 1 次电针治疗,以后每隔 12 h 再给予电针治疗。

4. 动物筛选:造模后的动物在自然苏醒后,参照 Longa 等^[3]的 5 级评分标准对其神经障碍进行评分:0 级——无神经功能丧失;1 级——左前肢不能充分伸展;2 级——向左环行运动,轻度神经功能丧失;3 级——向左侧倒,中度神经功能丧失;4 级——不能自然行走,重度神经功能丧失。

神经功能障碍在 1 级以上的大鼠被保留。经过筛选后,模型组和电针组保留的动物数量分别为 8 只与 9 只。

5. 标本采集与处理:各组大鼠分别于再灌注 48 h 后再次麻醉,依次迅速灌注 20℃ 生理盐水 200 ml、4℃ 4% 多聚甲醛 200 ml[含 0.1% 焦碳酸二乙酸(diethylpyrocarbonate, DEPC)],迅速取脑,以视交叉和其后 4 mm 处两点冠状切片,置于 4℃、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,切成 5 μm 厚的连续冠状石蜡切片,每隔 10 张取 1 张,在温水中充分展开,贴片。每份组织取 4 张切片,行原位细胞凋亡检测(TDT-mediated DUTP nick end labeling, TUNEL)和 IGF-1 染色各 2 张。

6. 指标检测及方法:分别采用 TUNEL、免疫组化[链酶亲合素-生物素-酶复合物(strept avidin-biotin-enzyme complex, SABC)]法检测 IGF-1。每只动物各取进行过 TUNEL 和 IGF-1 反应的不相邻切片 3 张(间隔 50 μm)。在 400 倍的高倍视野下,沿缺血侧大脑海马区域,以阳性染色的单个神经细胞作为阳性细胞,于阳性细胞丰富处随机选取 8 个非重叠的视野,用计算机图像分析仪(HPLAS-1000, 华中科技大学同济医学院千屏影像公司产)对各组 TUNEL 染色阳性、IGF-1 反应阳性细胞计数(镜下神经细胞细胞核中有棕色颗粒者为阳

性),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%]。进行阳性细胞计数并测定其灰度,取其平均值。

三、统计学分析

所有数据经方差齐性检验后,用方差分析进行统计学处理。实验结果用($\bar{x} \pm s$)表示,所有数据均输入计算机,以 SPSS 11.0 版软件统计包处理。

结 果

各组大鼠缺血侧海马凋亡细胞阳性率、IGF-1 阳性细胞率比较见表 1。

表 1 各组大鼠缺血侧海马凋亡细胞阳性率、IGF-1 阳性细胞率比较(%, $\bar{x} \pm s$)

组 别	只数	平均凋亡率	IGF-1
假手术组	10	10 ± 1.89 *	12.48 ± 1.42 *
模型组	8	92 ± 10.51 #△	18.52 ± 1.10 ▲
电针组	9	36 ± 4.72 ☆	36.32 ± 1.68 ☆
正常对照组	10	7 ± 1.54	13.26 ± 1.34

注:与正常对照组比较,* $P > 0.05$,* $P < 0.01$,▲ $P < 0.05$;与假手术组比较,△ $P < 0.01$;与模型组比较,☆ $P < 0.01$

正常组对照、假手术组大鼠海马 CA1 区有极少量凋亡细胞(图 1,2),模型组缺血侧大鼠海马凋亡细胞散布于整个海马 CA1 区内(图 3),电针组与正常对照组、假手术组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$),其缺血侧大鼠海马 CA1 区可见较多凋亡细胞(图 4),电针组与模型组相比,差异有统计学意义($P < 0.01$)。正常对照组和假手术组大鼠海马 CA1 区有少量 IGF-1 弱阳性表达(图 5,6),模型组 IGF-1 阳性表达数目少量增加,但胞浆染色呈轻-中度阳性(图 7),与假手术组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);电针治疗后,IGF-1 阳性表达数量增多,胞浆染色呈中-强阳性(图 8),与模型组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$)。

讨 论

急性脑血管病属于祖国医学“中风”病的范畴。缺血性脑卒中急性期以痰瘀互阻、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,缓则治其本的理论,在急性期,多配合开窍、化痰、通腑及清热解毒等法综合治疗^[5]。对于这些治法,不同的医家,不同的时期也各有侧重。针刺对缺血性脑损伤具有多水平、多通道、多靶点的保护和干预作用。根据祖国医学的经理理论,督脉是人体诸阳之总汇,有“总督诸阳”和“阳脉之海”之说,《难经·二十八难》:“督脉者,起于下极之俞,入属于脑”,“病变在脑,首取督脉”为治疗脑缺血性疾病的首选^[6]。“腧穴所在,主治所在”,大椎穴在第 7 颈椎棘突下,位近于头部,是手足

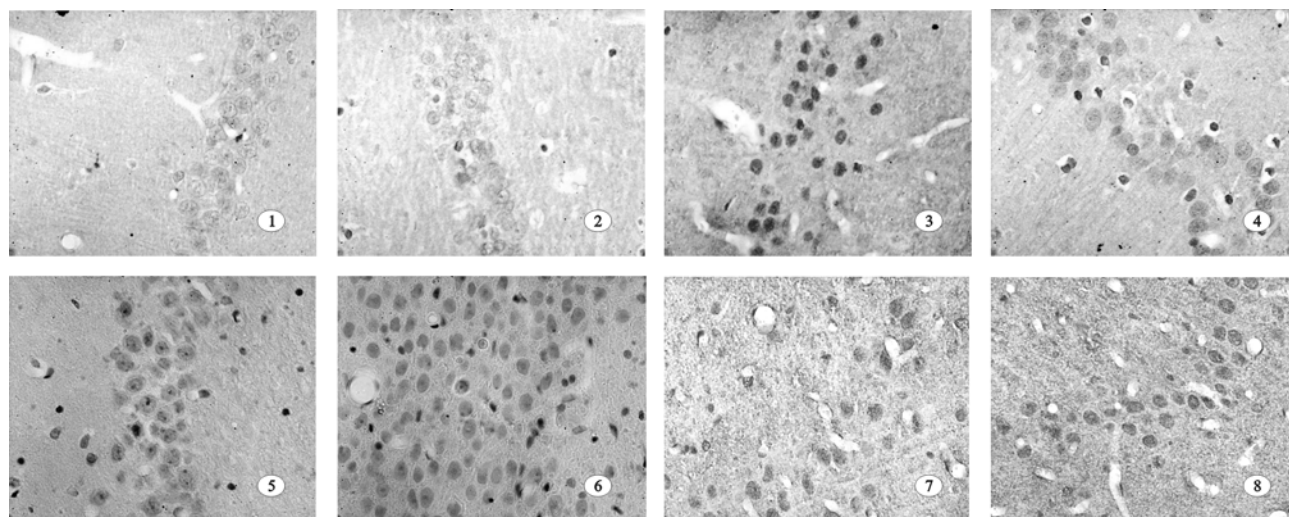


图1 正常对照组海马 CA1 区凋亡细胞(TUNEL, $\times 400$); 图2 假手术组海马 CA1 区凋亡细胞(TUNEL, $\times 400$); 图3 模型组脑缺血 30 min 再灌注 48 h 后缺血侧海马 CA1 区凋亡细胞(TUNEL, $\times 400$); 图4 电针组脑缺血 30 min 再灌注 48 h 后缺血侧海马 CA1 区凋亡细胞(TUNEL, $\times 400$); 图5 正常对照组海马 CA1 区 IGF-1 阳性细胞(SABC, $\times 400$); 图6 假手术组海马 CA1 区 IGF-1 阳性细胞(SABC, $\times 400$); 图7 模型组脑缺血 30 min 再灌注 48 h 后缺血侧海马 CA1 区 IGF-1 阳性细胞(SABC, $\times 400$); 图8 电针组脑缺血 30 min 再灌注 48 h 后缺血侧海马 CA1 区 IGF-1 阳性细胞(SABC, $\times 400$)

三阳、督脉的交会穴,故针刺大椎穴可激发六阳经和督脉之经气,使气血流畅,上行于脑,而发挥疏通脑络、开启脑窍的作用。现代医学研究表明,督脉分布于脑脊髓沿线,故对督脉穴位的刺激可能较易影响中枢神经的活动。内关穴属手厥阴心包经“络穴”,又属“八脉交会穴”,针刺此穴可起到宽胸利气,宁心安神的作用^[7]。局部解剖学研究表明,内关穴附近有正中神经通过,有学者在通过对内关穴形态学的研究后发现,“内关”穴的传入神经元主要为 $C_6 \sim T_1$ ^[8]。而支配颅内血管的植物神经(交感神经)也起源于 $C_8 \sim T_1$ 或 T_{1-2} 的侧角,通过交感干,在颈上神经节交换神经元,发出节后纤维^[9]。因此,内关穴调整脑血流的途径可能是通过正中神经来影响支配颅内血管的植物神经的功能而实现。现代实验研究证实,内关和督脉经穴相配(如“醒脑开窍”针法)对局灶性脑缺血实验动物模型有很好的神经保护作用。根据以上分析,大椎穴属于督脉、内关穴为手厥阴心包经“络穴”,两穴配合,起到调心通督、疏理经络、醒脑开窍作用。在急性脑缺血再灌注损伤的针灸治疗中,针刺大椎、内关穴可发挥疏通脑络、开启脑窍的作用,并显示出穴位的特异性。

局灶性脑缺血再灌注后细胞凋亡的发生是多因素介导的。IGF-1 是一种含 70 个氨基酸的多肽,该多肽早先被认为是“生长介素 C”。在生理条件下,IGF-1 及其受体广泛分布于中枢神经系统;在病理条件下,IGF-1 表达上调,并可能通过促分裂原活化蛋白激酶和磷脂酰肌醇 3-激酶/丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶等信号通路,抑制细胞凋亡、调节离子通道活性、抑制一氧化氮毒性

等多种途径发挥神经保护作用^[10]。神经细胞的存活主要受靶细胞或靶组织产生的营养因子的调控,一方面,对神经元起着营养、再生及保护作用;另一方面,抑制神经元的降解。不管是外源性还是内源性的神经生长因子,对神经元存活的作用都很重要。本研究结果表明,脑缺血再灌注后海马 CA1 区的神经元凋亡数目显著增多,IGF-1 阳性表达不明显,给予电针治疗后,海马 CA1 区的神经元凋亡数目减少,且 IGF-1 阳性表达增强,从而提示 IGF-1 是通过抑制海马区细胞凋亡而实现抗脑缺血再灌注损伤。这与以往的文献报道一致^[11,12]。

脑缺血损伤后的细胞死亡同时存在细胞坏死和凋亡两种病理表现形式,因此早期采取有效措施,可能会挽救一部分凋亡细胞,减少神经元死亡,减轻症状,降低脑血管疾病神经系统后遗症发生率。

参 考 文 献

- 1 张鸿,郑东明,赵冬雪,等. 胰岛素样生长因子-1 对大鼠局灶性脑缺血再灌注后神经细胞凋亡及 bcl-2、Bax 蛋白表达的影响. 陕西医学杂志,2004,33:867-871.
- 2 陈红辉,孙圣刚,童萼塘. 胰岛素样生长因子-1 与缺血性脑血管病. 国外医学神经病学神经外科学分册,2001,28:262-265.
- 3 Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. Stroke, 1989, 20:84-91.
- 4 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,1991,1:1-3.
- 5 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.
- 6 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.
- 7 王振龙. 头针体针结合治疗脑性偏瘫 70 例报告. 甘肃中医,1994,

- 7:44.
 8 陶之理. 穴位形态学的研究及进展. 针刺研究, 1989, 5:397-402.
 9 江西中医学院, 主编. 人体解剖组织胚胎学. 上海: 上海科学技术出版社, 1979. 349.
 10 韩彩萍, 胡长林. 胰岛素样生长因子-1 的神经保护作用. 国外医学脑血管疾病分册, 2005, 13:46-49.
 11 刘宗超, 王慕一. 胰岛素样生长因子-1 对局灶性脑缺血再灌注损伤

- 保护作用的研究. 中风与神经疾病杂志, 2002, 19:43-44.
 12 沈顺姬, 张淑琴, 陈嘉峰, 等. 大鼠局灶性脑缺血损伤中 IGF-1 mRNA 表达. 中风与神经疾病杂志, 2003, 20:327-329.

(修回日期: 2006-06-09)

(本文编辑: 松 明)

· 短篇论著 ·

穴位注射并微波疗法治疗贝尔氏面瘫的疗效观察

张群 李谨 彭先兵 戴润芝

周围性面瘫临床上较为常见, 患者表现为同侧面部所有表情肌弛缓性瘫痪, 其中以贝尔氏面瘫 (Bell's palsy) 最为多见, 为原发性周围性面瘫, 约占周围性面瘫患者总数的 80%^[1]。我科于 2002 年 3 月至 2005 年 3 月间, 对 24 例贝尔氏面瘫患者采取药物结合穴位注射及微波治疗, 取得较好疗效。现报道如下。

一、资料与方法

共选取在本科接受治疗的贝尔氏面瘫患者 46 例, 所有患者均排除因外伤、肿瘤压迫、代谢障碍或中毒等因素而导致的周围性面瘫, 其中男 26 例, 女 20 例; 年龄 13~61 岁, 平均 38.2 岁; 病程 1~30 d, 平均 4.5 d; 右侧面瘫 19 例, 左侧面瘫 27 例。患者临床表现为患侧面部表情运动丧失, 额纹消失, 不能皱眉与闭目, 鼻唇沟变浅, 口角向下垂向健侧呈歪斜状, 鼓腮漏气, 进食可有口角漏液现象。将上述患者分为治疗组 (24 例) 与对照组 (22 例), 2 组患者性别、年龄、病程及临床表现间差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 具有可比性。

对照组单纯采用药物治疗, 给予类固醇激素、血管扩张剂、B 族维生素及抗病毒药物治疗。治疗组患者在上述药物治疗的同时, 还给予穴位注射及微波治疗, 具体方法如下: 用 5 ml 注射器抽取维生素 B₁ 注射液 100 mg、维生素 B₁₂ 注射液 500 μg, 取患侧颊车、地仓、迎香、廉泉、翳风穴, 进针至有酸麻感后, 各注入药液约 0.8 ml; 然后采用珠海产 EBH-IV 型耳鼻喉科微波治疗仪进行治疗, 微波频率 2 450 MHz, 输出功率选择 20~30 W, 将直径 160 mm 的圆盘形辐射器置于患侧面颊部及耳后乳突区各 15 min, 辐射器距离皮肤大约为 1~2 cm, 每日治疗 1 次。2 组患者均以 10 d 为 1 个疗程, 连续治疗 2 个疗程。

疗效评定标准如下: 痊愈——症状及体征消失, 面肌运动功能正常; 显效——症状及体征明显改善, 面部静止时外观正常, 运动时有轻微功能障碍; 有效——面部运动功能部分恢复, 面部外观仍不对称, 但较治疗前有所减轻; 无效——症状及体征均无改善。

本研究采用 χ^2 检验对 2 组患者疗效进行比较, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

二、结果

2 组患者分别经 2 个疗程治疗后, 其疗效结果详见表 1。表中数据显示, 治疗组总有效率为 100%, 对照组为 81.8%, 2 组患者总有效率经统计学分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 即治疗组疗效明显优于对照组。

表 1 2 组患者疗效比较 (例, %)

组别	例数	痊愈	显效	有效	无效	总有效率
治疗组	24	18 (75.0)	5 (20.8)	1 (4.2)	0	24 (100.0) *
对照组	22	4 (18.2)	9 (40.9)	5 (22.7)	4 (18.2)	18 (81.8)

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$

三、讨论

虽然贝尔氏面瘫的病因目前还不十分清楚, 但学者们多认为与血管痉挛导致的缺血性神经病变、病毒感染、自身免疫性反应及内分泌紊乱等因素有关^[2]。临床研究发现, 较多病例发病前均受过风寒刺激, 可能系局部营养神经血管受风寒而痉挛, 导致面神经缺血而发病; 另外还有部分患者有病毒感染史 (如患流感、腮腺炎等)。总之, 无论是缺血、炎症或自身免疫等因素均可使面神经组织水肿, 进而导致面部表情肌瘫痪而出现功能障碍。

选择适当穴位注射维生素 B₁ 及 B₁₂, 可营养其患侧面神经, 调节神经功能, 增强面肌纤维的收缩力, 改善面神经和面部表情肌的营养状况, 有利于面神经功能恢复, 促使面瘫症状早日消失。本研究采用的微波频率为 2 450 MHz, 波长为 12.25 cm, 该微波对人体主要产生非热生物学效应 (即在人体不感觉到热量的情况下发挥其治疗效用), 能改善机体微循环, 提高组织修复能力, 达到消肿止痛、促进炎症消散的目的^[3]。有研究认为, 微波可能是通过抑制炎症介质合成与分泌或减少炎性细胞浸润及促进炎性细胞凋亡来实现抗炎作用的^[4]。微波作用于周围面神经组织, 可增强神经肌肉的电兴奋性, 促进周围神经功能修复, 增强机体免疫力, 促使面瘫症状早日缓解。

综上所述, 穴位注射并微波疗法治疗贝尔氏面瘫, 其疗效明显优于单纯药物治疗, 可缩短疗程、提高疗效, 值得临床推广、应用。

参 考 文 献

- 田勇泉, 孙爱华. 耳鼻喉-头颈外科学. 北京: 人民卫生出版社, 2004. 391-392.
- 王海波, 冯红云, 樊北民, 等. I 型单纯疱疹病毒致小鼠面神经麻痹的实验性研究. 中华耳鼻喉头颈外科杂志, 2006, 41: 13-16.
- Kolosova LI, Akoev GN, Arelev VD, et al. Effect of low-intensity millimeter wave electromagnetic radiation on regeneration of the sciatic nerve in rat. Bioelectromagnetics, 1996, 17: 44-47.
- 陈景藻. 现代物理治疗学. 北京: 人民军医出版社, 2000. 193-194.

(收稿日期: 2006-01-22)

(本文编辑: 易 浩)

作者单位: 442000 十堰, 郧阳医学院附属人民医院耳鼻喉科