

· 论 著 ·

电针对脑局部缺血再灌流大鼠分泌型
磷脂酶 A₂ 的影响

张树三 武凡

【摘 要】 目的 探讨电针在脑损伤时对脑细胞凋亡和分泌型磷脂酶 A₂ (secretory phospholipase A₂, sPLA₂) 及其相关介质的影响。方法 采用线栓法制成大脑中动脉缺血再灌注 (middle cerebral artery ischemia reperfusion, MCA-IR) 模型, 用 HE 染色和 TUNEL 法观察脑细胞形态学变化, 用免疫组化法检测 sPLA₂ 在脑细胞中的表达, 用 [³H] 标记大肠杆菌为底物以及用 ELISA 法分别检测血清中 sPLA₂ 活性和 TNF- α 、PGE₂ 水平。结果 在大鼠 MCA-IR 脑损伤时, 电针能明显降低脑细胞凋亡与坏死, 同时也可显著降低血清中 sPLA₂、TNF- α 、PGE₂ 水平及 sPLA₂ 在脑细胞中的表达, 与对照组比较, 差异有显著性意义 ($P < 0.01$)。结论 电针对脑损伤有良好的保护作用, 其机理在于抑制 sPLA₂ 的活性、蛋白表达及相关介质水平。

【关键词】 电针; 缺血性脑损伤; 分泌型磷脂酶 A₂

The effect of electroacupuncture on secretory phospholipase A₂ in rats with ischemic cerebral injury ZHANG Shusan*, WU Fan. * Department of Imaging Physics, Changzhi Medical College, Changzhi 046000, China

【Abstract】 Objective To explore the effect of electroacupuncture on cerebral apoptosis, secretory phospholipase A₂ (sPLA₂) and related mediators. Methods Thread occlusion technique was used to make models of middle cerebral artery ischemia-reperfusion (MCA-IR), apoptosis was measured by TUNEL staining method, while the sPLA₂ activity was detected by use of E. coli membrane labelled by [³H] oleic acid. The level of TNF- α and PGE₂ were detected by ELISA test. sPLA₂ protein expression was measured by immunohistochemistry. Results In contrast to control group, electroacupuncture inhibited the cerebral apoptosis and necrosis, it also remarkably inhibited the expression level of sPLA₂, TNF- α and PGE₂ in rats with ischemic cerebral injury. Conclusion Electroacupuncture has a good protective effect on MCA-IR injury of rats, which may be attributed to the decrease of sPLA₂, TNF- α , PGE₂ level and the expression of sPLA₂ protein.

【Key words】 Electroacupuncture; Ischemic, cerebral injury; Secretory phospholipase A₂

局灶性脑缺血特别是大脑中动脉阻断 (middle cerebral artery occlusion, MCAO) 为临床最常见的缺血性脑血管疾病。实验表明针刺可减轻脑组织损伤^[1], 但目前对其机理的研究主要集中在抗自由基损害, 降低一氧化氮合酶表达等方面^[2], 有关针刺对分泌型磷脂酶 A₂ (secretory phospholipase A₂, sPLA₂) 及其相关介质的影响则鲜见报道。Arai 等^[3]认为 sPLA₂ 在脑缺血后的病理变化中起着重要作用。本实验试图通过制作大鼠大脑中动脉闭塞再灌流模型, 从形态学、血清学的角度观察 sPLA₂ 及其相关介质的标志物与脑细胞损害的关系, 并在此基础上探讨电针 (electroacupuncture, EA) 刺激督脉穴位对脑缺血再灌流脑损伤的保护作用及其相关机理。

材料与方法

一、动物及分组

作者单位: 046000 长治, 山西长治医学院影像物理室 (张树三), 生化室 (武凡)

雄性 Wistar 大鼠共 42 只, 平均体重 (250 $\pm$ 20) g, 随机分为 7 组, 每组 6 只, 即缺血 (I) 0.5 h 后再灌 (R) 4 h、12 h、24 h (即 I 0.5 h/R 4 h、I 0.5 h/R 12 h、I 0.5 h/R 24 h) 共 3 个组及相应的施加电针 (EA) 组 (即 I 0.5 h/R 4 h + EA、I 0.5 h/R 12 h + EA、I 0.5 h/R 24 h + EA) 共 3 个组和假手术对照组。

二、大脑中动脉闭塞灌流模型的制作

采用线栓法^[4]制成大鼠大脑中动脉闭塞模型。大鼠用水合三氯乙醛 (350 mg/kg, ip) 麻醉后, 仰卧位固定。取颈正中切口, 分离左侧颈总动脉、颈内动脉、颈外动脉。结扎并剪断颈外动脉, 并将头端涂有聚胺酯、直径为 0.25 mm 的尼龙线栓插入, 自颈内动脉入颅并到达大脑前动脉起始处, 阻断自颈内动脉和大脑前动脉流向大脑中动脉的血流。术后大鼠苏醒时出现右前肢屈曲和前进时右侧划圈症状, 证明左侧大脑中动脉阻塞成功。然后再拔出线栓使栓子头部退到颈外动脉残留盲端, 这样即可使大脑中动脉继续从 Willis 环获得供血, 又不致影响同侧颈内动脉供血。栓子平均插入深度为 (20 $\pm$ 0.5) mm, 假手术组插入栓子为

15 mm,其余步骤同上。电针各系列组在阻塞大脑中动脉 0.5 h 后持续施加电针 0.5 h,穴位为督脉穴“人中”、“百会”。电针采用疏密波,疏波频率 4 Hz,密波频率 20 Hz,刺激强度 3 mA。

三、主要试剂

细胞凋亡原位检测试剂盒购自 Boehringer Mannheim 公司,TNF- α ELISA 试剂盒购自第四军医大学免疫学教研室。PGE₂ ELISA 试剂盒购自苏州医学院血栓教研组,sPLA₂ 单克隆抗体由 Lisa A Marshall 教授 (Smithkline Beecham Co. USA) 惠赠,[³H] 油酸购自 Amersham,USA。

四、标本收集

1. 大脑标本采集:各组大鼠于再灌时间结束时处死,假手术组于实验进行约 3 h 后处死。取其脑组织,用 4% 的多聚甲醛缓冲液灌注固定脑组织,自额极至枕叶分为 A、B、C、D、E 共 5 等份,各组均取脑 B 冠状脑片做各种检测。供 TUNEL 检测的标本放入 4% 多聚甲醛液中做石蜡包埋;供 sPLA₂ 免疫组化检测的标本取下后立即行冰冻切片。

2. 血清标本采集:I 0.5 h/R24 h 组及 I 0.5 h/R24 h + EA 组大鼠在大脑中动脉阻塞 0.5 h,再灌 0.5 h、3 h、12 h、24 h 后分别行尾静脉取血,收集血液,分离血清,置 -20℃ 环境中保存。

五、TUNEL 原位杂交

脑片常规脱蜡脱水处理后,将切片放入 0.3% H₂O₂/甲醛以阻断内源性过氧化物酶 (peroxidase, POD),用通透液 (0.1% Triton X-100/0.1% 柠檬酸) 处理后,分别加入 TUNEL 混合液、荧光素抗体-POD 溶液孵育,DAB 显色。TNF- α 用双抗体夹心 ELISA 法测定。PGE₂ 用竞争夹心 ELISA 法测定。

六、sPLA₂ 的测定及免疫组化检测

参照文献制备由 [³H] 油酸标记的大肠杆菌为 sPLA₂ 底物的方法^[5],取过夜培养的 JM109 大肠杆菌,以 1:20 稀释后继续振荡培养 1 h,加入 [³H] 油酸以及 Brij-35 使两者终浓度分别为 50 μ ci/ml 和 1 mg/ml,经继续培养、高压灭菌、加含叠氮钠的缓冲液防腐,以 10⁶ cpm/20 μ l 分装,此为 sPLA₂ 的底物。取 20 μ l 底物和 10 μ l 血清加入到 165 μ l 测定缓冲液中混匀,置 37℃ 水浴液振荡 15 min,加入 2 mol/L 的 HCl 100 μ l 及 200 mg/ml 的无脂酸牛血清蛋白 100 μ l。置冰水浴 20 min 后,1 000 rpm 离心 5 min,取上清液 100 μ l 加闪烁液 6 ml,避光静置 12 h,作液闪记录。sPLA₂ 单位定义:以每升样品 37℃ 每分钟催化水解 1 nmol 磷脂量为 1 个单位。

sPLA₂ 免疫组化检测采用的脑片厚度为 6 μ m,脑片采用 S-P 免疫细胞化学染色法。加入 1:50 sPLA₂

单克隆抗体,1:50 的生物素标记二抗,1:200 的辣根酶标记的链霉卵白素,DAB 显色,苏木素复染。

七、统计学分析

试验所得数据用 ($\bar{x} \pm s$) 表示。应用 SPSS 8.0 统计软件进行单因素多组间方差分析,相关分析用 Pearson's r 检验。将原位杂交和免疫组化的切片用 CM-2000 彩色医学图像系统分析,用 (目标总个数/mm²) 表示。

结 果

一、针刺督脉对 MCA-OR 大鼠脑细胞凋亡的影响

假手术组偶见 TUNEL 阳性细胞。缺血 0.5 h 再灌 4 h 可见凋亡细胞出现在纹状体、海马和大脑皮质,再灌 12 h 时阳性细胞开始增多,再灌 24 h 时凋亡细胞数处于高峰 (见图 1)。针刺督脉能明显降低各相应时相组大脑的凋亡细胞数 (见图 2)。

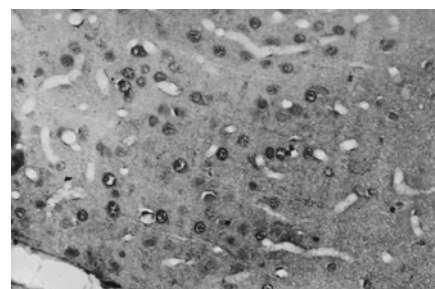


图 1 缺血 0.5 h 再灌 24 h 大鼠大脑皮质的凋亡细胞 ($\times 400$)

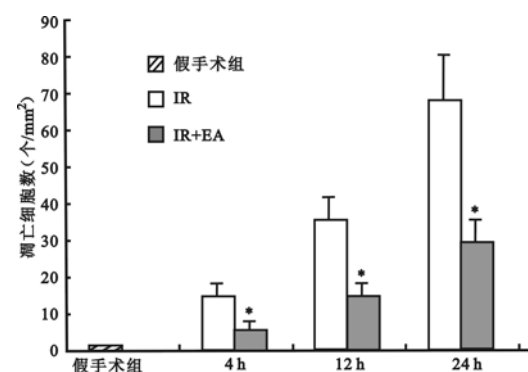


图 2 针刺督脉对 MCA-OR 大鼠大脑皮质凋亡细胞的影响
注: * 与 IR 组比较, $P < 0.01$

二、针刺督脉对 MCA-OR 大鼠血清中 TNF- α 、sPLA₂ 和 PGE₂ 的影响

大鼠血清 TNF- α 水平在缺血 0.5 h 再灌 0.5 h 时开始明显升高,12 h 达高峰,持续到 24 h;sPLA₂ 的活性在再灌 3 h 开始明显上升,12 h 达高峰,PGE₂ 水平的升高与 sPLA₂ 几乎同步 (见表 1)。针刺督脉能明显抑制相应各时相点大鼠血清 TNF- α 、sPLA₂、PGE₂ 水平,如缺血 0.5 h 再灌 24 h 时的上述血清指标比较见表 2。

表 1 IR 组大鼠血清 TNF- α 、sPLA₂ 和 PGE₂ 水平的时相性变化($\bar{x} \pm s, n=6$)

指 标	0 h	0.5 h	3 h	12 h	24 h
TNF- α (pg/ml)	10.5 $\pm$ 3.2	52.7 $\pm$ 9.8	91.2 $\pm$ 14.5	141.8 $\pm$ 26.2	136.4 $\pm$ 32.5
sPLA ₂ (μ /L)	42.5 $\pm$ 8.5	45.3 $\pm$ 7.9	75.8 $\pm$ 14.2	148.5 $\pm$ 28.9	143.4 $\pm$ 27.3
PGE ₂ (pg/ml)	213.4 $\pm$ 37.4	522.9 $\pm$ 83.2	614.9 $\pm$ 103.2	850.6 $\pm$ 128.9	840.5 $\pm$ 175.5

注: TNF- α 水平与 sPLA₂ 活性的相关性比较, $r=0.947, P<0.01$; sPLA₂ 活性与 PGE₂ 水平的相关性比较, $r=0.962, P<0.01$

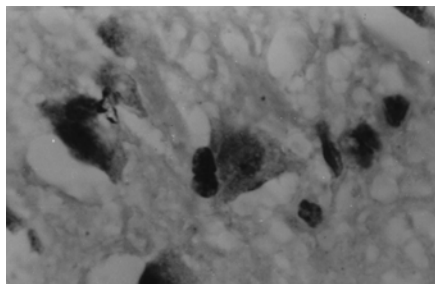
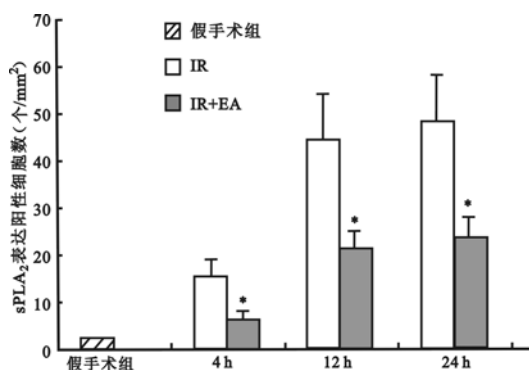
表 2 针刺督脉对缺血 0.5 h 再灌 24 h 大鼠血清 TNF- α 、sPLA₂ 和 PGE₂ 水平的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

组 别	TNF- α (pg/ml)	sPLA ₂ (μ /L)	PGE ₂ (pg/ml)
假手术组	11.5 $\pm$ 4.8	38.4 $\pm$ 7.2	210.5 $\pm$ 39.8
I0.5h/R24 h	136.4 $\pm$ 32.5 *	143.4 $\pm$ 27.3 *	840.5 $\pm$ 175.5 *
I0.5 h/R24 h + EA	51.2 $\pm$ 13.4 Δ	67.4 $\pm$ 10.1 Δ	341.8 $\pm$ 86.4 Δ

注: 与假手术组比较, * $P<0.01$; 与 I0.5 h/R24 h 组比较, $\Delta P<0.01$

三、针刺督脉对 sPLA₂ 蛋白表达的影响

假手术组大鼠切片可见少量 sPLA₂ 蛋白表达。缺血 0.5 h 再灌 4 h 时可见蛋白表达明显增加, 再灌 12 h, 表达处于高峰, 在大脑皮层及海马可见大量 sPLA₂ 阳性细胞, 持续到 24 h 仍不减低(见图 3)。针刺督脉能明显抑制各相应时相组 sPLA₂ 的蛋白表达(见图 4)。

图 3 缺血 0.5 h 再灌 24 h 大鼠皮质 sPLA₂ 蛋白表达($\times 400$)图 4 针刺 MCA-OR 大鼠督脉对 sPLA₂ 蛋白表达的影响

注: * 与 IR 组比较, $P<0.01$

讨 论

Bonfoco 等学者^[6]认为, 凋亡在脑缺血再灌注后的迟发性神经元死亡中扮演重要角色^[6], 对凋亡的干预可为缺血性脑血管疾病的防治提供新的思路。本资料显

示, 在大鼠脑梗死 0.5 h 再灌 4 h 时, 凋亡细胞出现在纹状体、海马及大脑皮质周围, 再灌 12 h 时凋亡细胞迅速增加, 24 h 后整个大脑中动脉供血区均有散在的凋亡细胞, 提示细胞凋亡参与脑梗死的扩散, 支持 Sahuquillo 等^[7]的观点。针刺督脉穴“人中”、“百会”能明显降低各相应缺血再灌注组凋亡细胞的数量, 为治疗创造机会。

TNF- α 是一个重要的细胞因子, 它直接参与缺血后脑组织损害过程。本实验观察到大鼠缺血 0.5 h 再灌 0.5 h 时血清 TNF- α 明显升高, 12 h 达到高峰并进入平台期, TNF- α 的产生早于凋亡细胞的产生并与凋亡细胞的高峰期几乎同步出现, 提示 TNF- α 与细胞凋亡有密切关系。针刺督脉能明显抑制血清 TNF- α 水平, 提示其减少细胞凋亡的可能机制是抑制 TNF- α 水平。

相关分析表明, TNF- α 水平的升高与 sPLA₂ 活性的增加有密切关系($r=0.947, P<0.01$), 而且 TNF- α 升高在前, 提示 TNF- α 可激活 sPLA₂, 支持 Ogawa^[9]的观点。脑组织含有大量磷脂成分, 而 sPLA₂ 是水解细胞膜磷脂的关键酶。神经细胞磷脂水解可释放大量的花生四烯酸(arachidonic acid, AA)。AA 在脂氧酶作用下合成白三烯(LT), LT 可活化蛋白酶 C, 进而诱导凋亡。因此, sPLA₂ 参与了脑细胞凋亡的产生。AA 则在环氧酶作用下合成前列腺素, 其中 PGE₂ 和 PGI₂ 能扩张小血管, 增加脑血管壁的通透性, 加速脑水肿形成。sPLA₂ 还可催化血小板激活因子的生成, 进一步增加脑血管通透性和激活凝血过程, 加重脑损伤^[10]。在本实验中观察到大鼠缺血再灌 0.5 h 时 sPLA₂ 开始增加, 12 h 达高峰, PGE₂ 的升高与 sPLA₂ 几乎同步, 且两者密切相关, 提示 sPLA₂ 对脂类介质的产生有重要意义。当细胞损害尚未导致信号传递网络完全破坏时, 细胞可通过凋亡而主动死亡, 而持续的 sPLA₂ 增高可导致膜脂成分过度降解而发生结构与功能的破坏。有文献报道, 脑缺血再灌流生物膜损伤是迟发性神经元死亡的重要原因^[7]。这提示 sPLA₂ 在缺血再灌脑损伤中起重要作用, 因而对 sPLA₂ 的抑制将是抗脑细胞损伤的关键环节。我们首次观察到针刺督脉能明显抑制缺血再灌注导致的 TNF- α 、sPLA₂、PGE₂ 水平的增高, 从而可能降低缺血再灌流对脑组织的损伤。在本实验中, 观察到 sPLA₂ 蛋白表达和 sPLA₂ 活性几乎同步增加, 均于缺血再灌 4 h 后增多, 在 12 ~ 24 h 进入高峰。sPLA₂ 的免疫组化检测阳性可说明脑细胞中含有

sPLA₂ 是 sPLA₂ 存在的部位。针刺督脉抑制 sPLA₂ 的表达将有助于减少 sPLA₂ 的损害作用,为防治脑血管疾病提供新的思路。

参 考 文 献

- 1 罗勇,董为伟.电针上调大鼠局灶性脑缺血再灌注时脑组织抗凋亡基因 bcl-2 蛋白表达.中华物理医学与康复杂志,2000,22:53.
- 2 陈志强,耿雅萍,张吉,等.电针对脑局部缺血再灌注损伤大鼠自由基的影响.中国针灸,1998,77:409-412.
- 3 Arai K, Ikegaya Y, Nakatani Y, et al. Phospholipase A₂ mediates ischemic injury in the hippocampus; a regional difference of neuronal vulnerability. Eur J Neuro Sci, 2001, 13: 2319-2323.
- 4 Laing RT, Jakubowski J, Laining RW. Middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats; which method works best? Stroke, 1993, 24: 294-298.
- 5 武凡,康格非,蒋纪恺.膜联蛋白 V 流式细胞术在肝细胞损害研究中的应用.中华肝病杂志,2001,9:24-26.
- 6 Bonfoco E, Krainc D, Ankarcrona M, et al. Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. Proc Natl Acad Sci, 1995, 92: 7126-7131.
- 7 Sahuquillo J, Poca MA, Amoro S. Current aspect of pathophysiology and cell dysfunction after severe head injury. Curr Pharm Des, 2001, 7: 1475-1503.
- 8 李力仙,张宇阳,戴钦舜,等.肿瘤坏死因子与脑创伤.国外医学免疫学分册,1999,22:326-328.
- 9 Ogawa M. Phospholipase A₂: basic and clinical aspect in inflammatory disease. Prog Surg Basel Karger, 1997, 24: 1-7.
- 10 Yang HC, Mosior M, Johnson CA, et al. Group-specific assays that distinguish between the four major types of mammalian phospholipase A₂. Anal Biochem, 1999, 269: 278-288.

(收稿日期:2002-03-13)

(本文编辑:易浩)

· 短篇报道 ·

臂丛神经阻滞配合手法治疗 126 例肩周炎患者的体会

张景萍 胡洁 茹群

我院自 1992~1996 年期间对 126 例肩周炎患者采用臂丛神经阻滞配合手法治疗,取得了良好疗效。现报道如下。

126 例患者中,均临床诊断为肩周炎,其中男 34 例,女 92 例,年龄 40~72 岁,以 50 岁左右居多。病史 3 个月~2 年,平均 1.2 年。

先采取臂丛神经阻滞治疗,嘱患者仰卧,头稍偏向健侧,手臂贴于体旁,手尽量下垂,显露患侧颈部,在前、中斜角肌间沟进针,注入浓度为 1% 利多卡因与 0.25% 布比卡因混合液 10 ml,观察 10 min,待患肢及肩部麻木无痛感时,行手法治疗。第一步:嘱患者仰卧,术者立于患侧,一手卡住患肩的肱骨头,向下作节律性按压,每秒 2 次,持续 4~5 min;第二步:患者侧卧位,患肢向上,术者立于患者背后,一手卡住肩胛骨的关节孟端,另一手握住患肢腕部,向患者背后扳拉,治疗节律、时间同第一步;第三步:患者取侧卧位,患肢向上,术者立于患者背后,一手握住患肢肘部,另一手卡住患肩,术者用力使肩关节作旋转运动,治疗时间为 4~5 min;第四步:患者取俯卧位,术者立于患肢侧,对患肢的冈上肌、冈下肌、大圆肌、小圆肌及三角肌作按摩,使肩部肌肉逐步放松,治疗持续 5~10 min。每 4 d 1 次,每次按上述步骤依次治疗,5 次为 1 个疗程。多数患者经 1~2 个疗程后治愈。在治疗期间,并嘱患者每天自行进行上举、内收、外展及后伸锻炼,有利于巩固疗效。

疗效评定标准^[1]:痊愈—肩关节疼痛消失,肩关节活动正常;显效—肩关节疼痛基本消失,外展、内收、上举活动基本恢复正常,但后伸活动稍受限,能坚持工作;有效—肩部疼痛减

轻,关节活动范围较前增加,但活动受限;无效—症状、体征均无改善。

经过 1~2 个疗程治疗后,对 126 例患者进行疗效评定,其中痊愈占 82 例,显效占 26 例,有效占 13 例,无效占 5 例,有效率为 96%。

讨论 肩关节主要受腋神经和肩胛上神经支配,而肩关节周围布满了丰富的自主神经纤维,因此较容易引起反射性的血运障碍,形成所谓的“疼痛-肌肉缺血-疼痛”之恶性循环^[2]。而神经阻滞治疗是缓解疼痛的一种有效方法,能够有效阻断疼痛的神经传导通路,进而阻断由疼痛引发的恶性循环^[3]。而经肌间沟入路的臂丛神经阻滞疗法,其优点在于能用小剂量的局麻药就可阻滞上臂及肩疼痛感^[4],解除肌肉痉挛,使手法治疗能在无痛及肩关节周围肌肉充分松弛的条件下进行,患者无痛苦,容易接受;同时,术者也可适当地加大手法力度,增加活动度数,有利于松解粘连的关节囊及肌键等,促进局部血液循环及炎症的消退,使肩关节功能恢复正常。

参 考 文 献

- 1 邵木全.注射疗法配合手法治疗肩周炎 300 例.按摩与导引,1997,6:8.
- 2 李仲廉,主编.临床疼痛治疗学.天津:天津科学技术出版社,1995. 246-247.
- 3 刘俊杰,赵俊,主编.现代麻醉学.北京:人民卫生出版社,1998. 1433.
- 4 刘俊杰,赵俊,主编.现代麻醉学.北京:人民卫生出版社,1998. 604.

(收稿日期:2002-07-08)

(本文编辑:易浩)