

# 电针对局灶性脑缺血再灌注大鼠血中 EPCs 含量及其神经功能缺损程度的影响<sup>※</sup>

● 李梦瑶<sup>\*</sup> 李向荣<sup>▲</sup> 高琼珏 刘 恋

**摘要** 目的:观察电针四关穴对局灶性脑缺血再灌注大鼠血中 EPCs 含量及其神经功能缺损程度的影响。方法:将 120 只 SD 大鼠随机分成正常组、假手术组、模型组及电针组,每组划分成 24h、48h 和 72h 三个亚组,各 10 只。模型组及电针组用线栓法建立大脑中动脉局灶性脑缺血再灌注模型。电针组各亚组在造模成功后即刻行电针四关穴干预(疏密波,20min/次),48h 组在 24h 再次电针干预,72h 组在 24h 和 48h 各电针干预 1 次。在相应时间点采集抗凝腹主动脉血分离单个核细胞,用流式细胞术检测其表型标记为 CD34<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup> 细胞的 EPCs 含量。各组均在造模后即刻、24h、48h 和 72h 按 Longa 评分进行神经功能评分。结果:造模后 24h,电针组 Longa 评分有所下降,与模型组比较无明显差异( $P>0.05$ ),模型组血中 EPCs 含量较其它各组显著增加( $P<0.01$ )。造模后 48h,电针组 Longa 评分较模型组明显降低( $P<0.05$ ),其血中 EPCs 含量较其它各组明显增加( $P<0.01$ )。72h 时,电针组 Longa 评分较模型组明显降低( $P<0.05$ ),其血中 EPCs 含量与正常组及假手术组比较无明显差异( $P>0.05$ ),而模型组仍高于其它各组( $P<0.01$ )。结论:电针四关穴能让局灶性脑缺血再灌注大鼠内源性 EPCs 含量增加,并能促进恢复其神经功能,其作用机理有待进一步深入研究。

**关键词** 脑缺血再灌注 电针 内皮祖细胞 神经功能缺损

目前,针灸调控内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)以修复损伤血管及促进血管再生已成为缺血性脑血管病治疗的热点之一。通过利用电针动员骨髓中的内源性 EPCs 迁移入血、归巢至缺血性卒中后的脑损伤区域,从而促进血管新生,继而改善血供,可能成为一条保护缺血脑组织并促进其神经功能恢复的新手段。本文将就电针与脑缺血再灌注损伤后机体内 EPCs 含量及神经功能

缺损程度的关系进行初步探索。

## 1 材料与方 法

**1.1 动物来源** 健康 SD 雄性大鼠 150 只,湖南中医药大学动物实验中心提供(SPF 级),大鼠许可证号 0617462。购买回来严格按照规则适应性饲养 1 周,饲养温度 20~25℃,湿度 50%~70%,体重 250~300g,鼠龄 9 周,自由摄食饮水。

### 1.2 造模

**1.2.1 造模方法** 将禁食 24h

(不禁水)的大鼠参照改良 Longa 线栓法制备左侧大脑中动脉局灶性脑缺血再灌注模型大鼠模型:①称重并腹腔注射 10%的水合氯醛(350mg/kg)麻醉;②仰卧固定后颈部消毒,正中切开钝性分离后暴露左侧颈总动脉,将颈内动脉、颈外动脉及翼腭动脉分离;③结扎颈总和翼腭动脉,从颈外动脉处将预备的线栓插入颈内动脉,在进深至大脑中动脉的起始端时,当插入约(18.5±0.5)mm 时遇阻力则止,在用颈外动脉挂线结扎固定后缝合伤口,造成左侧大脑中动脉供血区的局灶性缺血;④缺血 2h 后,将栓线拔出建立缺血-再灌注模型。将术后老鼠放置在干燥清洁的加热垫上,

※基金项目 湖南省科技厅资助项目(No. 2013109)

\* 作者简介 李梦瑶,女,医学硕士。研究方向:针灸治疗脑病的研究。

▲ 通讯作者 李向荣,男,主任医师,医学硕士,硕士研究生导师。研究方向:针灸治疗脑病的研究。E-mail:txmm819@sohu

• 作者单位 湖南中医药大学第二附属医院脑病科(410005)

室温控制在 26 ~ 30℃。

1.2.2 模型成功标准 待大鼠完全清醒后,参照经典 Zea - Longa 评分标准(5级4分法)进行神经功能评分:0分(不存在偏瘫肢体功能缺失);1分(不能完全伸展右前肢);2分(爬行时向右侧转圈,追尾);3分(爬行时向右侧倾倒);4分(不能自主行走,或伴有意识障碍)。

评分为 1 ~ 3 分为成功模型,入选实验。如果术中出血量大、出现呼吸异常、蛛网膜下腔出血或大鼠还未到时间点提前死亡者剔除,并将相应只数补足。

1.3 分组及处理方法 本实验采用先造模后分组的方法,随机抓取大鼠后用蓝色记号笔在鼠尾标记数字,用随机数字表进行分组,随机分成正常组、假手术组、模型组及电针组,每组划分成 24h、48h 和 72h 三个亚组,每组 10 只。均在造模后即刻、24h、48h 和 72h 进行神经功能评分并在造模后 24h、48h 和 72h 分别采集腹主动脉血。

A. 正常组:予常规饲养,不做任何处理。

B. 假手术组:分离颈部动脉,不插栓线、不结扎,在将切口缝合后,将其同期同步进行饲养;该组不行电针治疗,仅与电针组同时捆绑在鼠板上 20min。

C. 模型组:在造模后只与电针组同时捆绑于鼠板上 20min 而不行电针治疗。

D. 电针组:电针组在大鼠未清醒时选取大鼠四关穴行针刺后接电针干预。三个亚组均在造模后即刻电针干预 1 次,48h 组在造模后 24h 再次电针干预 1 次,72h 组在造模后 24h 及 48h 再次电针干预 1 次。

1.4 选穴依据 四关一词始于

《灵枢·九针十二原》,明代徐凤《针灸大全》注曰:“四关者占,五脏有六腑,六腑有十二原,十二原出于四关,太冲、合谷是也。”第一次将四关定位为太冲、合谷。太冲为足厥阴肝经的原穴。古文有云:“诸风掉眩,皆属于肝”,治疗中风病,应从肝论治,因其病位在脑,而太冲穴所在的足厥阴经是唯一一条循行于头部的阴经,肝脑相通,故刺激该穴可推动全身气血运行,平调阴阳寒热虚实,起到醒神开窍,痛经活络的作用。合谷是手阳明大肠经的原穴,是脏腑原气经过和留止的穴位,在穴性上,合谷穴可补可散,益气升阳,行气散滞,开窍启闭,镇惊安神,可用于厥证、脱证、闭证等急症。太冲、合谷两穴升降相宜,气血相依,脏腑相合,阴阳相配,此乃一组治疗中风病的经典绝妙配穴。

1.5 治疗方法 用华佗牌 0.25mm × 13mm 毫针在四关穴(两侧的“合谷”穴及“太冲”穴)进针 3mm 后连接华佗牌电针治疗仪(“太冲”接负极,“合谷”接正极,)以疏密波(电流强度 1mA,频率为 2/15Hz)持续刺激 20min。穴位的选取参照李忠仁主编的《实验针灸学》及华兴邦主编的大鼠穴位图谱<sup>[1]</sup>。

### 1.6 试剂及仪器

1.6.1 主要试剂 FITC 标记的小鼠抗大鼠 CD34 (AbD serotec),小鼠 VEGFR - 2 单克隆抗体 (Abcam),阴性对照小鼠 IgG - FITC 及 PE 标记的羊抗鼠 IgG (晶美生物);淋巴细胞分解液、4% 多聚甲醛、2% 小牛血清及 PBS 磷酸盐缓冲液(长沙骏宏)。

1.6.2 主要仪器 FC - 500 流式细胞仪(美国贝克曼公司);高速低温离心机 1 - 14 型(德国 Sigma 公司);南京前沿仪器设备有限公司

生产纯水仪;平安医械生产的真空肝素钠抗凝管;冰箱 BCD - 218A/B(海尔股份有限公司);移液器(芬兰 DRAGON 公司);华佗牌 0.25 × 13mm 毫针及 SDZ - V 型电针仪(苏州医疗用品有限公司)。

### 1.7 检测步骤

1.7.1 血样的采集 在完成规定时间的治疗观察后,重新依据上述实验方法在造模后的 24、48 和 72h 分别对各组动物进行麻醉后的固定。每个时间点正常组与假手术组及模型组与针刺组同时剖腹分离腹主动脉,用肝素钠抗凝管采集腹主动脉血 3ml,做好时间及代号标记后放置在 4℃ 冰箱内保存待分离。

1.7.2 血样的分离 ①先取淋巴细胞分离液放入灭菌管中;②按照 1:1 比例将腹主动脉血与注射用生理盐水混匀后添置到淋巴细胞分离液的液面上;③以 400g (1500 转/分)的速度,15cm 水平转子为半径离心配平好的标本 20 分钟;④离心取出弃血浆层,取乳白色环状的淋巴细胞层放到含有 2% 小牛血清 100μl + PBS5ml 的普通试管中,充分混匀后再以同样速度离心 20 分钟;⑤4% 多聚甲醛固定经 2 次反复清洗离心后所得沉淀;⑥ - 20℃ 冰箱中保存,最长可达 1 个月。

1.7.3 EPCs 检测前准备 ①加抗体孵育以确定方案:标记 4 只管,管 1 和管 2 中各取 90μl 解冻后标本放入,后将 KDR 抗体及 CD34 抗体各 5μl 添入管 1 中,同时将二种抗体的同型对照各 5μl 添入管 2 中;管 3 和管 4 中各取 95μl 解冻后标本,后在管 3 中添入 CD34 抗体 5μl,在管 4 中添入 KDR 抗体 5μl。②确定检测方案后,将两只标记好的管中各加入打散后标本 90μl,管 1 再分别取 KDR 及 CD34 两种抗体各 5μl,管 2 再取二种抗体的同型对

照各 5 $\mu$ l 加入,混匀后避光孵育约 30 分钟~1 小时。③重悬:孵育后两管均加入 PBS600 $\mu$ l 充分混匀,再次等速等时离心,弃上清液后加 4% 多聚甲醛重悬,最后以 4 $^{\circ}$ C 保存待测。

1.7.4 EPCs 检测 采用流式细胞仪检测 CD34 + /KDR + 细胞表达双阳性的细胞,即被标记为 EPCs。

1.8 统计学处理 所有数据由 SPSS17.0 统计软件统计分析,以  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义标

准。计量资料均以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,所有数据先进行正态性检验和方差齐性检验,当满足正态性及方差齐性时,选用单因素方差分析分析同一个时间点各组的组间差异,继之以 LSD 检验。

## 2 结果

2.1 神经功能评定结果 脑缺血再灌注后即刻模型组、电针组神经功能缺损评分明显高于假手术组 ( $P < 0.01$ );造模后 24h,电针组神经功能缺损评分有所下降,与模型

组比较无统计学意义 ( $P > 0.05$ );造模后 48h,电针组神经功能缺损评分降低,与模型组相比,其差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ );72h 时,电针组神经功能缺损评分降低,与模型组相比,其差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。说明造模后大鼠出现不同程度神经功能缺损的表现,而在造模后 48h 和 72h 电针组大鼠的神经功能恢复程度及其活跃性均优于模型组,提示电针四关穴可以促进脑缺血损伤后大鼠神经功能缺损的恢复。见表 1。

表 1 各组大鼠不同时间神经功能缺损评分比较(分,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	0h	24h	48h	72h
假手术组	0.21 $\pm$ 0.04	0.21 $\pm$ 0.04	0.21 $\pm$ 0.04	0.21 $\pm$ 0.04
模型组	2.58 $\pm$ 0.13 *	2.47 $\pm$ 0.11 *	2.33 $\pm$ 0.13	2.28 $\pm$ 0.11
电针组	2.53 $\pm$ 0.13 *	2.35 $\pm$ 0.14 *	2.12 $\pm$ 0.14 $\blacktriangle$	1.99 $\pm$ 0.13 $\blacktriangle$

注: \* 与假手术组比较,  $P < 0.01$ ;  $\blacktriangle$  与模型组比较,  $P < 0.05$ 。

2.2 治疗后外周血中 EPCs 含量的变化 每 100 个细胞中 EPCs 的个数为 EPCs 所占的百分比,造模后 24h,模型组血中 EPCs 含量显著增加,相较于其它各组,其差异有显著统计学意义 ( $P < 0.01$ )。

造模后 48h,电针组血中 EPCs 含量明显增加,相较其它各组,其差异有显著统计学意义 ( $P < 0.01$ )。造模后 72h 时,电针组血中 EPCs 含量和正常组及假手术组比较其

差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ),而模型组仍高于其它各组 ( $P < 0.01$ )。说明电针四关穴能在大鼠脑缺血损伤后 48h 更明显促进其 EPCs 含量增加。见表 2。

表 2 各组大鼠不同时间外周血 EPCs 含量变化比较(% ,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	24h	48h	72h
正常组	2.67 $\pm$ 0.20	2.60 $\pm$ 0.16	2.62 $\pm$ 0.17
假手术组	2.20 $\pm$ 0.95	2.80 $\pm$ 0.77	2.57 $\pm$ 0.08
模型组	5.27 $\pm$ 0.23 *	3.52 $\pm$ 0.12	4.35 $\pm$ 0.07 *
电针组	2.77 $\pm$ 0.13	4.80 $\pm$ 0.08 *	2.62 $\pm$ 0.13

注: \* 与同时段其它组比较,  $P < 0.01$ 。

## 3 讨论

缺血性脑卒中的发病率逐年上升且日益年轻化,严重影响了个人及家庭的身心健康。研究表明,及早改善缺血区域的血供是治疗缺血性脑血管病的关键。而促进脑缺血后半暗带区脑组织的血管新生及其侧支血管的形成,从而改善其血供,

可能成为一种保护缺血的脑组织和促进其神经功能恢复的新手段<sup>[2]</sup>。研究证实,在急性的缺血性脑卒中发生后 48h,其外周血中 EPCs 的数量和其神经功能缺损的严重程度呈负性相关<sup>[3-5]</sup>。因此,通过动员与增殖骨髓内的 EPCs 并将其迁移入血、归巢到缺血性卒中后的脑损伤区域,可促进血管新生、建立缺血区

侧支循环,这将可能成为一种改善脑组织供血与促进恢复其神经功能的新手段。

针灸疗法治疗缺血性卒中历史悠久,其中电针疗法可通过发挥多环节、多水平、多途径的调节作用来治疗缺血性卒中,作为一种传统的非药物治疗方法在防治缺血性卒中方面独具优势<sup>[6-7]</sup>。研究发现脑梗

死患者的肢体运动功能、神经功能缺损程度及日常生活活动能力能通过针刺治疗得以明显改善<sup>[8-10]</sup>。电针可使缺血性卒中缺血半暗带区内微血管数明显增多,促进血管新生,增加血氧供应,达到治疗缺血性卒中的目的。足厥阴的原穴太冲和手阳明的原穴合谷穴即为四关穴,两穴升降相宜,气血相依,脏腑相合,阴阳相配,此乃一组经典绝妙配穴。针刺双侧合谷和太冲穴可以通过交感神经来调节大脑血管管径,使脑血流的阻力降低,从而改善颅内血液循环<sup>[11-12]</sup>。针刺四关穴能有效地使中风患者的日常生活能力及质量得以改善,同时有益于患者更好的回归于社会<sup>[13]</sup>。

本研究立于观察电针四关穴对局灶性脑缺血大鼠血中 EPCs 含量及其神经功能缺损程度的影响,从结果中我们不难看出,通过针刺治疗后,电针组大鼠的神经功能恢复程度及其活跃性均优于模型组;而外周血中 EPCs 的含量在脑缺血损伤后均有所增加,然而再灌注后

48h,经电针干预后其 EPCs 含量明显高于模型组。结果证明电针四关穴不仅可以促进脑缺血损伤后大鼠神经功能缺损的恢复,亦能促进其外周血中 EPCs 含量增加,二者呈正相关。同时结果也显示,电针组 24h 和 72h 时血中 EPCs 含量低于模型组,且与正常组和假手术组无明显差异,其机理尚未明确,有学者研究提出这可能与损伤早期机体内的炎症反应及 VEGF 的表达有关,有待于进一步深入研究和阐明。

### 参考文献

[1] 华兴邦,李辞蓉,周浩良,等.大鼠穴位图谱的研制[J].实验动物与动物实验,1991,1:1.  
 [2] 战梅,尤艳利,周爽.针灸促缺血性脑血管病血管新生的作用及机制研究[J].医学信息,2011,24(3):1206-1207.  
 [3] 路敬叶,周广喜,牛荣东,等.急性脑缺血大鼠外周血 EPCs 研究[J].中国现代神经疾病杂志,2009,9(3):280-283.  
 [4] Chu K, Jung KH, Lee ST, et al. Circulating endothelial progenitor cells a new marker of endothelial dysfunction or repair in acute stroke[J]. Stroke,2008;39:1441-1447.  
 [5] Sobrino T, Hurtado O, Moro MA, et al. The

increase of circulating endothelial progenitor cells after acute ischemic stroke is associated with good outcome[J]. Stroke,2007;38:2759-2764.

[6] 周元成,吴新贵,肖贻财.电针刺“足三里”和“内关”对脑梗死大鼠运动功能及脑组织病理学的影响[J].中国临床新医学.2010,3(5):431-435.  
 [7] 王艳艳,李常新,牛小媛.电针对脑梗死大鼠神经功能及胶质纤维酸性蛋白表达的影响[J].中西医结合心脑血管病杂志.2012,10(10):1222-1224.  
 [8] 高琼琬.醒神启闭针刺法对脑梗死患者血中 EPCs 含量及其神经功能缺损程度的影响[D].长沙:湖南中医药大学,2014.  
 [9] 李梦瑶.醒神启闭针刺法配合归经温胆汤对脑梗死患者血中 EPCs 含量及患肢运动功能的影响[D].长沙:湖南中医药大学,2014.  
 [10] 高琼琬.醒神启闭针刺法对脑梗死急性期患者的影响[J].世界中医药,2016,11(4):580-582.  
 [11] 段方胜,吴钢,郑依勇,等.针刺四关穴对头痛患者脑血流动力学的影响[J].上海针灸杂志,1996,15(2):5.  
 [12] 杨波,张晓君,潘洪涛.针刺四关穴对颈内动脉血管阻力指数及血流量的影响[J].针灸临床杂志.1997,13(4):44-45.  
 [13] 王东岩,冯丽媛,董旭,等.合谷刺动作针法对脑卒中后腕背伸功能重建的研究[J].中医药信息.2011,8(1):88-89.

## 中医文化

### “医贵乎精,学贵乎博”

“医贵乎精,学贵乎博,识贵乎卓,心贵乎虚,业贵乎专,言贵乎显,法贵乎活,方贵乎纯,治贵乎巧,效贵乎捷。知此乎,则医之能事毕矣。”

这段话,见于清代同治、光绪年间名医赵濂(字竹泉)的《医门补要》,是对中医在业务上提出的标准和要求,也是作为一名良医所应具备的条件。“医贵乎精,学贵乎博”,是强调要精通医术,博览群书,博通古今。“识贵乎卓,心贵乎虚”,是说医生在学习中要认真思考,增强辨识、分析能力,力求提出新的见解,不要做书本的“奴隶”,并要防止随着学识的增长而滋生骄傲情绪。

“业贵乎专,言贵乎显”,是说一个人不可能在业务上通晓,科科精熟,应该有所专擅;如果讲学或著述,则要注意显畅易晓,避免模棱两可、义晦辞涩。“法贵乎活,方贵乎纯”,这是对临证立法和处方的具体要求。医生治病,除熟悉所治病症的基本治法外,尚须知常识变,掌握变通的活法而又不越规矩、法度;至于处方,当力求纯净,切忌杂糅。“治贵乎巧”,是说治病要巧治,它与“法贵乎活”是相辅相成的,是中医辨证论治的基本内容之一。所谓“效贵乎捷”,即争取较快地获得良效,不要优柔寡断,丧失治疗良机。

做一个高明的医生,实非易事,但也并非高不可攀。赵濂认为,只要掌握了上述各点,“则医之能事毕矣”。赵氏本人就是一位学识渊博,精于临症,熟悉古法而又善于在治法上变通和创新的医学家。“医贵乎精”这段话虽然文字不长,但内涵丰富,对后人具有启迪作用。

(摘自《中国中医药报》)