

# 电针对不同时间段局灶性脑缺血大鼠缺血区皮层 BDNF 表达的影响<sup>※</sup>

□ 许能贵\* 汪帼斌 余世锋 易 玮 赖新生

(广州中医药大学 广东 广州 510405)

**摘 要** 目的:探讨针刺对缺血性脑损伤的保护作用的生化机制。方法:采用热凝闭大鼠大脑中动脉致局灶性脑缺血模型,研究缺血 2 w 和 5 w 后缺血区皮层 BDNF 的变化规律和针刺对其影响。结果:假手术组大鼠缺血区的 BDNF 阳性细胞数量都很少,强度也比较弱;脑缺血 2 w 及 5 w 组大鼠缺血区 BDNF 的免疫阳性细胞数量比假手术组明显增多 ( $P < 0.01$ );脑缺血 2 w 组与脑缺血 5 w 组大鼠缺血区脑片比较显示,BDNF 阳性细胞数量并无显著性差异 ( $P > 0.05$ );缺血+电针 2 w 组与缺血+电针 5 w 组脑片中免疫阳性细胞的数量明显增加 ( $P < 0.01$ ),但随着时间的推移,此表达呈下降趋势。结论:针刺可以通过提高 BDNF 在缺血区周围皮层的表达,保护缺血性脑损伤,并可能与大脑可塑性的形成有一定的关系。

**关键词** 电针 脑缺血 动物模型 脑源性神经营养因子

脑缺血后神经元死亡的机制包括:神经元钙超载、自由基损伤、兴奋性氨基酸中毒和神经营养因子(NTFs)相对缺乏等。有实验证明脑源性神经营养因

**※基金项目** 国家自然科学基金资助项目(NO:30271644);广东省自然科学基金资助项目(NO:010253);国家中医药管理局科研基金资助项目(NO:02-03JP36)。

**\*作者简介** 许能贵,男,研究员、博士研究生导师。主要从事针灸治疗脑血管疾病的基础和临床研究,主持国家自然科学基金项目 2 项、省部级科研项目多项,获省级科技进步二等奖 1 项。

子(BDNF)对脑缺血具有保护作用,并能促进缺血后损伤神经元的修复。电针对脑缺血的治疗已被国际公认,我们以往的工作也表明电针可以提高急性脑缺血后局部 BDNF 的水平,并证明可以因此促进神经元功能的恢复。临床上对于缺血性脑病患者的治疗是长期的,尤其针刺疗法是治疗缺血性脑血管疾病后遗症的有效方法之一,但对其作用机理,如促进大脑可塑性形成等方面探讨得不够深入。为此,我们选择不同的时间段观察电针对脑缺血大鼠缺血区 BDNF 的影响并且探索其可能的作用机制,为临床针刺治疗缺血性

脑血管疾病及其后遗症奠定理论基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 动物

清洁级健康 SD 大鼠 36 只 (由广州中医药大学实验动物中心提供), 雌雄各半, 体重 180 ~ 240 g。自来水喂养, 饲用普通颗粒型大鼠饲料 (含蛋白 23%, 脂肪 4.7%, 钠盐 0.24%), 动物房温度控制在 18 ~ 26℃, 光暗周期 12 h。由抽签法随机分为假手术组、缺血组和缺血 + 针刺组, 每组又分为 2 w 和 5 w 两个时间段组, 共 6 小组, 每小组 6 只大鼠。其中缺血 2 周组在第三天时死亡一只。

### 1.2 模型制作

采用我们使用过的热凝闭大脑中动脉致局灶性脑缺血模型<sup>[1]</sup>。具体方法是用 10% 水合氯醛溶液, 按 400 mg/kg 体重量腹腔麻醉。然后取右上侧卧位固定, 沿耳眼连续中点切开皮肤, 分离颞肌, 暴露颞骨作一骨窗, 轻抬脑, 显露大脑中动脉, 用烧红的不锈钢丝轻触大脑中动脉, 使之凝闭, 造成局灶性脑缺血模型。其中假手术者只作手术暴露大鼠大脑中动脉, 不予凝闭。缺血 + 电针组立即给予电针治疗。

### 1.3 治疗方法

#### 1.3.1 穴位选择

穴位选取督脉经穴百会、大椎 2 穴, 其定位参照大鼠的常用针灸穴位<sup>[2]</sup>: “百会”位于顶骨正中; “大椎”在第 7 颈椎与第 1 胸椎间, 背部正中。

#### 1.3.2 刺法

对于缺血 + 针刺组大鼠, 以 30 号 1 寸毫针 (华佗牌, 苏州医疗用品厂生产) 斜刺入百会 0.5 寸, 直刺入大椎 0.5 寸, 将针柄分别连接至电针仪上, 疏密波, 强度以大鼠安静耐受为度。时间 30 min。每天 1 次, 均在上午 10 点左右进行, 连续治疗 2 w (2 w 组) 和 5 w (5 w 组)。而假手术组和缺血组大鼠只在同等条件下饲养, 未予任何处理。

### 1.4 样品采集及处理

2 周及 5 周后, 取出大鼠, 10% 水合氯醛腹腔麻醉, 心脏快速灌流生理盐水 100 ml, 然后用 4% 多聚甲醛 (4℃) 灌流固定 30 分钟。取脑放入 4% 多聚甲醛进行后固定 4 ~ 6 小时, 然后分别置于 15%、20%、

30% 的梯度蔗糖脱水。待脑组织下沉后取出做冰冻切片, 片厚 40 μm, 参照《在鼠脑立体定位图谱》<sup>[3]</sup>取缺血中心的脑片 (前囟前 0.1 ~ 0.8 mm) 进行免疫组织化学染色。

### 1.5 免疫组织化学染色

切片入 0.01 mol/l 磷酸盐缓冲液 (PBS, pH 7.2 ~ 7.4) 漂洗 3 次, 每次 5 min。然后入 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 中漂洗 10 min; 0.01 mol/l PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min。再放入 1% BSA (含 0.3% Triton X-100) 溶液中 30 min, 将切片放入羊抗大鼠 BDNF 抗体 (羊抗大鼠, Chemicon 公司产品) 中, 37℃ 孵育 2 h, 移入 4℃ 冰箱孵育 30 h。然后经 0.01 mol/l PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min。切片入生物素标记的兔抗羊 IgG (Chemicon 公司产品), 37℃ 孵育 2 h, 0.01 mol/l PBS 漂洗 3 次。切片挑入 0.05% DAB (含 0.01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 中, 显色后入 0.01 mol/l PBS 漂洗 3 次, 贴片, 晾干, 梯度酒精脱水, 二甲苯溶液透明, 苏木素复染, 最后中性树脂封片。对照实验以正常羊血清和 PBS 代替一抗, 同步进行上述免疫组织化学染色, 结果为阴性。

### 1.6 细胞计数及统计

光镜下 (×400) 对假手术组、缺血组及缺血 + 针刺组手术侧皮层的免疫阳性细胞进行细胞计数。测定结果均以算术平均值 ± 标准差表示, 并进行配对 *t* 检验。

## 2 结果

BDNF 免疫阳性细胞主要在梗死灶周围的皮层表达, 包括外侧中央前区、内侧中央前区, 第 I、II 感觉运动颗粒皮层。在光镜下呈蓝色与棕色相叠的点状、三角状、索状或片状表达痕迹。其免疫阳性颗粒主要分布在胞浆和细胞膜表面, 主干树突和近细胞膜的胞浆处染色较深, 而胞体中央细胞核处呈淡蓝色, 假手术的两个组 (2 w 和 5 w) 大鼠缺血区的 BDNF 阳性细胞数量都很少, 强度也比较弱; 脑缺血 2 w 组及 5 w 组大鼠缺血区 BDNF 的免疫阳性细胞数量比假手术组明显增多, 与假手术两个组相比差异显著 ( $P < 0.01$ ); 但脑缺血 2 w 组与脑缺血 5 w 组大鼠缺血区脑片比较显示, BDNF 阳性细胞数量并无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。缺血 + 电针 2 周组与缺血 + 电针 5

w 组脑片中免疫阳性细胞的数量明显增加，与两个缺血组相比具有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。因此缺血后给予电针治疗可以提高 BDNF 在缺血区周围皮层的表达，但随着时间的推移，此表达呈下降趋势。结果见表 1。

表 1 电针对不同时间段局灶性脑缺血大鼠缺血灶周围皮层 BDNF 免疫阳性细胞数的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

组 别	n	免疫阳性细胞计数
假手术 2 w 组	6	3.21 ± 0.70
假手术 5 w 组	6	3.04 ± 0.69
缺血 2 w 组	5	20.06 ± 2.87*
缺血 5 w 组	6	18.77 ± 2.41#
缺血 + 电针 2 w 组	6	29.20 ± 2.19*△
缺血 + 电直 5 w 组	6	23.61 ± 3.28**\$

注：与假手术 2 周组比较：\*  $P < 0.01$ ；与假手术 5 周组比较：#  $P < 0.01$ ；与缺血 2 周组比较：△  $P < 0.01$ ；与缺血 5 周组比较：\$  $P < 0.01$ ；与缺血 + 电针 2 周组比较：※  $P < 0.01$

3 讨 论

BDNF 作为神经营养因子家族中的一员，广泛分布于大脑中，是一类可促进运动神经元、感觉神经元、基底节前脑胆碱能神经元、皮层神经元、海马神经元、多巴胺能神经元等的存活和生长发育，并能防止它们受损死亡，以及具备改善神经元病理状态、促进受损神经元再生及分化成熟等生物效应。众多的研究表明，BDNF 参与脑缺血损伤的保护过程<sup>[4]</sup>，它可以保护神经元，抵抗损伤并在缺血后促进损伤神经元的修复，并且缺血时间越长，损伤越严重，它们表达越明显。还有证据表明，BDNF 能减少缺血引起的梗死面积，保护半影区神经元，并能抑制迟发性神经元坏死<sup>[5]</sup>。BDNF 可以保护中枢神经系统对抗代谢性和兴奋性氨基酸毒性损伤，防止细胞内钙离子的释放和细胞外钙离子入胞，对抗一氧化氮介导的谷氨酸细胞毒性，调节自由基代谢以及刺激轴突的出芽和突触的形成，从而缓解和修复脑缺血后的神经元损伤<sup>[6]</sup>。因此，脑缺血后增加的 BDNF 对缺血性损伤具有保护作用。

本实验发现，缺血 2 w 组及缺血 5 w 组大鼠缺血区 BDNF 表达与两个假手术组大鼠的 BDNF 表达均有明显差异，但两个缺血组本身的 BDNF 表达相比并无显著性差异。我们注意到已有文献显示，在神经损伤后 3 天 BDNF mRNA 开始缓慢增加，到 3~4 周达到最

高峰<sup>[7]</sup>。但有的实验表明，一次电针仅能使 BDNF 在缺血再灌后的 12 小时内保持高水平，尔后又降回对照组水平<sup>[8]</sup>。因本实验只选取 2 w 与 5 w 两个时间点，无法看出 BDNF 在脑缺血损伤后的变化规律，但所得到的结果是缺血 + 电针组大鼠缺血区大脑皮层 BDNF 表达显著增多，表明长时间持续电针可使 BDNF 在缺血后相当长时间内保持较高水平。持续高水平的 BDNF 不仅能有效地挽救半影区缺血神经元，修复损伤神经元，防止其发生坏死，而且还可以促进梗死灶周围正常神经元出芽、再生，并形成新的突触<sup>[9]</sup>。

当然，电针对局灶性脑缺血大鼠脑损伤的康复作用可能是一种综合调整的结果，其作用机理包括许多方面，增强其缺血脑组织的 BDNF 表达可能是其中机制之一。我们将进一步采用脑内注射外源性 BDNF 抗体或其受体 trkB 抗体的方式，来拮抗内源性 BDNF 的表达，以探索内源性 BDNF 的生理作用以及在脑损伤后对大脑可塑性的影响，进一步摸索电针在这过程中的作用。

参考文献

[1] 许能贵, 易玮, 马勤耘, 等. 电针对大鼠局灶性脑缺血后神经元损伤保护作用的研究. 中国针灸, 2000, 20 (4): 237-239.

[2] 林文注, 王佩主编. 实验针灸学. 上海: 上海科学技术出版社, 1994. 286-290.

[3] 包新民, 舒斯云. 大鼠脑立体定位图谱. 北京: 人民卫生出版社, 1999. 26-32.

[4] Endres M, Fan G, Hirt L, et al. Ischemic brain damage in mice after selectively modifying BDNF or NT4 gene expression. J Cereb Blood Flow Metab, 2000, 20 (1): 139-144.

[5] Pringle AK, Sundstrom LE, Wild GJ. Brain derived neurotrophic factor, but not neurotrophin-3, prevents ischemia induced neuronal cell death in organotypic rat hippocampus slice cultures. Neurosci Lett, 1996, 211: 203-206.

[6] 陈英辉, 黄显奋. 脑源性神经营养因子和脑缺血. 中国临床神经科学, 2000, 8 (2): 142-144.

[7] 曾超军. 脑源性神经营养因子对神经损伤的修复与再生. 国外医学·生理、病理科学与临床分册, 2001, 21 (4): 317-319.

[8] 韩太真, 吴霞梅主编. 学习与记忆的神经生物学. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1998.

[9] Hyejin K, Erin M. Long-lasting neurotrophin induced enhancement of synaptic transmission in the adult hippocampus. Science, 1995, 267: 1658.