

· 实验研究 ·

电针联合再灌注对急性脑梗死大鼠脑损伤的影响※

● 陈桂云 金海鹏 李相良 施镇国 王永▲

摘要 目的:观察电针水沟穴(GV26)和百会穴(GV20)加再灌注处理与单纯再灌注处理对急性大脑中动脉缺血模型大鼠脑组织损伤的影响。方法:通过建立大鼠大脑中动脉阻塞(MCAo)模型,设立假手术组、MCAo组、再灌注组、电针+再灌注组,每组20只,应用Zausinger法进行神经功能缺损评分、TTC染色法检测脑梗死面积、TUNEL染色法检测脑皮层缺血半暗带区域神经元凋亡水平。观察大脑中动脉缺血90 min后,再灌注前行电针水沟穴和百会穴,与单纯再灌注处理对改善大脑中动脉缺血脑组织损伤的比较。结果:造模后24 h,再灌注组的神经功能评分、相对脑梗死面积百分比、脑皮层缺血半暗带区域神经元凋亡水平较MCAo组均有显著改善($P<0.01$),而电针+再灌注组在改善神经功能评分、相对脑梗死面积百分比和缺血半暗带区神经元凋亡水平方面较单纯再灌注处理更优($P<0.05$)。结论:再灌注处理能改善急性大脑中动脉缺血性损伤,而电针能进一步提高再灌注在改善脑缺血性损伤的作用。

关键词 电针;水沟穴;百会穴;急性脑梗死;再灌注

Lancet 发表的最新中国疾病负担报告^[1]显示,1990—2017年,脑卒中取代了下呼吸道感染和新生儿疾病,成为国民死亡、残疾调整寿命年数(DALYs)、和疾病负担的主要原因。而缺血性卒中又占卒中的70%~80%^[2],其高发病率、高死亡率和高致残率给社会、家庭带来沉重的负担。急性缺血性卒中治疗的关键在于尽早开通阻塞血管、挽救缺血半暗带。最新发表的九大溶栓随机对照研究的汇总分析显示,与对照组相比,静脉溶栓后3~6个月死亡率未明显降低,仍高达17.9%,且2/3的患者依然遗留有不同程度的残疾^[3],因此,找到一个优于溶栓剂或提高其疗效的急性缺血性脑卒中的治疗方法仍然是一个亟待解决的问

题。目前,在所有电针预处理对急性脑缺血再灌注损伤的研究中,电针预处理干预的时间窗都在脑缺血前,虽然证实了电针预处理能诱导脑缺血耐受,但因患者发生脑梗死的时间窗是未知的,其在临床的应用尚缺乏可行性。本研究立足于临床,通过建立大鼠大脑中动脉缺血再灌注模型,将电针预处理的时间窗置于再灌注前,即模拟急性脑梗死患者在溶栓前接受电针水沟穴和百会穴治疗,探索提高再灌注后进一步减小脑神经功能缺损症状的方法。

1 材料和方法

1.1 实验动物及分组 清洁级雄性SD大鼠,体质量220~250 g,购于厦门大学实验动物中心,许可证号:SCXK(闽)2008-0001。于实验前适应环境1 w,控制室温(22 ± 1)℃,湿度(55 ± 5)%,光照时间7:00~19:00,自由摄食和饮水,在厦门大学动物实验中心分组饲养。按照随机数字表法将大鼠随机分为4组,分别是假手术组、MCAo组、再灌注组和电针+再灌注组,每组20只。在实验过程中死亡及造模不合格的大鼠由备用大鼠补齐。

1.2 主要试剂和仪器 2,3,5-三苯基氯化四氮唑

※基金项目 福建省卫生计生青年科研课题(No.2017-2-104);福建省科技计划项目自然科学基金青年创新项目(No.2018D0024)

▲通讯作者 王永,男,主治医师,医学博士。研究方向:针灸治疗脑血管病的研究。E-mail:wytcm@hotmail.com

• 作者单位 福建中医药大学附属厦门中医院(福建 厦门 361009)

(TTC)(美国 Sigma); TUNEL 试剂盒(美国 Roche); 戊巴比妥钠(德国 Merck); 韩氏穴位神经刺激仪(南京济生医疗科技有限公司); 荧光显微镜(德国 Leica); 切片机(德国 Leica)。

1.3 动物模型制备 参照 Zea Longa^[4]线栓法加以改进制作大鼠中动脉缺血再灌注模型(Middle Cerebral Artery Occlusion, MCAo)。术前 12 h 对大鼠禁食, 6 h 禁水。先用 2% 戊巴比妥钠(0.2 mL/100 g)进行腹腔注射麻醉, 再将大鼠仰卧位固定, 线栓从颈外动脉至颈内动脉插入大鼠中动脉, 线栓深入颅内约 18~20 mm。再灌注组阻断 110 min 后拔出线栓, 完成缺血再灌注。电针组阻断 90 min 时以电针干预 20 min 后拔出线栓, 完成缺血再灌注模型。假手术组除不插线栓外其余步骤同 MCAo 组。

1.4 电针干预方法 大鼠水沟穴和百会穴定位参照《实验针灸学》^[5]穴位标准。在大脑中动脉缺血 90 min 后, 予电针干预 1 次。操作方法: 将 0.25 mm×13 mm 无菌针灸针(华佗牌)分别刺入大鼠水沟穴和百会穴, 水沟穴针尖朝向鼻中隔方向针刺 2 mm, 百会穴针向前平刺 2 mm, 连接好电针治疗仪导线。应用韩式穴位神经刺激仪(HANS E200), 选用疏密波, 电流强度 1 mA, 频率 2/15 Hz, 时间 20 min。

1.5 观察指标与检测方法

1.5.1 神经功能评分 大鼠造模后 24 h, 每组随机取 10 只, 参照 Zausinger^[6]评分法对其进行神经功能评分, 具体如下: ①无法行动, 评为 0 分; ②向右转圈, 评为 1 分; ③提起鼠尾, 若有很明显的向右旋转且没有发现向左旋转, 评为 2 分; ④将排除 2 分的大鼠置于平地, 手抓住鼠尾固定大鼠, 分别对其两侧施加同样的压力, 若右侧抵抗力不如左侧, 则评为 3 分; ⑤将排除 3 分的大鼠让其自由活动, 观察其右侧前爪是否能伸直, 若无法伸直评为 4 分; ⑥若双侧没有任何区别, 评为 5 分。

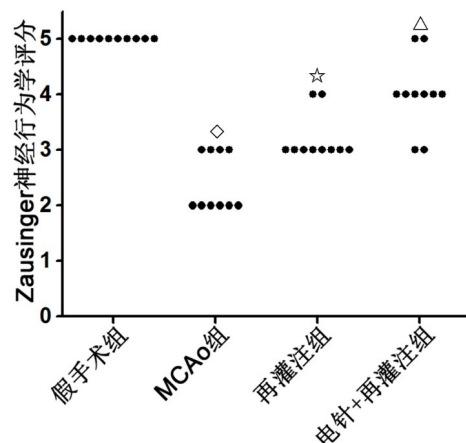
1.5.2 TTC 染色观察大鼠脑梗死面积 神经行为学评分后, 每组随机取 10 只大鼠采用 2% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉后断头取脑, 将大鼠大脑切成 2 mm 的冠状切片。将脑切片放入 2% TTC 溶液, 于 37 °C 温箱中孵育 10 min, 再用 4% 多聚甲醛溶液固定后拍照, 使用 image pro plus 6.0 软件测定梗死面积(梗死面积=对侧半球面积-病变半球非梗死面积), 然后计算相对脑梗死面积百分比, 即梗死面积与对侧半球面积的比值。

1.5.3 TUNEL 染色检测大鼠大脑皮层缺血半暗带细胞凋亡 TTC 染色后, 每组取另外 10 只大鼠用 2% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉后, 经心脏灌注 4% 多聚甲醛溶液约 100 mL, 将其在 4% 多聚甲醛中固定过夜, 常规石蜡包埋、切片(厚度 10 μm)。切片常规脱蜡、抗原修复后将切片与 TUNEL 试剂混合液室温背光孵育 1 h。PBS 洗涤后, 用 DAPI 核染色剂观察细胞核。由对分组不知情的研究人员使用 400 倍荧光显微镜在每个切片中随机观察大脑皮层缺血半暗带区 5 个不同视野, 并计数 TUNEL 阳性细胞的数量占总细胞数量的百分比。

1.6 统计学方法 数据分析应用 SPSS 19.0 系统软件, 数据采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。首先对数据进行正态分布检验(One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test, K-S 检验), 检验水准 $\alpha=0.05$, 符合正态分布者, 多组间数据差异比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA), 方差不齐采用 Dunnett's T3 法。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

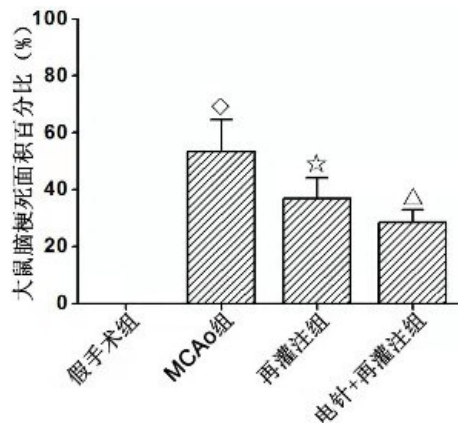
2.1 各组大鼠神经功能评分比较 经单因素方差分析, 各组大鼠神经功能评分有显著差异($P<0.01$)。各组经两两比较, MCAo 组大鼠神经功能评分显著低于假手术组($P<0.01$); 经再灌注干预, 再灌注组大鼠神经功能评分显著高于 MCAo 组($P<0.01$); 而经电针干预后再进行再灌注处理, 电针+再灌注组大鼠的神经功能评分较再灌注组又有显著提高($P<0.05$)。见图 1。



注: 与假手术组比较, $\diamond P<0.01$; 与 MCAo 组比较, $*P<0.01$; 与再灌注组比较, $\triangle P<0.05$

图 1 各组大鼠干预后神经功能评分比较

2.2 各组大鼠相对脑梗死面积百分比比较 经单因素方差分析,各组大鼠相对脑梗死面积百分比有显著差异($P<0.01$)。各组经两两比较,MCAo组大鼠相对脑梗死面积百分比显著高于假手术组($P<0.01$);经再灌注干预,再灌注组大鼠相对脑梗死面积百分比比较MCAo组显著降低($P<0.01$);而经电针干预后再进行再灌注处理,电针+再灌注组大鼠的相对脑梗死面积百分比比较再灌注组进一步显著降低($P<0.05$)。见图2。



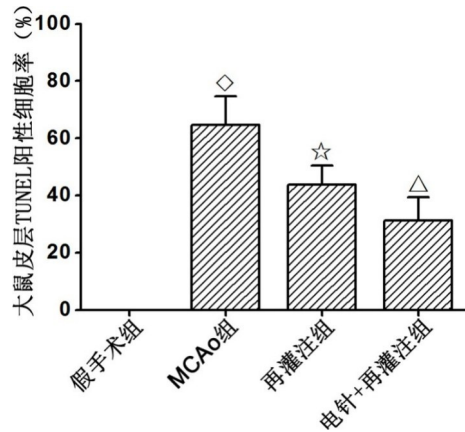
注:与假手术组比较, $\diamond P<0.01$;与MCAo组比较, $*P<0.01$;与再灌注组比较, $\triangle P<0.05$

图2 各组大鼠干预后相对脑梗死面积百分比比较

2.3 各组大鼠大脑皮层缺血半暗带细胞凋亡水平比较 经单因素方差分析,各组大鼠大脑皮层缺血半暗带细胞凋亡水平有显著差异($P<0.01$)。各组经两两比较,MCAo组大鼠大脑皮层缺血半暗带细胞凋亡水平显著高于假手术组($P<0.01$);经再灌注干预,再灌注组显著低于MCAo组($P<0.01$);而经电针干预后再进行再灌注处理,电针+再灌注组大鼠大脑皮层缺血半暗带细胞凋亡水平较再灌注组又有显著降低($P<0.01$)。见图3。

3 讨论

石学敏院士于1972年开创“醒脑开窍”针刺法治疗中风病,其基于对古医籍及现代医学理论的深入研究,创先提出对中医理论中“神”的把握及对中风病病机“窍闭神匿,神不导气”的认识,明确其病位在脑,确立了以醒脑开窍、滋补肝肾为主,疏通经络为辅的针刺治疗方法,经过四十年的临床验证,取得了显著的疗效^[7-10]。水沟穴是“醒脑开窍”的主穴,系督脉穴,为手、足阳明经与督脉的交会穴,可调督脉、开窍启闭,



注:与假手术组比较, $\diamond P<0.01$;与MCAo组比较, $*P<0.01$;与再灌注组比较, $\triangle P<0.01$

图3 各组大鼠干预后大脑皮层缺血半暗带TUNEL凋亡阳性细胞率比较

醒脑宁神,而使机体生命活动恢复,为临床上常用的急救穴。另外,中医学认为,脑为髓海,其气血输注上在于百会穴,下在于风府穴。而督脉总督一身之阳脉,为“阳脉之海”,其起于胞中,下出会阴,沿脊内上行至项进入脑内,属脑。百会穴属于督脉,根据“经脉所过,主治所及”的经络理论,百会穴在治疗脑血管疾病和脊髓相关疾病方面具有相对特异性和优势。从现代解剖学角度看,百会穴正下投影正好处于皮质运动、感觉区的投影区内,同时大脑前动脉主干也在其下走行。故本研究取水沟穴、百会穴共同干预急性脑缺血模型大鼠。随着近代临床医生将电刺激引入针灸领域,针灸治疗手段得到了扩展和补充,而电针在卒中后的康复治疗更是取得了一定的疗效^[11-16]。由于电针参数易于控制,将刺激量化,使治疗量更精确,故可作为急性缺血性卒中救治的手段。

脑缺血后的溶栓治疗,不仅要面临脑出血的风险,还要考虑其它副作用,其中一个很重要的方面就是脑缺血再灌注损伤(CIRI)。脑缺血再灌注损伤的主要病理变化为细胞凋亡,凋亡是机体为了维护内外环境的稳定,通过多种途径使细胞主动死亡的过程,属于一种生理性的细胞死亡,是可逆的。因此,本研究将电针干预置于再灌注前,明确大脑中动脉缺血后,从神经行为学、组织形态学和细胞病理学角度,再灌注前电针水沟穴和百会穴可以进一步改善大脑中动脉缺血性损伤,同时也在一定程度上逆转了缺血半暗带再灌注引起的神经元凋亡,为急性脑梗死患者溶栓治疗前予电针干预的可行性提供了基础实验依据,

(下转第72页)