

• 基础研究 •

头穴丛刺法对急性脑梗死大鼠病理学及神经生长因子和转化生长因子的影响

倪金霞^{1a}, 朱文增^{1b}, 唐强^{1b}, 秦颖², 于致顺^{1a}

[摘要] 目的 探讨头穴丛刺对急性脑梗死大鼠病理学及神经生长因子(NGF)和转化生长因子(TGF)的影响。方法 将 30 只大鼠随机分为 3 组:假手术组(A组)、造模组(B组)、头穴丛刺组(C组),每组 10 只。采用线栓法制备急性脑梗死动物模型,观察头穴丛刺法对急性脑梗死大鼠病理学的影响及脑组织皮质及海马区 NGF 和 TGF 表达的变化。结果 造模后第 7 天,B 组大鼠缺血区脑组织明显水肿,周围区神经细胞数明显减少;与 B 组比较,C 组大鼠脑缺血区脑组织水肿减轻,神经细胞数增多;术后 7 d,A 组与 B 组大鼠皮质及海马区均有少量 NGF 及 TGF 表达,两组比较差异无显著性意义($P > 0.05$),C 组大鼠皮质及海马区 NGF 及 TGF 表达明显升高,与 B 组比较差异有显著性意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结论 头穴丛刺能减轻大鼠脑缺血区组织水肿,改善缺血半影区神经细胞功能状态,促进神经胶质细胞增生,并可诱导皮质及海马区 NGF 和 TGF 的表达,减轻缺血造成的神经元损伤。

[关键词] 脑梗死;大鼠;头穴丛刺;神经生长因子;转化生长因子

Effect of Cluster Scalp Acupuncture on Pathological Changes and Expression of Nerve Growth Factor and Transforming Growth Factor in Rats after Acute Cerebral Infarction NI Jin-xia, ZHU Wen-zeng, TANG Qiang, et al. The Second Hospital Affiliated to Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150001, Heilongjiang, China

Abstract: **Objective** To explore the effect of cluster scalp acupuncture on pathological changes and the expression of nerve growth factor (NGF) and transforming growth factor (TGF) in rats after acute cerebral infarction. **Methods** 30 male Wistar rats were randomly divided into the sham operation group (group A), model group (group B) and cluster scalp acupuncture group (group C) with 10 animals in each group. Animal model was made by the middle cerebral artery occlusion. The pathological changes and the expression of NGF and TGF in the brain tissues of rats were tested. **Results** On the 7th day after operation, brain tissue of infarction area in the group B indicated significantly edema, neural cells decreased. Compared with the group B, the edema in the group C decreased and neural cells increased. At the same time, there were a few NGF and TGF expressions in hippocampus and cortex areas of the group A and group B, and there was no difference between the two groups ($P > 0.05$); but compared with the group A and group B, NGF and TGF in the group C increased significantly ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion** Cluster scalp acupuncture therapy can decrease edema, increase neural cells in infarction areas, as well as induce the expression of NGF and TGF in cortex and hippocampus.

Key words: cerebral infarction; rats; cluster scalp acupuncture; nerve growth factor; transforming growth factor

[中图分类号] R743.3 [文献标识码] A [文章编号] 1006-9771(2007)06-0522-02

[本文著录格式] 倪金霞,朱文增,唐强,等. 头穴丛刺法对急性脑梗死大鼠病理学及神经生长因子和转化生长因子的影响[J]. 中国康复理论与实践,2007,13(6):522-523.

脑卒中是中老年人常见病,多发病之一。流行病学调查资料显示,缺血性卒中约占脑卒中的 60%,幸存者中 70%以上遗留有不同程度的功能障碍(残疾),其中尤以后遗症最为常见,给患者、家庭、社会造成沉重的精神和经济负担。在我国,脑梗死患者约 3/4 不同程度丧失劳动能力,生活需要照顾。近年来,脑梗死治疗水平不断提高,使死亡率有所下降,但致残率仍然较高。因此,如何使脑梗死所致神经功能缺损症状降低到最小限度,成为国内外研究的热点。

头穴丛刺法是针灸专家于致顺教授在总结多年大量临床经验的基础上提出的一种新的治疗脑梗死的有效方法,在临床实践中已取得较好的效果。本研究旨在观察该方法对急性脑梗死大鼠病理学及神经生长因子(nerve growth factor, NGF)和转化生长因子(transforming growth factor, TGF)的影响,探讨头穴丛刺法治疗急性脑梗死的作用机制,为临床治疗提供理论依据。

基金项目:黑龙江中医药大学基金项目(No. 200116)

作者单位:1. 黑龙江中医药大学附属第二医院 a. 针灸科一病房; b. 康复科,黑龙江哈尔滨市 150001; 2. 哈尔滨医科大学第一临床医学院第二住院部,黑龙江哈尔滨市 150001。作者简介:倪金霞(1972-),女,河北蛟河县人,主治医师,博士研究生,主要研究方向:针灸防治中风病。通讯作者:于致顺。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组 选用健康雄性 Wistar 大鼠 30 只(由黑龙江中医药大学动物实验中心提供),体重 250~300 g,皮毛光滑润泽,呼吸道通畅,足部皮肤红润。将大鼠随机分为假手术组(A组)、造模组(B组)和头穴丛刺组(C组),每组 10 只。

1.2 主要器械设备及试剂 SXP-1B 手术显微镜(上海医用光学仪器厂);华佗牌针灸针(0.5 寸,26 号,苏州医疗用品厂);JSJ-1 组织脱水机(天津航空机电公司);BMJ-1 生物组织包埋机(天津航空机电公司);Leica 切片机(德国);ZDJ-1 型展片机(天津航空机电公司);KDJ-1 型烤片机(天津航空机电公司);Libror AEL-200 型电子精密天平(日本);CH-2 型光学显微镜(日本 OLYMPUS 公司);CH 型摄影显微镜(日本 OLYMPUS 公司);NGF 及 TGF 免疫组化试剂盒(武汉博士德生物工程公司)。

1.3 模型制备 选用直径 0.20~0.25 mm 的强力钓鱼线,剪成长 40 mm 的栓线,线前端经酒精灯修理形成光滑球形,在手术显微镜下观察其光滑程度,不合格的剔除,合格栓线消毒后放入生理盐水中备用。在室温 22℃条件下,大鼠称重后用 20% 氨基甲酸乙酯腹腔麻醉(1~1.2 g/kg 体重),仰卧固定在实验手术台上。颈部备皮,常规消毒后,行正中切口,沿双侧颌下腺中间剪开浅筋膜,钝性分离右侧胸骨舌骨肌与胸锁乳突肌之间的肌间隙,暴露颈总动脉和迷走神经。钝性分离总动脉、颈内

动脉及颈外动脉,结扎颈外动脉及总动脉近心端,并于总动脉远心端备线,颈内动脉远端用微动脉夹夹闭。参考 Zea-longa 方法,于总动脉近分叉处切口,插入与体重相应直径的栓线,收紧备线,打开动脉夹,栓线进入颈内动脉,栓线方向稍向外侧,以防进入翼腭动脉。当线进入 17~21 mm 时,可感到手下有阻力感,证明栓线头端已达大脑中动脉处,进线至大脑前动脉近端,阻断大脑中动脉的所有血液来源,扎紧备线,缝合,切口局部撒消炎粉。术后动物注意保暖。假手术组只分离动脉,不结扎,插线。模型成功的标志是动物苏醒后出现右眼 Horner 氏征及左侧肢体偏瘫。不合格的动物剔除。

1.4 操作方法 假手术组大鼠术后置于普通笼中饲养;造模组术后另置普通笼中饲养,不予任何治疗;头穴丛刺组大鼠术后 24 h 后进行头针治疗,采用丛刺法,取百会穴及百会左、右侧各旁开 4 mm 处针刺,快速捻转 1 min 后留针 30 min,每日 1 次,共针 7 次。各组大鼠在术后第 7 天开胸暴露心脏,先后用 0.85% 生理盐水及福尔马林溶液各 200 ml 心脏灌注,将体内血液冲净(从右房流出的液体变清),然后断头取脑,将脑组织放入福尔马林溶液中固定,以备观察脑组织形态学及免疫组化检测。

1.5 检测指标及方法

1.5.1 病理学检查 将固定的鼠脑取出,分离右半球,距额极 5 mm 处(相当于 MCA 供血区)做一厚 2 mm 的冠状切片,经脱水-透明-浸蜡-包埋-切片,HE 染色,光镜下观察细胞形态变化。

1.5.2 免疫组化检测 切片脱蜡至水→蒸馏水新鲜配制 3% H₂O₂,室温 5~10 min 以灭活内源性酶。蒸馏水洗 3 次→滴加正常血清封闭液,室温 20 min。甩去多余液体,不洗→滴加适当稀释的 1 抗,4℃过夜。0.01 M PBS(pH=7.4)洗 2 min×3 次→滴加生物素化山羊抗大鼠 IgG,20℃~37℃ 20 min。0.01 M PBS 洗 2 min×3 次→滴加试剂 SABC,20℃~37℃ 20 min。0.01 M PBS 洗 5 min×4 次→DAB 显色,使用 DAB 显色试剂盒(EDI022),取 1 ml 蒸馏水,加试剂盒中 A、B、C 试剂各 1 滴,混匀后加至切片。室温显色,镜下控制反应时间,一般在 5~30 min 之间。也可自配显色剂显色。蒸馏水冲洗→苏木素轻度复染。脱水,透明,封片,显微镜观察。

采用 OLYMPUS 光学显微镜观察,每张切片不同部位在显微镜的目镜下(×400 倍)选 3 个视野,取平均值,观察阳性细胞数(呈棕黄色染色)。

1.6 统计学处理 所得数据采用($\bar{x} \pm s$)表示,应用 SPSS 11.5 统计软件进行组间均数比较的 *q* 检验。

2 结果

2.1 头穴丛刺法对急性脑梗死大鼠脑组织病理学的影响 造模组大鼠缺血区细胞数目减少,脑组织明显水肿;头穴丛刺组大鼠缺血区脑组织水肿减轻,缺血周边区神经细胞数增加。

2.2 头穴丛刺法对急性脑梗死大鼠皮质及海马 NGF 表达的影响 见表 1。

表 1 各组大鼠皮质及海马 NGF 阳性细胞数比较

(n=10, $\bar{x} \pm s$)		
组别	皮质	海马
假手术组	1.25 ± 0.50	2.50 ± 1.29
造模组	2.50 ± 1.29	2.75 ± 1.71
头穴丛刺组	9.75 ± 4.27 ^{a,b}	8.50 ± 2.65 ^{a,b}

注:a.与假手术组比较, *P* < 0.01;b.与造模组比较, *P* < 0.05。

2.3 头穴丛刺法对急性脑梗死大鼠皮质及海马 TGF 表达的影响 见表 2。

表 2 各组大鼠皮质及海马 TGF 阳性细胞数比较

(n=10, $\bar{x} \pm s$)		
组别	皮质	海马
假手术组	1.50 ± 0.58	1.25 ± 0.5
造模组	2.75 ± 1.71	3.50 ± 2.08
头穴丛刺组	22.25 ± 10.21 ^{a,b}	14.65 ± 3.24 ^{a,b}

注:a.与假手术组比较, *P* < 0.01;b.与造模组比较, *P* < 0.01。

3 讨论

针灸是我国传统的治疗手段,对脑梗死后偏瘫的疗效已被大量临床实践所证实。目前认为,针灸的作用机制可能与针刺可直接扩张血管、调整血液流变学、血液动力学及神经电生理、免疫组化等有关。头穴丛刺法是针灸专家于致顺教授提出的一种新的治疗脑梗死的有效方法,在临床实践中已取得较好的效果。我们认为,对头部穴区的刺激可以通过头这一容积导体产生一种“场”或“针场”,将生物电效应传送到大脑皮质,与脑神经细胞自发电位变化传递到大脑皮质一样,无疑对大脑皮质有刺激作用。这种作用可能改变脑皮质神经细胞的兴奋性,纠正抑制性泛化,使可逆性神经细胞复活或使被抑制的神经细胞觉醒,从而促进神经功能尽快恢复。

脑组织形态学可直接反映神经细胞的形态及功能状态,指标客观。大鼠大脑中动脉阻断后,缺血区可见不同程度的缺血、坏死,脑组织明显肿胀,细胞数减少^[1,2];本实验采用头穴丛刺法治疗后,急性脑梗死大鼠缺血区脑组织的水肿减轻,缺血周边区神经细胞数增加,这可能是该方法治疗脑梗死的作用机制之一。

NGF 是最早被发现的一种神经营养因子,是对神经元的存活、生长发育、分化、再生和功能维持起调控作用的物质^[3],可促进急性脑梗死大鼠神经功能的恢复^[4];TGF-β 为多效能生长因子,可由体内或体外各种正常或已转化的细胞产生,在中枢神经系统可由小胶质细胞、星形胶质细胞或神经元产生。体外研究发现,TGF-β₁ 与 TGF-β₂ 可促进神经元存活和轴突生长,具有良好的神经营养作用。此外,TGF 可刺激细胞外基质的分泌与沉积,在诱导细胞凋亡等方面起着重要的调节作用^[5,6]。

本实验结果显示,头穴丛刺组急性脑梗死大鼠经头穴丛刺治疗后,皮质、海马部位梗死周边区可见多个神经元呈棕黄色染色,与造模组比较差异有显著性意义(*P* < 0.05, *P* < 0.01),表明头穴丛刺治疗能诱导急性脑梗死大鼠 NGF 及 TGF 的表达,从而减轻缺血对神经元的损害,保护和修复神经细胞。

[参考文献]

[1]何秋,刘美洁,朴英善,等.栓线法制备大鼠局灶性脑缺血再灌注模型的研究[J].中国医科大学学报,1998,27(4):343.
[2]徐立新,袁芳.改良的大鼠脑局部缺血模型[J].中国康复理论与实践,2005,11(1):23-24.
[3]张海明,张映.神经生长因子对神经元作用的研究进展[J].动物医学进展,2006,27(9):39-41.
[4]王益光,李志坚,王玉良,等.神经生长因子对急性脑梗死大鼠神经功能和一氧化氮合酶含量的影响[J].中国康复理论与实践,2005,11(8):597-598.
[5]田晓丽,杨杰.转化生长因子-β 研究进展[J].解放军预防医学杂志,2006,24(2):145-148.
[6]方琪,董万利.转化生长因子 β₁ 对大鼠局灶脑缺血/再灌注后细胞凋亡的影响[J].江苏医药杂志,2004,30(11):862-863.

(收稿日期:2007-02-15)