

DOI: 10.3969/j.issn.1006-9771.2012.10.009

·基础研究·

## 头穴丛刺法对急性脑梗死大鼠行为学及凋亡相关基因 bcl-2 的影响

朱文增<sup>1</sup>, 倪金霞<sup>2</sup>, 盛国滨<sup>3</sup>, 于致顺<sup>3</sup>

**[摘要]** 目的 探讨头穴丛刺对急性脑梗死大鼠神经行为学及凋亡相关基因 bcl-2 的影响。方法 将 72 只雄性 Wistar 大鼠随机分为 3 组: 假手术组(A)、造模组(B)和头穴丛刺组(C), 每组各 24 只。各组再根据脑梗死后不同时间分为 6 h、24 h 和 3 d 三个亚组, 每个时间点各 8 只。采用线栓法制备急性脑梗死动物模型, 观察不同时间点头穴丛刺法对急性脑梗死大鼠行为学及脑组织凋亡相关基因 bcl-2 表达的影响。结果 脑梗死第 3 天, C 组大鼠神经功能评分明显低于 B 组( $P<0.01$ ); C 组大鼠术后不同时间点缺血半暗区 bcl-2 的表达增多, 24 h 时达到高峰, 与 B 组比较差异均具有高度显著性差异( $P<0.01$ )。结论 头穴丛刺能明显降低急性脑梗死大鼠神经功能评分, 促进运动功能恢复; 并可促进大鼠缺血半暗区 bcl-2 的表达, 抑制细胞凋亡。

**[关键词]** 脑梗死; 大鼠; 头穴丛刺; bcl-2; 神经功能评分

**Effects of Cluster Scalp Acupuncture on Behavior and Apoptosis-related Gene bcl-2 in Rats after Acute Cerebral Infarction** ZHU Wen-zeng, NI Jin-xia, SHENG Guo-bin, et al. Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medicine Sciences, Beijing 100053, China

**Abstract: Objective** To explore the effects of cluster scalp acupuncture on the behavior and expression of bcl-2 in rats after acute cerebral infarction. **Methods** 72 male Wistar rats were randomly divided into sham operation group (A), model group (B) and cluster scalp acupuncture group (C), 24 rats in each group. According to time after cerebral infarction, each group was reassigned to 6 h, 24 h and 3 d subgroups, 8 rats in each subgroup. The acute cerebral infarction model was established with the middle cerebral artery occlusion. The effects of cluster scalp acupuncture on the behavior and expression of apoptosis-related gene bcl-2 in the rat brain tissues with acute cerebral infarction were tested at different time. **Results** 3 d after cerebral infarction, the score of neuronal function in group C was significantly lower than that of group B ( $P<0.01$ ). The expression of bcl-2 in brain ischemic penumbra increased in group C at different time and reached its peak at 24 h. Compared with group B, there was a statistical difference ( $P<0.01$ ). **Conclusion** Cluster scalp acupuncture can significantly reduce the neuronal function score of rats after acute cerebral infarction and then promote the recovery of movement function. The therapy can inhibit the apoptosis by increasing the expression of bcl-2 in penumbra zone of cerebral infarction.

**Key words:** acute cerebral infarction; rats; cluster scalp acupuncture; bcl-2; neuronal function score

**[中图分类号]** R743.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1006-9771(2012)10-0927-03

**[本文著录格式]** 朱文增, 倪金霞, 盛国滨, 等. 头穴丛刺法对急性脑梗死大鼠行为学及凋亡相关基因 bcl-2 的影响[J]. 中国康复理论与实践, 2012, 18(10): 927-929.

头穴丛刺法是于致顺教授在总结多年临床经验的基础上提出的一种治疗脑病的新方法。本研究通过观察头穴丛刺法对脑梗死大鼠行为学和神经细胞凋亡相关基因 bcl-2 的影响。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物与分组** 健康雄性 Wistar 大鼠, 体重 250~300 g, 皮毛光滑润泽, 呼吸道通畅, 足部皮肤红润, 由黑龙江中医药大学动物实验中心提供。将 72 只大鼠随机分为假手术组(A)、造模组(B)和头穴丛刺组(C), 每组 24 只。各组再分为 6 h、24 h、3 d 三个时间点, 每个时间点各 8 只。

**1.2 主要器械设备及试剂** 华佗牌针灸针(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); 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); Bcl-2 一抗试剂盒(北京中山试剂公司); 二步法免疫组化试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司); 多聚甲醛(天津市科密欧化学试剂有限公司); 水合氯醛(昆山市石浦年沙助剂厂)。

**1.3 模型制备** 采用线栓法制备大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)大鼠模型。选用直径 0.20~0.25 mm 的强力钓鱼线, 剪成长 40 mm 的栓线, 线前端经酒精灯处理形成光滑球形, 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。室温条件下, 大鼠称重后, 用 10% 水合氯醛 3.5 ml/kg 腹腔麻醉后, 仰卧固定在手术台上, 颈部备皮, 常规消毒后行正中切口, 钝性分离并结扎左侧颈外动脉(ECA)和颈总动脉(CCA)近心

基金项目: 1. 黑龙江省教育厅科学技术研究项目(11511373); 2. 哈尔滨市科技创新人才研究专项资金项目(2007RFQXS109)。

作者单位: 1. 中国中医科学院广安门医院针灸科, 北京市 100053; 2. 北京中医药大学东直门医院, 北京市 100700; 3. 黑龙江中医药大学附属二院, 黑龙江哈尔滨市 150001。朱文增(1971-), 男, 安徽砀山县人, 中西医结合博士后, 副主任医师, 主要研究方向: 针刺对中风可塑性影响的研究。通讯作者: 倪金霞。

端,并于 CCA 远心端备线并打一活结,钝性分离颈内动脉(ICA),在 ICA 远心端用微动脉夹夹闭,在 CCA 分叉部切一小口,将与体重相应直径的栓线插入,收紧备线,打开动脉夹,栓线进入 ICA,轻柔推进,至有阻力不能再进即停止推送,此时钓鱼线头端已达大脑中动脉开口处,进线长度为 17~21 mm(距分叉处),扎紧备线,缝合,切口局部撒消炎粉。假手术组只分离动脉,不结扎、不插线。模型成功的标志是<sup>[1]</sup>:左侧 Horner 征(+),右前肢瘫痪,大鼠麻醉清醒后提尾悬空时右侧前肢内收、屈曲,自主运动时身体向右侧转圈。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,不予以任何治疗;头穴丛刺组大鼠术后 6 h 即进行头针治疗,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,每个观测时间点针刺 1 次。对各组大鼠术后 6 h、24 h、3 d 进行神经功能评定后,均开胸暴露心脏,先后用 0.85% 盐水及福尔马林溶液各 100 ml 心脏灌注,以将大鼠体内血液冲净(从右房流出的液体变清)为宜,然后断头取脑,将脑组织放入福尔马林溶液中固定,以备免疫组织化学检测。

1.5 检测指标及方法

**1.5.1 行为学评估** 神经功能评定按 Bederson 等<sup>[2]</sup>制定的标准评分,评分分为 4 级。0 级(分):未见行为缺陷;1 级(分):前肢屈曲;2 级(分):侧推抵抗力下降(即侧向推力实验阳性)伴前肢屈曲,无转圈行为;3 级(分):同 2 级行为伴自发性旋转。

**1.5.2 免疫组化染色程序** 二甲苯脱蜡、酒精脱苯, PBS 冲洗 2 min×3 次,水化组织切片;3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 去离子水孵育 10 min,阻断内源性过氧化物酶;枸橼酸钠高压修复 2 min, PBS 冲洗 2 min×3 次;滴加一抗置入 4℃ 冰箱过夜, PBS 冲洗 2 min×3 次;滴加山羊抗小鼠 IgG 抗体-HRP 多聚体, 37℃ 孵育 20 min, PBS 冲洗 2 min×3 次;DAB 显色;自来水充分冲洗;1% 苏木素复染,自来水冲洗 5 min;梯度酒精脱水,二甲苯透明;封片剂封片。

结果判定:每张切片不同部位在显微镜的目镜下选 4 个视野,观察 bcl-2 阳性细胞数目,取其平均值。bcl-2 神经元胞浆呈棕黄色染色为阳性。

**1.6 统计学分析** 应用 SPSS 13.0 统计软件进行统计学处理。组间均数比较采用 *q* 检验,以 *P*<0.05 作为差异具有统计学意义。

2 结果

**2.1 神经功能评分** 模型组在 3 d 时神经功能评分与 6

h 评分比较,差异具有统计学意义(*P*<0.05),头穴丛刺组在 3 d 时神经功能评分明显减少,与 6 h、24 h 比较(*P*<0.05, *P*<0.01)。与假手术组比较,模型组、头穴丛刺组大鼠造模后不同时间点神经功能评分有显著性差异(*P*<0.05);与模型组比较,头穴丛刺组大鼠在治疗 3 d 后神经功能评分明显低于模型组(*P*<0.01)。见表 1。

表 1 各组大鼠不同时间点神经功能评分比较

组别	n	6 h	24 h	3 d
A	8	0	0	0
B	8	2.75±0.46 <sup>a</sup>	2.63±0.52 <sup>a</sup>	2.13±0.64 <sup>a</sup>
C	8	2.63±0.52 <sup>a</sup>	2.38±0.52 <sup>a</sup>	1.50±0.53 <sup>a,b</sup>

注: a.与 A 组比较: *P*<0.05; b.与 B 组比较: *P*<0.01。

**2.2 bcl-2 表达** 模型组术后不同时间点在缺血半暗区 bcl-2 均有不同程度的表达增多,24 h 时达到高峰,均高于组内其它时间点(*P*<0.05)。头穴丛刺组 bcl-2 亦在 24 h 时表达最明显。模型组和头穴丛刺组与假手术组在 6 h、24 h、3 d 时间点比较,均有高度显著性差异(*P*<0.01);头穴丛刺组在 6 h、24 h、3 d 时间点与模型组比较, bcl-2 表达均明显增高(*P*<0.01)。见表 2。

表 2 不同时间点各组大鼠缺血半暗区 bcl-2 表达的比较 (阳性细胞数)

组别	n	6 h	24 h	3 d
A	8	6.25±0.71	6.13±0.99	6.38±0.74
B	8	8.75±1.39 <sup>a</sup>	10.75±1.83 <sup>a</sup>	8.63±1.41 <sup>a</sup>
C	8	13.50±2.07 <sup>a,b</sup>	24.63±2.62 <sup>a,b</sup>	12.25±1.28 <sup>a,b</sup>

注: a.与 A 组比较: *P*<0.01; b.与 B 组比较: *P*<0.01。

3 讨论

**3.1 头穴丛刺法对大鼠 MCAO 后行为学的影响** 神经功能评估反映缺血性脑损伤的程度,而且与皮层缺血坏死神经元的数目密切相关。本实验采用 Bederson 神经功能评分对比观察各组大鼠 MCAO 术后不同时间神经行为的改变。结果显示,组内比较,模型组在 6 h、24 h 时神经功能评分比较差异无统计学意义(*P*>0.05),但在 3 d 时神经功能评分低于 6 h 评分组(*P*<0.05),可见随着缺血时间的延长,模型组大鼠神经功能缺损在一定程度上存在自发性的恢复过程;头穴丛刺组 3 d 神经功能评分明显低于 6 h 针刺组和 24 h 针刺组(*P*<0.05, *P*<0.01)。与模型组比较,头穴丛刺组在术后 6 h、24 h 比较,差异无统计学意义(*P*>0.05),这可能与大鼠 MCAO 术后脑水肿程度较重有关,而头穴丛刺治疗 3 d 后,神经功能评分减少明显低于模型组(*P*<0.01),该结果在一定程度上反映针刺量的累积直接影响脑梗死的治疗疗效,早期进行头穴丛刺治疗能明显改善大鼠的神经功能评分,方法简单,疗效确切。其针刺效应的发挥可能为:通过丛刺头部穴区,改变脑皮层神经细胞的兴奋性,纠正抑制性泛化,使



可逆性神经细胞复活或被抑制的神经细胞觉醒,从而促进神经功能的恢复。

**3.2 抑凋亡基因 bcl-2 与脑梗死** bcl-2 是一种重要的抑制神经元凋亡蛋白,可以通过与促凋亡蛋白形成异源二聚体从而达到抑制凋亡的目的,在维持神经细胞存活方面发挥着关键作用。脑缺血后 bcl-2 的过量表达可抑制由于谷氨酸释放、血清及生长因子缺乏、膜过氧化物和自由基等刺激诱导的中枢神经细胞死亡。bcl-2 基因治疗对缺血性脑梗死有明显治疗作用,是保护神经细胞在遭受致命损伤后免于死亡的一种积极生存机制。在大鼠局灶性脑缺血模型中, bcl-2 阳性细胞表达水平随缺血时间及再灌注时间呈动态变化。蒋氏等发现,在脑缺血再灌注的早期梗死灶周边即有 bcl-2 蛋白开始表达, 3~6 h 达到高峰, 24 h 开始逐渐降低<sup>[3]</sup>。冯氏等研究表明,脑缺血 2 h 再灌注 2 h 后 bcl-2 表达升高, 6 h 达到高峰, 12 h 开始下降,随着脑缺血再灌注时间延长脑损伤加重, bcl-2 蛋白表达减少<sup>[4]</sup>。于氏等报道,大鼠全脑缺血再灌注损伤后 bcl-2 表达至再灌注 12 h 达高峰,再灌注 24~72 h 逐渐减弱<sup>[5]</sup>。张氏等观察到,脑缺血再灌注早期 bcl-2 蛋白即有表达,再灌注 24 h 达高峰后逐渐降低<sup>[6]</sup>。陈氏等在观察脑缺血预处理对 bcl-2 表达的影响时发现,大鼠皮质和纹状体缺血区域 bcl-2 表达于缺血预处理再灌注 1 d 时明显增加,再灌注 3 d 时达高峰,以后逐渐下降,第 7 天仍高于空白对照组水平<sup>[7]</sup>。

本研究结果显示,大鼠 MCAO 后不同时间点缺血半暗区 bcl-2 均有不同程度的表达增多, 24 h 达到高峰,随后 bcl-2 表达下降。脑缺血后 bcl-2 峰值出现时间的差异可能与动物模型建立的方法不同有关。

有研究发现,大鼠脑缺血后不同时间 Bcl-2 及 Bax 蛋白的表达水平发生变化,认为 Bcl-2/Bax 的比例失衡可能是大鼠脑缺血后神经细胞凋亡的机制之一<sup>[8-10]</sup>。关于针刺对脑缺血大鼠凋亡相关基因的影响,学者们有不同的体会。如针刺百会、大椎穴可上调脑缺血再灌注大鼠脑组织海马区 bcl-2 蛋白的表达、下调 Bax 蛋白的表达,减轻脑损害<sup>[11]</sup>;早期针刺足三里、外关穴,可使急性脑梗死大鼠梗死灶周围组织中 bcl-2 的表达增高, Bax 表达下降,从而保护脑神经细胞<sup>[12]</sup>;大鼠局灶性脑缺血后 6 h、24 h、48 h、72 h 不同时间点,电针百会、曲鬓、前顶穴均可使半暗带 Bcl-2 蛋白的表达增多,而 6 h、24 h、48 h 时间点, Bax 蛋白的表达减少,从而抑制神经细胞凋亡<sup>[13]</sup>;另有研究报道,不同的针刺方法也可促进脑梗死大鼠缺血半暗区 bcl-2 的表达<sup>[14-16]</sup>,抑制促凋亡因子 Bax 的表达<sup>[16-17]</sup>,使 Bcl-2/Bax 相对升高,从而减轻脑缺血时神经功能障碍。

碍。

本研究结果显示,头穴丛刺可通过促进 MCAO 大鼠缺血半暗区 bcl-2 的表达,抑制神经细胞凋亡,挽救缺血半暗区神经细胞的功能,从而降低脑梗死后的致残率,为该方法在临床的推广应用提供了实验证据。

#### [参考文献]

- [1] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91.
- [2] Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, et al. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination [J]. Stroke, 1986, 17(3): 472-476.
- [3] 蒋杞英,王志新,符凤英. 大鼠局灶性脑缺血再灌注脑组织神经细胞凋亡与 Bcl-2、Bcl-xl 蛋白检测[J]. 郑州大学学报(医学版), 2004, 39(3): 428-431.
- [4] 冯建玉,滕军放,姜晓蕊. 大鼠局灶性脑缺血再灌注后 Bcl-2 蛋白在大脑皮质的表达[J]. 实用神经疾病杂志, 2005, 8(3): 43-44.
- [5] 于哩哩,李桂兰,毕长柏,等. 大鼠全脑缺血再灌注损伤后调控基因 Bcl-2、Bax 的表达及与细胞凋亡的关系[J]. 脑与神经疾病杂志, 2006, 14(6): 446-447.
- [6] 张正春,孔岩,郑世营,等. 局灶性脑缺血再灌注损伤细胞凋亡相关基因表达的研究[J]. 苏州大学学报(医学版), 2006, 26(6): 927-929.
- [7] 陈道文,周永,赵薛旭,等. 大鼠脑缺血预处理再灌注模型 Bcl-2 和 Bax 的表达[J]. 临床神经病学杂志, 2006, 19(1): 48-49.
- [8] de Falco M, Laforgia V, Fedele V, et al. Vasoactive intestinal peptide stimulation modulates the expression of Bcl-2 family members in the adrenal gland of the lizard *Podarcis sicula* [J]. Histochem J, 2001, 33(11-12): 639-645.
- [9] 刁尧,李亚明,陈春梅,等. Bcl-2 和 Bax 蛋白在大鼠脑缺血预处理脑组织中的表达及意义[J]. 中国医科大学学报, 2005, 34(3): 227-228.
- [10] 郭云良,高英茂. 脑缺血再灌注后神经元和内皮细胞凋亡与 Bcl-2 和 Bax 表达的时相关系[J]. 解剖学报, 2002, 33(2): 151-155.
- [11] 武登华,王光义. 针刺结合亚低温对局灶性脑缺血再灌注大鼠 Bcl-2 及 Bax 蛋白表达的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2011, 31(11): 1506-1509.
- [12] 何娜,朱春雷,何欣. 针刺治疗脑梗死对神经元保护作用机制的实验研究[J]. 当代医学, 2012, 18(9): 3-4.
- [13] 孙世晓,刘泓雨,杨春壮,等. 电针对局灶性脑缺血大鼠半暗带神经细胞凋亡及凋亡相关基因 Bcl-2、Bax、c-Fos 蛋白表达的影响[J]. 中医药学报, 2011, 39(1): 65-68.
- [14] 倪金霞,高维滨,朱文增. 项针疗法对急性脑梗死大鼠病理学及 Bcl-2 的影响[J]. 针灸临床杂志, 2007, 23(6): 46-47.
- [15] 刘星,宿宝贵,吕来清,等. 电针上调脑梗塞大鼠皮质缺血半暗区 Bcl-2 的表达[J]. 解剖学杂志, 2010, 32(2): 88-92.
- [16] 卜渊,耿德勤,曹金霞,等. 电针药氧对大鼠全脑缺血再灌注后 Bcl-2、Bax 蛋白表达的影响[J]. 针灸临床杂志, 2010, 26(11): 52-55.
- [17] 彭兴甫,彭英,朱德军,等. 针灸对脑梗死大鼠患侧 CA1 区 Bax 的影响[J]. 现代临床医学, 2011, 37(1): 37-39.

(收稿日期:2012-08-17 修回日期:2012-08-28)