

电针对脑缺血大鼠血管生成素及其受体表达的影响*

崔晓¹ 胡永善² 吴毅² 徐丽丽² 叶文成¹ 白玉龙² 郑庆平² 曾慧玲¹ 朱大年³

摘要 目的:观察电针能否促进大鼠局部脑缺血再灌注后的功能恢复,并观察电针对血管生成素及其受体表达的影响,从而探讨其促进功能恢复的内在机制。**方法:**成年雄性 SD 大鼠 18 只,随机分成电针组、对照组和假手术组,每组 6 只。大脑中动脉闭塞(MCAO)法造模 24h 后,电针组给予针刺百会、曲池、足三里,每天 30min,连续治疗 2 周,对照组及假手术组以相同的方法予以抓取和固定。采用神经行为学评分评价神经功能恢复情况;免疫组化法从蛋白水平观察 Ang-1、2、Tie-2 的表达情况。**结果:**2 周后,电针治疗组的神经行为学评分明显高于对照组($P<0.05$),并低于假手术组($P<0.05$);Ang-1、Ang-2 及 Tie-2 的表达显著高于对照组($P<0.05$)。**结论:**电针能够促进脑缺血大鼠神经功能恢复,这种改变可能与 Ang/Tie-2 通路上调有关。

关键词 脑缺血;电针;血管生成素

中图分类号:R743,R493 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2007)-10-0877-04

The effect of electro-acupuncture on the expression of angiopoietin after focal brain ischemia in rats/CUI Xiao, HU Yongshan, WU Yi, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2007, 22(10): 877—880

Abstract Objective: To investigate whether electro-acupuncture can improve neurological function and up-regulation the expression of Angiopoietin/Tie pathway after focal brain ischemia. **Method:** Eighteen male adult Sprague-Dawley rats were subjected to 60min right middle cerebral artery occlusion(MCAO). All rats were randomly assigned to one of the three groups: electro-acupuncture group, 2 week control group and sham group. Electro-acupuncture group undergo 30min electro-acupuncture treatment per day for 2 weeks. **Result:** After 2 weeks, the neurological score of electro-acupuncture group were higher when compared with spontaneous recovery ($P<0.05$). Angiopoietin-1, angiopoietin-2 and its receptor Tie-2 were up-regulated in electro-acupuncture group ($P<0.05$). **Conclusion:** Electro-acupuncture can improve neurological function after focal brain ischemia, which may associated with the up-regulation of Angiopoietin/Tie pathway.

Author's address Shanghai Changning District Tianshan Hospital of Traditional Chinese Medicine, 200051

Key words cerebral ischemia; electro-acupuncture; angiopoietin

电针作为一种传统的康复治疗方法,应用于脑梗死治疗已有二十几年的历史,其治疗缺血性脑损伤疗效的确切性已被大量临床试验所证实。减轻血管内皮损伤、促进血管新生在缺血性脑损伤的功能恢复中发挥着非常重要的作用。血管生成素-1(angiotensin, Ang-1)可以减轻脑缺血后血脑屏障的渗漏、减小梗死体积^[1];而血管生成素-2(Ang-2)可在血管内皮细胞生长因子的共同作用下,促进微血管的生成^[2]。因此,本研究试图观察电针治疗对血管生成素及其受体表达的影响,从而探讨电针治疗促进脑缺血后神经功能恢复的可能机制。

1 材料与方法

1.1 动物与分组

雄性成年 SD 大鼠(上海中科院提供,清洁级),体重 220—250g,2.5 月龄,18 只。在进行大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)造模手术前随机分为:电针治疗组(electro-acupuncture,

EA 组)、静止对照组(stroke-noexercise, SNE 组)、假手术组(Sham 组)。每组 6 只。笼内饲养,给予充足的食物和饮水,每日 12h 光照,室温 $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ 。

1.2 大鼠大脑中动脉缺血/再灌注模型(MCAO/R)制备

采用 Longa^[3]线栓法阻塞大鼠右侧大脑中动脉造成缺血。大鼠经 10%水合氯醛(300mg/kg, i.p.)麻醉后,行颈部正中切口,钝性分离右侧颈总动脉、右颈外动脉和右颈内动脉。结扎右颈外动脉分支枕动脉、甲状腺上动脉,动脉夹暂时夹闭右颈内动脉分支翼腭动脉。结扎并剪断右颈外动脉远心端,斜剪一切口,将预先处理过的尼龙线的圆钝端延切口插入近

* 基金项目:上海市长宁区卫生局科研基金资助项目(2004104001);复旦大学基础-临床医学交叉研究基金资助项目,编号校 200681

1 上海市长宁区天山中医医院康复医学科, 200051

2 复旦大学附属华山医院康复医学科

3 复旦大学上海医学院

作者简介:崔晓,女,副主任医师

收稿日期:2007-08-02

心端。将颈外动脉的近心端拉至与右颈内动脉成一直线,沿右颈内动脉缓慢推进尼龙线,直至尼龙线顶端有阻塞感,约距右颈总动脉分叉 18—20mm 处。缺血 60min 后,缓慢退出尼龙线,缝合皮肤。在手术过程中,大鼠肛温控制在 $37\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 。清醒后回笼,自由进食。假手术组的手术步骤同缺血组,只是尼龙线栓不入颅,不阻塞大脑中动脉。

1.3 处理方法

电针组:于造模后 24h 对动物进行电针治疗,根据中国针灸学会实验针灸研究会 1992 年制定的《实验动物穴位标准》定位,选用“百会”、“曲池”及“足三里”穴。选用苏州医疗用品有限公司生产的直径为 0.40mm、长 25mm 的华佗牌不锈钢毫针,电针治疗采用 G9805-C 的电针治疗仪(上海)。在大鼠缺血再灌注后 24h,针灸组予以电针治疗,采用疏密波,4/20Hz,电流大小以大鼠上肢出现轻微抖动且能安静耐受为度。每天 30min,每周 5d,连续治疗 2 周。

1.4 神经功能缺失体征评分

依照 Longa 等^[3]的方法,大鼠神经行为学评分于术后 24h、1 周、2 周分别进行评定。使用 6 分法评价大鼠脑缺血后运动及行为学缺陷,具体如下:5 分:正常;4 分:对侧前肢持续弯曲;3 分:瘫痪侧抵抗侧推力的能力下降;2 分:拉鼠尾时向瘫痪侧旋转;1 分:大鼠自由行动时向瘫痪侧旋转;0 分:鼠被放在地面上无自发活动。将术后 24h 评分为 2—4 分的大鼠选入组。

1.5 脑组织冰冻切片

大鼠脑组织采用灌注法固定。经蔗糖梯度脱水下沉后连续冠状冰冻切片(2.0—4.0mm, Bregma 平面),自视交叉出现开始,至腹侧海马出现为止,片厚 30 μm 。切片置脑保护液, -20°C 保存。

1.6 免疫组织化学染色

选取 Bregma 0.2mm 的脑片(以前连合后部出现为特征)从保护液中挑出(每只取 6 张脑片),依次进行以下实验操作:PBS 漂洗 $\rightarrow$ 0.3% H_2O_2 室温 20min $\rightarrow$ PBS 漂洗 $\rightarrow$ 5%BSA 封闭液 37°C 20min $\rightarrow$ 用兔多克隆抗 Ang-1 抗体(1:200)、兔多克隆抗 Ang-2 抗体(1:200)、兔多克隆抗 Tie-2 抗体(1:200)在 37°C 孵育 1h, 4°C 过夜 $\rightarrow$ PBS 漂洗 $\rightarrow$ 即用型生物素化的抗兔 IgG 37°C 孵育 20min $\rightarrow$ PBS 漂洗 $\rightarrow$ 亲和素-过氧化物酶复合物 37°C 孵育 20min $\rightarrow$ PBS 漂洗 $\rightarrow$ DAB(试剂均购自武汉博士德)显色 5—10min。切片呈色后移于蒸馏水中终止反应 $\rightarrow$ 常规脱水、透明、封片。

每组设一张阴性对照,用 PBS 代替一抗进行孵育,其余步骤同上。

阳性表达的测定:阳性结果为胞浆中出现棕黄色颗粒。选取纹状体背侧的额顶叶皮质(缺血周边区)及纹状体背外侧(缺血中心区),经 Olympus BX5 显微镜采用 40 倍物镜采集图像,读取每视野棕黄色颗粒数。每张大鼠脑片相应区域随机选取 6 个视野进行计数分析。

1.7 统计学分析

数据采用 SPSS11.5 统计软件进行分析。所有定量数据进行正态性和方差齐性检验,多组均数间的比较采用单因素方差分析。计量资料符合正态性分布者以均数 $\pm$ 标准差表示, $P<0.05$ 为差异有显著性意义;计数资料以中位数表示,组间差异用 Kruskal-Wallis analysis 比较,组内不同时间比较采用配对资料的非参数检验。

2 结果

2.1 神经行为学评分

术后 24h,电针组与对照组的神经行为学评分没有明显差异,但两组的评分均显著小于假手术组,表明造模成功。干预 1 周后,电针组神经行为学评分明显高于对照组且一直持续到 2 周末 ($P<0.05$),见表 1。

表 1 各组大鼠 MCAO 术后神经行为学评分

组别	24h	1 周	2 周
电针组	3	3.5 ^{①③}	4 ^{①②③}
对照组	2.5	3	3 ^③
假手术组	5	5	5

①与对照组比较 $P<0.05$;②与第 1 周的评分相比 $P<0.05$;③与术后 24h 相比 $P<0.05$

2.2 免疫组化染色结果

2.2.1 形态学改变:实验发现,血管生成素及其受体阳性细胞主要分布在缺血侧的额顶叶皮质上,即缺血周边区;在缺血侧海马区也有少量的表达;缺血侧的 Ang/Tie 阳性染色主要呈神经元样,卵圆形或锥性,核大而圆,常有突起存在;从缺血中心区到缺血周边区,其数量逐渐增加;少部分阳性染色为内皮细胞样,在缺血中心区和周边区均匀分布,如图 1。

2.2.2 梗死周边 Ang-1、Ang-2 及受体 Tie-2 的表达:对照组大鼠梗死灶周围 Ang-1、Ang-2 表达均高于假手术组,差异有显著性意义 ($P<0.05$);电针组大鼠脑梗死灶周边 Ang-1、Ang-2 及 Tie-2 的表达均高于对照组,差异有显著性意义 ($P<0.05$),见表 2。

3 讨论

在脑缺血性损伤中,血管内皮细胞损伤是脑缺血损害的早期病变和基本原因。血管内皮细胞的损伤导致血脑屏障功能障碍,促进脑水肿的形成;而脑

表 2 各组梗死灶周边 Ang-1、2 及 Tie-2 的表达 ($\bar{x} \pm s$)

组别	Ang-1	Ang-2	Tie-2
电针组	44.82±10.07 ^{①②}	47.97±9.75 ^{①②}	45.42±9.69 ^{①②}
对照组	31.85±7.16 ^②	28.02±5.1 ^②	24.42±6.06
假手术组	13.26±1.61	12.3±6.31	15.98±8.49

①与对照组相比 $P<0.05$ ②假手术组相比 $P<0.05$ 

图 1 电针组缺血周边 Ang-2 的表达

水肿可进一步导致脑缺血损伤,形成恶性循环,加重缺血区神经细胞的损伤。而在损伤后期,新生微血管的形成又是脑损伤恢复的关键所在。因此,如能在脑缺血的早期采取措施保护内皮细胞,减轻脑水肿的程度;促进缺血区新生血管的形成对脑缺血患者的神经功能恢复是至关重要的。

血管生成素(angiotensins, Ang)是一族特异性作用于血管内皮细胞的生长因子,最近的研究发现它们在血管内皮凋亡、血管形成后期的成熟、稳定性及重建方面扮演着非常重要的角色^[4]。Ang 家族中的 Ang-1 和 Ang-2 均可与其血管内皮特异性酪氨酸激酶受体(Tie-2)结合:Ang-1 与受体 Tie-2 结合后,促进表达活化 Tie-2 的血管内皮细胞萌芽和分支,募集内皮周围支持细胞,促进血管重塑和成熟,形成完整的血管壁,并通过调节内皮细胞和血管周围间质细胞的相互作用维持血管管腔的完整性和稳定性,向梗死灶生长^[2];同时活化内皮细胞磷脂酰肌醇激酶,使凋亡抑制剂生成增多,对抗内皮细胞凋亡,减轻缺血性脑卒中后大鼠血脑屏障通透性的增加;Ang-2 则在血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的协同下,能促进血管增生^[6],表现出血管生成的协同效应。

脑缺血性损伤发生后,机体有一定程度的自发修复,如缺血^[6-7]、缺氧^[8]等一系列病理生理改变可以上调血管生成素及其受体的表达;本实验也证实,对照组 Ang-1、Ang-2 的表达与假手术组相比有所增加($P<0.05$),并伴随一定程度的神经行为学改善,这种改善直到梗死后 2 周才比较明显。这说明脑梗死后的自发修复的确存在,但是比较缓慢,效果也不够显著。与此相比,电针治疗组 Ang-1、Ang-2 及 Tie-2 的表达与对照组相比均明显增加($P<0.05$),且神经行为学改善在治疗 1 周后就很明显($P<0.05$),这都证明了电针治疗在促进脑梗死后神经功能恢复方面的促进作用。值得强调的是,电针治疗组的神经行为

学改善随着治疗时间的延长更加明显,治疗 2 周后的神经行为学评分高于治疗 1 周时的评分($P<0.05$)。

脑梗死属中医“中风”范畴,早在《黄帝内经》中就有记载,《素问·生气通天论》云:“阳气者,大怒则行气绝,则血菀于上,使人薄厥”。《素问·调经论》云:“血之于气,并走于上,则为大厥”。针灸这一传统疗法在脑缺血的治疗中有其独到之处,Lo 等的研究表明针灸可以改善患者的运动功能^[9],Hopwood 等^[10]研究显示针灸能够提高患者的独立性,还有学者认为针灸能显著提高患者的自理能力,改善精神状态^[11]。百会居头之颠,是督脉之要穴,为手足三阳、督脉及足厥阴之会,统领一身之阳,内系于脑。Wang 等^[12]研究发现,对脑缺血后大鼠百会穴施行电针可以促进神经功能的恢复、减小梗死体积,增加 VEGF 的表达,Ren 等^[13]则报道电针针刺百会穴能引起神经生长因子的表达增多,还有研究显示针刺百会穴可以减轻脂质过氧化反应^[14];且缺血前对实验大鼠进行预针刺可以增强大鼠对脑缺血损伤的抵抗力^[15]。本实验以百会穴为主,体穴取曲池、足三里阳明经穴,针刺督脉百会以振奋周身之阳气,疏通经络、健脑补髓、醒脑开窍;取阳明经穴,以疏通经脉,调和气血。

综上所述,本实验表明电针治疗可以促进脑缺血性损伤后的神经功能恢复,增加 Ang-1、Ang-2 及 Tie-2 的表达,电针对神经功能改善促进作用随着治疗时间的延长更加明显。

参考文献

- [1] Zhang ZG, Zhang L, Croll SD, et al. Angiotensin-1 reduces cerebral blood vessel leakage and ischemic lesion volume after focal cerebral embolic ischemia in mice [J]. Neuroscience, 2002, 113: 683—687.
- [2] Zhu Y, Lee C, Shen F, et al. Angiotensin-2 facilitates vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis in the mature mouse brain [J]. Stroke, 2005, 36 (7): 1533—1537.
- [3] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. Stroke, 1989, 20(1):84—91.
- [4] Ardelt AA, McCullough LD, Korach KS, et al. Estradiol regulates angiotensin-1 mRNA expression through estrogen receptor- α in a rodent experimental stroke model [J]. Stroke, 2005, 36(2): 337—341.
- [5] Valable S, Montaner J, Bellail A, et al. VEGF-induced BBB permeability is associated with an MMP-9 activity increase in cerebral ischemia: both effects decreased by Ang-1 [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2005, 25(11): 1491—1504.
- [6] Lin TN, Nian GM, Chen SF, et al. Induction of Tie-1 and

- Tie-2 receptor protein expression after cerebral ischemia-reperfusion [J]. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism, 2001, 21(6):690—701.
- [7] Lin TN, Wang CK, Cheung WM, et al. Induction of angiopoietin and Tie receptor mRNA expression after cerebral ischemia-reperfusion [J]. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism, 2000, 20(2):387—395.
- [8] Ward NL, Moore E, Noon K, et al. Cerebral angiogenic factors, angiogenesis, and physiological response to chronic hypoxia differ among four commonly used mouse strains [J]. Journal of Applied Physiology, 2007, 102(5):1927—1935.
- [9] Lo YL, Cui SL, Fook-Chong S. The effect of acupuncture on motor cortex excitability and plasticity [J]. Neurosci Lett, 2005, 384(1-2):145—149.
- [10] Hopwood V. Does acupuncture help stroke patients become more independent [J]. Journal of Alternative & Complementary Medicine, 2005, 11(1):175—177.
- [11] Xu YL. Effects of acupuncture combined with modern rehabilitation technique at early stage on life self-care ability and mental state of the patient of stroke [J]. Zhongguo Zhenjiu, 2005, 25(5):304—306.
- [12] Wang SJ, Omori N, Li F, et al. Functional improvement by electro-acupuncture after transient middle cerebral artery occlusion in rats [J]. Neurol Res, 2003, 25(5): 516—521.
- [13] Ren XJ, Ma HF, Wang XN, et al. Effect of acupuncture on serum lipid and cerebral neurogrowth factor levels in hyperlipemia rats with concurrent cerebral ischemia [J]. Zhen Ci Yan Jiu, 2007, 32(1):24—28.
- [14] Siu FK, Lo SC, Leung MC. Electroacupuncture reduces the extent of lipid peroxidation by increasing superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities in ischemic-reperfused rat brains [J]. Neurosci Lett, 2004, 354(2):158—162.
- [15] Wang Q, Xiong L, Chen S, et al. Rapid tolerance to focal cerebral ischemia in rats is induced by preconditioning with electroacupuncture: window of protection and the role of adenosine [J]. Neurosci Lett, 2005, 381(1-2):158—162.

(上接 873 页)

- [11] Johansson BB, Haker E, Arbin M, et al. Acupuncture and transcutaneous nerve stimulation in stroke rehabilitation: a randomized controlled trial [J]. Stroke, 2001, 32:707—713.
- [12] 郭友华, 燕铁斌, Hui-Chan CWY. 低频电刺激治疗脑卒中偏瘫的神经机制研究进展 [J]. 中国康复医学杂志, 2005, 20:156—158.
- [13] Gosman-Hedström G, Claesson L, Klingenshierna U, et al. Effects of acupuncture treatment on daily life activities and quality of life [J]. Stroke, 1998, 29:2100—2108.
- [14] Shamay SM, Christina WY Hui-Chan. 经皮电神经刺激在脑卒中康复中的应用: 时尚与事实 [J]. 中华物理与康复医学杂志, 2007, 29(1):56—58.
- [15] Wyon Y, Hammar M, Theodorsson E, et al. Effects of physical activity and acupuncture on calcitonin gene-related peptide immunoreactivity in different parts of the rat brain and in cerebrospinal fluid, serum and urine [J]. Acta Physiol Scand, 1998, 162: 517—522.
- [16] Yan T, Hui-Chan CWY, Li LS. Functional electrical stimulation improves motor recovery of the lower extremity and walking ability of subjects with first acute stroke: a randomized placebo-controlled trial [J]. Stroke, 2005, 36:80—85.
- [17] 潘映福. 临床诱发电位 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2007. 112—176.
- [18] Jablonka JA, Witte OW, Kossut M. Photothrombotic infarct impairs experience-dependent plasticity in neighboring cortex [J]. Neuroreport, 2007, 18(2):165—169.
- [19] Yozbatiran N, Donmez B, Kayak N, et al. Electrical stimulation of wrist and fingers for sensory and functional recovery in acute hemiplegia [J]. Clin Rehabil, 2006, 20(1):4—11.
- [20] 任芸, 顾旭东, 姚云海, 等. 经皮神经电刺激结合运动疗法治疗脑卒中后肩痛的疗效观察 [J]. 中国康复理论与实践, 2006, 12(7): 601—602.
- [21] Dietrichs E. Brain plasticity after stroke—implications for post-stroke rehabilitation [J]. Tidsskr Nor Laegeforen, 2007, 127(9): 1228—1231.
- [22] Dancause N. Neurophysiological and anatomical plasticity in the adult sensorimotor cortex [J]. Rev Neurosci, 2006, 17(6): 561—580.
- [23] Woldag H, Hummelsheim H. Evidence-based physiotherapeutic concepts for improving arm and hand function in stroke patients [J]. J Neurol, 2002, 249:518—528.