

## · 基础研究 ·

## 针刺对局灶性脑缺血大鼠血清髓鞘碱性蛋白含量和缺血灶髓鞘再生的影响

段建钢<sup>1</sup> 刘 鸣<sup>1,2</sup>

**摘要 目的:**探讨针刺对缺血性脑卒中大鼠受损脑髓鞘的保护作用。**方法:**选用 100 只成年雄性 SD 大鼠,随机分为正常组(N)、MCAO 模型组(C<sub>+</sub>)、早期针刺组(E<sub>2</sub>)、晚期针刺组(E<sub>3</sub>),用改良的线栓法制备右侧大脑中动脉阻塞(MCAO)的局灶性脑缺血再灌注模型,采用“醒脑开窍针刺”法进行针刺,用 Pal-Weigert 髓鞘特殊染色法和 ELISA 法动态观察各组在 1d、3d、5d、7d 时脑髓鞘的再生情况和血清髓鞘碱性蛋白(MBP)的含量。**结果:**在各个时间点,C<sub>+</sub>组内囊有明显的髓鞘脱失,且血清 MBP 含量也明显升高;针刺组在各个时间点的髓鞘脱失程度明显减轻,且血清 MBP 含量升高的幅度明显低于模型组。E<sub>2</sub> 组的血清 MBP 含量达到峰值的时间比 E<sub>3</sub> 组晚。**结论:**针刺可能通过明显激发脑的可塑性潜能及其他机制,促进 MCAO 大鼠缺血损伤区的髓鞘再生。针刺治疗的时间窗可能在缺血后脑损伤的恢复中扮演重要的角色。

**关键词** 针刺;局灶性脑缺血;髓鞘碱性蛋白;髓鞘再生

中图分类号:R743.3, R246 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2007)-02-0118-04

**Effect of acupuncture on content of serum myelin basic protein and remyelination of ischemic focus in rats of focal cerebral ischemia/DUAN Jiangang, LIU Ming//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2007, 22 (2): 118—121**

**Abstract Objective:** To study the protective effect of acupuncture on injured cerebral myelin in rats of focal cerebral ischemia-reperfusion. **Method:** 100 adult male SD rats were employed in the study, which were randomly divided into normal(N), middle cerebral artery occlusion(MCAO) model(C<sub>+</sub>), early acupuncture(E<sub>2</sub>), late acupuncture(E<sub>3</sub>) group. Focal cerebral ischemia-reperfusion model was established by MCAO on the right side with modified thread embolism method. Xingnao kaiqiao needling method was applied for treatment. For each group, we continuously observed content of serum myelin basic protein (MBP) and remyelination of brain on the 1st, 3rd, 5th and 7th day by Pal-Weigert's myelin staining and ELISA methods respectively. **Result:** At appointed time, massive demyelination happened in the internal capsule of group C<sub>+</sub> and the content of serum MBP apparently increased. As for the acupuncture group, the extent of demyelination was lightened distinctly and the content of serum MBP was much lower than that of group C<sub>+</sub> at appointed time. While the content of serum MBP reached peak E<sub>2</sub> group was late than that of E<sub>3</sub> group. **Conclusion:** Acupuncture treatment could contribute to remyelination of ischemic region of MCAO rats, which maybe apparently activate plasticity potential and other mechanism in the brain. Time window of acupuncture treatment maybe play an important role during recovery of brain injured after ischemia.

**Author's address** Dept. of Neurology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu, 610041

**Key words** acupuncture; focal cerebral ischemia; myelin basic protein; remyelination

在临床上应用“醒脑开窍”针刺法对缺血性脑卒中进行治疗已取得了明显的疗效<sup>[1]</sup>,在偏瘫治疗中,肢体功能的康复与针刺的早期使用发挥着举足轻重的作用。近期也有一些报道称临床上针刺治疗缺血性脑白质损伤也是有效的<sup>[2]</sup>。有关缺血对脑白质结构影响方面的研究较少,白质通常认为比灰质对缺血更耐受。然而,随着现代神经影像学技术应用频率的逐渐增加,临床上见到中枢神经系统(central nerve system, CNS)的很多疾病存在白质损伤,在正常老年人中也发现大量的脑白质损伤<sup>[3]</sup>。研究表明<sup>[4-5]</sup>,在大

鼠大脑中动脉永久性闭塞模型中,脑白质对局灶性脑缺血是高度敏感的。而少突胶质细胞(oligodendrocyte, OLs)形成的髓鞘就是脑白质的重要组成部分,针刺是否可以通过对缺血性脑卒中后受损髓鞘的保护作用来发挥其治疗作用尚未见报道,为此,本文采用 ELISA 法和髓鞘特殊染色法,对

1 四川大学华西医院神经内科,成都,610041

2 通讯作者:刘鸣(四川大学华西医院神经内科,成都,610041)

作者简介:段建钢,男,硕士学位,在读博士研究生,住院医师

收稿日期:2006-06-26

在不同时间窗进行针刺的缺血性脑卒中大鼠在针刺后不同时间点的血清髓鞘碱性蛋白 (myelin basic protein, MBP) 含量和缺血灶的髓鞘再生进行动态观察, 以便初步探讨针刺治疗受损脑白质的分子机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物分组与造模

**1.1.1 动物分组:** 选体重在 250—300g 的健康雄性 SD 大鼠 (四川大学实验动物中心提供) 100 只, 用随机数字表的方法分成以下四组: 正常组 (N)、缺血再灌注模型组 ( $C_+$ )、缺血再灌注早期针刺组 ( $E_2$ )、缺血再灌注晚期针刺组 ( $E_3$ ); 除 N 组外, 每组又分成 5 个时间点进行检测: 造模前的 0h 和造模后 1d、3d、5d、7d。其中  $E_2$  和  $E_3$  组在针刺治疗开始的时间窗上有区别,  $E_2$  组是在缺血 30min 时开始针刺,  $E_3$  组是在缺血 2h 拔线实现再灌注后给予针刺治疗。正常组为 4 只, 造模后每个时间点的鼠均为 8 只。

**1.1.2 造模:** 在 Zea Longa 法基础上, 采用改良的线栓法制备大鼠右侧大脑中动脉阻塞 (middle cerebral artery occlusion, MCAO) 的局灶性脑缺血再灌注模型, 大鼠术前 12h 禁食不禁水, 以 10% 水合氯醛 (0.3ml/100g) 腹腔麻醉。置仰卧位, 常规去毛和消毒后, 于颈部行长约 25.0mm 的常规纵向切口。暴露并钝性游离右侧颈总动脉 (CCA)、颈内动脉 (ICA)、颈外动脉 (ECA) 和迷走神经, 在 CCA 下绕两根线、ECA 下绕一根线, 将 CCA 远心端的线之右端穿过 ECA 的下方, 使其绕过 ICA, 结扎 CCA 近心端和 ECA 近分叉部的线, 用左手向右侧轻悬吊 CCA、ICA 下方的线, 使其在一条直线上, 在 CCA 上距其末端约 3.0mm 处剪一小口, 见血液流出后, 用长 6 cm、直径 0.26mm、头端蘸蜡的渔线沿 ICA 方向插入约  $18.0 \pm 0.5$  mm, 至大脑中动脉起始段, 稍遇到阻力后, 停止插入, 然后于 ICA 近心端结扎该动脉, 全层缝合切口, 并留置长约 4cm 的渔线于体外。在缺血 2h 后拔线约 10mm 实现再灌注。麻醉及手术期间使大鼠肛温保持在 37—37.5℃。N 组不做特殊处理。

### 1.2 模型神经功能缺损评分方法

动物清醒后, 按 Bederson 法进行肢体的神经功能缺损评分<sup>[6]</sup>。标准: 0 分, 无任何神经功能缺失; 1 分, 左前肢屈曲, 不能伸展; 2 分, 侧向抵抗力下降, 伴前肢屈曲, 向左侧行走, 无转圈行为; 3 分, 向左侧转圈, 成追尾状。

### 1.3 治疗方法

动物用自制鼠夹固定, 不麻醉。根据华兴邦等<sup>[7]</sup>制定的大鼠针灸穴位图谱, 主穴: 取双侧内关 (手厥阴心包经)、水沟 (督脉)、双侧三阴交 (足太阴脾经)。

配穴: 百会 (督脉)。采用苏州生产的华佗牌毫针, 规格为: 直径 0.20mm, 针身长 0.25—0.5 寸。选用天津脑卒中研究组创立的“醒脑开窍”针刺法进行针刺: 先直刺双侧“内关”1mm 至筋间, 用捻转提插结合的泻法, 持续 1min, 留针 15min; 继刺水沟, 在鼻中隔下部向上斜刺“水沟”穴 1mm, 施雀啄法强刺激 1min; 其次刺三阴交, 直刺 5mm, 采用提插补法刺激 1min; 最后向前或向后斜刺“百会穴”2mm, 并采用平补平泻的捻转手法, 转角度 180°左右, 施手法 1min, 留针 15min, 留针期间各行针 2—3 次。1 次/d, 连续治疗, 最长的疗程为 7d。

### 1.4 血清 MBP 标本检测

从 N 组 4 只鼠的鼠尾静脉采血 1ml,  $C_+$ 、 $E_2$ 、 $E_3$  组均在造模前和缺血再灌注后 1d、3d、5d、7d 时分别从 4 只鼠的鼠尾静脉采血 1ml, 收集血清备用。待血液凝固后, 以 1000r/min 离心 5—10 min, 分离至少 100μl 血清, 分别装在塑料 EP 管中, 封口, 尽快置于 -20℃ 冰箱保存, 待测定血清 MBP。检测时采用陈俊杰<sup>[8]</sup>报道的简易的髓鞘碱性蛋白酶联免疫吸附定量测定 (ELISA) 法, 试剂盒由华西医科大学重组 DNA 研究室提供, 最低检出量为 0.25ng/ml, 对各组的测得值进行组间比较和组内比较的统计学处理。

### 1.5 脑髓鞘的形态学染色

用 Pal-Weigert 染色<sup>[9]</sup>显示各组动物在缺血再灌注后不同时间点内囊的髓鞘形态变化, 每个时间点选 4 只动物。具体操作如下: 动物在麻醉后剪开胸腔, 暴露出搏动的的心脏, 将灌注针从心尖插入升主动脉, 先用 100ml 生理盐水经主动脉快速冲洗至右心耳流出液变清亮, 然后以冷 (4℃) 的 4% 多聚甲醛 100ml 灌注, 直到动物前肢伸直、变硬, 整个过程在 10—20min 内完成。快速开颅取脑, 根据大鼠脑的立体定位图谱确定 SD 大鼠内囊所在的冠状切面, 即冠状切取前囟尾侧 1.4—3.2 mm 的脑组织, 置于 4℃ 的 4% 多聚甲醛中后固定 24h。标本经 30% 的蔗糖脱水, 常规制备冰冻切片, 片厚 30mm, 行 Pal-Weigert 髓鞘染色。

### 1.6 统计学分析

使用 SPSS11.0 进行统计学处理, 正态分布数据用均数±标准差表示, 不同组不同时点的比较使用重复测量方差分析, 根据情况进行两两比较。

## 2 结果

### 2.1 Pal-Weigert 髓鞘染色结果

正常神经髓鞘呈天蓝色, 背景为极浅的淡黄色, 脱髓鞘纤维因磷脂消失固不着色。N 组可见内囊的

神经纤维髓鞘染成深蓝色,且着色清晰,背景为极浅的淡黄色(图 1,见前置彩色插页 7);与 N 组相比, $C_+$  组在 1d 时可见内囊的大部分髓鞘崩解、破坏,脱失严重,髓鞘稀疏,部分区域有髓鞘断裂缺失,染色变浅;以后随着时间的推移,髓鞘的颜色逐渐加深,密度逐渐增大(图 2,见前置彩色插页 7),但到第 7d 时与 N 组的髓鞘相比仍有明显的差别, $E_2$ 、 $E_3$  组在第 1d 时与  $C_+$  组相比,内囊的髓鞘脱失明显减少,髓鞘分布较致密,染色较深, $E_2$  组在第 1d 时内囊的髓鞘脱失似乎比  $E_3$  组的轻,以后随着治疗时间的延长, $E_2$ 、 $E_3$  组髓鞘的颜色逐渐加深,密度逐渐增大,到第 7d 时,与 N 组的髓鞘染色没有明显区别(图 3—4,见前置彩色插页 7)。

## 2.2 血清 MBP 含量的测定结果

应用 ELISA 法对动物血清 MBP 的检测结果(表 1)显示:同一组内不同时间点与基线(造模前)

相比, $C_+$  组的血清 MBP 含量在缺血再灌注 1d 时有所升高( $P=0.023$ ),在第 3d 时达到峰值( $P=0.001$ ),以后又缓慢下降,到第 7d 时仍明显高于基线值( $P=0.000$ ); $E_2$ 、 $E_3$  组的血清 MBP 含量在缺血再灌注 1d 时略升高( $P=1.000, 0.094$ ),随着治疗时间的延长, $E_2$  组的血清 MBP 含量缓慢增加,在第 5d 时达到峰值( $P=0.002$ ),以后又迅速下降;而  $E_3$  组的血清 MBP 含量迅速增加,在第 3d 时达到峰值( $P=0.001$ ),以后又迅速下降,到第 7d 时  $E_2$  和  $E_3$  组的血清 MBP 含量略高于基线值( $P=0.001, 0.028$ )。对不同组间相对应时间点的 MBP 值进行比较,在 0h 时各组间的差异无显著性意义;1d 时,仅 N 与  $E_2$  组间的差异无显著性意义( $P=0.721$ );在 1d 时的其他组间及在其余时间点,各组间的差异均有显著性意义( $P<0.01$ )。其中  $E_2$ 、 $E_3$  组在第 7d 时都明显低于  $C_+$  组( $P=0.000$ )。

表 1 缺血性脑卒中大鼠血清 MBP 含量的动态变化

| 组别      | 例数 | 0h          | 1d                       | 3d                        | 5d                        | 7d                        |
|---------|----|-------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| $C_+$ 组 | 32 | 1.447±0.079 | 3.620±0.442 <sup>①</sup> | 54.287±3.170 <sup>①</sup> | 32.599±3.002              | 21.794±0.900 <sup>①</sup> |
| $E_2$ 组 | 32 | 1.448±0.081 | 1.514±0.185 <sup>②</sup> | 5.970±0.404               | 13.838±1.094 <sup>①</sup> | 4.474±0.261 <sup>③</sup>  |
| $E_3$ 组 | 32 | 1.449±0.082 | 2.077±0.146 <sup>②</sup> | 18.946±3.387 <sup>①</sup> | 6.479±0.619               | 3.078±0.288 <sup>③</sup>  |
| N 组     | 4  | 1.448±0.080 | 1.448±0.080              | 1.448±0.080               | 1.448±0.080               | 1.448±0.080               |

同组内不同时间点与基线比较:① $P<0.05$ ;② $P>0.05$ ;③ $E_2$ 、 $E_3$  组在第 7d 时与  $C_+$  组比较:③ $P<0.0001$ 。

## 3 讨论

MBP 在 CNS 由少突胶质细胞合成,是成熟 OLs 的标记物,它是功能上很重要的髓鞘结构蛋白,占 30%,是髓鞘紧凑结构的成分,具有神经组织的特异性。髓鞘的紧凑结构给有髓神经纤维提供了一个高的膜阻抗和低的电容,而这正是跳跃式的冲动传导所要求的。因此,在 CNS 中,轴突通过 OLs 的髓鞘形成使迅速的冲动传播成为可能。最近的研究已充分注意到脑白质保护的重要性,并提出了脑缺血全脑保护的概念<sup>[10]</sup>,因此,有必要充分发挥白质对缺血缺氧性损害的自我保护机制,寻求相关的治疗策略。这也是我们采用“醒脑开窍”针刺法研究针刺对缺血性脑卒中受损脑髓鞘保护作用的主要原因。

众所周知,脑梗死发生后,缺血中心区会在数分钟内出现不可逆性坏死,而在周围存在缺血半暗带,此区细胞电生理活动已停止,但在一定时间内仍保持结构的完整性和跨膜离子的平衡。随着时间推移,缺血半暗带处于变化过程中,在有利的条件下可转化为正常灌注区,在不利的条件下则转化为梗死区。故早期治疗要分秒必争,这就是发病后及时针刺治疗的出发点。而我们从插线成功到手术完成,并观察大鼠生命体征平稳所需的时间是大约 30min,这就是  $E_2$  组选择缺血 30min 时开始针刺的原因;另一方面,许多做脑缺血再灌注动物模型的实验公认手

术后拔线的时间最好在缺血 2h,而在抢救脑卒中急危症患者方面,针刺疗法的早期参与,可明显地提高急危症患者的存活率。因此  $E_3$  组开始针刺的时间选择在开始拔线的时间。

我们首先应用经典的 Pal-Weigert 髓鞘染色法从形态学的角度观察针刺对缺血性脑卒中受损髓鞘的保护作用。研究结果显示, $C_+$  组在局灶性脑缺血再灌注 1d 时,由于缺血损伤和氧自由基过度形成等机制,导致局部的 OLs 发生缺血、坏死,髓鞘脱失,与文献报道的一致<sup>[4-5]</sup>,以后随着时间的推移,髓鞘的颜色逐渐加深,密度逐渐增大,这可能是由于脑的缺血缺氧性损伤使位于前脑室下区的神经干细胞激活<sup>[11]</sup>,首先分化为少突胶质祖细胞,并迁移到内囊区分化为成熟的 OLs,形成了髓鞘。此外,随着时间的推移,缺血区侧支循环的建立也促进了髓鞘的形成,这些都提示大鼠脑部存在一定的自然恢复机制<sup>[12]</sup>。但从本实验的观察可以看出,脑部的这种自然恢复机制在我们观察的最长时间内远不足以完全代偿受损的髓鞘。 $E_2$  和  $E_3$  组在第 1d 时内囊的髓鞘脱失明显减少,说明针刺治疗可能通过抗炎、减轻脑水肿、改善脑血供、有效地清除氧自由基等机制减轻 OLs 的缺血损害,从而减少髓鞘的脱失; $E_2$  组在第 1d 时内囊的髓鞘脱失似乎比  $E_3$  组的轻,这提示针刺的早期参与可能更有助于减轻 OLs 的损害和继

发的髓鞘脱失;在治疗到第7d时,治疗组内囊的髓鞘与正常组的髓鞘染色之间的区别并不明显,这提示针刺在减轻OLs缺血损害的同时,可能还通过激发脑的可塑性潜能、刺激MBP合成增多,从而促进MCAO大鼠缺血损伤区的髓鞘再生。

缺血性脑卒中时因局部脑组织缺血缺氧等机制,导致OLs死亡,髓鞘脱失,引起MBP向脑脊液中脱落,同时脑梗死后血脑屏障受到不同程度的损害,MBP也会出现在血液中,因此,血清MBP的测定在一定程度上反映了CNS有无实质性损害,特别是有无髓鞘脱失的一个较为特异性的生化指标,其含量的高低能够反映损害范围的严重程度,而且能在治疗过程中反映病情变化<sup>[13-14]</sup>。本研究采用ELISA法测定血清MBP的浓度,结果表明:在C<sub>1</sub>组,由于缺血损伤和氧自由基过度形成等机制,导致髓鞘脱失,MBP迅速释放入脑脊液,同时血脑屏障破坏或功能障碍,MBP进入血液循环,使血清MBP含量明显升高,并在早期达到高峰,另一方面,缺血缺氧性损伤能轻度刺激MBP合成增多<sup>[15]</sup>,这可能使血清MBP含量增加方面起了一定的作用,说明未经治疗的大鼠在脑缺血早期髓鞘和血脑屏障破坏严重;由于在缺血后进行针刺治疗可以一方面通过抗炎、减轻脑水肿、改善脑血供、有效地清除氧自由基等机制挽救受到缺血损害的OLs,减少髓鞘的损伤,另一方面针刺治疗可以减轻血脑屏障的破坏,降低血脑屏障的通透性<sup>[16]</sup>,因而使针刺治疗组的血清MBP含量明显低于未治疗组,且随着治疗时间的延长,针刺可能通过进一步激活脑的可塑性,刺激MBP合成增多,从而促进髓鞘的再生。这与我们通过髓鞘染色得出的研究结果一致。E<sub>3</sub>组的血清MBP达到峰值的时间比E<sub>2</sub>组早,而且比E<sub>2</sub>组在相应时间点的值高,这可能是由于在缺血发生的晚期进行针刺治疗,对髓鞘及血脑屏障的保护作用较早期针刺弱,导致血清MBP迅速达到峰值所致,这提示针刺的治疗时间窗可能在缺血后脑损伤的恢复中起重要的作用,这与我们通过髓鞘染色得出的结论相符。

脑白质的再生和重塑是一个十分复杂的课题。本研究从组织形态学和血清MBP含量这两个方面显示了“醒脑开窍”针刺法对受损脑髓鞘的保护作用,揭示了血清MBP含量能比较早而全面地反映针刺对中枢神经髓鞘的保护作用,推测针刺治疗可能通过明显刺激MBP的合成,激活脑的可塑性,从而促进髓鞘的再生,至于针刺是否通过刺激MBP基因

的转录或其他机制来促进MBP的合成还有待进一步研究。

## 参考文献

- [1] 石学敏. “醒脑开窍”针刺法治疗脑卒中 [J]. 中国临床康复, 2003, 7(7): 1057.
- [2] 郭健. 针刺治疗弥漫性轴索损伤病案讨论 [J]. 中国针灸, 2003, 23(5): 312.
- [3] Back SA, Rivkees SA. Emerging concepts in periventricular white matter injury[J]. Semin Perinatol, 2004, 28(6): 405.
- [4] Pantoni L, Garcia JH, Gutierrez JA. Cerebral white matter is highly vulnerable to ischemia[J]. Stroke, 1996, 27(9): 1641.
- [5] Farkas E, Donka G, de Vos RA, et al. Experimental cerebral hypoperfusion induces white matter injury and microglial activation in the rat brain.[J]. Acta Neuropathol (Berl), 2004, 108(1): 57
- [6] 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.
- [7] 李忠仁. 实验针灸学 [M]. 第1版. 北京: 中国中医药出版社, 2003, 327—329.
- [8] 陈俊杰, 王若菡, 李昌隆. 简易的髓鞘碱性蛋白及其抗体酶联免疫吸附同步定量测定法[J]. 华西医科大学报, 1995, 26(2): 125.
- [9] 王伯云, 李玉松, 黄高, 等. 病理学技术[M]. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 2001. 184—185.
- [10] Dewar D, Yam P, McCulloch J. Drug development for stroke: importance of protecting cerebral white matter [J]. Eur J Pharmacol, 1999, 375(1-3): 41.
- [11] John Bartley, Thomas Soltau, Hereward Wimborne, et al. BrdU-positive cells in the neonatal mouse hippocampus following hypoxic-ischemic brain injury[J]. BMC Neurosci, 2005, 6: 15.
- [12] Komitova M, Mattsson B, Johansson BB, et al. Enriched environment increases neural stem/progenitor cell proliferation and neurogenesis in the subventricular zone of stroke-lesioned adult rats[J]. Stroke, 2005, 36(6): 1278.
- [13] Lamers KJ, Vos P, Verbeek MM, et al. Protein S-100B, neuron-specific enolase (NSE), myelin basic protein (MBP) and glial fibrillary acidic protein (GFAP) in cerebrospinal fluid (CSF) and blood of neurological patients [J]. Brain Res Bull, 2003, 61(3): 261.
- [14] 周莉, 胡昌恒, 袁光固, 等. 急性脑血管病患者血清及脑脊液髓鞘碱性蛋白的测定及临床意义[J]. 华西医科大学报, 1992, 23(4): 362.
- [15] Gregersen R, Christensen T, Lehmann E, et al. Focal cerebral ischemia induces increased myelin basic protein and growth-associated protein-43 gene transcription in peri-infarct areas in the rat brain[J]. Exp Brain Res, 2001, 138(3): 384.
- [16] 吴绪平, 张东友, 周华, 等. 电针对急性脑梗死的作用机制研究——对家兔脑动态CT时间-密度曲线的影响 [J]. 中国中西医结合影像学杂志, 2005, 3(1): 14.