

头穴透刺对脑出血大鼠脑组织 GLUT1 表达的影响*

鲍春龄¹ 东红升² 东贵荣¹

摘要 目的:研究大鼠脑出血后血肿周围组织葡萄糖载体蛋白-1(GLUT1)表达的动态变化规律及头穴透刺的治疗作用。**方法:**将雄性 Wistar 大鼠随机分为空白组、假手术组、模型组、针刺组,每组又分为 24h、72h、168h 三个小组,采用胶原酶/肝素联合注入法制备脑出血大鼠模型,给以百会透太阳穴电针治疗,各组动物在指定时间断头取脑,取血肿周围 3mm 范围内组织,采用免疫组织化学法观测 GLUT1 表达的变化。**结果:**模型组:三个时间点均见大部分 GLUT1 阳性微血管形态变窄、皱缩、闭塞,越靠近病灶越严重;GLUT1 表达 24h 先代偿性升高,与假手术组比较 $P<0.05$,后 72h、168h 失代偿性降低,与假手术组比较 $P<0.05$;针刺组:仅在 24h 时血肿周围出现了轻微的管腔狭窄,之后大部分血管表现为管腔呈圆形扩张, GLUT1 在 72h、168h 也出现下降($P<0.05$),但明显好于模型组($P<0.05$)。**结论:**针刺在多长时间点对 GLUT1 均有治疗作用,能延长治疗时间窗,减轻病变程度且早期作用明显。

关键词 头针;脑出血;葡萄糖载体蛋白-1

中图分类号:R246.6,R743 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2007)-12-1067-03

Experimental study of scalp-acupuncture on the express of GLUT1 after rat intracerebral hemorrhage/BAO Chunling,DONG Hongsheng,DONG Guirong//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2007, 22 (12): 1067—1069

Abstract Objective: To prove the effect of acupuncture through an experimental study of scalp-acupuncture on the express of GLUT1 after intracerebral hemorrhage in rats. **Method:** Wistar rats were divided into 4 groups: normal group, sham group, model group, acupuncture group. The last three group was divided into three time groups(24h,72h,168h), The model of intracerebral hemorrhage in rat was made with Collagenase VII/heparini infusion, and treated with electro-acupuncture of Baihui-Taiyang points, Immunohistochemical method used to observe the expression of GLUT1 around the hemotoma. **Result:** The model group after intracerebral hemorrhage: morphology of majority positive GLUT1 capillary vessels showed narrowing, shrinking and obliteration in three time points specially near the focus of lesion. The expression of GLUT1 in 24h revealed a compensatory rising at first, compared with control group ($P<0.05$); then lowered, in 72h and in 168h ($P<0.05$); Acupuncture group: in perihemotoma area, the morphology of positive GLUT1 capillary vessels showed slightly narrowing only in 24h, then most of the vessels showed spherical distending, GLUT1 decreased in 72h and 168h ($P<0.05$),but better than the model group($P<0.05$). **Conclusion:** Acupuncture have therapeutic effects on three time points, delay the development of pathologic change in time,lengthen the therapy time window, and obviously effect in the earlier period.

Author's address The Affiliated Yueyang Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine; Shanghai University of TCM; Shanghai, 200437

Key words scalp acupuncture; intracerebral hemorrhage;glucose transporter proteins

葡萄糖载体蛋白 (glucose transporter proteins, GLUT) 家族在分子水平上调控着机体各种组织细胞,特别是脑组织的血糖稳态是决定脑及周围组织中葡萄糖(GLU)细胞内转运及代谢最关键的一步。至今在哺乳类动物中已经发现 6 种 GLUT,其中 GLUT1、3、5 等已确定为哺乳类动物脑组织中参与 GIU 转运及代谢的主要 GLUT。在整个脑组织中, GLUT1 已检测到有同一基因编码的 2 种存在形式:相对分子质量为 55000 和 45000 的 GLUT1。前者在血-脑屏障的毛细血管内皮细胞呈高浓度特异性表达,后者则主要在星形胶质细胞内表达^[1-2]。脑出血除占位效应对周围组织的压迫可能引起缺血性损伤外,血液中的成分:凝血酶、血红蛋白等对周围组织

产生直接的毒性作用。脑出血后血肿周围组织低氧诱导因子(hypoxia-inducible factor,HIF)表达增高,HIF 可调节 GLUT1 和能量代谢关键酶的基因表达,从而直接影响能量代谢,导致一系列病理变化^[3]。头穴透刺治疗脑出血具有明显的促进血肿吸收和改善神经功能缺损作用^[4],但其机制尚需进一步探讨,所以本文对脑出血后血肿周围组织 GLUT1 变化进行连续观察,深入认识 GLUT1 在脑出血后病理机制中

* 基金项目:国家自然科学基金资助课题(30500677),黑龙江省研究生创新基金资助课题(YJSCX2005-214H1J)

1 上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院针灸科,上海,200437

2 上海市针灸经络研究所

作者简介:鲍春龄,女,博士,主治医师

收稿日期:2007-07-19

的作用及头穴透刺的保护作用。

1 材料与方法

1.1 材料

实验动物: 健康雄性 Wistar 大鼠 80 只, 清洁级, 体重 220—280g, 由黑龙江中医药大学动物实验中心提供。主要试剂: 胶原酶 VII (Sigma America), 肝素 12.5U/ μ l (上海生化), 兔抗鼠 GLUT1 多抗相当分子量 55000 (Neo Markers USA), DAB 显色试剂盒 (北京中山)。主要仪器: 立体定位仪 (Kasuya Japan Narishinge ST-85-28) 微量进样器 (上海), 牙科钻头 (北京); 华佗牌针灸针 (苏州); 电针治疗仪: G6805-II 型 (上海)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组: 健康雄性 (Wistar) 大鼠 80 只, 随机数字表分成以下 4 组: ①空白组: 健康大鼠; ②假手术组: 向大鼠脑内尾状核中心部注入 2 μ l 0.9% 的生理盐水。③模型组: 向大鼠脑内尾状核中心部注入 2 μ l 胶原酶/肝素的生理盐水 (含胶原酶 0.5U 和肝素 7U)。④针刺组: 大鼠造模成功后给予头穴电针。后三组每组又分为 24h、72h、168h 三个时间点组。每组各 8 只动物。

1.2.2 造模方法: 参照任泽光的方法^[9]。动物经 10% 水合氯醛腹腔麻醉 (400mg/kg BW), 头顶备皮后将动物固定于三维立体定位仪上, 局部皮肤采用碘酊消毒, 正中矢状切开头皮, 剥离骨膜, 调节门齿托的高度, 使动物的前、后颌处于同一水平。以前颌为坐标原点, 向后 0.2mm, 向右 2.9mm, 确定注射点坐标, 用牙科钻钻孔 (直径 1.0mm) (右尾状核位置), 用微量注射器吸取含 0.5U/ μ l 胶原酶的生理盐水和 7U/ μ l 肝素的生理盐水各 1.0 μ l, 沿钻孔处竖直 5min 缓慢进针 6.0mm, 5min 缓慢匀速注射后, 留针 10min, 缓慢退针 5min, 钻孔处填入明胶海绵止血, 撒少许青霉素粉防止局部感染, 缝合皮肤。各组动物清醒后放回笼内饲养。

1.2.3 针刺方法: 取穴: 百会: 在大鼠头顶两耳根连线与前后中线交点 (相当于人体百会处)。太阳: 在外眼角与耳之间的凹陷中 (相当于人体太阳穴), 参照华兴帮等制定的《实验动物穴位图谱》。操作: 常规消毒, 以 0.25mm $\times$ 30mm 毫针两根, 分别刺入百会 (向右前太阳穴方向) 和右侧太阳穴。将 G-6805 II 型电麻仪正极接百会穴毫针, 负极接太阳穴毫针, 连续波, 频率 120 次/min, 强度 1mA, 留针 30min。从造模后大鼠清醒开始进行针灸治疗, 1 次/天。

1.2.4 标本的取材及制备: 在饲养过程中, 模型 72h

组、针刺 72h 组和针刺 168h 组大鼠各死亡 1 只, 模型 168h 组大鼠死亡 2 只。10% 水合氯醛麻醉 (350mg/kg 体重), 快速开胸暴露心脏, 剪开右心耳, 经左心室插管至升主动脉内, 于 5min 内快速灌注 150ml 左右生理盐水, 随后滴注以含 4% 多聚甲醛的 0.1mol/L 磷酸缓冲液 250ml 缓慢灌注固定。灌注完毕, 从枕骨大孔剪开, 完整取脑, 在相同固定液中 4℃ 固定 24h。

1.2.5 免疫组化染色方法: 以注射针眼为中心作冠状切面厚为 2—2.5mm 组织块。常规脱蜡至水→经 PBS (pH=7.4) 冲洗 5min/次 $\times$ 3→加枸橼酸修复液 10min→蒸馏水冲洗 5min/次 $\times$ 3→加 50 μ l 过氧化酶阻断溶液, 室温下孵育 10min→PBS 冲洗 5min/次 $\times$ 3→加入 50 μ l 非免疫性动物血清, 室温下孵育 5min→PBS 冲洗 5min/次 $\times$ 3→加入 5 μ l 一抗, 4℃ 过夜→PBS 冲洗 5min/次 $\times$ 3→加入 50 μ l 生物素标记的第二抗体→室温下孵育 20min→PBS 洗冲洗 5min/次 $\times$ 4→加入 100 μ l 新鲜配置的 DAB 溶液, 显微镜下观察 3—10min→自来水冲洗→苏木素复染→自来水冲洗还蓝→梯度酒精脱水干燥→二甲苯透明→中性树胶封固→显微镜下观察。

每只动物取 2 张切片, 每片取 5 个连续不重复视野。将 10 个视野的阳性细胞数的平均值, 作为该切片的阳性微血管数。在 200 倍光镜下计数 GLUT1 染色阳性的微血管数。

1.3 统计学分析

数据以均数 $\pm$ 标准差表示, SPSS12.0 统计软件分析处理, 采用单因素方差分析, 多组间均数两两比较采用 *Q* 检验, 以 $P < 0.05$ 作为显著性差异。

2 结果

2.1 脑微血管位置形态观察结果

见图 1 (见前置彩色插页 8)。GLUT1 在正常大鼠脑组织血管内皮细胞表达, 胞膜着色, 出现棕色染色为阳性。其阳性染色完整的勾画出脑微血管。空白组、假手术组血管数量均匀分布, 管腔大小形态正常。模型组血肿周围三个时间点均见大部分微血管形态变化, 表现为血管管腔严重变窄、皱缩、甚至闭塞, 越靠近病灶血管形态变化越严重, 其中在 24h 表现最为严重。针刺组仅在 24h 时出现了轻微的管腔狭窄, 之后大部分血管表现为管腔呈圆形扩张。针刺组血管形态明显好于模型组。

2.2 针刺对脑出血大鼠脑组织 GLUT1 表达的影响

见表 1。各时间点假手术组与空白组无明显差异, ($P > 0.05$); 24h 模型组代偿性增高, 与假手术组

比较差异有显著性意义 ($P<0.05$), 72h、168h 模型组失代偿性降低, 与假手术组比较差异有显著性意义 ($P<0.05$); 针灸组 24h 也表现增高的趋势, 但与假手术组比较无显著差异 ($P>0.05$); 72h、168h 针灸组也出现异常下降, 与同时时间段假手术组比较差异有显著性意义 ($P<0.05$), 但明显好于模型组, 与模型组有明显差异 ($P<0.05$)。

表 1 针刺对脑出血大鼠脑组织 GLUT1 表达的影响 ($\bar{x}\pm s$)

组别	24h(n=8)	72h	168h
空白组	92.63±13.67		
假手术组	93.08±19.16	94.80±14.28(n=8)	94.20±7.56(n=8)
模型组	131.67±10.84 ^①	54.47±14.09 ^① (n=7)	50.95±15.61 ^① (n=6)
针刺组	107.82±9.05 ^②	73.20±19.03 ^② (n=7)	68.13±14.22 ^② (n=7)

①与同时时间假手术组比较 $P<0.05$; ②与同时时间模型组比较 $P<0.05$

3 讨论

神经细胞的能量代谢活动主要依赖于来自体循环中的葡萄糖, 血液中的糖要进入神经细胞中必须穿越血脑屏障及脑细胞膜。GLUT1 分布在这道屏障上, 为葡萄糖运输起易化作用。氧分压、周围环境中糖浓度、线粒体功能、ATP 水平、细胞外 K^+ 浓度等因素对调节 GLUT1 表达起重要作用^[6-10]。本文研究结果表明: 脑出血后血肿周围 GLUT1 蛋白及其基因表达 24h 先代偿性升高, 与对照组比较 $P<0.05$; 后失代偿性降低, 72h、168h 与对照组比较 $P<0.05$; 与李中秋^[11]观察所得的结果相一致, 原因为脑出血 48h 前, 血脑屏障未被严重破坏, 早期 24h GLUT1 表达的增高表明在能量代谢发生变化后, 迅速的发生防御反应, 代偿性增加葡萄糖的转运以促进能量代谢反应的进行, 增加高能物质的产生, 为能量供给低的区域提供底物, 有助于恢复脑的能量代谢和稳定神经元膜电位, 以保证脑组织的正常结构和功能。另外, 能量依赖性离子泵功能下降, 导致细胞外的 K^+ 浓度升高, 细胞膜不稳定, 反复的去极化而致过多 Ca^{2+} 在细胞内堆积, 激发神经元上 GLUT1 表达。脑出血 72h 后因血脑屏障严重破坏, 血肿周围组织损伤加重, 组织坏死, 内皮细胞大量减少了 GLUT1 蛋白合成。脑出血 168h 时, 我们认为此时血脑屏障功能尚未恢复, 不可逆的组织坏死发生, 导致蛋白合成停止, 出现明显 GLUT1 表达下降。

本研究表明, 针刺组虽表现和模型组相同的变化趋势, 但 24h 并未出现明显的异常, 反映针刺的早期效应, 说明针刺能在时间上延迟能量衰竭的发生, 延长了治疗时间窗; 72h、168h 病变程度明显好于模型组, 说明针刺减轻了病变程度。本结果表明针刺能扩张脑内小动脉, 且能导致新生血管的形成, 功能性毛细血管开放, 来增加缺血性脑组织的血液灌注。脑

出血后提高灌注压, 增加脑血流量可能有利于继发性脑损害的防治。头穴针刺治疗后早期即解除血管的痉挛状态, 使微血管开放为周边侧支代偿血流进入缺血区创造条件; 同时血流的恢复使缺血组织获得了血氧供给, 使微血管本身减轻了缺血的损伤, 从而使微血管和代偿血流间出现了良性循环。针刺治疗能明显纠正血管的痉挛状态, 能很好保障血流量, 防止线粒体结构破坏, 保障线粒体中的氧化磷酸化作用和 ATP 的供应, 减轻钠泵损伤, 氧供充足减少乳酸堆积; 血脑屏障损坏轻, 血管内皮功能较好, 葡萄糖供应良好, 故 GLUT1 代偿不明显; 凋亡细胞少, 组织坏死发生的范围小, GLUT1 降低相对少^[12]。头部是十四经循行交会、汇聚之处, 刺激头穴, 可以通过调节气血、阴阳, 进而协调五脏六腑的综合调节作用。采用头穴透刺起到一经带多经, 一穴带多穴的整合作用。对大脑功能的调节, 也是综合调节, 不只限于调节头皮下的皮质中枢。针刺的治疗原理主要是通过提高局部脑血流灌注和脑细胞功能, 改善脑细胞的缺氧状态, 激发脑细胞的活性和代谢, 促进损伤脑神经细胞的修复等效应实现^[13]。

参考文献

- [1] Maher F, Vannucci SJ, Simpson IA. Glucose transporter proteins brain[J]. FASEB J, 1994, 8: 1003-1011
- [2] Vannucci SJ, Maher F, Simpson IA. Glucose transporter proteins in brain: delivery of glucose to neurons and glia[J]. GLIA, 1997, 21: 2-21.
- [3] Jiang Y, Wu J, Keep RF, et al. Hypoxia-inducible factor-1 α in brain after ICH [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2002, 22: 689-696.
- [4] 宋春华, 朱文增, 东贵荣, 等. 实验性脑出血病理生理变化及头穴针刺调节及即刻效应的机理研究[J]. 中国医药学报, 2003, 18(增刊): 89-92.
- [5] 任泽光, 吴建中. 大鼠脑出血模型[J]. 中华神经外科杂志, 1993, 9(4): 205.
- [6] Bruckner BA, Ammini CV, Otal MP, et al. Regulation of brain glucose transporters by glucose and oxygen deprivation [J]. Metabolism, 1999, 48(4): 422-431.
- [7] Nehlig A. Cerebral energy metabolism, glucose transport and blood flow: changes with maturation and adaptation to hypoglycaemia[J]. Diabetes Metab, 1997, 23(1): 18-29.
- [8] Simpson IA, Appel NM, Hokari M, et al. Blood-brain barrier glucose transporter: effects of hypo- and hyperglycemia revisited [J]. J Neurochem, 1999, 72(1): 238-247.
- [9] Duelli R, Maurer MH, Staudt R, et al. Increased cerebral glucose utilization and decreased glucose transporter GLUT1 during chronic hyperglycemia in rat brain [J]. Brain-Res, 2000, 858(2): 338-347.
- [10] Duelli R, Staudt R, Duemngen L, et al. Increase in glucose transporter densities of GLUT3 and decrease of glucose utilization in rat brain after one week of hypoglycemia [J]. Brain Res, 1999, 831(1-2): 254-262.
- [11] 李中秋, 陆兵勋, 吕田明. 实验性脑出血血肿周围组织血脑屏障葡萄糖转运蛋白的表达 [J]. 第一军医大学学报, 2005, 25(3): 339-342.
- [12] 鲍春龄. 头穴针刺对脑出血大鼠脑组织能量代谢时空效应特性的实验研究[D]. 黑龙江中医药大学博士论文, 2006.7.
- [13] 欧阳钢, 王东岩. 头针疗法作用途径初探[J]. 河北中医, 2000, 22(11): 848.