

头针对脑缺血再灌注大鼠脑组织中组织金属蛋白酶抑制因子-1表达调控机制的动态研究*

于学平¹ 孙晓伟¹ 邹伟^{1,2} 张鑫¹

摘要

目的:动态观察头针对脑缺血再灌注大鼠脑组织中组织金属蛋白酶抑制因子-1(TIMP-1)表达的影响,以探讨头针抗脑缺血再灌注损伤的可能作用机制。

方法:将SD雄性大鼠130只随机分为假手术组、模型组和针刺组。采用改良的Zea Longa线栓法制作脑缺血再灌注模型,针刺组选取百会透刺曲鬓穴进行手捻针治疗。应用免疫组化和免疫印迹检测方法,比较三组不同时点脑组织TIMP-1阳性表达与含量的变化。

结果:针刺组各时间点TIMP-1较模型组均有升高趋势,再灌注4h、12h、24h、48h与模型组比较均无显著性差异($P > 0.05$);再灌注72h仍维持在较高水平,与模型组相比差异具有显著性意义($P < 0.05$)。

结论:早期头针治疗能够上调缺血侧脑组织TIMP-1的表达,并随针刺治疗时间的延长,其疗效更加显著。上调TIMP-1以抑制MMP-9活性或阻断MMP-9的合成,可能是头针拮抗脑缺血再灌注损伤的作用机制之一。

关键词 头针;脑缺血再灌注;组织金属蛋白酶抑制因子-1;血脑屏障

中图分类号:R743.3, R245 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2017)-03-0283-05

A dynamic study of scalp acupuncture on regulation of expression of brain TIMP-1 in rats with cerebral ischemia reperfusion/YU Xueping, SUN Xiaowei, ZOU Wei, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2017, 32(3): 283—287

Abstract

Objective: To observe the effect of scalp acupuncture on the expression of tissue inhibitor of metalloproteinases-1(TIMP-1) in the rats with cerebral ischemia reperfusion for exploring the interaction mechanisms.

Method: One hundred and thirty male SD rats were randomly divided into three groups: sham operation group, model group, and scalp acupuncture group. Cerebral ischemia/reperfusion model was induced by modified Longa's method. Scalp acupuncture group was treated with Baihui-Qubin acupuncture. The positive expression and protein content of TIMP-1 were detected by immunohistochemistry and western blot.

Result: Compared with model group, the expression of TIMP-1 in the scalp acupuncture group was on increasing curve, but there was no significant difference between the two groups after 4h, 12h, 24h, 48h reperfusion (all $P > 0.05$). The expression of TIMP-1 in the scalp acupuncture was higher than that in the model group after 72h reperfusion($P < 0.05$).

Conclusion: Scalp-acupuncture can effectively up-regulate TIMP-1 expression in the rats after acute cerebral ischemia/reperfusion, which may be more obvious as the treatment time goes on. Increased TIMP-1 can restrain the activity of MMP-9 or block up the synthesise of MMP-9, which may ameliorate cerebral ischemia reperfusion injury.

Author's address The First Hospital Affiliated to Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin, 150040

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2017.03.007

*基金项目:哈尔滨市科技局科技创新人才项目(优秀学科带头人)(2014RFXGJ030)

1 黑龙江中医药大学附属第一医院,哈尔滨,150040; 2 通讯作者

作者简介:于学平,女,博士,主任医师,教授; 收稿日期:2015-11-02

Key word scalp acupuncture; cerebral ischemia/reperfusion; tissue inhibitor of metalloproteinases; blood-brain barrier

血脑屏障(blood brain barrier, BBB)破坏是脑缺血再灌注损伤的一个重要病理机制,其中基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinases-9, MMP-9)增加是导致血脑屏障破坏的主要环节之一^[1],内源性组织金属蛋白酶抑制因子-1(tissue inhibitor of metalloproteinase-1, TIMP-1)作为MMP-9的上位抑制因子,具有下调MMP-9表达的作用,MMP-9/TIMP-1系统失衡是缺血性脑卒中血脑屏障损伤和修复的关键因素^[2-3]。调控MMP-9/TIMP-1平衡,寻求治疗缺血性脑血管病的新思路,日益受到国内外学者的关注,研究发现头针能降低脑缺血再灌注及脑梗死大鼠模型MMP-9的表达^[4-7],但有关头针对TIMP-1表达的影响,目前未见报道。因此,本实验采用右侧大脑中动脉缺血再灌注大鼠模型(middle cerebral artery occlusion/right, MCAO/R),观察局灶性脑缺血再灌注后TIMP-1的表达规律及早期头针干预对TIMP-1表达的影响,以期进一步探讨针灸的作用机制,寻求治疗缺血性脑血管病的有效方法。

1 材料与方法

1.1 动物分组

健康SD雄性大鼠130只,SPF级,体重280—300g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供。随机分为假手术组(30只)、模型组(50只)和针刺组(50只)。模型组和针刺组又根据缺血再灌注时间随机分为再灌注4h、12h、24h、48h和72h组,每个小组10只,其中5只用于做免疫组化,5只用于做免疫印迹。

1.2 动物模型制备

模型组与针刺组:参照改良的Zea Longa线栓法^[8],行右侧大脑中动脉插线栓塞,制成脑缺血2h再灌注模型。假手术组:插入线栓约10mm,不阻断大脑中动脉血流,持续2h后再拔出线栓,其余手术过程与模型组相同。根据Zea Longa^[8]的5分制评分标准,1—3分表明造模成功。剔除失败模型,从相同品种和重量的同一批次备用大鼠中随机补齐,保证每小组数量不变。

1.3 干预方法

针刺组:参照华兴邦^[9]《大鼠穴位图谱》取百会穴、曲鬓穴。百会穴处常规剪毛消毒,以0.30×25mm毫针快速刺入帽状腱膜下,并向右下方曲鬓穴透刺,进针约15mm,以200r/min小幅度捻转,持续5min,每间隔5min重复捻转1次,共留针30min。各小组均于再灌注后2h开始针刺,每12h针刺1次。

假手术组和模型组:在针刺组治疗的相应时间内,抓取并固定1次,每次30min,不做其他处理。

1.4 指标检测

1.4.1 免疫组化测定:处死大鼠,断头取脑,固定包埋。脑组织切片,常规脱蜡、水化、封闭;加一抗稀释液(1:50稀释,兔抗大鼠TIMP-1多克隆抗体)4℃孵育过夜;生物素标记的二抗,室温孵育20min;适当比例稀释的辣根酶标记链霉卵白素工作液,室温孵育20min;DAB显色液显色,苏木素进行复染封片。采用Motic Med 6.0数码图像分析系统,每张切片在400倍显微镜下随机选取梗死周围区5个非重叠视野,计数TIMP-1阳性细胞数的平均值。

1.4.2 免疫印迹测定:处死大鼠,断头取脑,裂解脑组织;取上清液以BCA试剂盒测定其蛋白浓度;SDS-AGE电泳;染胶、转膜、封闭;一抗孵育、二抗孵育;DAB试剂盒显色,将膜置于扫描仪中扫描,用凝胶图像处理系统分析目标带的分子量和净光密度值。

1.5 统计学分析

采用SPSS 17.0统计软件进行统计分析,组间比较使用单因素方差分析,使用S-N-K及LSD检验;方差不齐时,使用秩和检验。

2 结果

2.1 缺血侧脑组织TIMP-1免疫组化染色结果

光学显微镜下,DAB显色的TIMP-1主要在血管内皮细胞、神经元,小胶质细胞和星形胶质细胞,阳性着色表现为胞浆染成浅黄色、棕黄色或棕褐色。假手术组为正常低表达;模型组、针刺组在不同时间点均较假手术组阳性细胞数增多。

模型组:从4h开始阳性细胞数增多;并逐渐增加,至再灌注24—48h最高,增加幅度最大;随后至72h降低,但仍明显高于假手术组($P < 0.05$)。针刺组:各时间点阳性细胞数均较模型组逐渐有所增加,但4h、12h、24h、48h四个时间点与模型组比较无显著性差异($P > 0.05$);至再灌注72h,TIMP-1阳性细胞数仍没有减少,与模型组相比,具有显著性差异($P < 0.05$),见表1。

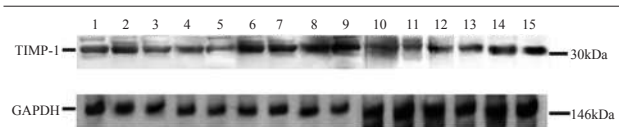
2.2 缺血侧脑组织 TIMP-1 蛋白表达的 Western blot 检测结果

假手术组右侧脑组织中可见 TIMP-1 蛋白低水平表达的条带。而模型组、针刺组大鼠在脑缺血再灌注后不同时间点,缺血侧脑组织中均可见到明显的 TIMP-1 蛋白表达的条带。见图1。

经Image pro plus 6.0软件分析及统计学处理,脑缺血再灌注后不同时间点,模型组、针刺组大鼠缺血侧脑组织中 TIMP-1 蛋白含量均较假手术组增高,

差异有显著性意义($P < 0.05$)。模型组:从4h开始增高;至12h继续增高,至再灌注24—48h最高,增高幅度最大;随后至72h降低,其含量降为 1.61 ± 0.38 ,但仍明显高于假手术组($P < 0.05$)。针刺组:各时间点均较模型组有所升高,并逐渐增加,但在4h、12h、24h、48h四个时间点与模型组比较无显著性差异($P > 0.05$);至再灌注72h为 2.34 ± 0.31 ,TIMP-1蛋白含量仍没有下降,维持在较高水平,与模型组相比,差异具有显著性意义($P < 0.05$)。见表2。

图1 各组大鼠缺血侧脑微血管 TIMP-1 条带表达



注:1假手术组4h;2假手术组12h;3假手术组24h;4假手术组48h;5假手术组72h;6模型组4h;7模型组12h;8模型组24h;9模型组48h;10模型组72h;11针刺组4h;12针刺组12h;13针刺组24h;14针刺组48h;15针刺组72h。

表1 各组大鼠缺血侧脑组织 TIMP-1 阳性细胞数比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	IR4h	IR12h	IR24h	IR48h	IR72h
假手术组	3	3.46 ± 0.72	3.52 ± 0.71	3.34 ± 0.53	3.51 ± 0.61	3.18 ± 0.78
模型组	5	9.44 ± 0.71^{①}	9.81 ± 0.76^{①}	10.55 ± 0.77^{①}	11.19 ± 0.71^{①}	9.49 ± 1.13^{①}
针刺组	5	9.69 ± 1.22^{①}	10.58 ± 1.43^{①}	11.93 ± 1.61^{①}	12.50 ± 2.13^{①}	12.68 ± 2.28^{①②}

与同时时间点假手术组比较:① $P < 0.05$;与同时时间点模型组比较:② $P < 0.05$

表2 各组大鼠缺血侧脑组织 TIMP-1 蛋白表达相对含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	IR4h	IR12h	IR24h	IR48h	IR72h
假手术组	3	1.02 ± 0.31	1.23 ± 0.12	0.90 ± 0.17	1.11 ± 0.22	0.74 ± 0.34
模型组	5	1.34 ± 0.09^{①}	1.48 ± 0.08^{①}	1.75 ± 0.41^{①}	1.94 ± 0.16^{①}	1.61 ± 0.38^{①}
针刺组	5	1.47 ± 0.21^{①}	1.66 ± 0.14^{①}	2.00 ± 0.34^{①}	2.22 ± 0.39^{①}	2.34 ± 0.31^{①②}

与同时时间点假手术组比较:① $P < 0.05$;与同时时间点模型组比较:② $P < 0.05$

3 讨论

内源性组织金属蛋白酶抑制因子(tissue inhibitor of metalloproteinases, TIMPs)作为内源性抑制剂,参与基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)表达的调整,在脑缺血再灌注过程中发挥着重要的作用^[10]。大多数MMPs以无活性的酶原形式分泌,经过酶切水解而被激活^[11],同时受到TIMPs的特异性抑制,因此体内MMPs的生物学活性与MMPs/TIMPs有关。TIMP-1由结缔组织细胞和巨噬细胞产生,同时多种细胞因子能诱导其分泌,主要通过两条途径对MMP-9产生抑制作用:酶原活化阶段与酶原pro-MMP-9形成稳定的复合物来阻

碍酶原的自我激活;同时MMP-9活化后与TIMP-1以1:1非共价键形成MMP-TIMP复合体,阻断MMP-9与底物结合而发挥其抑制作用^[12]。正常情况下,人体MMP-9/TIMP-1处于动态平衡中,MMP-9处于低表达水平,脑缺血再灌注后产生的一系列缺血级联反应激活MMP-9,使其异常升高,超出的TIMP-1的抑制能力,MMP-9将会过度降解基底膜,导致BBB损伤^[3]。因此,许多实验研究显示缺血再灌注后TIMP-1表达上调,并与MMP-9表达水平是一致的,多在24—48h达高峰,随后随着MMP-9的表达下降,TIMP-1表达也降低,5—7天后降到最低值,同时伴随着微血管基底膜中的IV型胶原(colla-

gen-IV、Col-IV)、层粘连蛋白(laminin, LN)及纤维连接蛋白(fibronectin, FN)的动态变化^[13-14];而给予外源性抑制剂可减轻基底膜损伤,缓解继发的出血转化及脑水肿^[15-16]。临床研究也显示 MMP-9/TIMP-1 与脑梗死的梗死面积、出血转化及预后密切相关^[17-21]。近年来“神经血管单元(neurovascular unit, NVU)”^[22]概念的出现,使 MMP-9/TIMP-1 平衡更加重要,因为 BBB 是神经血管单元的核心结构,而 MMP-9/TIMP-1 系统动态失衡是其损伤和修复的关键启动因素^[2],因此,研究 MMP 的特殊抑制剂或提高内源性 TIMP 水平,开发具有调控 MMP/TIMP 平衡的治疗方法,将为缺血性脑卒中的治疗提供新的思路。

本研究采用免疫组化方法测定缺血侧脑组织 TIMP-1 阳性细胞数,用免疫印迹方法测定缺血侧脑组织中 TIMP-1 蛋白含量,观察 MCAO/R 模型大鼠缺血侧脑组织 TIMP-1 的动态变化,两种方法的结果均显示:与假手术组相比,模型组缺血再灌注后 4h, TIMP-1 即开始增加,24—48h 达高峰,此后逐渐下降,但仍高于假手术组,此结果与笔者前期研究所见的 MMP-9 增加^[4]及 Col-IV 降低的动态变化一致^[23],进一步说明脑缺血再灌注后存在着 MMP-9/TIMP-1 失衡, MMP-9 的过度表达启动了内源性 MMP-9 的自我调节系统, TIMP-1 随之代偿性上调,但当超出了 TIMP-1 的代偿范围时, MMP-9/TIMP-1 系统失去动态平衡,即导致 BBB 基底膜崩解破坏。

本研究采用免疫组化和免疫印迹方法,进一步观察了头穴透刺对 MCAO/R 模型大鼠 TIMP-1 的影响,结果显示:针刺组脑缺血再灌注后各时间点的 TIMP-1 阳性细胞数及蛋白含量均较模型组升高,但 4h、12h、24h 及 48h 无显著性差异($P > 0.05$), 72h 具有显著性差异($P < 0.05$);并且 72h 时未下降,仍维持高水平,而此时模型组 TIMP-1 已开始降低。可见针刺组与模型组比较,其 TIMP-1 升高趋势与前期研究中针刺组 MMP-9 降低^[4]、Col-IV 增加^[23]的趋势是相吻合的,说明头针保护 BBB,抗缺血再灌注损伤的作用机制之一可能是启动了内源性 MMP-9 抑制系统,通过上调 TIMP-1 表达,并使 TIMP-1 能维持在较高水平,推迟下降的时间,从而抑制 MMP-9 的表达,减轻其对基底膜 Col-IV 的降解,保护 BBB 的完

整性,减轻缺血再灌注损伤;同时研究发现与模型组比较, TIMP-1 升高的高峰期较 MMP-9 降低^[4]、Col-IV 增加^[23]的高峰期延迟,前期研究中发现与模型组比较,针刺组缺血侧脑组织 MMP-9 降低和 Col-IV 表达增加的时间点是再灌注 24h、48h、72h 均有显著性差异($P < 0.05$);而本研究中 TIMP-1 上调的时间点仅在再灌注 72h 有显著差异($P < 0.05$)。说明增加针刺治疗次数,延长治疗时间,头针上调 TIMP-1 的作用会进一步加强,并且可以推断头针上调 TIMP-1 并非针刺降低 MMP-9、增加 Col-IV 的唯一机制,还有其他因素共同干预,有待于进一步研究。

综上所述,头穴透刺的可能作用机制之一是通过调节 MMP-9/TIMP-1 失衡,抑制 BBB 基底膜的降解,减轻血脑屏障的破坏,保护“神经血管单元”。这与文献中报道的使用 MMPs 抑制剂可以减轻脑水肿和减小梗死体积的机制相类似^[16]。虽然目前尚不能完全明确各因素之间的相互关系,但是可以肯定针灸治疗作用的多环节、多靶点特点,从头穴透刺法对 MMP9/TIMP-1 干预作用入手,研究头针抗缺血再灌注损伤的机制,将为防治脑缺血再灌注损伤的研究提供一些思路。

参考文献

- [1] 张春丽.缺血性脑血管病血脑屏障研究进展[J].医学综述,2013,19(11):1935.
- [2] 郭英慧,高杰.缺血性脑卒中神经血管单元的 MMP/TIMP 系统研究进展[J].辽宁中医杂志,2013,40(11):2214—2215.
- [3] 潘锐焕,孙景波,黄燕.MMP/TIMP 平衡与缺血性脑卒中的关系[J].时珍国医国药,2013,24(4):972—973,976.
- [4] 孙晓伟,于学平,李洪涛,等.头针对脑缺血再灌注大鼠脑组织 MMP-9 表达调控的动态研究[J].中医药学报,2011,39(3):107—110.
- [5] 邹伟,冯秀娟,朱春燕.头穴丛刺对脑梗死大鼠脑内 MMP-9 变化的影响[J].中国康复医学杂志,2009,24(2):146—149.
- [6] 张慧敏,韩焱晶,赵万标,等.头针对局灶性脑缺血大鼠海马 CA3 区微血管内皮基质金属蛋白酶-9 影响的动态观察[J].针刺研究,2011,36(3):193—198.
- [7] 成越,倪光夏.MMP-2、MMP-9 与脑缺血以及针刺调节作用的研究进展[J].针灸临床杂志,2015,31(6):84—87.
- [8] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20(1):84—91.
- [9] 华兴邦.大鼠穴位图谱的研究[J].实验动物与动物实验,1991,(1):

- 1—5.
- [10] 王继贵.脑卒中新的生物标志物研究进展[J].实验与检验医学, 2012,30(4):323.
- [11] Hamacher S, Matern S, Roeb E. Extracellular matrix -- from basic research to clinical significance. An overview with special consideration of matrix metalloproteinases[J]. Dtsch Med Wochenschr, 2004, 129(38):1976—1980.
- [12] Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs[J]. Cardiovasc Res, 2006, 69(3):562—573.
- [13] 陈合成.MMP-9在大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤中的作用机制研究[D].兰州:兰州大学,2007.14—17.
- [14] 李建生,刘轲,王明航,等.老龄大鼠脑缺血再灌注损伤与明胶酶系基因表达的关系[J].中华老年心脑血管病杂志,2007,9(11): 775—778.
- [15] Burggraf D, Vosko MR, Schubert M, et al. Different therapy options protecting microvasculature after experimental cerebral ischaemia and reperfusion[J]. Thromb Haemost, 2010, 103(5):891—900.
- [16] Gasche Y, Copin JC, Sugawara T, et al. Matrix metalloproteinase inhibition prevents oxidative stress-associated blood-brain barrier disruption after transient focal cerebral ischemia[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2001, 21(12):1393—1400.
- [17] 朱焰,裴红霞,戴金洪.MMP-9、TIMP-1水平与急性脑梗死关系的研究[J].实用预防医学,2009,16(6):1892—1894.
- [18] 王文华,林莉.缺血性脑卒中患者血浆基质金属蛋白酶-9和基质金属蛋白酶抑制剂-1水平的变化[J].中国现代医生,2012,50(34):145—146,148.
- [19] 谢明剑,薛伟新,邱楚雄,等.脑梗死病人梗死面积与MMP-1、MMP-9、TIMP-1的关系探讨[J].中西医结合心脑血管杂志, 2011,9(2):173—174.
- [20] 黄瀚凡,苏迈,王朔桂,等.老年缺血性脑卒中MMP-9及TIMP-1血清含量测定临床研究[J].航空航天医学杂志,2014,25(7): 945—946.
- [21] 肖登峰,张苏.MMP-9、Hs-CRP、MMP-1/TIMP-1水平检测对缺血性脑卒中患者预后的影响[J].实用临床医学杂志,2014,18(19):14—16.
- [22] 张伟,赵伟秦,卢德宏.大鼠脑缺血再灌注损伤后神经血管单元的改变[J].中华老年心脑血管病杂志,2008,10(8):620—622.
- [23] 于学平,孙晓伟,邹伟.头针对脑缺血再灌注大鼠脑微血管IV型胶原蛋白影响的动态研究[J].针灸临床杂志,2012,28(4):60—62.

(上接第274页)

- 体结构分析[J]. 中国康复医学杂志, 2008, 23(4): 291—296.
- [13] Oostenveld R, Fries P, Maris E, et al. FieldTrip: open source software for advanced analysis of MEG, EEG, and invasive electrophysiological data, [J]. Computational Intelligence and Neuroscience, Computational Intelligence and Neuroscience, 2010, 2011, 2011: e156869.
- [14] R Core Team. R: A language and environment for statistical computing.[M]. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2015.
- [15] 林枫. 网络科学方法论探索[G].郝立新主编, 中国人民大学哲学院编. 哲学家·2012. 北京: 人民出版社, 2013: 192—204.
- [16] 林枫, 江钟立. 网络思维: 基于点线符号的认知图式和复杂性范式[J]. 自然辩证法通讯, 2011, 33(1): 29—35.
- [17] Fallani FDV, Richiardi J, Chavez M, et al. Graph analysis of functional brain networks: practical issues in translational neuroscience[J]. Phil. Trans. R. Soc. B, 2014, 369(1653): 20130521.
- [18] Blank IA, Rohter SV, Kiran S, et al. Functional reorganization of the large-scale brain networks that support high-level cognition following brain damage in aphasia[C]. Academy of Aphasia 53rd Annual Meeting. 2015,doi: 10.3389/conf.fpsyg.2015.65.00014.
- [19] Abel S, Weiller C, Huber W, et al. Therapy-induced brain reorganization patterns in aphasia[J]. Brain, 2015, 138(4): 1097—1112.
- [20] Arnemann KL, Chen A JW, Novakovic-Agopian T, et al. Functional brain network modularity predicts response to cognitive training after brain injury[J]. Neurology, 2015, 84(15): 1568—1574.
- [21] Krishnan G, Bellur R, Karanth P. Lexico-semantic deficits in people with right hemisphere damage: Evidence from convergent naming tasks[J]. Journal of Neurolinguistics, 2015, 35: 13—24.
- [22] Stam C J, De Haan W, Daffertshofer A, et al. Graph theoretical analysis of magnetoencephalographic functional connectivity in Alzheimer's disease[J]. Brain, 2009, 132(1): 213—224.
- [23] 程少强, 江钟立, 吴婷, 等. 慢性非流畅性失语患者语言加工特征的脑磁图研究[J]. 中国康复医学杂志, 2013, 28(6): 538—543.
- [24] 祁冬晴, 江钟立, 林枫, 等. Broca失语患者语言加工偏侧化特征的脑磁图研究[J]. 中国康复医学杂志, 2014, 29(5): 410—414.
- [25] Sandberg CW, Bohland JW, Kiran S. Changes in functional connectivity related to direct training and generalization effects of a word finding treatment in chronic aphasia[J]. Brain and Language, 2015, 150: 103—116.