

·基础研究·

针康法对脑缺血小鼠血清中白细胞介素-6、 白细胞介素-10含量的影响*

杨 赫¹ 唐 强^{2,3}

摘要

目的:本研究旨在观察小鼠脑缺血后脑损伤功能恢复和炎症因子产物的病理变化,观察针康法对脑缺血小鼠血清炎症因子标志物白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-10(IL-10)含量的影响。探讨针康法调控缺血性脑血管病炎症因子释放的神经保护作用。

方法:9只小鼠作为假手术组,36只采用线栓法建立局灶性脑缺血模型后随机分为模型组、针刺组、康复组及针康组。针刺组术后24h予头穴丛刺治疗,康复组术后24h予跑台训练,针康组术后24h予跑台+循序渐进电动跑台训练,一次/天,共14天。于脑缺血后3d、7d、14d进行神经功能评分,酶联免疫吸附法检测血清IL-6及IL-10的水平。

结果:与假手术组相比,模型组血清IL-6、IL-10水平均显著上升($P<0.05$)。与模型组相比,针康组血清IL-6、IL-10水平均显著下降($P<0.05$),mNSS评分降低($P<0.05$)。

结论:针康法能够下调小鼠脑缺血后血清中IL-6、IL-10水平,其机制可能与降低炎症因子表达水平有关。

关键词 针康法;白细胞介素-6;白细胞介素-10

中图分类号:R493,R743.3,R246 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-1242(2021)-06-0706-04

缺血性卒中后,无论是在病变核心还是在缺血半暗带,组织损伤和修复的演变都受到神经炎症事件的强烈影响^[1],这些事件涉及炎症介质的释放、系统细胞的招募和血管重构^[2]。炎症被日益认为是脑血管病尤其是动脉闭塞和血流动力障碍所引起的缺血性脑病发病机制的关键因素^[3]。血浆炎症标志物白细胞介素-10(interleukin-10)和白细胞介素-6(interleukin-6)水平升高^[4]与缺血性卒中^[5]和出血性卒中^[6]的预后较差有关。各种证据表明^[7],脑缺血后的细胞死亡和细胞因子、趋化因子的产生可能是免疫系统为获得神经抗原特异性免疫反应与神经血管单位协同,维持细胞稳态加速血脑屏障重建、神经血管重建的连续事件,这些事件对脑缺血损伤预防有积极的作用。针康法是头穴丛刺针法和现代康复训练方法有机结合^[8],针对卒中患者运动缺损、痉挛状态、吞咽障碍、二便障碍、失语症进行辨证取穴,适时运用神经发育技术改善脑神经血管单元的失神经支配状态。研究组成员利用多中心、大样本从障碍学的角度使用国际公认信度和效度较高的评价量表验证了针康法能够有效地减少脑卒中后各种功能障碍的发生,提高患者的生活质量^[9];同时,从行为学、形态学、分子生物学的角度在缺血动物模型上证明了针康法能

减少缺血区神经元损伤的发生促进结构重塑^[8-9]。然而尚不清楚针康法针对IL-6/IL-10炎症因子在脑缺血后病理生理反应中的保护作用 and 风险,本研究可能会为改善脑缺血提供一定实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

6—8周龄SPF级C57BL/6J雌性小鼠共45只,由黑龙江中医药大学药物安全性评价中心提供[批号SCXK(辽)2015—0001],体重(22.0±3.2)g,实验过程中所有处置符合相关动物伦理学要求。增长型颗粒饲料喂食,自由饮水,维持12h光暗循环,适应性驯养小鼠7d后,将小鼠按随机数字表法分为假手术组、模型组、针刺组、康复组、针康组5组,每组9只。每次取3只。分别在第3、7、14天进行指标检测。

1.2 试剂及仪器

水合氯醛(天津市凯通化学试剂有限公司);ZH-PT型动物实验跑台(安徽正华生物仪器设备有限公司);FC型酶标仪(赛默飞世尔上海仪器有限公司);一次性使用无菌针灸针(苏州针灸用品有限公司);Mouse IL-6 Elisa kit 96T(北京

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2021.06.012

*基金项目:黑龙江省自然科学基金(ZD2019H007);黑龙江中医药大学科研基金(2019MS22)

1 黑龙江中医药大学,黑龙江省哈尔滨市,150040; 2 黑龙江中医药大学附属第二医院康复中心; 3 通讯作者

第一作者简介:杨赫,男,博士,主治医师; 收稿日期:2020-03-01

博奥拓达科技有限公司);Mouse IL-10 Elisa kit 96T(北京博奥拓达科技有限公司)。

1.3 动物模型建立

参考前期实验研究,改良Koizumi线栓法^[10]制备小鼠永久性大脑中动脉闭塞脑缺血模型。小鼠术前12h禁食,不禁水。4%水合氯醛0.01ml/g腹腔注射麻醉。直肠温度在整个手术过程中被监测,并使用加热垫维持(37±0.5)℃温度。手术台上固定小鼠,颈部术区备皮、消毒,钝性分离皮下组织和腺泡,显微镜下找到右侧颈总、颈外、颈内动脉,5号手术线依序结扎颈总动脉近心端、颈外动脉远心端,颈总动脉主干下方备活结。微动脉夹阻断分叉处血流,距分叉处2mm刺一个“V”形口,将已备好的线栓插入将松结扎紧,松开微动脉夹,轻轻上提颈内动脉使线栓缓缓进入,达大脑中动脉分支起始处,线栓进入深度0.8cm左右。常规消毒、缝合,术后恒温加热垫维持肛温(37±0.5)℃至苏醒。假手术组不插入线栓,余操作相同。术后24h行Longa评分,1—3分小鼠纳入实验。

1.4 干预方法

假手术组和模型组不予治疗,只给予同等条件抓取。

针刺组:术后1天针刺治疗组开始进行头针治疗,参考华兴邦等^[11]《大鼠针灸穴位图谱》和于氏头穴丛刺^[12]针法选定百会穴、自前顶至百会方向左右旁开2mm处,用0.25mm直径、13mm长无菌针灸针依穴刺入头皮,快速捻转30s后留针1h,每日1次。康复组:术后1天开始进行电动跑台康复训练30min,每天1次,每周训练5天,坡度为0°,电击强度1mA,跑台方案以速度6m/min递增至10m/min,后下调至6m/min共干预2周。针康组:术后1天开始头穴丛刺治疗+循序渐进电动跑台训练。定位小鼠百会穴及其左右旁开2mm处,采用直径0.25mm、长13mm针灸针丛刺,快速捻转30s后留针1h,每日1次。跑台训练方案同康复治疗组。

1.5 神经功能评定

各组小鼠清醒后,采用改良神经功能缺损评分(modified neurological severity score, mNSS)^[11]从运动、感觉、横梁平衡与反射缺损和异常活动五方面评估各时间点不同干预组小鼠神经功能缺损。0分正常,1—6分轻度损伤,7—12分中度损伤,13—18分重度损伤。由不参与动物实验的研究人员进行打分。

1.6 血清IL-6、IL-10检测

术后固定时间点予10%水合氯醛麻醉实验小鼠,于腹主动脉取血抽至采血管中。静置2h后3500r/min离心10min,将上层血清吸取至2ml EP管-20℃保存备用。按Elisa试剂盒说明书,检测各组小鼠血清中IL-6、IL-10含量。

1.7 统计学分析

采用SPSS19.0统计学软件进行分析,计量资料采用均数±标准差表示。组间比较采用单因素方差分析及SNK-q检

验,以 $P<0.05$ 表示差异有显著性意义。

2 结果

2.1 神经功能评定

术后各时间点,假手术组小鼠无神经功能损伤。术后3天,与模型组比较,假手术组、针刺组、康复组、针康组mNSS评分有显著性差异($P<0.05$);与假手术组比较,模型组、针刺组、康复组、针康组mNSS评分差异有非常显著性意义($P<0.05$)。术后7天,与假手术组比较,模型组、针刺组、康复组、针康组mNSS评分差异有显著性意义($P<0.05$)。术后14d,与模型组比较,假手术组、针刺组、康复组、针康组mNSS评分差异有显著性意义($P<0.05$);与假手术组比较,模型组、针刺组、康复组、针康组mNSS评分差异有显著性意义($P<0.05$)。见表1。

2.2 针康法对脑缺血小鼠不同时相血清中IL-6含量的影响

脑缺血后3d,与模型组小鼠相比,假手术组、针刺组、针康组血清中IL-6含量显著降低($P<0.05$)。在术后7d模型组较其余各组血清中IL-6含量明显升高,有显著性差异($P<0.05$)。脑缺血后14d,与模型组比较假手术组、针康组血清中IL-6含量显著降低($P<0.05$),见表2。

2.3 针康法对脑缺血小鼠不同时相血清中IL-10含量的影响

脑缺血后3d,与假手术组、模型组分别比较,康复组、针康组血清IL-10含量明显升高($P<0.05$)。脑缺血后7d,康复组小鼠血清IL-10含量较其余组显著升高($P<0.05$)。术后14d,与模型组比较,假手术组、针康组小鼠血清IL-10含量显著降低($P<0.05$),见表3。

表1 各时间点各组mNSS评分的比较 ($\bar{x}\pm s$,分)

组别	例数	3d	7d	14d
假手术组	9	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
模型组	9	13.67±0.58 ^①	11.00±1.40 ^①	9.33±0.58 ^①
针刺组	9	9.33±0.58 ^②	7.67±0.58 ^①	5.33±0.58 ^②
康复组	9	8.67±2.08 ^②	6.67±1.15 ^①	4.00±1.00 ^②
针康组	9	6.67±1.53 ^②	5.33±2.31 ^①	3.33±0.58 ^②
<i>F</i>		16.959	9.017	28.516
<i>P</i>		<0.05	<0.05	<0.05

注:①与假手术组比较 $P<0.05$;②与模型组比较 $P<0.05$

表2 针康法对脑缺血小鼠血清中IL-6含量的影响 ($\bar{x}\pm s$,pg/ml)

组别	例数	3d	7d	14d
假手术组	9	32.98±0.37	32.99±0.33	27.20±1.07
模型组	9	46.88±0.83 ^①	44.69±1.81 ^①	42.63±5.45 ^①
针刺组	9	35.72±3.60 ^②	33.15±1.69 ^②	31.88±1.74
康复组	9	40.35±1.88	38.47±1.16 ^②	34.59±2.89
针康组	9	33.68±3.08 ^②	35.98±2.73 ^②	29.73±1.20 ^②
<i>F</i>		6.232	7.744	4.031
<i>P</i>		<0.05	<0.05	<0.05

注:①与假手术组比较 $P<0.05$;②与模型组比较 $P<0.05$

表3 针康法对脑缺血小鼠血清中IL-10含量的影响($\bar{x} \pm s$, pg/ml)

组别	例数	3d	7d	14d
假手术组	9	282.18±12.63	306.65±16.32	217.77±28.77
模型组	9	286.02±28.19	316.11±5.55	301.57±14.97 ^①
针刺组	9	326.17±27.95	319.36±13.66	283.28±11.23
康复组	9	392.33±21.46 ^{①②}	384.59±20.09 ^{①②③}	274.52±6.23
针康组	9	378.97±14.11 ^{①②}	326.24±18.83 ^③	212.69±20.81 ^②
<i>F</i>		5.464	3.869	4.911
<i>P</i>		<0.05	<0.05	<0.05

注:①与假手术组比较 $P<0.05$;②与模型组比较 $P<0.05$;③与针刺组比较 $P<0.05$;④与康复组比较 $P<0.05$

3 讨论

中枢神经系统微环境的变化,无论是局部改变还是循环血液的外周变化都会对体内平衡和疾病的发生产生巨大影响。许多研究描述了急性期反应后几天内就会出现典型的表现,淋巴细胞减少和血浆IL-10及IL-6水平升高^[13-14]。IL-6神经毒性因子是脑组织损伤时发出的警告信号^[15],IL-6的直接作用是通过刺激成熟B细胞生长、促进T细胞增殖分化、诱导单核/巨噬细胞趋化、提高中性粒细胞存活率等方式发挥促炎和免疫调节作用^[16]。IL-6、IL-10是研究最多的两种炎症因子,有研究表明^[17]拮抗IL-6生成及其表达可缩小脑梗死面积,阻碍炎症通路信号传递并抑制有毒物质释放。白细胞介素-10(IL-10)是一种多功能的抗炎细胞因子,在免疫耐受中起重要作用,IL-10承担激活、分泌、诱导、分化各通路与细胞调节的任务^[18]。

本研究通过对小鼠神经功能评分结果分析发现,术后各时间点模型组的神经功能评分明显高于假手术组、针刺组、康复组、针康组。显示针刺治疗、康复训练、针康法对脑缺血神经损伤有一定的保护作用。进一步通过测定各时相血清IL-6、IL-10含量发现,术后3d模型组血清IL-6含量达到峰值,与模型组比较假手术组、针刺组、针康组IL-6含量显著降低($P<0.05$)。术后7天,模型组血清IL-6含量仍明显升高,与各组比较差异显著($P<0.05$)。术后14天,与模型组比较假手术组、针康组IL-6含量显著降低($P<0.05$)。血清IL-10含量则在各时相显示,术后3天与模型组比较康复组、针康组血清IL-10含量明显升高($P<0.05$)。术后7天,与康复组比较,假手术组、模型组、针刺组、针康组IL-10含量显著降低($P<0.05$)。术后14天,与模型组比较,针康组、假手术组IL-10含量显著降低($P<0.05$)。针康组小鼠在各时相血清IL-6、IL-10含量不同程度下降,这与先期研究一致,血清IL-10、IL-6在3d时间点一过性升高随后下降与脑卒中急性期密不可分。Wang XM等^[19]发现入院后第3天血清IL-10水平升高并达到峰值,且与脑水肿程度呈负相关。另一方面,IL-10释放能调节神经元对兴奋性氨基酸的敏感性,促进细胞存活信号的表达,多种信号通路促进神经元和胶质细胞的存活^[20]。针

康法同时激活IL-6、IL-10促进免疫细胞集聚,中和细胞凋亡和吞噬,拖延其他促炎通路上因子的转录和分泌减轻脑继发性损伤。综上,针康法能够降低小鼠脑缺血后血清中IL-6、IL-10水平最终达到抑制炎症损伤的作用。

参考文献

- [1] Liesz A, Suri-Payer E, Veltkamp C, et al. Regulatory T cells are key cerebroprotective immunomodulators in acute experimental stroke[J]. *Nature Medicine*, 2009, 15(2):192—199.
- [2] Zhang W, Song JK, Zhang X, et al. Salvianolic acid A attenuates ischemia reperfusion induced rat brain damage by protecting the blood brain barrier through MMP-9 inhibition and anti-inflammation[J]. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 2018, 16(3):184—193.
- [3] Klimiec-Moskal E, Piechota M, Pera J, et al. The specific ex vivo released cytokine profile is associated with ischemic stroke outcome and improves its prediction[J]. *Journal of Neuroinflammation*, 2020, 17(1):7.
- [4] Horváth E, Huțanu A, Chiriac L, et al. Ischemic damage and early inflammatory infiltration are different in the core and penumbra lesions of rat brain after transient focal cerebral ischemia[J]. *Journal of Neuroimmunology*, 2018, 324: 35—42.
- [5] Whiteley W, Chong WL, Sengupta A, et al. Blood markers for the prognosis of ischemic stroke: a systematic review[J]. *Stroke*, 2009, 40(5):e380—e389.
- [6] Ye L, Gao L, Cheng H. Inflammatory profiles of the interleukin family and network in cerebral hemorrhage[J]. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 2018, 38(7):1321—1333.
- [7] Fu Y, Liu Q, Anrather J, et al. Immune interventions in stroke[J]. *Nat Rev Neurol*, 2015, 11(9): 524.
- [8] 唐强,朱路文. 脑卒中康复新策略——针康法[J]. *中国康复医学杂志*, 2015, 30(10):1071—1073.
- [9] 唐强,白晶,王艳,等. 头穴丛刺法调控大鼠脑梗死后内源性神经干细胞增殖迁移分化的实验研究[J]. *中国康复医学杂志*, 2009, 24(8):676—679+670.
- [10] Koizumi J. Experimental studies of ischemic brain edema. 1. A new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area[J]. *Jpn J Stroke*, 1986, 8:1—8.
- [11] 唐强,田源,叶涛,等. 针康法对脑缺血大鼠缺血半暗区细胞凋亡及X连锁凋亡抑制蛋白和cleaved-caspase-9蛋白表达的影响[J]. *中国康复理论与实践*, 2017, 23(12):1365—1371.
- [12] 叶涛,朱路文,阮野,等. 针康法对脑缺血大鼠神经功能及缺血半暗区皮层细胞凋亡相关蛋白表达的影响[J]. *中国康复理论与实践*, 2018, 24(5):502—508.
- [13] Emsley HC, Smith CJ, Gavin CM, et al. An early and sustained peripheral inflammatory response in acute ischaemic stroke: relationships with infection and atherosclerosis [J] *J Neuroimmunol*, 2003, 139:93—101.

- [14] Smith CJ, Emsley HC, Gavin CM, et al. Peak plasma interleukin-6 and other peripheral markers of inflammation in the first week of ischaemic stroke correlate with brain infarct volume, stroke severity and long-term outcome[J]. BMC Neurol, 2004, 4:2.
- [15] Lång M, Skrifvars MB, Siironen J, et al. A pilot study of hyperoxemia on neurological injury, inflammation and oxidative stress[J]. Acta Anaesthesiol Scand, 2018, 62: 801—810.
- [16] Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, et al. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity[J]. Nature Reviews Immunology, 2011, 11(8):519—531.
- [17] Di Napoli M, Shah IM. Neuroinflammation and cerebrovascular disease in old age: a translational medicine perspective[J]. Journal of Aging Research, 2011, 2011(6):857484.
- [18] Zhang P, Hill GR. Interleukin-10 mediated immune regulation after stem cell transplantation: Mechanisms and implications for therapeutic intervention[J]. Seminars in Immunology, 2019, 44:101322.
- [19] Wang XM, Zhang YG, Li AL et al. Expressions of serum inflammatory cytokines and their relationship with cerebral edema in patients with acute basal ganglia hemorrhage[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2016, 20: 2868—2871.
- [20] Strle K, Zhou JH, Shen WH, et al. Interleukin-10 in the brain[J]. Crit Rev Immunol, 2001, 21(5):427—449.

·临床研究·

全身振动训练对脑卒中偏瘫患者本体感觉及平衡功能的影响*

李 岩¹ 何雯雯^{1,2} 董燕飞¹ 李 辉¹ 傅建明¹ 姚云海¹ 劳方金¹ 孙 亚¹

摘要

目的:探讨全身振动训练对脑卒中偏瘫患者本体感觉及平衡功能的影响。

方法:采用随机、对照研究,将50例脑卒中偏瘫患者分为治疗组和对照组,每组25例,两组给予常规康复治疗,在此基础上对照组增加全身振动平台站立,但不实际训练,治疗组增加全身振动训练,每日1次,每次15min,每周5次,治疗前及治疗8周后采用等速肌力评估系统评估患者的本体感觉主动角度重现测试值(AAR),采用简化Berg平衡功能量表(BBS)评定患者平衡功能,采用Gait watch步态分析系统评价患者步幅及步速。

结果:治疗前两组患者的本体感觉、BBS、步态评定,组间差异无显著性意义($P>0.05$),治疗后两组AAR、BBS及步态评定均优于治疗前水平,差异有显著性意义($P<0.05$)。且治疗后治疗组AAR、BBS、步态评定步幅、步速较对照组优异,差异有显著性意义($P<0.05$)。

结论:全身振动训练可以改善脑卒中偏瘫患者本体感觉,并可以改善平衡功能,该疗法值得临床推广应用。

关键词 全身振动;脑卒中;本体感觉;平衡

中图分类号:R743.3,R493 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-1242(2021)-06-0709-04

脑卒中患者因脑部受损,影响患者本体感觉信息接收的效率,出现本体感觉障碍^[1],有研究发现脑卒中患者本体感觉障碍的发生率约为47.7%^[2-3],本体感觉障碍导致患者对运动速度和运动方向不能及时正确的感知,不能迅速做出调整,进而出现平衡功能障碍、姿势调节障碍,影响各种动作的准确性,患者步行功能受到损害^[4]。全身振动疗法^[5](the whole body vibration, WBV)是一种利用机械振动和抗阻负荷作用

于人体的训练方法,振动和负荷引起的局部或全身肌肉的振荡,神经及肌肉功能得到改善。有研究显示,全身振动疗法可以改善本体感觉功能^[6-7],然而关于全身振动训练改善本体感觉及平衡的研究仍较少^[8-9],因此需要进一步的探讨。本研究旨在探讨全身振动训练对脑卒中患者本体感觉及平衡功能的影响。

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2021.06.013

*基金项目:嘉兴市科技计划项目(2018AD32045)

1 浙江省嘉兴市第二医院康复医学中心,嘉兴,314000; 2 通讯作者

第一作者简介:李岩,男,硕士,副主任技师; 收稿日期:2020-09-17