

# 电针对缺血性中风后遗症期大鼠 脑血流量和内皮素-1的影响\*

王娟<sup>1</sup>,刘健<sup>2</sup>

(1.天津中医药大学,天津 300193;2.天津中医药大学第一附属医院针灸研究所,天津 300193)

**摘要:**[目的]观察电针对缺血性中风后遗症期大鼠脑血流量的影响并探讨其作用机制。[方法]将30只Wistar成年健康雄性大鼠,按随机数字表法分为电针组、模型组、假手术组,每组10只。参照Zea-Longa线栓法复制大鼠中动脉缺血模型(MCAO),MCAO 5周后为缺血性中风后遗症期大鼠模型。电针百会、水沟2周后,应用激光多普勒血流仪进行脑血流量的检测,免疫组化方法测定脑组织中内皮素-1(ET-1)含量。[结果]与假手术组比较,模型组脑血流量降低( $P<0.05$ );与模型组比较,电针组脑血流量明显提高( $P<0.05$ )。模型组ET-1蛋白表达阳性物质总面积高于假手术组( $P<0.05$ )。电针组ET-1蛋白表达阳性物质总面积有低于模型组的趋势,但两组比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )。[结论]脑缺血后,脑组织中ET-1含量明显上升。电针有抑制ET-1上调的趋势,提高缺血性中风后遗症期大鼠的脑血流值。

**关键词:**电针;缺血性中风后遗症期;脑血流;内皮素-1

**中图分类号:**R255.2

**文献标识码:**A

**文章编号:**1673-9043(2014)05-0287-04

中风病已成为危害人类生命健康的三大杀手之一。缺血性中风的发病率约占中风病的75%,且复发率、致残率较高<sup>[1]</sup>。急性期后,多数患者遗有不同程度的后遗症,严重影响患者的生存质量。后遗症期的治疗,对于降低致残率,促进神经恢复具有重要的意义。缺血性中风的发生、发展和复发与患者的脑血流量密切相关,因此改善脑组织缺血缺氧的状态是治疗关键<sup>[2]</sup>。内皮素(ET)是机体在严重缺血、缺氧状态下产生的一种内源性致损伤因子,有强烈缩血管效应,能减少血流量,参与了脑梗死的发生发展过程<sup>[3]</sup>。以往对于脑血流、内皮素-1(ET-1)与脑缺血关系的研究大多基于急性期,而对于后遗症期的研究较少。本研究通过建立缺血性中风后遗症期大鼠模型,检测大鼠脑血流量和脑组织中ET-1的变化,观察电针对缺血性中风后遗症期大鼠脑血流的影响与ET-1变化之间的关系,为中风病后期的临床康复治疗提供实验依据。

\*基金项目:天津市高等学校科技发展基金项目(20050319)。

作者简介:王娟(1984-),女,2013级在职博士,医师,研究方向为针刺治疗中风病。

通讯作者:刘健,E-mail:yookan@sina.com。

## 1 材料和方法

### 1.1 试剂和仪器

**1.1.1 主要试剂** 水合氯醛(分析纯)、多聚甲醛(分析纯)等,均由天津市瑞金特化学品有限公司提供。0.01 mol/L磷酸盐缓冲液(PBS),0.1 mol/L枸橼酸缓冲液,打孔液,3%过氧化氢封闭液,复合消化液,分化液,抗体稀释液,ET-1蛋白一抗(博士德生物工程有限公司)。

**1.1.2 主要仪器** DRT4激光多普勒血流仪(美国惠普公司生产,瑞典百灵威医疗仪器中国公司代理),脱水机、包埋机、切片机(德国LEICA公司生产),微波炉(格兰仕P7021 TP-6),隔水式电热恒温培养箱(WMK-02型),显微镜(OLYMPUS BX51),数字显微照相机(OLYMPUS DP11)。

### 1.2 实验动物和分组

**1.2.1 实验动物** 三级动物(SPF)Wistar成年健康雄性大鼠,体质量250~280 g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,合格证号:SCXK(京)2007-0001。

**1.2.2 分组** 以上大鼠30只,按随机数字表法分为电针组、模型组、假手术组,每组10只。

**1.3 缺血性中风后遗症期鼠模型制备** 参考王新

陆等<sup>[4]</sup>的方法制备缺血性中风后遗症模型。

参照 Zea-Longa 线栓法<sup>[5]</sup>复制大脑中动脉缺血模型(MCAO),大鼠麻醉清醒后,按照 Zausinger 六分法<sup>[6]</sup>对其神经功能进行评分,去除无神经功能缺损及病情过轻和过重的模型,即评分为 0、4 和 5 分的大鼠,评分为 1、2、3 分的均视为 MCAO 模型成功。MCAO 5 周后为缺血性中风后遗症大鼠模型。假手术组大鼠行相同的开颅术而不插入鱼线。

**1.4 针刺取穴和方法** 电针组参照《实验针灸学》<sup>[7]</sup>的常用实验动物针灸穴位,“水沟”取穴在唇裂正中、鼻尖下 1 mm 处,平刺 5 mm;“百会”取穴在顶骨正中,平刺 10 mm。两穴刺入后,“百会”接正极,“水沟”接负极,采用 2/15 Hz 疏密波,每日 20 min,连续 2 周,中间休息 1 d。模型组和假手术组进行与电针组相同程度的捉抓。

**1.5 观察指标及方法**

**1.5.1 检测软脑膜脑血流值** 运用激光多普勒血流仪监测大鼠脑血流变化。连接两个多普勒探针,打开激光;10%水合氯醛腹腔麻醉大鼠,将颅骨充分暴露;将探头固定于前囟处,使探头与颅骨接触即可;开始记录血流值,待数据稳定后记录 1 min。

**1.5.2 切片制备** 迅速断头取脑,取右侧大脑半球置于 4%多聚甲醛液中继续固定 24 h。常规制备脑组织,参照包新民绘制的大鼠脑立体定位图谱取皮层,石蜡冠状切片,厚约 5 μm。

**1.5.3 ET-1 蛋白的免疫组化检测** 石蜡切片脱蜡至水,3%过氧化氢室温孵育 10 min,PBS 洗 3 min×3 次,使用枸橼酸,微波修复,自然冷却至室温。PBS 洗 3 min×3 次,用正常山羊血清封闭液,室温孵育 10 min,倾去血清,勿洗。滴加一抗,ET-1 一抗比例均为 1:50,4 ℃过夜保存。0.01 mol PBS 洗 3 min×3 次,滴加生物素化山羊抗兔,37 ℃孵育 45 min,0.01 mol PBS 洗 3 min×3 次,滴加链酶亲合素(HRP),

37 ℃孵育 45 min。0.01 mol PBS 洗 3 min×3 次。DAB 显色,中性树胶封片。在 400 倍高倍镜下,随机选取各组大脑皮质的 10 个区域,用 HPIAS-1000 彩色病例图文分析系统进行定量分析,以 0.207 3 μm 像素点长,在 1.219×1.3 μm<sup>2</sup> 测量窗下,测取棕黄色反应物的总面积来分析蛋白表达的水平。

**1.6 统计学处理** 采用 SPSS 18.0 统计软件进行统计学处理,计量资料用均数±标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示。检验数据是否属于正态分布,然后用单因素方差分析(One-Way ANOVA)对数据进行分析,其中组间的多重比较选择 LSD 检验;若数据不符正态分布或方差不齐,采用非参数检验对数据进行分析。 $P<0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 脑血流量(CBF)检测结果** 见表 1。与假手术组比较,模型组 CBF 降低,差异有统计学意义( $P<0.05$ );电针组 CBF 明显提高,与模型组比较,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。

表 1 各组大鼠脑血流量均值比较( $\bar{x}\pm s$ ) mL/min

组别	n	CBF
电针组	10	437.15± 39.66 <sup>#</sup>
模型组	10	286.94±120.32 <sup>*</sup>
假手术组	10	442.70±113.13

注:与假手术组比较,\* $P<0.05$ ;与模型组比较,<sup>#</sup> $P<0.05$ 。

**2.2 脑组织中 ET-1 检测结果** 见图 1、表 2。胞浆内有棕黄色颗粒的为阳性细胞。在 400 倍高倍镜

表 2 各组大鼠 ET-1 蛋白表达阳性物质总面积的比较( $\bar{x}\pm s$ ) μm<sup>2</sup>

组别	n	ET-1
电针组	10	350.19±210.59
模型组	10	612.48±388.00 <sup>*</sup>
假手术组	10	294.90±237.61

注:与假手术组比较,\* $P<0.05$ 。

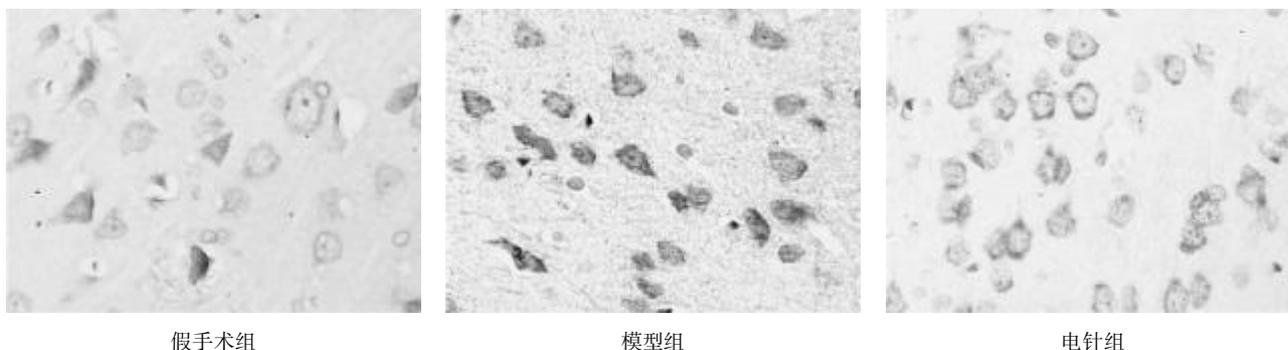


图 1 各组大鼠大脑皮质 ET-1 蛋白表达(免疫组化法×400)

下,随机选取各组大脑皮质的10个区域,用HPIAS-1000彩色病理图文分析系统进行定量分析,以 $0.2073\ \mu\text{m}$ 像素点长,在 $1.219\times 1.3\ \mu\text{m}^2$ 测量窗下,测取棕黄色反应物的总面积来分析蛋白表达的水平。

镜下可见棕黄色阳性物位于胞浆内,假手术组偶见阳性细胞,染色浅;模型组见较多阳性细胞,呈棕黄色深染;电针组阳性细胞少于模型组,染色较浅。

由表2可知,模型组ET-1蛋白表达阳性物质总面积高于假手术组,两组比较差异有统计学意义( $P<0.05$ )。电针组ET-1蛋白表达阳性物质总面积有低于模型组的趋势,但两组比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )。

### 3 讨论

中风急性期经治疗后病情趋向稳定,进入较长的恢复期和后遗症期,患者遗留严重残疾,生活质量降低。因此,积极探索中风后遗症期病因机制、治疗方法,进而帮助患者尽快恢复功能,回归社会是当今医学领域的一个重要课题。本研究利用电针水沟穴和百会穴,对缺血性中风后遗症模型大鼠进行干预,探讨电针对其脑组织中ET-1含量的影响及其与脑血流量变化的关系。

本研究选取督脉经穴之水沟和百会,主要在于督脉总督一身之阳脉,为阳脉之海,电针督脉经穴可以振奋周身之阳气,疏通经络,醒脑开窍,从而达到保护脑缺血的目的。许多学者经过实验观察证实,水沟、百会可明确增加缺血区的脑血流供应量<sup>[8-9]</sup>。电针刺激百会穴(2/15 Hz的疏密波)对脑缺血能产生较好的耐受效应<sup>[10]</sup>。

ET是血管内皮细胞分泌和释放的内源性血管收缩因子<sup>[11]</sup>。脑血管内皮细胞可产生ET,ET受体存在于脑干、基底节等许多重要器官。ET包括3种异构体ET-1、ET-2和ET-3,ET-1的缩血管作用最强、效应最持久,对脑动脉影响较大<sup>[12-14]</sup>。生理状态下,内皮细胞合成内皮素很少且清除速度快,故组织中仅有少量的ET-1蛋白表达<sup>[15-16]</sup>。

脑血流量的变化与中风患者脑组织急性期变化、再灌注损伤及预后都有相关性。脑缺血时,血管内皮细胞合成和释放大量的ET-1,高浓度的ET-1可直接作用于内皮平滑肌细胞ET受体,通过收缩血管,刺激血小板黏附及自由基的释放等机制,使血流量减少,加重脑组织的缺血、缺氧,并促使脑组织和血管内皮细胞变性死亡<sup>[17]</sup>。

本研究运用激光多普勒血流仪监测缺血性中风后遗症期大鼠脑血流量,发现模型组与假手术组比较,脑血流量降低,说明脑血流下降是缺血性中风后遗症期的病理基础。电针组与模型组相比,脑血流量明显提高,说明电针可以提高缺血性中风后遗症期大鼠的脑血流量。

本研究观察到,假手术组有少量的ET-1蛋白表达,模型组ET-1蛋白表达阳性物质总面积高于假手术组,说明在缺血性中风后遗症期,脑组织中ET水平呈显著提高状态,ET活性增强,可能存在脑血管痉挛或梗死所造成的脑缺血缺氧。电针治疗后,ET含量均值虽然较模型组低,但是差异无统计学意义( $P>0.05$ )。说明电针有使缺血性中风后遗症期大鼠ET-1降低的趋势。电针后大鼠脑血流量的改善可能与ET-1降低后改善了缺血后血管收缩状态有关。

### 参考文献:

- [1] 章翔.脑卒中诊断治疗学[M].北京:人民军医出版社,2002:1.
- [2] 石磊,杜元灏.脑梗死急性期局部血流量变化及电针干预效应研究[J].天津中医药,2012,31(2):85-87.
- [3] Takasaki G. Similarity of endothelin to snake venom toxin[J]. Nature,1998,335(6188):3031.
- [4] 王新陆,王中琳.缺血性中风后遗症模型的建立与评价[J].世界科学技术—中医药现代化,2004,6(3):14.
- [5] Longa EZ, Weinstein PR, Carson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniotomy in rats[J]. J Stroke, 1989,20(1):84-91.
- [6] Zausinger S, Westeraier T, Plesnila N, et al. Neuroprotection in transient focal cerebral ischemia by combination drug therapy and mild hypothermia: comparison with customary therapeutic regimen[J]. Stroke, 2003,34(6):1526-1532.
- [7] 李忠仁.实验针灸学[M].北京:中国中医药出版社,2007:108-126.
- [8] 杜元灏,翟娜,石学敏.针刺对急性脑缺血模型鼠微血管自律运动等的影响[J].针刺研究,1998,23(4):275-278.
- [9] 许能贵,马耕耘,许冠荪,等.电针对局灶性脑缺血大鼠脑血流量、脑组织含水量、SOD、MDA的影响[J].针刺研究,1998,23(3):175-177.
- [10] 杨静,熊利泽,王强,等.不同刺激参数及其组合对电针诱导大鼠脑缺血耐受效应的影响[J].中国针灸,2004,24(3):208-212.
- [11] 范英昌,金树梅,赵桂峰.丹参酮IIA对EVC304细胞血管舒缩因子的影响[J].天津中医药大学学报,2006,25(4):215-218.
- [12] 杨荣卫.人工寒潮促发2型糖尿病大鼠卒中前状态脑组

- 织 ET-1 与 CGRP 含量的变化[D].南昌:南昌大学,2010.
- [13] 王世军,崔可密,卢 岩.针刺对 MCAO 大鼠血 NO、ET 的影响[J].山东中医药大学学报,2005,29(2):159-161.
- [14] 樊 凌,常小荣,严 洁,等.电针对急性脑缺血大鼠血清 NO、NOS、ET-1 的影响 [J].湖南中医药大学学报,2008,28(1):67-69.
- [15] 陈兴华,赖新生.针刺对中风性假性球麻痹患者血浆内皮素及一氧化氮的影响[J].针刺研究,2005,30(3):171-174.
- [16] 户玫琳,吴 华,王世彪,等.温通针法对急性脑缺血大鼠血浆 ET-1 和 CGRP 影响的实验研究[J].针灸临床杂志,2011,27(9):54-56.
- [17] 王 松,郭洪志.血管内皮素-1 水平变化在急性脑梗死诱发全身炎症反应综合征中的意义[J].脑与神经疾病杂志,2006,1(5):366-368.
- (收稿日期:2014-05-12)

### Effect of electroacupuncture on cerebral blood flow and secretion of ET-1 in rats with ischemic stroke sequelae

WANG Juan<sup>1</sup>, LIU Jian<sup>2</sup>

(1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China; 2. Institute of Acupuncture, The First Affiliated Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China)

**Abstract: [Objective]** To observe the effect of electroacupuncture on cerebral blood flow and secretion of ET-1 in rats with ischemic stroke sequelae. **[Methods]** Thirty healthy adult male Wistar rats were randomly divided into electroacupuncture group, model group and sham operation group with 10 rats in each group. Referencing the Zea-Longa line tied method the model of middle cerebral artery occlusion (MCAO) was reproduced. Five weeks later the model of ischemic stroke sequelae was considered to be formed. Rats in electroacupuncture groups were punctured on “Baihui”, “Shuigou”. Two weeks later, the Laser Doppler flow-meter was used to monitor the cerebral blood flow of rats and immunohistochemical method was used for determination of the level of endothelin-1 (ET-1) in brain tissue. **[Results]** Compared with the sham operation group, the cerebral blood flow was reduced in the model group ( $P < 0.05$ ). Compared with model group, the cerebral blood flow was significantly increased in the EA group ( $P < 0.05$ ). In the model group the total area with ET-1 protein expression-positive substance was higher than that in sham group ( $P < 0.05$ ). The total area of the positive cells of ET-1 protein expression in the brain tissue of EA group had a lower trend than that in the model group. But there was no significant difference between these two groups ( $P > 0.05$ ). **[Conclusion]** After cerebral ischemia, cerebral tissue ET-1 levels has increased significantly. EA can inhibit the up-regulation of ET-1 and improve the blood flow of the rats with ischemic stroke sequelae.

**Key words:** electroacupuncture; ischemic stroke sequelae; cerebral blood flow; ET-1