

· 基础研究 ·

急性脑缺血再灌注大鼠脑内 IL-1 β 蛋白表达及针刺对其抑制作用的研究

郭壮丽 裴海涛

【摘要】目的 观察急性脑缺血再灌注大鼠脑内 IL-1 β 蛋白的表达规律及探讨针刺治疗急性脑缺血的机制。方法 采用大鼠脑缺血再灌注模型,应用免疫组化方法观察脑缺血再灌注后假手术组、对照组与针刺组再灌注 2 h、6 h、12 h、24 h 各时间点 IL-1 β 蛋白表达的变化,同时采用 TTC 染色法测定对照组及针刺组再灌注 24 h 时间点大鼠梗死灶体积。结果 假手术组大鼠 IL-1 β 在皮层、纹状体呈基础水平表达,对照组和针刺组脑缺血再灌注后 2 h IL-1 β 表达开始增强,于再灌注后 12 h 达高峰,但针刺组各时间点 IL-1 β 表达均较对照组弱。结论 针刺可明显抑制皮层及纹状体 IL-1 β 蛋白的表达,同时缩小梗死的体积,说明针刺对缺血性脑损伤的保护作用机制可能与其抑制脑内 IL-1 β 蛋白的表达有关。

【关键词】针刺; 脑缺血再灌注; 白细胞介素-1 β

The expression of IL-1 β and the effect of acupuncture on the IL-1 β in rats underwent acute cerebral ischemia followed by reperfusion GUO Zhuang-li, PEI Hai-tao. Department of Neurology, the Affiliated Hospital of Medical College, Qingdao University, Qingdao 266003, China

【Abstract】Objective To observe the expression of IL-1 β and to study the mechanism of acupuncture for focal cerebral ischemia. Methods The ischemia-reperfusion model was established in rats. The immunohistochemistry technique was used to detect the expression of IL-1 β in the sham operation group, control group and acupuncture group at 2h, 6h, 12h, 24h after reperfusion following middle cerebral artery occlusion in rats, TTC staining method was used to observe the infarct volume at 24h after reperfusion. Results The sham operation group showed a baseline expression of IL-1 β in cortex and striate body. The cells expressing IL-1 β were increased in 2h after reperfusion and peaked at 12h after reperfusion in the control and acupuncture groups. The expression of IL-1 β was weaker in acupuncture group as compared to that in the control group at all the time points. Conclusion Acupuncture could downregulate the expression of IL-1 β in cortex and striate body and reduce infarct volume. It was indicated in the study that downregulated expression of IL-1 β might be one of the mechanisms of acupuncture protecting the brain from ischemic damage.

【Key words】Acupuncture; Cerebral ischemia-reperfusion; Interleukin-1 β

近年的研究表明,脑缺血再灌注后脑组织局部过度的炎症反应是造成再灌注损伤的主要原因之一。在炎症反应出现之前可发现有细胞因子介导,如白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor, TNF- α) 的表达。它们均具有参与免疫调节和趋化的作用,同时可促进白细胞黏附于内皮细胞,使白细胞自血管内向缺血脑组织迁移,这些均加重了缺血性脑损伤^[1]。现代医学对比尚无较可靠的治疗方法。研究表明^[2-6],针刺能增加脑血流量,降低自由基水平,改善脑水肿,调整神经生化机制,从而使脑损伤程度减轻。那么,针刺对脑梗死的良性调整作用,是否是通过调控炎性细胞因子来实现,目前鲜见报道。本研究通过观察针刺对中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)大鼠脑内 IL-1 β 蛋白表达的影响,进一步探讨针刺对脑缺血损伤保护作

用的分子生物学机制。

材料与方法

一、实验动物分组

选用清洁级雌性 SD 大鼠 55 只(中科院上海实验动物中心提供),体重 230 ~ 270 g,其中 10 只用于梗死体积的测定,随机分为针刺 A 组与对照 A 组各 5 只;剩下 45 只用于 IL-1 β 蛋白的测定,随机分为假手术组 5 只,针刺 B 组 20 只,对照 B 组 20 只(造模后不作任何干预)。针刺 B 组与对照 B 组再分别根据缺血再灌注时间,随机分为缺血再灌注后 2 h、6 h、12 h、24 h 四个亚组,每组各 5 只。

二、实验动物模型制备及针刺方法

除假手术组,其于 4 组大鼠均参照 Koizumi 等^[7]建立的方法制备模型。

经颈外动脉(external carotid artery, ECA)插入 4-0 尼龙线,经颈总动脉(common carotid artery, CCA)分叉

处和颈内动脉(internal carotid artery, ICA)颅外段,阻塞 ICA 颅内段到达大脑中动脉(middle cerebral artery, MCA)分支处 MCA 的起始部,引起 MCA 供血区的急性脑缺血。具体方法为:SD 大鼠用 10% 水合氯醛(300 mg/kg 体重)腹腔麻醉,麻醉后的大鼠仰卧固定于手术台上,颈部正中切开,逐层切开至肌层,钝性分离甲状腺、肌肉,暴露并分离 CCA、ICA、ECA。电凝 ECA 分支,结扎 ECA 的远端。暴露翼腭动脉,在 ICA 起始部稍上方和 CCA 分叉处下各置一动脉夹。剪断 ECA,自 ECA 残端口插入一端预先用硅胶处理的尼龙线,直径约 0.28 mm。轻推栓线经 CCA 分叉处沿 ICA 入颅,至大脑前动脉,有阻力感时即停止插入。栓线插入深度约为 (18 ± 0.5) mm。结扎 ECA 残端口,缝皮。尾端留 1 cm 长的尼龙线固定在皮肤上。缺血 2 h 后,轻轻外拉尼龙线,至有阻力感时提示尼龙线头部已离开 ICA 而位于 ECA 残端,将体表外的尼龙线剪断,恢复大脑中动脉的血供,实现再灌注。缝合切口后动物保温,麻醉清醒后,置单笼正常饲养至预定处死并取标本的时间。

假手术组尼龙线不插到 MCA 起始部位,插线深度为 12 mm 左右,其余步骤同上。

针刺方法:针刺 A 组与针刺 B 组参照华兴邦等^[8]研制的大鼠穴位图谱取穴。于头顶部相当于人体百会、风府穴处常规剪毛消毒。用 0.35 mm × 40 mm 毫针快速刺入皮下向左前方(相当于人体曲鬓穴处)平刺,进针深度约 0.8 cm,另于风府穴直刺一针,深度约 0.5 cm。缺血后 10 min 给予针刺,连接全能脉冲电疗仪(型号为 KWD-8081)。百会接阳极,风府接阴极,电针频率 7 Hz,强度 6 mA,每次 30 min。

三、脑梗死体积测定

将对照 A 组与针刺 A 组 SD 大鼠于缺血 2 h 再灌注 24 h 后,用 10% 水合氯醛腹腔注射,深度麻醉后断头取脑,放到 -20℃ 冰箱中速冻,在此温度下从额极开始做片厚 1 mm 的连续冠状切片,将切片置于 2% 氯化-2,3-5 三苯基四氮唑(triphenyltetrazolium chloride, TTC)溶液中,37℃ 避光孵育 30 min 后,未缺血区呈红色,梗死区呈白色。据此可用电子计算机图像处理精确地计算出梗死灶大小。脑组织梗死体积的测定主要利用多媒体彩色病理图文处理系统,通过摄像机摄入到图文处理系统的屏幕上,处理成清晰图像后储存在文件中。然后用鼠标画出脑组织白色区域,即梗死区。再通过该系统自动测量得出每一片脑组织的梗死面积,再乘以每片的厚度(1 mm),即得出该片脑组织的梗死体积。以此类推,将每个脑标本的所有切片的梗死体积相加,就可计算出这个鼠脑的梗死体积。

四、脑石蜡切片制备及 IL-1 β 蛋白免疫组化检测

将各组大鼠深度麻醉,迅速打开胸腔,左心室插管

经升主动脉快速灌注生理盐水 200 ml,再持续灌注 0.1 mol/L 磷酸缓冲液配制的 4% 多聚甲醛固定液 300 ml,断头取脑,再用相同固定液后固定 1 h。石蜡包埋,连续切片。

免疫组化按照试剂盒说明书进行操作(免疫组化试剂盒由武汉博士德公司提供)。阴性对照用 0.1 mol/L PBS 代替一抗。

五、图像分析

应用 VIDAS21 显微图像处理系统测定缺血区的反应产物光密度(optical density, OD)值,以同一张切片上未受损脑组织 OD 值为背景,减去背景 OD 值,得到校正的光密度(corrected optical density, COD)值。光密度值在 0~1 之间。

六、统计学分析

采用 SPSS 8.0 统计软件进行统计,所有数据均以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,两组数据间比较采用方差齐性检验及 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、针刺对 MCAO 大鼠脑梗死体积的影响

从表 1 可看出, MCAO 大鼠缺血 2 h 再灌注 24 h 后,脑梗死体积较大;针刺 A 组梗死体积小于对照 A 组,两者差异具有统计学意义($P < 0.05$),表明针刺可明显缩小梗死的体积。

表 1 针刺对脑梗死体积的影响(mm^3 , $\bar{x} \pm s$)

组 别	<i>n</i>	脑梗死体积
对照 A 组	5	137.76 ± 19.9
针刺 A 组	5	84.46 ± 22.3 *

注:与对照 A 组比较, * $P < 0.05$

二、MCAO 再灌注大鼠脑内 IL-1 β 的表达

由表 2~4 可看出,对照 B 组缺血区皮层及纹状体 IL-1 β 蛋白表达明显增强,从再灌注 2 h 后 IL-1 β 表达 COD 值开始升高,直到再灌注 24 h 后 IL-1 β 蛋白表达都较假手术组增强,表达高峰在 12 h。阳性细胞为神经细胞、胶质细胞,血管内皮细胞也有少量表达;针刺 B 组缺血区皮层及纹状体 IL-1 β 蛋白表达 COD 值较假手术组高,但针刺 B 组各时间点 COD 值均低于相应对照组,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

表 2 假手术组与对照 B 组各时间点 IL-1 β 的表达($\bar{x} \pm s$)

组 别	<i>n</i>	皮层	纹状体
假手术组	5	0.16 ± 0.02	0.17 ± 0.01
对照 B 组			
再灌注 2 h	5	0.21 ± 0.01 *	0.24 ± 0.02 *
再灌注 6 h	5	0.25 ± 0.01 *	0.27 ± 0.02 *
再灌注 12 h	5	0.32 ± 0.02 *	0.37 ± 0.01 *
再灌注 24 h	5	0.28 ± 0.01 *	0.34 ± 0.01 *

注:与假手术组比较, * $P < 0.01$

表 3 针刺对不同时间点缺血区皮层 IL-1 β 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	缺血后再灌注时间(h)			
		2	6	12	24
对照 B 组	20	0.21 $\pm$ 0.01	0.25 $\pm$ 0.01	0.32 $\pm$ 0.02	0.28 $\pm$ 0.01
针刺 B 组	20	0.17 $\pm$ 0.01 [#]	0.20 $\pm$ 0.02 [#]	0.27 $\pm$ 0.02 [*]	0.26 $\pm$ 0.01 [*]

注:与对照组 B 比较, * $P < 0.05$, [#] $P < 0.01$

表 4 针刺对不同时间点缺血区纹状体 IL-1 β 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	缺血后再灌注时间(h)			
		2	6	12	24
对照 B 组	20	0.24 $\pm$ 0.02	0.27 $\pm$ 0.02	0.37 $\pm$ 0.01	0.34 $\pm$ 0.01
针刺 B 组	20	0.18 $\pm$ 0.02 [#]	0.22 $\pm$ 0.02 [#]	0.35 $\pm$ 0.01 [#]	0.31 $\pm$ 0.01 [*]

注:与对照 B 组比较, * $P < 0.05$, [#] $P < 0.01$

讨 论

IL-1 是最早被发现的神经肽细胞因子之一, IL-1 β 是血浆和组织液中主要分泌形式,也是脑组织中的主要形式^[9]。IL-1 β 主要的生理来源是单核-巨噬细胞,脑内神经元、星形细胞和血管内皮细胞也可少量合成,IL-1 分泌后与 IL-1R(白细胞介素-1 受体)结合而发挥作用。近来许多研究表明,IL-1 作为前炎性细胞因子是参与缺血性脑损伤的主要介质之一。

脑缺血再灌注后 IL-1 β 产生的细胞机制目前尚不清楚。它可由胶质细胞、神经元细胞和内皮细胞合成分泌,同时又把这些细胞作为靶细胞,不仅启动了机体对损伤的应答,而且放大了对损伤的反应。我们的研究表明:假手术组 IL-1 β 在双侧大脑皮层及纹状体中呈低水平表达,脑缺血再灌注后脑组织非缺血侧的 IL-1 β 表达同假手术组,缺血区皮层及纹状体区 IL-1 β 蛋白从再灌注后 2 h 就已开始升高,到再灌注后 12 h 达高峰,24 h 后表达仍高于假手术组。这与国内李岚等^[10]所报道的 IL-1 β 出现高峰在 6 h 不一致,可能与动物品种、缺血时间及检测方法不同有关。正常脑组织内有少量 IL-1 表达,低水平(生理条件下)的 IL-1 β 可允许神经元可塑性的保持。缺血再灌注后 IL-1 β 表达快速升高,说明缺血早期 IL-1 β 合成机制即被激活,导致其大量表达。本研究观察到表达 IL-1 β 蛋白的阳性细胞为缺血皮层及纹状体区的胶质细胞和神经细胞,血管内皮细胞也有少量表达,证明了上述细胞是 IL-1 β 合成和分泌的场所。有人认为 IL-1 β 在缺血再灌注损伤中的作用与中性粒细胞浸润有密切关系,其可能作为趋化因子,对中性粒细胞有直接或间接的化学吸引作用^[11]。有文献报道^[12]大鼠脑缺血 1 h 再灌注 12 h 后脑组织内方有中性粒细胞浸润,并且我们用 HE 染色证实大鼠局灶缺血 2 h 再灌注后 2 h,缺血半球无白细胞浸润,因而排除了此时脑内所表达的 IL-1 β 来源于血源性细胞的可能性。因此我们的结

果提示,脑缺血再灌注后,脑内缺血区皮层及纹状体有内源性的、蛋白水平的 IL-1 β 表达。

目前,IL-1 β 在缺血性脑损伤中的具体作用机制还不十分明确,但 IL-1 β 作为启动炎症反应网络中的关键因子,可能通过下述机制发挥损伤作用:①激活磷脂酶 A₂,使磷脂过度降解,直接引起细胞膜损伤;②参与白细胞和小胶质细胞激活,释放和(或)分泌一系列潜在的神经毒性物质如氧自由基、超氧化物等;③使内皮细胞由正常的抗凝状态转变为促凝状态,促进内皮细胞与白细胞的粘附,介导粘附分子 ICAM-1 表达上调,白细胞聚集,引起血管炎性反应;④促进 IL-8、TNF- α 、克隆刺激因子和 IL-1 β 自身的合成;⑤使局部兴奋性氨基酸增多,诱导一氧化氮合酶表达,加重毒性损伤^[13-15]。

本研究结果显示,针刺组缺血区脑组织 IL-1 β 蛋白表达明显低于对照组,且各时间点均有统计学意义,但与假手术组比较仍较高($P < 0.05$)。说明针刺能抑制 IL-1 β 的表达,但不能使其恢复到正常水平。同时也证明了针刺在抑制 IL-1 β 蛋白表达的同时,减小了脑梗死体积,说明针刺可对缺血性脑损伤起保护作用。但由于缺血性脑损伤的机制较复杂,还有其他因素相互作用,故还要配合其他治疗,才能收到更好的疗效。

针刺如何降低脑缺血再灌注损伤后炎性介质和毒性物质的产生,目前尚不明确。但针刺可防止再灌注期间局部脑血流量的降低,抑制钙超载、减少自由基和兴奋性氨基酸的释放,并可通过以上机制间接或直接抑制炎性介质的产生,从而起到脑保护作用。以上研究提示针刺对缺血性脑损伤的保护作用可能与针刺抑制脑内 IL-1 β 蛋白的表达有关,其具体机制有待于进一步深入研究。

参 考 文 献

- DeGraba TJ. The role of inflammation after acute stroke: utility of pursuing anti-adhesion molecule therapy. *Neurology*, 1998, 51: 62-68.
- 李汉先,高观明,程汉兰,等. 针刺对脑缺血性损害的防治作用与机制的初探. *针刺研究*, 1994, 19: 26-28.
- 罗勇,董为伟. 针刺对脑缺血大鼠的脑保护作用. *上海针灸杂志*, 2001, 20: 38-40.
- 张春红,王舒,郑灏泳,等. 针刺对局灶性脑缺血大鼠脑细胞凋亡的影响. *针刺研究*, 2001, 26: 102-105.
- 罗勇,董为伟. 电针上调大鼠局灶性脑缺血/再灌注时脑组织抗凋亡基因 bcl-2 蛋白表达. *中华物理医学与康复杂志*, 2000, 22: 53.
- 胡国强,田菲,李平,等. 醒脑开窍针法对脑缺血及再灌注家兔脑自由基病理学超微结构的影响. *中国危重病急救医学*, 1996, 8: 5-7.
- 李胜,雷征霖. 大鼠大脑中动脉区局灶性脑缺血模型. *国外医学脑血管疾病分册*, 1998, 6: 3-6.
- 华兴邦,李辞蓉,周浩良,等. 大鼠穴位图谱的研制. *实验动物与动物实验*, 1991, 1: 1-5.
- 高晶,郭玉璞. 缺血后脑组织损伤中的炎细胞作用. *中华神经科杂志*, 1999, 32: 303-305.

- 10 李岚,焉学英,夏松青,等.大鼠局灶脑缺血和(或)再灌注模型中 IL-1 β 的表达及其与白细胞浸润的关系.临床军医杂志,2000,28:1-3.
- 11 Hara H, Fink K, Endres N, et al. Attenuation of transient focal cerebral ischemic injury in transgenic mice expressing a mutant ICE inhibitory protein. J Cereb Blood Flow Metab, 1997, 17: 370-374.
- 12 Takao T, Tracey DE, Mitchell WM, et al. Interleukin-1 receptors in mouse brain: characterization and neuronal localization. Endocrinology, 1990,127:3070-3078.
- 13 Loddick SA, Wong ML, Bongiorno PB, et al. Endogenous interleukin-1 receptor antagonist is neuroprotective. Biochem Biophys Res Commun, 1997,234:211-215.
- 14 Stroemer RP, Rothwell NJ. Exacerbation of ischemic brain damage by localized striatal injection of interleukin-1 β in the rat. J Cereb Blood Flow Metab, 1998, 18:833-839.
- 15 Stroemer RP, Rothwell NJ. Cortical protection by localized striatal injection of IL-1 α following cerebral ischemia in the rat. J Cereb Blood Flow Metab, 1997, 17:597-604.

(修回日期:2004-08-19)

(本文编辑:阮仕衡)

· 短篇论著 ·

综合康复疗法预防肘部骨折术后肘关节功能障碍

刘锐 李姝

1999 年至 2004 年,我院对 31 例肘部骨折患者术后即采用持续被动活动(continuous passive motion, CPM)锻炼,同时早期配合主动运动、局部冷敷等康复措施,取得了满意的临床效果。报道如下。

一、资料与方法

肘部骨折患者 31 例,男 22 例,女 9 例;年龄 8~65 岁,平均 42.3 岁;肱骨髁间骨折 15 例(张力带结合螺丝钉固定 6 例,加压钢板和重建钢板固定 9 例),桡骨小头骨折切除 4 例,尺骨鹰嘴骨折 12 例(张力带固定 9 例,钢板内固定 3 例)。本组均为关节内骨折,术中确认固定物牢靠。

术后第 1 天即开始行 CPM 锻炼的患者为 17 例,术后 3~5 d 开始 CPM 锻炼的患者为 14 例。第 1 周每日 2 次,每次 15~30 min,1 周后逐渐增加至每日 2 次,每次 30 min~1 h。术后第 1 周配合进行患肢肌肉静力性收缩训练,术后第 2 周鼓励患者应用患肢进行负重日常生活训练,术后第 3 周配合行肘关节周围肌肉渐进式抗阻训练。肘关节康复治疗后期我们局部施以冷疗,化学冰袋或冰块袋置于肘关节周围压力包扎 30~60 min。患肢康复训练后颈腕吊带或支具固定肘关节于功能位 1~3 周。康复期间每周拍片复查,以检查骨折及内固定物是否发生移位。

患者肘关节功能按 Mayo 评分标准^[1]进行评定:优——肘关节功能总分 ≥ 90 分;良——总分 80~89 分;可——总分 60~79 分;差——总分 < 60 分。

二、结果

本组 31 例患者,在院康复时间 3~4 周,随访 3~8 个月,平均随访 5.6 个月。无一例发生骨折移位,X 线片均示骨性愈合。患者肘关节功能恢复情况:优 22 例,良 9 例,优良率 100%。

三、讨论

与上肢其他关节相比,肘关节由于其解剖特性,创伤后更易发生功能障碍。本组均为肘关节骨折患者,按照 AO 分型既

无血液供应,也无淋巴回流,甚至没有中间结构将其与骨内环境系统的有关部分相连,一般认为受损关节软骨愈合潜能非常有限,关节软骨损伤后常易并发创伤性关节炎和肘关节僵直。Søjbjerg^[2]报道创伤后肘关节僵直发生率约为 5%。因 CPM 可增加关节软骨的营养和代谢活动,加速关节软骨和关节周围组织的损伤修复,并刺激具有双重分化能力的细胞向关节软骨转化等作用^[3],所以本组病例未出现肘关节僵直,其肘关节功能恢复良好。

CPM 装置应用时应注意患肢放在 CPM 机上后要系好固定带,防止肢体离开机器支架,以至于达不到要求的活动角度。一般应从小角度开始,逐渐增加至最大角度。停机时间,一般在伤口愈合,主动关节内活动无疼痛,肿胀停止或消退时(大约 3~4 周)。

异位骨化最常发生于髋关节周围,其次是肘关节。目前对于异位骨化的发病机制仍然缺乏足够的认识,对于已经形成的异位骨化,有效的治疗方法只有手术切除。因此对于存在高危因素患者的预防,显得就尤其重要。本组均为肘关节严重创伤,加之手术的进一步损伤,极易并发肘关节异位骨化。我们采取康复治疗后立即进行局部冷敷,有效减少了出血,阻断了形成骨化的途径,故本组均未发生异位骨化。

肘部骨折术后早期进行 CPM 锻炼,并配合主动运动、局部冷敷等康复措施,不仅能减轻术后伤口疼痛和肿胀,更能够促进骨折愈合,最大程度地恢复肘关节的功能,从而提高患者的生活质量。

参 考 文 献

- 1 Modabber MR, Jupiter JB. Reconstruction for posttraumatic condition of the elbow joint. J Bone Joint Surg Am, 1995, 77:1431-1446.
- 2 Søjbjerg JO. The stiff elbow. Acta Orthop Scand, 1996, 67:626-631.
- 3 陆裕朴,胥少汀,葛宝丰,等,主编.实用骨科学.北京:人民军医出版社,1991. 1587-1590.

(修回日期:2004-11-10)

(本文编辑:阮仕衡)

作者单位:475000 开封,河南省开封市第一人民医院骨科(刘锐),康复科(李姝)