

井穴放血法对急性脑缺血大鼠缺血区脑组织凋亡相关蛋白的影响^{*}

王秀云¹, 李积胜², 刘公望¹, 郭义¹, 潘荣菁¹, 张果忠², 李桂兰¹, 韩煜¹, 王强¹

(1. 天津中医学院, 天津 300193; 2. 武警医学院, 天津 300162)

摘要: [目的] 观察井穴放血法对急性缺血性脑损伤的脑保护作用。[方法] 将实验大鼠分为假手术组、脑缺血组和脑缺血+井穴放血治疗组, 一侧大脑中动脉阻塞致急性缺血性脑损伤模型(MCAO), 治疗组在脑缺血后即刻给予井穴放血治疗, 出血量为每穴1滴。分别于缺血后的1、3、6、24 h处死, 进行免疫组织化学染色, 检测缺血区皮层脑组织c-fos蛋白(FOS)及HSP70蛋白免疫阳性细胞, 以观察井穴放血法对急性缺血性脑损伤后早期抑凋亡基因表达的影响。[结果] c-fos蛋白和HSP70蛋白在缺血区皮层脑组织表达增加, 缺血后1 h HSP70无表达, FOS表达增加, 在随后观察的3、6、24 h时程内HSP70和FOS均有随缺血时间延长表达增多的趋势。井穴放血治疗组在以上各时程c-fos及HSP70免疫阳性细胞数均高于同时段的缺血病模组, 有统计学意义。[结论] 急性脑缺血后应用井穴放血干预治疗可明显增强缺血区脑组织对抗神经细胞凋亡的即刻早期基因c-fos蛋白和抗应激HSP70蛋白的表达, 从而提高了缺血后神经细胞对缺血、缺氧的耐受和适应能力, 提高了缺血后神经元的可塑性, 进而可影响晚期目的基因的表达, 抵抗细胞凋亡的发展, 增强脑修复能力。表明井穴放血法对中风初期有一定的脑保护作用。

关键词: 急性局灶性脑缺血; 井穴刺络放血疗法; c-fos蛋白; HSP70蛋白

中图分类号: R245.312 文献标识码: A 文章编号: 1672-1519(2004)02-0123-03

急性脑缺血过程中, 缺血半影区是兴奋性毒性、梗死灶周围去极化、炎症和凋亡起作用的地方, 也是目前所有治疗方案的靶标。如同其他治疗一样, 针刺对梗死灶中心区坏死的神经元无逆转能力, 早期进行针刺预防及治疗以挽救周边神经元的功能、限制和缩小梗死灶范围是针刺治疗缺血性中风的关键所在^[1], 对中风初起患者尽早施予井穴放血处理的意义也在于此。c-fos属于即早反应基因家族(immediate early genes, IEGs), 它的表达是机体受到刺激后所能观察到的基因活动的首批变化, 是神经元被刺激激活的“第二信使”与目的基因表达之间的信息传递媒介, 因此常被作为特定刺激条件下神经元功能活动的标志^[2]。晚期目的基因Bax(促凋亡)、bcl-2(抗凋亡)在发生细胞凋亡方面起着非常重要的作用。但细胞是否发生凋亡与充当第三信使角色的c-fos基因和应激蛋白HSP70表达密切相关, 两者均在缺血早期介导了与其他抗凋亡

因子间的多极保护效应, 干预了促凋亡目的基因的表达, 从而抑制了细胞凋亡的进展。c-fos可激活系列后期效应性基因参与细胞内的抗损伤和增强修复机制的功能, 反映神经元的应激反应能力, 从而在缺血过程中有维持生存和修复保护作用。HSP70是一种非特异性细胞保护蛋白, 是机体在应激状态下出现的一种保守蛋白, 已有研究表明HSP70主要在缺血半影区功能尚存的神经元中表达, 表达早且量多的神经元对缺血耐受性强, 因此HSP70表达是预示受损神经元能够存活的一个敏感指标, 具有抗凋亡作用, 可阻止脑缺血后的神经细胞损伤。故观察即早反应基因c-fos与热应激蛋白HSP70, 可了解急性脑缺血损伤后缺血半影区内脑细胞的存活和凋亡状况。笔者观察了实验性急性脑缺血后即刻应用井穴放血法在“脑缺血后超早期干预窗”中的脑保护作用。

1 材料与方法

1.1 动物分组及模型制作 120只健康成年Wistar大鼠, 体质量170~210 g(2月龄), 雌雄不拘, 由国家医药管理局天津药物研究院实验动物中心提供。动物适应性饲养1周后进行实验。将大鼠随机分为对照组(假手术)、模型组(脑缺血)和治疗组(脑

^{*} 基金项目: 国家自然科学基金资助(No. 30271641), 天津市卫生局科研基金资助(No. 97Y107)

作者简介: 王秀云(1965-), 女, 副教授, 博士, 硕士生导师, 全国刺络放血学组委会秘书长, 已承担国家及部市级课题十余项。

缺血+井穴放血), 每组各 40 只。并分别在刺血治疗后 1、3、6、24 h 各组分别观察 c-fos 和 HSP70 蛋白表达情况。

将大鼠用 0.4% 戊巴比妥钠腹腔麻醉后, 右侧卧位, 于眼眶后至耳的连线中点纵行切开皮肤约 2 cm, 分离并切去部分颞肌, 暴露颞骨, 用颅骨钻做一直径 3~5 mm 的骨窗, 轻抬脑可见到横过嗅束向上走行的大脑中动脉(MCA), 采用凝闭法阻断大脑中动脉造成急性缺血性脑损伤模型(MCAO)。假手术组仅开骨窗而不凝闭动脉。治疗组在造模后即刻施加手十二井穴刺络放血疗法。在大鼠予井穴刺络放血治疗后的 1、3、6、24 h 各不同时段, 分别从 3 组中随机选取 10 只动物实行麻醉、灌注固定、冰冻切片。待进行免疫组化反应。

1.2 井穴刺络放血治疗方法 选穴: 位于大鼠双侧前肢趾端的十二井穴, 每侧计 6 穴。即手太阴肺经井穴少商、手厥阴心包经井穴中冲、手少阴心经井穴少冲、手阳明大肠经井穴商阳、手少阳三焦经井穴关冲、手太阳小肠经井穴少泽。方法: 以刺血针于以上诸穴点刺放血, 出血量为每穴 1 滴。

1.3 大鼠脑取材及组织的制备 以 0.4% 戊巴比妥钠腹腔麻醉动物, 开胸腔, 暴露心脏, 剪开右心耳, 从左心室依次灌注 37℃ 的生理盐水 150 mL 至流出液清晰、动物肝脏及肠系膜呈苍白色, 继续灌注 4℃ 多聚甲醛 500 mL, 约 1 h 内灌毕, 待动物出现四肢肌肉抽搐表示灌注成功。断头、迅速剥取脑组织, 放入 4℃ 的相同固定液中进行后固定 6~12 h, 然后置于 4℃ 的 20% 戊糖溶液中 12 h 以上, 置冷冻切片机内作连续冠状切片, 片厚约 45 μm, 收集于 pH 7.4, 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲溶液(PBS) 中, 每组大鼠自缺血区选取两套切片, 分别采用免疫组织化学方法检测 c-fos 和 HSP70 免疫阳性细胞。

1.4 免疫组织化学反应 在 c-fos 检测时, 取各组脑片进行下述免疫组织化学反应: 1) 0.3% TritonX-0.03% H₂O₂, 37℃, 30 min; 2) 5% 正常羊血清, 室温, 20 min; 3) 兔抗 c-fos 血清, 1:2 000, 加 1.5% 正常羊血清, 4℃, 12 h; 4) 卵白素-生物复合素 ABC 复合物, 1:100, 37℃, 2 h。以上各步间均以 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液洗涤 4 次, 15 min/次, 然后用 0.1 mol/L 醋酸缓冲液(pH 6.0) 浸泡 15 min, 进行 DAB 呈色反应。乙醇梯度脱水、二甲苯透明、中性树胶封片。对 HSP70 的检测与上述方法基本相同, 将选定的损伤区脑组织切片依次移入 0.1%

Triton 和 0.03% H₂O₂ 溶液, 3℃ 孵育 30 min; 3% 正常羊血清, 37℃ 孵育 30 min; 入兔抗鼠 HSP70 抗体(Santa Cruz Inc 产品), 4℃ 孵育 72 h; 生物素标记的羊抗兔抗体(vector 公司)和 ABC 液各 1 h (37℃); 0.05% DAB-0.01% H₂O₂-TBS 呈色 10~20 min, 镜下观察染色结果, 使所有切片背景染色尽可能一致, 然后终止反应。以上各步间均以 0.05 mol/L PBS(pH 7.4) 漂洗 3 次, 5 min/次。

1.5 统计方法 在光镜下观察皮层内 c-fos 和 HSP70 免疫阳性细胞, 采用 SPSS11.0 版本软件进行数据分析, 实验结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 统计学方法采用单因素方差分析。

2 实验结果

急性缺血性脑损伤后, 能诱导 c-fos 及 HSP70 蛋白在皮层缺血区脑组织的表达增加, 其中缺血 1 h 后 HSP70 蛋白尚极少表达, FOS 蛋白则明显表达, 在随后所观察的 24 h 时程内 c-fos 及 HSP70 蛋白均有随缺血时间延长逐渐增多的趋势, 提示脑的缺血性损伤可应激性地增强神经细胞对缺血、缺氧的耐受和适应能力。而脑缺血后即刻应用井穴放血干预治疗的大鼠缺血区皮层脑组织, 较之病模组可进一步上调缺血区脑组织 c-fos 及 HSP70 蛋白的表达水平, 两者比较有显著性差异, 提示尽早应用井穴刺络放血疗法, 可明显增强脑组织对抗缺血性脑损伤的脑损害发展。

3 讨论

手十二井穴刺络放血法具有泻热消瘀、活血通络、开窍启闭、护脑醒神等功效, 为中医传统的特色急救措施之一, 其操作简单, 作用迅速, 在中风急救方面对于缓解症状、改善预后效果肯定^[3,4]。此法简便易行, 在中国已经试验式地使用达千年之久, 特别是作为民间疗法更被广泛接受。近 20 a, 中国国内和国外如日本等已着手从临床和实验两个方面开展了本疗法的研究, 进一步深入挖掘此特色疗法, 阐明其作用机制, 具有很高的学术价值和临床应用价值。

急性缺血性脑损伤诱发的脑卒中是临床重大疑难病症之一, 国内外学者一直从多方面探讨其发病机制和有效的防治措施。近年来采用井穴刺络放血法治疗本病的研究取得了不断的进展。经多层次研究证实, 该法对脑血流有良性调整作用, 可明显改善缺血区脑组织的急性缺氧状态; 改善实验性脑梗死大鼠缺血区单胺类和氨基酸类递质异常, 抑制胞内 Ca²⁺ 内流和胞外 K⁺、Na⁺ 失衡等^[5-7]。

本次研究表明,井穴放血法能增强与耐缺血、缺氧有关的快速反应蛋白 FOS 和应激蛋白 HSP70 的大量表达,表明本法促进了损伤后组织的修复与神经元的功能重建。血流量不足、血氧供应障碍是缺血性中风发生的始动环节,而及时施加井穴放血刺激能快速动员脑保护蛋白发挥效应,在提高对缺氧的耐受性同时,增强受损神经元的建构,在多环节上减轻了由于细胞能量储备耗竭所诱发的酸中毒和神经细胞膜损伤产生的一氧化氮和自由基。脑缺血后 c-fos 和 HSP70 的快速高水平表达,通过继发启动了相关基因的表达而减轻了以上诸环节,对抗内源性损伤因子引起的毒性作用,清除细胞内的异常蛋白,最终减缓了缺血区脑神经细胞的胞内 Ca^{2+} “超负荷”状态,起到保护脑细胞,加速脑细胞的损伤修复作用,从早期阻止了缺血半影区内的细胞凋亡,减轻了生化过程的加剧和梗死灶的扩大,减缓了缺血半影区的扩大和脑损害的发展。

参考文献:

- [1] 张京钟,施 静,刘晓春,等.电针对局灶性脑缺血后脑内 Bax, Bcl-2 表达的影响[J].中国组织化学与细胞化学杂志,2001,10(1):27.
- [2] 陈宜张.分子神经生物学[M].北京:人民军医出版社,1995.43.
- [3] 周国平,徐汤苹.手十二井穴放血对脑缺血家兔脑血流图影响的初步研究[J].天津中医,1989,6(5):22.
- [4] 郭 义,张艳军,王秀云,等.手十二井穴刺络放血对中风患者颅内血流动力学影响的观察[J].针灸临床杂志,1995,11(6):21.
- [5] 马岩^王,郭 义,徐汤苹,等.手十二井穴刺络放血对实验性脑缺血大鼠缺血区脑组织氧分压影响的动态观察[J].上海针灸杂志,2000,19(1):40.
- [6] 马岩^王,徐汤苹.手十二井穴刺络放血对实验性脑缺血大鼠缺血组织 K^+ 、 Na^+ 浓度影响的动态观察[J].中国针灸,1997,21(9):562.
- [7] 马岩^王,郭义,王秀云,等.手十二井穴刺络放血对实验性脑缺血大鼠缺血区脑组织钙调素活性影响的实验观察[J].针刺研究,1999,24(2):105.

(收稿日期:2004-02-18)

Influence of well acupoints blood_letting therapy on apoptosis associated protein of ischemic brain tissue in rats with acute cerebral ischemia

WANG Xiu yun, LI Ji sheng, LIU Gong wang, *et al*

(Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China)

Abstracts: [Objective] To observe the protective function of well acupoints blood_letting method against acute ischemic brain injury. [Methods] Rats were divided into sham operation group, cerebral ischemia group and treatment group. Acute ischemic brain injury was made by middle cerebral artery obstruction(MCAO). Well acupoints blood_letting therapy, one drip each time, was given in rats in treatment group immediately after cerebral ischemia. 1, 3, 6, 24 hours after ischemia, rats were killed and c-fos protein(FOS) and HSP70 immune positive cells of cortex tissue in ischemic region were determined by immunohistochemistry assay to observe the influence on antiapoptosis gene expression at early stages of acute ischemic brain injury. [Result] Increased expression of c-fos protein and HSP70 protein in cortex tissue of ischemic region was observed with no expression of HSP70 1 hour after ischemia, while the expression of FOS was increased. Expression of FOS and HSP70 tended to increase with the time elapsed during the following 3, 6, 24 hours. The count of c-fos and HSP70 immune positive cells in treatment group was all higher than that in model group during the same period of time with statistical significance. [Conclusion] Well acupoints blood_letting therapy can obviously enhance the expression of c-fos and HSP70 protein in ischemic region, increase the ability against apoptosis and the tolerance and adaptation ability of nerve cell to hypoxia and ischemia, and enhance the neuron compliance after ischemia, thus further influencing the expression of objective gene at late stages, resisting the development of apoptosis, enhancing the repairing ability of brain. It is suggested that well acupoints blood_letting therapy has certain protective action against early stroke.

Key words: acute focal cerebral ischemia; well acupoints blood_letting; c-fos protein; HSP70 protein

.....

爱 护 环 境 保 护 树 木 减 少 污 染

• 公益广告 •