

·基础研究·

电针对局灶性脑缺血大鼠细胞间黏附分子-1 表达和白细胞浸润的影响

刘玉珍¹ 蒋戈利¹ 韩景献² 车永哲³

摘要 目的:探讨针刺抗脑缺血再灌注炎症损伤的机制。方法:采用线栓法制作大鼠大脑中动脉缺血模型(MCAO), TTC 染色,免疫组化技术及原位杂交方法检测细胞间黏附分子-1(ICAM-1) mRNA 和蛋白的时程变化规律及电针的调节作用,以及检测再灌注后白细胞髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)的变化。结果:再灌注 3h 模型组和非穴组 MPO 活性均增加,24—48h 达到峰值,而电针组相应 MPO 活性明显降低($P<0.05$)。ICAM-1 mRNA 和蛋白表达均发生于脑缺血/再灌注后 3h,分别于再灌注 12h 和 24h 达到高峰(组内比较 $P<0.01$),针刺可显著降低缺血区 ICAM-1 mRNA 和蛋白表达(与模型组比较 $P<0.01$)。结论:早期针刺治疗可能通过下调脑缺血区黏附分子 ICAM-1 的表达,从而抑制黏附分子介导的内皮细胞与中性白细胞的黏附浸润,而防治脑缺血再灌注炎症损伤。

关键词 电针;脑缺血/再灌注;细胞间黏附分子-1;过氧化物酶

中图分类号:R245, R493,R741 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2007)-02-0122-03

Effects of galvano-acupuncture on neutrophil infiltration and the expression of ICAM-1 mRNA and protein of cerebral ischemic region in rats/LIU Yuzhen,JIANG Geli,HAN Jingxian,et al//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2007, 22(2): 122—124

Abstract Objective:To study mechanisms of early treatment of cerebral ischemia-reperfusion (I/R) by acupuncture in resisting inflammation injury in rats.**Method:**Cerebral I/R Model was established by occlusion of the middle cerebral artery for 1h and then removal of the occlusion at 3h, 12h,24h and 48h respectively.The expression of ICAM-1 mRNA and protein was displayed by using immunohistochemical ABC and in situ hybridization techniques in ischemic cerebral cortex and corpus striatum in rats.The change of leukocytes myeloperoxidase in cerebral ischemic region, was assayed with a spectrometer system.**Result:**The mRNA expression of ICAM-1 was detected at capillary endothelia cells in ischemic cerebral cortex at 1h ischemia-3h reperfusion and peaked at 1h ischemia-12h reperfusion, The protein expression of ICAM-1 was detected at capillary walls in post ischemia cerebral cortex at 1h ischemia-3h reperfusion and peaked at 1h ischemia-24h reperfusion and increased continually during 48h reperfusion.Both mRNA and protein expression of ICAM-1 in ischemic cerebral cortex were down-regulated considerably by galvano-acupuncture treatment($P<0.01$).**Conclusion:**The protective effect of acupuncture on cerebral neurons under acute infarction is possible through it downregulative action on the mRNA and protein expression of ICAM-1, which caused neutrophil infiltration that induced by adhesive molecules between endothelium cell and neutrophil.

Author's address TCM Acupuncture and Recovered Centre of Tianjin Sanatorium of PLA, 300381

Key words galvano-acupuncture;cerebral ischemic - reperfusion;intercellular adhesion molecule-1;myeloperoxidase

炎症反应在脑缺血的病理损伤过程中的作用机制是近年来研究的热点, 研究人员已经观察到缺血性脑损伤后局部炎性细胞浸润现象, 1—2 天内主要以多形核白细胞浸润为主^[1], 血管内皮细胞表面的黏附分子在此过程中起关键性作用。本课题拟在建立大鼠局灶性脑缺血再灌注(ischemia/reperfusion,I/R)损伤模型的基础上, 观察细胞间黏附分子-1 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1) mRNA 和蛋白表达的时程变化规律, 并通过检测髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO) 反映中性白细胞的浸润情况, 以期探讨黏附分子在中性白细胞局部浸润过程中的作用机制, 为缺血性脑血管病的针刺抗炎作用

提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 动物分组

健康雄性 Wistar 大鼠 138 只, 体重 $260\pm 20g$, 由中国医学科学院实验动物研究所提供。按随机分组

1 解放军天津疗养院中医针灸康复中心, 天津市解放南路 600 号, 300381

2 天津中医学院第一附属医院老年病研究室

3 南开大学医学院解剖教研室

作者简介:刘玉珍,女,博士,主治医师

收稿日期:2006-03-06

原则分成以下几组:假手术组与实验组,实验组分为脑缺血 1h/再灌注 3h、12h、24h、48h 模型对照组(各 12 只, TTC 染色各用 2 只)、非穴位针刺组和电针治疗组(每组各 10 只)。

1.2 局灶性脑缺血再灌注大鼠模型的建立及组织制备

参照 Longa^[2]的改良方法制作大鼠局灶性脑缺血再灌注模型。10%水合氯醛(330mg/kg)腹腔麻醉,消毒颈部皮肤,沿颈正中线做一长度约 2cm 的切口,仔细分离暴露出右侧颈总动脉(CCA)、颈外动脉(ECA)和颈内动脉(ICA)。在右侧颈总动脉接近分叉处以眼科剪剪一“V”形小口,将头端用火焰烧成光滑球面(直径为 2.5—2.8mm)的 4-0 单股尼龙线从小口缓慢插入,经颈总动脉分叉处进入右侧颈内动脉入颅,插线深度 1.8—2.0cm,栓塞右大脑中动脉。消毒并缝合切口,手术过程中大鼠肛温维持在 37±0.5℃。栓塞 1h 后,缓慢拔出尼龙线进行再灌注,根据所需的再灌注时间段取脑。假手术组不插线,其他同手术组。

1.3 TTC 染色

将 2g 氯化三苯基四氮唑(2,3,5-triphenyltetrazolium chloride, TTC)溶于 100ml 生理盐水中,避光 4℃保存备用。取 I/R 3h、12h、24h、48h 模型对照组大鼠,每组 2 只。分别断头取脑后去除嗅球、小脑和低位脑干,用脑切片器迅速做冠状切片,每片厚 2mm,放入 2%的 TTC 磷酸缓冲液中,37℃水浴避光孵育 30min,终止染色,取出后观察,正常脑组织染成红色,梗死组织呈白色,弃去 TTC,加入 5 倍以上体积的 4%的多聚甲醛固定,一周内拍照。

1.4 神经病学评分

按 Longa^[2]5 分法进行神经病学评分:0 分,无神经缺损症状;1 分,不能伸展对侧前爪;2 分,行走时向偏瘫侧转圈;3 分,向偏瘫侧倾倒;4 分,不能自发行走,意识丧失。其中,0 分及 4 分者被剔除。

1.5 电针治疗方法

根据华兴邦等^[3]研制的“大鼠穴位图谱”,选取水沟、内关、三阴交穴。

操作方法:先直刺双侧内关、三阴交,行提插捻转泻法 1min,继刺人中,向鼻中隔方向斜刺,将针体旋转 360°行雀啄手法。非穴位针刺组:选取双侧肋下 2 个固定非穴点,用平补平泻捻转手法 1min。通以 G6805-II 型电针治疗仪,频率为 4—16Hz,波形为断续疏密波,刺激强度为 2V。持续时间为 10min。

治疗时机:I/R 后 3h、12h 针刺组于脑缺血即刻、再灌注即刻、再灌注相应时间点分别进行电针治疗;

I/R24h、48h 针刺组除此之外每 12h 治疗 1 次。

1.6 白细胞活性的检测

1.6.1 取材:10%水合氯醛足量腹腔麻醉大鼠,即行开颅取脑。自视交叉后冠状位切开,取新鲜额顶叶皮质及皮质深部纹体等基底节区脑组织各 100mg,制成 5%的组织匀浆。

1.6.2 髓过氧化物酶(MPO)活性检测步骤:按照南京建成公司 MPO 检测试剂盒说明进行操作。根据所提供的公式:MPO 单位/克湿片=(测定管 OD 值-对照管 OD 值)/11.3×取样量(g)计算出 MPO 酶活力单位。

1.7 ICAM-1 mRNA 和蛋白的表达

1.7.1 取材:所用手术器械和用具均经 180℃烤箱过夜或 0.1%DEPC 浸泡去 RNA 酶处理。10%水合氯醛足量腹腔麻醉大鼠,4%多聚甲醛(4℃,pH7.4 含 0.1%DEPC)用 BT-100 恒流泵心脏灌注固定取脑,发现颅底瘀血者剔除。从视交叉至脑桥前缘冠状位切取脑组织 2 块,每块厚约 3mm,置于同一固定液中 4℃ 1—2h,OCT 包埋,冰冻切片连续切片,厚度为 20μm,分别每隔 5 张和 6 张各取一张贴片,前者按原位杂交要求制片,用于原位杂交;后者贴附于载玻片,用于免疫组化。干燥,保存于-20℃备用。

1.7.2 免疫组化染色(ABC 法)。

1.7.3 原位杂交反应:杂交前所有液体均用经高压灭菌的 0.1%DEPC 双蒸水配制。ICAM-1 靶基因的 mRNA 序列:

①5'-TCCGT GCAGG TGAAC TGCTC TTCCT CTTGC-3'

②5'-GACCC CAAGG AGATC ACATT CACGG TGCTG-3'

反应步骤按说明书进行。

1.8 阳性评定及分析

在光镜下毛细血管内皮细胞细胞膜、细胞浆着色呈黄褐色为 ICAM-1mRNA 原位杂交阳性。毛细血管着色呈棕黄色为 ICAM-1 蛋白表达阳性。在 400×倍镜下,每组各选取 5 张切片,每张切片在缺血区随机选取 5 个不重叠视野,用 MPIAS-1000 多媒体彩色病理图文分析系统(同济医科大学清平影像公司研制)进行图像分析。

1.9 统计学分析

数据用均数±标准差表示。统计学处理采用 SPSS10.0 软件进行方差分析、t 检验和相关性分析。

2 结果

2.1 TTC 染色结果

TTC 染色可较直观地观察脑缺血的范围,有助于评价模型建立的成功与否。本实验假手术组和缺

血再灌注模型组非缺血侧脑组织呈均匀一致的红色。缺血侧脑组织明显水肿,苍白色,无光泽,TTC染色后缺血区呈白色,缺血再灌注3h缺血病灶位于额顶叶皮质下部和纹状体外侧区,范围小,边界欠清;随着再灌注时间的延长,苍白色面积逐渐扩大,I/R 48h波及额顶叶皮质上部、纹状体内侧区及梨状区皮质。经TTC染色,可认为本实验的模型制作成功(图1,见前置彩色插页8)。

2.2 再灌注后 MPO 活性的变化及针刺的影响

MPO活性在假手术组和缺血再灌注3h组均未见表达;缺血再灌注后12h、24h、48h模型组皮质和纹状体MPO活性均升高,与假手术组相比有极显著性差异($P<0.01$),在24h、48h两个时间点MPO活性显著增强。电针组缺血侧皮质和纹状体各时间点MPO活性的上调明显受抑制,与模型组相比有极显著性差异($P<0.01$),非穴组与模型组相比,无显著性差异($P>0.05$)。见表1。

2.3 脑缺血再灌注后 ICAM-1 mRNA 和蛋白的表达及电针的调节

应用ICAM-1 cDNA探针探查mRNA的表达,光镜下观察,阴性对照片未出现阳性信号,假手术组皮质ICAM-1 mRNA无表达;实验组表达为黄褐色

的阳性毛细血管内皮细胞,阳性信号显示明显的区域性,即缺血灶中心区及半暗带区。I/R 3h脑缺血区皮层和纹状体开始表达,随着再灌注时间的延长,阳性反应物表达增加,于I/R 12h达到高峰;持续至48h(模型组与假手术组比较 $P<0.01$)。电针组ICAM-1 mRNA阳性信号面积减少,与模型组与非穴组相应时间点比较,具有显著性差异($P<0.01$)(见表2)(图2—4,见前置彩色插页8)。

免疫组化染色显示,ICAM-1蛋白阳性染色为棕黄色的微血管和毛细血管,小血管和大血管呈阴性反应。假手术组ICAM-1蛋白呈微量表达。在实验组,阳性血管在脑的不同区域也显示明显的区域特征,与上述的杂交信号在脑的分布基本一致。对ICAM-1阳性血管进行计数,统计结果显示,I/R 3h脑缺血区的阳性血管均明显多于假手术组($P<0.01$),随着再灌注时间的延长,阳性毛细血管数目亦逐渐增加,I/R 24h达到高峰(组内比较 $P<0.01$),I/R 48h仍呈较高水平表达。电针组ICAM-1阳性信号血管数明显减少,与模型组和非穴组相应时间点比较,具有显著性差异($P<0.01$)(见表2)(图5—8,见前置彩色插页8)。

表1 缺血再灌注后皮层及纹状体 MPO 的变化

($\bar{x} \pm s$)

I/R 时相	动物数(只)	缺血部位	假手术组	模型组	非穴位针刺组	电针组
12h	5	皮质	0.021±0.003	0.116±0.017 ^①	0.112±0.016 ^{①②}	0.051±0.009 ^{①③}
		纹状体	0.024±0.002	0.144±0.019 ^①	0.143±0.016 ^{①②}	0.067±0.014 ^{①③}
24h	5	皮质	0.017±0.002	0.242±0.027 ^①	0.241±0.026 ^{①②}	0.175±0.023 ^{①③}
		纹状体	0.030±0.003	0.251±0.013 ^①	0.248±0.025 ^{①②}	0.160±0.001 ^{①③}
48h	5	皮质	0.028±0.003	0.285±0.017 ^①	0.275±0.026 ^{①②}	0.189±0.022 ^{①③}
		纹状体	0.024±0.003	0.305±0.031 ^①	0.293±0.036 ^{①②}	0.216±0.020 ^{①③}

与假手术组比较^① $P<0.01$;与模型组比较;^② $P>0.05$;^③ $P<0.01$

表2 电针对脑缺血区 ICAM-1 杂交信号面积和免疫组化染色的阳性血管计数的影响

($\bar{x} \pm s$)

I/R 时相	动物数(只)	项目	假手术组	模型组	非穴位针刺组	电针组
3h	5	阳性信号面积	-	273.1±23.8	263.2±22.6	242.6±18.2
		血管数目	-	6.3±0.7	6.0±0.6	4.7±0.5
12h	5	阳性信号面积	-	1205.7±118.3 ^{①②}	1185.7±110.5 ^{①②}	884.4±65.1
		血管数目	1.8±0.4	24.1±2.3 ^①	23.5±2.2 ^①	13.2±1.6
24h	5	阳性信号面积	-	850.8±79.6 ^①	851.7±78.3 ^①	625.45±69.3
		血管数目	1.6±0.3	37.3±3.5 ^{①②}	35.8±3.4 ^{①②}	23.5±2.1
48h	5	阳性信号面积	-	493.0±42.4 ^①	486.4±40.3 ^①	245.4±25.3
		血管数目	1.9±0.4	13.7±1.7 ^①	11.8±1.4 ^①	7.7±0.9

(阳性信号面积/17205.5 μm^2)^①与电针组相比 $P<0.01$,^②与本组其他时间点比较 $P<0.01$

3 讨论

研究表明,脑缺血再灌注后,周围血中白细胞透过血脑屏障向缺血区迁移,黏附分子的表达明显增高,提示黏附分子与脑缺血有密切的关系^[4]。

ICAM-1是黏附分子免疫球蛋白基因超家族的一种单链糖蛋白,正常情况下可在血管内皮细胞有少量表达,但在内毒素、TNF- α 、IL-1和IFN- γ 等刺激下,其在血管内皮细胞的表达明显上调^[5]。Wang^[6]

等用RT-PCR方法发现MCAO后,缺血皮质ICAM-1在术后3h明显上升(2.6倍),6—12h达高峰(6.0倍),且持续5d。本研究结果与Wang结果相似,ICAM-1 mRNA在假手术组未见表达,而蛋白有少量表达,在脑缺血1h再灌注3h mRNA和蛋白均开始明显表达,mRNA表达在12h达到高峰,而蛋白表达在24h达到高峰,48h仍维持较高水平。电针组I-

(下转 150 页)