

## · 基础研究 ·

电针对局灶性脑缺血再灌注大鼠  
大脑皮质微血管的影响

毛庆菊 陈邦国

**【摘要】目的** 研究电针对局灶性脑缺血再灌注大鼠大脑皮质微血管密度的影响。**方法** 将 40 只 SD 大鼠按随机数字表法随机分为正常组 ( $n=4$ )、假手术组 ( $n=4$ )、模型组 ( $n=16$ ) 和电针组 ( $n=16$ )。正常组常规饲养,不作任何处理,假手术组大鼠于麻醉切开颈部皮肤钝性分离肌层后,仅分离颈总动脉及颈内动脉至翼腭动脉,模型组和电针组均采用线栓法制备大鼠大脑中动脉闭塞(MCAO)模型。模型组和电针组于栓塞 30 min 后再灌注,并根据再灌注的时间点各分 1 d、2 d、4 d、8 d 四个亚组,每个亚组 4 只大鼠。电针组于缺血再灌注 1 h 开始进行电针治疗,取“百会”、“水沟”、“足三里”穴,选疏密波治疗,每日 1 次,每次 30 min。观察各组大鼠局灶性脑缺血 30 min 再灌注 1 d、2 d、4 d、8 d 后的右侧大脑皮质微血管 CD34 蛋白的表达及微血管密度的动态变化。**结果** 模型组各亚组大鼠的大脑皮质的微血管密度(MVD)较正常组和假手术组均有所增加,尤以缺血再灌注 4 d 后最为显著,差异有统计学意义( $P<0.05$ );在相同时间点,电针组各亚组大鼠的 MVD 均高于模型组,以缺血再灌注 4 d 后 2 组差异有统计学意义( $P<0.05$ )。**结论** 调控脑内微血管新生可能是针刺发挥脑保护作用的途径之一。

**【关键词】** 脑缺血再灌注; 电针; 血管新生; 大鼠

**Effects of electroacupuncture on the microvasculature of the cerebral cortex after focal cerebral ischemia and reperfusion in rats** MAO Qing-ju\*, CHEN Bang-guo. \*Department of Traditional Chinese Medicine, Tianyou Hospital Affiliated to Wuhan University of Science and Technology, Wuhan 430064, China

**【Abstract】Objective** To study the effects of electroacupuncture (EA) on micro-vessel density (MVD) in the cerebral cortex after focal cerebral ischemia and reperfusion. **Methods** Forty Sprague-Dawley rats were randomly divided into a normal group ( $n=4$ ), a sham-operated group ( $n=4$ ), a model group ( $n=16$ ) and an EA group ( $n=16$ ). The middle cerebral artery was sutured to establish a model of middle cerebral artery occlusion (MCAO). The Baihui (DU20), Shuigou (DU26) and Zusanli (ST36) acupoints were stimulated with slow-fast wave current for 30 min daily. Streptavidin-biotin-peroxidase complex was used to detect the expression of CD34 and MVD changes in the rats' right cerebral cortex on the 1st, 2nd, 4th and 8th day. **Results** Compared with the normal group and the sham-operated group, MVD in the ischemic cortex of all subgroups of the model group had increased. It peaked on the 4th day and then gradually declined through the 8th day. MVD in all the subgroups of the EA group increased significantly, and more than in the model group at every time point, but the difference between the 2 groups was significant only on the 4th day. **Conclusions** Regulating angiogenesis in ischemic brain tissue is one of the ways EA can protect the brain.

**【Key words】** Cerebral ischemia; Reperfusion; Electroacupuncture; Angiogenesis

脑卒中因其高致残率及高死亡率已成为严重威胁现代人类健康的重大疾病<sup>[1]</sup>。目前,大量的研究集中于挽救和改善神经元存活和功能恢复,有关脑缺血后脑微血管再生、微循环重建,较少引起研究者的关注。然而,脑卒中后神经元存活的挽救和功能恢复与脑微循环密切相关<sup>[2]</sup>。本实验在建立大鼠局灶性脑缺血再灌注模型的基础上,观察大鼠大脑皮质微血管 CD34

表达及大脑皮质微血管密度的动态变化,探讨电针对脑缺血边缘区微血管生成的影响,从而为针刺发挥脑保护作用的机制提供依据。

## 材料与方法

## 一、实验动物及设备

选取健康 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 40 只,雌、雄各半,体重( $200 \pm 20$ ) g,由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供。于实验前 1 周一次性购进,饲养于安静、温暖且避强光的环境中,室温( $20 \pm 2$ ) °C,自由饮水饮食。实验设备包括:CD34 免疫组化试剂盒

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2011.08.003

基金项目:2006 年湖北省自然科学基金资助项目(2006ABA057)

作者单位:430064 武汉,武汉科技大学附属天佑医院中医科(毛庆菊);湖北中医药大学(陈邦国)

(由深圳晶美生物有限公司提供);DAB 显色试剂(购自北京中山生物有限公司);4% 多聚甲醛(德国 E. Merk 公司产品);10% 水合氯醛(湖北中医药大学中心实验室提供);日本产 Olympus 光学显微镜;日本产 Nikon 数码照相机;北京产 LH202H 型韩氏电针治疗仪;电热烧灼器(上海医疗器械厂);无菌医用缝合尼龙线(上海医用缝合针厂);苏州产 0.5 寸不锈钢毫针。

## 二、实验方法

1. 动物分组:按随机数字表法将 40 只大鼠分为正常组、假手术组、模型组(再分缺血再灌注 1 d、2 d、4 d、8 d 4 个亚组)、电针组(再分缺血再灌注 1 d、2 d、4 d、8 d 加电针 4 个亚组)。前 2 组每组 4 只大鼠,后 2 组每个亚组 4 只大鼠。正常组常规饲养,不作任何处理,假手术组大鼠于麻醉切开颈部皮肤钝性分离肌层后,仅分离颈总动脉及颈内动脉至翼腭动脉,模型组和电针组均采用线栓法制备大鼠大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型。模型组和电针组于栓塞 0.5 h 后再灌注。

2. 局灶性脑缺血再灌注模型制备:参照 Longa<sup>[3]</sup>报道的线栓法并加以改进,栓线采用直径 0.26 ~ 0.28 mm、长度为 6.0 cm 的尼龙鱼线。以 10% 水合氯醛(300 mg/kg 体重)腹腔注射麻醉后,仰卧位固定,分离并暴露右侧颈总及颈内外动脉,栓线从颈外动脉至颈内动脉插入大脑中动脉遇阻即止,进线长度约为(18.0 ± 0.5)mm。栓塞成功的大鼠于缺血 0.5 h 后拔除尼龙鱼线至颈外动脉残端内给予血液再灌注,随即缝合切口,于室温下禁食给水喂养。于大鼠自然苏醒后参照 Longa<sup>[3]</sup>5 级评分标准对其神经障碍程度进行评分:0 级代表无神经功能丧失;1 级代表左前肢不能充分伸展;2 级代表向左环行运动,轻度局灶神经功能丧失;3 级代表向左侧倾倒,中度局灶神经功能丧失;4 级代表不能自然行走,重度局灶神经功能丧失。神经功能障碍 > 1 级为造模成功。

3. 电针治疗方法:电针组选取百会、水沟、后三里(足三里)穴,取穴标准及针刺深度参照中国针灸学会实验针灸研究会华兴邦等制定的《常用动物腧穴图谱》标准而定<sup>[4]</sup>。其中百会向前平刺 2 mm,水沟向上斜刺 1 mm,后三里(足三里)直刺 7 mm。用 28 号 0.5 寸的不锈钢毫针(针长 15 mm),采用 LH202H 型韩氏电针治疗仪,选用疏密波,频率 2 Hz ~ 15 Hz,强度 1 mA。每次持续刺激 30 min。电针组每组缺血再灌注 1 h 后行第一次电针治疗,以后均每日电针治疗。

4. 标本采集方法:正常组、假手术组大鼠于造模后当天进行标本采集,模型组和电针组大鼠于缺血再灌

注后 1 d、2 d、4 d、8 d 后进行标本采集。各组采集标本时,均以 10% 水合氯醛足量麻醉,开胸暴露心脏,将灌注针头从心尖部插入升主动脉,剪开右心耳,依次迅速灌注 20℃ 0.9% 生理盐水 200 ml、4℃ 4% 多聚甲醛 200 ml(含 0.1% 焦碳酸二乙酯),迅速取脑,在视交叉平面后 2 ~ 5 mm 处将脑冠状切开,留取中间部分置于 4℃ 4% 多聚甲醛固定液中过夜。将固定后的脑组织进行常规上行脱水、二甲苯透明后石蜡包埋,连续切片,切片厚 5 μm,每隔 10 张取 1 张,在温水中充分展开,用玻片贴片,备用。

5. 观察指标检测:微血管判定及脑组织微血管密度(microvessel density, MVD)计数。采用免疫组化用链酶亲合素-生物素-酶复合物(Strept Avidin-Biotin-enzyme Complex, SABC)法检测 CD34 在缺血脑组织微血管内皮细胞中的阳性表达。按 Weidner<sup>[5]</sup>方法进行,血管内皮细胞以细胞内有棕黄色颗粒沉着为阳性染色标准。先用低倍镜扫视整个切片,寻找血管密度最高的区域,即“热点”(hot spot),然后在高倍镜(×400)视野下计数被染色的血管数目,共计数 3 个高倍镜视野,取平均值来表示 MVD。染色的内皮细胞或内皮细胞簇只要与附近的微血管分开,即视为一个微血管,不考虑血管腔的有无,也不用红细胞出现与否作为判断血管的标准。每只实验动物各取进行过 CD34 反应的不相邻切片 3 张(间隔 50 μm)。

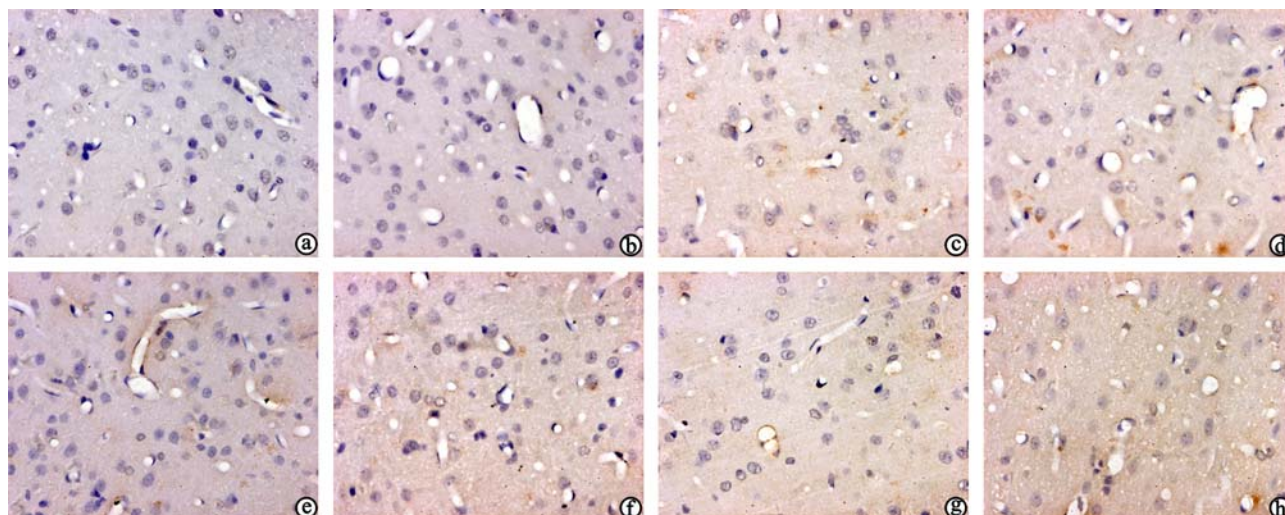
## 三、统计学分析

所有数据均选用 SPSS 11.0 版统计学软件进行数据统计分析,结果用( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用单因素方差分析比较各组之间微血管密度值, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

各组大鼠右侧大脑皮质 CD34 表达情况:标记微血管的 CD34 阳性产物主要位于缺血半暗带区域的内皮细胞,内皮细胞胞浆出现浅棕色染色,环状或者条索状黄褐色者为血管,着色部位为血管基底膜。

正常组和假手术组大鼠极少见染成浅棕色颗粒的内皮细胞(图 1a、图 1b);模型组大鼠缺血再灌注 1 d 后可见内皮细胞深染成团或部分切片仅见血管呈条索状,缺血再灌注 2 d 后进一步增多,以缺血再灌注 4 d 增加显著,缺血再灌注 8 d 后较缺血再灌注 4 d 后明显减少(图 1c、图 1e、图 1g)。电针组大鼠在缺血再灌注 1 d 后可见 CD34 阳性标记的微血管形成,血管密集,染色深;以缺血再灌注 4 d 后最明显,缺血再灌注 8 d 后缺血半暗带区的微血管生成较缺血再灌注 4 d 后的明显减少,但仍较同时间点的模型组多(图 1d、图 1f、图 1h)。



注:a 为正常组右侧大脑皮质微血管内皮细胞 CD34 阳性细胞表达;b 为假手术组右侧大脑皮质微血管内皮细胞 CD34 阳性细胞表达;c 为模型组脑缺血 30 min 再灌注 1 d 后右侧大脑皮质微血管内皮细胞 CD34 阳性细胞表达;d 为电针组脑缺血 30 min 再灌注 1 d 后右侧大脑皮质微血管内皮细胞 CD34 阳性细胞表达;e 为模型组脑缺血 30 min 再灌注 4 d 后右侧大脑皮质微血管内皮细胞 CD34 阳性细胞表达;f 为电针组脑缺血 30 min 再灌注 4 d 后右侧大脑皮质微血管内皮细胞 CD34 阳性细胞表达;g 为模型组脑缺血 30 min 再灌注 8 d 后右侧大脑皮质微血管内皮细胞 CD34 阳性细胞表达;h 为电针组脑缺血 30 min 再灌注 8 d 后右侧大脑皮质微血管内皮细胞 CD34 阳性细胞表达

图 1 各组大鼠右侧大脑皮质 CD34 的微血管检测结果(SABC 法, ×400)

模型组各亚组大鼠的大脑皮质的微血管密度(MVD)较正常组和假手术组均有所增加,尤以缺血再灌注 4 d 后最为显著,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );在相同时间点,电针组各亚组大鼠的 MVD 均高于模型组,以缺血再灌注 4 d 后 2 组差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),详见表 1。

表 1 各组大鼠右侧大脑皮质微血管密度比较 (个/400 倍视野,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	只数	1 d	2 d	4 d	8 d
正常组	4	0.18 ± 0.02	-	-	-
假手术组	4	0.41 ± 0.04	-	-	-
模型组	16	3.87 ± 0.62 <sup>a</sup>	5.98 ± 0.71 <sup>a</sup>	6.45 ± 0.67 <sup>a</sup>	4.72 ± 0.63 <sup>a</sup>
电针组	16	5.22 ± 1.08 <sup>a</sup>	7.07 ± 1.31 <sup>a</sup>	8.73 ± 1.68 <sup>ab</sup>	6.11 ± 1.07 <sup>a</sup>

注:与假手术组、正常组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与模型组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$

## 讨 论

缺血性脑血管病(ischemic cerebrovascular disease, ICVD)遗留的神经功能障碍一直是困扰人类医学的难题。治疗性血管生成(therapeutic angiogenesis, TAG)方法的出现,为缺血性脑血管病的治疗开辟了一条通向缺血性脑血管病血管再生的新途径。血管新生(angiogenesis, AG)是指新生的毛细血管从已经存在的血管侧枝中出芽与再塑,即是在原有的血管处内皮细胞分裂、增殖,形成新分支、发芽或套叠,再扩展延伸而成新的毛细血管网。组织的缺血、缺氧以及血流对血管壁切应力的改变均可触发炎性细胞在血管壁周围聚集,引起血管内皮细胞和血管平滑肌细胞的增殖、分化和迁

移,导致血管出芽并最终形成的血管网。新生血管的形成对缺血组织侧枝血供的建立和功能的改善具有重要作用。中枢神经缺血后,在梗死灶周围有一圈缺血相对较轻的区域,称半暗带。在脑缺血早期再恢复缺血半暗带区血流是改善组织损伤的关键。

脑卒中后缺血区微血管增生,其增生的范围和程度直接关系到缺血区边缘血流的改善,影响神经生理功能的恢复。最近的研究表明,脑缺血后神经元的修复不仅与营养因子、生长相关因子表达等有关,还取决于缺血区 AG 营造的微环境<sup>[6]</sup>。AG 是缺血区组织的抗损伤和神经元修复的结构基础,缺血性脑血管病治疗后 AG 可以促进中枢神经的再生<sup>[7-8]</sup>。AG 的现象在缺血半暗带区最为明显,此区域的血流量只是减少,而没有完全断绝,但血流量的细微差异就足以决定细胞存活与否。新生血管形成后从正常脑组织向半暗带及缺血中心区延伸<sup>[9]</sup>,扩散加权成像(diffusion weighted imaging, DWI)观察显示,新生血管与血流量增加的区域相吻合,提示新生血管有增加局部血流量的功能<sup>[10]</sup>。

传统的针刺疗法对脑部疾病有着肯定的治疗作用,我们的前期研究表明电针有保护神经元<sup>[11-13]</sup>和改善微血管内皮功能<sup>[14-16]</sup>的作用。AG 属于中医学“生脉”的范畴,有关中医药的促生作用尤其是针灸的促血管生成作用还未曾多见。本实验选用“百会”、“水沟”、“足三里”诸穴,其中百会、水沟二穴为督脉要穴,百会位于巅顶,为三阳五会,刺之可振奋全身之阳气,具有补益气血、疏通脑络之功效;水沟为任脉、手阳明

与督脉之会,任脉为“阴脉之海”,督脉为“阳脉之海”,故针水沟可调节阴阳平衡,激发阳明经气,调节脑内气血的偏盛偏衰;足三里为足阳明胃经之合穴,阳明为多气多血之经脉,取之可促进气血生长,营养脑部血管。百会、水沟、足三里(双侧)合用,共奏益气活血、祛瘀生新之功效。本实验通过观察电针对脑缺血大鼠皮质微血管密度的影响,来探讨针刺治疗脑缺血再灌注损伤的确切途径。

实验结果显示,正常组和假手术组的微血管内皮细胞 CD34 阳性表达极少。模型组大鼠各亚组的 MVD 较正常组和假手术组均有所增加,表明缺血后脑微血管存在一定程度的代偿增生,这与以往的研究结果一致<sup>[17]</sup>。本实验观察到脑缺血再灌注(cerebral ischemic reperfusion, CIR)2 d 内微血管内皮细胞 CD34 的阳性表达水平较低,说明在脑缺血早期微血管形成和侧枝动脉的建立较少,而在脑缺血再灌注 2 d 后,微血管内皮细胞 CD34 的阳性表达增加,于脑缺血再灌注 4 d 后达到高峰。原因可能是,缺血再灌注 2 d 后随着脑组织缺血、缺氧的加重,局部组织炎性细胞浸润增加,脑水肿加重(缺血再灌注 3~7 d 为脑水肿高峰期),微血管生成和侧枝动脉建立增加,随着新生血管的增加,缺血组织血液供应和缺氧得到改善,炎细胞浸润减少,脑水肿减轻,由此缺血再灌注 8 d 后微血管内皮细胞 CD34 阳性表达下降,AG 减少。同时,我们在实验中还发现大鼠脑缺血半球血管屈曲且不规则,CD34 阳性小血管数量明显增多,这些增多的血管可能来自于脑血管内皮细胞增殖,新的毛细血管形成也可能是原有侧枝循环的开放<sup>[18]</sup>。

本实验中,电针组在缺血 0.5 h 再灌注后 1 d、2 d、4 d、8 d 的微血管内皮细胞 CD34 的阳性表达数均高于模型组相应时间段;以缺血再灌注 4 d 为高峰,随后降低,表明电针可促进微血管内皮细胞 CD34 的阳性表达,尤其是脑梗死 4 d 内的微血管内皮细胞 CD34 的阳性表达最为明显。进一步证实了电针可有效地增加缺血侧大脑皮质的微血管生成,促进侧枝循环的建立,从而发挥脑保护作用<sup>[19-20]</sup>。

本实验还观察到,脑缺血再灌注后,CD34 蛋白主要表达在缺血半暗带区域的内皮细胞,即缺血侧顶颞叶处的大脑皮质的微血管内皮细胞 CD34 阳性表达最丰富,海马 CA3 区和齿状回的微血管内皮细胞 CD34 阳性表达次之,海马 CA1 区的微血管内皮细胞 CD34 阳性表达较少,这种表现一方面可能与大脑皮质、海马 CA3 区和齿状回的缺血耐受较好有关;另一方面可能与大鼠的顶颞叶皮质处为其运感区的投影区相关。

综上所述,电针治疗能有效调控脑缺血半暗带区域微血管的生成,从而改善半暗带区的微循环,进而促

进神经功能的恢复,这也可能是电针发挥脑保护作用的机制之一。本研究的意义在于为电针发挥脑保护作用提供微血管新生方面的初步证据。至于电针治疗调控微血管生成的具体机制,还有待进一步的研究。

## 参 考 文 献

- [1] 饶明俐,主编. 中国脑血管病防治指南. 北京:人民卫生出版社, 2007:1-3.
- [2] 李玲,陶玉倩,李扬,等. 尿激酶型纤溶酶原激活物及其抑制剂-1 表达与脑微血管改变的实验研究. 中华老年医学杂志, 2005, 24: 453-456.
- [3] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*, 1989, 20:84-91.
- [4] 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, 1:1-3.
- [5] Weidner N, Semple JP, Welch WR, et al. Tumor angiogenesis and metastasis-correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med*, 1991, 324: 1-8.
- [6] Ding YH, Li J, Zhou Y, et al. Cerebral angiogenesis and expression of angiogenic factors in aging rats after exercise. *Curr Neurovasc Res*, 2006, 3:15-23.
- [7] 谭峰. 脑缺血中的微血管重建. 中西医结合心脑血管病杂志, 2006, 4:330-331.
- [8] Folkman J. Angiogenesis. *Annu Rev Med*, 2006, 57:1-18.
- [9] Marti HJ, Bernaudin M, Bellail A. Hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression precedes neovascularization after cerebral ischemia. *Am J Pathol*, 2000, 156: 965-976.
- [10] Slevin M, Krupinski J, Slowik A, et al. Serial measurement of vascular endothelial growth factor and transforming growth factor-beta1 in serum of patients with acute ischemic stroke. *Stroke*, 2000, 31:1863-1870.
- [11] 钱长晖,毛庆菊,王芳,等. 电针对大鼠脑缺血海马损伤区神经元 δ-连环素表达的影响. 福建医药杂志, 2007, 29: 82-84.
- [12] 孔立红,毛庆菊,陈邦国,等. 电针对脑缺血再灌注大鼠海马区胰岛素样生长因子-1 表达的影响. 中华物理医学与康复杂志, 2006, 28: 666-669.
- [13] 董晓萍,罗涛,毛庆菊,等. 电针对脑缺血再灌注大鼠海马神经元 GluR-2 表达的影响. 中国组织化学与细胞学杂志, 2007, 16:664-668.
- [14] 毛庆菊,李厚秀,孔立红,等. 电针对脑缺血再灌注大鼠脑微血管内皮细胞间黏附分子-1 和 P-选择素表达的影响. 中华物理医学与康复杂志, 2007, 29:734-737.
- [15] 毛庆菊,王汉兵,陈邦国,等. 电针对局灶性脑缺血再灌注大鼠外周血中可溶性细胞间黏附分子-1 和内皮素-1 的影响. 针刺研究, 2006, 31: 272-275.
- [16] 孔立红,毛庆菊,陈邦国. 电针对局灶性脑缺血再灌注大鼠细胞间黏附分子-1 表达的影响. 世界针灸杂志(英文版), 2007, 17:31-36.
- [17] 蔡振利,周东,徐树军. 大鼠局灶性脑缺血再灌注模型 CD34 表达及巴曲酶对其表达的影响. 中风与神经疾病杂志, 2006, 23: 97-99.
- [18] Ling W, Joseph P, Erinjeri BS, et al. Collateral growth and angiogenesis around cortical stroke. *Stroke*, 2001, 32: 2179-2184.
- [19] 王世军,崔可密,卢岩,等. 针刺对 MCAO 大鼠海马 CA3 区微血管数目及神经元死亡率的影响. 山东中医药大学学报, 2005, 29:59-60.
- [20] 黄晓琳,韩肖华. 电针结合经颅磁刺激对脑缺血大鼠 VEGF164 mRNA 和 CD31 表达的影响. 中华物理医学与康复杂志, 2006, 28: 10-13.

(修回日期:2011-07-20)

(本文编辑:阮仕衡)