

电针结合经颅磁刺激对脑缺血大鼠 VEGF164 mRNA 和 CD31 表达的影响

黄晓琳 韩肖华

【摘要】 目的 研究电针结合经颅磁刺激对急性脑缺血大鼠血管生成的影响。方法 将 55 只雄性 Wistar 大鼠随机分成正常组、模型组、电针组、磁刺激组和电针加磁刺激组。复制急性大脑中动脉缺血模型,分别施以电针、磁刺激和电针加磁刺激方法处理,采用逆转录-聚合酶链反应、免疫组织化学方法,检测 VEGF164 mRNA 及血小板内皮细胞黏附因子(CD31)的表达。结果 电针组、磁刺激组和电针加磁刺激组梗死灶周围 VEGF164 mRNA 和 CD31 表达增强($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),尤其以电针加磁刺激组明显。结论 电针结合磁刺激可以增强急性脑缺血大鼠梗死灶周围 VEGF164 mRNA 和 CD31 的表达,从而实现非分子水平的治疗性血管生成作用。

【关键词】 电针; 磁刺激; VEGF164 mRNA; CD31; 脑缺血

The effects of electroacupuncture combined with transcranial magnetic stimulation on VEGF164 mRNA and CD31 expression in rats with cerebral ischemia HUANG Xiao-lin, HAN Xiao-hua. Department of Rehabilitation Medicine, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

【Abstract】 Objective To study the effect of electroacupuncture(EA) combined with transcranial magnetic stimulation(TMS) on the angiogenesis in rats with cerebral ischemia. **Methods** Fifty-five male Wistar rats were randomly divided into five groups: a normal group, a model group, an EA group, a TMS group and an EA plus TMS group. After the establishment of acute middle cerebral artery occlusion (MCAO), the rats in various groups were accordingly treated with EA, TMS or EA plus TMS, respectively. Then the expression of VEGF164 mRNA and CD31 was observed. **Results** The expression of VEGF164 mRNA and CD31 around the infarction locus of the three treatment groups increased, especially in the EA plus TMS group. **Conclusion** EA plus TMS can increase the expression of VEGF164 mRNA and CD31 around the infarction locus and promote the non-molecular angiogenesis in rats with cerebral ischemia.

【Key words】 Electroacupuncture; Magnetic stimulation; VEGF164 mRNA; CD31; Cerebral ischemical

目前,缺血性脑卒中的治疗除溶栓、抗凝、降纤、抗血小板聚集等外,更安全、有效的治疗方法尚有待进一步探索。脑卒中患者往往有动脉粥样硬化、高血压和糖尿病等基础疾病,多伴有弥散的颅内小血管病变,可能对传统的溶栓治疗反应欠佳。近年来血管生成治疗成为研究热点,已有研究发现:缺血后脑组织血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)及其受体表达增加,尤其是缺血半暗带的血管内皮、胶质细胞及神经元表达明显,并对缺血脑组织具有保护作用^[1,2]。血小板内皮细胞黏附因子-1(platelet endothelial cell adhesion molecule-1, PECAM-1/CD31)是血小板内皮细胞黏附因子,可在血管内皮中表达,故已成为临床常用的血管生成(angiotogenesis)指标。本研究通

过观察电针结合磁刺激对脑缺血大鼠 VEGF164 mRNA 和 CD31 表达的影响,探讨其促血管生成作用。

材料与方法

一、动物分组与造模

1. 分组:55 只健康雄性 Wistar 大鼠(同济医学院实验动物中心提供),体重为(200 ± 20)g,随机分成 5 组:正常组、模型组、电针组、磁刺激组、电针加磁刺激组,每组 11 只。

2. 造模:参照廖维靖等^[3]和 Zea Longa 等^[4]的大鼠大脑中动脉缺血模型造模方法,腹腔注射 6%的水合氯醛(剂量为 350 mg/kg 体重),颈部正中切口,长约 2 cm,暴露右侧颈总动脉和颈外动脉,0 号丝线结扎颈外动脉。分离与颈总动脉伴行的迷走神经,在距颈总动脉分叉处近端 0.5 ~ 0.6 cm 处结扎颈总动脉。在结扎线的远端置丝线备用。用微小动脉夹夹闭备用线远端的颈总动脉,在备用线的近端用眼科剪剪一小切口,将黑色

基金项目:留学回国人员科研启动基金资助项目(教外司留[2002]247)

作者单位:430030 武汉,华中科技大学同济医学院附属同济医院康复医学科

5-0 尼龙线线栓送进切口,向上推至动脉夹处,将备用线稍微扎紧,随即松开动脉夹。将线栓沿颈总动脉、颈内动脉顺行向上插入至大脑中动脉起始部,遇阻力时停止,从颈总动脉分叉处计算插入深度为 (1.9 ± 0.2) cm,造成大脑中动脉供血阻断。正常组不作特殊处理。

二、模型神经功能缺损评分方法

动物清醒后,按 Bederson 方法进行肢体功能的神经缺损评分^[5]。标准:0 分,无任何神经功能缺失;1 分,左前肢不能伸展;2 分,向左侧行走;3 分,向左侧转圈,成追尾状。44 只实验动物造模清醒后神经功能缺损总评分为 96 分。

三、治疗方法

1. 针刺组:造模结束且动物尚未清醒时即开始针刺治疗,选用“百会”、“水沟”穴,根据中国针灸学会实验针灸研究会 1992 年制定的“实验动物穴位标准”定位。选用苏州医疗用品有限公司生产的直径为 0.40 mm,长 25 mm 的华佗牌不锈钢毫针,“百会”斜向前刺入 10 mm,“水沟”直刺入 4 mm。接通上海产 ZYZ-20GZ1 型高性能针灸治疗仪,“百会”接负极,“水沟”接正极,选用连续波,频率为 40 Hz,刺激强度为 1~2 mA,以大鼠肢体轻微抖动为度,每天治疗 1 次,每次 20 min,连续治疗 6 d。

2. 磁刺激组:于造模结束后 3 h 内给予磁刺激。磁刺激采用英国产 Magstim 200 型磁刺激器。脉冲磁场的强度峰值为 2 T,取最大输出强度的 70%,刺激频率为 0.5 Hz,利用直径为 4 cm 的圆形线圈,线圈边缘距离颅骨 1 cm,与大鼠右侧大脑半球相切,连续刺激 20 次为 1 组,每天 2 组,持续 6 d。

3. 电针加磁刺激组:于电针治疗结束后进行磁刺激,方法及参数分别同电针组、磁刺激组。

4. 模型组和正常组动物自然饲养,不作特殊处理。

四、免疫组织化学染色

用 200 ml 生理盐水对麻醉大鼠进行快速左心室灌注冲洗,再用 4% 多聚甲醛 500 ml 先快后慢灌注固定,恒定灌注时间 45~60 min。灌注完毕立即断头取脑,4% 多聚甲醛溶液后固定不超过 24 h,石蜡包埋、切片。免疫组化所用 CD31 抗体购于武汉博士德生物技术公司,采用链霉亲和素-生物素-过氧化物酶复合物法。

五、逆转录-聚合酶链反应

每组实验动物取 6 只进行逆转录-聚合酶链反应检测。取新鲜右侧大脑中动脉供血区皮层组织 100 mg,加入 1 ml Trizol 中彻底匀浆,随后加入氯仿和异丙醇,将提取的总 RNA 用紫外分光光度仪进行浓度测定后,用灭活 RNA 酶的 DEPC 水稀释为 $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, -70°C 保存。取焦碳酸二乙酯处理过的水 $8 \mu\text{l}$ 、 $5 \times$ 逆转录缓冲液 $4 \mu\text{l}$ 、脱氧核糖核苷酸 $2 \mu\text{l}$ 、寡聚脱氧胸腺嘧啶核苷酸

$1 \mu\text{l}$ 、RNA 酶抑制剂 $1 \mu\text{l}$ 、AMV 逆转录酶 $1 \mu\text{l}$ 混匀后加入 0.5 ml 的 EP 管中,于 42°C 水浴中孵育 1 h, 95°C 灭活禽成髓细胞瘤病毒逆转录酶 5 min,立即置冰水中冷却, -20°C 保存。参照 Jung 等^[6] 报告的大鼠 VEGF 聚合酶链反应引物的寡核苷酸序列:S 5'-GAC-CCTGGTGGACATCTTCCAGGA-3', AS 5'-GGTGAGAG-GTCTAGTTCCTCCGA-3'。内对照 β_2 微球蛋白引物序列:S 5'-CAGATCTGTCTTCAGCAAG-3', AS 5'-GGAGTA-AACTGCTCCAGATG-3'。PCR 反应条件为 94°C 预变性 7 min, 94°C 变性 1 min, 58°C 退火 45 s, 72°C 延伸 1 min,共 30 个循环, 72°C 后延伸 5 min。

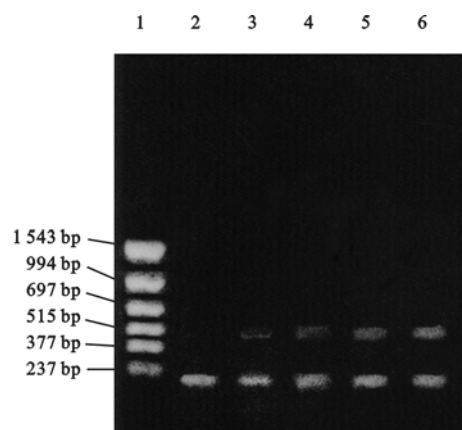
六、统计学分析

采用 HPIAS-1000 型高分辨病理图文分析系统(同济医学院千屏影像工程公司)进行图像分析处理,得出平均密度扫描值及面密度值。用 SPSS 11.0 统计软件,多组间比较用方差分析,两组间比较用 q 检验。

结 果

一、缺血脑组织 VEGF164 mRNA 的表达

经过 30 次循环,扩增出一条 462 bp 大小 DNA 片段即对应为 VEGF164 mRNA;扩增出另一条 188 bp 大小的 DNA 片段即对应为内对照 β_2 -微球蛋白。由图 1 可见电针加磁刺激干预后,缺血大鼠脑组织中 VEGF164 mRNA 的表达明显增强。



注:1——标志物;2——正常组;3——模型组;4——电针组;5——磁刺激组;6——电针加磁刺激组

图 1 电针或/和磁刺激对缺血大鼠脑组织中 VEGF164 mRNA 表达的影响

二、缺血脑组织 CD31 的表达

模型组大鼠梗死灶周围 CD31 的表达较正常组上调,但差异无统计学意义。通过不同的干预方法处理后,梗死灶周围 CD31 的表达与模型组比较明显增强,尤其是电针加磁刺激组达到 0.072 ± 0.013 ,差异有统计学意义($P < 0.01$),而电针组与磁刺激组比较无显著性差异。见表 1。

表 1 梗死灶周围 VEGF164 mRNA/ β_2 -微球蛋白和 CD31 的表达 ($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	VEGF164 mRNA β_2 -微球蛋白	CD31
正常组	5	0.042 ± 0.029	0.024 ± 0.009
模型组	5	0.126 ± 0.079	0.033 ± 0.007
电针组	5	0.306 ± 0.115 [△]	0.060 ± 0.011 [*]
磁刺激组	5	0.535 ± 0.154 ^{☆*}	0.051 ± 0.010 [*]
电针加磁刺激组	5	0.892 ± 0.345 ^{☆#}	0.072 ± 0.013 [#]

注:与模型组比较, * $P < 0.05$, # $P < 0.01$;与正常组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta^* P < 0.01$

讨 论

脑血管闭塞以后,缺血区毛细血管增生的范围与程度直接关系到缺血边缘区血流的改善,影响神经生理功能的恢复,从而决定了患者的预后。新血管的生成来源于先前存在的血管的内皮细胞增殖^[7]。而内皮细胞的增殖,有赖于 VEGF。人类 VEGF 存在 4 种亚型: VEGF206、VEGF189、VEGF165 和 VEGF121,其中 VEGF121 和 VEGF165 属于分泌型蛋白质,与 VEGF 的生物学活性密切相关。大鼠体内 VEGF 有 3 种异构体: VEGF188、VEGF164 和 VEGF120,分别与人的 VEGF189、VEGF165 和 VEGF121 相对应^[7,8]。CD31 是一种大小为 130 kd 的免疫球蛋白超家族成员之一,表达于内皮细胞、白细胞和血小板,相关的研究发现 CD31 参与了血管新生过程^[9],也常被用于测定微血管密度^[10]。

目前,血管生成的治疗策略有两种:一种是以 VEGF 为主的基因治疗;另一种是电刺激的非分子血管生成策略。钟林等^[11]的实验证实了电刺激可以引起后肢缺血大鼠区域性的 VEGF mRNA、VEGF 蛋白表达增加,从而改善缺血肢体远端的血流。石正洪等^[12]也观察了电刺激小脑顶核对局部脑缺血大鼠毛细血管生成的影响,结果发现大脑中动脉梗死后,缺血区神经元变性、坏死,内皮细胞在半暗带有少量表达,毛细血管数较对照组增加,经小脑顶核刺激后,内皮细胞大量表达,毛细血管数目明显增加。以上研究为电刺激实现非分子的治疗性血管生成提供了有力的佐证。

我们从实验中观察到,以脉冲电针刺激百会、水沟结合磁刺激干预急性脑缺血模型,结果提示,单纯电针或磁刺激均可使 VEGF164 mRNA 和 CD31 表达增强,而电针结合磁刺激组 VEGF164 mRNA 和 CD31 表达增强更显著,说明两者联合应用对激活 VEGF164 mRNA 表达、诱发脑缺血性损伤血管再生方面优于单纯电针或磁刺激。我们在过去的研究中也观察到,电针结合磁刺激可以上调梗死灶周围 VEGF 的表达^[13]。

1985 年 Barker 等^[14]利用磁刺激技术首次在人体中实现大脑皮层的中枢神经刺激,其原理是可兴奋组

织均能被外部的强时变磁场非侵入兴奋^[15],时变磁场诱发出电场,从而在组织中产生电流,引起细胞膜的去极化,调节组织兴奋性和促使有关组织器官的功能发生相应变化。本实验利用此特性可以实现对颅内深部脑区的非介入刺激^[16,17],可能促使了局部存活细胞合成 VEGF,从而促进内皮细胞增殖、迁移,加速新血管的生成,恢复受损脑组织血流供应,改善低氧和低糖状态,最终达到保护脑组织,促进神经功能康复的目的。本研究结果提示:电针结合磁刺激干预可引起内源性 VEGF mRNA、VEGF 蛋白表达增加,并改善缺血区域的血流,从而表明应用物理因子(如磁、电或两者联合)可实现非分子水平的治疗性血管生成作用。由于磁刺激具有安全、无痛、无创和操作简便等优点,因而越来越受到人们的重视,目前已逐步用于中枢神经传导、神经疾病治疗及脑功能研究等各个方面,并取得了较好效果。对这些物理因子的进一步研究将有可能为缺血性脑血管病的神经功能康复提供新的治疗途径。

参 考 文 献

- Marti HJ, Bernaudin M, Bellail A, et al. Hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression precedes neovascularization after cerebral ischemia. *Am J Pathol*, 2000,156:965-976.
- Kovacs Z, Ikezaki K, Samoto K. VEGF andflt expression time kinetics in rat brain infarct. *Stroke*,1996,27:1865-1873.
- 廖维靖,刘淑红,范明,等.线栓阻断大鼠大脑中动脉制作缺血性脑损伤模型的改良. *中华物理医学与康复杂志*,2002,24:349-352.
- Zea Longa E, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*,1989,20:84-91.
- Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, et al. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurological examination. *Stroke*, 1986, 17:472-476.
- Jung HH, Kim MW, Lee JH, et al. Expression of vascular endothelial growth factor in otitis media. *Acta Otolaryngol*, 1999, 119:801-808.
- Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature*, 1997, 386:671-674.
- Ladoux A, Frelin C. Expression of vascular endothelial growth factor by cultured endothelial cells from brain microvessels. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993,194:799-803.
- Solowiej A, Biswas P, Graesser D. Lack of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 attenuates foreign body inflammation because of decreased angiogenesis. *Am J Pathol*, 2003,162:953-962.
- Su MY, Cheung YC, Fruehauf JP. Correlation of dynamic contrast enhancement MRI parameters with microvessel density and VEGF for assessment of angiogenesis in breast cancer. *J Magn Reson Imaging*, 2003, 18:467-477.
- 钟林,蔡端,余波,等.电刺激改善下肢缺血及促进骨骼肌血管生成的实验研究. *中华物理医学与康复杂志*,2003,25:129-132.
- 石正洪,董为伟.电刺激小脑顶核促脑缺血后毛细血管新生的实验研究. *中风与神经疾病杂志*,2003,20:250-252.
- 黄晓琳,韩肖华,李春芳,等.电针联合经颅磁刺激对急性脑缺血大鼠 VEGF 及其受体 Flk-1 表达的影响. *中华物理医学与康复杂志*,

2004, 26: 581-584.

- 14 Barker AT, Jalinous R, Freeston IL. Non-invasive magnetic stimulation of the human motor cortex. *Lancet*, 1985, 2: 1106.
- 15 Davey K, Luo L, Ross DA. Toward functional magnetic stimulation FMS theory and experiment. *IEEE Trans Biomed Eng*, 1994, 41: 1024.
- 16 Hoffman RE, Boutros NN, Berman RM. Transcranial magnetic stimulation of left temporoparietal cortex in three patients reporting hallucina-

ted" voices". *Biol Psychiatry*, 1999, 46: 1307.

- 17 Hoffman RE, Boutros NN, Hu S. Transcranial magnetic stimulation and auditory hallucinations in schizophrenia. *Lancet*, 2000, 355: 1073.

(收稿日期: 2005-10-19)

(本文编辑: 熊芝兰)

· 短篇论著 ·

药物结合心理疗法对癌症疼痛患者生活质量的影响

胡保红 朱珊珊 翟红敏

疼痛是癌症患者特别是晚期患者的主要症状,从生理、心理、社会和精神等多个方面影响患者的生活质量,其发生率几乎高达 100%。2003 年 1 月至 2004 年 6 月,我们应用 WHO 推荐的三阶梯药物疗法及心理疗法治疗 31 例癌症疼痛患者,使患者疼痛明显缓解,生活质量明显提高,现报道如下。

一、资料与方法

1. 临床资料:选择我院收治的 31 例癌性疼痛患者,其中男 18 例,女 13 例;年龄 29~64 岁,平均(57.4±7.8)岁;胃癌 12 例、肝癌 8 例、结肠癌 11 例;临床分期均为 T₂N₁M₀~T₄N₃M₁ 期。患者的疼痛无规律性,持续性加重,疼痛程度的分级参照 WHO 的疼痛分级标准^[1],其中 I 级 3 例,II 级 13 例,III 级 15 例。

2. 疼痛程度分级标准:0 级为无痛;I 级(轻度疼痛)为虽有疼痛感但可忍受,并能正常生活,睡眠不受干扰;II 级(中度疼痛)为疼痛明显,不能忍受,要求服用镇痛药物,睡眠受干扰;III 级(重度疼痛)为疼痛剧烈,不能忍受,需要镇痛药物,睡眠严重受到干扰。

3. 治疗方法:应用 WHO 推荐的三阶梯药物疗法及心理治疗。三阶梯治疗根据疼痛程度选用药物。第一阶段选用非阿片类止痛药,如布洛芬、吲哚美辛或对乙酰氨基酚,用于 I 级疼痛;第二阶段选用弱阿片类镇痛剂,如丙氧氨酚复方片、盐酸布桂嗪等,用于 II 级疼痛;第三阶段选用强阿片类药物,如埃托啡或盐酸哌替啶,用于 III 级疼痛。治疗过程中随着疼痛程度的改变而调整药物种类和剂量。心理治疗包括改变患者及其家属对药物副作用及耐受性的错误认识;疏导和消除患者的消极心理;医务人员和患者及其家属共同制定控制疼痛计划,并指导患者用药;暗示疗法,利用治疗者的专业知识,使患者接受治疗者的观念,从而消除心理压力和负担,使症状得以减轻。

4. 疗效评价标准:治疗 1 个月对所有患者的疼痛进行疗效评价。完全缓解为治疗后完全无痛;部分缓解为疼痛较治疗前明显减轻,睡眠基本不受干扰,能正常生活;轻度缓解为疼痛较治疗前减轻,但仍感明显疼痛,睡眠受干扰;无效为疼痛与治疗前比较无减轻。

5. 生活质量评估:于患者治疗前和治疗 1 个月后采用欧洲研究和治疗协会(European Organization for Research and Treat-

ment of Cancer, EORTC) 所拟生活质量核心问卷(Quality of Life Questionnaire-Core 30, QLQ-C 30)^[2]进行生活质量评估。该方法包括 30 个项目,由患者的身体状况、家庭作用、认知、情绪状况、社会功能量表和患者疲劳程度、疼痛、恶心和呕吐及癌症患者常见症状等组成。

6. 统计学分析:采用 SPSS 10.0 统计软件,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,采用非配对 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

二、结果

经过 1 个月的治疗,患者生活质量与治疗前比较,有明显改善(表 1)。疼痛完全缓解 22 例(71.0%),部分缓解 4 例(12.9%),轻度缓解 4 例(12.9%),无效 1 例(3.2%)。

三、讨论

30%~50% 的癌症患者有不同程度的疼痛,其中晚期癌症患者占 70%。在癌症患者的治疗中,心理治疗起着重要的作用。这需要医护人员对这些患者的心理特征有足够的认识,并给予针对性的指导,消除患者的消极心理,使他们认识到长期使用麻醉性镇痛药,其成瘾性的发生非常罕见^[3],应用该类药物的目的是为了缓解疼痛,提高生活质量。同时还应和患者及家属共同制订疼痛控制计划。

WHO 于 1986 年推荐的疼痛三阶梯止痛法是简单、价廉且行之有效的办法。本组 31 例患者的癌症临床分期均为 T₂N₁M₀~T₄N₃M₁ 期,中、重度疼痛占 90.3%,经过治疗,完全缓解及部分缓解者达 83.9%,无效率仅占 3.2%。我们通过开展三阶梯止痛治疗,认识到疼痛的评估是治疗前必须做好的重要一步,在此基础上遵循三阶梯止痛方案的原则,即正确的药物、用药剂量、时间间隔和用药途径,同时密切观察药物的不良反应,使 90% 以上患者的癌症疼痛得到缓解。

QLQ-C30 是专为癌症患者研制的的生活质量评估表,具有较高的特异性,实用性强,依从性较高,经过临床验证,具有良好的信度、效度、灵敏度及心理学特性^[4]。本研究采用三阶梯药物疗法结合心理治疗,结果显示患者疼痛得到了控制,QLQ-C30 生活质量总分明显提高,大部分功能和症状得到明显改善。

总之,我们认为晚期癌症患者在姑息治疗中,除了延迟死亡外,最重要的任务是控制疼痛,改善患者生存质量。我们应用三阶梯药物疗法及心理疗法治疗癌症疼痛患者,提高了患者的生活质量,值得临床应用。