

大脑中动脉栓塞大鼠脑区病理生理动态变化及不同频率针刺法的影响

张 雪^{1△} 樊小农^{2,3} 王 舒^{2,3} 钱宇斐¹ 张亚男¹ 魏媛媛¹ 武慧群¹
卢红朵¹ 孙红红¹ 郭海燕¹ 李凌鑫¹ 石学敏³

摘要 目的 了解大脑中动脉栓塞(middle cerebral artery obstruction, MCAO)大鼠不同脑区微血管、炎性细胞的动态变化及毫针针刺法中频率因素对其影响。方法 参照 Zea-Longa 线栓法复制大鼠 MCAO 模型,对“醒脑开窍”针刺法主穴水沟施以快频率 180 次/s 和慢频率 60 次/s,持续时间均为 5 s 的针刺干预,共 6 次,计数皮层、海马、纹状体部位微血管及炎性细胞的变化。结果 模型组各部位(除纹状体)的炎性细胞数和微血管数无明显变化;造模 72 h 后,未针刺组与正常组比较,纹状体的微血管数明显减少,皮层和海马的炎性细胞数明显增多;与未针刺组比较,快频率针刺组可明显减少皮层和海马的炎性细胞数、慢频率针刺组可明显增加纹状体的炎性细胞数和微血管数,各组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 MCAO 大鼠在脑缺血后,会随着时间变化出现微血管和炎性细胞动态病理变化并表现出明显的脑区特异性;快、慢频率针刺法改善脑缺血的作用环节不同,同样具有脑区部位的特异性。

关键词 大脑中动脉栓塞;病理生理;针刺方法;针刺频率

Dynamic Physiologic and Pathologic Changes in Brain of Rat with Middle Cerebral Artery Obstruction and Effects of Acupuncture in Different Frequencies on Them ZHANG Xue, FAN Xiao-nong, WANG Shu, et al
Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin (300193)

ABSTRACT **Objective** To study the dynamic changes of capillaries and inflammatory cells in different regions of brain in rat with middle cerebral artery obstruction (MCAO), and the effects of acupuncture in different frequencies on them. **Methods** In reference to Zea-Longa's method, rat model of MCAO was established by thread-ligation. Shuigou point (DU26), the main acupoint for "awakening brain and opening apertures", was stimulated by high (180 times/s) or low (60 times/s) frequency puncturing 5 s every 12 h for 6 times totally. The amount of capillaries (AC) and inflammatory cells (AIC) in brain cortex (BC), hippocampus (Hp) and corpus striatum (CS) was counted. **Results** Changes in AC and AIC of all brain regions (except for CS) in rats immediately after modeling were statistically insignificant ($P > 0.05$). But 72 h later, AC in CS decreased, AC in Hp, AIC in BC and AIC in Hp increased significantly in the modeled rats, showing significant difference to the normal level, but AIC reduced to approach the normal. As compared with the rats un-intervened, AIC in BC and Hp was decreased in rats intervened with high frequency puncturing, AC and AIC in CS were increased in rats intervened by slow frequency puncturing (both $P < 0.05$). **Conclusion** Amount of capillaries and inflammation cells are changed dynamically in MCAO rats after brain ischemia, showing evident brain regional specificity; the ischemic improving effects of acupuncture in different frequencies are various in their action rings, also showing brain regional specificity.

KEYWORDS middle cerebral artery obstruction; physiology and pathology; method of acupuncture; fre-

基金项目:国家重点基础研究发展计划(973 计划)资助项目(No. 2006CB504500, No. 2006CB504504);天津市科技发展计划资助项目(No. 043609811);天津市高等学校科技发展基金资助项目(No. 20030113, No. 20050319)

作者单位:1. 天津中医药大学(天津 300193);2. 天津中医药大学第一附属医院;3. 天津市针灸研究所,天津市针灸学重点实验室,国家中医药管理局“针刺量效关系实验室”

通讯作者:樊小农, Tel:022-27432207, E-mail:fanxiaonong@163.com

[△] 现在内蒙古包头医学院第二附属医院针灸科(包头 014030)

quency of acupuncture

针刺治疗脑血管疾病具有很好的疗效,但因为针刺操作方法千差万别,难以对临床或基础研究中不同实验结果进行分析比较,从而不利于临床选择和医师掌握。而且在对改善脑血流的相关研究中,已发现高频率和低频率电针针刺出现相反的作用^[1,2]。因此,了解脑缺血前后不同脑区病理生理的基本变化情况、进行针刺量化研究,将有助于揭示针刺机制和指导针灸临床操作。本研究利用大鼠大脑中动脉栓塞模型(middle cerebral artery obstruction, MCAO),观察大鼠造模即刻和存活 72 h 后 MCAO 大鼠脑组织病理生理的动态变化以及应用不同频率针刺法干预后,对该病理生理的影响情况,探讨针刺频率因素的作用机制。

材料与方法

1 试剂与仪器 10% 水合氯醛(天津市瑞金特化学品有限公司);12% 福尔马林液(天津市瑞金特化学品有限公司);光学显微镜(BX40 日本 OLYMPUS);HMIAS-2000 高清晰度彩色医学图文分析系统(武汉同济医科大学千屏影像技术有限公司);切片机(德国莱卡, Leica RM2245);包埋机(德国莱卡, Leica EG1150H)。

2 动物与分组 SPF 级 Wistar 成年健康雄性大鼠, 250 ~ 280 g, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 合格证号: SCXK(京)2007-0001。36 只大鼠随机分为 6 组: 分别为正常组、假手术组、模型组、未针刺组(对照组)、快频率针刺组和慢频率针刺组, 每组 6 只。虽然进行了严格的实验前培训, 但由于手术受人为因素的影响很大, 而且造模后大鼠的成活率也影响着实验, 所以不论是术中还是造模后均会导致大鼠死亡, 我们对死亡的大鼠都进行了补充以确保每组 6 只。

3 模型制备 参照 Zea-Longa 线栓法^[3]复制大鼠 MCAO 模型, 主要步骤: 禁食水 12 h, 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉(250 mg/kg)至大鼠对疼痛刺激反应消失为止, 背位固定于大鼠手术板, 局部消毒后备皮, 取颈部正中稍偏左切口 2 ~ 2.5 cm, 分离两侧甲状腺, 暴露左侧胸锁乳突肌和胸骨舌骨肌间的三角区, 钝性分离左侧颈总动脉和颈外动脉, 并用 0 号手术线结扎颈外动脉。在分叉处和近心端处分别用小动脉夹夹闭一段颈总动脉, 然后用 1 mL 注射器针头在近心端处扎一个小孔, 用直径 0.265 mm 的鱼线缓慢插入, 待插进之后, 放开分叉处的动脉夹, 将鱼线继续进入颈内动脉, 直至遇到阻力为止, 鱼线进入颅内

深度为 18 ~ 20 mm(鱼线事先已做好标记), 此时插入的鱼线正好封闭大脑中动脉开口, 阻断大脑中动脉的血流。插线成功后结扎颈总动脉及针孔处, 放开另一个动脉夹, 分层缝合, 清理伤口后放入笼中。

4 造模成功判定 大鼠造模清醒后, 按 Zausinger 六分法^[4]对其神经功能进行评分, 去除未造模成功及病情过轻过重的模型(即评分为 0、4 和 5 分的动物)。Zausinger 六分法评定标准如下: 0 分: 不能自发行走; 1 分: 自由走动状态下向病变对侧旋转; 2 分: 抓住鼠尾, 大鼠向病变对侧旋转; 3 分: 对于施向病变对侧的侧压力抵抗力下降; 4 分: 不能伸直病变对侧前爪, 甚至全身向对侧屈曲; 5 分: 无神经功能缺损。

5 假手术组处理 除不插入鱼线外, 其他操作与手术组相同, 且 Zausinger 六分法评分为 5 分的动物。

6 选穴及干预方法 选穴方法参照《实验针灸学》^[5], 水沟穴位于唇裂鼻尖下 1 mm 正中处。快慢针刺组: 在造模成功后待大鼠清醒, 约 1 h 左右, 即给予第 1 次针刺干预, 之后每 12 h 用同样的方法再干预, 72 h 共干预 6 次。具体针刺操作方法为: 两人配合操作, 一人用手抓取活体大鼠以固定, 另一人做提插手法操作, 当针尖刺入皮肤后, 因大鼠水沟处皮肤单薄, 提插时水沟处皮肤亦随针上下移动, 故在确保针尖不出皮肤的情况下提插 1 mm 左右, 持续时间为 5 s。其中快、慢频率针刺组分别施 3 次/s 和 1 次/s 的提插手法。正常组、假手术组、未针刺组: 用与针刺组实施相同时间、同等条件的抓取, 但不实施任何针刺干预, 共抓取 6 次。模型组: 造模成功即刻采集指标, 未给予任何干预方法。

7 观察指标及方法 观察脑组织中微血管及炎性细胞的数量; 光镜下观察脑组织病理形态学变化。对大鼠快速断头取脑, 分离病变侧大脑(即左侧), 迅速固定于 12% 福尔马林溶液中, 石蜡包埋后切片(5 μ m), HE 染色, 树胶封固。光镜下, 通过 HMIAS-2000 高清晰度彩色医学图文分析系统, 观察脑缺血损伤组织学特点; 由专门人员计数两个 400 倍视野下的微血管数(镜下微血管为细长条形, HE 染色为红色)及炎性细胞数(镜下炎性细胞为小圆形, HE 染色为黑色), 将其平均值作为每张切片的微血管数值及炎性细胞数值, 每个效应指标观察 6 个标本, 12 张切片, 进行统计分析。由于光镜观察视野有限, 若该视野中观测对象轻微改变, 在整个部位则可累计出较大变

化,因此本实验进行结果统计时采用了变化率概念,即变化率(%)=(相应组别效应指标值-模型组效应指标值)/模型组效应指标值。

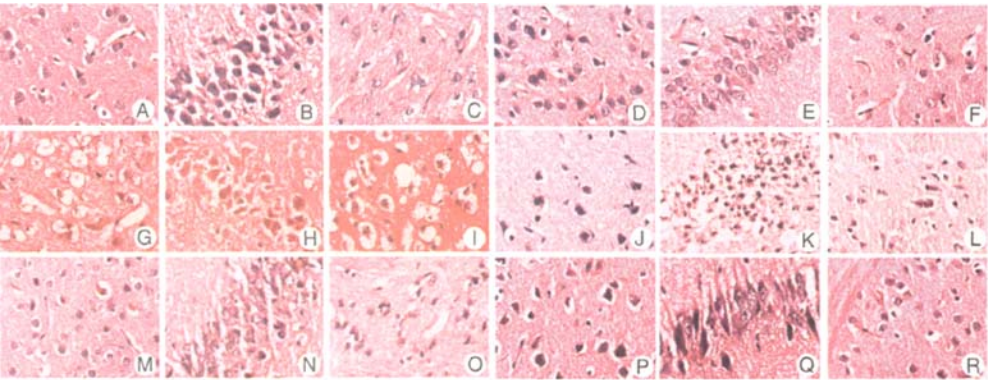
8 统计学方法 采用 SPSS 11.5 软件包,运用单因素方差分析统计法,两两比较采用 *q* 检验。率的比较采用多个样本比较的秩和检验,并进行两两比较。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组 MCAO 大鼠不同脑区微血管及炎性细胞数比较(图 1,表 1) 模型组仅在纹状体部位的炎性细胞数较正常组明显增多,其余部位指标未见明显变

化;与未针刺组比较,快频率针刺组皮层和海马的炎性细胞数明显减少、慢频率针刺组纹状体的炎性细胞数和微血管数明显增多;未针刺组纹状体部位的微血管和炎性细胞数明显低于皮层和海马,皮层部位的微血管数明显低于海马,差异均有统计学意义(*P* < 0.05)。

2 未针刺及针刺组 MCAO 大鼠不同脑区微血管及炎性细胞数量变化率比较(表 2) 微血管数的变化率:快、慢频率针刺组在皮层、海马、纹状体三部位与未针刺组比较均分别显示为无变化、减小和增大,炎性细胞数的变化率:与未针刺组比较,快频率针刺组在皮层、海马、纹状体分别显示为无变化、减小和增大;慢



注: A、B、C 分别为正常组织皮层、海马、纹状体; D、E、F 分别为假手术组织皮层、海马、纹状体; G、H、I 分别为模型组织皮层、海马、纹状体; J、K、L 分别为未针刺组织皮层、海马、纹状体; M、N、O 分别为快频率组织皮层、海马、纹状体; P、Q、R 分别为慢频率组织皮层、海马、纹状体

图 1 各组大鼠脑组织皮层、海马、纹状体形态学结果(HE, ×400)

表 1 各组 MCAO 大鼠不同脑区微血管及炎性细胞数比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	切片数	微血管数(个)			炎性细胞数(个)		
		皮层	海马	纹状体	皮层	海马	纹状体
正常	12	4.83 ± 1.53	4.17 ± 1.70	5.17 ± 2.33	1.58 ± 1.16	1.83 ± 1.64	1.33 ± 0.65
假手术	12	4.58 ± 2.11	5.42 ± 1.51	3.50 ± 1.78	2.08 ± 1.16	1.67 ± 0.65	1.17 ± 1.03
模型	12	4.17 ± 2.04	3.00 ± 1.28	2.67 ± 0.78	2.75 ± 2.14	4.83 ± 2.69	4.83 ± 1.70*
未针刺	12	4.00 ± 1.65 [△]	6.58 ± 2.07 [▲]	0.67 ± 0.89*	6.25 ± 1.48* [▲]	7.75 ± 2.14* [▲]	2.50 ± 1.17
快频率	12	5.67 ± 2.78	4.17 ± 1.95	3.58 ± 1.93	3.58 ± 1.16 [△]	3.17 ± 1.40 [△]	4.42 ± 1.78
慢频率	12	5.33 ± 1.56	4.17 ± 1.27	4.08 ± 1.24 [△]	6.75 ± 1.86	6.75 ± 1.60	7.92 ± 3.15 [△]

注:与正常组比较,**P* < 0.05;与未针刺组比较,[△]*P* < 0.05;与本组纹状体比较,[▲]*P* < 0.05;与本组海马比较,[○]*P* < 0.05

表 2 未针刺及针刺组 MCAO 大鼠不同脑区微血管及炎性细胞数量变化率比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	切片数	微血管数变化率			炎性细胞数变化率		
		皮层	海马	纹状体	皮层	海马	纹状体
未针刺	12	0.57 ± 1.85	1.77 ± 2.37	-0.72 ± 0.43	1.70 ± 1.75	1.36 ± 1.93	-0.44 ± 0.34
快频率	12	0.83 ± 1.33	0.57 ± 0.93*	0.32 ± 0.66*	0.36 ± 0.57	-1.16 × 10 ⁻³ ± 0.92*	-1.19 × 10 ⁻³ ± 0.44*
慢频率	12	0.92 ± 1.67	0.67 ± 0.94*	0.67 ± 0.74*	2.06 ± 2.51	1.12 ± 2.24 [△]	0.95 ± 1.35 [△]

注:与未针刺组比较,**P* < 0.05;与快频率组比较,[△]*P* < 0.05

频率针刺组仅在纹状体显示增大,同时,快、慢频率针刺组在海马和纹状体脑区比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

讨 论

炎性细胞在缺血区聚集、浸润,参与缺血脑组织损伤的病理过程^[6]。而大脑微血管在脑缺血损伤中也处于动态变化过程^[7]。因此本实验选取以上指标观察脑缺血病理生理变化及不同频率针刺法对其的影响。

由于模型组与正常组比较,差异无统计学意义,提示大鼠在脑缺血的即刻,各脑区的微血管和炎性细胞数尚未发生明显变化;而在脑缺血 72 h 后,纹状体部位的微血管数明显减少,皮层和海马部位的炎性细胞数明显增多,而且不同脑区的微血管数和炎性细胞数存在差异,说明随着缺血时间的延长,微血管和炎性细胞在不同脑区将重新“分布”,即在脑缺血动态病理生理的变化中,表现出明显的脑区特异性。这可能与它们的血管构筑有关。本实验模型采取的是 MCAO,纹状体主要靠其供应,这点也可能是造成纹状体微血管明显减少的原因。

不同频率针刺法对炎性反应的作用不同。快频率针刺法可明显抑制炎性反应,减慢炎性反应进程;而慢频率针刺法未显示出抑制炎性反应的作用,相反在纹状体加速了炎性反应进程。在不同频率电针作用机制影响效应的研究中发现,2 Hz 电针较 100 Hz 刺激可明显保护大鼠脑缺血耐受的保护作用^[1];临床研究亦证明,采用电针结合促通技术治疗脑卒中偏瘫患者时,低频 3 Hz 电针较高频 12 Hz 电针临床疗效更为明显^[8]。由于临床还是以毫针针刺为主,而且电针并不能完全模拟针刺手法的操作。因此本实验采用毫针针刺的方法,对不同针刺频率影响 MCAO 大鼠不同脑区的动态病理生理变化进行了有益尝试,结果证实针刺具有脑区部位的特异性作用,且不同频率针刺法在改善脑缺血的作用环节上有差异,具体针刺频率的部位特异性及其作用环节的差异性尚需进一步的研究。

参 考 文 献

- [1] 杨静,熊利泽,王强,等. 不同刺激参数及其组合对电针诱导大鼠脑缺血耐受效应的影响[J]. 中国针灸, 2004, 24(3):208-212.

Yang J, Xiong LZ, Wang Q, et al. Effects of different stimulating parameters and their various combinations on electroacupuncture-induced cerebral ischemic tolerance in rats [J]. Chin Acupunct Moxibust, 2004, 24(3):209-213.

- [2] 欧阳钢,贾少微,王凡,等. 不同电针刺激频率对脑卒中患者脑血流灌注和脑功能的影响[J]. 中国针灸, 2005, 25(11):776-778.
- Ouyang G, Jia SW, Wang F, et al. Effects of electroacupuncture of different frequencies on cerebral blood perfusion and cerebral function in the patient of stroke[J]. Chin Acupunct Moxibust, 2005, 25(11):776-778.
- [3] Longa EZ, Weinstein PR, Carson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniotomy in rats [J]. Stroke, 1989, 20(1):84-91.
- [4] Zausinger S, Hungerhuber E, Baethmann A, et al. Neurological impairment in rats after transient middle cerebral artery occlusion: a comparative study under various treatment paradigms [J]. Brain Res, 2000, 863:94-105.
- [5] 李忠仁主编. 实验针灸学[M]. 北京:中国中医药出版社, 2003:327-328.
- Li ZR, editor. Experimental acupuncture [M]. Beijing: China Press of Traditional Chinese Medicine, 2003:327-328.
- [6] 郝延磊,蒲传强,张凤英,等. 实验性脑缺血模型脑组织微血管细胞间粘附分子-1 表达的研究[J]. 中华神经科杂志, 1998, 31(2):105.
- Hao YL, Pu CQ, Zhang FY, et al. Research on the expression of adhesion molecules-1 in microvascular cells in brain tissue of experimental cerebral ischemia model[J]. Chin J Neurol, 1998, 31(2):105.
- [7] 唐民科,冯卫红,徐秋萍,等. 脑缺血后的脑微血管变化[J]. 生理科学进展, 2006, 37(3):236-238.
- Tang MK, Feng WH, Xu QP, et al. Cerebral microvascular changes in the brain after ischemia [J]. Prog Physiol Sci, 2006, 37(3):236-238.
- [8] 刘兵,林军华. 不同频率电针结合促通技术治疗脑卒中偏瘫临床评价[J]. 第四军医大学学报, 2007, 28(16):1503-1505.
- Liu B, Lin JH. Different frequency electroacupuncture with facilitation techniques in the treatment of hemiplegic patients after cerebral apoplexy [J]. J Fourth Milit Med Univ, 2007, 28(16):1503-1505.

(收稿:2008-12-26 修回:2010-01-25)