

· 针灸经络 ·

# 电针对局灶性脑缺血大鼠缺血皮质区内皮抑素、血小板反应蛋白-1 表达的影响

李斯亮<sup>1</sup>, 唐巍<sup>2</sup>, 龚丽<sup>1</sup>, 咎兴淳<sup>1</sup>, 丰丽媛<sup>1</sup>, 童明月<sup>1</sup>, 何鹏<sup>1</sup>

(1. 安徽中医药大学研究生院, 安徽 合肥 230012; 2. 安徽中医药大学针灸推拿学院, 安徽 合肥 230012)

**[摘要]**目的 观察电针对局灶性脑缺血大鼠缺血皮质区内皮抑素(endostatin, ES)、血小板反应蛋白-1(thrombospondin-1, TSP-1)表达的调控作用及其机制。方法 将54只健康雄性SD大鼠随机分为假手术组、模型组和电针组, 每组18只。利用改良线栓法复制局灶性大脑中动脉闭塞模型, 电针组选取“百会”与“水沟”穴进行治疗, 每次30 min, 每日1次, 共干预7 d。比较术后7 d各组大鼠神经功能评分, 用2, 3, 5-三苯基氯化四氮唑染色法测量脑梗死面积, 免疫组织化学法及蛋白免疫印迹法检测ES、TSP-1蛋白在大鼠脑缺血皮质区的表达情况。结果 与假手术组比较, 模型组大鼠神经功能缺损体征较为显著, 梗死范围明显, 脑缺血皮质区ES和TSP-1蛋白表达均显著上调( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 电针组大鼠神经功能评分降低( $P < 0.05$ ), 梗死面积缩小( $P < 0.05$ ), 脑缺血皮质区ES、TSP-1蛋白表达水平均明显下调( $P < 0.05$ )。结论 电针可促进局灶性脑缺血大鼠神经功能恢复, 缩小梗死面积, 其机制可能与血管新生抑制因子ES、TSP-1的表达下调有关。

**[关键词]**电针; 脑缺血; 内皮抑素; 血小板反应蛋白-1

**[中图分类号]**R743.3 **[DOI]**10.3969/j.issn.2095-7246.2019.01.012

缺血性脑卒中可产生临床各种神经功能缺失的症状, 是由于局部脑组织血液供应障碍, 脑组织缺血低氧性病变坏死所致<sup>[1]</sup>。该病发病率、病死率高, 每年导致约670万人死亡<sup>[2]</sup>。85岁以上老人发生脑卒中的概率约为25%, 缺血性脑卒中约占80%<sup>[3]</sup>。近年来有研究表明, 脑梗死周围皮质的血管生成作用可在一定程度上促进脑卒中后神经功能恢复<sup>[4]</sup>。电针可增加梗死区脑血流量、血管数量, 并改善神经功能<sup>[5]</sup>。过去很多报道着眼于减少脑缺血性疾病的损害因素<sup>[6]</sup>, 然而临床疗效并不理想, 因此寻求新的方法成为研究的重点。有文献报道通过抑制内皮抑素(endostatin, ES)、血小板反应蛋白-1(thrombospondin-1, TSP-1)等抑制因子对血管新生的负向调节, 能够改善脑缺血损伤后脑血管生成效应, 增加缺血区及其周围血液供应, 使受损神经得到修复<sup>[7]</sup>, 这可能成为临床通过调控血管新生抑制因子促进脑缺血后血管新生, 发挥脑保护作用的新途径。本研究以电针与血管新生抑制因子表达的关联性作为切

入点, 探讨电针疗法能否通过调控血管新生抑制因子的表达, 促进神经功能的改善, 产生脑保护作用。

## 1 材料

1.1 动物 健康的雄性SD大鼠54只, 体质量为280~320 g, 由安徽医科大学动物饲养中心[生产许可证号为SCXK(皖)2011-002]提供。每笼饲养3只, 室温控制在20~25℃, 保持通风, 动物在自然条件下饮食饮水, 术前禁食不禁水。

1.2 试剂 ES、TSP-1抗体: 武汉Abcam公司; SABC试剂盒: 武汉博士德公司; SP二抗试剂盒及DAB显色试剂盒: 北京中杉金桥生物技术有限公司; TTC染色液: 美国Sigma公司; ECL显影剂: Bio-rad公司; SDS: Sigma公司。

1.3 仪器 华佗牌毫针、华佗牌SDZ-IV型电子针疗仪(0.30 mm×25 mm): 苏州医疗用品厂有限公司; 石蜡组织薄片切片机: 德国LEICA公司; BX51型Olympus显微镜: 日本Olympus公司; 垂直板电泳槽(24DN型): 北京六一仪器厂; EPS300型电泳仪: 上海天能科技有限公司。

## 2 方法

2.1 干预方法 依据《实验针灸学》<sup>[8]</sup>进行穴位定位, 电针组大鼠取“百会”和“水沟”穴进行治疗。“百会”穴取于顶骨正中, 沿皮向前平刺1 cm; “水沟”穴取于唇裂鼻尖下1 mm正中, 沿鼻中隔方向斜刺0.3~0.4 cm。于术后4 h开始刺激, 采用0.30 mm×25

**基金项目:**国家自然科学基金项目(81373711, 81874500); 安徽高校科研创新平台团队建设项目(2015TD033); 第九批安徽省学术和技术带头人后备人选项目(2013025)

**作者简介:**李斯亮(1991-), 女, 硕士研究生

**通信作者:**唐巍(1969-), 女, 博士, 教授, [tangwei2633@163.com](mailto:tangwei2633@163.com)

mm毫针刺,接SDZ-IV华佗电针治疗仪。电针参数为疏密波,电流强度为1 mA,频率为2 Hz。每次时间30 min,每日1次,连续治疗7 d。

**2.2 动物分组及模型制备** 54只大鼠分为假手术组、模型组、电针组,每组18只。参照LONGA等<sup>[9]</sup>改良的颈外动脉线栓法复制局灶性大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型:大鼠术前禁食不禁水,用3.5%水合氯醛腹腔注射麻醉(10 mL/kg),仰卧位固定于鼠板,无菌操作。用手术剪在颈部正中靠右0.5 cm处纵向剪一道长约2 cm的切口,血管钳钝性分离,暴露右侧颈总动脉(common carotid artery, CCA)和迷走神经。向下剥离出颈内动脉(internal carotid artery, ICA)和颈外动脉(external carotid artery, ECA),用缝合线在ECA上打死结并将其在远心端凝断,使ECA的游离端与ICA拉成一条直线,动脉夹暂时夹闭备用线远端的ICA和CCA。在ECA根部用缝合线打一松结,再用眼科剪在ECA残端斜45°方向剪一小口,将适合于大鼠体质量标记好的鱼线插入ICA并沿入颅方向徐徐推入,插入深度18~20 mm,稍遇阻力应立即停止插线。将ECA根部预留好的缝合线打死结固定好,移去动脉夹,缝合切口皮肤,常规无菌操作后注射0.5 mL青霉素钠,预防感染。其中假手术组不插入栓线,仅作各动脉分离。大鼠清醒后自由进食、进水,每日更换垫料,保持笼具清洁,注意保温。依据神经功能学评分判断大鼠模型是否复制成功<sup>[10]</sup>,模型复制成功标准:对侧前爪弯曲,伸展受限;自主运动时,身体向偏瘫侧转圈或者身体向对侧倾倒。

**2.3 神经功能学评分** 参照文献<sup>[11]</sup>制定神经功能评分标准。于大鼠清醒后评分。0分:大鼠自主活动无异常;1分:大鼠左侧前肢伸展不全;2分:大鼠醒后运动时,向瘫痪侧转圈;3分:大鼠醒后运动时,身体向左侧倾倒;4分:意识丧失,不能自发行走。

## 2.4 指标观察方法

**2.4.1 大鼠神经功能评分** 参考神经功能学评分标准,于治疗7 d后对各组大鼠进行神经功能缺损评分。

**2.4.2 大鼠脑梗死面积检测** 利用2,3,5-三苯基氯化四氮唑(2,3,5-Triphenyltetrazoliumchloride, TTC)染色法进行观察。大鼠评分结束立刻予以腹腔深度麻醉处死,快速取完整脑组织置于冰袋上,用生理盐水冲净后立即置于培养皿中,切除小脑和嗅球。放入-20℃冰箱10~15 min冰冻,取出后进行冠状面切片,共5片,每片厚度为2 mm。加入

2% TTC染色液,于37℃水浴箱中避光温育30 min,4℃环境下用4%多聚甲醛固定。将脑片取出摆放好,用数码相机照像。用图像分析系统Image Pro-Plus 6.0测量脑梗死面积,脑梗死面积百分比=梗死面积/全脑片面积×100%。

**2.4.3 大鼠脑缺血皮质区ES、TSP-1蛋白表达水平检测** 用4%多聚甲醛将全脑固定过夜,1周后取出,经过脱水、浸蜡、包埋、切片、摊片、烤片及脱蜡等步骤,采用免疫组织化学法对脑组织中ES、TSP-1蛋白表达水平进行检测。随机选取7张非连续的脑组织切片,在400倍光镜下观察缺血梗死部位,采用Image pro-plus 6.0图像处理系统统计平均光密度,以胞浆棕黄色为阳性表达。

**2.4.4 大鼠脑缺血皮质区ES、TSP-1蛋白相对表达水平检测** 采用Western blot法进行测定。用RIPA裂解液提取蛋白,按照1:4加入5×SDS-PAGE蛋白上样缓冲液。ES、TSP-1分别进行10% SDS-PAGE、15% SDS-PAGE变性电泳,转膜后再用TBST(含5%脱脂奶粉)封闭,而后进行一抗孵育、二抗孵育。TBST洗膜后,参照ECL发光试剂盒说明书依次进行化学发光、显影、定影。用Image J软件计算内参条带与目标条带的净吸光度值,最终得出目标条带与内参条带净吸光度值的比值作为蛋白相对表达水平。

**2.5 统计学方法** 采用SPSS 23.0软件对数据进行统计学分析。连续型变量采用“均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )”进行统计学描述。采用单因素方差分析,均数多重比较采用LSD检验。显著性水准为 $\alpha=0.05$ 。

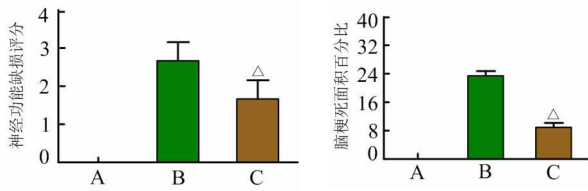
## 3 结果

**3.1 各组大鼠神经功能缺损评分比较** 假手术组大鼠无明显神经功能缺损症状,评分为0分;与假手术组比较,模型组大鼠神经功能缺损症状较为明显;与模型组比较,电针组大鼠经电针干预后神经功能缺损评分明显降低( $P<0.05$ )。结果提示电针疗法可有效提高脑缺血大鼠的神经功能。见图1。

**3.2 各组大鼠脑梗死面积比较** 经TTC染色观察发现,假手术组未见明显缺血区域,模型组右侧脑半球出现苍白色缺血区域。经过计算梗死面积发现,与假手术组比较,模型组大鼠脑梗死区域明显;与模型组比较,电针组大鼠梗死面积显著减小( $P<0.05$ )。见图1、图2。

**3.3 各组大鼠脑缺血皮质区ES、TSP-1阳性细胞平均光密度比较** 与假手术组比较,模型组大鼠脑缺血皮质区ES、TSP-1阳性细胞平均光密度明显升高( $P<0.05$ );与模型组比较,电针组ES、TSP-1阳性细胞

平均光密度明显降低( $P < 0.05$ )。见图3、图4。



注: A. 假手术组; B. 模型组; C. 电针组; 与模型组比较,  $\Delta P < 0.05$ ; 神经功能缺损评分,  $n = 18$ ; 脑梗死面积,  $n = 6$

图1 各组大鼠神经功能缺损评分和脑梗死面积比较( $\bar{x} \pm s$ )

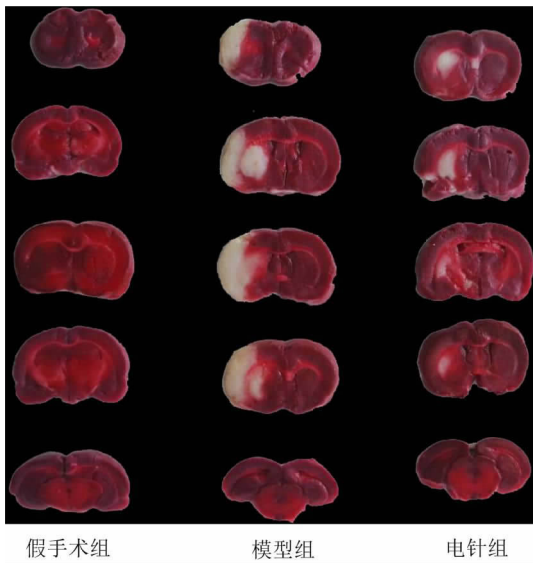
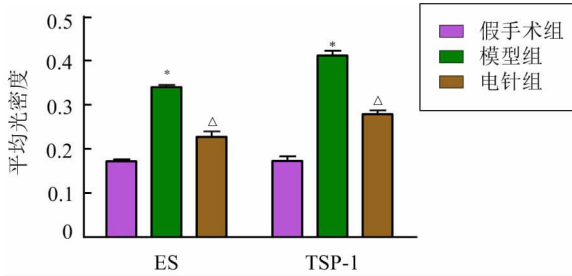


图2 各组大鼠脑梗死区域大体形态(TTC染色)



注: 与假手术组比较, \*  $P < 0.05$ ; 与模型组比较,  $\Delta P < 0.05$

图3 各组大鼠脑缺血皮质区ES、TSP-1阳性细胞平均光密度比较( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

3.4 各组大鼠脑缺血皮质区ES和TSP-1蛋白表达水平比较 假手术组大鼠脑缺血皮质区ES、TSP-1蛋白有少量表达;与假手术组比较,模型组大鼠ES、TSP-1蛋白表达水平显著上升( $P < 0.05$ );与模型组比较,电针组ES、TSP-1蛋白表达水平明显下降( $P < 0.05$ )。见图5。

#### 4 讨论

脑缺血属中医学“中风”范畴。其病机可归纳为风、火、痰、气、虚、瘀,机体可在此6种病因影响下导致阴阳失调,气血逆乱,上犯于脑而发病。针刺作为传统中医疗法,具有操作简便、安全的特点,在脑缺血治疗及其后遗症预防方面卓有成效。“百会”为手

足少阳、足太阳、足厥阴与督脉之会,有疏通脑络、协调百脉、补神益智之效。“水沟”系督脉穴,为督脉与手足阳明经的交会穴,可开窍启闭、调督醒神。实验研究证实,针刺“百会”“水沟”可发挥对脑缺血后损伤的修复作用<sup>[12-14]</sup>。故本实验选取此二穴对MCAO模型大鼠进行电针干预,探讨其相关作用机制。

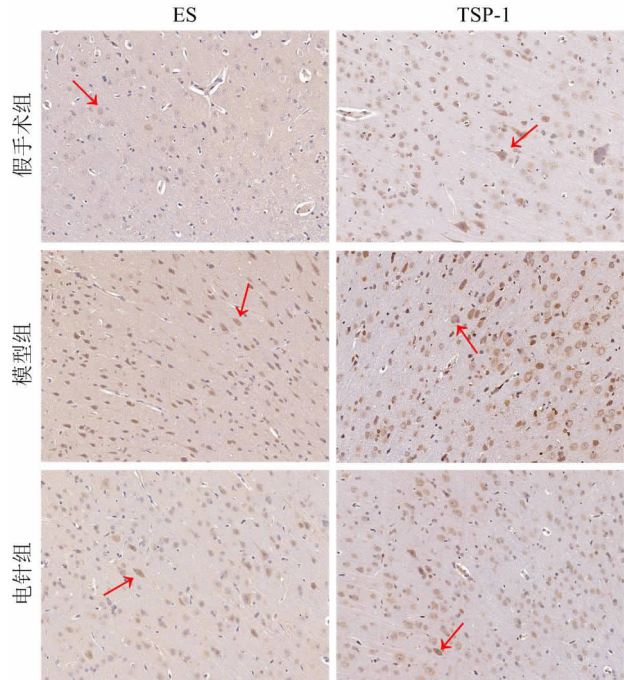
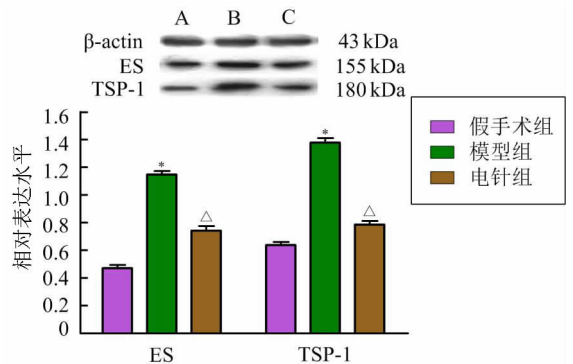


图4 各组大鼠脑缺血皮质区ES、TSP-1阳性细胞表达比较

(免疫组织化学法,10×40倍,箭头示阳性细胞)



注: A. 假手术组; B. 模型组; C. 电针组; 与假手术组比较, \*  $P < 0.05$ ; 与模型组比较,  $\Delta P < 0.05$

图5 各组大鼠脑缺血皮质区ES、TSP-1蛋白表达水平比较( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

脑缺血发生后,脑血管内皮细胞的损伤可导致血脑屏障功能障碍,降低其通透性,形成脑水肿;脑水肿可进一步损伤缺血区的神经细胞<sup>[15]</sup>。文献报道,新生的脑微血管可改善缺血区周围的血流灌注,为修复神经细胞提供良好的微环境,改善脑缺血后的神经功能<sup>[16]</sup>。

研究发现,ES是目前已知最强的内源性血管生成抑制因子,能特异性作用于血管内皮细胞,诱导血

管内皮细胞凋亡,抑制迁移活动,从而抑制血管再生<sup>[17]</sup>。ES主要在一些高度血管化的组织(如脑的脉络膜、肠壁血管)中表达,并参与血管周边基质的结构和组装<sup>[18]</sup>,在正常脑组织呈低表达,脑缺血损伤后主要表达在海马、侧脑室周围、纹状体等部位,并于脑缺血后2 h增加,12 h达高峰<sup>[19]</sup>。另有研究发现,ES可导致血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)与其受体的结合减少,抑制VEGF介导细胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinases, ERK)、丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)酪氨酸磷酸化,从而抑制VEGF诱导的新血管形成作用<sup>[20]</sup>。TSP-1是一种血管生成抑制因子<sup>[21]</sup>,主要通过刺激炎症因子和DR相关基因的表达诱导一氧化氮合酶等效应蛋白的表达来发挥作用,可抑制纤维生长因子或VEGF诱导的血管生成反应,通过多种途径抑制内皮细胞的黏附,阻碍其迁移<sup>[22]</sup>。VEGF是目前发现的最强烈的血管新生促进因子<sup>[23]</sup>。研究表明,通过上调梗死区VEGF的表达、下调ES的表达有利于血管新生,可改善缺血区周围血流灌注,促进神经细胞修复。资料显示,脑缺血损伤修复的关键之一是调整ES和VEGF两者之间的动态平衡<sup>[24]</sup>,而电针下调TSP-1的表达亦可对脑缺血损伤起到修复作用<sup>[25]</sup>。

本实验结果表明,电针干预可明显改善大鼠神经功能,有效降低缺血区梗死面积,同时可伴有血管新生抑制因子ES、TSP-1蛋白表达下降。电针干预能够抑制ES、TSP-1等血管新生抑制因子对血管新生的负反馈调节,从而发挥VEGF等血管新生促进因子的血管生成作用,修复受损神经,减轻脑缺血后脑神经的损伤。

综上所述,电针“百会”和“水沟”穴可显著下调MCAO模型大鼠脑缺血皮质区血管新生抑制因子ES、TSP-1蛋白表达,这对于促进神经功能恢复,缩小缺血区梗死面积,具有一定的临床价值,可能是其发挥脑缺血后脑功能保护作用的机制之一。而ES、TSP-1对缺血性脑卒中后血管新生的作用机制尚未明确,有待于进一步研究。

#### 参考文献:

[1] 王飞龙,韩岚,樊玲,等. 桃红四物汤对实验性脑缺血大鼠血清中ET-1, Ang-1, VEGF的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(1): 101-106.

[2] CUNNINGHAM C J, REDONDO-CASTRO E, ALLAN S M. The therapeutic potential of the mesenchymal stem cell secretome in ischaemic stroke[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2018, 38(8): 1276-1292.

[3] MURRAY C J, LOPEZ A D. Measuring the global burden of disease[J]. N Engl J Med, 2013, 369(5): 448-457.

[4] MA J X, ZHANG L N, NIU T F, et al. Growth differentiation factor 11 improves neurobehavioral recovery and stimulates angiogenesis in rats subjected to cerebral ischemia/reperfusion[J]. Brain research bulletin, 2018, 139: 38-47.

[5] SHI L, CAO H M, LI Y, et al. Electroacupuncture improves neurovascular unit reconstruction by promoting collateral circulation and angiogenesis[J]. Neural regeneration research, 2017, 12(12): 2000-2006.

[6] XIE M, YI C, LUO X, et al. Glial gap junctional communication involvement in hippocampal damage after middle cerebral artery occlusion[J]. Ann Neurol, 2011(70): 121-132.

[7] 姚红,倪光夏. 基于“治疗性血管新生”理论探讨针灸治疗缺血性脑卒中的机制[J]. 吉林中医药, 2016, 36(5): 521-525.

[8] 郭义. 实验针灸学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2008, 14(7): 414-417.

[9] LONGA F Z, WEINSTEIN P R, CARLSON S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20(1): 84.

[10] 罗勇,董为伟. Wistar大鼠插线法局灶性脑缺血/再灌注模型的实验研究[J]. 重庆医科大学学报, 2002(1): 1-4.

[11] BEDERSON J B, PITTS L H, TSUJI M, et al. Rat middle cerebral artery occlusion evaluation of model and development of a neurologic examination[J]. Stroke, 1986, 17(3): 472-476.

[12] 王琼,黄伟,吴洪阳. 针刺对急性脑缺血大鼠沉默信息调节因子2相关酶1和核转录因子- $\kappa$ B蛋白的影响[J]. 针刺研究, 2018, 43(3): 146-151.

[13] 黄伟,李佳,朱广为. 针刺百会、人中穴对急性脑缺血大鼠模型NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B- $\alpha$ 的影响[J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(1): 298-302.

[14] 王琼,黄伟,吴洪阳,等. 针刺百会、人中穴对急性脑缺血大鼠模型葡萄糖转运蛋白1,3的影响[J]. 广州中医药大学学报, 2018, 35(1): 86-92.

[15] 杨敏,陈邦国,梁超. 头针对大鼠局灶性脑缺血再灌注后脑组织VEGF及ES表达的影响[J]. 中国中医急症, 2014, 23(6): 1012-1013, 1052.

[16] PALMER T D, WILLHOITE A R, GAGE F H. Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis[J]. J Comp Neurol, 2000, 425(4): 479-494.

[17] SU S J, YE H T M, CHUANG W J, et al. The novel targets for anti-angiogenesis of genistein on human cancer cells[J]. Biochem Pharmacol, 2005, 69(2):

- 307.
- [18] MAATTA M, HELJASVAARA R, PIHLAJANIE-MI T, et al. Collagen XVIII/endostatin shows a ubiquitous distribution in human ocular tissues and endostatin-containing fragments accumulate in ocular fluid samples[J]. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2006, 25(4):341-349.
- [19] 马曦, 罗勇. 电针对大鼠局灶脑缺血再灌注后脑内血管生长因子和血管抑制因子表达的影响[J]. 中国针灸, 2006, 27(2):129-133.
- [20] TIAN H L, CHEN H, CUI Y H, et al. Increased protein and mRNA expression of endostatin in the ischemic brain tissue of rabbits after middle cerebral artery occlusion[J]. Neurosci Bull, 2007, 23(1):35-40.
- [21] SHIRAHARA H, YAMAMOTO K, NAMBA M. Human hepatocyte carcinogenesis (Review)[J]. Int J Oncol, 2013, 42(4):1133-1138.
- [22] LEE D, KIM D, CHOI Y B, et al. Simultaneous blockade of VEGF and Dll4 by HD105, a bispecific antibody, inhibits tumor progression and angiogenesis [J]. MAbs, 2016, 8(5):892-904.
- [23] 孙顺昌, 王国峰, 赵玉芳, 等. 局灶性缺血预处理对脑缺血大鼠血管内皮生长因子表达及血管形成的影响[J]. 中国临床神经科学, 2011, 19(6):594-600.
- [24] 蒋静子, 刘开祥, 李浩, 等. 急性脑梗死患者血清 VEGF 与内皮抑素水平的动态变化及意义[J]. 广西医科大学学报, 2012, 29(6):869-871.
- [25] 万赛英, 谭峰, 吴海科, 等. 电针干预高血压大鼠脑缺血 Ang1 TSP-1 的表达及细胞超微结构的研究[J]. 中华中医药学刊, 2010, 28(12):2544-2547.

(收稿日期:2018-07-30;编辑:曹健)

## Effect of Electroacupuncture on the Expression of Endostatin and Thrombospondin-1 in the Ischemic Cortex in Rats with Focal Cerebral Ischemia

LI Si-liang<sup>1</sup>, TANG Wei<sup>2</sup>, GONG Li<sup>1</sup>, ZAN Xing-chun<sup>1</sup>, FENG Li-yuan<sup>1</sup>, TONG Ming-yue<sup>1</sup>, HE Peng<sup>1</sup>

(1. Graduate School of Anhui University of Chinese Medicine, Anhui Hefei 230012, China; 2. College of Acupuncture and Moxibustion, Anhui University of Chinese Medicine, Anhui Hefei 230012, China)

**[Abstract] Objective** To observe the effect of electroacupuncture (EA) on the expression of endostatin (ES) and thrombospondin-1 (TSP-1) in the ischemic cortex in rats with focal cerebral ischemia (FCI) and its mechanism. **Methods** Fifty-four healthy male Sprague-Dawley rats were randomly divided into sham-operation group, model group, and EA group, with 18 rats in each group. A right middle cerebral artery occlusion model was established by the modified suture method. The EA group was treated by EA (30 min) at Baihui and Shuigou points once daily for 7 days. The neurological score was assessed at 7 d after operation. The cerebral infarct area was measured by 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride staining. Immunohistochemistry and Western blot were used to measure the protein expression of ES and TSP-1 in the ischemic cortex. **Results** Compared with the sham-operation group, the model group showed obvious signs of neurological deficit, with a significantly increased neurological score, an obvious infarct area, and significantly upregulated protein expression of ES and TSP-1 in the ischemic cortex ( $P < 0.05$ ). Compared with the model group, the EA group had a significantly lower neurological score ( $P < 0.05$ ), a significantly smaller infarct area ( $P < 0.05$ ), and significantly downregulated expression of ES and TSP-1 in the ischemic cortex ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** EA can promote neurological recovery and reduce the infarct area in rats with FCI, possibly by down-regulating the expression of angiogenesis inhibitors ES and TSP-1.

**[Key words]** Electroacupuncture; Focal cerebral ischemia; Endostatin; Thrombospondin-1