针刺对脑出血急性期大鼠脑损伤保护作用及机制研究*

孙 姬[1]，周 勤[2]，黄菲菲[1]，沈 君[1]，周 红[1△]
（1. 上海交通大学医学院附属第九人民医院神经内科，上海 201999；
2. 上海市江湾医院中医针灸科，上海 200434）

摘要：目的 探讨针刺对脑出血急性期大鼠脑损伤的保护作用及机制。**方法** 选取健康 Wistar 大鼠 120 只，制备脑出血模型后随机分为 3 组，模型组 40 只大鼠不予以干预，对照组 40 只大鼠予以西药干预，实验组 40 只大鼠予以针刺者，观察 3 组大鼠脑水含量、胶质细胞源性神经营养因子（GDNFmRNA）阳性表达、基质金属蛋白酶-9（MMP-9）及水孔蛋白-4（AQP-4）阳性细胞数量。**结果** （1）干预后 1d、2d、3d、7d，实验组脑水含量分别是（72.12±1.21）%、（73.01±2.32）%、（75.42±0.29）%、（62.35±0.56）%，较对照组（76.32±2.21）%、（78.02±1.92）%、（80.98±0.65）%、（65.24±0.68）%及模型组的（79.02±2.14）%、（81.23±2.19）%、（83.21±0.78）%及（68.01±0.82）%少，差异均有统计学意义（F=5.831、6.521、5.065、4.986；P=0.027、0.025、0.031、0.033）。（2）干预后 6h、1d、2d、3d、7d，实验组 GDNFmRNA 表达分别是（117.18±2.42）、（141.12±2.25）、（102.01±1.32）、（97.46±1.29）、（96.35±0.56），较模型组（90.35±3.54）、（120.02±2.14）、（97.23±2.16）、（79.21±0.75）、（55.01±0.82）及对照组的（91.32±3.22）、（122.32±3.23）、（98.02±2.92）、（80.01±0.62）与（56.24±0.68）多，且实验组 MMP-9 阳性细胞数分别是（23.21±2.31）、（27.82±3.69）、（37.42±4.02）、（22.28±2.75）、（9.97±0.86），AQP-4 阳性细胞数分别是（48.21±1.31）、（53.82±2.69）、（63.42±4.02）、（65.28±2.75）、（44.97±0.86），均较模型组、对照组少，差异均有统计学意义（F=7.631、7.931、8.521、6.065、6.312、5.631、5.931、4.521、5.065、5.312；P=0.023、0.019、0.013、0.038、0.037、0.035、0.033、0.039、0.041、0.040）。**结论** 针刺可通过减轻脑水肿，促进 GDNFmRNA 表达，抑制 MMP-9 与 AQP-4 表达达到保护急性脑出血大鼠脑损伤保护的作用。

关键词： 脑出血；大鼠；脑损伤；针刺；保护作用；机制
中图分类号： R245 **文献标志码：** A **文章编号：** 1000-2723(2017)06-0014-04
DOI： 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2017.06.004

脑出血指的是非外伤性原发性脑实质出血，急性期病死率可到 30.0%~40.0%，脑出血发生后，可迅速引发血肿占位效应，对周围脑组织造成损伤，致使神经细胞死亡、脑疝等发生，进而导致患者死亡[1-2]。针刺是中医常用治疗方式之一，近年来逐渐被应用于急性期脑出血患者治疗中，可发挥减轻脑水肿、抑制炎性反应等作用，达到保护脑组织的效果[3-4]。本研究旨在进一步探讨针刺对急性脑出血大鼠脑组织的保护作用与机制，现报道如下。

1 材料及方法

1.1 实验材料

（1）实验动物。选取 120 只健康 Wistar 大鼠，均为雄性，体质量（350.21±20.33）g，购自上海实验动物研究中心，适应性饲养 7d。

（2）设备与仪器。YY0088-92 型微量注射器购自宁波镇江三爱仪器厂；BMJ-1 型生物组织包埋机、TSJ-1 型自动脱水机、LEICA RM 型石蜡切片机、烤片机与展片机均购自天津航空机电公司；病理图像分析系统由厦门麦克奥迪实验集团有限公司提供。DFN 原位杂交试剂盒（MK1613）、MMP-9 免疫组化试剂盒（MK2181）、VEGF 免疫组化试剂盒（MK1142h）均购自武汉博士德生物有限公司；DAB 显色试剂盒

* 基金项目：上海市浦东新区卫生系统重点学科群建设项目（PWZxq2015-14）
收稿日期：2017-12-09
作者简介：孙姬（1977-）女，上海人，硕士，主治医师，研究方向：脑血管病的临床基础研究。
△通信作者：周红，E-mail：1324769313@qq.com

均购自京中杉金桥生物有限公司；多聚甲醛、戊二醛、氯化钠均购自天津市博迪化工有限公司；茴拉西坦购自山西亚宝药业集团有限公司。

1.2　方法

1.2.1　模型制备

依据谢巍[5]等研究方法制备模型：予以大鼠腹腔麻醉，取仰卧位于立体定位仪上固定，确保其前卤区、后卤区处于同一水平面，于头皮正中实施消毒处理后作 1cm 的切口，对骨膜实施剥离，使前卤、冠状缝暴露，于前卤点由 3.5mm、后 0.2mm 钻圆孔，直径 1mm，至硬脑膜表面。对尾部实施消毒处理，于距尾端 3cm 处剪断，取 50.0μL 血液，注入尾壳核，注射速度为 25.0μL/min，留针 2min，并缓慢出针，包扎鼠尾，缝合头皮。

1.2.2　分组与干预

120 只大鼠造模后全部成活，造模成功后立即随机将其分为 3 组：模型组 40 只，不予以干预；对照组 40 只予以茴拉西坦（剂量：1.0mL）灌胃；实验组 40 只予以针刺：即对大鼠进行捆绑固定，以 28 号 1 寸的毫针对百会透曲鬓穴实施针刺，进针 0.8 寸，进行 0.5h 的留针，期间行 3 次捻转，5min/次，捻转速度为 200 转/min。

1.2.3　实验结果测定

（1）脑水含量测定。各组分别于干预后 6h、1d、2d、3d、7d 随机选取 4 只大鼠（每组共 20 只），断头取脑，测定脑水含量。将取出的脑组织置入 200mL 生理盐水浸润的培养皿中，对软脑膜、凝血块进行清除，测定其湿重，烘干处理后测定干重。脑含水量=（湿重－干重）/湿重×100%[6]。

（2）免疫组化检测。其余大鼠分别于 6h、1d、2d、3d、7d 采集标本，常规制备石蜡切片。①GDNFmRNA 表达情况测定。取石蜡切片，常规行玻片、脱蜡至水处理，并展开阻断内源性过氧化物酶处理，通过 PBS 液冲洗 2 次，5min/次，将 3%经柠檬酸稀释胃蛋白酶滴至切片，于 37℃环境中反应 10min，分别以 PBS 液冲洗 3 次，蒸馏水冲洗 1 次，以 1%多聚甲醛/0.1MPB 进行固定，行预杂交、杂交处理，依次洗涤、封闭，展开 DAB 显色处理，封片，于显微镜下观察。②MMP－9、AQP－4 阳性细胞数量测定。常规对切片实施脱蜡至水、阻断内源性过氧化物酶处理，于 0.02mL 枸缘酸盐缓冲液中浸入切片，行热抗原修复处理，冷却并冲洗后加入 PBS 液封闭，分别加入一抗、二抗，实施 DAB 显色，于病理图像分析系统下进行观察。

1.3　统计学分析

研究涉及数据行统计分析前均通过 Kolmogorov－Smirnov 展开检验，以四格表、PXC 表卡方检验对分类资料进行统计，对于数量较低的指标，通过 Fisher 实施检验。以 t 对定量资料实施检验，若方差不齐，予以校正 t 检验，水平因素较多时通过 F 进行检验，组间多重对比通过 S－N－K 进行检验，通过 SPSS21.0 软件展开数据分析工作，结果显示 $P<0.05$，差异有统计学意义。

2　结果

2.1　对比 3 组脑水含量

干预后 6h，3 组脑水含量比较差异无统计学意义（$P>0.05$），干预后 1d、2d、3d、7d，实验组脑水含量均较模型组、对照组少，差异有统计学意义（$P<0.05$）；对照组脑水含量较模型组少，差异有统计学意义（$P<0.05$），见表 1。

2.2　对比 3 组 GDNFmRNA 表达情况

干预后，实验组 GDNFmRNA 阳性表达较模型组、对照组多，差异有统计学意义（$P<0.05$），模型组与对照组 GDNFmRNA 阳性表达比较差异无统计学意义（$P>0.05$），见表 2。

表 1　3 组脑水含量对比（$\bar{x}\pm s$，$n=4$，%）

组别	6h	1d	2d	3d	7d
模型组	67.86±0.32	79.02±2.14	81.23±2.19	83.21±0.78	68.01±0.82
对照组	68.21±0.22	76.32±2.21[a]	78.02±1.92[a]	80.98±0.65[a]	65.24±0.68[a]
实验组	68.18±0.42	72.12±1.21[bc]	73.01±2.32[bc]	75.42±0.29[bc]	62.35±0.56[bc]
F	1.631	5.831	6.521	5.065	4.986
P	0.281	0.027	0.025	0.031	0.033

注：对照组与模型组比较，[a]$P<0.05$；实验组与模型组组比较，[b]$P<0.05$；实验组与对照组比较，[c]$P<0.05$

表 2　3 组 GDNFmRNA 表达情况（$\bar{x}\pm s$，$n=36$）

组别	6h	1d	2d	3d	7d
模型组	90.35±3.54	120.02±2.14	97.23±2.16	79.21±0.75	55.01±0.82
对照组	91.32±3.22	122.32±3.23	98.02±2.92	80.01±0.62	56.24±0.68
实验组	117.18±2.42*#	141.12±2.25*#	102.01±1.32*#	97.46±1.29	96.35±0.56*#
F	6.631	6.931	4.521	4.065	4.312
P	0.028	0.026	0.034	0.036	0.038

注：与模型组比较，*$P<0.05$；与对照组比较，#$P<0.05$

2.3　对比 3 组 MMP-9 阳性细胞数量

干预后，实验组 MMP-9 阳性细胞数均较模型组、对照组少，差异有统计学意义（$P<0.05$），且对照组 MMP-9 阳性细胞数较模型组少，差异有统计学意义（$P<0.05$），见表 3。

2.4　对比 3 组 AQP-4 阳性细胞表达情况

干预后，实验组 AQP-4 阳性细胞数均较模型组、对照组少，差异有统计学意义（$P<0.05$），且对照组 AQP-4 阳性细胞数较模型组少，差异有统计学意义（$P<0.05$），见表 4。

表 3　3 组 MMP-9 阳性细胞数量表达情况（$\bar{x}\pm s$，$n=40$）

组别	6h	1d	2d	3d	7d
模型组	35.52±2.72	60.21±6.73	87.62±2.02	65.21±2.27	28.92±3.21
对照组	31.32±2.34①	41.23±2.35①	55.21±6.82①	29.01±2.41①	14.03±2.16①
实验组	23.21±2.31②③	27.82±3.69②③	37.42±4.02②③	22.28±2.75②③	9.97±0.86②③
F	7.631	7.931	8.521	6.065	6.312
P	0.023	0.019	0.013	0.038	0.037

注：对照组与模型组比较，①$P<0.05$；实验组与模型组比较，②$P<0.05$；实验组与对照组比较，③$P<0.05$

表 4　3 组 AQP-4 阳性细胞表达情况比较（$\bar{x}\pm s$，$n=40$）

组别	6h	1d	2d	3d	7d
模型组	55.52±1.72	71.21±2.73	86.62±4.32	92.21±3.27	53.92±3.21
对照组	51.32±1.34[d]	68.23±2.35[d]	79.21±5.82[d]	89.01±3.41[d]	50.03±2.16[d]
实验组	48.21±1.31[ef]	53.82±2.69[ef]	63.42±4.02[ef]	65.28±2.75[ef]	44.97±0.86[ef]
F	5.631	5.931	4.521	5.065	5.312
P	0.035	0.033	0.039	0.041	0.040

注：对照组与模型组比较，[d]$P<0.05$；实验组与模型组比较，[e]$P<0.05$；实验组与对照组比较，[f]$P<0.05$

3　讨论

脑出血是一种常见的脑血管疾病，在中医学中隶属“卒中”“中风”等范畴，该病起病急、病情变化迅速[7-8]。脑出血出现后，血肿产生的代谢产物存在化学刺激性，且可对周围组织产生压迫，使周围脑组织发生缺血、缺氧性损伤，增强脑血管内皮的吞饮作用，引发脑水肿，致使患者脑组织受损[9-10]。因此，对于急性期脑出血患者，及时减轻脑水肿的治疗极为关键。大量临床研究证实，对急性期脑出血患者实施针刺，可有效缓解脑水肿，达到保护脑组织的效果[11-12]。

本次研究以脑出血急性期大鼠为对象，探讨针刺对其脑组织的保护作用，结果表明，针刺在急性期脑出血大鼠中有多方面作用：①减少脑含水量；②提升 GDNFmRNA 表达水平；③抑制 MMP-9 与 AQP-4 表达水平。本次研究结果显示，干预后：①实验组脑水含量较对照组、模型组少（$P<0.05$）；实验组 GDNFmRNA 阳性表达较模型组、对照组多（$P<0.05$）；②实验组 MMP-9、AQP-4 阳性细胞数量均较模型组、对照组少（$P<0.05$）。提示针刺“百会透曲鬓”可减轻急性期脑出血大鼠脑含水量，其机制主要为促进

GDNFmRNA 表达、抑制 MMP－9、AQP－4 表达。

GDNF 是一种神经营养因子，可对内源性基因表达产生促进作用，提升组织抗损伤的能力，并促进神经元的自我保护[13－14]。予以急性期脑出血大鼠针刺后，针刺对神经胶质细胞产生促进作用，使其对 GDNF 的分泌与合成增多，提升 GDNFmRNA 表达水平，对血肿周围神经元的营养环境进行改善，使神经元能够存活，进而达到保护脑组织的效果。MMP－9 属于一种中性蛋白酶，在出血性脑血管损伤性疾病中有所参与。脑出血发生后，血肿周围毛细血管内皮细胞 MMP－9 增多，而针刺可对其分泌与合成产生抑制作用，使 MMP－9 表达水平降低[15－16]。不仅如此，针刺还能够对 MMP－9 活性产生抑制作用，使中性粒细胞、氧化应激产物释放减少，从而达到抑制脑损伤的效果。AQP－4 是一种水通道蛋白，在脑出血大鼠水肿侧可见高表达，而针刺能对 AQP－4 产生抑制作用，使 AQP－4 合成减少、活性下降，阻断 AQP－4 参与血管源性脑水肿的通路，达到脑保护作用[17－18]。

综上，针刺可减轻急性脑出血大鼠脑水肿，达到脑保护的作用，其机制促进 GDNFmRNA 表达，抑制 AQP－4、MMP－9 表达。但本次研究所选大鼠样本较少，且未进行长期观察，尚需增加样本量、延长观察时间进行研究，以进一步探讨针刺对急性脑出血大鼠脑组织的远期保护作用与机制。

参考文献：

[1] 戴正泽，黎宏斐. 自发性脑出血治疗进展[J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志，2015，28(2)：139－142.

[2] 官念，吴碧华，刘黎明，等. 脑出血病因及相关机制的研究进展[J]. 中华老年心脑血管病杂志，2016，18(6)：670－672.

[3] 周华伟，胡雨华，吴文军. 脑出血中医针刺治疗进展[J]. 山西医药杂志，2015，44(3)：296－298.

[4] 张国威，邹伟，刘芳，等. “百会”透“曲鬓”对急性脑出血大鼠脑组织 MMP－9 表达影响的实验研究[J]. 中国实用医药，2010，5(12)：1－3.

[5] 谢巍，张波，宋世宾，等. 大鼠脑出血后 AQP－4、IL－6 及 MMP－9 的表达与脑水肿的相关性研究[J]. 贵州医药，2015，39(8)：686－690.

[6] 苗笑梅，程世翔，杨震，等. 十二井穴刺络放血联合亚低温治疗对颅脑创伤急性期大鼠脑水肿的影响[J]. 中国应用生理学杂志，2015，31(3)：249－253.

[7] 姜岩，熊杰. 脑出血急性期的中医药治疗概况[J]. 现代中西医结合杂志，2009，18(8)：933－936.

[8] 王峰. 补阳还五汤联合微创颅内血肿清除术治疗高血压性脑出血 38 例疗效观察 [J]. 中医临床研究，2014(5)：83－84.

[9] 宁培云，赵洪勇，赵志超，等. 丹红注射液对实验性脑出血大鼠脑水肿及血浆 MMP－9、TIMP－1、NF－κB 水平的影响[J]. 疑难病杂志，2017，16(8)：821－824.

[10] 赵剑，刘广辉，梁亮，等. 黄芪甲苷对大鼠脑出血后脑水肿及水通道蛋白 4 表达的影响 [J]. 宁夏医科大学学报，2015，37(8)：879－882.

[11] 濮璟楠，师蔚. 脑出血后脑水肿管理专家共识[J]. 实用心脑肺血管病杂志，2017，25(8)：1－6.

[12] 关瑞桥. 针刺“百会”透“曲鬓”对脑出血大鼠血清中 CD62P 的表达影响及相关性的实验研究 [D]. 哈尔滨：黑龙江中医药大学，2016.

[13] 曾志青，刘洪，蒋迪. 神经营养因子受体同源物 2 通过上调 proNGF、sortilin、p75NTR 表达诱导脑出血后血肿周围脑组织细胞凋亡[J]. 细胞与分子免疫学杂志，2015，1(4)：532－536.

[14] 郝文炯，折刚刚，魏健强，等. 神经生长因子制剂辅助血肿清除术对多灶性脑出血患者神经功能恢复的影响[J]. 中国医药导报，2016，13(35)：72－75.

[15] 张彦敏，申翠，邢淑芳，等. 奥拉西坦对高血压脑出血患者血浆 TIMP－1 和 MMP－9 水平的动态影响研究[J]. 河北医药，2015，37(6)：884－886.

[16] 蒋令修，梁宇，陈文武，等. 醒脑静注射液对脑出血患者血浆 MMP－9 及 TIMP－1 的影响 [J]. 中国现代医生，2015，53(35)：5－7.

[17] 李建军，马铁柱，梁晋，等. 凉血通瘀方对大鼠脑出血脑组织含水量及 AQP－4 表达的影响[J]. 实用药物与临床，2015，18(4)：383－386.

[18] 王茜，唐美霞，郑淑美，等. 电颈针干预对急性脑出血大鼠脑组织水通道蛋白 4 表达及脑含水量的影响[J]. 中国中医急症，2016，25(1)：48－50.

（编辑：徐建平）