

电针水沟穴对高血压性脑出血模型大鼠神经元保护作用的动态观察*

★ 冯剑¹ 尤艳利^{1**} 周爽^{1*} 陈宝谨² 李白羽¹ 方凡夫¹ 丁邦友² 袁凌松² (1. 第二军医大学中医系 上海 200433, 2. 上海中医药大学 上海 201203)

摘要:目的:探讨电针水沟穴对急性高血压性脑出血模型大鼠脑组织超微结构的影响。方法:参照胶原酶加肝素脑内尾状核联合注射的方法造模。WKY 大鼠分为 6 h、1 d、3 d、7 d 对照组。受试 SHR 大鼠分为模型 6 h、1 d、3 d、7 d 组;假手术 6 h、1 d、3 d、7 d 组;电针 6 h、1 d、3 d、7 d 治疗组。分别在 6 h、1 d、3 d、7 d 用光镜和电镜观察各组大鼠脑组织结构的变化情况。结果:模型组大鼠 6h 即出现明显的脑组织超微结构改变,模型 1 d 组超微结构病变进一步加重,模型 3 d 组较 1 d 模型组脑组织超微结构病变有所改善,模型 7 d 组超微结构病变与模型 6 h 组相仿。治疗各组与相应模型组比较,大脑皮层神经细胞细胞器肿胀程度减轻,电针 7 d 组,细胞膜结构完整,大部分细胞器结构完整,个别线粒体还存在肿胀,细胞核双层结构,核仁清晰,部分细胞存在异染色质轻微增多现象。结论:电针水沟穴可明显改善高血压性脑出血大鼠脑组织超微结构的损害,这可能是电针水沟穴促进神经功能修复的机制之一。

关键词:电针;水沟穴;脑出血;神经元保护作用

中图分类号:R 245-3 **文献标识码:**A

Dynamic Detection of Neuron Protective Effect of Electroacupuncture at Shuigou on Hypertensive Intracerebral Hemorrhage Model of Rats

FENG Jian¹, YOU Yan-li¹, ZHOU Shuang¹, CHEN Bao-jin², LI Bai-yu², FANG Fan-fu, DING Bang-you², YUAN Ling-song²

1. Department of Traditional Chinese Medicine, Second Military Medical University, Shanghai 200433;

2. Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203

Abstract: Objective: To study the effect of electroacupuncture (EA) at Shuigou (RN 26) on ultrastructure in hypertensive intracerebral hemorrhage (ICH) rats. Methods: Experimental hypertensive ICH model of rats were established by injecting collagenase and heparin into right caudate nucleus of spontaneously hypertensive rats using stereotaxis technique. WKY rats were divided into 6 hours, 1 day, 3 days group and 7 days group after injecting physiological saline into right caudate nucleus, and spontaneously hypertensive rats (SHR) were divided into model groups (6 hours, 1 day, 3 days, 7 days), sham operation groups (6 hours, 1 day, 3 days, 7 days) and the EA groups (6 hours, 1 day, 3 days, 7 days). Electroacupuncture at Shuigou (RN 26) treated EA groups every day. The changes of brain tissue ultrastructure in every group were observed under light and electron microscope at 6 hours, 1 day, 3 days, and 7 days after operation. Results: In model groups, significant change of brain tissue ultrastructure appeared at 6 hours after operation and the lesion aggravate at 1 days. At 3 days, amelioration of the lesion appeared, and at 7 days the lesion became similar to that of 6 hours group. EA group in all time points showed significant improvement in organelle swelling degree of cerebral cortical neurons compared with the model group, and at 7 days the membrane and most of organelles of nerve cells were perfect, and bilayer structure of nucleus were clear. However, some mitochondria swelled, and there were a little mult heterochromatin in some nerve cells. Conclusion: The therapy of electroacupuncture at Shuigou (RN 26) can improve brain tissue ultrastructure in hypertensive ICH model rat, which may be one of

* 基金项目:国家自然科学基金资助(30400608, 30672714),上海市重点学科建设资助(T0302)

** 通讯作者:尤艳利,第二军医大学中医系,上海 200433, E-mail: youyanli2005@yahoo.com.cn; 周爽,第二军医大学中医系,上海 200433, E-mail: zhoushuang8008@163.com

mechanisms of promoting neuronal function restoration.

Key Words: Electroacupuncture; Shuigou (RN 26); Intracerebral Hemorrhage; Neuron Protective Effect

高血压性脑出血 (Intracerebral Hemorrhage, ICH) 是一种全球性急性脑血管疾病, 致死率和致残率均较高, 其治疗方法迄今仍无突破性的进展^[1]。随着我国人口基数的不断增加, 及我国老龄化社会进程加快, 同时由于脑出血发病年龄有日趋年轻化的倾向, 脑出血发病的绝对人数还将不断增加。我们的临床与实验研究表明, 电针水沟等穴对脑出血具有良好的疗效^[2~6]。本研究通过观察电针水沟穴对高血压性脑出血模型大鼠脑组织超微结构的影响, 为临床防治该病提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物 SHR 大鼠、WKY 大鼠, 雄性, (250 ± 20)g, SPF 级, 由中国科学院上海分院动物实验中心提供。所有动物购回后适应性喂养 1 周, 无不良反应, 饮食、饮水正常者, 即纳入实验。

1.2 实验主要试剂与仪器 胶原酶 VII (Collagenase Type VII), Sigma; ZH-蓝星 B 脑立体定位仪, 淮北正华生物仪器设备有限公司; LKB-Navo 超薄切片机, 瑞典; 日立 H-600 型透射电镜, 日本。

1.3 方法

1.3.1 造模方法 参照胶原酶加肝素脑内尾状核联合注射的方法^[7], 注射含有 0.5 U/μl 胶原酶 VII 和 7 U/μl 肝素的生理盐水 1 μl, 在高血压大鼠的基础上建立脑出血大鼠模型。

1.3.2 实验动物处理方法 WKY 6 h、1 d、3 d、7 d 对照组: 每组 2 只, 造模方法除注入尾状核液体为生理盐水外, 余步骤同模型组。模型 6 h、1 d、3 d、7 d 组: 每组 4 只, 受试 SHR 大鼠参照胶原酶加肝素脑内尾状核联合注射的方法造模; 假手术 6 h、1 d、3 d、7 d 组: 每组 4 只, 受试 SHR 大鼠造模方法除注入尾状核液体为生理盐水外, 余步骤同模型组; 电针 6 h、1 d、3 d、7 d 治疗组: 每组 4 只, 受试 SHR 大鼠于造模成功后, 参照华氏等制定的《实验动物穴位图谱》选取水沟穴 (水沟: 唇裂鼻尖下 1 mm 正中处, 向上斜刺 1 mm)。水沟穴与右耳根部皮肤接 G6805-II 电针治疗仪, 连续波, 频率 120 次/min, 强度 1 mA, 留针 30 min。即时治疗 1 次, 此后每日治疗 1 次。

1.3.3 电镜和光镜观察 各组分别于术后 6h、1d、3d、7d 应用光镜和电镜进行脑组织的观察。

(1) 光镜下脑组织结构的观察

取病灶侧 (假手术组取相对应侧) 脑组织置于

10% 中性甲醛溶液中固定, 经梯度酒精序列脱水、浸蜡、石蜡包埋, 切 5 μm 片, HE 染色, 光学显微镜下观察皮层组织形态学改变。

(2) 电镜下脑组织超微结构的观察

取出新鲜脑组织, 在冰盘上迅速剥离血肿周围皮层组织 (正常组取相对应侧), 取组织约 1 mm × 1 mm × 1 mm, 迅速置于 2% 戊二醛外固定 24h, 用 PBS 反复冲洗后, 用 1% 锇酸固定。然后用 50%、70%、90%、100% 乙醇 20 min 各 2 次, 100% 丙酮 (1:1) 5 min 2 次, Epon812 和丙酮 (2:1) 预渗透 1.5 h, 纯 Epon812 渗透过夜, Epon812 包埋, 65 °C 48 h 聚合, 超薄切片, 醋酸铀及柠檬酸铅双重染色, 日立 H-600 透射电镜观察。

2 实验结果

2.1 光镜观察脑出血周围区组织形态学改变

假手术组可见穿刺区周围有少许点状出血, 脑组织结构基本正常, 与 WKY 组无差异。模型 6h 组, 脑组织中可见大片出血灶及点状出血, 神经元细胞核稀疏, 胞浆液化, 细胞间质轻度水肿。模型 1 d 组, 在出血周围区可见坏死的神经元, 细胞之间及小血管周围间隙明显增大, 细胞间质严重水肿。模型 3 d 组, 出血灶周围毛细血管增生, 神经细胞周围可见较多炎性细胞浸润, 存在少量胶质细胞。模型 7 d 组, 其病理改变与 6 h 组相近, 其病理损伤已明显好转, 见较多胶质细胞增生。电针 6 h 组, 神经元周围仍有轻度水肿, 但毛细血管数量较模型 6 h 组增多。电针 1 d 组, 神经元结构有所恢复, 细胞间质水肿较模型 1 d 组明显减轻, 毛细血管呈增多趋势。电针 3 d 组, 神经元结构基本恢复, 细胞间质水肿明显减轻, 呈轻微水肿, 存在大量的炎性细胞, 毛细血管数量明显增多。电针 7 d 组与模型 7 d 组相比, 明显改善, 且优于 3 d 电针组, 但仍未能恢复如正常组的结构状态。

2.2 电镜观察各组大鼠脑组织超微结构的改变

WKY 组大鼠大脑皮层神经细胞轮廓清晰, 双层结构清晰。胞浆中可见大量结构完整、清晰的细胞器, 如线粒体、高尔基复合体、粗面内质网、核糖体、溶酶体等。细胞核呈圆形或卵圆形, 核膜完整、双层结构清晰, 核仁清晰, 染色质分布均匀, 以常染色质为主。星型胶质细胞的细胞核椭圆形, 核膜平滑呈两层, 胞质内细胞器较少, 可见形态正常的线粒体与粗面内质网; 假手术组大鼠大脑皮层神经细胞超微

结构与对照组基本相同。模型 6 h 组大鼠大脑皮层神经细胞膜双层结构欠清楚,胞浆中线粒体肿胀,内嵴部分缺失,基质清淡,部分粗面内质网脱颗粒,细胞核膜完整但双层结构欠清晰,核仁清晰,异染色质增多。血肿周围的星形胶质细胞的细胞核形态不规则,核膜模糊不清,部分呈断裂病变,核内染色质重度凝聚,胞浆大部分空化,仅存固缩的线粒体与细胞器碎片漂浮其中;模型 1 d 组大鼠大脑皮层神经细胞膜不清晰,胞浆电子密度增高,线粒体肿胀明显,内嵴紊乱或缺失,基质清淡,细胞核固缩,电子密度增高,异染色质增多,凝集成块。星形胶质细胞受累区域逐渐扩大,出现小胶质细胞的增生,激活形成巨噬细胞(即格子细胞);模型 3 d 组大鼠大脑皮层神经细胞大部分细胞器结构不清,线粒体肿胀,呈空泡样改变,细胞核固缩,电子密度增高,异染色质增多,并出现边聚现象。星形胶质细胞出现反应性增生、肥大,巨噬细胞在血肿周围聚集,少数吞噬了含铁血黄素;模型 7 d 组大鼠大脑皮层神经细胞膜不清晰,胞浆电子密度增高,细胞器肿胀,细胞核异染色质增多,凝集成块,并出现边聚现象,胶质细胞呈扩张状态,结构损伤有所改善。治疗各组与相应模型组比较,大脑皮层神经细胞细胞器肿胀程度减轻,至治疗 7 d 组,细胞膜结构完整,大部分细胞器结构完整,个别线粒体还存在肿胀,但膜结构清晰,细胞核双层结构,核仁清晰,部分细胞存在异染色质轻微增多现象。

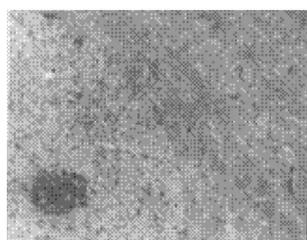


图1 WKY对照组
(×10000)

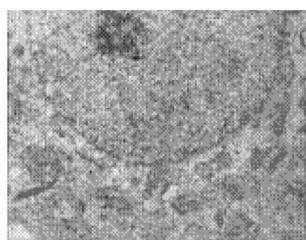


图2 假手术组
(×10000)

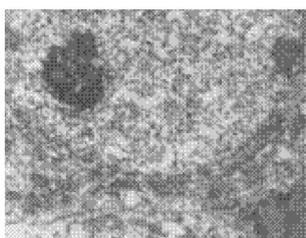


图3 模型6h组
(×10000)

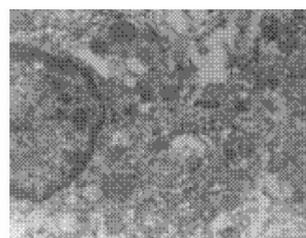


图4 模型1d组
(×10000)

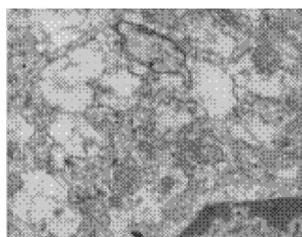


图5 模型3d组
(×10000)

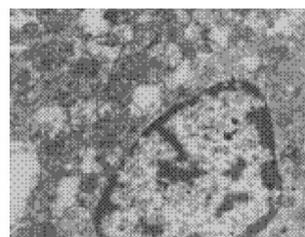


图6 模型7d组
(×10000)

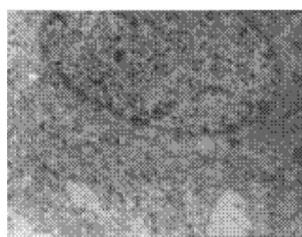


图7 治疗6h组
(×10000)

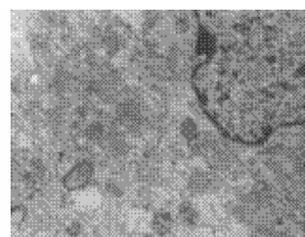


图8 治疗1d组
(×10000)

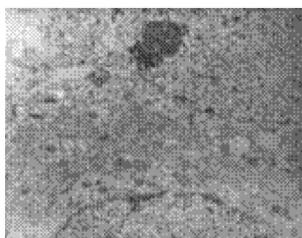


图9 治疗3d组
(×10000)

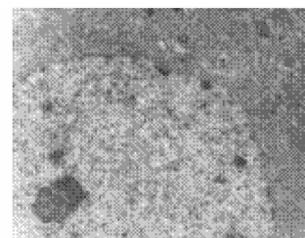


图10 治疗7d组
(×10000)

3 讨论与结论

高血压性脑出血是临床上最为常见的一种脑血管疾病,根据其临床表现一般可归属于中医学“中风”的范畴。其主要病因在于患者平素气血亏虚,心、肝、肾三脏阴阳失调,加之忧思恼怒,或饮酒饱食,或房事劳累,或外邪侵袭等诱因触发,肝阳暴张,血随气逆,挟痰挟火,横窜经络,蒙蔽清窍而发病。病属本虚标实,在急性发病期以内风、痰浊、瘀血、邪热等标实证候为突出。

高血压是脑出血的重要独立危险因素之一^[8],脑出血伴血压升高时,预后往往不良。SHR 大鼠是自发性高血压大鼠,是目前研究高血压疾病常用的模型大鼠^[9]。在自发性高血压 SHR 大鼠的基础上注射胶原酶诱导的急性高血压性脑出血模型,组织病变从血肿到包裹形成,脑水肿的程度以及其后的修复过程,均较接近人类脑出血。并且病灶部位大小易于标准化,能连续地进行生化、病理和药物疗效过程的观察,是一种较理想的人类脑出血模型^[10]。本研究结果显示,模型组大鼠出现明显的脑组织超微结构改变,表明本研究的造模十分成功,胶原酶诱导的脑出血模型持续时间较长,血肿有自然吸收趋

势,较好地再现了脑出血的病理过程。

水沟穴位于颜面中部、口鼻之间,根据中医学经络腧穴理论,水沟穴为督脉、手、足阳明经之会,是醒神急救之要穴。从现代神经解剖学和生理学来看,水沟穴位于三叉神经的上颌支眶下神经及颈交感神经支配区内,可通过三叉神经、颈交感神经途径调节脑血管功能。水沟穴因其独特的部位及与督脉、阳明经特殊的关系,成为治疗脑部病变的主要穴位。电针“水沟”穴能通过促进神经肽 Y 和降钙素基因相关肽的平衡作用^[11],改善脑出血后脑血管的舒缩功能紊乱。据古代文献记载及现代针灸临床实践表明,水沟穴是治疗中风病常用穴位。我们前期的研究工作亦证实以水沟等为主穴,治疗高血压性脑出血急性期临床疗效良好,可以有效地减轻脑出血后脑水肿程度,改善脑出血的临床症状和体征,促进机能恢复,缩短病程,降低致死致残率。本研究结果表明,电针水沟穴可以显著改善高血压性脑出血模型大鼠脑出血后脑组织的结构,促进神经细胞的恢复。

脑组织中神经细胞的变化是神经病理学研究的主要对象。脑出血时由于血肿的直接压迫以及血管活性物质等的释放^[12~14],可导致血管周边神经细胞直接受损。本实验结果显示高血压性脑出血大鼠脑细胞水肿明显,部分神经细胞变性,超微结构出现细胞浓缩、致密,线粒体肿胀,甚至空化,细胞核固缩,电子密度增高,异染色质增多,凝集成块等病理变化。电针治疗后,高血压性脑出血大鼠神经细胞的病理结构明显改善,这将为今后该病的防治提供重要的理论依据。

参考文献

[1]唐宇平,蔡定芳.急性脑出血损伤的病理生理学机制[J].国外医学·脑血管疾病分册,2005,13(1):11-15.

[2]方邦江,周爽,王升旭,等.急性脑出血患者针刺治疗前后血 TNF-

a,NSE 水平变化的观察[J].新中医,2002,34(12):44-45.

[3]周爽,方邦江,王升旭,等.针刺水沟、内关、足三里为主治疗出血性中风急性期的临床观察[J].湖北中医杂志,2002,24(10):6-7.

[4]Zhou Shuang, Fang Bangjiang, Sun Guojie. Effect of Acupuncture on Neurological Defects and Daily Life Ability in Patients with Acute Cerebral Hemorrhage[J]. World J Acu-mox,2003,13(4):19-22.

[5]周爽,方邦江,黄建华.电针对高血压性脑出血大鼠海马 Gi2α、Gi3α 基因转录的影响[J].中国中医基础医学杂志,2005,11(6):437-439.

[6]周爽,徐佳,黄建华.电针对大鼠高血压性脑出血血肿周围组织 NF-κB TNF-α 表达的影响[J].中医药学刊,2005,23(6):985-986.

[7]任泽光,吴建中.大鼠脑出血模型[J].中华神经外科杂志,1993,9(4):205-206.

[8]Smajlovic D, Salihovic D, C Ibrahimagic O. Analysis of risk factors, localization and 30-day prognosis of intracerebral hemorrhage [J]. Bosn J Basic Med Sci,2008,8(2):121-125.

[9]Chen X, Patel K, Connors SG, et al. Acute antihypertensive action of Tempol in the spontaneously hypertensive rat [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol,2007,293(6):H3246-3253.

[10]王永炎.今日中医内科[M].北京:人民卫生出版社,2000:63.

[11]杜艳军,孙国杰,王述菊,等.电针水沟对脑出血大鼠脑血管神经调节物质影响的实验研究[J].针刺研究,2007,32(6):373-376.

[12]Schellinger PD, Fiebich JB, Hoffmann K, et al. Stroke MRI in intracerebral hemorrhage: is there a perihemorrhagic penumbra? [J] Stroke. 2003,34(7):1674-1679.

[13]Qureshi AI, Suri MF, Ostrow PT, et al. Apoptosis as a form of cell death in intracerebral hemorrhage [J]. Neurosurgery,2003,52:1041-1047.

[14]Teemstra OP, Evers SM, Lodder J, et al. Stereotactic treatment of intracerebral hematoma by means of a plasminogen activator: a multicenter randomized controlled trial (SICHPA) [J]. Stroke,2003,34:968-974.

(收稿日期:2008-11-19)

《江西中医药》征订启事

《江西中医药》创刊于1951年,是新中国创办最早的中医药杂志,也是第一批进入中文核心期刊的中国医药类核心期刊,并被多家知名权威检索期刊及数据库确定为固定信息源。五十多年来,《江西中医药》发表了数以万计的优秀论文,一大批中医药学者就是从这里走向成功、走向成名的。21世纪,《江西中医药》迎来了更大的发展机遇,2002年评为华东地区优秀期刊、江西省优秀期刊,2004年评为全国高校优秀期刊。2003年成功改为月刊,赢得了更多读者的青睐。本着“面向临床,面向基层,坚持传统,注重实用”的办刊思路,我们进一步充实内容,调整栏目,使文章更具可读性、实用性、信息性,以满足读者的需要。

《江西中医药》(ISSN 0411-9584,CN 36-1095/R)为月刊,国内外公开发行。国内邮发代号为44-5,国外代号为BM1012。每期定价:4.80元。

