

·基础研究·

头穴丛刺对脑梗死大鼠脑内 MMP-9 变化的影响

邹伟¹ 冯秀娟² 朱春燕²

摘要 目的:通过观察头穴丛刺对脑梗死大鼠梗死灶周围基质金属蛋白酶-9(MMP-9)变化的影响,探讨头穴丛刺治疗脑梗死的作用机制。**方法:**将雄性 Wistar 大鼠 60 只随机分为模型组、头穴丛刺组各 25 只,假手术组 10 只,右颈内动脉插入线栓法建立大鼠大脑中动脉闭塞(MCAO)模型。参照 Bederson 评分标准,每组于术后第 24 小时、第 3 天、第 7 天、第 14 天、第 21 天各时间点进行行为学评分。**结果:**头穴丛刺组治疗第 7 天、第 14 天、第 21 天,大鼠的行为学评分较术后第 24 小时、第 3 天有较大改善,并明显优于模型组($P<0.05$)。头穴丛刺组及模型组在术后第 24 小时、第 3 天梗死灶周围 MMP-9 阳性细胞明显增多,第 7 天后均回落,在上述三个时间点比较,头穴丛刺组 MMP-9 表达水平低于模型组,两组比较有显著性意义($P<0.01$)。平均光密度值的比较与 MMP-9 阳性细胞数比较在头穴丛刺组和模型组间呈明显正相关。**结论:**头穴丛刺可明显改善脑梗死大鼠的神经功能,其机制可能是头穴丛刺降低早期梗死灶周围 MMP-9 的表达,从而减轻脑梗死早期血管源性脑水肿及脑组织的炎症损伤。

关键词 头穴丛刺;脑梗死;基质金属蛋白酶-9;大鼠

中图分类号:R743.3,R493 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2009)-02-0146-04

The effect of scalp clustery acupuncture on MMP-9 in rats with cerebral infarction/ZOU Wei, FENG Xiujuan, ZHU Chunyan//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2009, 24(2):146—149

Abstract Objective:To investigate the effect of scalp clustery acupuncture on matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in rats after cerebral infarction, and to explore the mechanism of scalp clustery acupuncture on cerebral infarction damage. **Method:** Sixty male Wistar rats were randomly divided into the scalp clustery acupuncture group (25 rats), the model group (25 rats) and the sham group (10 rats). The animal model was made by blocking middle cerebral artery. Behavior scores of each group were recorded on the 1st, 3rd, 7th, 14th, and 21st days after operation. **Result:** Behavior scores on the 7th, 14th, and 21st d in scalp cluster acupuncture group were much better than those on the 1st, 3rd d, and were much better than model group ($P<0.05$). MMP-9 positive cells around the cerebral infarction focus significantly increased on the 1st, 3rd d both in scalp cluster acupuncture group and model group and both decreased on the 7th d. The expression of MMP-9 in scalp clustery acupuncture group were lower than that in model group, and there was statistical difference between two groups ($P<0.05$). MMP-9 positive cells became declining on the 14th and 21st d and there was no statistical difference between scalp clustery acupuncture group and model group ($P>0.05$). **Conclusion:** The scalp clustery acupuncture can significantly improve neural functions in rats with cerebral infarction. Its mechanism may be reducing the early expression of MMP-9 around the cerebral infarction focus and decreasing the cerebral neural cells damage caused by inflammation and edema.

Author's address The Affiliated Hospital of Heilongjiang University of Traditional Medicine, Harbin, 150040

Key words scalp cluster acupuncture; cerebral infarction; matrix metalloproteinase-9; rats

于致顺教授创立的头穴丛刺法治疗脑源性疾病疗效显著,尤其是对脑梗死的治疗受到愈来愈广泛的关注^[1]。长期的临床及实验研究表明:头穴丛刺可以加速神经功能障碍的恢复、缩短患者住院时间、节省住院费用、减低患者的致残率^[2-3]。为了进一步探讨其作用机制,本实验动态观察了头穴丛刺对脑梗死大鼠梗死灶周围细胞基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)表达的影响,以期能为头穴丛刺在临床的普遍应用提供充分的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

健康雄性清洁级 Wistar 大鼠 60 只,体重 220—280g,由黑龙江中医药大学及哈尔滨医科大学动物实验中心提供。随机分为 3 组,模型组 25 只,头穴丛刺组 25 只,假手术组 10 只。

1.2 主要仪器及试剂

光学显微镜 (OLYMPUS CX21FS1); 32 号 0.5

1 黑龙江中医药大学附属第一医院,哈尔滨,150040

2 黑龙江中医药大学研究生

作者简介:邹伟,男,博士后,博士生导师,主任医师

收稿日期:2008-05-15

寸毫针(苏州华佗牌);鼠抗人MMP-9单克隆抗体,SP试剂盒,DAB(福州迈新生物技术有限公司);苏木素染液,伊红染液。

1.3 动物模型制备

1.3.1 栓线处理:选用直径为0.200mm的强力钓鱼线,剪成长为30mm的栓线,线前端经酒精灯处理成光滑圆球形,直径约0.235mm,在手术显微镜下观察其形态、大小,不合格者剔除。

1.3.2 手术操作:大鼠称重后,参照改良的Zea Longa法^[4],10%水合氯醛(0.3ml/100g)腹腔麻醉,颈部正中切口,钝性分离右颈总动脉(RCCA)、右颈内动脉(RICA)及右颈外动脉(RECA),结扎RECA及RCCA近心端,并与RCCA远心端备线,RICA远端用微动脉夹夹闭。RCCA近分叉处切口,插入栓线,收紧备线,打开动脉夹,将栓线轻柔推入RICA。当线进入17—21mm时,可感到手下有阻力感,证明栓线头端已达MCA处,进线至大脑前动脉近端,阻断MCA的所有血液来源。扎紧备线,剪断过长栓线,全层缝合皮肤。假手术组只结扎右颈总动脉和颈外动脉,颈内动脉中不插入栓线,余步骤相同。

1.4 模型制作成功标准

大鼠麻醉清醒,参照Bederson等^[5]方法,进行神经功能缺损评分。

评分标准: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:向左侧转圈呈追尾状;4分:意识障碍,无自主行走。评分在2—3分者评定为造模成功并纳入为研究对象。术后评分不合格及未存活至取材时间点的大鼠不计入。随时补充模型动物以保证每组25只。

1.5 头穴丛刺方法

大鼠脑缺血2h后开始头穴丛刺法治疗。将大鼠头部固定,头顶部剪毛、消毒。采用于致顺头部腧穴七区划分法,取顶区,百会穴及百会穴左、右侧各旁开4mm处,以32号0.5寸毫针三根分别向前刺入,针体与皮肤呈15°,刺入深度约10mm,留针30min,每日1次,治疗6d,休息1天。模型组及假手术组不以任何治疗。

1.6 检测指标与方法

1.6.1 大鼠行为学评分:每组于术后第24小时、第3天、第7天、第14天、第21天行行为学评分。

1.6.2 病理形态学观察:每组于术后第24小时、第3天、第7天、第14天、第21天行为学评分后,头穴丛刺组和模型组各随机取5只,假手术组随机取2只大鼠,灌注后取脑组织,固定、浸蜡、包埋、石蜡切片,HE染色,光镜下观察细胞形态变化。

1.6.3 梗死灶周围细胞MMP-9的表达:免疫组化方法观察每个时间点梗死灶周围MMP-9表达。

1.7 免疫组化染色结果的评定标准及结果分析

本研究中采用DAB显色系统,阳性对照结果显示抗体阳性表达均为细胞浆染色呈棕黄色。每张组织切片在缺血侧随机选5个不重复视野,100倍镜下观察,400倍下计数MMP-9阳性细胞数。数码照相机拍照后输入BI-2000图像分析系统,进行平均光密度值测定。阳性细胞个数越多,平均光密度值越大,提示免疫反应越强。

1.8 统计学分析

应用SPSS 13.0统计软件进行统计学处理,计量资料数据以均数±标准差表示。两组计量资料间比较采用独立样本*t*检验。

2 结果

2.1 大鼠行为学评分

头穴丛刺组和模型组组内比较均在术后第1天、第3天神神经缺损评分最差,第7天以后症状逐步改善。头穴丛刺组治疗7d、14d、21d后,大鼠的行为学评分较术后第24小时、第3天有较大改善,并明显优于模型组($P<0.05$)。假手术组评分均为0分。见表1。

2.2 病理组织形态学观察

各时间点比较头穴丛刺组细胞数目较模型组明显增多。

2.3 梗死灶周围细胞MMP-9的表达

头穴丛刺组及模型组在术后第24小时梗死灶周边MMP-9表达开始增高,第3天达高峰,第7天后均回落,在上述三个时间点,模型组MMP-9表达高于头穴丛刺组,两组比较有显著性意义($P<0.01$)。第14天、第21天两组MMP-9表达明显下降,两组比较无显著性意义($P>0.05$)。术后第24小时、第3天、第7天头穴丛刺组与模型组MMP-9阳性细胞数均高于相同时间点假手术组($P<0.01$)。见表2。不同时间点平均光密度值比较见表3。

表1 行为学评分比较 ($\bar{x}\pm s$,分)

组别	第24小时	第3天	第7天	第14天	第21天
模型组	3.0±0.71	2.8±0.45	2.4±0.55	2.0±0.71	1.6±0.55
头穴丛刺组	2.8±0.84	2.6±0.55	1.6±0.55 ^①	1.0±0.71 ^①	0.4±0.55 ^①

①与模型组比较 $P<0.05$

表2 MMP-9阳性细胞数比较 ($\bar{x}\pm s$,个)

组别	第24小时	第3天	第7天	第14天	第21天
模型组	41.81±4.17	55.50±3.57	35.37±5.82	14.06±4.11	12.43±2.38
头穴丛刺组	33.47±5.64 ^①	46.8±4.38 ^①	26.5±4.27 ^①	12.90±3.76	11.10±2.75
假手术组	13.1±2.74	13.0±2.73	11.5±2.10	12.47±2.43	11.79±1.78

①相同时间点三组间比较 $P<0.01$

表3 MMP-9 平均光密度值比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	第24小时	第3天	第7天	第14天	第21天
模型组	0.45±0.034	0.47±0.029	0.39±0.037	0.28±0.053	0.25±0.054
头穴丛刺组	0.37±0.043 ^①	0.41±0.013 ^①	0.33±0.045 ^①	0.26±0.059	0.24±0.045
假手术组	0.24±0.054	0.25±0.046	0.24±0.050	0.24±0.040	0.23±0.027

①相同时间点三组间比较 $P<0.05$

3 讨论

早期康复可以促进脑卒中患者神经功能恢复,已引起临床神经病学家和康复治疗家的重视并取得了很大的进展^[6]。早期针刺治疗提高脑卒中的疗效是肯定的,并已应用于临床^[7-11]。头穴针刺是在中国传统针灸与现代医学基础上发展形成的,且临床疗效明显优于单纯西医药、中药及单纯体针,因而开始作为一种独立的治疗方法受到了医学界的高度重视,并得以推广。

于致顺教授提出头穴丛刺法^[12],他认为针刺的即刻效应是针具刺入后,针具本身、针具与组织间的作用、组织被破坏等所产生的物理、化学等变化而产生的“场”,直接作用于大脑皮质及有关部位,改善了这些部位的病理变化。这个“场”不是一个点,也不是一个线,而是一个面,因此它不只作用于针具下的组织,也作用于其周围。根据“场”的理论,结合脑的功能,将头部治疗区划分为顶区、顶前区、额区、枕区、枕下区、颞区、项区。在每个治疗区刺入3—5针,以将病变部位覆盖,此种针法能达到最好的治疗效果,且能减少临床施针的数量,减轻患者疼痛,这就是头穴丛刺法,其临床疗效肯定。顶区是从百会至前顶(或前顶至百会)及其向左、右各1及2寸的平行线,直下有中央前回、中央后回、旁中央小叶及顶上小叶、顶下小叶的一部分。因此头穴丛刺顶区对脑梗死所致的运动障碍、感觉障碍均有良好的促进恢复作用。

MMPs是分解细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的蛋白酶类中最重要的一类,是一组同源的锌依赖性中性蛋白酶,参与胚胎正常发育及组织重塑,并在多种病理过程中发挥作用。MMP-9是MMPs家族成员之一。酶原相对分子质量为92kD,而其活性形式的相对分子质量为83kD,它由角质细胞产生,贮存在中性粒细胞和嗜酸性粒细胞的颗粒中,主要由中性粒细胞和巨噬细胞、上皮细胞等以无活性的酶原分泌^[13-14],在降解其底物前需被激活。激活此酶的蛋白酶为纤溶酶、弗林蛋白酶(furin)等丝氨酸蛋白酶^[15]。研究发现,MMP-9在脑缺血后血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)损伤和血管源性脑水肿的发生中发挥着重要作用^[16]。MMP-9可降解内皮细胞

间紧密连接蛋白组成成分闭锁带蛋白-1(zonulaeoccluden-1)以及IV型胶原、V型胶原、黏结蛋白等血管基底膜成分,从而导致BBB破坏^[17],血管通透性的增加,中性粒细胞、巨噬细胞从受损血管溢出,释放炎症介质^[18]。细胞分泌MMPs的同时也产生金属蛋白酶组织抑制剂(tissue inhibitor of metalloproteinases, TIMPs)。正常情况下,MMPs与TIMPs相互牵制,以复合物的形式调节ECM,ECM保持在一种动态平衡中。

Asahi等^[19]在大鼠脑缺血再灌注模型中发现MMP-9水平升高,RT-PCR测得的MMP-9的mRNA增加,基因敲除大鼠的梗死面积较对照组明显减少,MMP-9抑制剂能明显降低脑梗死的面积。Rosenberg等^[20]发现大鼠大脑中动脉阻塞后MMP-9 12h后显著升高并维持到24h。潘钰等^[21]实验研究发现,大鼠局灶性脑缺血灌注6h在缺血区边缘可见部分MMP-9免疫组化阳性细胞,MMP-9蛋白在第24小时达高峰,维持至第120小时仍有较高表达,第10天时表达减少。

Romanic等^[22]对持久性MCAO大鼠模型进行研究发现,脑卒中后12h即可在缺血脑组织中观察到明显的MMP-9活性,第24小时其活性达最高值,持续5d后下降,在第15天时降至正常水平。陈钰等^[23]研究发现脑缺血再灌注后第6小时缺血区内MMP-9阳性细胞开始出现,第12小时明显增高,至第2天达高峰,第3天后阳性细胞数开始减少,至第14天时恢复到基础水平,各相邻时间点比较差异显著。

本研究进一步探讨MMP-9在局灶性脑缺血损伤中不同时相的表达变化规律及头穴丛刺对其变化的影响。本实验术后第24小时、第3天、第7天模型组及假手术组MMP-9阳性细胞数均高于假手术组($P<0.01$),表明脑缺血后可上调MMP-9,造模成功。头穴丛刺组及模型组在术后第24小时MMP-9表达开始增高,第3天两组梗死灶周围可见大量MMP-9阳性细胞,第7天时明显下降,第14天与假手术组基本一致。术后第24小时、第3天两组大鼠行为学评分均较差,相应病理学观察可见明显脑水肿,一定程度上证实了MMP-9在破坏BBB,引起血管源性脑水肿的重要作用。更重要的是,术后第24小时、第3天、第7天头穴丛刺组MMP-9表达较模型组均减少,两组比较有显著性意义($P<0.01$),第14天、第21天两组比较差异无显著性意义($P>0.05$)。平均光密度值的检测结果与MMP-9阳性细胞数呈正相关。此外,病理形态学观察,各时间点比

较头穴丛刺组细胞数目较模型组明显增多。说明头穴丛刺可抑制 MMP-9 的表达, 早期维护 BBB 的完整, 减轻炎性物质对脑组织的损害。因此, 头穴丛刺降低脑梗死早期梗死灶周围 MMP-9 可能是其治疗的重要途径之一。

参考文献

- [1] 唐强, 朱冬梅, 刘景隆. 头穴丛刺结合康复治疗急性脑梗死患者运动功能障碍的临床观察 [J]. 中国康复理论与实践, 2004, 10(11): 697—698.
- [2] 张立, 唐强. 头穴丛刺改善脑卒中后认知功能障碍 [J]. 针灸临床杂志, 2007, 23(6): 27—28.
- [3] 唐强, 朱肖菊, 吴北峰. 头穴丛刺针法治疗急性脑梗塞 116 例 [J]. 针灸临床杂志, 2005, 21(3): 43—44.
- [4] 廖维靖, 范明, 杨运煌, 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 [J]. 中华物理医学与康复杂志, 2002, 24(6): 345—348.
- [5] 杨雪荣, 王明远, 朱沂. 大鼠局灶性脑缺血再灌注模型的制备和评价 [J]. 新疆医科大学学报, 2008, 31(5): 556—558.
- [6] 刘鹏, 黄东锋, 毛玉蓉, 等. 早期康复对脑卒中患者功能恢复的影响 [J]. 中国康复医学杂志, 2003, 18(2): 99—100.
- [7] 商晓英, 刁凤英, 吴世杰. 急性脑卒中早期康复和针刺治疗的疗效分析 [J]. 中国康复医学杂志, 2003, 18(2): 108—109.
- [8] 陈立典, 郭晓琳, 陶静, 等. 针刺治疗结合肌力训练对脑卒中后偏瘫患者步行能力的影响 [J]. 中国康复医学杂志, 2006, 21(2): 136—139.
- [9] 杨俊生, 宋允章, 杨军, 等. 针刺结合功能训练治疗脑卒中偏瘫的疗效分析 [J]. 中国康复医学杂志, 2007, 22(1): 80—81.
- [10] 脑血管病三级康复治疗研究课题组(A组). 三级康复治疗改善脑卒中偏瘫患者综合功能的临床研究 [J]. 中国康复医学杂志, 2007, 22(1): 3—8.
- [11] 陈尚杰, 李红, 周晓平, 等. 不同针刺法对脑梗死无认知障碍患者的神经功能和生存质量的影响 [J]. 中国康复医学杂志, 2008, 23(6): 548—549.
- [12] 王薇, 周国滨. 于致顺主任医师头针治疗经验 [J]. 中国中医药,

2003, 1(6): 28—31.

- [13] Fang KC, Raymond WW, Blount JL, et al. Dogmat cell α -chymase activates progelatinase B by cleaving the Phe88-Gln89 and Phe91-Glu92 bonds of the catalytic domain [J]. J Biol Chem, 1997, 272(41): 25628—25635.
- [14] Okada A, Santavicca M, Basset P. The cDNA cloning and expression of the gene encoding rat gelatinase B [J]. Gene, 1995, 164(2): 317—321.
- [16] 刘菲. 基质金属蛋白酶-9 在缺血性脑血管病患者血清中的表达及临床意义 [J]. 军事医学科学院院刊, 2005, 29(6): 545—562.
- [16] Planas AM, Sole S, Justicia C, et al. Expression and activation of matrix metalloproteinase-2 and -9 in rat brain after transient focal cerebral ischemia [J]. Neurobiol Dis, 2001, 8(5): 834—846.
- [17] Pfefferkorn T, Rosenberg GA. Closure of the blood-brain barrier by matrix metalloproteinase inhibition reduces rTPA-mediated mortality in cerebral ischemia with delayed reperfusion [J]. Stroke, 2003, 34(8): 2025—2030.
- [18] Kelly MA, Shuaib A, Todd KG. Matrix metalloproteinase activation and blood-brain barrier breakdown following thrombolysis [J]. Exp Neurol, 2006, 200(1): 38—49.
- [19] Asahi M, Asahi K, Jung JC, et al. Role for matrix metalloproteinase 9 after focal cerebral ischemia: effects of gene knockout and enzyme inhibition with BB-94 [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2006, 20(12): 1681—1689.
- [20] Rosenberg GA, Mun-Bryce S. Matrix metalloproteinases in neuroinflammation and cerebral ischemia [J]. Ernst Schering Res Found Workshop, 2004, (47): 1—16.
- [21] 潘钰, 关骅, 张朝东. 高压氧对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤小胶质细胞和基质金属蛋白酶的影响 [J]. 中国康复医学杂志, 2005, 20(1): 8—11.
- [22] Romanic AM, White RF, Arleth AJ, et al. Matrix metalloproteinase expression increases after cerebral focal ischemia in rats: inhibition of matrix metalloproteinase -9 reduces infarct size [J]. Stroke, 1998, 29(5): 1020—1030.
- [23] 陈红兵, 郭云良, 孙圣刚, 等. 大鼠脑缺血再灌注后基质金属蛋白酶-2 和 9 的表达 [J]. 解剖学杂志, 2005, 28(3): 304—307.

(下转 141 页)

- [6] 吴红瑛, 范建中, 洪军. 持续性植物状态患者的综合康复疗效分析 [J]. 中国临床康复, 2002, 6(12): 1779.
- [7] 王德生, 李江东, 王晓丹, 等. 70 例持续性植物状态患者脑电和诱发电位的临床研究 [J]. 中国康复医学杂志, 2005, (1): 56—57.
- [8] 李素敏, 吴杰, 孙吉林. 持续性植物状态患者脑磁图体感诱发电反应研究 [J]. 中国康复医学杂志, 2007, (5): 455.
- [9] 陈健. 持续性植物状态的预后影响因素 [J]. 中华医学写作杂志, 2004, 11(2): 154—157.
- [10] 于兆华, 李铁山, 于尉杰, 等. 早期康复治疗对脑外伤术后植物状态病人预后的影响 [J]. 齐鲁医学杂志, 2007, 22(1): 58—59.
- [11] 孔磊, 覃少清. 高压氧综合治疗持续性植物状态的疗效观察及护理 [J]. 广西医学, 2007, 29(9): 1465—1466.
- [12] 李卫军. 高压氧治疗脑外伤后植物状态 56 例 [J]. 中华航海医学

与高压医学杂志, 2007, 14(3): 140.

- [13] 朱崇田, 石娜. 中西医结合治疗持续性植物状态临床观察 [J]. 实用中医药杂志, 2008, 24(2): 94—95.
- [14] 丰广魁, 奚肇庆. 持续性植物状态(PVS)的中医证治 [J]. 中华中医药学刊, 2007, 25(11): 2294—2296.
- [15] 黄建龙, 雷金娣, 熊亚琴, 等. 中西医结合促醒疗法治疗脑外伤持续性植物状态的疗效观察 [J]. 中国康复医学杂志, 2008, (3): 269—270.
- [16] 王晓燕, 吴淑君. 醒脑开窍针法用于颅脑损伤后持续植物状态的临床研究 [J]. 中国康复医学杂志, 2006, (6): 547—548.
- [17] 王秀坤, 罗小宁, 石艺华, 等. 康复训练配合中西医治疗持续植物状态病人的临床观察 [J]. 实用中西医结合临床, 2007, 7(1): 67—68.