

·传统医学与康复·

电针对局灶性脑缺血再灌注大鼠 uPA、PAI-1 的影响

孔立红¹ 毛娟娟¹

摘要 目的:观察电针对局灶性脑缺血再灌注大鼠 uPA、PAI-1 的影响。方法:大脑中动脉线栓法(MCAO)制备脑缺血再灌注模型,运用免疫组化法检测缺血区 uPA 与 PAI-1 含量的变化以及电针的影响。结果:假手术组大鼠脑缺血区 uPA、PAI-1 呈低水平表达;缺血再灌注 24h uPA 表达增加、PAI-1 表达降低;电针可下调 uPA 表达、上调 PAI-1 的表达。结论:电针治疗可能是通过调节 uPA、PAI-1 蛋白的表达,减轻脑微血管基底膜的损害进而通过保护脑微血管的完整性来达到脑保护作用。

关键词 脑缺血再灌注;电针;尿激酶型纤溶酶原激活物;纤溶酶原激活物抑制剂-1

中图分类号:R246,R49,R743 **文献标识码**:B **文章编号**:1001-1242(2007)-03-0260-02

脑微血管结构的完整性是保护脑缺血再灌注损伤的基础。尿激酶型纤溶酶原激活物(urokinase-type plasminogen activator, uPA)、纤溶酶原激活物抑制剂-1(plasminogen activator inhibitor-1,PAI-1)是纤溶系统的两个重要组成部分,脑缺血再灌注时,uPA 可以破坏微血管结构的完整性,PAI-1 可以保护细胞表面和微血管基底膜免受蛋白分解酶的降解;保护细胞间的接触面而保持组织结构的完整性。在脑缺血再灌注时,观察针刺对 uPA、PAI-1 表达的影响的研究鲜见报道。本实验通过观察针刺对脑缺血再灌注大鼠缺血区 uPA、PAI-1 表达的影响,以期以针灸抗脑缺血再灌注损伤提供科学理论依据,进而指导临床应用。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

清洁级健康 SD 大鼠 40 只,体重 200±20g,雌雄不限,由湖北中医学院实验动物中心提供。随机分为正常组、假手术组、模型组、针刺组,每组 10 只。

1.2 大鼠局灶性脑缺血再灌注模型制备及各组处理方法

1.2.1 模型制备:局灶性脑缺血(middle cerebral artery occlusion, MCAO)再灌注模型的建立采用改良线栓法^[1]。

1.2.2 处理方法:正常组:正常给水给食,不予处理,灌注固定处死取脑。假手术组:麻醉切开颈部皮肤后,仅分离颈总动脉、颈外动脉及颈内动脉至翼腭动脉,不插线栓。24h 后灌注固定处死取脑。模型组:栓塞 30min 再灌注 24h 后灌注固定处死取脑。针刺组:大鼠选取大椎穴、双侧内关穴(参照华兴邦制定的《实验动物穴位图谱》)进行治疗。用 28 号 0.5 寸毫针针刺,大椎与缺血侧(右侧)内关接通 G-6805 电针治疗仪,采用疏密波,频率 120 次/min,强度 1mA,以局部肌肉轻微抖动为度,每次持续刺激 30min。于缺血 30min 再灌注后 1h、23h,各电针半小时。并于缺血再灌注 24h 后灌注固定处死取脑。

1.3 脑片制备及 uPA、PAI-1 免疫组化检测

动物完成观察时间后,以 10%水合氯醛按标准量麻醉大鼠,开胸暴露心脏,经左心室先灌注生理盐水 200ml、继之灌注 4%多聚甲醛 200ml(含 0.1%DEPC),灌毕迅速取脑,常规脱水、透明、石蜡包埋,连续切片。

免疫组化按照试剂盒说明书进行操作(免疫组化试剂盒

由武汉博士德公司),采用 HPIAS-1000 计算机高清晰彩色图像分析仪(华中科技大学同济医学院千屏影像公司)对切片进行图像分析。

1.4 统计学分析

所有数据以均数±标准差表示,采用 SPSS 11.0 统计软件包对数据进行处理。

2 结果

2.1 电针对 uPA 表达的调节作用

见表 1。在正常组和假手术组大鼠缺血区 uPA 有少量的表达,而在模型组 uPA 为高表达,与正常组、假手术组比较有显著性差异($P<0.01$);针刺后 uPA 的表达降低,与模型组比较,有显著性差异($P<0.01$),与正常组比较,无显著性差异($P>0.05$),说明针刺可明显下调 uPA 的表达。

2.2 电针对 PAI-1 表达的调节作用

见表 2。在正常组和假手术组大鼠缺血区 PAI-1 有少量的表达,而在模型组 PAI-1 为低表达,与正常组、假手术组比较,有显著性差异($P<0.01$);针刺后 PAI-1 的表达升高,与模型组比较,有显著性差异($P<0.01$),与正常组比较,无明显差异($P>0.05$),说明针刺可明显上调 PAI-1 的表达。

表 1 uPA 阳性细胞的表达 (灰度值,PU, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	uPA 蛋白表达
正常组	10	14.2±1.6
假手术组	10	17.8±2.5 ^①
模型组	10	24.6±3.3 ^{②③}
针刺组	10	15.3±2.7 ^{④⑤}

与正常组比较:① $P>0.05$,② $P<0.01$ ⑤ $P>0.05$;③与假手术组比较; $P<0.01$;④与模型组比较; $P<0.01$

表 2 PAI-1 阳性细胞的表达 (灰度值,PU, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	PAI-1 蛋白表达
正常组	10	18.5±2.3
假手术组	10	19.3±2.7 ^①
模型组	10	14.4±3.5 ^{②③}
针刺组	10	17.9±1.8 ^{④⑤}

与正常组比较:① $P>0.05$,② $P<0.01$,⑤ $P>0.05$;③与假手术组比较; $P<0.01$;④与模型组比较; $P<0.01$

1 湖北中医学院针灸骨伤系,武汉,430061

作者简介:孔立红,女,博士,副教授

收稿日期:2006-06-19

3 讨论

脑缺血损伤后,恢复缺血部位的血供是治疗的一个关键,但是缺血再灌注可以导致脑微血管损害,出现血管源性脑出血、水肿,加重脑损害。目前有关再灌注后脑微血管损害特征及机制尚不清楚。一些研究者在局灶脑缺血大鼠模型中发现再灌注后血脑屏障损伤,伊凡斯蓝漏入脑组织,认为可能是再灌注后脑微血管内皮细胞紧密连接开放引起^[2]。然而,也有研究认为局部脑缺血再灌注后脑微血管以内皮细胞脱落,基底膜破坏为主^[3]。

IV型胶原和层连蛋白是构成基底膜的主要物质。Hamann等^[4]和Okada等^[5]用激光共聚焦显微镜和免疫荧光组织化学法观测,发现局部脑缺血再灌注24h后脑微血管基底膜层连蛋白、纤维连接蛋白、IV型胶原等的数量和信号强度均明显减少,血管基底膜抗原也同步消失,表明脑缺血再灌注后存在脑微血管基底膜损害。研究发现,基底膜的降解是一系列蛋白分解酶作用的结果。纤溶酶系统中细胞外间质和基底膜降解的主要酶类uPA,在缺血后脑组织活性明显增高,其主要作用有:①直接降解细胞外间质和基底膜;②激活纤溶酶,使基底膜中多种成分如纤维蛋白、纤维连接蛋白等降解,而且活化的纤溶酶亦激活IV型胶原酶,使基底膜中的主要成分IV型胶原降解^[6]。这与脑微血管结构损害密切相关^[7]。本研究结果表明,大鼠脑缺血再灌注后24h,缺血区脑组织中uPA表达明显升高,与李玲等^[8]的研究结果一致;电针治疗后,uPA表达显著降低,与模型组比较,有显著性差异($P<0.01$),表明电针可以下调uPA的表达而起到脑保护作用。

PAI-1是诸种丝氨酸蛋白酶抑制剂,它的主要功能为保护细胞表面和微血管基底膜免受蛋白分解酶的降解;保护细胞间的接触面而保持组织结构的完整性^[9]。实验研究发现^[11],PAI-1表达降低,其对uPA^[12]的抑制作用相应减弱,从而保护基底膜及细胞外间质免遭其他蛋白分解酶的降解及保护细胞间接触面的作用也相应减弱,导致细胞表面及微血管基底膜大量降解,微血管结构完整性破坏,这也是导致再灌注脑水肿加重和出血的原因之一。而PAI-1蛋白表达增高,则可以减轻继发性脑出血^[13]。我们的实验研究结果表明,大鼠脑缺血再灌注后24h,缺血区脑组织中PAI-1表达明显降低,与正常组、假手术组比较,差异有显著性意义($P<0.01$);电针治疗后,PAI-1表达显著降低,与模型组比较,有显著性差异($P<0.01$),表明电针可以上调PAI-1的表达而起到脑保护作用。

本研究表明,电针治疗可以通过下调uPA表达、上调

PAI-1表达来保护脑微血管的完整性进而达到脑保护的日的。但在再灌注后期,uPA、PAI-1的表达究竟有没有参与脑微血管的重建及其作用机制如何,尚待进一步研究。

参考文献

- [1] 孟宜良. 线栓法大鼠大脑中动脉局灶性脑缺血模型研究现状[J]. 国外医学·神经病学神经外科学分册,2002,2(29):113.
- [2] Yang GY, Betz AL. Reperfusion-induced injury to the blood-brain barrier after middle cerebral artery occlusion in rats [J]. Stroke,1994,25(8):1658.
- [3] Nishigaya K, Yoshida Y, Sasuga M, et al. Effect of recirculation on exacerbation of ischemic vascular lesions in rat brain [J]. Stroke,1991,22(5):635.
- [4] Hamann GF, Okada Y, Fitridge R, et al. Microvascular basal lamina antigen disappear during cerebral ischemia and reperfusion[J]. Stroke,1995,26:2120.
- [5] Okada Y, Copeland BR, Fitridge R, et al. Fibrin contributes to micro-vascular obstructions and parenchymal changes during early focal cerebral ischemia and reperfusion [J]. Stroke, 1994,25:1847.
- [6] Mun-Bryce S, Rosenberg. Matrix metalloproteinases in cerebrovascular disease [J]. J Cereb Blood Flow Metab,1998,18(11):1163.
- [7] Ahn MY, Zhang ZG, Tsann W, et al. Endogenous plasminogen activator expression after embolic focal cerebral ischemia in mice[J]. Brain Res,1999,837(1-2):169.
- [8] 李玲,黄如训,肖小华,等. 局灶脑缺血再灌注区脑微血管基底膜损害及uPA、uPA mRNA表达的实验研究[J].中国病理生理杂志, 2000,16(11):1189.
- [9] 李玲,陶玉倩,李扬,等. 尿激酶型纤溶酶原激活物及其抑制物-1表达与脑微血管改变的实验研究[J].中华老年医学杂志,2005(6):453.
- [10] Hua Y, Xi G, Keep RF, et al. Plasminogen activator inhibitor-1 induction after experimental intracerebral hemorrhage [J]. J Cereb Blood Flow Metab,2002,22(1):55.
- [11] 李玲,黄如训,胡俊,等. 大鼠局灶性脑缺血再灌注病灶及周围区PAI-1表达[J].中国病理生理杂志,2004,20(3):417.
- [12] Mun-Bryce S, Rosenberg GA. Matrix metalloproteinases in cerebrovascular disease [J]. J Cereb Blood Flow Metab,1998,18(11):1163.
- [13] 刘冰,黄如训,曾进胜,等. 降纤酶对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的作用[J].中国脑血管病杂志,2005,2(5):215.