维普资讯 http://www.cqvip.com

7-9

(3)

文章编号：0253-3626（2000）01-0007-03

局灶性脑缺血/再灌注及电针对Wistar大鼠脑组织HSP70表达的影响

R277.733.2
R245.9

王渝蓉[1]，罗勇[2]，冷志[3]，董为伟[2]，李其蓉[1]

（1. 重庆市第一人民医院神内科 400011；2. 重庆医科大学临床学院神内科 400016；
3. 重庆医科大学第二临床学院病理科 400010）

摘 要 应用免疫组化S-P法，探讨局灶性脑缺血/再灌注及电针双侧“合谷”穴（LI 4）对Wistar大鼠脑组织中热休克蛋白（HSP70）表达的影响及意义。结果局灶性脑缺血3h、再灌注3h及6h组HSP70的表达较假手术组明显增加（$P<0.01$），缺血3h/再灌注6h＋电针“合谷”穴组与缺血3h/再灌注6h组相比HSP70表达进一步增加（$P<0.05$）。提示电针对局灶性脑缺血/再灌注的保护作用可能与HSP70表达增加有关。

关键词 局灶性脑缺血/再灌注；电针；HSP70；“合谷”穴 电针疗法、大鼠

中国图书分类法分类号：R743.3 **文献标识码**：A **收稿日期**：1999-06-17

The effect of focal cerebral ischemia/reperfusion and electro-acupuncture on HSP70 expression in wistar rat brain tissue

WANG Yu-Rong, et al

Department of Neurology, College of Clinical Medicine

Abstract: The effect of focal cerebral ischemia/reperfusion and electro-acupuncturing bilateral “He gu” point (*LI 4*) on HSP70 expression in wistar rat brain tissue was evaluated by the S-P immunohistochemistry method. Compared with a control group, HSP70 expression increased markedly in I 3h、I 3h/R 3h、I 3h/R 6h groups ($P<0.01$). Compared with the I 3h / R 6h group, it was observed that electro-acupuncture could further increase HSP70 expression ($P<0.05$).The results suggest that the neuroprotective mechanism of electro-acupuncture on focal cerebral/reperfusion may be related to the upregulation of HSP70 expression.

Key Words: Focal cerebral ischemia/reperfusion; Electro-acupuncture; HSP70; “He gu” point (*LI 4*)

热休克蛋白(Heat Shock Protein, HSP)是细胞在缺血等应激反应时产生的一种保护性蛋白，按其分子量大小主要分为HSP27、HSP70、HSP90等，其中HSP70的表达是预示受损神经元能够存活的一个敏感指标。现已证实：HSP70对神经元具有保护作用，其机制可能与HSP70使变性蛋白复性或保护前核糖体功能、减少自由基生成等有关[1、2]。近年有关针刺治疗脑缺血机制的研究趋于多元化且更加深入，但从分子水平进行研究的报道较少，本文重点探讨局灶性脑缺血/再灌注及电针双侧“合谷”穴(LI 4)区对Wistar大鼠脑组织中HSP70表达的影响及意义。

作者介绍：王渝蓉(1964-11出生)，女，主治医师

基金项目：本课题部分由卫生部研究基金资助(941356)

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组 本校实验动物中心提供的Wistar大鼠42只，雌雄兼用，体重210～260g。随机分为7组，每组6只，即(1)假手术组；(2)局灶性脑缺血3h组(I 3h)；(3)局灶性脑缺血3h/再灌注3h组(I 3h/R 3h)；(4)局灶性脑缺血3h/再灌注6h组(I 3h/R 6h)；(5)局灶性脑缺血3h+电针组(I 3h+EA)；(6)局灶性脑缺血3h/再灌注3h+电针组(I 3h/R 3h+EA)；(7)局灶性脑缺血3h/再灌注6h+电针组(I 3h/R6h+EA)。

1.2 大鼠局灶性脑缺血/再灌注模型制备 用3.5%水合氯醛(350mg/kg.i.p)麻醉大鼠，参考Nagasawa等[3]介绍的线栓法造模有改动，将头端约5mm长度涂有聚胺酯的直径为0.25~0.26mm的尼龙钩丝从右侧颈外动脉(ECA)插入到颈内动脉(ICA)，并自ECA和ICA分叉处向头端送入1.9mm~2.1mm，阻塞大脑中动脉(MCA)起始处3h。然后将钩丝轻缓外抽，使其头端回到颈总动脉(CCA)的主干中，实现再灌注，分别再灌注3h、6h。假手术对照组除钩丝不插入MCA外，余同。

1.3 神经病学评分 参考Kuluz[4]神经缺陷三级评分标准，稍

维普资讯 http://www.cqvip.com

表　各组动物脑组织神经元每个高倍视野HSP70平均阳性数比较（$\bar{x}\pm s$）

Group	n	pre	I 3h	I 3h R 3h	I 3h R 6h
I/R	6	6.3±3.1	30.2±16.8*	31.7±13.8*	40.7±10.9*
I/R+EA	6		44.0±16.4☆	47.2±22.8☆	64.5±21.7☆☆

*与假手术组比较　$P<0.01$　☆与非电针对应组比较　$P>0.05$　☆☆与非电针对应组比　$P<0.05$

加改进，手术动物清醒后，于大鼠脑缺血1.5h进行评分。标准如下：0级 无缺陷、活动正常；1级 右侧Horner's征阳性；2级 提尾悬空时左前肢屈曲、内收；3级 自主运动时，身体向偏瘫侧(左侧)划圈。上述三项体征均有的动物视为造模成功，进入下一步实验。

1.4　针刺干预方法　电针组动物在MCA闭塞后近2h施以电针治疗，选取大鼠双侧“合谷”(LI 4)区进针，电针仪为57-6电脉冲医疗刺激仪，电针参数及方式参见另文[3]。

1.5　免疫组化方法　用4%多聚甲醛灌注固定脑组织，经胼胝体矢状面取材，石腊包埋，4μm连续切片，常规脱腊水化后用0.01M柠檬酸盐为缓冲剂的高温高压抗原修复、免疫组化S-P法染色，DAB显色，HSP70多克隆抗体及超敏S-P即用型药盒购于Maxin公司。

1.6　组化染色结果分析　染色阳性为棕黄色，着色部位在神经元细胞核，观察10个高倍视野缺血区周围半影区神经元细胞核阳性数，取其平均值，统计结果采用显著性t检验。

2　结　果

各组动物脑组织中均有不同程度的HSP70表达，HSP70主要在缺血区周围半影区神经元细胞核中表达。各组动物脑组织神经元每个高倍视野HSP70平均阳性数的比较见表1。图1～3示假手术组、I 3h/R 6h组、I 3h/R 6h+EA组动物脑组织神经元HSP70表达情况。

从表可看出，假手术组脑组织神经元中有少许HSP70表达，I 3h、I 3h/R 3h、I 3h/R 6h三组随着缺血后再灌注时间延长，HSP70表达有升高趋势，但三组间比较无显著差异(t=0.1684、t=1.2815、t=1.2478 P值均大于0.05)，但与假手术组比较三组的HSP70表达均有明显升高，有极显著性差异(t=3.2411、t=4.3761、t=7.42　P值均小于0.01)。I 3h+EA组与I 3h组、I 3h/R3h+EA组与I 3h/R3h组比较，电针组HSP70表达均有升高趋势，但尚未达显著水平(t=0.4212、t=1.4365，P值均大于0.05)。而I 3h/R6h+EA组与I 3h/R6h组比较，电针后HSP70表达明显增加，二组间有显著性差异(t=2.3989，$P<0.05$)。

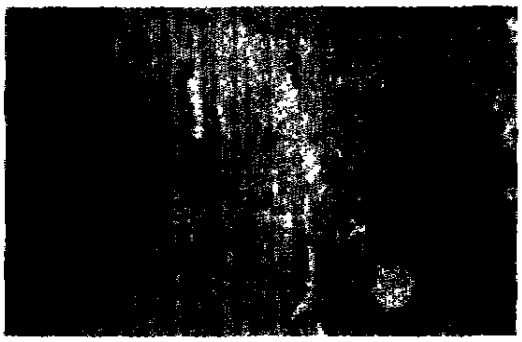


图1 SP×100 假手术组



图2 SP×100 I 3h/R 6h组

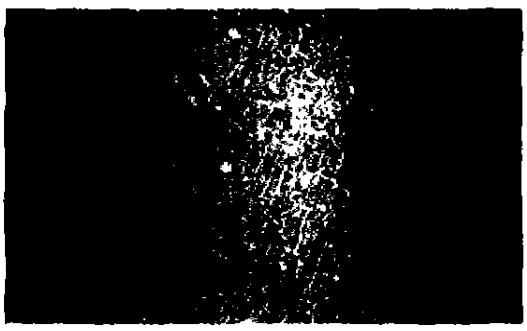


图3 SP×100 I 3h/R 6h+EA组

3.1　电针“合谷”穴的依据及意义

中医认为“合谷”穴为原穴，是脏腑原气输注、经过和留止的部位，为十二经的根本。即所谓“五脏六腑之有疾者，皆取其原也”。既往我们的研究表明电针不完全性脑缺血大鼠“合谷”穴区，可明显改善大脑皮层灌注量，针刺局灶性脑梗塞大鼠双侧“合谷”穴可使线粒体肿胀程度明显减轻，

维普资讯 http://www.cqvip.com

数量叫升，对脑缺血有肯定保护作用[5]，故本实验仍选取大鼠双侧“合谷”穴作为电针穴位。

3.2 局灶性脑缺血/再灌注时对大鼠脑组织HSP70表达的影响

正常脑组织内一般无HSP70蛋白表达，本实验假手术组中可见脑组织有少量HSP70蛋白表达，可能为机体对造模手术的应激反应所致。HSP70基因对缺血极为敏感，可立即诱导并合成蛋白，随着再灌注时间延长，HSP70逐渐增高[6]。本实验观察到I 3h、I 3h/R3h、I 3h/R6h随着再灌注时间延长，HSP70表达有升高趋势，虽未达显著水平($P>0.05$)，但与假手术组比较，各组HSP70表达均有明显增高，有极显著性差异($P<0.01$)，与其他学者的研究结果一致[6]，已有研究表明，缺血延至8h甚至24h，HSP70均可能有表达[7]，HSP70表达在再灌注24h最多[8]。本实验为观察电针的早期治疗作用，所设I 3h、I 3h/R3h、I 3h/R6h缺血及再灌注时间均较短，I 3h、I 3h/R3h、I 3h/R6h之间比较，HSP70表达有随再灌注时间延长而升高趋势，虽未达显著水平($P>0.05$)，但本实验同文献报道HSP70表达与缺血及再灌时间有关的结论相似。

3.3 电针对局灶性脑缺血/再灌注大鼠脑组织HSP70的影响及意义

近年，关于HSP在脑缺血过程中的表达、诱导的研究已取得一定进展，有研究证实：HSP70与细胞缺血耐受性关系密切，脑缺血后表达HSP70的神经元不发生坏死[2]。应激后HSP70不但在胞浆中与变性蛋白结合，使变性损伤的蛋白得以迅速处理和恢复，维持神经元内蛋白自稳，防止变性蛋白进一步折叠，失去功能[9]。氧自由基是HSPs诱生因素之一，HSPs另一作用是抑制NADPH氧化酶，NADPH氧化酶参与氧自由基产生的关键反应，HSPs通过反馈作用减少氧自由基的产生[2]。综上所述，HSP70是机体应激时，尤其是脑缺血损伤时产生的应激蛋白，对细胞具有保护作用。

本实验中I 3h+EA组与I 3h组、I 3h/R3h+EA组与I 3h/R 3h组比较，HSP70表达虽未达显著水平($P>0.05$)，但有逐步增高的趋势，而I 3h/R 6h+EA组与I 3h/R 6h组相比，则HSP70表达明显增高，有显著性差异($P<0.05$)。实验表明电针对局灶性脑缺血/再灌注大鼠脑组织HSP70有明显影响，可使HSP70表达增加。

已有研究表明：针刺具有减少脑缺血时氧自由基生成的作用[10]，HSP70主要在缺血半影区功能尚存的神经元中表达，缺血后HSP70表达早且量多的神经元对缺血耐受性强[6]。缺血半影区的神经元功能在一定时间内尚存，如何保护缺血半影区神经元，缩小梗塞范围，是当今治疗脑缺血疾病的焦点。本实验显示：电针能够明显增加缺血半影区神经元HSP70表达，故我们推测增高HSP70，可能有助于减少氧自由基生成，同时有助于保护缺血半影区神经元。本实验结果提示：针刺治疗脑缺血的机制可能与HSP70蛋白增加有关，为临床针刺治疗脑缺血疾病提供又一新的理论依据。

参 考 文 献

[1] Maihos C, Howard M K, Latchman D S. Heat shock proterin Hsp90 and HSP70 protect neuronal cells from thermal stress but not from programmed cell death[J]. Neurochem 1994;63:1787~1795

[2] 管阳太，郑惠民. 热休克蛋白在缺血性脑损伤中的作用[J]. 国外医学脑血管疾病分册，1994;2(3):142～145

[3] Nagasawa H, Kogure K. Correlation between cerebral blood flow and histologic changes in a new rat model of middle cerebral arctery occlusion [J].Stroke, 1989;20:1037~1043

[4] Kuluz JW, Prado RJ, Dietrich D, et al.The effect of nitric oxide synthase inhibition on infarct volume ofter reversible focal ischemia in consious rats[J]. Stroke, 1993;24:2023~2029

[5] 罗 勇，黄仲荪，徐 晨. 针刺对缺血性脑梗塞大鼠皮层神经元线粒体影响的形态计量研究[J]. 上海针灸杂志 1996;15(6):28~30

[6] 张 荣，周范民，周良辅，等. 脑缺血后脑内HSP70表达的实验研究[J].中国临床神经科学，1998;6(1):13～17

[7] 谢 安，臧益民，张继武，等. 大脑局部急性缺血后热休克蛋白70的免疫组织化学研究[J].中国病理生理杂志，1999;15(1):86

[8] 路敦跃，江德华. 脑缺血再灌注大鼠海马hsp70及bcl-2基因的表达[J].中国应用生理学杂志，1997;13(3):224～227

[9] Gething MJ,Sambrook J.Protein folding in the cell[J] .Nature ,1992;355:33

[10] 陈志强，耿稚萍，张 吉，等. 电针对脑局部缺血再灌注损伤大鼠自由基的影响[J].中国针灸,1998;7:409～412