DOI:10.3969/j. issn. 1000-9760.2017.06.004

艾灸对脑缺血-再灌注损伤大鼠 MMP-9 表达的影响*

郑桂芝¹ 梁汝庆² 郑灿磊¹ 于 斌¹ 孙 闵¹ 孙 冰¹ (¹ 济宁医学院中西医结合学院,济宁 272067; ² 济宁医学院附属医院,济宁 272029)

摘 要 目的 观察艾灸对脑缺血-再灌注损伤大鼠血清 MMP-9 含量的影响。方法 将 SD 大鼠随机分为模型组、艾灸组和假手术组,每组 15 尺,神经行为学评分评判造模以及不同时间点艾灸干预神经功能恢复情况,ELISA 检测血清 MMP-9 含量,Western Blot 检测脑组织中 MMP-9 表达。结果 艾灸干预后,艾灸组神经功能缺损评分较模型组明显降低(P < 0.05);艾灸组血清 MMP-9 含量和脑组织 MMP-9 表达较模型组明显降低,差异具有统计学意义(P < 0.05)。结论 艾灸对脑缺血-再灌注损伤大鼠神经功能有显著改善作用,其机制可能是通过调节血清和脑组织 MMP-9 表达量的变化,从而保护血管内皮细胞损伤。

关键词 艾灸;脑缺血-再灌注损伤;基质蛋白酶9

中图分类号:R245 文献标识码:A 文章编号:1000-9760(2017)12-402-05

Effect of moxibustion on MMP-9 expression in rats with cerebral ischemia-reperfusion injury

ZHENG Guizhi¹, LIANG Ruqing², YU Bin¹, ZHENG Canlei¹, SUN Min¹, SUN Bing¹
(¹College of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine of Jining Medical University, Jining 272067, China;

²Affiliated Hospital of Jining Medical University, Jining 272029, China)

Abstract: Objective To observe the effect of moxibustion on the expression of MMP-9 in cerebral ischemia-reperfusion injury rats. Methods SD rats were divided into model group, moxibustion group and Shamoperation group randomly (n = 15). Neurobehavioral score was used to evaluate the situation of modeling. After moxibustion, the recovery of nerve function at different time points, the content of MMP-9 in serum were detected by ELISA, and the expression of MMP-9 in brain tissue was detected by Western Blot. Results After moxibustion, the neurological score in moxibustion group was significantly lower than that in the model group (P < 0.05). The MMP-9 expression in serum and brain tissue in the moxibustion group were significantly lower than those in the model group (P < 0.05). Conclusion Moxibustion can significantly improve neurological function in rats with cerebral ischemia-reperfusion injury. The mechanism may be the protection of vascular endothelial cell injury by changing the expression of MMP-9 in serum and brain tissue.

Keywords: Moxibustion; Cerebral ischemia-reperfusion injury; Matrix metalloproteinase-9

脑血管疾病是目前严重威胁人类健康和生命的主要疾病,其中缺血性脑血管病约占全部脑血管疾病患者的80%。临床大多由大脑中动脉阻塞引起急性血液循环障碍,导致突发性局灶性脑功能障碍,引起感觉、运动功能减退或丧失,甚至死亡,是

神经内科常见病和多发病,具有高发病率、高死亡率、高致残率、高复发率的特点。研究表明^[1-2],缺血性脑血管病的发生有许多炎症因子参与,其中基质金属蛋白酶类(matrixmetallopro-teinases,MMPs)尤其是基质金属蛋白酶 9(MMP-9)的升高,对血管内皮细胞损伤性增强,从而导致缺血性脑病的发生。血管内皮细胞损伤是其共同的病理基础。中医认为本病发病的基本病机是本虚标实,风、火、

^{*[}基金项目]山东省中西医结合临床重点学科资助项目; 济宁医学院青年基金资助 (JYQ2011KM046)

痰、瘀等是其标,脏腑气血虚弱,阴阳失调是其本。 针灸作为中国传统治疗方法,在脑血管疾病防治研 究中得到了长足的发展,同时针灸治疗缺血性中风 作用机理的实验研究也不断深入。临床实践表明, 艾灸治疗急性缺血性中风具有较好的疗效^[3-8]。本 实验采用脑缺血-再灌注损伤模型,模拟人类多次 短暂性脑缺血发作类型,探讨艾灸类人迎穴对脑缺 血-再灌注损伤大鼠血管内皮细胞的保护作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

SD 大鼠,雄性,清洁级,体质量 220~280g,由 上海中医药大学实验动物中心提供(合格证编号: JZDW2014-0336)。实验过程中对动物的处置符合 实验动物伦理学标准。大鼠于饲养笼内适应性饲 养1周,清洁饮水,自由摄食等。用电脑 SPSS 软件 用随机数字法将其随机分为模型组(即脑缺血-再 灌注损伤组)、艾灸组(即艾灸脑缺血-再灌注损伤 组)、假手术组,每组各 15 只。

1.2 主要试剂与仪器

680 型酶标仪(BIO-RAD); MMP-9 试剂盒(碧云天公司, C1002); RIPA 组织细胞快速裂解液(Solarbio, R0010); BCA 蛋白定量试剂盒(thermo, PICPI23223); NC 膜(Millipore, HATF00010);蛋白预染 Marker (Fermentas, SM1811);发光液(Millipore, WBKLS0100); Tween-20 (Amresco, BYL40713); 丽春红染液(上海基尔顿生物, BYL40635)。

1.3 方法

- 1.3.1 脑缺血-再灌注损伤模型的制备 模型组和艾灸组大鼠以2%戊巴比妥钠(30mg/kg),腹腔注射麻醉后,仰卧位固定头部和四肢,常规剃毛,消毒,沿颈部正中作一长度约2.0cm切口,逐层钝性分离,分离双侧颈总动脉(CCA),以无创动脉夹夹闭CCA近心端3min,间隔30min,再夹闭3min,共夹闭3次,缝合颈部切口,建立脑缺血-再灌注损伤模型。假手术组只分离颈总动脉,不夹闭,其他同模型组。
- 1.3.2 神经病学评分及纳入标准 参照 Longa 等^[9]5 级标准评分法。0 分:无神经功能缺损;1 分:缺血对侧前肢内收、不能完全伸展;2 分:行走时向偏瘫侧转圈者;3 分:行走时向偏瘫侧倾倒;4

分:意识丧失,不能自发行走。动物出现神经功能 缺损,无烦躁不安、抬头狂体征,1~3分为模型成 功,0分和4分予以剔除;癫痫发作者,取材时发现 脑出血、蛛网膜下腔出血者均剔除,随机补充。

1.3.3 处理方法 术后均给予单只大笼饲养。艾 灸组于模型建立 6h 开始用特制动物艾条(直径 0.5cm,长度 12cm,河南南阳汉医艾绒有限责任公司生产)艾灸类人迎穴(大鼠穴位中无此穴,取穴方法模仿人体人迎穴定位方法,具体定位为甲状腺两侧,颈动脉搏动处。具体定位如图 1 所示),每次 15min,每天 1 次,共治疗 7d。模型组和假手术组只做与艾灸组相同的固定,不做任何处理。



图1 大鼠取穴定位图

- 1.3.4 标本采集 每组分别于造模后 6h 和第 3d 各随机抓取 5 只,先行神经功能缺损评分,然后用 2% 戊巴比妥钠(30 mg/kg),腹腔注射麻醉后,仰卧位固定头部和四肢,腹主动脉抽血处死,将血置于枸橼酸钠抗凝试管内,摇匀。然后,断头,取脑。7d 后将剩余的大鼠用上述同样的方法处理并取材。整个过程符合动物伦理学要求。
- 1.3.5 ELISA 检测 MMP-9 含量 具体方法:将大鼠禁食 12h 后,腹主动脉抽取血 5mL,置于枸橼酸钠抗凝试管内,摇匀,室温静置 40min,离心 15min (3000 r·min⁻¹),分离血清置入 EP管,-80℃冰箱保存,统一检测。严格按照试剂盒说明操作。检测结果见表 2。
- 1.3.6 Western Blot 检测脑组织中 MMP-9 表达 具体操作步骤:将各组脑组织用裂解液充分裂解, 离心(4℃,12000 r/min,5min),BCA 方法蛋白定 量,取 20μL 总蛋白加入上样缓冲液煮沸变性,经 PAGE 凝胶电泳,然后转膜,用 5% 脱脂奶粉封闭 后,加入一抗、二抗孵育,ECL 发光液显色,成像系 统扫描、拍照。检测结果如图 2 所示。

1.4 统计学方法

采用 SPSS22.0 统计软件进行分析,计量资料

用均数 \pm 标准差 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,组间比较用单因素方差分析。检验水准 $\alpha = 0.05$,以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠不同时间点神经行为学评分

假手术组在造模后 6h、3d 和 7d 的神经行为学评分均为 0,也就是假手术不能对大鼠肢体运动产生影响;模型组和艾灸组在造模后 6h 和造模后 3d,神经行为学评分均较高,两组比较无差异(P>0.05),与假手术组比较,均有差异性(P<0.05)。在造模后 7d,艾灸组神经行为学评分明显降低,与模型组比较有统计学差异(P<0.05)。见表 1。

表1 3组大鼠不同时间点神经行为学评分比较($分,\bar{x}\pm s$)

组别	造模后 6h	造模后 3d	造模后7d
假手术组	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
模型组	2.0 ± 1.00 *	2.6 ± 0.55 *	2.4 ± 0.55 *
艾灸组	2.2 ± 0.84 *	2.4 ± 0.84 *	1.4 ± 0.45
F 值	13.059	29.400	10.800
P	0.001	0.000	0.002

注:与假手术组比较,*P<0.05;与模型组比较,*P<0.05。

2.2 各组大鼠不同时间点血清 MMP-9 含量

在造模后 6h,与假手术组比较,模型组和艾灸组血清中 MMP-9 含量明显升高(P < 0.05);在造模 3d 和 7d 后,与假手术组比较,模型组和艾灸组血清中 MMP-9 含量仍较高(P < 0.05),与模型组比较,艾灸组血清中 MMP-9 含量明显下降,差异有统计学意义(P < 0.05)。见表 2。

表 2 3组大鼠在不同时间点血清 MMP-9 含量比较 $(ng/ml, \bar{x} \pm s)$

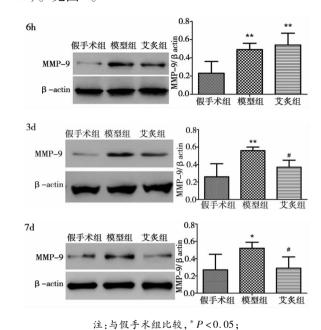
组别	造模后 6h	造模后 3d	造模后 7d
假手术组	91.62 ± 10.18	93. 18 ± 8. 25	90. 38 ± 10. 11
模型组	108.52 ± 15.35 *	123. 18 ± 9. 17 *	106.16 ±11.11 *
艾灸组	107.46 ± 7.78 *	111.26 ± 10.7#	94.78 ± 8.07#
F 值	11.591	25.496	5.22
P	0.002	0.000	0.023

注:与假手术组比较,*P<0.05;与模型组比较,*P<0.05。

2.3 各组大鼠不同时间点脑组织 MMP-9 表达

在造模后 6h,与假手术组比较,模型组和艾灸 组脑组织中 MMP-9 表达较高(P<0.05);在造模

3d 和 7d 后,与假手术组比较,模型组脑组织中 MMP-9 蛋白表达仍较高(P < 0.05),与模型组比较,艾灸组脑组织中 MMP-9 表达明显下降(P < 0.05)。见图 2。



与模型组比较, #P < 0.05。 图 2 各组大鼠在不同时间点脑组织 MMP-9 表达

3 讨论

缺血性脑卒中严重危害着人类的健康与生存质量。脑缺血后可引发炎性反应,已有的研究表明^[10-12],MMP-9作用于血管基底膜成分,参与了缺血性脑卒中后炎性反应以及继发性脑损伤的病理过程。MMPs是一组依赖 Ca²⁺和 Zn²⁺的中性蛋白酶家族,MMP-9属明胶酶,是神经系统中最为重要的 MMP,主要作用为降解血管周围基膜的IV型明胶胶原、层粘连蛋白、纤粘连蛋白等绝大部分细胞外基质。脑缺血时,MMP-9 能降解脑血管基质的关键成分,使血脑屏障通透性增加,导致大量的水、电解质和蛋白质外流,最终形成血管源性脑水肿和神经元损坏。如大量活化的白细胞通过破坏损伤的血脑屏障渗入到脑组织内,可释放许多细胞因子、炎症介质,加速神经元的损伤,加重缺血性脑损害

艾灸作为中国传统疗法,具有简单易行、经济有效等特点。大鼠类人迎穴的定位从解剖位置上来看,位于甲状腺两侧,颈动脉搏动处。艾灸此穴扩张颈部血管,增加血流,从而改善脑部血液循环。

但目前人们研究的重点多集中在针刺能够显著改善缺血性脑卒中模型的多项指标并参与脑血管内皮细胞损伤状态的调整和恢复,而对于其康复与干预时间和疗程选择的相关性研究相对较少。本实验通过夹闭颈总动脉,建立局灶性脑缺血大鼠模型,并利用神经功能缺损评分验证模型成功与否。用 ELISA 法和免疫印迹法分析 MMP-9 在不同时间点的动态表达量变化及艾灸对其表达的影响,从而探讨艾灸在缺血脑组织保护方面的作用机制。

本实验结果显示,艾灸组大鼠在艾灸 3d 时,神经行为学评分尚无明显下降,随着艾灸天数增加,7d 后的神经行为学评分明显低于模型组(P < 0.05),提示艾灸类人迎穴可以改善脑缺血所引起的神经功能损伤。其机制可能艾灸使局部温度升高,舒张颈部血管,增加脑血流,从而改善脑缺血所致的神经功能损伤,这一结果与文献报道一致[13]。

现代研究,MMP-9的升高与很多疾病相关,如 心、脑血管病。在急性脑缺血时,此项指标显著升 高[14],本实验结果与之相符。在不同时间点其升 高的程度不同,本实验中模型组在脑缺血-再灌注 损伤早期(6h),即有 MMP-9 明显增高(P < 0.05), 3d 时最高,至7d 时仍明显高于基础水平(P< 0.05),表明 MMP-9 升高是脑缺血损伤后的早期反 应,且 MMP-9 的升高能持续 7d 以上,与假手术组 比较,有显著性差异。通过艾灸类人迎穴,可以降 低脑缺血-再灌注大鼠血清和脑组织中 MMP-9 表 达的峰值,与模型组相比,峰值低;艾灸 7d 时, MMP-9 表达明显低于模型组,与基础值相当,有提 前降至正常的趋势。有研究表明, MMP-9 的升高 可以加速神经元的损伤,破坏脑内血管内皮细胞, 从而使脑缺血的损害性加重。艾灸能够降低 MMP-9 的含量,提示其有保护血管内皮细胞,抑制 神经元损伤,控制病情的进一步发展。

本文还发现:艾灸可以促进伤口的愈合(如结痂时间)。艾灸组大鼠伤口结痂时间比模型组和假手术组均短,因为本实验造模后7d就处死大鼠,有的老鼠伤口还没有完全愈合,故未行统计。但是从整体上看,艾灸组伤口结痂时间比其他两组明显早,这与许多报道艾灸可以促进伤口愈合时间相一致[15-18]。艾灸可以加速创面修复组织中血管及血管内皮细胞的增殖,促进血管内皮生长因子[19](VEGF)的释放,使其表达高峰前移,从而促进皮

肤创伤愈合。

综上,艾灸能够改善大鼠脑缺血所引起的神经功能缺损评分,减轻症状;降低脑缺血-再灌注大鼠血清和脑组织 MMP-9 表达的峰值,从而起到保护血管内皮细胞,抑制神经元损伤,控制病情的进一步发展;促进伤口的愈合。且艾灸方便易行,操作简便,疗效确切,无毒副作用,且费用低廉,值得进一步临床推广应用。

参考文献:

- [1] Ramos-Fernandez M, Bellolio MF, Stead LG. Matrix metalloproteinase-9 as a marker for acute ischemic stroke:a systematic review [J]. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2011, 20 (1):47-54. DOI: 10. 1016/j. jstrokecerebrovasdis. 2009. 10. 008.
- [2] Fischer M, Dietmann A, Beer R, et al. Differential regulation of matrix-metalloproteinases and their tissue inhibitors in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage [J]. PLoS One, 2013, 8 (3): e59952. DOI: 10. 1371/journal. pone. 0059952.
- [3] 聂斌,梁迪赛,孙小翠,等. 俞慕穴艾灸对脑卒中患者 躯干控制及运动功能的影响[J]. 上海针灸杂志, 2013,32(9):706-708.
- [4] 吕超. 针灸治疗中风后遗症 89 例[J]. 中国中医药现代远程教育,2014,12(8):84-85.
- [5] 刘永锋,马晓明,闫兵,等. 针刺配合艾灸百会穴治疗中风后失眠疗效观察[J]. 上海针灸杂志,2016,35(3):270-272.
- [6] 柳刚,韩为,黄学勇,等. 重灸百会穴法治疗脑中风后 失语症 30 例临床研究[J]. 时珍国医国药,2016,27 (5):1136-1138.
- [7] 齐江敏,张天生,郝重耀.艾灸治疗中风后痉挛性偏瘫41 例临床观察[J]. 中医临床研究,2015,7(12): 120-121.
- [8] 杨海侠,荣华. 艾灸治疗中风恢复期患者肢体功能障碍的疗效观察[J]. 陕西中医,2016,37(3):351-352.
- [9] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20(1):84-91.
- [10] Suzuki Y, Nakano Y, Mishiro K, et al. Involvement of Mincle and Syk in the changes to innate immunity after ischemic stroke [J]. Sci Rep, 2013, 3 (1): 3177. DOI10.1038/srep03177.
- [11] Morancho A, Hernández-Guillamon M, Boada C, et al. Cerebral ischaemia and matrix metalloproteinase-9 mod-

- ulate the angiogenic function of early and late outgrowth endothelial progenitor cells [J]. J Cell Mol Med, 2013, 17(12):1543-1553. DOI 10.1111/jcmm. 12116.
- [12] Chaturvedi M, Kaczmarek L. Mmp-9 inhibition: a therapeutic strategy in ischemic stroke [J]. Mol Neurobiol, 2014, 49 (1): 563-573. DOI: 10. 1007/s12035-013-8538-z.
- [13] 郑仕平,韩为,储浩然,等. 通督调神针灸预处理对脑缺血再灌注大鼠 miRNA664 及 MMP9 调控机制的研究[J]. 上海针灸杂志,2016,35(1):76-80.
- [14] 于学平, 孙晓伟, 邹伟, 等. 头针对脑缺血再灌注大鼠脑组织中组织金属蛋白酶抑制因子-1 表达调控机制的动态研究[J]. 中国康复医学杂志, 2017, 32(3): 283-287.
- [15] 祝亚男,唐娅琴,汪永坚.艾灸促进乳腺癌术后创面愈合临床观察[J].上海针灸杂志,2014,33(2):151-

152.

- [16] 孙琦,孙忠人,张秦宏,等. 艾灸对大鼠创伤皮肤组织血管内皮细胞和血管内皮生长因子表达的影响[J]. 中国针灸,2014,34(7):679-684.
- [17] 孙忠人,王迪,尹洪娜,等.艾灸对大鼠皮肤创伤成纤维细胞和 KGF 表达的影响[J].针灸临床杂志,2014,30(4):70-72.
- [18] 乔海元. 艾灸对肛裂术后创面愈合的促进作用观察 [J]. 大家健康(中旬版),2014(4):47-47.
- [19] 张雪杰,施健,刘学文. 肢体远隔缺血预适应对缺血性脑血管病患者血清脑源性神经营养因子和基质金属蛋白酶-9水平的影响[J]. 中国老年学杂志,2017,37(9);2157-2159.

(收稿日期 2017-11-23) (本文编辑:石俊强)

(上接第401页)

- [11] Song LX, Wang HM, Guo XQ, et al. A comparative study on the binding behaviors of beta-cyclodextrin and its two derivatives to four fanlike organic guests [J]. J Org Chem, 2008, 73 (21): 8305-8316. DOI: 10. 1021/jo801436h.
- [12] Singh AP, Cabrer PR, Alvarez-Parrilla E, et al. Complexation of 6-deoxy-6-(aminoethy) amino-β-cyclodextrin with sodium cholate and sodium deoxycholate. Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry 1999; 35:335-348. DOI:10.1023/A:100816752054
- [13] Benesi HA, Hildebrand JH. A Spectrophotometric investigation of the interaction of iodine with aromatic hydro-

- carbons[J]. Journal of the American Chemical Society, 1949,71(8);2703-2707. DOI:10.1021/ja01176a030.
- [14] Dang XJ, Tong R, Li HL. The electrochemistry of the inclusion complex of anthraquinone with β-cyclodextrin studied by means of OSWV [J]. Journal of Inclusion Phenomena and Molecular Recognition in Chemistry, 1996, 24(4):275-286. DOI:10.1007/bf01041113.
- [15] Hapiot F, Tilloy S, Monflier E. Cyclodextrins as supramolecular hosts for organometallic complexes [J]. Chem Rev, 2006, 106 (3): 767-781. DOI: 10. 1021/cr050576c.

(收稿日期 2017-10-09) (本文编辑:石俊强)

・简讯・

我校学报被评为山东省高校学报研究会优秀期刊

为探索高校综合性学术期刊特色化办刊模式,提高新数媒时代编辑人员职业素养,山东省高校学报研究会于2017年11月24日至27日,在福建省古田会议旧址举办了以"学术期刊的专业化与专题化转型"为主题的学术研讨会暨2017年优秀期刊、优秀主编、优秀编辑评选活动。经评审委员会最终评定,我校学报被评为优秀期刊。

本刊编辑部