



# 针刺结合丹红注射液对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用

曾兆禄<sup>1</sup>, 韩继超<sup>2</sup>, 薛云<sup>3</sup>, 马玉奎<sup>3</sup>

(1. 山东省临朐县人民医院, 临朐, 山东 262600; 2. 济南市第一人民医院, 济南, 山东 250011;  
3. 山东省药学院, 济南, 山东 250033)

**【摘要】** 目的 研究针刺结合丹红注射液对大鼠脑缺血再灌注损伤有无保护作用。方法 采用大脑中动脉内栓线阻断法(MCAO)制备大鼠大脑中动脉脑缺血再灌注损伤模型,缺血2 h后将线拔出实现再灌注,分别于再灌注后立刻静脉注射丹红注射液2 mL/kg,并针刺百会、足三里,每天1次,连续3 d,72 h后采用Zea-Longa的5级4分制评分方法进行神经功能评分,TTC染色法测定脑梗死面积,Western blot法检测缺血侧脑皮层中Bcl-2与Bax的蛋白表达。结果 与模型和单用丹红注射液组比较,针刺结合丹红注射液治疗后大鼠神经功能缺陷评分明显降低,脑梗死面积减少,Bcl-2的蛋白表达增多,Bax蛋白表达减少。结论 针刺结合丹红注射液比单用丹红注射液对大鼠脑缺血再灌注损伤具有更明显的保护作用。

**【关键词】** 针刺;脑缺血再灌注损伤;Bcl-2;Bax

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016) 02-0062-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.02.013

## Neuroprotective effect of acupuncture combined with Danhong injection on focal cerebral ischemia/reperfusion injury in rats

ZENG Zhao-lu<sup>1</sup>, HAN Ji-chao<sup>2</sup>, XUE Yun<sup>3</sup>, MA Yu-kui<sup>3</sup>

(1. People's Hospital of Linqu County, Shandong Linqu 262600, China;

2. the first People's Hospital of Jinan, Jinan 250011; 3. Shandong Pharmaceutical Academy, Jinan 250033)

**【Abstract】 Objective** To investigate the neuroprotective effect of acupuncture combined with a Chinese medicine, Danhong injection, on focal cerebral ischemia/reperfusion injury in rats. **Methods** Middle cerebral artery (MCA) occlusion was prepared by putting a nylon suture in the MCA. The MCA blood flow in the animals was restored at two hours after the MCA occlusion by withdrawing the suture to the external carotid artery (ECA). The acupoints "Baihui" (DU20) and "Zusanli" (ST36) were acupunctured and stimulated by twirling the acupuncture needle after reperfusion, and the rats were also administered with Danhong injection by intravenous injection, once every day for three days. Zea-Longa scores were recorded to assess the changes of neurological function. The rats were sacrificed at 72 h after reperfusion. Triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining was used to measure cerebral infarction size. Western blot was used to test the level of Bcl-2 and Bax in the ischemic penumbra. **Results** The acupuncture combined with Danhong injection treatment group displayed markedly lower neurologic deficit scores, reduced ischemic infarct surface, increased expression

[作者简介] 曾兆禄(1971-),男,主管药师,本科,研究方向:针灸理疗。

[通讯作者] 马玉奎(1975-),男,副主任药师,博士,研究方向:新药药理毒理评价。E-mail: yukuima@sina.com。

of Bcl-2 protein, and reduced expression of Bax protein, compared with those in the model group and Danhong injection alone group. **Conclusions** Acupuncture combined with Danhong injection show more significant neuroprotective effect than Danhong injection treatment alone on rat models of cerebral ischemia/reperfusion injury.

**【Key words】** Acupuncture; Danhong injection; Cerebral ischemia/reperfusion injury; B cell lymphoma/leukemia-2; Bcl-2-associated protein

临床上对于缺血性脑血管病的首要治疗原则是尽早重建血液再灌,恢复脑部的血氧供应,使缺血脑组织重新获得营养物质供应并及时地将有害的代谢产物清除掉。重建血液再灌,一方面可使缺血的脑组织及时得到血氧供应,抑制受损脑组织神经细胞死亡,有利于神经元功能的恢复;另一方面可进一步加重缺血脑组织的病理损害,使病情恶化,引起脑缺血再灌注损伤,故防止再灌注损伤是目前治疗缺血性脑血管疾病的重要环节和瓶颈<sup>[1]</sup>。丹红注射液是从丹参和红花中提取的含有丹参素、丹参酚 A 等成分的中药注射液,具有抗炎抗氧化及神经保护作用,临床上被广泛用于急性缺血性脑病<sup>[2]</sup>。但是缺血性脑病发病机理比较复杂,单用一种药物难以取得满意的疗效。针灸作为一种中医疗治方法已经在脑血管病治疗中得到应用<sup>[3]</sup>,但单用疗效有限,治疗作用难以得到证实,这也直接影响了该方法在临床上的应用。本文采用针刺结合丹红注射液的方法研究其对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用,为临床推广应用提供参考依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 动物及饲养环境:SD 大鼠(SCXK(京)2012-0001),雄性,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供。SPF 级环境饲养,室温(20~26)℃,湿度 40%~70%,日温差≤4℃,昼夜明暗交替时间 12 h/12 h。实验动物使用许可证号:SYXK(鲁)2014 0008。

1.1.2 药品与试剂:丹红注射液(菏泽步长制药有限公司提供,批号 130808);Western blot 用抗体 Bcl-2, Bax, GAPDH(美国 Santa Cruz Biotechnology 公司提供);红四氮唑(TTC)(天津市科密欧化学试剂开发中心提供,批号 20100413)。

1.1.3 仪器:HC-3018R 型高速冷冻离心机(科大创新股份有限公司中佳分公司制造);封膜机(美国 Fisher Scientific 制造);SSW-600-2S 型电热恒温水槽(上海博迅实业有限公司医疗设备厂制造);微量加样器(美国艾本德公司制造)。

### 1.2 方法

1.2.1 大鼠局灶性脑缺血再灌注模型的建立<sup>[4]</sup>:大鼠造模前禁食 24 h 不禁水,采用腹腔注射 350 mg/kg 的 10% 水合氯醛麻醉后将大鼠仰卧固定于手术台上,剪去切口部位的被毛,切开颈部正中部位的皮肤,分离暴露右侧颈总动脉(CCA),向上分离右颈外动脉(ECA)远端 1 cm,结扎 ECA 分支,在近 CCA 分叉处结扎 ECA,用动脉夹夹闭 CCA 近心端,用眼科剪在 ECA 结扎处与分叉处之间做一切口,将栓线自切口处插入,收紧线结,将动脉夹松开,将尼龙线顺 ECA 经颈内动脉(ICA)慢慢送入颅内,插入深度为(18.5±0.5)mm,阻断 MCA 的血供,收紧丝线,将线尾端暴露于切口外,层层缝合切口。阻断血流 2 h 后,同法将再次麻醉大鼠,将尼龙线栓慢慢退出至有阻力感,使其头端回到 CCA 分叉处,大脑中动脉重新获得血液供应,实现再灌注,剪断线栓,完成 MCAO 模型制备。假手术组仅进行右侧颈总动脉、颈内动脉、颈外动脉的分离,不进行栓塞。

1.2.2 动物分组及给药:选取造模成功大鼠 40 只,按照神经功能缺陷评分均衡原则分为 4 组,分别为假手术组、模型组、丹红注射液 2 mL/kg 组和针刺结合丹红注射液 2 mL/kg 组,造模后丹红注射液组静脉给予丹红注射液,另一组给予丹红注射液后针刺百会穴和左侧足三里穴,得气后接脉冲电疗仪,采用疏密波,频率 2~100 Hz,强度 2 mA,每次 20 min<sup>[5]</sup>。每天给药或针刺 1 次,连续 3 d。假手术组和模型组给予相同容积的生理盐水。

1.2.3 神经功能缺陷评分:脑缺血 2 h 再灌注 72 h 后,参考 Zea-Longa<sup>[4]</sup>的评分标准对实验大鼠进行 5 级 4 分制神经功能评分,各个分值之间按照观察的具体情况可增减 0.5 分。评分标准为 0 分:未观察到明显的神经功能缺失症状;1 分:提尾悬空时梗死半球对侧前肢不能完全伸展;2 分:行走时向偏瘫侧及左侧旋转;3 分:自主运动时向左侧倾倒;4 分:不能自发行走,意识水平降低。MCAO 模型组 1~3 分提示模型复制成功,0 分、4 分或死亡者剔除。

1.2.4 脑缺血面积测定<sup>[6]</sup>:10% 水合氯醛腹腔注

射麻醉大鼠后,打开胸腔暴露心脏,用 4℃ 预冷生理盐水快速进行心脏灌注。取脑经生理盐水漂洗后置 -20℃ 冰箱中冷冻 10 min,然后将以 2 mm 为间隔进行脑组织冠状切片,置于 2% TTC(2,3,5-氯化三苯基四氮唑)生理盐水溶液中,37℃ 避光染色 30 min。待显色后置于 4% 多聚甲醛溶液中固定 24 h 后对采用图像处理软件(Adobe Photoshop 7.0)对缺血面积进行处理和统计,计算缺血面积。最终脑缺血面积以占总面积的百分率表示。

1.2.5 Western blot 检测大鼠缺血侧脑皮质 Bcl-2、Bax 蛋白水平:取 50 mg 脑组织,剪碎,用预冷 PBS 液洗涤两遍,加入 300  $\mu$ L RIPA 组织裂解液和 3  $\mu$ L PMSF,超声波粉碎,置冰上裂解 20 min。4℃ 离心,15 000 r/min,20 min。吸取上清液采用 BCA 法测定组织蛋白浓度。用 12% 分离胶和 5% 积层胶灌胶后,将凝胶置电泳槽中,上下游均加入电泳缓冲液。取蛋白样品上样。Bcl-2、Bax 每孔均上样 50  $\mu$ g,同时对称上样 marker。电泳开始电压为 30 V,当溴酚蓝进入分离胶后,将电压调至 100 V,电泳 3.5 h 后切断电源。取下凝胶用于转膜。分别剪取 6 块滤纸和 1 块硝酸纤维素膜(NC 膜),浸入转移缓冲液中将塑料架放入含有转移缓冲液的托盘中,按负极到正极的顺序将转移海绵,滤纸,PAGE 胶,NC 膜,滤纸,转移海绵依次放置在塑料架上,夹上转移夹,放入转移槽中。胶靠负极,NC 膜靠正极。接通电源,电压 100 V,冷室转膜 1 h。转移结束后,将 NC 膜浸入丽春红染液中染色后将 NC 膜放入培养皿中,加 5% 脱脂奶粉,4℃ 封闭过夜。平皿中加入一抗,放入 NC 膜,4℃ 摇床过夜后加二抗反应。反应完毕后将 ECL 显色液加到 NC 膜的正面,反应 1 min,进入暗室,将 NC 膜放入 Kodak 增感屏,于 NC 膜正上方放置胶片,曝光,显影,定影。显影后可见密度强度不同的条带。将显色的胶片图像输入凝胶分析系统,应用 ID Image Analysis Software 进行表达强度测定。

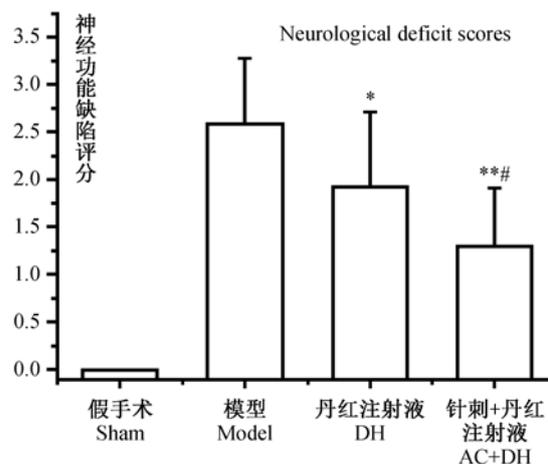
1.2.6 统计学方法:采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析。各组数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较用  $t$  检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 针刺结合丹红注射液对 MCAO 大鼠神经功能缺陷评分的影响

与模型组比较,给予丹红注射液后大鼠的神经功能缺陷有一定程度减轻,而结合针刺后神经功能

缺陷明显减轻,与模型组和单用丹红注射液组比较差异均有显著性( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ),说明针刺结合丹红注射液能明显改善模型大鼠神经功能缺陷,其效果好于单用丹红注射液。见图 1。



\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs 模型组; #  $P < 0.05$  vs. 丹红注射液组

图 1 针刺结合丹红注射液对 MCAO 大鼠神经功能缺陷评分的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

Note. DH: Danhong injection group. AC + DH:

Acupuncture plus Danhong injection. The same as below.

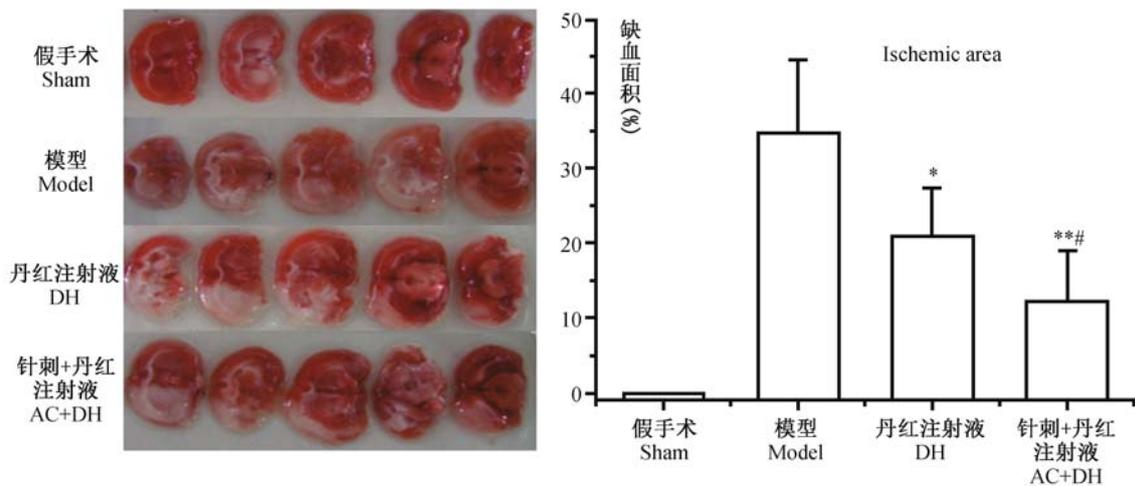
Fig. 1 The effects of acupuncture combined with Danhong injection on the neurological deficit scores of the rats ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ ).

### 2.2 针刺结合丹红注射液对 MCAO 大鼠脑缺血面积的影响

与模型组比较,给予丹红注射液后大鼠脑缺血面积减少,而结合针刺后脑缺血面积减少更明显,与模型组和单用丹红注射液组比较差异均有显著性( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ),说明针刺结合丹红注射液能明显抑制模型大鼠脑缺血,其效果好于单用丹红注射液,见图 2。

### 2.3 针刺结合丹红注射液对 MCAO 大鼠缺血侧脑皮质区 Bcl-2/Bax 蛋白表达水平的影响

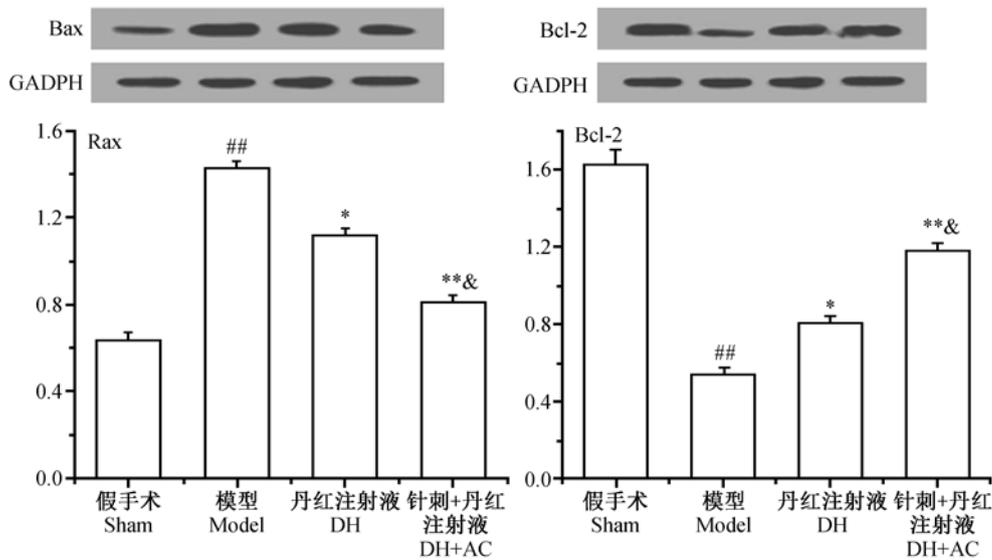
与模型组比较,给予丹红注射液后大鼠脑缺血侧皮质区 Bcl-2 蛋白表达增加,Bax 蛋白表达降低( $P < 0.05$ ),而结合针刺后脑缺血皮质区 Bcl-2 蛋白表达增加更明显,Bax 蛋白表达降低更显著( $P < 0.01$ ),与模型组和单用丹红注射液组比较差异均有显著性( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ),说明针刺结合丹红注射液能更明显抑制模型大鼠脑缺血侧皮质区凋亡相关蛋白的表达,其效果好于单用丹红注射液,见图 3。



\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs. 模型组; # $P < 0.05$  vs. 丹红注射液组

图 2 针刺结合丹红注射液对 MCAO 大鼠脑缺血面积的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Fig. 2 The effects of acupuncture combined with Danhong injection on infarct volume in the rat brains ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ ).



( $\bar{x} \pm s, n = 5$ ) \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs. 模型组; ## $P < 0.01$  vs. 假手术组; & $P < 0.05$ , vs. 丹红注射液组

图 3 针刺结合丹红注射液对 MCAO 大鼠缺血侧脑皮质区 Bcl-2/Bax 蛋白表达水平的影响

Fig. 3 Effect of acupuncture combined with Danhong Injection on Bcl-2 and Bax expression levels in the ischemic penumbra cortex. ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

### 3 讨论

大脑中动脉栓塞 (MCAO) 模型是目前用来评价急性慢性脑缺血再灌注损伤药物最为经典的模型, 此模型与人类脑卒中病理生理过程最为接近。通过闭塞大脑中动脉 2 h 后再复灌, 使大脑中动脉供应区的血流先减少或全无后再恢复血液和氧气供

应, 造成脑组织缺血缺氧, 能量代谢障碍, 导致神经细胞坏死或凋亡, 与临床局灶性脑缺血的发病过程和机制基本类似。此模型可以用来定性、定量地观察缺血脑组织的病理生理变化和评价治疗的疗效。神经功能缺陷评分和脑梗死面积是评价脑缺血再灌注损伤程度的重要指标之一。以往研究发现, Bcl-2 表达高低与脑缺血再灌注损伤的严重程度密

切相关,在缺血再灌注损伤的动物模型中,Bcl-2 表达量与神经细胞凋亡数量呈负相关,Bcl-2 基因被敲除后,神经功能缺陷变严重,梗死面积会扩大,会加剧脑缺血再灌注后的神经细胞损伤<sup>[7]</sup>。Bax 被称为“死亡基因”,表达过多则促进细胞凋亡,加重缺血再灌注损伤。故脑缺血再灌注损伤后 Bcl-2 和 Bax 表达的比例决定着细胞在凋亡信号的作用下是否出现凋亡及凋亡的发生率,当 Bax 蛋白表达占优势时促进细胞发生凋亡,而当 Bcl-2 蛋白表达占优势时则抑制细胞凋亡<sup>[8]</sup>。

本实验采用了 Zea-Longa 评分法对神经功能缺陷进行评分,采用可以快速对梗塞范围能够直观定量的 TTC 染色法对梗死区域进行检测,Western blot 法检测了模型大鼠缺血侧脑皮质区 Bcl-2 和 Bax 蛋白水平,探讨针刺结合丹红注射液对脑缺血再灌注的神经保护作用。结果显示与假手术组比较,模型组大鼠神经功能缺陷评分明显升高,脑缺血面积明显增加,脑组织内 Bax 蛋白表达显著升高,而 Bcl-2 蛋白表达显著降低,此实验结果与文献报道一致<sup>[9]</sup>,充分证实了模型复制成功。与模型组比较,丹红注射液组大鼠神经功能缺陷评分降低,缺血面积减少,脑缺血皮质中 Bcl-2 蛋白表达升高,而 Bax 蛋白表达降低。同时应用针刺后,以上指标的变化更明显,且与丹红注射液组比较均有显著性差异。以上结果提示,丹红注射液对脑缺血再灌注损伤具有一定的保护作用,但结合针刺后效果更明显,故临床上对于脑缺血性疾病的治疗可静脉滴注丹红

注射液后再给予针刺治疗,可进一步提高疗效。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Eltzschig HK, Eckle T. Ischemia and reperfusion — from mechanism to translation [J]. *Nat Med*, 2011, 17(11): 1391 - 1401.
- [ 2 ] 曹向阳, 徐建辉, 曹彪. 丹红注射液的临床应用研究进展 [J]. *中西医结合心血管病杂志*, 2011, 8(3): 349 - 351.
- [ 3 ] 曹健, 周美启. 近三年针刺防治脑血管疾病作用机制研究概况 [J]. *安徽中医学院学报*, 2008, 27(5): 61 - 64.
- [ 4 ] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84 - 91.
- [ 5 ] 李忠仁. 实验针灸学 [M]. 中国中医药出版社, 2008: (2): 255 - 256.
- [ 6 ] Hou J, Tian J, Jiang W, et al. Therapeutic effects of SMND-309, a new metabolite of salvianolic acid B, on experimental liver fibrosis [J]. *Eur J Pharmacol*, 2011, 650(1): 390 - 395.
- [ 7 ] Antezana DF, Clatterbuek RE, Alkayed NJ, et al. High-dose ibuprofen for reduction of striatal infarcts during middle cerebral artery occlusion in rats [J]. *J Neurosurg*, 2003, 98(4): 860 - 866.
- [ 8 ] Li JS, Zhang W, Kang ZM, et al. Hyperbaric oxygen preconditioning reduces chemia reperfusion injury by inhibition of apoptosis via mitochondrial pathway in rat brain [J]. *Neuroscience*, 2009, 159(4): 309 - 1315.
- [ 9 ] He Y, Wan HT, Du YG, et al. Protective effect of Danhong injection on cerebral ischemia-reperfusion injury in rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 144(2): 387 - 394.

[ 修回日期 ] 2015-11-17