

电针对脑缺血再灌注模型大鼠血清白介素的影响

王平¹, 穆艳云², 程洁², 沈洁², 沈梅红², 陈霞², 李茜², 孙永², 龚美蓉²

1 青岛即墨市人民医院中医科, 山东 266200, 中国

2 南京中医药大学第二临床医学院, 江苏 210046, 中国

【摘要】目的：观察电针对脑缺血再灌注模型大鼠血清白介素-6(interleukin-6, IL-6)、IL-8 和 IL-10 的影响, 探讨电针防治缺血性脑病的作用机理。**方法：**雄性 Sprague Dawley (SD) 大鼠按随机数字表分为假手术组、模型组和电针组, 以上三组又各分为 6 h 和 24 h 两个亚组。假手术组仅予手术血管分离, 插入线栓, 不进行治疗。模型组及电针组采用改良 Longa 线栓法复制大脑中动脉局灶性脑缺血再灌注模型。模型组仅造模, 不作任何治疗; 电针组治疗取百会(GV 20)及大椎(GV 14), 采用电针疏密波刺激 30 min。应用 Elisa 法测定各组大鼠 IL-6、IL-8 和 IL-10 水平。**结果：**脑缺血再灌注后 6 h, 模型组血清 IL-6、IL-8 及 IL-10 水平均较假手术组高($P<0.01$, $P<0.05$, $P<0.05$); 电针组血清 IL-8 水平低于模型组($P<0.05$), 血清 IL-6 及 IL-10 水平与模型组无统计学差异。脑缺血再灌注后 24 h, 电针组血清 IL-6 及 IL-8 水平低于模型组(均 $P<0.05$), 血清 IL-10 水平三组比较均无统计学差异。**结论：**电针早期介入脑缺血损伤可以调节血清 IL-6、IL-8 水平。**【关键词】**针刺疗法; 电针; 脑缺血; 再灌注损伤; 白介素-6; 白介素-8; 白介素-10; 大鼠**【中图分类号】**R2-03 **【文献标志码】**A

白细胞介素家族因子在缺血性脑血管病发病中的作用受到较多关注^[1-2], 目前临床观察研究涉及的因子有白介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)^[3]、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor, TNF- α)^[4]、IL-6^[5-6]、IL-8^[7]、IL-10^[8-10]等均有涉及。临床上观察患者白介素因子的血清水平变化, 并分析它们在脑缺血性脑损伤中的作用及其与神经功能损伤的关系, 认为其与发病的严重程度及神经功能损伤具有相关性。IL-6、IL-8 是致炎因子, IL-10 是抗炎因子, 目前相关的实验研究与临床研究结果不完全吻合。有研究认为 IL-6、IL-10 在缺血性脑损伤中可能有脑保护作用^[10-11]。大量临床及实验研究显示针刺促进缺血性脑血管病神经功能恢复的作用肯定。本次实验在前期工作^[12-15]基础上, 进一步观察针刺治疗对脑缺血再灌注模型大鼠血清 IL-6、IL-8、IL-10 水平的影响, 以探索针刺在缺血性脑损伤后康复中的作用机理。

1 材料与方法

1.1 实验动物

清洁级健康雄性 Sprague Dawley (SD) 大鼠, 8 月龄, 体重(280 $\pm$ 20) g, 购自浙江省实验动物中心, 许可证号: SCXK(浙)2008-0033。实验过程中对动物的处置符合实验动物伦理学标准。在 25℃ 下适应性喂养 1 星期后用于实验。

1.2 主要试剂和仪器

G6805 型电针仪 (上海医疗仪器厂, 中国上海); HH-4 数显恒温水浴锅 (国华电器有限公司, 中国常州)。DG5033A 酶标仪 (华东电子

集团医疗装备有限责任公司, 中国南京)。IL-6、IL-8、IL-10 Elisa 测定试剂盒 (建成生物工程公司, 中国南京)。严格按照试剂盒说明操作。

1.3 分组

实验大鼠按随机数字表法随机分为假手术组和造模组。假手术组分为两个时相: 6 h 和 24 h 各 8 只。将成功制作出的脑缺血再灌注模型实验大鼠按相关文献进行神经缺损综合评分^[16], 凡 2 分以上者采用随机数字表随机分为模型组和电针组, 两组各分为 6 h 和 24 h 两个亚组。模型组和电针组两个时段最终得到符合评分标准大鼠各 9 只。不足 2 分者, 按实验动物伦理学标准处死。

1.4 模型制备

参考相关文献^[17-18]中的线栓法加以改良制作大鼠大脑中动脉缺血模型, 与本课题组以往方法相同^[11-13]。再灌注 2 h 后进行神经行为学评分。用 10% 水合氯醛((每 100 g 体重 0.35 mL)腹腔麻醉大鼠, 将麻醉后大鼠仰卧位固定在手术台上。常规消毒后, 在颈部正中作一个约 2 cm 长的切口, 钝性分离右侧颈总动脉、颈外动脉、颈内动脉及其分支。结扎相应部位后, 于颈外动脉距分叉部 0.4 cm 左右剪一斜口, 插入沾以石蜡的直径为 0.26 mm 的尼龙线线栓, 将尼龙线线栓推进到大脑中动脉开口处[约 (18 $\pm$ 2) mm]。结扎、缝合切口, 外留栓线 1 cm 左右。缺血 2 h 后, 抽出尼龙线线栓至颈总动脉分叉处(有阻力感), 实现再灌注。再灌注 2 h 后进行神经行为学评分。根据神经缺损综合评分^[16], 得 2 分或以上者视为造模成功。

神经缺损综合评分标准如下:

0 分: 活动无异常, 无缺损体征。

1 分: 右侧 Homer's 征阳性。

2 分: 提尾悬空, 左前肢屈曲内收。

3 分: 自主运动, 身体向左(偏瘫侧)划圈。

1.5 分组处理

1.5.1 假手术组

假手术组大鼠只做手术血管分离, 不插入线栓, 不给予治疗。

1.5.2 模型组

模型且大鼠仅造模, 不给予电针治疗。

1.5.3 电针组

模型制作同模型组, 于造模后 2 h 进行电针治疗。

穴位: 大椎、百会。

操作: 穴位定位标准依据《实验针灸学》所附大鼠穴位图谱^[19]。针具为苏州产华佗牌不锈钢针毫针, 直径 0.25 mm, 长 25 mm。常规消毒后, 向尾部方向平刺百会, 向前约 30° 角斜刺大椎, 进针深度均 0.5 寸。捻转刺激 30 s 后, 接 G6805 型电针仪。选疏密波, 频率 2 Hz /15 Hz, 电流强度 1-3 mA, 电压 1-3 V, 刺激强度以保持针刺局部轻微抖动为度, 每次刺激 30 min。

电针组分 6 h 和 24 h 两个时相组。6 h 时相组仅予一次电针治疗, 24 h 时相组大鼠处死后, 再进行一次电针治疗。

各组 6 h 和 24 h 两个时相组大鼠分别在脑缺血再灌注 6 h 和 24 h 时处死。

1.6 测量参数

1.6.1 神经行为学评分

在脑缺血再灌注 6 h、24 h 分别依据以下相关神经行为学评分标准, 对大鼠进行评分^[18]。

自发活动 (0-3 分): 观察笼中 5 min, 观察其靠近笼壁及探究环境的能力。

四肢运动的对称性 (0-3 分): 提尾观察四肢运动的对称性。

两前肢运动的对称性 (0-3 分): 将大鼠置于桌子边缘, 保持两后肢腾空, 观察其两前肢运动的对称性。

攀附力 (1-3 分): 将大鼠置于笼壁上观察其攀爬能力, 提尾拉下时感受其攀附力。

本体感觉 (1-3 分): 用钝棒触摸其两侧, 观察其对刺激的反应。

触须反应 (1-3 分): 从动物后面用钝棒触胡须, 观察其反应。

评分在 3-18 分之间, 18 分者为正常。评分越低, 神经行为学异常越严重。

1.6.2 血清 IL-6、IL-8、IL-10 水平

6 h 和 24 h 两个时相组动物分别于脑缺血再灌注 6 h、24 h 后抽取腹主动脉血 5 mL, 室温静置 10 min 后, 以 4 300 转/分离心, 取上清液, 置 -20℃ 冰箱存放。

1.7 统计学处理

所有数据采用 SPSS 16.0 软件进行统计学处理。计量资料以均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 以 One-way ANOVA 做方差比较。若方差齐性, 用最小显著差异 (least significant difference, LSD) 行样本均数间的多重比较; 方差不齐时用 Dunnett's T3 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 神经行为学评分比较

脑缺血再灌注 6 h 时, 模型组评分最低, 电针组评分高于模型组, 二者有统计学差异 ($P < 0.01$); 模型组、电针组与假手术组相比, 均有统计学差异 (均 $P < 0.01$)。脑缺血再灌注 24 h 时, 模型组、电针组评分均有所升高; 模型组仍最低, 与假手术组及电针组均有统计学差异 (均 $P < 0.01$); 电针组与假手术组有统计学差异 ($P < 0.01$, (表 1))。

表 1. 各组神经行为学评分比较 ($\bar{x} \pm s$, 分)

组别	n	6 h	24 h
假手术组	8	17.38±0.52	17.5±0.53
模型组	9	5.11±1.36 ¹⁾	8.56±1.67 ¹⁾
电针组	9	8.67±1.12 ¹⁾²⁾	13.11±1.05 ¹⁾²⁾

注: 与假手术组比较, 1) $P < 0.01$; 与同期模型组比较, 2) $P < 0.01$

2.2 血清 IL-6 水平比较

脑缺血再灌注 6 h 时, 模型组血清 IL-6 水平最高, 与假手术组相比有统计学差异 ($P < 0.01$), 与电针组相比无统计学差异; 假手术组与电针组相比无统计学差异。脑缺血再灌注 24 h 时, 各组血清 IL-6 水平均下降, 模型组仍最高, 与假手术组相比无统计学差异, 与电针组相比有统计学差异 ($P < 0.05$), 假手术组与电针组无统计学差异。模型组、电针组自身 6 h、24 h 比较均有统计学差异 (均 $P < 0.01$), 假手术组自身 6 h、24 h 比较无统计学差异 (表 2)。

表 2. 各组血清 IL-6 水平比较 ($\bar{x} \pm s$, ng/L)

组别	n	6 h	24 h
假手术组	8	176.79±21.83	165.67±18.95
模型组	9	209.47±3.42 ¹⁾	180.7±14.11 ²⁾
电针组	9	194.52±23.37	151.43±33.1 ²⁾³⁾

注：与假手术组比较，1) $P<0.01$ ；与同组 6 h 比较，2) $P<0.01$ ；与同期模型组比较，3) $P<0.05$

2.3 血清 IL-8 水平比较

脑缺血再灌注 6 h 时，模型组血清 IL-8 水平最高，与假手术组相比有统计学差异 ($P<0.01$)，与电针组相比有统计学差异 ($P<0.05$)；假手术组与电针组相比无统计学差异。脑缺血再灌注 24 h 时，各组血清 IL-8 均下降，模型组仍最高，与电针组相比有统计学差异 ($P<0.05$)，与假手术组相比无统计学差异，假手术组与电针组无统计学差异。模型组、电针组自身 6 h、24 h 比较均有统计学差异 ($P<0.01$, $P<0.05$)。假手术组自身 6 h、24 h 比较无统计学差异 (表 3)。

表 3. 各组血清 IL-8 水平比较 ($\bar{x} \pm s$, ng/L)

组别	n	6 h	24 h
假手术组	8	176.06±23.64	164.88±14.13
模型组	9	198.3±14.15 ¹⁾	177.52±13.89 ³⁾
电针组	9	178.44±13.6 ²⁾	154.63±28.05 ²⁾⁴⁾

注：与假手术组比较，1) $P<0.05$ ；与同期模型组比较，2) $P<0.05$ ；与同组 6 h 比较，3) $P<0.01$, 4) $P<0.05$

2.4 血清 IL-10 水平比较

脑缺血再灌注 6 h 时，模型组血清 IL-10 水平最高，与假手术组相比有统计学差异 ($P<0.05$)，与电针组相比无统计学差异；假手术组与电针组相比有统计学差异 ($P<0.05$)。脑缺血再灌注 24 h 时，各组血清 IL-10 均下降，三组之间无统计学差异。三组自身 6 h、24 h 比较均无统计学差异 (表 4)。

表 4. 各组血清 IL-10 水平比较 ($\bar{x} \pm s$, ng/L)

组别	n	6 h	24 h
假手术组	8	92.31±16.06	87.22±5.13
模型组	9	106.00±11.84 ¹⁾	98.88±15.29
电针组	9	105.02±8.32 ¹⁾	90.76±21.3

注：与假手术组比较，1) $P<0.05$

3 讨论

目前临床研究认为血清中 IL-6、IL-8、IL-10 水平的变化与脑缺血后损伤病情有相关性，在急

性期程升高趋势，随时间延长下降，并与严重程度有一定的相关性，认为血清 IL-6、IL-8 及 IL-10 水平是急性脑梗塞早期脑损伤的标志，血清 IL-6、IL-8 是致炎性因子，IL-10 是抗炎性因子。这三种白介素也可用于判断脑梗塞患者的病情及预后。白介素因子的血清水平变化提示脑缺血损伤可应激性产生全身性免疫反应，有学者认为是亚临床炎症状态^[20-21]。以上结果均为血清细胞因子水平与脑梗死关系的研究。

神经行为学评分结果显示电针组神经功能优于模型组^[22-24]。与我们以往研究结果相似^[12-14]，提示电针治疗可能对脑功能有保护作用。

血清白介素因子结果显示，模型组大鼠三种细胞因子血清水平在 6 h 均较假手术组升高，提示脑缺血损伤促使三种细胞因子水平在血清中升高，中枢脑缺血损伤应激可使机体应激性产生全身反应；电针治疗组则三种因子血清水平均较模型组低，有统计学差异，这提示尽早介入电针治疗有助于调节三种细胞因子血清水平；在 24 h 时，三种细胞因子均有下降趋势，电针治疗组 IL-6、IL-8 血清水平均较模型组低，有统计学差异；且模型组、电针组 IL-6、IL-8 水平两个时相的下降自身比较均有统计学差异。提示电针介入可以调节血清 IL-6、IL-8 水平，调节因脑缺血损伤应激而致的全身性免疫变化情况；相对来说，电针对致炎因子 IL-6、IL-8 的抑制程度较显著，对抗炎因子 IL-10 的促进程度不如抑制致炎因子。

虽然 IL-6 是致炎因子，但许多动物实验脑组织研究显示，脑缺血损伤后 IL-6 是起保护脑神经元作用的因子^[25-28]，与临床血清观察的结果推测不吻合。本课题组前期研究结果显示脑缺血再灌注后 6 h 至 24 h 大鼠脑组织内 IL-6 表达变化趋势是下降的，而电针治疗组的表达高于模型组^[29]。本次实验结果血清 IL-6 水平趋势也是下降的，但电针治疗组在 24 h 时 IL-6 水平是低于模型组的。IL-6 在脑内表达水平与血清水平变化不一致。笔者认为，这可能与脑组织是缺血的直接受害者有关，脑组织缺血后应激反应结果不同同于脑缺血损伤后的机体应激全身性反应结果。因此血清中细胞因子的变化并不能与脑组织内细胞因子的变化简单混为一谈，也不能简单的从血清水平角度完全确定 IL-6 一定是有脑损伤作用的。

我们前期研究显示电针治疗缺血性脑损伤有良好的脑功能保护作用^[12-14], 结合本次实验结果, 笔者认为电针对血清中致炎因子 IL-6、IL-8 的抑制程度较显著, 对抗炎因子 IL-10 的调节程度相对不显著。本次实验结果提示调节周围血清白介素因子水平可能与电针脑保护作用有关, 有全身性调控作用, 但具体免疫调节途径尚需进一步观察。

参考文献

- [1] Persson J, Folkersen L, Ekstrand J, Helleberg J, Gabrielsen A, Lundman P, Hedin U, Paulsson-Berne G. High plasma adiponectin concentration is associated with all-cause mortality in patients with carotid atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 2012, 225(2): 491-496.
- [2] Zeng L, Wang Y, Liu J, Wang L, Weng S, Chen K, Domino EF, Yang GY. Pro-inflammatory cytokine network in peripheral inflammation response to cerebral ischemia. *Neurosci Lett*, 2013, 548: 4-9.
- [3] Chen XD, Zhen J, Zhao Y, Feng YL, Ma XL. 脑梗死患者血清白介素-6 白介素-8 白介素 1 β 及白介素-18 水平的研究. *Inner Mongolia Med J*, 2012, 44(11): 1358-1359.
- [4] Zhou W, Wang LP, Liu H, Bian Y. Influence of scalp acupuncture on serum tumor necrosis factor in patients with acute cerebral infarction. *Shanghai Zhenjiu Zazhi*, 2002, 21(1): 11-12.
- [5] Ye F, Luo JQ, Chen J, Ye SH, Wu RD. 血清 NSE、IL-6 和 IL-8 水平与急性脑梗死的关系. *浙江实用医学*, 2012, 17(3): 192-193.
- [6] Qian LL, Jia K. 醒脑静注射液对急性脑梗死患者脑保护作用及白介素-6、白介素-8 水平的影响. *中成药*, 2013, 35(8): 1633-1636.
- [7] Jin ML, Yang GZ. 血浆白介素-8 与急性脑梗死的相关性探讨. *中国医学创新*, 2012, 9(14): 56-57.
- [8] Chen BL, Li XB, Li J, Ma L. 短暂性脑缺血发作与 IL-6、IL-8 和 IL-10 的关系. *脑与神经疾病杂志*, 2013, 21(4): 247-250.
- [9] Zhang CG, Qu CH, Yang H, Liu WH. 急性脑梗死患者血清 IL-17 和 IL-10 的动态变化研究. *Chin J Appl Physiol*, 2014, 30(1): 36-37.
- [10] Ma J, Yan FL. Role of IL-10 in stroke-induced immunodepression syndrome. *Chin J Cerebrovas Dis*: electronic edition, 2011, 5(5): 49-54.
- [11] Zhang Q, Wang YF, Zhang YB, Li JM. Inflammatory biomarkers of stroke. *Chin J Stroke*, 2013, 8(4): 276-279.
- [12] Mu YY, Shen MH, Cheng J, Xia YB, Liu XH, Xiang XR. Effect of electroacupuncture on interleukin-6 expression in hippocampus of cerebral ischemia. *Liaoning Zhongyi Zazhi*, 2013, 40(4): 797-800.
- [13] Shen MH, Xiang XR, Li Y, Pan JL, Ma C, Li ZR. Effect of electroacupuncture on expression of γ -glutamylcysteine synthetase protein and mRNA in cerebral cortex in rats with focal cerebral ischemia-reperfusion. *Zhen Ci Yan Jiu*, 2012, 37(1): 25-29.
- [14] 沈梅红, 李成, 李忠仁. 电针对脑缺血再灌注模型大鼠的 GSH 含量、GSH-Px 及 GR 活性的影响. *南京中医药大学学报*, 2011, 27(2): 137-139.
- [15] Wu WZ, Li ZR, Cheng J, Shen MH, Zhou JL, Wu XL. Effect of electroacupuncture on serum iNOS and HO-1 in patients with acute cerebral infarction of wind-phlegm obstructing collaterals type. *Shanghai Zhenjiu Zazhi*, 2012, 31(12): 858-859.
- [16] Kuluz JW, Prado RJ, Dietrich WD, Schleien CL, Watson BD. The effect of nitric oxide synthase inhibition on infarct volume after reversible focal cerebral ischemia in conscious rats. *Stroke*, 1993, 24(12): 2023-2029.
- [17] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91.
- [18] Garcia JH, Wagner S, Liu KF, Hu XJ. Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats statistical validation. *Stroke*, 1995, 26(4): 627-634.
- [19] 李忠仁. 实验针灸学. 北京: 中国中医药出版社, 2005: 255-257.
- [20] Senn JJ, Klover PJ, Nowak IA, Zimmers TA, Koniaris LG, Furlanetto RW, Mooney RA. Suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3), a potential mediator of interleukin-6-dependent insulin resistance in hepatocytes. *J Biol Chem*, 2003, 278(16): 13740-13746.
- [21] Krogh-Madsen R1, Plomgaard P, Keller P, Keller C, Pedersen BK. Insulin stimulates interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha gene expression in human

- subcutaneous adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2004, 286(2): E234-E238.
- [22] Ge LB, Fang C, Xu MS, Xu J, Li CZ. Effects of electroacupuncture on the ability of learning and memory in rats with ischemia-reperfusion injury. *J Acupunct Tuina Sci*, 2009, 7(1): 3-7.
- [23] Dong ZH, Fang JQ, Shao XM. Advances in the study of mechanisms for acupuncture-moxibustion prevention and treatment of ischemia-reperfusion injury. *Shanghai Zhenjiu Zazhi*, 2011, 30(12): 877-880.
- [24] Liu CY, Xu MS, Ge LB. Effects of electroacupuncture plus dopamine D1 receptor antagonist on somatosensory evoked potentials and behavioral changes in rats with cerebral ischemia-reperfusion. *J Acupunct Tuina Sci*, 2012, 10(3): 133-137.
- [25] Gertz K, Kronenberg G, Kälin RE, Baldinger T, Werner C, Balkaya M, Eom GD, Hellmann-Regen J, Kröber J, Miller KR, Lindauer U, Laufs U, Dirnagl U, Heppner FL, Endres M. Essential role of interleukin-6 in post-stroke angiogenesis. *Brain*, 2012, 135(Pt 6): 1964-1980.
- [26] Nakamachi T, Tsuchida M, Kagami N, Yofu S, Wada Y, Hori M, Tsuchikawa D, Yoshikawa A, Imai N, Nakamura K, Arata S, Shioda S. IL-6 and PACAP receptor expression and localization after global brain ischemia in mice. *J Mol Neurosci*, 2012, 48(3): 518-525.
- [27] Suzuki S, Tanaka K, Suzuki N. Ambivalent aspects of interleukin-6 in cerebral ischemia: inflammatory versus neurotrophic aspects. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2009, 29(3): 464-479.
- [28] Gravante G, Ong SL, Metcalfe MS, Sorge R, Sconocchia G, Orlando G, Lloyd DM, Dennison AR. Cytokine response to ischemia/reperfusion injury in an vivo perfused porcine liver model. *Transplant Proc*, 2009, 41(4): 1107-1112.
- [29] Mu YY, Shen HM, Cheng J, Xia YB, Liu XH, Xiang XR. Effect of electroacupuncture on interleukin-6 expression in hippocampus of cerebral ischemia-reperfusion rats. *Liaoning Zhongyi Zazhi*, 2013, 40(4): 797-799.

作者简介：王平，医学学士，主治医师

通信作者：穆艳云，医学博士，副教授。

E-mail: yanyunmu@sina.com