

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.09.001

文章编号: 1005-8982 (2018) 09-0001-05

基础研究 · 论著

十二井穴放血对不同程度颅脑创伤大鼠 脑水肿及线粒体生物合成的影响*

沈彤¹, 张赛², 涂悦², 陈旭义², 吴焕成³

[1. 天津中医药大学第一附属医院 推拿科, 天津 300193; 2. 武警后勤学院
附属医院脑科中心 (天津市神经创伤修复重点实验室), 天津 300162;
3. 天津市北辰医院 脑系科, 天津 300400]

摘要: **目的** 探讨十二井穴放血对颅脑创伤 (TBI) 大鼠脑水肿及线粒体生物合成的影响。**方法** 将 56 只 SD 大鼠随机等分为 7 组, 即轻度 TBI 组、轻度 TBI 加井穴放血组、中度 TBI 组、中度 TBI 加井穴放血组、重度 TBI 组、重度 TBI 加井穴放血组和对照组, 每组 8 只。应用电子控制性脑皮质撞击仪, 轻度、中度、重度 TBI 组的打击深度分别为 1、3 和 4 mm。对照组仅开骨窗后缝合皮肤, 不进行打击。井穴放血通过 1 ml 注射器针头于大鼠双侧前肢趾端的十二井穴点刺出血完成, 出血量为每穴 10 μ l, 每 12 h 进行 1 次放血。手术后 72 h, 进行神经功能损伤评分 (mNSS), 随后取 10 mg 损伤周围脑组织, qRT-PCR 检测过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子 1 α (PGC-1 α)、线粒体转录因子 A (TFAM) 基因的表达和线粒体 DNA (mtDNA) 拷贝数, 剩余脑组织进行脑含水量测量。**结果** TBI 后大鼠的 mNSS 评分均高于对照组, 且随着 TBI 严重程度的增加, 评分依次增高 ($P < 0.05$), 且轻、中度 TBI 组大鼠在应用井穴放血疗法后 mNSS 评分与相应的单纯损伤组比较降低 ($P < 0.05$); TBI 模型大鼠的 PGC-1 α 和 TFAM 基因表达水平以及 mtDNA 拷贝数均高于对照组 ($P < 0.05$); 轻度 TBI 组大鼠在应用井穴放血疗法后, mtDNA 拷贝数高于相应的未应用放血疗法的大鼠 ($P < 0.05$), 中度 TBI 组大鼠在应用放血疗法后 PGC-1 α 基因表达水平和 mtDNA 拷贝数升高 ($P < 0.05$), 轻、重度 TBI 组大鼠在应用井穴放血疗法后, 虽然 PGC-1 α 和 TFAM 基因表达水平均有升高趋势, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$); TBI 后各组大鼠脑组织含水量与对照组比较均增高, 且中度 TBI 组大鼠在应用井穴放血疗法后脑组织含水量与相应的单纯损伤组大鼠比较降低 ($P < 0.05$)。**结论** 井穴放血可能通过激活 PGC 及下游通路, 促进 mtDNA 的生物合成, 从而增强损伤脑组织的能量供应, 进而改善脑水肿程度, 发挥脑保护作用。

关键词: 颅脑创伤; 十二井穴; 线粒体 DNA; 神经功能损伤评分; 放血疗法

中图分类号: R642

文献标识码: A

Neuro-protective effect of blood-letting punctures at twelve Jing-Well points in rat model of traumatic brain injury*

Tong Shen¹, Sai Zhang², Yue Tu², Xu-yi Chen², Huan-cheng Wu³

(1. Department of Massage, The First Affiliated Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China; 2. Brain Center of Affiliated Hospital of Logistics College of PAP, Tianjin Key Laboratory of Neurotrauma Repair, Tianjin 300162, China; 3. Department of Brain Medicine, Tianjin Beichen Hospital, Tianjin 300400, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of blood-letting punctures at twelve Jing-Well points on cerebral edema and mitochondrial biogenesis in rat model of traumatic brain injury (TBI). **Methods** A total of 56 male SD

收稿日期: 2017-08-04

* 基金项目: 国家自然科学基金 (No: 31200809; 11672332)

[通信作者] 吴焕成, E-mail: waik_e_d@163.com

rats were randomly divided into 7 groups: mild TBI group, mild TBI + blood-letting group, moderate TBI group, moderate TBI + blood-letting group, severe TBI group, Severe TBI + blood-letting group and sham group. (8 for each group). TBI were conducted by controlled technic of cortical impact injury with impacting depth of 1mm (mild TBI), 3 mm (moderate TBI) and 4 mm (severe TBI). Rats in the sham group underwent the same operation except for cortical impacting. Blood-letting at Jing-Well points was performed by pricking the bilateral forelimb toes of the rats with 1ml syringe needle every 12 h with bleeding amount of 10 μ l per point each time. The modified neurological severity score (mNSS) was recorded 72 h post operation. Brain tissue surrounding the lesion was harvested for analysis of PGC-1 α , TFAM and mtDNA copy number. Brain water was measured. **Results** mNSS in 3 TBI groups were significantly higher compared with sham group, which increased along with the severity of TBI ($P < 0.05$). Treatment of blood-letting decreased mild and moderate TBI-induced mNSS ($P < 0.05$). Expression levels of PGC-1 α , TFAM gene and the mtDNA copy in TBI group were significantly upregulated compared with Sham group ($P < 0.05$). Treatment of blood-letting in mild TBI+blood-letting group aggrandized increase of mtDNA copy number when compared with TBI only groups ($P < 0.05$). Expression of PGC-1 α was upregulated by blood-letting therapy in moderate TBI group while no significant differences were observed in mild and severe TBI groups in terms of PGC-1 α and TFAM gene expressions ($P > 0.05$). Water content in brain tissue of TBI group was significantly increased when compared with Sham group, which was decreased with the application of bloodletting therapy ($P < 0.05$). **Conclusion** Neuroprotective effect of blood-letting punctures at twelve Jing-Well points achieves probably due to the fact that it enhances energy supplement, ameliorates brain edema through activation of PGC mediated signal pathways and biosynthesis of mtDNA.

Keywords: traumatic brain injury (TBI); twelve jing-well points; mitochondrial dna; mNss; blood-letting therapy

随着社会经济、交通运输业等的快速发展, 颅脑创伤 (traumatic brain injury, TBI) 的发生率也逐年增高, 其高致残率和致死率给社会和家庭可造成严重负担。而 TBI 后的继发性脑水肿是导致患者残疾和死亡的重要原因之一, 因此有效控制脑水肿是治疗 TBI 的关键手段^[1]。近年有研究显示, 十二井穴放血对改善 TBI 后脑水肿有一定疗效, 但相关机制尚不明确。线粒体是机体能量代谢的重要场所, 线粒体功能障碍与细胞毒性脑水肿以及神经功能损伤程度密切相关, 这提示线粒体或许是井穴放血疗法发挥脑保护作用的重要靶点之一^[2-4]。本实验拟通过皮质撞击致伤 (controlled cortical impact injury, CCI) 构建不同损伤程度 TBI 大鼠模型, 探讨井穴放血疗法对脑水肿的影响, 并进一步检测线粒体生物合成相关基因表达以及线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 拷贝数的变化, 从而为研究井穴放血疗法治疗 TBI 的机制提供更多基础支持。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

雄性 SD 大鼠 56 只, 7 ~ 8 周龄, 体重 220 ~ 250 g, 购自军事医学科学院动物实验中心。RNA/DNA 共提取试剂盒 (北京天根生化科技有限公司), 实时荧光定量 PCR 试剂盒 (北京康为世纪生物科技有限公司)。

1.2 仪器与设备

电子控制性脑皮质撞击仪 (eCCI, 美国 Custom &

Design 公司), Nano Drop 2000 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司), real-time PCR 仪 (Step One Plus, 美国 ABI 公司)。

1.3 方 法

1.3.1 动物分组及 TBI 模型的复制 将大鼠按随机数字表法随机等分为 7 组, 即轻度 TBI 组 (L 组)、轻度 TBI 加井穴放血组 (L+B 组)、中度 TBI 组 (M 组)、中度 TBI 加井穴放血组 (M+B 组)、重度 TBI 组 (H 组)、重度 TBI 加井穴放血组 (H+B 组) 和对照组, 每组 8 只。各 TBI 组经 1% 戊巴比妥钠按 40 mg/kg 麻醉后, 暴露右侧顶骨, 颅钻钻孔直径约 4.5 mm, 调整 eCCI 打击臂至与垂直方向呈 20° 夹角, 使用 3 mm 直径打击帽打击大脑皮质。参数如下: 打击速率为 5 m/s, 打击后最低点持续时间为 0.2 s, 轻度、中度、重度 TBI 组的打击深度分别为 1、3 和 4 mm^[5]。对照组仅开骨窗后缝合皮肤, 不进行打击。

1.3.2 十二井穴放血 用 1 ml 注射器针头于大鼠双侧前肢趾端的十二井穴点刺出血, 出血量为每穴 10 μ l, 每 12 h 进行 1 次放血, 穴位定位方法采用比较解剖学, 参考人体相应穴位解剖标志。

1.3.3 神经功能损伤评分及标本采集 7 组大鼠均于术后第 72 h 行 mNSS 评分^[6], 分数越高说明症状越严重, 最严重为 18 分, 0 分为正常。评价完成后采用颈椎离断法处死大鼠, 各组均取损伤灶周边同一部位脑皮质约 10 mg, 进行后续 DNA 和 RNA 的提取, 剩余脑组

织进行干湿比重测量。

1.3.4 实时荧光定量聚合酶链反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 测定相关基因表达及线粒体 DNA 拷贝数 按照说明书,提取脑组织的基因组 DNA 和总 RNA,并将 RNA 逆转录成 cDNA。qRT-PCR 测定线粒体生物合成相关基因的表达变化,包括过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子 1 α (peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α , PGC-1 α)、线粒体转录因子 A (mitochondrial transcription factor A, TFAM), 以及可

代表 mtDNA 拷贝数的线粒体单拷贝基因环氧化酶 2 (cyclooxygenase 2, COX2)。方法如下:配制 PCR 反应体系,包括 2 \times Ultra SYBR Mixture, cDNA 10 ng 或基因组 DNA 50 ng, 以及相应体积的引物和灭菌双蒸水,每个基因设置 3 个重复孔。反应条件采用两步法:95 $^{\circ}$ C 10 min 预变性,随后 95 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 60 $^{\circ}$ C 退火延伸 60 s, 共 40 个循环测定 Ct 值,以 0.3 $^{\circ}$ C 梯度逐步升温行熔解曲线分析。应用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各目的基因的相对表达量。引物序列见表 1。

1.3.5 脑组织含水量测定 取脑后仅保留左右大脑半

表 1 设计引物序列

基因名称	引物序列	产物长度 /bp
PGC-1 α	正向: 5'-CACCAAACCCACAGAAAACAG-3'	136
	反向: 5'-GGCTCAGAGGAAGAGATAAAGTTG-3'	
TFAM	正向: 5'-CACCCAGATGCAAAACTTTCAG-3'	144
	反向: 5'-CTGCTCTTATACTTGCTCAGAC-3'	
β -actin	正向: 5'-TGCCTGACGGTCAGGTCA-3'	101
	反向: 5'-CAGGAAGGAAGGCTGGAAG-3'	
mtDNA (COX2)	正向: 5'-ATAACCGAGTCGTTCTGCCAAT-3'	160
	反向: 5'-TTTCAGAGCATTGGCCATAGAA-3'	
mtDNA (RSP18)	正向: 5'-TGTGTTAGGGGACTGCTGGACA-3'	112
	反向: 5'-CATCACCCACTTACCCCAAAA-3'	

球,立即称重,所得质量为湿重。随后将大脑放入烘箱中,75 $^{\circ}$ C 烘烤 48 h,称重后所得质量为干重。含水量=(湿重-干重)/湿重。

1.4 统计学方法

数据分析采用 SPSS 17.0 统计软件,组间比较采用单因素方差分析,两两比较用 LSD- t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 神经功能损伤评分

TBI 后大鼠的 mNSS 评分均高于对照组,且随着 TBI 严重程度的增加,评分依次增高 ($P < 0.05$),且轻、中度 TBI 组大鼠在应用井穴放血疗法后 mNSS 评分与相应的 L 和 M 组比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),见表 2。

表 2 不同组别各指标比较 ($n=8, \bar{x} \pm s$)

组别	mNSS 评分 / 分	PGC-1 α	TFAM	mtDNA 拷贝数	脑组织含水量
L 组	5.75 \pm 1.75 ⁽¹⁾	2.56 \pm 0.71 ⁽¹⁾	2.40 \pm 0.97 ⁽¹⁾	5.50 \pm 1.42 ⁽¹⁾	0.788 \pm 0.016 ⁽¹⁾
L+B 组	4.00 \pm 1.19 ^(1,2)	3.13 \pm 0.87 ⁽¹⁾	3.07 \pm 0.72 ⁽¹⁾	7.82 \pm 3.20 ^(1,2)	0.776 \pm 0.012 ⁽¹⁾
M 组	8.88 \pm 1.73 ⁽¹⁾	2.49 \pm 0.78 ⁽¹⁾	2.76 \pm 1.35 ⁽¹⁾	5.03 \pm 3.36 ⁽¹⁾	0.791 \pm 0.009 ⁽¹⁾
M+B 组	6.63 \pm 2.13 ^(1,2)	3.74 \pm 1.01 ^(1,2)	3.41 \pm 1.48 ⁽¹⁾	7.42 \pm 2.90 ^(1,2)	0.780 \pm 0.007 ^(1,2)
H 组	10.63 \pm 2.07 ⁽¹⁾	4.61 \pm 2.04 ⁽¹⁾	3.64 \pm 0.71 ⁽¹⁾	3.67 \pm 1.82 ⁽¹⁾	0.797 \pm 0.012 ⁽¹⁾
H+B 组	10.00 \pm 1.20 ⁽¹⁾	5.47 \pm 1.95 ⁽¹⁾	4.48 \pm 2.32 ⁽¹⁾	4.00 \pm 1.83 ⁽¹⁾	0.799 \pm 0.015 ⁽¹⁾

续表 2

组别	mNSS 评分 / 分	PGC-1 α	TFAM	mtDNA 拷贝数	脑组织含水量 /%
对照组					
S 组	0	1.07 \pm 0.14	1.03 \pm 0.20	1.22 \pm 0.37	0.761 \pm 0.007
F 值	339.462	40.736	35.924	134.702	5.561
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.009

注：1) 与对照组比较, $P < 0.05$; 2) 与单纯损伤组比较, $P < 0.05$

2.2 各基因表达及 mtDNA 拷贝数变化

TBI 模型大鼠的 PGC-1 α 和 TFAM 基因表达水平以及 mtDNA 拷贝数均高于对照组 ($P < 0.001$); 轻度 TBI 组大鼠在应用井穴放血疗法后, mtDNA 拷贝数高于相应的未应用放血疗法的大鼠 ($P < 0.05$), 中度 TBI 组大鼠在应用放血疗法后 PGC-1 α 基因表达水平和 mtDNA 拷贝数升高 ($P < 0.05$), 轻、重度 TBI 组大鼠在应用井穴放血疗法后, 虽然 PGC-1 α 和 TFAM 基因表达水平均有升高趋势, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 2。

2.3 脑组织含水量

TBI 后各组大鼠脑组织含水量与对照组比较均增加, 且中度 TBI 组大鼠在应用井穴放血疗法后脑组织含水量与相应的 M 组比较降低 ($P < 0.05$), 见表 2。

3 讨论

脑水肿 TBI 后常见的并发症之一, 常于发病后第 2 天达到高峰, 主要由创伤造成的脑组织缺血、缺氧以及 Na⁺-K⁺ 离子泵的功能障碍导致细胞水肿引起, 其可造成颅内压急剧增高, 从而进一步使脑的血液灌注减少, 病情加重, 甚至导致脑疝威胁生命^[7]。井穴位于人体的四肢末端, 是十二经脉气血起始之处, 《医宗金鉴 - 刺灸心法要诀》中指出: “商阳主刺卒中, 暴仆昏沉痰涎壅, 少商、中冲、关冲、少泽、商阳, 使气血流行, 乃起死回生救急之妙穴”。放血疗法最早的记载可见于《黄帝内经》, 如“刺络者, 刺小络之血脉也”; “菟陈则除之, 出恶血也”, 并明确地提出刺络放血可以治疗癫狂、头痛、暴暗、热喘及衄血等病证, 与单纯灸法比较, 起除淤效果更佳。

本实验结果表明, 井穴放血可有效减轻轻度和中度 TBI 大鼠神经功能损伤症状, 并降低 TBI 后脑水肿的严重程度, 提示 TBI 后应用井穴放血疗法可发挥脑保护作用。与苗笑梅和张静莎等的研究结果类似, 苗笑

梅等^[8]发现, 十二井穴刺络放血可以降低神经功能缺陷评分, 减轻脑水肿, 对创伤性大鼠脑组织有保护作用, 张静莎等^[9]也发现, 手十二井穴放血有改善重型颅脑创伤患者意识状态的作用趋势, 但上述两项研究均未深入探讨相关机制。细胞内线粒体可通过氧化磷酸化为细胞活动提供能量, 当创伤导致线粒体功能障碍时, 可引起细胞内乳酸堆积并影响 Na⁺-H⁺ 交换, 促进脑水肿的发生^[10]。为此本课题组进而检测脑组织中中线粒体生物合成相关基因表达及 mtDNA 拷贝数的变化, 以期探索井穴放血疗法发挥脑保护作用的靶点。

结果表明, TBI 后组织中 mtDNA 拷贝数增加, 提示创伤在造成线粒体损伤后, mtDNA 发生代偿性扩增。一方面, mtDNA 是独立存在于细胞器中的环状基因组 DNA, 其在基因组之中的个数称为 mtDNA 拷贝数, 由于线粒体 DNA 缺少组蛋白的保护, 使其容易受到氧化应激、炎症等危险因素的损害, 造成及线粒体功能障碍^[11-12], TBI 后, 损伤本身及坏死的脑组织可诱导活性氧簇 (ROS) 及炎症因子的释放增多^[13], 使机体进入氧化应激状态从而造成 mtDNA 损伤。另一方面, ROS 在造成 DNA 损伤的同时, 本身亦可以作为第二信使, 触发 TFAM 和 NRF 的表达, 促进线粒体扩增, 从而降低功能障碍 mtDNA 所占比例, 代偿能量供应水平的下降^[14-15]。当应用井穴放血后, 可见大鼠的 PGC-1 α 基因以及下游的 TFAM 基因表达进一步升高, 且 mtDNA 拷贝数提高, 表明井穴放血可能是通过激活 PGC 及下游通路, 促进 mtDNA 的生物合成, 从而增强创伤脑组织的能量供应, 改善脑水肿程度, 发挥脑保护作用。同时, 本实验还发现, 对于重度 TBI 大鼠, 单独应用井穴放血疗法时, 虽然可一定程度上促进 mtDNA 拷贝数的增加, 但并未改善神经功能损伤症状及脑水肿程度, 这可能是由于重型 TBI 因损伤严重, 会同时累及多条通路, 多因素综合作用导致脑水肿的发生, 而单独应用井穴放血疗法尚不足以展现改善脑水肿的作用, 提示在重型 TBI 时应多种治疗策略共同施治, 辅以井穴

放血疗法,或许能展现出更好的治疗效果。

综上所述,本实验通过构建 TBI 大鼠模型,初步探讨井穴放血对脑水肿及线粒体生物合成基因的影响,为解释井穴放血发挥脑保护作用的机制提供基础研究。但 TBI 的发病是多因素共同造成,其发生发展也涉及其他多条通路及靶基因,这仍有待挖掘。若能进一步探讨井穴放血对其他通路的影响,或许可为 TBI 的临床治疗乃至开发井穴放血的新用途提供帮助。

参 考 文 献:

- [1] 江金文,刘会云,李美华. AQP4 与创伤性脑水肿的研究进展 [J]. 国际神经病学神经外科学杂志, 2017, 44(2): 213-217.
- [2] 胡捷先,陈献华. 脑缺血后谷氨酸通路及其调控的研究进展 [J]. 复旦学报(医学版), 2016, 43(6): 724-731.
- [3] 付浩,杨小飒,余东堃,等. 凋亡抑制剂 zVAD 对脑缺血再灌注小鼠外周血线粒体 DNA 拷贝数的影响 [J]. 遵义医学院学报, 2016, 39(6): 593-596.
- [4] MALAKHOVA L, BEZLEPKIN V G, ANTIPOVA V, et al. The increase in mitochondrial DNA copy number in the tissues of gamma-irradiated mice[J]. Cell Mol Biol Lett, 2005, 10(4): 721-732.
- [5] 付浩,孙中磊,杨小飒,等. 脑皮质撞击击致创伤性脑损伤大鼠模型的构建 [J]. 遵义医学院学报, 2017, 40(1): 38-41.
- [6] CHEN J, SANBERG P R, LI Y, et al. Intravenous administration of human umbilical cord blood reduces behavioral deficits after stroke in rats[J]. Stroke, 2001, 32(11): 2682-2688.
- [7] 宋海燕,王仙丽,伊生勇. 恶性脑梗死伴脑水肿的研究进展 [J]. 武警后勤学院学报(医学版), 2016, 25(7): 593-596.
- [8] 苗笑梅,程世翔,杨震,等. 十二井穴刺络放血联合亚低温治疗对颅脑创伤急性期大鼠脑水肿的影响 [J]. 中国应用生理学杂志, 2015, 31(3): 249-253.
- [9] 张静莎,郭义,耿连岐. 手十二井穴刺络放血、薏苡仁鼻饲联合亚低温对重型颅脑创伤影响的临床疗效评价的初步研究 [J]. 世界中医药, 2016, 11(3): 510-514.
- [10] 朱志安,张红,高远征. 创伤性脑水肿脑组织乳酸及线粒体 SOD、MDA 水平的变化 [J]. 中国临床神经外科杂志, 2000, 5(2): 48-50.
- [11] JOKINEN R, MARTTINEN P, STEWART J B, et al. Tissue-specific modulation of mitochondrial DNA segregation by a defect in mitochondrial division[J]. Hum Mol Genet, 2016, 25(4): 706-714.
- [12] 向军军,赖菁菁,胡跃强. 近 3 年线粒体介导细胞凋亡的研究进展 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2016, 14(13): 1497-1499.
- [13] KAWABORI M, YENARI M A. Inflammatory responses in brain ischemia[J]. Curr Med Chem, 2015, 22(10): 1258-1277.
- [14] LUNA B, BHATIA S, YOO C, et al. Bayesian network and mechanistic hierarchical structure modeling of increased likelihood of developing intractable childhood epilepsy from the combined effect of mtDNA variants, oxidative damage, and copy number[J]. J Mol Neurosci, 2014, 54(4): 752-766.
- [15] 付浩,胡文静,王志宏,等. 脑缺血再灌注小鼠线粒体 DNA 拷贝数与神经功能损伤相关性研究 [J]. 现代中西医结合杂志, 2017, 26(1): 4-6.

(王荣兵 编辑)