

电针足三里穴对腹腔脓毒症大鼠肠缺血及氧自由基损伤的作用研究

胡森 张立俭 白慧颖 包呈梅

【摘要】 目的 探讨电针足三里穴对脓毒症大鼠肠缺血和氧自由基损伤的保护作用。方法 采用盲肠结扎穿孔术(CLP)制备大鼠脓毒症模型。雄性 Wistar 大鼠 32 只,随机分为 CLP+电针足三里(CLP/EA)组、CLP+假电针(CLP/SEA)组、迷走神经切断+CLP+SEA(VA/CLP/SEA)组、VA+CLP+EA(VA/CLP/EA)组,每组 8 只。EA 组持续针刺双侧足三里穴 30 min,刺激强度为 2~3 mA,2~100 Hz;SEA 组采用相同频率和强度刺激非经非穴(足三里外侧旁开 0.5 cm)30 min;VA 组于 CLP 前切断迷走神经。各组大鼠于 CLP 后 6 h 测定空肠黏膜血流量(JMBF),处死动物取空肠组织,测定丙二醛(MDA)含量、黄嘌呤氧化酶(XOD)和二甲胺氧化酶(DAO)活性及肠组织含水量。结果 与 CLP/SEA 组比较,CLP/EA 组 JMBF 和 DAO 活性显著增加,XOD 和 MDA 及肠组织含水量显著降低(P 均 <0.05);VA/CLP/SEA 组和 VA/CLP/EA 组 JMBF 和 DAO 活性显著降低,XOD 和 MDA 水平显著升高,且组织含水量明显高于 CLP/EA 组(P 均 <0.05)。VA/CLP/EA 组与 VA/CLP/SEA 组各指标均无明显差异(P 均 >0.05)。结论 电针足三里可显著增加 CLP 大鼠 JMBF 和 DAO 活性,减轻肠组织水肿和脂质过氧化损伤;切断腹腔迷走神经能减轻或消除电针的作用,增强小肠组织过氧化反应,加重肠组织水肿和黏膜细胞损害。电针足三里穴对肠缺血和氧自由基损伤的保护机制可能与兴奋胆碱能通路有关。

【关键词】 脓毒症; 电针; 足三里穴; 小肠; 氧自由基; 胆碱能神经

The effects of electro-acupuncture at Zusanli point (足三里穴) on intestinal proinflammatory factors, diamine oxidase and tissue water content in rats with sepsis HU Sen, ZHANG Li-jian, BAI Hui-ying, BAO Cheng-mei. Laboratory of Shock and Multiple Organ Dysfunction, Burns Institute, First Hospital Affiliated to the PLA General Hospital, Beijing 100048, China

【Abstract】 **Objective** To investigate the protective effect of electro-acupuncture (EA) at Zusanli point (足三里穴) on sepsis induced ischemic and oxygen free radical intestinal injury in rats with sepsis. **Methods** Thirty-two male Wistar rats were used to reproduce sepsis by cecal ligation and puncture (CLP), and they were randomly divided into four groups (each $n=8$): CLP+EA (CLP/EA), CLP+sham EA (CLP/SEA), vagotomy+CLP+SEA (VA/CLP/SEA) and vagotomy+CLP+EA (VA/CLP/EA). Zusanli point was electro-acupunctured with constant voltage (2–100 Hz, 2 mA for 30 minutes) immediately after CLP surgery. Abdominal vagotomy was performed in rats in VA/CL/SEA and VA/CLP/SEA groups. Six hours after CLP, the mucosal blood flow of jejunum (JMBF) was measured. Animals were sacrificed after 6 hours and specimens of jejunum were harvested for evaluation of malondialdehyde (MDA), xanthine oxidase (XOD), diamine oxidase (DAO) and assessment of the water content (WCR). **Results** JMBF and the activity of DAO of CLP/EA group were markedly higher, and the levels of XOD, MDA and WCR in jejunal tissue were obviously lower than those of CLP/SEA group (all $P<0.05$). The levels of JMBF and DAO of the VA/CLP/SEA group and VA/CLP/EA group were significantly lower, and XOD, MDA and WCR obviously higher than those of the CLP/EA group (all $P<0.05$). There were no statistically differences in all above measurements between the VA/CLP/EA group and the VA/CLP/SEA group (all $P>0.05$). **Conclusion** The results indicate that EA at Zusanli point obviously increased JMBF and DAO, and alleviated tissue edema and insult of intestinal mucosa. Vagotomy could weaken or eliminate the effects of EA. It is suggested that cholinergic anti-inflammatory pathway is one of the main mechanisms of intestinal protective effect of EA at Zusanli point.

【Key words】 sepsis; electro-acupuncture; Zusanli point; intestine; oxygen free radical; cholinergic nerve

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2009.08.013

基金项目:全军“十一五”计划专项课题(06Z055)

作者单位:100048 北京,解放军总医院第一附属医院烧伤研究

所休克与多器官障碍实验室

Email:hs82080@yahoo.com.cn

缺血和炎症反应引起的内脏组织水肿及脂质过氧化损伤是脓毒症的重要病理生理变化,也是导致多器官功能障碍综合征(MODS)和患者死亡的原因之一,目前临床尚缺乏有效的治疗措施^[1]。针刺治疗能双向调节神经-内分泌-免疫系统,保护脏器功能,

但其作用机制尚不清楚^[2]。本研究中观察电针足三里对大鼠盲肠结扎穿孔术(CLP)后内脏缺血引起的氧自由基生成和组织水肿作用,为脓毒症和 MODS 的防治提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组:32 只雄性 Wistar 大鼠(由军事医学科学院动物实验中心提供),60~70 日龄,体重(220±20)g。按照随机数字表法将动物分为 4 组:CLP+电针足三里穴(CLP/EA)组、CLP+假电针(CLP/SEA)组、迷走神经切断+CLP+SEA(VA/CLP/SEA)组、VA+CLP+EA(VA/CLP/EA)组,每组 8 只。

1.2 动物模型制备及处理:按照 Chaudry 等^[3]报道的方法进行 CLP,复制严重腹腔感染致脓毒症模型。术毕立即皮下注射 50 ml/kg 生理盐水抗休克。VA/CLP/SEA 组和 VA/CLP/EA 组于 CLP 前在胃贲门处沿食管两侧切断迷走神经。电针时用自制布袋固定大鼠,于 CLP 后 20 min 在清醒状态下常规消毒双下肢并备皮。CLP/EA 组和 VA/CLP/EA 组取足三里穴(膝关节后外侧、腓骨小头下约 5 mm 处)直刺 7 mm^[4],接电针仪持续刺激 30 min,刺激强度 2~3 mA,频率 2~100 Hz。CLP/SEA 组、VA/CLP/SEA 组刺激非经非穴(足三里外侧旁开 0.5 cm,频率 2~100 Hz,强度 2~3 mA)30 min。

1.3 检测指标及方法:CLP 后 6 h,在麻醉状态下沿原切口开腹,暴露空肠起始段,于十二指肠悬韧带远端 10 cm 造口,用激光多普勒血流仪(LDF,瑞典 PERIMED 公司)接触式光纤探头接触空肠黏膜,测定空肠黏膜血流量(JMBF)。LDF 信号经仪器转换为血流灌注量单位(BPU),采用 PSW 2.0 版配套软件进行 BPU 信号和曲线的输出、记录,每次测量 30 s,取 10 s 稳定曲线计算平均值。然后处死动物取空肠,测定组织中丙二醛(MDA)、黄嘌呤氧化酶(XOD)、二胺氧化酶(DAO)及组织含水量。MDA、XOD 和 DAO 试剂盒由南京建成生物工程研究所提供,按说明书要求操作。空肠组织含水量采用干湿法测定:取空肠组织称湿重后,放入烤箱 90℃烤

72 h,再称干重,组织含水量(%)=(湿重-干重)/湿重×100%。

1.4 统计学分析:采用 SPSS 12.0 统计分析软件,数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

表 1 结果显示,CLP 后 6 h,与 CLP/SEA 组比较,CLP/EA 组 JMBF 和 DAO 显著增加,XOD、MDA 及组织含水量显著降低(P 均 <0.05);VA/CLP/SEA 组和 VA/CLP/EA 组 JMBF、DAO 显著降低,XOD 和 MDA 显著升高,组织含水量明显高于 CLP/EA 组(P 均 <0.05)。VA/CLP/EA 组与 VA/CLP/SEA 组各指标比较差异均无统计学意义(P 均 >0.05)。

3 讨论

CLP 模型是目前国内外公认的脓毒症动物治疗模型,能模拟腹腔脓肿发展到弥漫性腹膜炎、脓毒性休克和多器官功能障碍的临床过程。在此过程中,腹腔脏器尤其是胃肠组织在缺血和过度炎症刺激下,发生缺血/再灌注和氧自由基损伤。XOD 是小肠组织氧自由基主要生成途径中的关键酶,其活性高低可作为反映组织氧自由基生成的灵敏指标。在缺血/再灌注过程中,小肠组织中堆积的 ATP 代谢产物次黄嘌呤在 XOD 的催化作用下大量生成黄嘌呤,同时稳态的分子氧被转化为极不稳定的氧自由基,造成肠组织结构、代谢和功能的损害^[5]。MDA 是氧自由基攻击生物膜中的多不饱和脂肪酸、引起脂质过氧化反应的产物,其含量能间接反映组织细胞过氧化损伤的程度^[6]。

本研究结果显示,电针足三里穴对脓毒症大鼠小肠促炎因子所致的肠组织水肿和肠黏膜损伤具有明显保护作用,能抑制异常升高的小肠组织 XOD 和 MDA 水平,降低小肠组织含水量,恢复肠黏膜 DAO 活性。但若在 CLP 前预先切断双侧腹腔迷走神经,能加重肠组织过氧化反应和肠组织水肿;此时电针足三里穴的干预作用明显减弱或消失。说明迷走神经的完整性在电针发挥抗炎和器官保护作用时

表 1 电针足三里对大鼠 CLP 后 6 h JMBF 及空肠组织 MDA、XOD、DAO 和含水量的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	JMBF(BPU)	DAO(U/g)	XOD(U/g)	MDA(μ mol/g)	组织含水量(%)
CLP/EA 组	6	58.76±8.47 ^a	0.21±0.05 ^a	4.53±0.48 ^a	1.77±0.12 ^a	65.3±2.3 ^a
CLP/SEA 组	6	44.60±4.11	0.12±0.04	6.12±0.64	2.60±0.24	72.2±3.4
VA/CLP/SEA 组	6	35.18±6.82 ^{ab}	0.06±0.04 ^{ab}	7.17±0.50 ^{ab}	3.25±0.29 ^{ab}	72.4±3.6 ^b
VA/CLP/EA 组	6	32.44±5.44 ^{ab}	0.07±0.02 ^{ab}	7.92±0.84 ^{ab}	3.56±0.34 ^{ab}	75.5±2.9 ^b

注:与 CLP/SEA 组比较,^a $P < 0.05$;与 CLP/EA 组比较,^b $P < 0.05$

具有至关重要的作用^[7]。

胆碱能抗炎通路(cholinergic anti-inflammatory pathway)是 2000 年后报道的胆碱能神经及其通过其递质乙酰胆碱(Ach)调节或对抗全身炎症反应的通路^[8]。研究证明,直接给予 Ach 或烟碱能显著减少多种炎性细胞产生肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素- β (IL-1 β)、IL-6 及 IL-18 等促炎细胞因子。电刺激外周迷走神经能抑制脏器缺血、内毒素攻击和失血性休克动物血浆及组织促炎细胞因子表达,减轻休克,并证明 Ach 的抗炎作用是通过与胆碱能 N 受体 $\alpha 7$ 亚单位(NR $\alpha 7$)结合实现的^[9-11]。本课题组前期的研究显示,内毒素血症模型大鼠预先静脉注射 NR $\alpha 7$ 拮抗剂 α -银环蛇毒素,电针足三里对肝组织 TNF- α 含量和丙氨酸转氨酶活性的影响亦显著减弱或消失,说明电针足三里的抗炎作用很可能是通过 NR $\alpha 7$ 实现的^[12]。因此,笔者认为激活胆碱能抗炎通路是电针足三里发挥抗炎和肠保护作用的主要机制之一。本研究中还观察到,与 CLP/SEA 组比较,VA/CLP/SEA 组和 VA/CLP/EA 组促炎因子水平显著增加,DAO 活性降低,表明促炎/抗炎因子水平的平衡受交感肾上腺素能神经与副交感胆碱能神经调节。在本实验中,当副交感胆碱能神经的作用被阻断后,表现出交感肾上腺素能神经的促炎作用,导致促炎细胞因子水平升高和组织炎症反应加重。

从中医角度看,足三里不仅是抗炎及免疫调节的要穴,更是足阳明胃经的合穴和治疗胃肠疾病的要穴。本课题组前期研究也证明,电针足三里穴能改善胃肠黏膜血流量,促进胃肠动力,这一作用可以被胆碱能 M 受体抑制剂阿托品所阻断^[13]。结合本实验中观察到 CLP/EA 组和 VA/CLP/EA 组大鼠多有腹泻、味多腥臭的表现,提示电针足三里穴不仅能兴奋胆碱能 N 受体发挥抗炎作用,可能也兴奋了胆

碱能 M 受体发挥增加肠黏膜血流量、促进肠蠕动和排毒的作用,有助于减轻脓毒症引起的肠黏膜缺血、水肿、炎症和肠麻痹,对于防治肠道细菌和毒素移位、肠源性脓毒症及 MODS 有积极的作用^[14]。

参考文献

- [1] Hassoun HT, Kone BC, Mercer DW, et al. Post-injury multiple organ failure; the role of the gut. Shock, 2001, 15(1): 1-10.
- [2] 胡森, 宋琪, 王磊, 等. 电针兴奋胆碱能抗炎通路减轻内毒素引起的细胞因子释放和脏器功能损害作用研究. 中国中西医结合急救杂志, 2008, 15(4): 205-208.
- [3] Chaudry IH, Wichterman KA, Baue AE. Effect of sepsis on tissue adenine nucleotide levels. Surgery, 1979, 85(2): 205-211.
- [4] 李忠仁. 实验针灸学. 北京: 中国中医药出版社, 2003: 327-328.
- [5] Granell S, Bulbena O, Genesca M, et al. Mobilization of xanthine oxidase from the gastrointestinal tract in acute pancreatitis. BMC Gastroenterol, 2004, 4: 1.
- [6] Janero DR. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. Free Radic Biol Med, 1990, 9(6): 515-540.
- [7] 叶小丰, 李建国, 杜朝晖, 等. 电针“足三里”穴对大鼠迷走神经放电的影响. 针刺研究, 2006, 31(5): 290-293.
- [8] Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M, et al. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. Nature, 2000, 405(6785): 458-462.
- [9] 胡森. 兴奋胆碱能抗炎通路干预炎症与缺血引起的器官损害. 感染、炎症、修复, 2008, 9(4): 195-198.
- [10] Song XM, Li JG, Wang YL, et al. The protective effect of the cholinergic anti-inflammatory pathway against septic shock in rats. Shock, 2008, 30(4): 468-472.
- [11] Wang H, Yu M, Ochani M, et al. Nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$ subunit is an essential regulator of inflammation. Nature, 2003, 421(6921): 384-388.
- [12] 胡森, 宋琪, 王海滨, 等. 电针足三里对内毒素所致大鼠肝损伤保护机制的研究. 中国中西医结合急救杂志, 2007, 14(5): 296-298.
- [13] 胡森, 王磊, 宋琪, 等. 电针足三里兴奋胆碱能通路对烫伤大鼠胃肠黏膜血流量和肠动力的影响. 中国中西医结合急救杂志, 2009, 16(2): 79-81.
- [14] 李志军. 脓毒症的中中西医结合治疗对策. 中国中西医结合急救杂志, 2008, 15(6): 323-325.

(收稿日期: 2009-05-12 修回日期: 2009-05-23)

(本文编辑: 李银平)

• 科研新闻速递 •

吸入纯氧对脓毒性休克患者的治疗效果有限

最近, 欧洲一个多国联合研究小组对纯氧通气治疗污染性腹膜炎所致脓毒性休克的安全性和有效性进行了深入研究。研究小组将 20 只实验猪麻醉后, 给予羟乙基淀粉和去甲肾上腺素将平均动脉压维持在正常水平, 用自身粪便制作污染性腹膜炎模型。20 h 后, 以吸入氧浓度(FiO₂) > 0.90 (对照组, $n=10$) 和 1.00 (纯氧组, $n=10$) 持续通气 12 h; 在同样血流动力学情况下, 检测全身及局部循环和携氧参数。结果发现: 吸入纯氧可缓解肺动脉高压, 改善肠道微循环和门静脉胺中毒, 但不能阻止内生肌酐清除率的持续降低($P=0.074$)和血中肿瘤坏死因子- α 的升高($P=0.112$), 可以减少肺组织坏死($P<0.001$), 但对肝脏的作用并不明显($P=0.069$); 纯氧通气期间肺功能指数、组织抗氧化活性、血液氧化和异硫氰酯应激未见明显变化。最终研究小组认为, 就对机体的整体影响而言, 吸入纯氧治疗细菌腹膜炎所致脓毒性休克是安全的, 但治疗效果并不明显。

杨明星, 编译自《Crit Care Med》, 2009-06-15(电子版); 胡森, 审核