

• 论著 •

经穴输氧对大鼠颅脑损伤后一氧化氮合酶活性的影响

杨华锋¹, 杨喜民², 王晓峰², 李栓德², 李晓林³

(1. 宁波市妇女儿童医院, 浙江 宁波 315012; 2. 解放军第三医院, 陕西 宝鸡 721004;

3. 陕西中医学院附属医院, 陕西 咸阳 712083)

【摘要】 目的: 探讨经穴输氧治疗大鼠颅脑损伤的作用机制。方法: SD 大鼠 50 只被随机分为正常组、假损伤对照组、电针组(取百会、足三里、阳陵泉、三阴交穴电针治疗)、常规治疗组(给予仙台合剂 4.17 ml/kg)、经穴输氧组(将氧气按 0.1 L/min 输入穴位)5 组。后 3 组大鼠制备脑损伤模型。各组除给予常规治疗外进行对应治疗, 7 d 后活杀动物取双侧脑组织, 检测脑组织一氧化氮合酶(NOS)活性变化, 并进行脑组织病理观察。结果: 与假损伤对照组比较, 各治疗组可显著降低伤侧及对侧脑组织 NOS 活性, 差异有显著性($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 且经穴输氧组伤侧 NOS 活性显著低于电针组和常规治疗组($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$)。治疗前创伤各组双侧大脑半球不对称, 伤侧半球明显肿胀, 挫伤中心区有出血、神经细胞坏死, 挫伤周边神经组织水肿, 细胞肿胀, 毛细血管塌陷, 有血管外出血; 治疗后各组基本为正常脑表现。结论: 经穴输氧对治疗脑损伤后遗症有效, 可以改善脑部血供, 纠正脑组织缺血、缺氧状态, 具有保护神经细胞作用。

【关键词】 经穴输氧; 一氧化氮合酶; 脑损伤

中图分类号: R245.9; R277.7 文献标识码: A 文章编号: 1008-9691(2006)06-0342-03

Effect of nitric oxide synthase activity in brain injury rats treated with oxygen therapy through acupunctures

YANG Hua-feng¹, YANG Xi-min², WANG Xiao-feng², LI Shuan-de², LI Xiao-lin³. 1. Ningbo Women and Children's Hospital, Ningbo 315012, Zhejiang, China; 2. the Third Hospital of PLA, Baoji 721004, Shanxi, China; 3. Affiliated Hospital of Shanxi College of Traditional Chinese Medicine. Xiayang 712083, Shanxi, China

【Abstract】 **Objective:** To study the mechanism of the oxygen therapy through acupunctures on rats with brain injury. **Methods:** Fifty SD rats were randomly divided into five groups: normal, sham injury, electro-acupuncture [at Baihui (百会), Zusanli (足三里), Yanglingquan (阳陵泉), Sanyinjiao (三阴交)], routine treatment [Xiantai mixture (仙台合剂) 4.17 ml/kg] and oxygen therapy through acupunctures (0.1 liter per minute) groups. Brain injury model was established in the latter three groups. Besides the routine treatment in all the groups, the corresponding therapies were given to the treatment groups respectively. The rats were killed 7 days after the respective treatment, the two hemispheres of the brain were taken out. Changes of nitric oxide synthase (NOS) activity and pathologic changes of brain tissues were observed. **Results:** Comparing with the sham injury group, all treatment groups had a more obvious decrease of NOS activity, the differences being significant ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and the last group which was offered oxygen therapy through acupunctures had even obviously lower level of NOS activity than those of the other two treatment groups: the electro-acupuncture and routine treatment groups ($P < 0.05$ and $P < 0.01$). Before treatment, the two hemispheres in the groups with injuries were not symmetric, pathologic changes showed that the injured side was obviously swollen, at the center of the lesion, there were blood and necrosis of nerve cells, and at the periphery of the lesion, the nerve tissues were edematous, nerve cells swollen, capillary vessels dilated with extra-vascular bleeding. After treatment, normal brain manifestations were seen in each group. **Conclusion:** Oxygen therapy through acupunctures is effective for the treatment of the sequelae of brain injuries, it may improve the blood and oxygen supply to correct the ischemia and hypoxia in the brain tissues and protect the nerve cells.

【Key words】 oxygen therapy through acupunctures; nitric oxide synthase; brain injury

基金项目: 兰州军区医药卫生科研计划项目(LXH 20-06)

作者简介: 杨华锋(1972-), 男(汉族), 陕西西安人, 医学硕士, 主治医师, 主要从事颅脑外伤和功能性神经外科的临床和基础研究, 发表论文 5 篇 (Email: YHFnb@tom.com)。

经穴输氧是利用祖国医学的经络理论和针灸理论以及现代氧疗理论结合而成的一种新型治疗方法。经穴输氧治疗方法仅见于临床,基础研究尚少见报道,其治疗作用和机制尚待探讨。本实验拟以大鼠为模型动物,利用重物自由落体撞击大鼠头部致伤,制备脑损伤模型,通过经穴输氧治疗后检测一氧化氮合酶(NOS)活性的变化,探讨其发生的机制以及相互关系与治疗作用,为经穴输氧治疗脑损伤提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物模型制备及分组:健康成年雄性 SD 大鼠 50 只(西安医科大学动物实验中心提供),体重(320±40)g。按随机数字表法随机分为正常组、假损伤对照组、电针组(电针+常规治疗)、常规治疗组(仙台合剂=甘露醇+地塞米松+维生素 E)和经穴输氧组(经穴输氧+常规治疗),每组 10 只。创伤性脑损伤模型制备参照 Feeney 等^[1]落体脑损伤模型略作改良。手术方法:用质量分数为 2.5%的戊巴比妥钠 40 mg/kg 腹腔注射麻醉大鼠,待麻醉平稳后将动物俯卧位固定于致伤架上,顶部头皮常规消毒后正中切开头皮,暴露双侧顶骨,在人字缝前方约 2 mm、正中左侧 2 mm 处顶骨钻孔,扩大骨窗直径约 4 mm,暴露硬膜,固定头颅致伤架的横杆使致伤锤下端(直径 3 mm)紧贴硬膜,用 50 g 的砝码于 40 cm 高处落下撞击致伤顶端,使下端脑组织发生局限性挫裂伤,止血后用少许骨蜡敷盖骨窗,缝合头皮,即造成创伤性脑损伤模型。假损伤对照组大鼠在钻孔暴露硬膜后不致伤。

1.2 给药方法及标本采集:实验动物均喂食普通饲料 7 d;给予青霉素 50 kU 预防感染,每日 1 次,连续用 7 d。常规治疗组给予仙台合剂 4.17 ml/kg,每日 1 次,连续用 7 d。电针组取百会、足三里、阳陵泉、三阴交穴位,毫针直刺 0.2~0.5 mm,接电针治疗仪,频率 3 Hz,电压<3 V(以肢体微动为准),行针 10 min,每日 1 次,连续 7 d。经穴输氧组取百会、足三里、阳陵泉、三阴交等穴位,采用自制空心针将氧气按 0.1 L/min 输入穴位,压力 5 kPa(1 kPa=10.20 cm H₂O),每日 1 次,每次 10 min,连续 7 d。实验 7 d 后,麻醉各组动物并断头取脑,去除嗅脑、小脑,致伤各组取创伤部位周边皮质及对侧相应区域皮质约 1.0 cm³,正常组和假损伤对照组取双侧大脑对应顶叶皮质约 1.0 cm³,称重后用质量分数为 0.9%的冰冷生理盐水按 150 mg:1.5 ml 的比例用自制的玻璃匀浆器制成 10%的脑组织匀浆,以

4 000 r/min(离心半径 8 cm)离心 10 min,取上清液冷藏保存待检测。

1.3 检测指标及方法

1.3.1 NOS 的检测:取脑组织匀浆 0.2 ml,根据 NOS 催化 L-精氨酸(L-Arg)和分子氧反应生成一氧化氮(NO),NO 与亲核性物质生成有色化合物的原理,在 530 nm 波长下测定其吸光度(A)值,依据下列公式计算 NOS 活性,参照试剂盒操作测定要求操作。

$$\text{NOS(U/mg)} = \frac{A_{\text{测定管}} - A_{\text{空白管}}}{38.3 \times 10^{-6}} \times \frac{2.41 + \text{取样量}}{\text{取样量}} \times \frac{1}{1 \times 15} \div \text{蛋白含量(mg/L)}$$

1.3.2 脑组织匀浆中蛋白含量检测:各组均用蛋白含量表示。蛋白的测定根据蛋白质分子具有 NH₃⁺基因,当将棕红色的 CBBG250 显色剂加入蛋白标准液式样品中时,CBBG250 染料上的阴离子与蛋白-NH₃⁺结合,使溶液变为蓝色,通过测吸光度依据下列公式可计算出蛋白含量。

$$\text{蛋白含量(g/L)} = \frac{A_{\text{测定管}}}{A_{\text{标准管}}} \times \text{标准管浓度(g/L)}$$

1.3.3 脑组织病理学观察:治疗 7 d 后活杀动物取双侧脑组织,常规脱水、石蜡包埋,切片,行苏木素-伊红(HE)染色,在光镜下进行病理组织学观察。

1.4 统计学分析:数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 脑组织病理学结果

2.1.1 大体标本检查:正常组及假损伤对照组双侧大脑半球对称,未见有组织兰染。治疗前创伤各组双侧半球不对称,左侧半球明显较右侧半球肿胀,并于左侧半球顶叶部位挫伤中心区有挫碎脑组织,周边兰染明显;冠状切面见挫伤中心区深达白质及海马区。治疗后创伤各组脑组织兰染浅淡,双侧半球基本对称,未见明显组织肿胀,坏死组织吸收。

2.1.2 光镜观察:正常组及假损伤对照组大鼠为正常表现,HE 染色见神经组织染色均匀,细胞界线清晰,胞浆、胞核染色均匀。治疗前创伤各组伤侧见挫伤中心区有出血、神经细胞坏死,挫伤周边神经组织水肿,神经细胞肿胀,血管周边间隙扩大,毛细血管塌陷,有血管外出血,胶质细胞肿胀;对侧有轻度的神经组织水肿、神经细胞肿胀、胶质细胞肿胀;均符合脑损伤病理学特征,所以本模型可以作为研究颅脑损伤的实验研究。治疗后创伤各组挫伤中心区出血基本吸收,胶质细胞生长活跃,挫伤周边神经组织

水肿明显减退、神经细胞无明显肿胀、血管周边间隙缩小、毛细血管增生活跃。HE 染色见神经组织染色均匀,细胞界线清晰,胞浆、胞核染色均匀。

2.2 NOS 活性的变化(表 1):大鼠颅脑损伤后 7 d,假损伤对照组大鼠伤侧及对侧脑组织中的 NOS 活性明显低于正常组(P 均 <0.05);与假损伤对照组比较,电针组、常规治疗组、经穴输氧组伤侧及对侧脑组织 NOS 活性均显著降低,差异有显著性($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。伤侧经穴输氧组 NOS 的活性显著低于电针组($P<0.05$)和常规治疗组($P<0.01$);对侧电针组、经穴输氧组、常规治疗组间 NOS 活性差异无显著性($P>0.05$)。

表 1 各组动物脑组织 NOS 活性变化($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 1 Change of NOS activity of brain tissue in each group($\bar{x}\pm s, n=10$) kU/g

组别	伤侧 NOS	对侧 NOS
正常组	2.58±0.20	2.58±0.20
假损伤对照组	2.33±0.27*	1.89±0.41*
电针组	1.66±0.41**△△	1.62±0.89*△
常规治疗组	1.89±0.45**△△	1.85±0.21*△
经穴输氧组	1.56±0.71**△△#*§	1.51±0.25*△

注:与正常组比较:* $P<0.05$,** $P<0.01$;与假损伤对照组比较:△ $P<0.05$,△△ $P<0.01$;与电针组比较:# $P<0.05$;与常规治疗组比较:§ $P<0.01$

3 讨论

经穴输氧^[2,3]是利用祖国医学的经络理论和针灸理论及现代的氧疗理论结合而成的一种新型治疗方法,中医理论提出:经络内联脏腑,外络肢节,是气血运行的通道。穴位是人体脏腑经络之精气输注于体表的部位。针刺治疗脑损伤已被较多的临床与实验研究所证实,而氧是体内各组织代谢所必需的物质,氧气输入穴位后,也就具有针刺和氧疗的双重作用,并可提高穴位的氧分压,使氧气沿经络运行和局部扩散供组织利用,以达到治疗疾病的目的。据大量的实验表明,我们治疗选用的足三里穴有双向调节脑部血流和血管舒缩状态,以改善损伤区的血供,穴位外的神经元受到穴位空心针和局部氧气的刺激,会迅速通过神经系统将信息传送给大脑,调整因外伤引起的大脑皮质功能的紊乱状态,使其恢复正常而达到治愈目的。

iNOS 广泛存在于多种细胞中,在病理条件下,由于创伤、内毒素、缺血等因素,可以诱导机体产生 iNOS,其活性不依赖于钙调蛋白(Ca^{2+}/CaM),但它催化生成的 NO 作用缓慢而持久,在中枢神经系统(CNS)损伤、病毒感染以及其他病理条件的细胞

死亡过程中起毒害因子的作用^[4]。NOS 广泛存在于神经系统中,NO 在神经系统损伤的病理生理过程中可能起着毒害因子作用。戴翰升等^[5]研究表明,脑创伤大鼠伤后脑含水量随着静脉血 NO 的增加而增加,脑组织 NOS 则随 NO 的增加而下降。说明创伤性脑水肿与血 NO 有密切相关性,组织中 NOS 在该过程中可能起催化剂的作用。有研究表明,NOS 抑制剂对脑缺血有明显的保护作用^[6];且能有效抑制缺血性海马区神经元凋亡^[7]。

本实验表明,在大鼠颅脑损伤 7 d 后 NOS 活性明显降低。经穴输氧后可以使 NOS 活性降低,减少脑损伤后 NOS 催化 NO 的神经毒性作用,切断或影响引起神经组织细胞凋亡的环节,从而阻止了继发性神经组织死亡的恶性循环,最大限度地保护和修复神经组织。另外,经穴输氧通过对疾病相关的穴位,刺激穴位下神经、血管、淋巴组织被刺激,将此兴奋传入大脑脑损伤区神经元,使其在穴位局部和损伤区域同时表达由 nNOS 催化产生瞬间释放的 NO,作用迅速,但时间比较短暂,一般为数小时,其作用可以改善血管循环,抑制白细胞聚集,对血管内膜起保护作用,抑制肾上腺素物质产生的血管收缩物质,改善脑损伤区的缺血缺氧状态,使神经细胞功能恢复^[8]。因此推测经穴输氧通过降低 iNOS 活性而提高和延长 nNOS 的活性,对神经组织有保护作用。

参考文献:

- [1] Feeney D M, Boyeson M G, Linn R T, et al. Responses to cortical injury: I. Methodology and local effects of contusions in the rat [J]. Brain Res, 1981, 211: 67-77.
- [2] 李晓林. 经穴输氧临床初探[J]. 国外医学·中医中药分册, 1997, 6: 12.
- [3] 李迎国, 杨喜民, 王晓峰, 等. 经穴输氧对大鼠颅脑损伤后血液流变性的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2002, 11: 344-346.
- [4] Koprowski H, Zheng Y M, Heber-Katz E, et al. In vivo expression of inducible nitric oxide synthase in experimentally induced neurologic diseases[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90: 3024-3027.
- [5] 戴翰升, 王小菊, 简志宏, 等. 大鼠创伤性脑水肿一氧化氮及其合成的变化[J]. 中国危重病急救医学, 1999, 11: 622-623.
- [6] Dawson V L, Dawson T M, Bartley D A, et al. Mechanisms of nitric oxide-mediated neurotoxicity in primary brain cultures[J]. J Neurosci, 1993, 13: 2651-2661.
- [7] 王汉旻, 黄怀钧, 王凤霞. 一氧化氮合酶抑制剂对缺血性海马神经元凋亡的抑制作用[J]. 中国危重病急救医学, 2000, 12: 284-286.
- [8] 郑文权, 陈俊抛, 田时雨. 局灶性脑缺血时脑组织中 nNOS 对神经元的作用研究[J]. 中风与神经疾病杂志, 1999, 16: 15-17.

(收稿日期: 2006-08-25 修回日期: 2006-10-05)

(本文编辑: 李银平)