

• 论著 •

针刺预处理对脑缺血/再灌注大鼠脑水肿及腺苷水平的影响

唐 伟, 邹珮枫

(大连大学附属新华医院神经内科, 辽宁 大连 116021)

【摘要】 目的:探讨针刺预处理对全脑缺血大鼠脑水肿及腺苷(ADO)水平的影响,并与缺血预处理的效果进行比较。方法:120只Wistar大鼠被随机分为正常对照组、假手术组、脑缺血组、脑缺血预处理组、针刺预处理组5组,每组24只。采用四动脉阻断法制备大鼠全脑缺血模型。假手术组:仅暴露血管,不制模;脑缺血组:全脑缺血10min;脑缺血预处理组:全脑预缺血3min,再灌注24h后再次全脑缺血10min;针刺预处理组:缺血10min前7d针刺大鼠双侧足三里穴和曲池穴并进行电刺激,每日1次,每次30min,同时刺激百会穴。每组分别于再灌注12、24、48和72h各活杀6只动物,取脑组织,用干湿法测脑组织含水量,分光光度计测定ADO含量。结果:假手术组各时间点脑组织含水量与正常对照组比较差异均无显著性;脑缺血组脑组织含水量明显高于假手术组和正常对照组,且随时间延长脑水肿越来越重;脑缺血预处理组与针刺预处理组各时间点比较均明显低于脑缺血组,但差异均无显著性;针刺预处理组48h和72h与正常对照组比较差异无显著性。假手术组各时间点脑组织ADO含量与正常对照组比较差异均无显著性;脑缺血组脑组织ADO含量明显高于假手术组和正常对照组;脑缺血预处理组与针刺预处理组各时间点比较均高于脑缺血组,大约是脑缺血组的2倍,但差异无显著性。结论:针刺预处理与脑缺血预处理同样可以使脑组织ADO含量增高,提示针刺预处理发生机制与ADO有着极为密切的关系,增强内源性ADO含量很可能是针刺预处理的脑保护作用机制之一。

【关键词】 缺血/再灌注损伤;脑;针灸疗法;脑水肿;缺血预处理;腺苷

中图分类号:R245;R259;R743.31 文献标识码:A 文章编号:1008-9691(2007)03-0166-03

Effect of acupuncture precondition on cerebral edema and adenosine in rats with cerebral ischemia/reperfusion

TANG Wei, ZOU Sa-feng. Department of Neurology, Affiliated Xinhua Hospital of Dalian University, Dalian 116021, Liaoning, China

【Abstract】 **Objective:** To explore the effect of acupuncture precondition on adenosine (ADO) and cerebral edema in rats with cerebral ischemia and compare the effects of acupuncture precondition with those of ischemic precondition. **Methods:** One hundred and twenty Wistar rats were divided into five groups randomly and equally. They were control group with no intervention, sham operation group with only exploration of 4 blood vessels without performing models, ischemic group with blockage of 4 blood vessels for 10 minutes to induce whole brain ischemia, ischemic precondition group with blockage of 4 blood vessels for 3 minutes first then 10 minutes after 24 hours of reperfusion and acupuncture precondition group with electroacupuncture at bilateral Zusanli point (足三里穴) and Quchi point (曲池穴) with simultaneous stimulation of Baihui point (百会穴) for 30 minutes everyday for 7 days before 10 minute-ischemia. In each group, after reperfusion for 12, 24, 48, 72 hours, 6 rats were killed, respectively. Brain water content was measured by dry-wet method, and ADO was analyzed by spectrophotometer. **Results:** ①Brain water content: in sham operation group, the water content had no difference compared with that in the normal group at any time point. That in ischemic group was higher than those in control and sham operation groups, and was higher and higher following the prolongation of time. Those of ischemic precondition group and acupuncture precondition group were lower than that in ischemic group and the two former groups were of no differences at any time point. Those in acupuncture precondition group was not different from that of control group at 48 and 72 hours. ②ADO content: ADO in sham operation group had no significant differences in comparison with that in normal control group at any time point. ADO in ischemic group was higher than that in sham operation group and normal control group. ADO contents in ischemic precondition group and acupuncture precondition group were two times as ischemic group and the two former groups had no difference. **Conclusion:** The increase of ADO in acupuncture precondition group suggests the mechanism of acupuncture precondition be related to the increase of ADO, and the increase of internal ADO may be one of the mechanisms of cerebral protection.

【Key words】 cerebral ischemia/reperfusion injury; acupuncture therapy; cerebral edema; ischemic precondition; adenosine

针刺预处理是指在脑缺血之前给予针刺,从而对缺血后脑组织产生部分保护作用的处理措施。我们前期的研究表明,针刺预处理能减少脑缺血后海马 CA1 区神经元凋亡,诱导脑缺血耐受^[1],但针刺预处理的脑保护作用机制尚不清楚。本研究拟探讨针刺预处理对全脑缺血大鼠脑水肿及腺苷(ADO)水平的影响,为针刺防治缺血性脑血管疾病提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 实验材料:健康雄性 Wistar 大鼠 120 只(由黑龙江中医药大学实验动物中心提供),6 月龄,体重(250±20)g,在常温、常湿环境下自由饮水。腺苷脱氢酶购自 Boehringer molannheim 公司。

1.2 动物分组及模型制备:采用四动脉阻断法制备大鼠全脑缺血模型,以翻正反射消失、1 min 后动物无反应为判断模型制备成功的主要标准。120 只大鼠按随机数字表法分为 5 组,每组 24 只。①正常对照组:正常饲养,不干预。②假手术组:仅暴露 4 条血管,不制模。③脑缺血组:全脑缺血 10 min。④脑缺血预处理组:全脑缺血 3 min,再灌注 24 h 后再次全脑缺血 10 min。⑤针刺预处理组:术前 7 d 给予针刺,用 0.25 mm×40 mm 毫针刺大鼠双侧足三里穴,直刺进针 5 mm;取曲池穴,直刺进针 4 mm;双侧连接 KWD-808 I 型全能脉冲电疗仪,频率为 1 Hz,电压为 2 V,强度以肢体轻微抖动为度,每日 1 次,每次 30 min;同时用 0.25 mm×25 mm 毫针刺向百会穴平刺约 3 mm,间歇 5 min 捻转 1 次,平补平泻,共持续 30 min;针刺 7 d 后给予全脑缺血 10 min。上述 5 组每组再分为再灌注 12、24、48 和 72 h 4 个时间点,每个时间点 6 只大鼠。所有动物手术至苏醒期间用白炽灯维持肛温在(36.0±0.5)℃(相当于脑温 37℃左右),苏醒后每日测肛温 1 次。

1.3 检测指标及方法

1.3.1 脑组织含水量测定:以干湿法测脑组织含水量,每组取 6 只大鼠断头处死,取出左侧额顶叶脑组织用分析天平称湿重(W),然后在(100±2)℃烤箱中烤至恒重,再称干重(D),根据下列公式计算脑组织含水量。

$$\text{脑组织含水量} = (W - D) / W \times 100\%$$

基金项目:辽宁省教育厅高等学校科学研究科研基金资助项目(20040050)

作者简介:唐伟(1972-),男(满族),辽宁省人,博士,副主任医师,主要从事针刺预处理脑保护机制研究(Email: tangweiren@yahoo.com.cn)。

1.3.2 ADO 含量测定:取右侧脑组织称重,用超声波组织细胞粉碎仪制备成脑组织匀浆,测定时匀浆瓶中预先加入 0.6 mol/L HClO₄ 溶液 6 ml,2℃下以 14 000 r/min(离心半径 10 cm)离心 30 min,取上清液,用 5 mol/L 的 K₂CO₃ 溶液中和至 pH 为 7.4;2℃下以 14 000 r/min(离心半径 10 cm)离心 25 min,取上清液,加入含 K₂HPO₄ 3 mmol/L 和乙二胺四乙酸(EDTA)3 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液摇匀;使用双波长分光光度计测定 ADO 含量。

1.4 统计学分析:采用 SPSS10.0 统计软件,数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,进行单因素方差分析,两组间比较采用 Newman-Keuls *q* 检验;*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 实验动物数量分析:实验中脑缺血组、针刺预处理组共有 5 只大鼠缺血中反射无明显抑制,瞳孔无变化,认为未造成严重缺血而被剔除;4 只术中死亡;3 只出现抽搐死亡。补充后最终有 120 只大鼠进入结果分析。

2.2 各组大鼠体重、手术时间及手术肛温比较:各组大鼠体重、手术时间及手术肛温比较差异均无显著性,说明各组间有可比性。

2.3 针刺预处理对脑水肿的影响(表 1):与正常对照组比较,假手术组再灌注 12、24、48 和 72 h 脑组织含水量比较差异均无显著性,脑缺血组脑组织含水量明显高于假手术组和正常对照组,且随时间延长脑水肿越来越重;脑缺血预处理组和针刺预处理组脑组织含水量均显著低于脑缺血组,但两组间比较差异均无显著性,再灌注 48 h 和 72 h 与正常对照组比较差异无显著性。

表 1 各组脑组织含水量比较($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 1 Comparison of water content of brain tissues in each group($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	12 h	24 h	48 h	72 h
正常对照组	(75.8±2.7)%	(74.9±1.3)%	(73.7±3.1)%	(74.4±1.4)%
假手术组	(76.3±2.6)%	(75.4±3.3)%	(74.6±2.5)%	(73.7±2.3)%
脑缺血组	(80.4±6.4)% ^{ab}	(83.0±8.4)% ^{ab}	(85.5±5.9)% ^{ab}	(88.7±5.4)% ^{ab}
脑缺血预处理组	(78.6±3.7)% ^{ac}	(79.4±4.0)% ^{ac}	(77.7±2.6)% ^c	(76.3±1.4)% ^c
针刺预处理组	(79.4±2.3)% ^{ac}	(80.5±1.6)% ^{ac}	(77.7±2.7)% ^c	(76.4±4.5)% ^c
<i>F</i> 值	5.44	5.77	5.21	6.88
<i>P</i> 值	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

注:与正常对照组比较:^a*P*<0.05;与假手术组比较:^b*P*<0.05;与脑缺血组比较:^c*P*<0.05

2.4 针刺预处理对 ADO 水平的影响(表 2):假手术组于再灌注 12、24、48 和 72 h 脑组织 ADO 含量与正常对照组比较差异均无显著性,脑缺血组脑组

织 ADO 含量明显高于假手术组和正常对照组;脑缺血预处理组和针刺预处理组 ADO 含量于再灌注各时间点明显高于脑缺血组,大约是脑缺血组的 2 倍,但两组间比较差异无显著性。

表 2 各组脑组织 ADO 含量的比较($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 2 Comparison of ADO content of brain tissues in each group($\bar{x} \pm s, n=6$) nmol/L

组别	12 h	24 h	48 h	72 h
正常对照组	37±4	39±5	38±8	36±7
假手术组	38±6	36±7	36±5	36±4
脑缺血组	56±3 ^{ab}	58±5 ^{ab}	54±4 ^{ab}	53±4 ^{ab}
脑缺血预处理组	122±14 ^c	132±16 ^c	136±17 ^c	139±16 ^c
针刺预处理组	121±16 ^c	123±17 ^c	125±18 ^c	142±14 ^c
F 值	5.31	5.82	4.17	6.98
P 值	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

注:与正常对照组比较:^a $P<0.05$;与假手术组比较:^b $P<0.05$;与脑缺血组比较:^c $P<0.05$

3 讨论

我们借鉴“缺血预处理”现象和依据中医“针灸治未病”理论提出了“针刺预处理”的概念,是指在脑缺血之前给予针刺,从而对脑缺血产生部分保护作用^[2]。我们前期的动物实验已经证实,针刺能够诱导脑缺血耐受的发生,对全脑缺血大鼠脑组织具有保护作用^[1]。本实验是在前期基础上进一步深入研究。

脑水肿是急性脑血管病的共同病理过程,早期主要是细胞毒性水肿,后期则为血管源性水肿。水肿形成又可加重循环障碍及脑缺血损伤,扩大缺血范围,并最终导致脑疝形成,因此,阻止和消除脑水肿是治疗急性脑血管病的关键。本实验中假手术组各时间点脑组织含水量与正常对照组比较差异均无显著性;脑缺血组脑组织含水量高于假手术组和正常对照组,且随时间延长脑水肿越来越重;脑缺血以后,葡萄糖的无氧酵解使脑中的乳酸含量增加,引起 pH 值下降,导致代谢性酸中毒,使 Na^+/K^+ 交换通道抑制,阻碍 H^+ 排除,致使 H^+ 升高,促使更多 Na^+ 进入脑内,伴有大量渗透性水的摄入,从而促发和加重脑水肿。脑缺血预处理组、针刺预处理组各时间点脑组织含水量均低于脑缺血组,说明脑缺血预处理具有防治脑水肿的作用;针刺预处理组 48 h 和 72 h 与正常对照组比较差异均无显著性。这与我们前期实验观察的脑组织病理学改变的结果相吻合^[1];光镜下,脑缺血预处理组、针刺预处理组术后各时间点细胞肿胀轻微,毛细血管水肿程度轻,尼氏体丰富,术后 72 h 肿胀细胞已很少见到;电镜下线粒体肿胀轻微,毛细血管水肿少见,术后 72 h 损伤细胞大多

已恢复至正常形态,胞浆内细胞器丰富,结构完整。

ADO 作为中枢神经系统内主要的抑制性调节因子之一,对脑缺血、缺氧和脑外伤有明显的保护作用^[3]。它是机体在缺血、缺氧时高能磷酸盐分解产生的一种内源性核苷,在不同缺血模型中发现细胞外液 ADO 含量显著增高,ADO 能抑制缺血诱导的兴奋性氨基酸(EAA)释放,降低细胞膜 Ca^{2+} 通透性,扩张脑血管,降低中性粒细胞的活动功能和抑制血小板凝集,减缓能量消耗,是一种内源性神经保护剂^[3-5]。另外,张良清等^[6]临床研究表明,ADO 预处理可减少炎症细胞因子的释放,降低活化中性粒细胞与内皮的黏附,进一步抑制炎症反应,从而减轻组织的损伤。本实验中假手术组各时间点脑组织 ADO 含量与正常对照组比较差异均无显著性,说明麻醉药、手术创伤对 ADO 含量没有影响;脑缺血组脑组织 ADO 含量高于假手术组和正常对照组,证实脑缺血后 ADO 含量增高。脑缺血预处理组、针刺预处理组脑组织 ADO 含量高于脑缺血组,大约是脑缺血组的 2 倍;预处理中 ATP 水解,ADO 释放显著增加,并与特异性受体(主要为受体)结合,激活蛋白激酶 C(PKC),从而参与预处理调节。ADO 可提前或加强 K^+-ATP 通道的开放,限制 Ca^{2+} 内流和 EAA 的突触前释放,稳定神经元膜电位,降低脑能量代谢,从而起到组织对缺血和低氧的耐受作用。

综上所述,针刺预处理与脑缺血预处理同样可以使脑组织 ADO 含量增高,提示针刺预处理的机制与 ADO 关系极为密切,增强内源性 ADO 含量很可能是针刺预处理脑保护作用机制之一。

参考文献:

- [1] 孙忠人,唐伟,单丽莉,等. 针刺诱导脑缺血耐受的实验研究[J]. 中国临床康复, 2005, 9(1): 122-123.
- [2] 陈泽斌,邹峰,袁芳,等. 针刺预处理对脑缺血/再灌注大鼠顶皮质 NR2A 和 NR2B 蛋白表达的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2005, 12(2): 79-83.
- [3] 雷毅,熊利泽,张龙芳,等. 腺苷 A1 受体阻断剂对电针预处理诱导脊髓缺血耐受作用的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2005, 12(4): 199-203.
- [4] 王强,刘艳红,熊利泽,等. 腺苷 A1 受体参与单次电针预处理诱导的脑急性缺血耐受[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2004, 11(1): 13-16.
- [5] 车玉英,贾国良,陈士良. 缺血预处理和“腺苷预处理”对兔心肌梗塞面积的影响[J]. 中国危重病急救医学, 1997, 9(9): 514-516.
- [6] 张良清,李志志,邵义明,等. 腺苷预处理对体外循环下瓣膜置换术患者围术期炎性反应的影响[J]. 中国危重病急救医学, 2002, 14(4): 217-219.

(收稿日期: 2006-12-24 修回日期: 2007-01-04)

(本文编辑: 李银平)