

针 灸 推 拿

针刺对多发梗死性痴呆大鼠一氧化氮/
一氧化氮合酶的影响刘存志¹ 于建春¹ 王 彤² 韩景献¹

摘要 目的:探讨针刺对多发梗死性痴呆(MID)大鼠一氧化氮(NO)/一氧化氮合酶(NOS)的影响。方法:MID大鼠随机分为模型组、针刺组和非穴组,并设正常组和假手术组。观察各组大鼠血清及不同脑区NO含量、NOS活性及各脑区神经元型NOS(nNOS)基因的表达。结果:与正常组比较,模型组大鼠血清、皮质、海马NO含量升高,海马及纹状体NOS活性升高,各脑区nNOS mRNA及蛋白表达增强。针刺可明显逆转上述异常改变。结论:针刺可抑制MID大鼠nNOS的过度表达,降低NOS活性,减少NO的产生,从而通过NO/NOS途径起到一定的神经保护作用。

主题词 痴呆,多发性梗死性/针灸疗法 一氧化氮/代谢

Effects of Acupuncture on Nitric Oxide and Nitric Oxide Synthetase in Multi-Infarctional Dementia RatsLiu Cunzhi¹, Yu Jianchun¹, Wang Tong², et al.

(1. The First Affiliated Hospital of Tianjin College of TCM, Tianjin 300193; 2. Tianjin College of TCM)

Objective: To probe into effects of acupuncture on nitric oxide (NO) and nitric oxide synthetase (NOS) in multi-infarctional dementia (MID) rats. **Methods:** MID rats were randomly divided into model group, acupuncture group, non-acupoint group, normal group and sham-operation group. NO contents and NOS activities in serum and different brain regions, and nNOS gene expression in different brain regions were investigated. **Results:** NO contents in serum, cortex and hippocampus, NOS activities in hippocampus and striatum, and expressions of nNOS mRNA and protein in different regions increased in model group as compared with those of normal group. Acupuncture could significantly reverse the above abnormal changes. **Conclusion:** Acupuncture can inhibit over-expression of nNOS, decrease activity of NOS and reduce NO generation in MID rats, so as to exert a certain nerve protective action via NO/NOS pathway.

Key Words Dementia, multi-infarctional/acup-mox therapy; Nitric oxide/metabolism

多发梗死性痴呆(MID)是血管性痴呆(VD)的最主要类型,是在脑血管病变基础上,由一次多灶或多次脑梗死造成的痴呆,严重危害老年人的健康和生活质量。大量研究表明,一氧化氮(NO)在脑血管疾病发病中具有神经保护和神经毒性两种不同倾向^[1],故NO在VD发病过程中有可能起到保护和损伤两种作用。本研究采用栓子注入法制作MID模型,从含量(活性)及基因表达水平系统观察MID大鼠血清及不同脑区NO/一氧化氮合酶(NOS)的变化及针刺的作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物分组:Ⅱ级Wistar雄性大鼠73只,体重(355±20)g,由中国人民解放军军事医学科学院第四研究所提供。随机分为模型组和非穴组各14只,正常

组、假手术组和针刺组各15只。

1.2 模型制作:参考Kaneko^[2]、陈俊抛^[3]的方法加以改进。取同种大鼠股动脉采血,无菌条件下于37℃温箱内自然干燥,制备200μm以下的血凝块备用。每10mg血凝块加生理盐水0.3ml。6.5%水合氯醛35mg/100g腹腔麻醉后,在右颈内动脉起始处,用1ml注射器缓慢注入栓子盐水悬液0.3ml,造成多灶性脑梗死,然后结扎颈外动脉,缝合皮肤。肌肉注射庆大霉素抗感染。假手术组手术方法同模型制作,以生理盐水0.3ml代替栓子溶液。

1.3 针刺方法:针刺组采用益气调血、扶本培元针法,穴位选取膻中、中脘、气海及双侧血海、足三里,取穴参照华兴邦等研制的大鼠穴位图谱^[4]。除血海穴外均行捻转补法各30秒;血海穴施捻转泻法30秒。非穴组选取双侧肋下各两个固定非穴点作为对照刺激点,用平补平泻捻转手法各30秒。针刺组、非穴组于造模后12天开始针刺,每日1次,治疗6天,休息1天,3周共治疗18次。模型组、假手术组和正常组进行与针刺组和非穴组相同时间、相同程度的捉抓刺激。

基金项目:天津市科技发展计划重点项目(05YFSYSF01500),
天津市自然科学基金项目(033606811)

1 天津中医药大学第一附属医院老年病研究室,天津市南开区
鞍山西道31号 300413

2 天津中医药大学

收稿日期:2005-05-26;修回日期:2005-09-19

1.4 NO/NOS 含量(活性)测定:针刺结束后,随机抽取正常组、假手术组、模型组、针刺组及非穴组各 9 只,用于 NO 含量及 NOS 活性测定。各组动物由股动脉取血,将标本做相应处理后待测。同时各组动物断头处死,1 分钟内快速取脑,在冰盘上分离出大脑皮质、海马及纹状体,用预冷的生理盐水冲净表面血液,以滤纸吸干。将不同脑组织分别称重后,以重量:体积=1:9 加入冰生理盐水,制成 10%的组织匀浆,3000 转/分钟离心 15 分钟,取上清液-80℃保存以备测定。血清和脑组织中 NO 含量测定用硝酸还原酶法,NOS 活性测定采用化学比色法(NO 及 NOS 测试盒均由南京建成生物工程研究所提供)。

1.5 nNOS 基因表达的测定:其余 28 只大鼠随机分为正常组、假手术组及针刺组各 6 只,模型组及非穴组各 5 只。大鼠深度麻醉后,迅速剪开胸腹腔,暴露心脏,在右心耳处剪一小口,迅速将注射针头从心尖插入左心室,并从主动脉口进入主动脉,推注生理盐水 100ml,继之以 4%中性多聚甲醛 350ml 灌注固定。取出大脑,用相同固定液继续固定 2~4 小时,常规石蜡切片,检测按照试剂盒说明书进行操作。nNOS mRNA 的检测采用原位杂交法;nNOS 蛋白的检测采用免疫组织化学 SP 法。其中 nNOS 原位杂交检测试剂盒及 DAB 显色试剂盒均由天津市灏洋生物制品科技有限责任公司提供;nNOS 兔 IgG 多克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司,SP 免疫组化检测试剂盒购自美国 Zymed 公司。nNOS mRNA 及蛋白表达的阳性信号主要位于细胞浆内,呈棕黄(褐)色颗粒。在 400 倍光镜

下,随机选取各组不同脑区各 10 个视域,用 HPIAS-2000 高清晰度彩色病理图文分析系统(同济医科大学千屏影像工程公司提供)进行定量分析,测量黄褐色反应物的积分光度。

1.6 统计学方法:所有数据用 SPSS10.0 统计软件处理,组间比较用单因素方差分析,检验水准以 $P<0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 针刺对各组大鼠血清和脑组织 NO 含量、NOS 活性影响的比较:表 1 示,与正常组比较,模型组大鼠血清、皮质及海马中 NO 含量明显增高($P<0.01$),而针刺组血清、皮质及海马中 NO 含量明显低于模型组($P<0.05$ 或 $P<0.01$),与正常组接近($P>0.05$)。模型组大鼠海马及纹状体 NOS 活性较正常组明显升高($P<0.01$),针刺组与模型组比较则显著降低($P<0.01$)。表明针刺具有降低 MID 大鼠血清、皮质、海马 NO 含量及海马、纹状体 NOS 活性的作用。

2.2 针刺对各组大鼠不同脑区 nNOS mRNA 表达的影响:表 2 示,模型组各脑区 nNOS mRNA 的表达均明显强于正常组($P<0.05$ 或 $P<0.01$),尤以海马为著,而针刺组皮质及海马内 nNOS mRNA 的表达均明显低于模型组($P<0.05$ 或 $P<0.01$),在纹状体内其表达水平虽低于模型组,但差异无显著性($P>0.05$)。表明针刺可下调 MID 模型大鼠异常高表达的 nNOS mRNA 水平。

2.3 针刺对各组大鼠不同脑区 nNOS 蛋白表达的影响:表 2 示,模型组各脑区 nNOS 蛋白的表达均明显强

表 1 各组大鼠血清和脑组织 NO 含量、NOS 活性比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	NO				NOS			
		血清 ($\mu\text{mol/L}$)	皮质 ($\mu\text{mol/gProt}$)	海马 ($\mu\text{mol/gProt}$)	纹状体 ($\mu\text{mol/gProt}$)	血清 (U/ml)	皮质 (U/mgProt)	海马 (U/mgProt)	纹状体 (U/mgProt)
正常组	9	19.41 $\pm$ 5.30	0.68 $\pm$ 0.27	0.89 $\pm$ 0.18	1.22 $\pm$ 0.28	32.12 $\pm$ 4.14	0.35 $\pm$ 0.07	0.51 $\pm$ 0.12	0.58 $\pm$ 0.11
假手术组	9	24.24 $\pm$ 5.54 $\triangle\triangle$	0.84 $\pm$ 0.18 $\triangle\triangle$	1.03 $\pm$ 0.32	1.01 $\pm$ 0.34	32.05 $\pm$ 2.72	0.36 $\pm$ 0.06	0.55 $\pm$ 0.21 $\triangle\triangle$	0.61 $\pm$ 0.16 $\triangle\triangle$
模型组	9	33.82 $\pm$ 6.58**	1.54 $\pm$ 0.49**	1.33 $\pm$ 0.30**	1.29 $\pm$ 0.34	31.30 $\pm$ 1.66	0.33 $\pm$ 0.11	0.85 $\pm$ 0.13**	0.83 $\pm$ 0.07**
针刺组	9	19.12 $\pm$ 6.58 $\triangle\triangle$	1.01 $\pm$ 0.48 $\triangle$	0.90 $\pm$ 0.23 $\triangle\triangle$	0.99 $\pm$ 0.41	30.45 $\pm$ 2.66	0.35 $\pm$ 0.11	0.63 $\pm$ 0.12** $\triangle\triangle$	0.60 $\pm$ 0.17 $\triangle\triangle$
非穴组	9	38.24 $\pm$ 6.15**	0.77 $\pm$ 0.29	0.97 $\pm$ 0.35 $\triangle$	1.11 $\pm$ 0.16	29.56 $\pm$ 4.17	0.35 $\pm$ 0.10	0.77 $\pm$ 0.04**	0.89 $\pm$ 0.05**

与正常组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较, $\triangle P<0.05$, $\triangle\triangle P<0.01$ 。下表同

表 2 各组大鼠不同脑区 nNOS mRNA、nNOS 蛋白
表达积分光度比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	nNOS mRNA			nNOS 蛋白		
		皮质	海马	纹状体	皮质	海马	纹状体
正常组	6	95.01 $\pm$ 43.15	133.82 $\pm$ 44.67	110.23 $\pm$ 46.39	41.31 $\pm$ 19.58	175.01 $\pm$ 74.27	57.12 $\pm$ 20.00
假手术组	6	114.85 $\pm$ 40.48 $\triangle$	155.27 $\pm$ 65.62 $\triangle\triangle$	146.88 $\pm$ 66.19 $\triangle$	79.86 $\pm$ 33.27** $\triangle$	195.00 $\pm$ 106.98 $\triangle$	134.50 $\pm$ 45.34** $\triangle\triangle$
模型组	5	320.52 $\pm$ 153.92*	413.21 $\pm$ 82.51**	306.40 $\pm$ 137.99*	280.86 $\pm$ 141.03*	716.81 $\pm$ 323.28*	581.97 $\pm$ 259.33**
针刺组	6	129.04 $\pm$ 23.08 $\triangle$	124.71 $\pm$ 33.75 $\triangle$	162.02 $\pm$ 60.39 $\triangle$	113.68 $\pm$ 43.17 $\triangle$	1139.54 $\pm$ 57.44 $\triangle$	96.29 $\pm$ 46.81 $\triangle$
非穴组	5	378.50 $\pm$ 151.07**	326.99 $\pm$ 107.17**	316.77 $\pm$ 108.57**	166.11 $\pm$ 47.91**	380.53 $\pm$ 176.37*	336.86 $\pm$ 123.28**

于正常组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 而针刺组各脑区 nNOS 蛋白的表达均明显低于模型组($P < 0.05$)。表明针刺可下调 MID 模型大鼠异常高表达的 nNOS 蛋白水平。此外, 假手术组在纹状体及皮质内 nNOS 蛋白表达强于正常组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 这可能与手术创伤所产生的应激反应有关。

3 讨论

在人体衰老过程中, 三焦气化功能日趋低下, 加之各种致病因素的影响, 最易出现气机升降出入失常, 如气虚、气滞、气郁等, 随之产生痰浊、瘀血、浊毒等病理产物, 老年期痴呆正是这种气化失常的具体表现^[5]。上取膻中穴理宗气, 下用气海穴壮元气, 中选中脘穴调水谷之气, 分治三焦; 同时中脘、足三里、血海又可调养气血, 培补后天。由此可见, 益气调血、扶本培元针法着眼于从气论治, 不同于以往从肝论治、从肾论治、从痰论治及从瘀论治等常规治法, 是一种全新的治疗思路。

正常生理情况下, NO 通过强化或削弱突触连接, 成为与学习相关的突触调节和神经发育中突触形成这两个过程中的共同分子机制。过量的 NO 则是造成神经元迟发性损伤的主要因素^[6]。大鼠在全脑缺血后 2 周痴呆形成时, 空间分辨、学习记忆能力发生严重障碍, 海马内 NO 水平明显升高^[7]。本研究中 MID 大鼠海马、纹状体 NOS 活性及血清、皮质、海马 NO 含量明显增高, 提示 NO 的毒性作用参与了 VD 的发病过程, 这与一些学者^[8]认为脑缺血后近期记忆的损害与再灌注早期海马内产生 NO 有关的观点一致。研究显示, VD 发生后不同脑区 nNOS 蛋白和 mRNA 的表达量大幅度增加, 表明 NO/NOS 途径在 VD 的形成过程中具有重要作用, 亦即 NO 的神经毒性作用途径可能是导致 MID 大鼠认知功能障碍的重要机制之一。

海马既是缺血损伤敏感脑区, 又是学习记忆的相关脑区, 它对中风、颅脑损伤和其他疾病或损伤的破坏很敏感。生化检测结果显示, 在各脑区中以海马受累最

明显。NOS 活性及 NO 含量在海马区均出现明显异常, 而纹状体仅出现 NOS 活性异常, 皮质区仅出现 NO 含量异常, 提示脑缺血后上述各指标的水平变化在不同脑区有一定的空间定位。

现代医学对 VD 脑损伤级联反应过程中各种机制的研究以及中医学对痴呆病因病机的认识表明, VD 脑损伤是多重机制共同参与的结果, 仅对某一机制或某个环节进行干预, 作用局限。针刺的脑保护作用机制仍不清楚, 但至少不同于药物的直接干预作用, 可能是通过激发机体的潜能, 启动内在多种调控机制所产生的间接参与作用。本研究显示, 针刺在转录和翻译水平上均可明显抑制 MID 大鼠各相关脑区 nNOS 的过度表达, 降低 NOS 活性, 减少 NO 的产生, 从而通过 NO/NOS 途径起到一定的神经保护作用, 这可能是针刺改善 MID 大鼠脑功能、提高其学习记忆能力的重要机制之一。

参考文献

- 1 Iadecola C. Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain injury. Trends Neurosci, 1997, 20(3): 132~139.
- 2 Kaneko D, Nakamura N, Ogawa T. Cerebral infarction in rats using homologous blood emboli: Development of a new experimental model. Stroke, 1985, 16(1): 76~84.
- 3 陈俊抛, 田时雨, 于薇薇, 等. 多发性脑梗死痴呆动物模型的研究. 中华神经精神科杂志, 1994, 27(5): 311~312.
- 4 华兴邦, 李辞蓉, 周浩良, 等. 大鼠穴位图谱的研制. 实验动物与动物实验, 1991, (1): 1~5.
- 5 刘存志, 于建春, 韩景献. 试述韩景献教授对老年期痴呆基本病机的认识. 湖北中医杂志, 2004, 26(1): 15~16.
- 6 Gahm C, Holmin S, Mathiesen T. Temporal profiles and cellular sources of three nitric oxide synthase isoforms in the brain after experimental contusion. Neurosurgery, 2000, 46(1): 169~177.
- 7 许丹芸, 游国雄, 苗建亭, 等. 脑缺血及血管性痴呆形成过程中一氧化氮机制的实验研究. 中华老年医学杂志, 1999, 18(4): 240~243.
- 8 Ohno M, Yamamoto T, Watanabe S. Intrahippocampal administration of the NO synthase inhibitor L-NAME prevents working memory deficits in rats exposed to transient cerebral ischemia. Brain Res, 1994, 634(1): 173~177.

类风湿、强直性脊柱炎、无菌性骨坏死专科培训招生

河北省巨鹿县中医风湿骨病研究所专业从事风湿骨病研究 20 年, 对风湿骨病的治疗取得了进展。本班重点传授: 腰椎间盘突出手法归位, 并传授中药“三联疗法”主要用于颈椎病、骨质增生、妇女产后风湿、类风湿性关节炎、强直性脊柱炎、无菌性骨坏死。“三联疗法”可快速修复骨侵蚀, 恢复关节功能。背三针疗法主要适用于关节痛、骨性关节、滑膜炎各种膝关节疾病, 并传授本院制剂丸、散的配制工艺。本班采用理论与实践结合。由学员亲自实践, 直到得心应手为止。学员可带患者免费试验。开班时间每月 1 日、15 日。自带白大衣。学费 3000 元, 函授 1500 元, 学期 7 天。

地址: 河北巨鹿县中医风湿病专科培训学校; 邮编: 055250; 电话: 0319-4338888; 联系人: 李淑英