

电针不同介入时间对急性脊髓损伤大鼠一氧化氮、超氧化物歧化酶和丙二醛的影响

王婷婷 邬继红 钟煜朝 韩 丽 王自勤

(北京中医药大学针灸学院, 北京市朝阳区北三环东路 11 号, 100029)

[摘 要] **目的** 对电针治疗急性脊髓损伤(ASCI)大鼠的最佳介入时间进行初步探讨。**方法** 将 50 只雄性 SD 大鼠随机分为空白组、模型组、电针 I 组、电针 II 组、电针 III 组, 电针各组分别在造模后 2h、6h、12h 进行电针治疗。选用“大椎”和“命门”穴, 持续脉冲电流, 频率 2Hz, 强度 2~5mA, 治疗 30min。在造模后 24h 采集标本, 检测一氧化氮(NO)、超氧化物歧化酶(SOD)和丙二醛(MDA)含量的变化。**结果** 电针各组大鼠损伤脊髓中 NO、SOD 和 MDA 含量均较模型组有改变, 以造模后 2h 针刺影响最明显($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 造模后 6h 针刺次之, 造模后 12h 针刺再次之。**结论** 急性脊髓损伤后早期介入(2h 针刺)疗效更佳。

[关键词] 急性脊髓损伤; 一氧化氮; 丙二醛; 超氧化物歧化酶; 针刺时效

Influence of Electroacupuncture at Different Time on Nitric Oxide, Superoxide Dismutase and Malondialdehyde Levels in Acute Injury of Spinal Cord in Rats

WANG Tingting, WU Jihong, ZHONG Yuchao, et al.

(Acupuncture and Moxibustion College, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029)

ABSTRACT **Objective** To observe the effect of electroacupuncture at different time in acute injury of spinal cord (ASCI) in rats so as to find the best time for the treatment. **Methods** A total of 50 SD rats were evenly randomized into normal group, model group, electroacupuncture group A, B and C. The 3 electroacupuncture groups were treated with electroacupuncture at 2h, 6h and 12h respectively after being made ASCI model. The acupoints Mingmen (GV 4) and Dazhui (GV 14) were chosen for electroacupuncture with frequency 2Hz, continuous wave, and intensity 2~5mA for 30 minutes. The samples were collected at 24h after modeling to detect the changes in nitric oxide (NO), malondialdehyde (MDA) and superoxide dismutase (SOD) in the injured spinal cord. **Results** After treatment, the serum levels of NO, MDA and SOD in the injured spinal cord of all rats changed. The result of 2h after modeling was the most significant ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), then 6h the second, and then 12h the third. **Conclusion** Electroacupuncture given earlier (2h after ASCI) achieves better effect.

Key Words Acute spinal cord injury; Nitric oxide; Malondialdehyde; Superoxide dismutase; Time-effect of acupuncture

国内外研究表明, 急性脊髓损伤(acute spinal cord injury, ASCI)的继发性损害易形成不可逆的局面^[1], 而自由基是脊髓继发性损害的重要因素与标志^[2], 对于脊髓损伤的治疗研究也主要集中在脊髓损伤后脊髓内继发病理损伤的预防和逆转^[3]。在这个阶段, 针刺治疗的不同介入时间对疗效是否有影响? 我们查阅近 10 年的文献仅发现吴永刚等^[1]通过实验室观察, 认为针刺能够改善脊髓损伤后的血流量, 抑制血流量的下降。但其观察仅基于不同电针介入时间对脊髓损伤血流量变化的影响, 对于其他指标尚无进一步的研究。本研究以急性脊髓损伤大鼠为模型, 以一氧化氮(NO)、超氧化物歧化酶(SOD)和丙二醛(MDA)为观察指标, 通过对比电针治疗 ASCI 损伤的不同介入时间, 观察其疗效的差异性, 从而为临床治疗 ASCI 提供一定的实验依据。

1 材料

1.1 实验动物

选用清洁级健康 SD 大鼠 50 只, 体重(250±10)g, 由北京维通利华动物中心提供[实验动物批号: SCXK(京)2007-0001]。

1.2 主要药物和试剂

水合氯醛: 北京化学试剂厂生产; 碘伏: 武汉同济美迪生科技有限公司生产; 酒精: 北京贞玉民生药业有限公司生产; 生理氯化钠注射液: 中国大冢制药有限公司生产; SOD 试剂盒及 MDA 试剂盒: 南京建成生物工程研究所; NO 试剂盒: 重庆市第三军医大学临床微生物教研室。

1.3 主要仪器

电针仪: LH-202H 型韩氏穴位神经刺激仪, 北京华卫产业开发公司生产; 毫针: 28 号(0.35×25mm)华佗牌无菌针灸针, 苏州针灸医疗器材有限公司生产; 电子天平: JA 2003N 电子天平, 上海精密科学仪器有限公司

公司;超低温冰箱:日本;自制的改良式 Allen's 打击装置;骨科手术器械(手术刀、剪、咬骨钳、镊);医用缝合针;4 号缝皮丝线。

2 方法

2.1 动物分组及造模

将 50 只大鼠采用随机数字表法分为 5 组:空白组、模型组、造模后 2h 针刺组(电针Ⅰ组)、造模后 6h 针刺组(电针Ⅱ组)、造模后 12h 针刺组(电针Ⅲ组),每组各 10 只。

除空白组外,其余 4 组大鼠以 10%水合氯醛(3.5ml/kg)腹腔麻醉,俯卧位固定于自制的弓形手术台上,脱毛剂脱毛后,碘伏消毒手术部位,以 T12 肋为标志,取后正中切口长约 1.5cm,钝性剥离脊旁肌肉暴露脊柱后,以微型咬骨钳咬除 T9~11 棘突和椎板,不损伤硬脊膜。采用自制的 Allen's^[4]改良式打击装置(将 10g 打击锤套入透明套管内,卡住打击高度,松开锤子即可下落),高度为 5cm,致伤量为 50g·cm,造成 T10~11 节段急性脊髓损伤(此致伤量可造成大鼠的不完全性截瘫,属中等程度损伤)。大鼠出现摆尾反射,双下肢瘫痪示造模成功。缝合切口后用碘伏消毒伤口皮肤。术后单笼饲养,保持垫料干燥,定时膀胱挤压帮助排尿。空白组不做任何处理。

2.2 针刺方法

选用大鼠“大椎”、“命门”两穴,取穴及针刺方法参照《实验针灸学》^[5]。使用毫针刺入 0.4~0.6 寸,用 LH-202H 型韩氏电疗仪,上接阴极,下接阳极,持续脉冲电流,电针频率 2Hz,刺激强度 2~5mA,针刺时间 30min。输出强度以双下肢瘫痪肌肉出现有节律的收缩为度。电针Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ组分别在造模后 2h、6h 及 12h 进行上述处理。

2.3 标本采集

所有大鼠在造模后 24h 采集标本。大鼠在 10%水合氯醛麻醉下显露受伤脊髓节段,以损伤点为中心快速切取脊髓约 2cm,用 4℃生理盐水在冰面上冲洗,滤纸吸干水分、称重。

2.4 观察指标和方法

NO 的含量测定采用改良的 Gress 法,SOD 的含量测定采用黄嘌呤氧化酶法,MDA 的含量测定采用硫代巴比妥酸(TBA)比色法。按试剂盒说明书操作。

2.5 统计学方法

采用 SPSS10.0 统计软件,计量资料用($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用方差分析的方法。

3 结果

表 1 示,模型组与空白组比较,损伤脊髓组织中

NO、MDA 含量升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),SOD 含量降低($P < 0.05$)。各电针组与模型组进行比较,电针Ⅰ组损伤脊髓组织 NO 含量较模型组降低($P < 0.05$);电针Ⅱ、Ⅲ组 MDA 含量均比模型组降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),SOD 含量均比模型组升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。各电针组与空白组进行比较,NO、SOD 与 MDA 含量的差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 1 各组大鼠脊髓组织中 NO、SOD 与 MDA 含量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	NO(μmol/L)	SOD(U/ml)	MDA(nmol/ml)
空白组	10	65.26±18.02	111.68±9.30	4.85±0.57
模型组	10	80.24±11.73*	97.13±8.95*	6.28±0.45**
电针Ⅰ组	10	65.15±10.13△	125.64±18.32△△	5.18±0.95△△
电针Ⅱ组	10	74.19±11.59	123.56±19.41△△	5.38±0.87△
电针Ⅲ组	10	74.27±13.68	113.44±18.30△	5.55±0.77△

注:与空白组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较,△ $P < 0.05$,△△ $P < 0.01$

4 讨论

督脉起于胞中,行于背部正中,上达巅顶,与手三阳经在背部、头面交会,是诸阳经脉之总会,对整个经脉系统有统帅作用,与脑、脊髓等关系相当密切。中医认为脊髓损伤的病因病机是由于督脉受损,从而导致督脉所过部位不适。针刺督脉直达病所,既能培补真阳,又可疏通经气,使之上下贯通,阳气通达,则截瘫可愈,故治疗首取督脉^[6]。

传统的针灸疗法通过疏通经络、调节脏腑气血平衡,减轻和延缓急性脊髓损伤早期病理损害,改善脊髓微循环,以达到保护脊髓组织、促进神经功能恢复和神经再生等功效。根据现代医学理论,督脉电针可以改善损伤局部组织的血液微循环,又能促进脑脊液流动,减轻 ASCI 部位的水肿和血肿的压迫及粘连,从而扼制了脊髓继发性损伤的进行^[7]。

NO 是一种小分子的有机物,广泛分布于人体的各组织、器官,由催化左旋精氨酸(L-Arg)产生,在体内具有广泛的生物学效应。NO 是细胞间第二信使物质又具有细胞毒性作用,在过量的情况下可导致严重的神经毒性作用而造成组织损伤^[8]。在本实验中,损伤脊髓组织中 NO 含量明显升高,通过治疗后,损伤脊髓组织中 NO 含量均较损伤后下降,尤以造模后 2h 进行电针治疗的大鼠损伤脊髓 NO 含量下降最多。提示电针治疗介入越早,NO 下降量越大,更能保护受损的脊髓组织。

生理状态下,机体氧自由基与自由基清除剂处于平衡状态,脊髓损伤后,平衡破坏,氧自由基产生明显增加而清除剂相对不足,造成局部氧自由基及其产物

积聚而使损伤程度加重。因此许多学者认为氧自由基是脊髓继发性损伤的重要因素与标志。MDA 是过氧脂质的代谢产物, SOD 是自由基的清除剂, 在清除自由基同时本身被消耗, 它们的含量可反映体内自由基的变化^[9]。在本实验中, 模型组大鼠脊髓损伤后脊髓组织中 MDA 升高同时伴有 SOD 下降, 提示脊髓损伤后局部立即产生大量自由基, 引起 SOD 下降, 进而导致脊髓继发性损伤。通过电针治疗, 各电针组大鼠损伤脊髓组织中 MDA 含量较模型组普遍下降, 而 SOD 含量普遍上升, 提示我们电针治疗可以降低急性脊髓损伤大鼠脊髓 MDA 含量, 提高 SOD 含量, 加强对损伤脊髓组织的保护作用, 尤其以造模后 2h 组大鼠损伤脊髓组织 MDA 和 SOD 含量改变最多, 与模型组相比差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。提示电针治疗介入时间越早, MDA 与 SOD 含量变化越大, 更能起到保护受损脊髓的作用。

本实验数据结果基于实验室观察, 只能表明急性脊髓损伤大鼠在脊髓损伤早期(损伤后 24h 内), 电针治疗介入的时间越早疗效越好。另外可以进一步增大样本量、增加不同介入治疗时间的电针组以进一步深入观察研究。

参考文献

[1] 吴永刚, 韩晶, 孟维滨. 针刺对大鼠脊髓损伤早期治疗作用的研究[J]. 上海针灸杂志, 1995, 14(4): 182-183.
[2] 赵立, 李涛, 贾连顺. 机械性脊髓损伤模型的应用现状[J]. 中华实验外科杂志, 1997, 14(2): 128-129.
[3] 张志英, 严振国. 电针对脊髓损伤后一氧化氮合酶表达的影响[J]. 中国临床康复, 2002, 6(2): 206-207.
[4] Allen AR. Surgery of experimental lesion of spinal cord equivalent to crush injury of fracture dislocation of spinal column: A preliminary report[J]. JAMA, 1911, 57(8): 878-880.
[5] 林文注, 王珮. 实验针灸学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1994: 288-290.
[6] 吴永刚, 刘成德, 孙忠人, 等. 针刺对实验性脊髓损伤组织形态学的影响[J]. 上海针灸杂志, 1999, 18(3): 33-34.
[7] 徐斌. 脊髓针为主综合治疗法治疗外伤性截瘫 286 例疗效观察[J]. 中国针灸, 1990, 10(2): 7-9.
[8] Ischiropoulos H, Zhu L, Chen J, et al. Peroxynitrite-mediated tyrosine nitration catalyzed by superoxide dismutase[J]. Arch Biochem Biophys, 1992, 298(2): 431-437.
[9] Kontos HA, Wei EP. Superoxide production in experimental brain injury[J]. J Neurosurg, 1986, 64(5): 803-807.
(收稿日期: 2008-12-24; 修回日期: 2009-09-03)
[编辑: 叶 晨]

《中医杂志》第四届编辑委员会名单

主任委员 胡熙明

名誉主编 费开扬

主 编 曹洪欣

副主任委员 王永炎 王文中 吕玉波 张大宁 李俊德 李大鹏 费开扬 陈啸宏 杨明会 房书亭 郑守曾
施 杞 徐镜人 曹洪欣 谢阳谷

委员(以姓名笔画为序)

于生龙	于淑芳	马有度	王永炎	王文中	王炳岐	王东生	王 琦	王乃平	王之虹	王 玲	王国庆	王忠和
王喜军	王书臣	王承德	王鱼门	王振邦	邓大学	包文辉	龙致贤	龙济瀛	刘保延	刘红星	向方远	吕玉波
吕志平	孙万珍	孙耀志	孙树椿	阮诗玮	闫希军	吴以岭	吴坤平	张大宁	张之君	张世臣	张孝娟	张承烈
张炳厚	李连达	李大鹏	李俊德	李沈明	李天太	李怀荣	李乾构	肖小河	肖燕军	陈可冀	陈克正	陈贵廷
陈 桦	陈抗生	陈金甫	陈保华	陈啸宏	苏荣彪	杨殿兴	杨世兴	杨卓欣	杨明会	邹节明	林日初	林天东
林立军	拉蒙(西班牙)	房书亭	周岱翰	周宜强	周 然	周超凡	周绍明	周铭心	郑守曾	姚乃礼	施 杞	
胡熙明	费开扬	胡晓军	晁恩祥	赵 松	赵步长	赵树森	徐志伟	徐镜人	索天仁	梁菊生	袁长津	高思华
高文柱	曹洪欣	曹正逵	梅国强	傅世垣	彭 炜	程兆盛	谢阳谷	詹文涛	翟胜利	戴锡孟		

顾问(以姓名笔画为序)

刁跃池	万有生	王绪鳌	王荣和	王绵之	王雪苔	王其飞	王玉川	王一章	韦贵康	邓铁涛	田景福	冯天有
任继学	刘志明	许锦柏	李任先	李炳文	李惠治	李顺成	李振华	何 任	张学文	张奇文	张 琪	吴炳新
吴咸中	沈自尹	陈佑邦	陈彤云	金树滋	庞春生	周仲瑛	赵藕善	胡志祥	姜正谦	贺志光	高 德	殷顺海
唐由之	黄春源	蔡剑前	费淳璐	程莘农	路志正	魏福凯						