

针刺对脑挫伤大鼠脑组织坏死面积及脑细胞凋亡的影响

张毅敏¹ 唐纯志² 程少冰¹ 敖杰男¹ 曹勇¹ 马民¹

(1. 暨南大学医学院中医系, 广州市黄埔大道西 601 号, 510632; 2. 广州中医药大学针灸推拿学院)

[摘要] **目的** 观察针刺对脑挫伤模型大鼠脑组织坏死面积与脑细胞凋亡的影响。 **方法** 参照 Feeney 自由落体撞击造模法建立脑挫伤大鼠模型, 将 40 只大鼠随机分为假手术组、模型组、纳络酮组、针刺组, 每组 10 只。针刺组、纳络酮组分别给予针刺、腹腔注射纳络酮, 每天 1 次, 共 7 天。处理结束后, 采用生物学图像分析系统计算坏死面积、TUNEL 法检测脑细胞凋亡。 **结果** 模型组大鼠脑组织损伤严重, 坏死面积大于损伤面积, 出现大量的脑细胞凋亡 ($P < 0.01$); 针刺组、纳络酮组脑组织坏死面积较模型组明显减小, 且均小于损伤面积 ($P < 0.01$); 两组大鼠脑细胞凋亡指数较模型组明显减少 ($P < 0.01$); 针刺组脑组织坏死面积与纳络酮组比较无统计学意义 ($P > 0.05$)。 **结论** 针刺可缩小脑挫伤模型大鼠脑组织坏死面积、减少脑细胞凋亡, 具有确切的抗继发性脑损伤作用。

[关键词] 脑挫伤; 针灸疗法; 坏死面积; 细胞凋亡; 大鼠

Effect of Acupuncture on the Infarcted Area and Apoptosis of Rats with Brain Contusion

ZHANG Yimin¹, TANG Chunzhi², CHENG Shaobing¹, AO Jienan¹, CAO Yong¹, MA Min¹

(1. Medical College, Jinan University, Guangzhou 510632; 2. Guangzhou University of Chinese Medicine)

ABSTRACT **Objective** To observe the effect of acupuncture on the infarcted area and apoptosis of rats with brain contusion. **Methods** Feeney's method was used to establish brain contusion model. The 40 rats were randomized into sham-operation, model, acupuncture and naloxone (NX) group with 10 in each. Acupuncture was performed for the rats of acupuncture group and NX was injected intraperitoneally for the rats of NX group. The treatment was done once everyday, 7 days altogether. Then the brain histotomy was prepared after all the treatment finished. Computer image analysis system was used to detect the infarcted area. TUNEL method was adopted to detect the apoptosis. **Results** The brain contusion in the model group was severe, there were lots of apoptotic cells and the infarcted areas were bigger than the injured areas ($P < 0.01$). The infarcted areas of the acupuncture and NX groups were obviously smaller than those of the model group ($P < 0.01$) and smaller than the injured areas as well ($P < 0.01$); and the apoptotic cells of these two treated groups were significantly less than those of the model group ($P < 0.01$). There was no significant difference in the infarcted areas between acupuncture and NX groups ($P > 0.05$). **Conclusion** Acupuncture can decrease the infarcted areas and apoptosis of the rats with brain contusion, being effective in anti-secondary brain injuries.

Key Words Brain contusion; Acupuncture therapy; Infarcted area; Apoptosis; Rats

颅脑损伤 (traumatic brain injury, TBI) 在创伤中所占比例大、残死率高、已成为威胁人类生命安全的“第一公害”^[1], 为发达国家青少年伤病致死的首位病因^[2]。随着急救医学的发展, 急诊患者死亡率明显下降, 但出现大量持续植物状态患者, 仅我国 1998 年统计就有 10 万, 且呈逐年递增趋势^[3]。大量临床资料表明, 针刺对脑损伤患者催醒及神经功能恢复有显著的疗效^[4]。本研究采用脑挫伤大鼠动物模型, 从脑组织坏死面积及脑细胞凋亡两方面观察针刺对 TBI 的影响, 以期对针刺治疗颅脑损伤提供可靠的实验依据。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠共 40 只, 体重 (280 ± 30) g, 由

广州中医药大学动物实验中心提供, 动物合格证号: 0020763。本实验在广州中医药大学清洁级动物实验室完成。

1.2 药品及主要试剂

细胞凋亡原位检测试剂盒 (德国宝灵曼公司产品, 购自武汉博士德生物工程有限公司)。针具为华佗牌一次性 26 号、1 寸针灸针。

1.3 主要仪器

RM 2025 切片机 (Leica 公司)、EG 1140H 包埋机。Olympus BX⁵⁰F-3 双目显微镜 (附件自动照相装置 Nikon E990, 日本产)。计算机图像分析系统 (GM-2000B 生物学图像分析系统, 北京航天航空大学出品)。

2 方法

2.1 动物造模及分组

将 40 只大鼠随机数字表法分为 4 组: 假手术组、模型组、纳络酮组及针刺组, 每组 10 只。所有大鼠称重后

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目 (06300588); 广东省自然科学基金面上资助项目 (9151063201000026); 暨南大学引进优秀人才科研启动基金资助项目 (51207014)

通讯作者: 张毅敏, jane107@163.com, (020) 85228016

腹腔注射浓度为 10g/L 的戊巴比妥钠(30mg/kg), 麻醉成功后参照 Feeney 自由落体撞击造模法^[5]:沿颅骨正中中线纵形切开头皮, 分离至颅骨, 于矢状缝左旁 2mm, 冠状缝后 2mm 处, 用牙科钻钻开颅骨, 以此为中 心, 用蚊式血管钳咬开直径约 4mm 圆形骨窗, 深度至硬脑膜, 保持硬脑膜完整。模型组、纳络酮组及针刺组用致伤力度为 25g 小锤从 25cm 高度自由落下, 打击置于硬脑膜上的直径为 3mm 的圆柱体, 造成左侧大脑局限性脑挫裂伤, 然后将动物缝合头皮。假手术组钻孔后不打击, 直接缝合头皮。

针刺组和纳络酮组造模后 24h 开始治疗。针刺组穴位:百会、人中、风府透哑门、合谷, 穴位定位参照林文注主编《实验针灸学》^[6]大鼠常用穴位定位标准。将针刺入穴位 2mm, 采用捻转平补平泻手法, 每穴操作 2min; 纳络酮组腹腔注射 0.02mg 纳络酮。每天治疗 1 次, 共治疗 7 次。假手术组及模型组不做治疗。各组在相同条件下喂养。

2.2 检测指标及方法

治疗结束当天取材, 大鼠用 10% 的水合氯醛麻醉, 断头取脑, 10% 中性甲醛溶液固定 24h 后, 常规石蜡包埋, 沿挫伤灶中心作冠状切片, 片厚 4μm。组织切片 HE 染色, 光学显微镜(10×40) 下由病理专科医生在未知实验分组情况下观察挫伤灶及其周围组织的病理形态学变化, 并采用 GM-2000B 生物学图像分析系统计算损伤面积。

脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记法(TUNEL 法) 原位检测细胞凋亡, 按试剂盒说明书操作。细胞核中有棕褐色颗粒者为阳性染色细胞。以阳性染色细胞作为观测指标。由病理专科医生在未知实验分组情况下对所有标本进行分析: TUNEL 法染色后, 光学显微镜下每个样本取细支气管肺泡区随机观察 5 个高倍视野(10×40), 计数每个高倍视野每 100 个细胞中的阳性细胞数, 取平均值作为该样本细胞凋亡指数。

2.3 统计学方法

采用 SPSS 14.0 统计软件进行分析; 组间比较方差齐性时采用 LSD 检验, 方差不齐时采用 T 2 法检验。各组损伤面积比较采用单样本 t 检验。

3 结果

3.1 针刺对脑挫伤大鼠脑组织坏死面积的影响

模型组、纳络酮组、针刺组最初造模时脑损伤面积均为打击圆柱体截面面积, 即 $3.14 \times 1.5\text{mm} \times 1.5\text{mm} = 7.065\text{mm}^2$ 。表 1 示, 假手术组坏死面积为 0; 模型组损伤区脑组织坏死面积大于损伤面积($P < 0.01$);

针刺组、纳络酮组坏死面积均较模型组明显减少($P < 0.01$), 且均小于损伤面积($P < 0.01$)。针刺组坏死面积较纳络酮组有下降趋势, 但无统计学意义($P > 0.05$)。

3.2 针刺对脑挫伤大鼠脑细胞凋亡的影响

表 1 示, 假手术组无脑细胞凋亡, 模型组出现大量的脑细胞凋亡; 针刺组、纳络酮组脑细胞凋亡指数较模型组明显减少($P < 0.01$); 针刺组脑细胞凋亡指数较纳络酮组稍多($P < 0.01$)。

表 1 各组大鼠脑组织坏死面积及脑细胞凋亡指数的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	脑组织坏死面积 (mm^2)	脑细胞凋亡指数 (%)
假手术组	10	0	0
模型组	10	$8.39 \pm 0.67^*$	$14.29 \pm 2.00^*$
纳络酮组	10	$5.25 \pm 0.60^{*\Delta}$	$6.61 \pm 1.06^{*\Delta}$
针刺组	10	$4.47 \pm 0.40^{*\Delta}$	$9.09 \pm 1.31^{*\Delta\blacktriangle}$

注: 与假手术组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.01$; 与纳络酮组比较, $\blacktriangle P < 0.01$

4 讨论

急性脑损伤后神经元损伤分为两种形式, 一种称为原发性损伤, 指损伤暴力对神经元的机械损伤, 在创伤的同时发生, 主要表现为细胞坏死。另一种称为迟发性损伤(又称继发性损伤), 主要由于颅脑损伤后发生广泛或局部的脑微循环紊乱和血流动力学变化致脑部缺血缺氧造成微环境改变(病理生理生化改变) 所致, 主要表现为创伤后“半暗带”神经元凋亡^[7]。细胞坏死不可修复, 寻求积极有效的措施挽救“创伤半暗带”尚有活力的脑细胞、防治神经元的继发性损害, 使脑功能受损减到最低程度, 这已成为当前颅脑外伤研究的热点^[8-9]。

目前西医对颅脑损伤继发性损害的治疗, 缺乏特异性的药物, 很多外源性药物不易通过血脑屏障^[10]。大量临床资料表明, 针刺对脑损伤有独特的疗效^[4], 被认为是颅脑损伤后长期昏迷患者的催醒手段之一^[11]。有研究发现, 针刺能缓解创伤性脑血管痉挛, 改善大脑皮质的血液循环和脑组织的摄氧能力, 加速损伤脑组织的修复, 促进新的功能联系的形成, 防治 TBI 后脑组织缺血缺氧导致的继发性脑损害^[12-13]。

中医学认为, 脑损伤的病位在脑, 病机为气滞血瘀, 阻蔽清窍, 如《灵枢》所云: “有所击堕, 恶血留内”。这与西医学有关损伤区脑血流量明显下降, “创伤半暗带”缺血缺氧的研究结果一致^[12]。督脉入通脑, 故主要选取位于脑部的督脉经穴: 人中醒神开窍, 为急救要穴, 在《四总穴要歌》中就有急救刺水沟之说, 故为本组穴的主穴。现代研究表明, 针刺人中一方面兴奋脑神经

元,使中枢神经系统发生复杂的整合作用,另一方面,可明显促进脑组织血液循环,增加脑灌注量,为脑细胞的功能恢复提供能量^[10],二者共同构成人中开窍醒神的作用基础。实验研究证实,人中对脑损伤后意识障碍及脑电图的改善优于其他穴位^[14];百会位于巅顶,醒神益智,恢复神机、为治疗脑病要穴,现代研究表明,针刺“百会”可提高人及动物的记忆力^[15];风府透哑门醒神开窍,促进语言功能恢复,3 穴分别位于脑的前、中、后部,合用起协同作用。合谷为手阳明经原穴,阳明经多气多血,刺之行气活血通络,故列为四关穴之一。诸穴合用活血通络,醒神开窍,恢复神机。

纳络酮作为阿片受体拮抗剂,能有效阻止急性颅脑损伤后内源性阿片肽含量升高造成的继发性脑损害,抑制神经细胞凋亡,对有效维持损伤后血压和脑灌注压、控制颅内压、减轻脑水肿、促进神经功能恢复、改善预后有明显作用^[9,16]。由于其体内吸收迅速、疗效好、见效快、无明显毒副作用,目前已越来越广泛地应用于脑外伤救治^[17]。

本研究结果显示,模型组损伤区脑组织坏死面积大于创伤面积,出现大量的脑细胞凋亡,表明造模成功,同时进一步证明了脑外伤后所诱发的继发性损伤在 TBI 病理演变中的作用;纳络酮组、针刺组脑组织坏死面积及脑细胞凋亡均较模型组明显减少($P < 0.01$),表明纳络酮与针刺治疗均能抗脑细胞凋亡、减少脑组织坏死;且两组坏死面积均小于损伤面积($P < 0.01$),表明纳络酮与针刺治疗具有确切的抗 TBI 继发性脑损伤、加速损伤脑组织修复的作用;针刺组较纳络酮组脑细胞凋亡指数稍高,但二者脑组织坏死面积无统计学差异,有待今后通过加大样本含量进一步研究。

参考文献

[1]周跃,闫仁福,苏忠周,等. 颅脑损伤患者 1563 例流行病学分析[J]. 浙江医学,2007,29(8):882-884.
[2]Clifton GL, Miller ER, Choi SC, et al. Lack of effect of induction of hypothermia after acute brain injury [J]. N

Engl J Med, 2001, 344(8):556-563.
[3]张利泰,成泽东,杨明惠,等. 针灸治疗持续性植物状态的研究进展[J]. 中国针灸,2004,24(9):662-664.
[4]张毅敏. 针灸治疗颅脑损伤及其后遗症的概况[J]. 中国临床康复,2006,10(7):135-137.
[5]王双坤,刘佰运,郝淑煜. 创伤性脑损伤的实验动物模型[J]. 中国交通医学杂志,2005,19(4):327-329.
[6]林文注. 实验针灸学[M]. 上海:上海科学技术出版社,1994:30-45.
[7]王俊懿. 脑外伤后神经细胞凋亡的研究进展[J]. 四川医学,2005,26(5):576-578.
[8]郝淑煜. 创伤性脑损伤与细胞凋亡[J]. 中国交通医学杂志,2005,19(4):322-325.
[9]董晓巧,刘伟国,杨小锋. 纳洛酮抗家兔颅脑损伤后细胞凋亡及其自由基机制的实验研究[J]. 浙江医学,2007,29(4):321-324.
[10]朱诚,江基尧,于明琨. 我国颅脑创伤研究现状与展望[J]. 中华创伤杂志,1999,15(1):1.
[11]陈丽萍,申永涛,刘娟. 电项针配合醒脑开窍针法促醒持续植物状态 30 例疗效观察[J]. 中国医药指南,2008,6(2):207-208.
[12]赵永烈,史海霞. 近年来针灸治疗颅脑损伤的研究概况[J]. 甘肃中医学院学报,2002,19(3):47-50.
[13]万剑斌,肖晓华,章江川. 头针治疗创伤性脑血管痉挛的疗效观察[J]. 针灸临床杂志,2007,23(9):21-22.
[14]韩震,周岱,俞光第,等. 神经电刺激治疗对大鼠中脑损伤后意识障碍的影响[J]. 中华物理医学与康复杂志,2001,23(1):11-12.
[15]周莉. 针刺百会穴对记忆影响的实验观察[J]. 黑龙江中医药,1992,2(3):41-42.
[16]梁敏,梁宁,白令君. 纳洛酮对急性颅脑损伤患者血浆内皮素、降钙素基因相关肽和氧自由基含量的影响[J]. 中国急救医学,2001,21(1):24-25.
[17]段玉林. 纳洛酮治疗 148 例急性重型颅脑外伤[J]. 中国医药导报,2008,5(15):62.

(收稿日期:2009-07-08;修回日期:2009-09-01)

[编辑:叶晨]

(上接第 512 页)

[4]王焕林,陈继军. 我国军人症状自评量表常模的建立及结果分析[J]. 中华精神科杂志,1999,32(1):38-40.
[5]Davidson JR. Recognition and treatment of posttraumatic stress disorder[J]. JAMA, 2001, 286(5):584-588.
[6]Hoge CW, Lesikar SE, Guevara R, et al. Mental disorders among U.S. Military personnel in the 1990s: association with high levels of health care utilization and early military attrition[J]. Am J Psychiatry, 2002, 159(9):1576-1583.
[7]Deahl M, Srinivasan M, Jones N, et al. Preventing psychological trauma in soldiers: the role of operational stress training and psychological debriefing [J]. Br J Med

Psychol, 2000, 73(Pt 1):77-85.
[8]秦虹云,季建林. PTSD 及其危机干预[J]. 中国心理卫生杂志, 2003,17(9):614-616.
[9]杨玉兴,魏品康,修丽娟,等. 白龙解郁颗粒对 67 例肿瘤相关性抑郁患者生活质量的影响[J]. 中国中医药信息,2009,36(5):35-37.
[10]修丽娟,魏品康,刘龙,等. 消痰解郁方对慢性强迫游泳应激后小鼠海马 5-HT_{1A} 受体 mRNA 表达的影响[J]. 第二军医大学学报,2007,28(10):1126-1128.
<http://www.cnki.net>

(收稿日期:2009-08-24;修回日期:2010-01-10)

[编辑:叶晨]