

脊柱推拿促进缺血缺氧性脑病幼鼠生长发育的研究*

丁建伟¹, 邵先桃^{1△}, 贾杰², 曹爽³, 李炳⁴, 熊磊^{1△}

(1. 云南中医学院针灸推拿康复学院, 云南昆明 650500; 2. 复旦大学附属华山医院, 上海 200040;

3. 上海交通大学医学院附属第九人民医院, 上海 200011; 4. 复旦大学附属金山医院, 上海 201508)

摘要:目的 观察推拿是否促进缺血缺氧性脑病(hypoxic ischemic encephalopathy, HIE)幼鼠生长发育,以寻求有效干预 HIE 的手段。方法 将新生 SD 幼鼠随机分为对照组($n=12$)、模型组($n=13$)和推拿组($n=12$)。选择出生后第 3 天(3-day-postnatal, P3)的幼鼠,采用单侧颈总动脉结扎联合缺氧的方法制备 HIE 模型,造模后 2d(P5)开始进行脊柱推拿干预;对各组幼鼠的体质量、睁眼时间和耳朵张开时间进行检测,并进行步态实验和负向趋地实验。结果 与对照组比较,模型组幼鼠体质量均显著降低($P<0.01$ 、 $P<0.05$),而推拿组幼鼠体质量比模型组明显增加($P<0.01$ 、 $P<0.05$);与对照组比较,模型组幼鼠睁眼时间、耳朵展开时间和步态反射出现的时间均较延长($P<0.05$);而推拿组幼鼠睁眼时间、耳内展开时间和步态反射出现的时间均明显缩短($P<0.01$ 、 $P<0.05$)。与对照组比较,模型组幼鼠爬至倾斜板顶端所需时间均显著长于对照组($P<0.01$ 、 $P<0.05$),而推拿组幼鼠爬至倾斜板顶端所需时间比模型组缩短($P<0.01$ 、 $P<0.05$)。结论 脊柱推拿可以促进 HIE 幼鼠的生长发育,可能成为干预脑缺血缺氧性疾病的有效手段之一。

关键词: 缺血缺氧性脑病; 脊柱推拿; 生长; 发育

中图分类号: R244.1

文献标志码: A

文章编号: 1000-2723(2013)06-0030-04

缺血缺氧性脑病(hypoxic Ischemic encephalopathy, HIE)是指由各种原因引起的部分或完全缺氧,脑血流减少或暂停,致使脑损伤而引起一系列神经系统疾病的综合征。HIE 影响婴幼儿的体格生长和智能发育。而动物研究也发现 HIE 幼鼠体质量增长缓慢、早期神经和运动发育迟缓。研究发现,新生儿护理时,辅以推拿可促进早产儿体质量的增加,改善睡眠的持续时间和睡眠模式,减少哭闹和烦躁的时间、住院天数及儿科疾病的患病率^[1]。另外,推拿对幼龄动物生长发育的影响逐渐受到人们的关注,如 Guzzetta 等^[2]发现推拿可促进正常幼鼠大脑的发育和视觉皮层的成熟。然而,推拿对缺血缺氧性脑病的效果与机制,尚未完全阐明。因此,本研究通过观察脊柱推拿对 HIE 幼鼠体格发育、早期神经行为等方面的影响,以寻求干预 HIE 的有效手段,同时为推拿防治脑瘫等缺血缺氧性疾病

提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

3 只 SD 孕鼠购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,孕 22d 产仔;将新生 SD 幼鼠随机分为对照组($n=12$)、模型组($n=13$)和推拿组($n=12$)。母鼠母乳喂养,室内温度恒定于 $(22\pm 2)^{\circ}\text{C}$ 。选择出生后第 3 天(3-day-postnatal, P3)的幼鼠,采用右侧颈总动脉结扎联合缺氧的方法制备 HIE 模型,推拿组造模后 2d(P5)开始对幼鼠进行脊柱推拿,1 次/日,20 min/次,持续 15d。对各组幼鼠的体质量、睁眼时间和耳朵张开时间进行检测,并进行步态实验和负向趋地实验。本研究对动物所有的实验操作均遵守国家有关管理条例,并经复旦大学实验动物伦理委员会批准。

1.2 造模方法

参照 Rice 等^[3]的方法,分离并结扎 P3 幼鼠右侧

* 基金项目:“十二五”国家科技支撑计划课题(NO:2013BAI10B03);国家中医药管理局“十二五”重点学科《中医儿科学》项目

收稿日期:2013-11-27 修回日期:2013-12-17

作者简介:丁建伟(1988~),男,云南昆明人,在读硕士研究生。主要从事脑瘫机制与中医药干预研究。

△通信作者:邵先桃, E-mail:taixiantao@163.com;熊磊, E-mail:xlluck@sina.com

颈总动脉,术后 37℃保持体温 2 h,再连续给予含 8% O₂ 和 92% N₂ 的混合气体 2 h,之后放回鼠笼。

1.3 脊柱推拿方法

参照邵先桃等^[4]的方法,采用一指禅、按揉等手法作用于幼鼠脊柱的正中及两侧韧带、肌肉。每只幼鼠 1 次/日,20 min/次,持续 15d。

1.4 步态实验

用圆规在白纸上作一半径为 13 cm 的圆圈,记录乳鼠前肢在 30 s 之内从中央爬出圈外的时间。

1.5 负向趋地实验

将幼鼠头朝下放于倾斜 45°、长 30 cm 的木板

中央。从 P13 开始,隔日记录幼鼠转头向上且两前爪爬至倾斜板顶端的时间(s)。

1.6 统计学分析

计量资料数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS16.0 统计分析软件进行数据的统计学处理,多组计量资料组间差异比较采用单因素方差分析,两组间计量资料比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组幼鼠不同出生日龄时体重结果比较

从表 1 可知,与对照组比较,模型组幼鼠体质

表 1 各组幼鼠不同出生日龄时体质量结果比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	出生日龄幼鼠体质量/g							
		P7	P9	P11	P13	P15	P17	P19	P21
对照组	12	12.75±0.45	16.50±0.65	21.33±0.52	26.08±0.79	30.08±1.16	36.92±1.00	40.75±0.45	47.50±1.68
模型组	13	10.12±2.00 [▲]	13.59±2.19 [▲]	17.56±2.66 [▲]	19.38±3.71 [*]	23.26±3.95 [*]	29.50±4.53 [*]	31.74±5.97 [*]	38.35±6.54 [*]
推拿组	12	11.46±1.90	15.08±1.91 [#]	18.92±2.36 [#]	21.38±3.71 [#]	25.92±4.97 [#]	31.77±5.42 [#]	36.38±6.17 [△]	43.38±8.27 [△]

注:与对照组比较,* $P < 0.01$ 、[▲] $P < 0.05$;与模型组比较,[△] $P < 0.01$ 、[#] $P < 0.05$

量均显著降低($P < 0.01$ 、 $P < 0.05$);与模型组比较,推拿组幼鼠体质量均明显增加($P < 0.01$ 、 $P < 0.05$)。

2.2 三组幼鼠睁眼、耳朵展开、步态反射出现的时间结果比较

如表 2 所示,与对照组比较,模型组幼鼠睁眼时间、耳朵展开时间和步态反射出现的时间均明显

表 2 三组幼鼠睁眼、耳朵展开、步态反射出现的时间结果比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	睁眼时间/d	耳朵展开时间/d	步态反射出现时间/d
对照组	12	14.33±0.49	11.08 ±0.67	11.50±2.35
模型组	13	16.91±0.38 [▲]	13.54±0.61 [▲]	14.21±2.20 [▲]
推拿组	12	13.06±0.52 [△]	11.00±0.60 [△]	10.92±1.44 ^{△*}

注:与对照组比较,[▲] $P < 0.05$;与模型组比较,* $P < 0.01$ 、[△] $P < 0.05$

延长($P < 0.05$);与模型组比较,推拿组幼鼠睁眼时间、耳朵展开时间和步态反射出现的时间均显著缩短($P < 0.01$ 、 $P < 0.05$)。

2.3 各组幼鼠不同出生日龄时负向趋地实验结果比较

从表 3 可见,与对照组比较,模型组幼鼠负向趋地实验中爬至倾斜板顶端所需时间均显著长于对照组,在 P13、P15、P17 和 P19 时差异有统计学意义($P < 0.01$ 、 $P < 0.05$)。推拿组幼鼠负向趋地实验中爬至倾斜板顶端所需时间皆明显比模型组缩短,在 P13、P15、P17 和 P19 时差异有统计学意义($P < 0.01$ 、 $P < 0.05$)。

3 讨论

本文采用的脊柱推拿疗法,是以中医传统经络理论和现代解剖学的神经支配原理为指导的中医

表 3 各组幼鼠不同出生日龄时负向趋地实验结果比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	幼鼠爬至倾斜板顶端所需时间/s					
		P13	P15	P17	P19	P21	P23
对照组	12	21.39±6.47	19.03±6.44	13.11±5.02	11.54±6.58	8.34±4.49	5.30±2.80
模型组	13	32.09±14.7 [*]	23.71±8.94 [▲]	20.17±6.94 [*]	15.54±4.04 [▲]	9.37±3.79	6.30±2.83
推拿组	12	20.10±7.66 [△]	18.72±11.01 [#]	12.11±5.81 [△]	11.21±5.11 [#]	8.34±6.97	5.15±4.03

注:与对照组比较,* $P < 0.01$ 、[▲] $P < 0.05$;与模型组比较,[△] $P < 0.01$ 、[#] $P < 0.05$

外治疗法^[4]。该疗法有利于脑瘫患儿的运动发育,能有效降低肌张力^[5],减少颈反射残存^[6]。本研究进一步发现脊柱推拿可促进 HIE 幼鼠生长发育,与 Lubics 等^[7]和 Fan 等^[8]报道一致,早期缺血缺氧可导致幼鼠体质量增长缓慢,眼、耳发育异常,且负向趋地实验、步态实验均显示其早期神经发育的缺陷。HIE 对幼鼠神经系统的损害,致使其运动、感觉功能发育迟缓,在步态实验中,需要更多的时间爬出圈外;同时负向趋地实验中,由于肌力和平衡协调能力的减弱,HIE 幼鼠转头向上到达顶端的时间较正常幼鼠延长。推拿可促进 HIE 幼鼠体质量增长,眼、耳等长出日期趋于正常;与缺血缺氧模型组相比,推拿组步态实验中爬出圈外的时间较短;负向趋地实验中,幼鼠转头向上爬至顶端所需时间减少。本实验结果表明,脊柱推拿可促进 HIE 幼鼠体格发育,改善其早期神经发育,其机理可能表现在以下方面。

首先,推拿引起体质量增加可能机制包括:(1)推拿促进骨骼肌肉的发育^[9]。研究发现推拿有利于骨膜及骨长度的增加,增加骨密质和减少骨的重吸收^[9-10];引起垂体分泌生长激素 GH,刺激肝脏分泌 IGF-1,有利于骨盐沉积和骨质的矿化^[11]、肌肉蛋白质增加和肌纤维的增长^[12];增加血清 PICP 的水平,促进骨骼的强壮^[13]。(2)推拿刺激胰岛素、胃泌素等分泌,增加迷走神经活性,促进胃蠕动增加,进而有利于食物的消化吸收^[9-13]。(3)推拿促进能量消耗,增加饮食摄入^[14]。其次,推拿改善机体的免疫功能,有利于生长发育。研究显示推拿激活 NK 细胞^[15],增强了 NK 细胞的毒性,增加循环 T 淋巴细胞,进而促进免疫力的提高^[16]。另外,NK 细胞激活与焦虑和压力情绪呈负相关^[14],推测推拿可能通过对自主神经的影响,减少皮质醇和去甲肾上腺素的分泌,促进情绪放松^[17],而提高机体的免疫力。再者,推拿促进神经系统的发育。研究发现背部推拿后脑部血流增多^[18],推拿可能通过对脑血流的影响,而改善脑部的营养供应,有利于大脑发育。另外,推拿刺激经过皮肤、肌肉本体感受器,经脊神经后根沿低级中枢传入高级中枢,可能通过调控皮质或边缘系统神经营养因子的表达、神经递质的释放等方面^[9],抑制缺血缺氧损伤后神经元的凋亡,促进神经元及其突触的再生、增殖和修复,对大脑结构和功能的可塑性产生积极的影响,进而有助于视觉、运动、感觉、神经行为等方面的发育。

本研究中脊柱推拿对幼鼠体格发育和早期神

经行为的积极影响,提示该疗法可能有助于幼鼠生长发育,为其临床应用提供相关实验依据。推拿对生长发育的作用机理,目前临床和动物实验,已有一定进展;然而脊柱推拿是通过何种机制促进 HIE 幼鼠生长发育的,目前尚不清楚,有待我们进一步深入研究。

参考文献

- [1] Abdallah B,Badr LK,Hawwari M. The efficacy of massage on short and long term outcomes in preterm infants [J]. *Infant Behav Dev*,2013,36(4):662-669.
- [2] Guzzetta A,Baldini S,Bancalé A,et al. Massage accelerates brain development and the maturation of visual function[J]. *J Neurosci*,2009,29(18):6042-6051.
- [3] Rice JE,Vannucci RC,Brierley JB. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat [J]. *Ann Neurol*,1981,9(2):131-141.
- [4] 邵先桃,熊磊. 治疗痉挛型小儿脑瘫的选择性脊柱推拿疗法[J]. *中国医疗前沿*,2008,3(20):3-4.
- [5] 胡鸾,邵先桃,王春林. 选择性脊柱推拿疗法治疗痉挛型小儿脑瘫的临床研究 [J]. *云南中医学院学报*,2009,32(1):43-45,54.
- [6] 李继君,邵先桃,张涛,等. 脊柱推拿法对 41 例痉挛型脑瘫患儿紧张性颈反射残存的临床观察[J]. *中医儿科杂志*,2008,4(5):47-49.
- [7] Lubics A,Reglodi D,Tamas A,et al. Neurological reflexes and early motor behavior in rats subjected to neonatal hypoxic-ischemic injury [J]. *Behav Brain Res*,2005,157(1):157-165.
- [8] Fan LW,Lin S,Pang Y,et al. Hypoxia-ischemia induced neurological dysfunction and brain injury in the neonatal rat [J]. *Behav Brain Res*,2005,165(1):80-90.
- [9] Chen H,Miller S,Shaw J,et al. ,Massage therapy during early postnatal life promotes greater lean mass and bone growth,mineralization,and strength in juvenile and young adult rats [J]. *J Musculoskelet Neuronal Interact*,2009,9(4):278-287.
- [10] Aly H,Moustafa MF,Hassanein SM,et al. Physical activity combined with massage improves bone mineralization in premature infants:a randomized trial [J]. *J Perinatol*,2004,24:305-309.
- [11] Moyer-Mileur LJ,Ball SD,Brunstetter VL,et al. Maternal-administered physical activity enhances bone mineral acquisition[J]. *J Perinatology*,2008,28:432-437.
- [12] 卢声声. 推拿手法对卫星细胞和生肌调节因子影响机制的研究进展[J]. *按摩与康复医学(中旬刊)*,2011,2(12):46-47.

- [13] Kulkarni A. Massage and touch therapy in neonates; the current evidence[J]. Indian Pediatr, 2010, 47(9):771-776.
- [14] Field T, Diego M, Hernandez-Reif M. Preterm infant massage therapy research: A review [J]. Infant Behav Dev, 2010, 33(2):115-124.
- [15] Ironson G, Field T, Scafidi F, et al. Massage therapy is associated with enhancement of the immune system's cytotoxic capacity[J]. Int J Neurosci, 1996, 84:205-217.
- [16] Ang JY, Lua JL, Mathur A, et al. A randomized placebo-controlled trial of massage therapy on the immune system of preterm infants [J]. Pediatrics, 2012, 130 (6):e1549-e1558.
- [17] Lee YH, Park BN, Kim SH, et al. The effects of heat and massage application on autonomic nervous system [J]. Yonsei Med J, 2011, 52(6):982-989.
- [18] Buckle J, Newberg A, Wintering N, et al. Measurement of regional cerebral blood flow associated with the M technique-light massage therapy: a case series and longitudinal study using SPECT[J]. J Altern Complement Med, 2008, 14(8):903-910.
- [19] 郭东鸣. 推拿按摩影响内分泌功能的研究进展 [J]. 中医药导报, 2011, 17(9):85-87.

(编辑:李平)

Effects of Spinal Massage on the Growth Development of Neonatal Rats with Hypoxic-ischemic Brain Injury

DING Jian-wei¹, TAI Xian-tao¹, JIA Jie², CAO Shuang³, LI Bing⁴, XIONG Lei¹

(1. School of Acupuncture, Massage and Rehabilitation, Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, Kunming

Yunnan 650500; 2. Department of Rehabilitation, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200040;

3. Shanghai Ninth People's Hospital Affiliated Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200011;

4. Central Laboratory, Jinshan Hospital, Fudan University, Shanghai 201508)

ABSTRACT: **Objective** To observe whether massage can promote growth and development of pups with hypoxic-ischemic encephalopathy (HIE) in order to seek effective means of intervention of HIE. **Methods** The newborn SD rats were randomly divided into control group ($n=12$), model group ($n=13$) and the massage group ($n=12$). HIE model with the pups after birth for three days (3-day-postnatal, P3) was prepared using total unilateral carotid artery ligation combined hypoxia. The pups in the massage group undergone spinal massage intervention. The levels of weight and the time of opening eyes and ears open of all newborn rats were evaluated, respectively. The gait and negative chemotaxis experiments were done at the same time. **Results** Compared with the control group, the levels of weight of newborn rats in the model group were significantly increased ($P<0.01$, $P<0.05$), whereas this phenomenon was reversed by spinal massage ($P<0.01$, $P<0.05$). The time of opening eyes, ears open and turning around and reach the upper rim end of the board of newborn rats in the model group were significantly longer than the control group ($P<0.01$, $P<0.05$), which was reversed by massage ($P<0.01$, $P<0.05$). **Conclusion** Spinal massage can promote growth and development of pups with hypoxic-ischemic encephalopathy, it may be one of the effective means of intervention in hypoxic ischemic encephalopathy.

KEY WORDS: hypoxic ischemic encephalopathy; spinal massage; growth; development

(原文见第 26 页)

Simultaneous Detection for Different Composition of Volatile Oil in Tongluo Qutong Gao by Gas Chromatography

YIN Wen-jing¹, ZHANG Chun-xia², YAN Jia-fei²

(1. Renji Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200127, China;

2. Henan Lingrui Pharmaceutical Co. Ltd, Xinyang Henan 465550, China)

ABSTRACT: **Objective** To establish a method for simultaneous determination of camphor, menthol crystal and camphor in Tongluo Qutong Gao. **Methods** Naphthalene was used as the internal standard. DB-WAX capillary column was adopted, nitrogen as the carrier gas, and FID as the detector. The column temperature at 140°C. **Results** Camphor, menthol crystal and camphor in Tongluo Qutong Gao and naphthalene have been separated well. The average recovery rates of camphor, menthol crystal and camphor were 98.76% (RSD=0.66%), 97.48% (RSD=0.66%) and 100.99% (RSD=1.4%), respectively. **Conclusion** The method is simple, accurate and separable, and it can also be used to control the quality of Tongluo Qutong Gao.

KEY WORDS: gas chromatography; volatile oil(camphor, menthol crystal and camphor); tongluo qutong gao