

• 针灸推拿 •

针刺足三里穴预处理对肺缺血再灌注损伤小鼠的氧化应激的影响^{*}

舒 琦¹, 陈琳琳¹, 张新芳², 刘小云¹, 李肖晴², 李更如², 黄文彪², 刘自兵^{1△}

(1. 安徽中医药大学针灸骨伤临床学院, 安徽 合肥 230038; 2. 安徽中医药大学中西医结合临床学院, 安徽 合肥 230038)

摘要: **目的** 探讨针刺足三里穴预处理对肺缺血再灌注损伤小鼠的氧化应激的影响。**方法** 将美国癌症研究所(ICR)小鼠随机分为正常组、假手术组、模型组、电针假手术组和电针模型组。后两组小鼠手术前在双侧足三里穴电针预处理 5d, 30min/d。测定各组血清和支气管肺泡灌洗液中总蛋白浓度、丙二醛(MDA)和超氧化物歧化酶(SOD)的含量;测定肺湿干比;观察肺组织形态。**结果** 与正常组比较,假手术组血清和肺泡灌洗液中 MDA 及 SOD 含量变化均无统计学意义($P>0.05$);模型组血清和肺泡灌洗液中 MDA 含量均显著增高且 SOD 含量均明显降低($P<0.01$)与模型组比较,电针模型组血清和支气管肺泡灌洗液中 MDA 含量显著降低($P<0.05$)且 SOD 含量显著增高($P<0.05$),支气管肺泡灌洗液中蛋白含量与血清蛋白含量比值减小($P<0.05$),左肺湿干比也显著降低($P<0.05$),还能改善肺组织的病理变化。**结论** 电针预处理对肺缺血再灌注 ICR 小鼠氧化应激损伤具有保护作用,其机制可能与清除自由基,减轻氧化应激损伤有关。

关键词: 电针预处理;足三里穴;肺缺血再灌注损伤;氧化应激;超氧化物歧化酶;丙二醛

中图分类号: R245.9⁷

文献标志码: A

文章编号: 1000-2723(2016)04-0039-05

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2016.04.009

肺缺血再灌注损伤(LIRI)意指肺缺血导致的损伤在血流恢复之后,没减轻反而加重的现象。目前研究认为,肺缺血再灌注过程中出现的氧化应激反应是造成肺损伤的主要原因之一。因此,抗氧化治疗已成为防治 LIRI 的重要措施。电针预处理是近年来提出的用于减轻缺血再灌注对靶器官损伤的一种新方法,疗效显著。国内有学者研究发现电针预处理能提高肢体缺血再灌注大鼠生存率及减轻脑损伤,其机制可能与减轻氧化应激损伤有关^[1]。另外,电针预处理能够上调缺血再灌注后锰超氧化物歧化酶(SOD₂)表达,能够减轻缺血再灌注损伤^[2]。还有大量研究证明电针预处理通过清除自由基、抗氧化应激和激活胆碱能抗炎通路等途径对缺血再灌注损伤的脏器功能具有保护作用。虽然针刺抗氧化应激的研究已成热点,在心、脑、肾等脏器的缺血再灌注损伤课题中多有涉及,但是,电针预处理对 LIRI 的氧化应激的影响还未有研究。LIRI 临床多见

于肺移植、体外循环、创伤、心肺复苏和肺动脉栓塞等^[3]。本研究若显示对 LIRI 有保护作用,将对临床治疗相关疾病提供理论及实验依据。

本实验采用小鼠夹闭肺门模型观察电针预处理对小鼠肺缺血再灌注后肺水含量、肺内和血清中蛋白浓度及 MDA、SOD 的浓度和肺病理结构变化的影响,探讨电针足三里穴预处理对肺缺血再灌注氧化应激损伤的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物

清洁级 ICR 成年小鼠,雄性,体质量 25~30g,由常州卡文斯实验动物有限公司提供(合格证号:201501020)。

1.2 实验材料

小动物呼吸机(ALC-V8 型,上海奥尔科特生物科技有限公司),静脉留置针,硫酸阿托品注射液(北京双鹤药业股份有限公司),MDA 试剂盒、SOD

^{*} 基金项目:国家自然科学基金项目(81373743);安徽省自然科学基金项目(1408085MH201);大学生创新创业训练计划项目(2014040)

收稿日期:2016-05-17

作者简介:舒琦(1992-),女,安徽桐城人,本科在读,研究方向:针刺作用机制。

△通信作者:刘自兵, E-mail: zibingliu@163.com

试剂盒(批号:E-20346、E-20347,上海源叶生物科技有限公司),Bradford 蛋白浓度测定试剂盒(货号:P0006,碧云天生物技术有限公司),戊二醛(货号:CL-K488,德国巴斯夫公司),透射电镜(型号 HT-7700,日本日立公司)

1.3 动物分组及针刺预处理

将 45 只小鼠随机分为 5 组:正常组、假手术组、模型组、电针预处理加假手术组及电针预处理加模型组,每组 9 只。假手术组仅打开胸腔并暴露肺门;模型组制作夹闭肺门 30min 后打开再灌注 1 h 的肺缺血再灌注模型;电针预处理假手术组和电针预处理模型组均在手术前接受电针双侧足三里穴预处理 5d,每天 30min,电针强度为 1mA,频率为 2Hz,疏密波,以引起小鼠后肢轻微抖动而不嘶叫为宜。

1.4 肺缺血再灌注模型的制作

小鼠术前 12h 禁食,给予阿托品 0.01mg/kg 肌肉注射,用 6%水合氯醛 7mL/kg 腹腔注射麻醉。采用 20G 静脉留置针行气管插管,连接小动物呼吸机,呼吸频率设定为 135~145 次/min,潮气量为 150~180mL/min,吸气和呼气比值 1:1.5。模型制作:腹腔注射肝素 500U/kg,10min 后,左胸做横行切口约 8mm,钝性分开胸肌,在第 3 肋间分离肋间肌,进入胸腔。用自制的拉钩勾住肋骨向两边牵拉,充分暴露手术视野,略调小潮气量,使左肺轻微塌陷。用玻璃分针小心推开小鼠胸腺及心脏并暴露左侧肺门,用显微血管夹从左上往后下夹闭左侧肺门,见左肺无通气后,再将潮气量减少 1/3,以免右肺过度膨胀,暂合拢手术切口。夹闭 30min 后,打开胸腔,将血管夹取出,重新调整潮气量,见左肺复张,起伏频率同呼吸机一致,关闭胸腔,再灌注 1 h^[4]。假手术组:仅开胸暴露左肺门,不实施缺血和再灌注操作,

时间和模型组等同。

1.5 血清及 BALF 中 MDA 及 SOD 含量检测

术后分别采集小鼠左心室血 1mL 及左侧 BALF 2mL,并以 3 000r/min 离心 15min,取上清液以双抗体夹心法测定其中 MDA 及 SOD 含量,操作严格按照试剂盒说明进行。

1.6 肺组织病理改变观察

术后取肺,4%多聚甲醛固定,冠状切取左肺上叶组织,石蜡包埋,切片厚 5 μ m,HE 染色,中性树脂封片,光镜下观察病理形态。另切取部分肺组织,经戊二醛固定,制成 50nm 切片,电镜下观察小鼠肺组织超微结构^[4]。

1.7 肺湿干重比(W/D)

取左上肺肺组织,试纸吸干表面水分,称取湿重(W),80℃干燥箱内放置 72h,再次称重,得出干重(D)。计算湿干重比值(W/D)^[4]。

1.8 统计学分析

应用 SPSS17.0 进行统计分析,实验数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组数据的比较采用单因素分析,2 组间数据的比较采用 LSD 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MDA 及 SOD 含量

检测结果显示,与正常组比较,假手术组血清和 BALF 中 MDA 及 SOD 含量变化均无统计学意义($P>0.05$);模型组血清和 BALF 中 MDA 含量均显著增高且 SOD 含量均明显降低($P<0.01$)。与假手术组比较,模型组血清及 BALF 中 MDA 含量显著增高($P<0.01$),SOD 含量均显著降低($P<0.01$);电针假手术组血清中 MDA 含量显著降低,SOD 含量显著增高($P<0.01$),而在 BALF 中 MDA 含量降低($P<0.01$),但 SOD 含量变化无统计学意义($P>0.05$)。与

表 1 各组小鼠血清及支气管肺泡灌洗液中 MDA 及 SOD 含量($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

组别	血清		支气管肺泡灌洗液	
	MDA/(nmol·L ⁻¹)	SOD/(U·L ⁻¹) ¹	MDA/(nmol·L ⁻¹)	SOD/(U·L ⁻¹)
正常组	2.36 $\pm$ 0.13	131.56 $\pm$ 10.63	2.2 $\pm$ 0.16	139.58 $\pm$ 8.5
假手术	2.47 $\pm$ 0.26	137.94 $\pm$ 1.05	1.97 $\pm$ 0.15	137.52 $\pm$ 14.58
模型组	3.56 $\pm$ 0.17 ^{***}	91.27 $\pm$ 5.37 ^{***}	3.21 $\pm$ 0.25 ^{***}	96.99 $\pm$ 7.4 ^{***}
电针假手术	1.73 $\pm$ 0.43 ^{***}	126.6 $\pm$ 3.92 [#]	2.26 $\pm$ 0.25 [#]	140.84 $\pm$ 8.5
电针模型组	3.3 $\pm$ 0.09 ^{***}	120.32 $\pm$ 3.2 ^{***SS}	2.7 $\pm$ 0.08 ^{***SS}	118.2 $\pm$ 7.26 ^{***SS}

注:与正常组比较,^{**} $P<0.01$;与假手术组比较,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$;与模型组比较,^{SS} $P<0.01$

模型组比较,电针模型组血清中MDA含量变化无统计学意义($P>0.05$),而BALF中MDA含量显著降低($P<0.01$);SOD含量在血清和BALF中均显著增高($P<0.01$)。见表1。

2.2 血清和肺泡灌洗液中蛋白含量比值的变化

与正常组比较,假手术组与模型组蛋白比值显著增高($P<0.01$)。与假手术组比较,电针假手术组和模型组蛋白比值无显著差异($P>0.05$)。与模型组比较,电针模型组蛋白比值显著降低($P<0.01$)。见表2。

2.3 左肺湿干比的变化

与正常组比较,假手术组与模型组比值均显著增高($P<0.01$)。与假手术组比较,模型组比值显著增高($P<0.01$);电针假手术组比值变化无统计学意义($P>0.05$)。与模型组比较,电针模型组比值显著降低($P<0.01$)。见表2。

表2 各组小鼠肺泡灌洗液和血清中蛋白含量比值及左肺湿干比($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	肺蛋白/血蛋白	湿干比
正常组	0.53±0.01	4.28±0.23
假手术	0.58±0.04**	5.05±0.34**
模型组	0.62±0.05**	6.58±0.74***
电针假手术	0.55±0.01	4.75±0.16*
电针模型组	0.54±0.01**	5.25±0.16***

注:与正常组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与假手术组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

2.4 肺组织形态

在光镜下观察,正常组肺泡细胞壁较完整,肺间质较薄,假手术组与电针假手术组病理变化不明显,肺泡壁未见增厚和水肿,形态较完整。模型组变化明显,缺血再灌注使得肺泡壁增厚,中性粒细胞浸润,肺间质水肿,肺泡腔内出血明显。而电针模型组水肿不明显,肺泡壁增厚不明显,中性粒细胞浸润较少。提示缺血再灌注可以导致肺泡损伤,而针刺足三里预处理可以减轻肺损伤。见图1。

在透射电镜下观察,正常组线粒体形态正常,板层小体略有排空,染色体少见边聚现象。假手术组与电针假手术组变化不大,线粒体肿胀不明显,板层小体稍有排空,染色体边聚不明显。模型组变化显著,线粒体肿胀且嵴排列混乱或断裂^[5],板层小体肿胀,出现空泡化^[6],染色质凝集在细胞核周围。电针模型组,线粒体与板层小体肿胀减轻,空泡化现象减少,染色质边聚减少。说明电针足三里穴预处理可以减轻肺缺血再灌注损伤,其线粒体形态结构的改变可能与线粒体氧化应激反应有关。见图2。

3 讨论

肺缺血再灌注后,肺中血液循环及气体交换功能逐渐恢复,肺内氧气含量增加,大量氧自由基生成并释放,且种类繁多。同时,机体内抗氧化剂的消耗,不足以清除过量的氧自由基,因此氧化系统及抗氧化系统失衡,氧自由基攻击肺泡上皮细胞和血管内皮细胞并损害血管的通透性,使得组织内水分

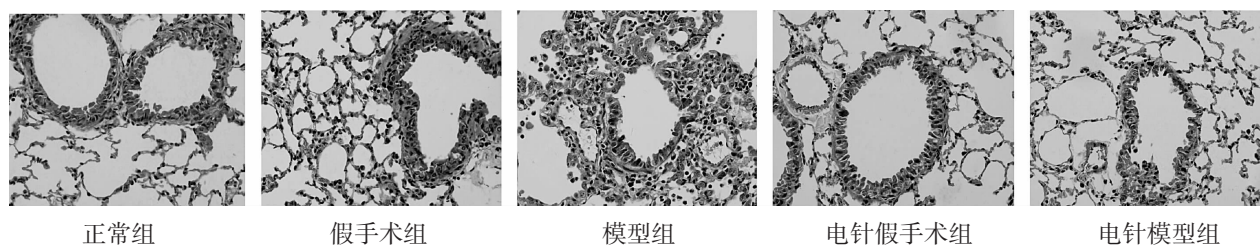


图1 光镜下5组肺组织显微结构变化比较(苏木精-伊红染色,×400)

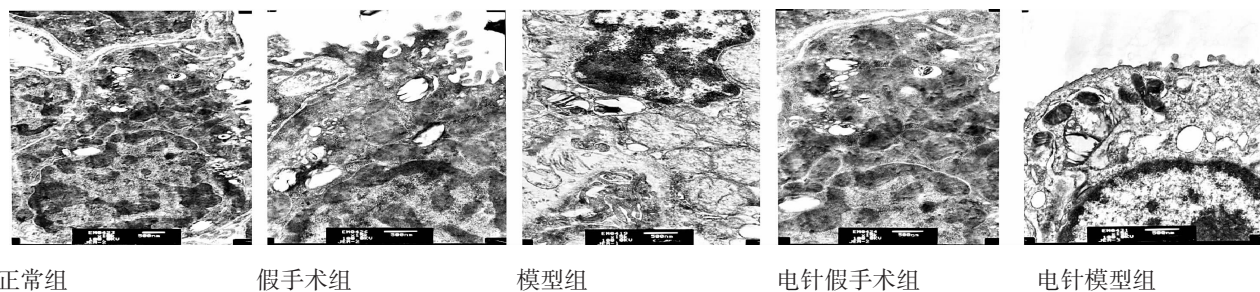


图2 电镜下5组肺组织细胞器显微结构变化比较

积聚,从而导致细胞代谢方面的障碍,引起肺氧化应激性损伤^[7]。因而,对抗氧化应激以清除自由基作为 LIRI 治疗方法的一种,已引起人们的广泛关注。而针灸改善肺功能和治疗呼吸系统疾病的研究,历来为针灸学者所重视,大量研究结果表明针灸不仅可以改善肺功能,防治疾病,还能对抗氧化应激。刘智斌^[8]等用嗅三针电刺激急性的脑缺血再灌注模型大鼠后,发现电针可提高皮层组织过氧化氢酶、谷胱甘肽过氧化物酶活性(GSH-PX)和总抗氧化能力,改善脑缺血再灌注脑损伤。针刺足三里,可通过提高 SOD、GSH-PX 和降低活性氧、MDA 达到清除自由基、抗氧化应激的作用。李氏^[9]通过针刺老年大鼠的足三里穴,发现针刺能提高血中 SOD 的含量,降低自由基代谢产物脂质过氧化物的含量。

MDA 是膜脂过氧化最重要的产物之一,生物体内,自由基作用于脂质发生过氧化反应,氧化终产物为丙二醛,它的产生能加剧膜的损伤,引起蛋白质、核酸等生命大分子的交联聚合,且具有细胞毒性。可通过 MDA 的含量了解膜脂过氧化程度,并能间接反应机体受自由基攻击的严重程度^[10]。SOD 即歧化超氧阴离子的专一性酶,是生物体内重要的抗氧化酶,为清除自由基的首要物质,在人体的氧化与抗氧化平衡中起着至关重要的作用^[11]。其含量多少可间接的反映出机体清除氧自由基能力。本次实验结果显示:模型组血清中与肺泡灌洗液中 MDA 的含量显著增高,而 SOD 含量显著降低,可提示肺缺血再灌注诱发了肺组织的氧化应激性损伤。与模型组相比,电针模型组在电针预处理后,血清和肺泡灌洗液中 MDA 含量显著降低,且 SOD 含量显著增高。说明电针预处理有提高肺组织中的 SOD 含量和降低 MDA 水平的作用,以此来对抗氧自由基的侵袭、拮抗过氧化损伤,而对肺组织有保护作用,减轻 LIRI。

血管通透性增加是肺缺血再灌注过程中的一个重要病理环节,国内有学者研究发现电针足三里能抑制烫伤后肠道微血管通透性增加,减轻组织水肿,增加肠黏膜血流^[12]。肺泡灌洗液中蛋白含量与血清中蛋白含量的比值大小能反应血管通透性的程度。模型组的蛋白含量比值明显大于正常组和电针模型组,说明模型组的肺血管通透性增加,蛋白由血管腔进入肺间质和肺泡,其通透性增加的机制可

能与自由基破坏血管内膜等结构的作用有关^[13]。电针模型组的蛋白含量比值比模型组明显降低,说明电针预处理有降低血管通透性的作用,其机制可能与拮抗氧化应激损伤有关。

肺水肿是 LIRI 的又一病理变化,肺水肿的发生与自由基的毒性作用密切相关。自由基能导致亚细胞器膜和血管内膜等结构破坏及肺水肿的形成和发展^[14]。有研究报道电针预处理“百会”等穴能够减轻脑缺血再灌注后脑水肿以降低脑缺血再灌注损伤^[15]。本研究显示,与模型组比较,电针模型组左肺湿干比明显减小,说明电针预处理能减轻肺缺血再灌注后肺水肿程度,对肺组织有保护作用。其保护机制可能与针刺对抗自由基相关。

肺组织病理学结果也能够表明,电针预处理足三里穴后可明显增强小鼠肺细胞抗氧化能力,改善小鼠 LIRI 后肺水等代谢,从而减轻细胞水肿,并维持细胞的正常形态和功能。另外,透射电镜结果显示,电针模型组比模型组损伤程度轻,其线粒体和板层小体肿胀程度和空泡化现象均有改善。进一步证实了电针预处理对肺缺血再灌注损伤具有保护作用。而近来也有研究表明电针内关穴可减轻大鼠体外循环后心肌线粒体超微结构损伤,加速缺血心肌能量的代谢,其机制可能和降低心肌线粒体的氧化应激水平有关^[16]。

综上所述,本实验结果表明,电针预处理对缺血再灌注的小鼠肺损伤具有一定的保护作用,其机制可能为增强缺血肺组织和血清中 SOD 活性,加速自由基清除并拮抗脂质过氧化损伤,以降低肺组织及血清中 MDA 水平,减轻肺水肿,改善 LIRI 的肺组织的病理变化。电针预处理对于防治缺血性肺疾病有广阔的应用前景,但其关于如何提高肺组织及血清中 SOD 活性、降低 MDA 含量的具体机制还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 陈烨,周军,袁婉丽,等. 电针预处理对肢体缺血再灌注大鼠生存、脑损伤及认知功能的影响 [J]. 中国病理生理杂志, 2013, 29(3): 469-475.
- [2] 孙思斯,高杨,刘墨宇,等. 电针预处理对脑缺血再灌注后 SOD₂ 的表达影响 [J]. 中华神经外科疾病研究杂志, 2014, 13(3): 236-240.
- [3] 陈文树,平尾,李武锦,等. 肺缺血再灌注损伤的研究进展 [J]. 创伤与急诊电子杂志, 2015, 3(4): 1-12.

- [4] 郑志坤,李劲松,王建军,等. 小鼠肺缺血再灌注损伤模型的建立与评估[J]. 华中科技大学学报,2011,40(6):727-729.
- [5] 张建新,李兰芳,尚涛,等. NG-硝基-L-精氨酸对大鼠内毒素性肺线粒体损伤的影响 [J]. 中国病理生理杂志,2008,24(24)5:920-924.
- [6] 谢仰民. 急性呼吸窘迫综合征大鼠肺病理组织电镜观察 [J]. 中国比较医学杂志,2006,16(6):351-352.
- [7] 任俊伟,杨琴. 白藜芦醇对大鼠脑缺血再灌注氧化应激损伤的影响 [J]. 中国生物制品学杂志,2011,24 (3):294-296.
- [8] 刘智斌,牛文民. “嗅三针”电刺激对脑缺血再灌注大鼠神经元线粒体保护作用的观察 [J]. 针刺研究,2007,32(3):163-166.
- [9] 姜艳玲,李野. 针灸抗衰老机制研究[J]. 长春中医药大学学报,2012,28(4):632-633.
- [10] Karabulut AB, Kirimlioglu V, Kirimlioglu H, et al. Protective effects of resveratrol on spleen and ileum in rats subjected to ischemia-reperfusion [J]. Transplant Proc, 2006,38(2):375-377.
- [11] Balakrishna S, Lomnicki S, McAvey KM, et al. Environmentally persistent free radicals amplify ultrafine particle mediated cellular oxidative stress and cytotoxicity [J]. Part Fibre Toxicol, 2009,6(1):11-24.
- [12] 胡森,王磊,周洁平. 电针足三里对烫伤休克大鼠肠黏膜血流和微血管通透性的影响[J]. 微循环学杂志,2010,20(1):10-12.
- [13] 赵云峰,姜艳平,吴学玲. 肺血管内皮细胞通透性与急性呼吸窘迫综合征 [J]. 中华肺部疾病杂志,2013,6(2):173-175.
- [14] 邢晓辉,朱汉祚,陈一敏,等. 柚皮苷对大鼠急性局灶性脑缺血再灌注损伤保护作用 [J]. 中国中医药咨讯,2009,1(6):7-8.
- [15] 万秋霞,王威威,刘冬冬,等. 电针预处理对大鼠脑缺血再灌注损伤后颈静脉血糖及脑水肿的影响[J]. 同济大学学报,2014,35(2):39-42.
- [16] 涂杰,李涛,梁东科,等. 电针内关穴对大鼠体外循环后心肌线粒体超微结构及氧化应激的影响 [J]. 广东医学,2015,36(9):1322-1326.

(编辑:徐建平)

(原文见第35页)

Study of the Compatibility Laws of Gastrodia Dispelling Wind and Dredging Collaterals

PENG Daiping¹, TANG Xiaohu², ZHOU Ruibin¹

(1. Kunming Municipal Hospital of Traditional Chinese Medicine, Kunming, 650011, China;

2. Yunnan Province Hospital of Traditional Chinese Medicine, Kunming, 650021, China)

ABSTRACT: **Objective** To study the effects of compatibility circumstances on gastrodia's effect in dispelling wind and dredging collaterals in complex prescriptions. **Methods** 400 formulae that effected on qufeng tongluo were collected from 1159 formulae with gastrodia, and the frequency of herbs combining with gastrodia in 400 formulae was ranked from high to low. **Results** According to the compatibility frequency from high to low, before 10 herbs are: Radix Saposhnikoviae (38.75%), Szechuan Lovage Rhizome (38.00%), Notopterygium (28.75%), Angelica Sinensis (27.25%), Radix Aconiti (20.75%), Cassia or Cassia Twig (19.00%), Monkshood (18.00%), Scorpion (17.25%), Achyranthes (17.00%), Rhizoma Typhonii (16.25%). **Conclusion** It showed that gastrodia should combine with corresponding herbs to form compatibility to exert the effect of qufeng tongluo in formula, which expression of qufeng sanxie, qufeng xuanbi, qufeng huatan and qufeng jiedu.

KEY WORDS: Gastrodia; Qufeng Tongluo(dispelling wind and dredging collaterals); compatibility law