

穴位注射疗法对早期大鼠脊髓损伤治疗作用机理的探讨

★ 刘娟 田磊 (陕西中医学院针推系 咸阳 712046)

★ 赵卫华 (陕西中医学院基础部 咸阳 712046)

★ 指导:邓春雷 (陕西省西安市中医医院 西安 71000)

摘要:目的:探讨穴位注射丹参注射液治疗脊髓损伤作用的可能机制。方法:采用改良的 Allen 氏造模法建立大鼠急性脊髓损伤模型,随机分为正常对照组、造模组、甲基强的松龙组、穴位注射治疗组。应用原子光谱分析法测定伤区脊髓组织中总钙的含量,并用荧光光度计分析伤区脊髓组织 MDA 的含量及 SOD 的活性。结果:造模后 8 小时伤区脊髓组织总钙及 MDA 含量各治疗组均显著低于造模组($P < 0.05$),SOD 的活性各治疗组显著高于造模组($P < 0.05$),穴注组与甲基强的松龙组无显著性差异($P > 0.05$)。结论:提示穴位注射丹参注射液能够减少早期脊髓损伤后 Ca^{2+} 内流及自由基的过氧化反应,从而有效的减轻脊髓继发性损害,保护神经组织并促进其功能恢复。

关键词:穴位注射疗法;脊髓损伤;总钙;丙二醛;过氧化物歧化酶

中图分类号:R 245.9⁺5 **文献标识码:**B

脊髓损伤(Spinal Cord Injury SCI)是临床上致残率很高的疾病,其病因主要为直接或间接的外力作用于脊柱,造成脊髓损伤。SCI 可分为原发性损伤和继发性损伤。近年基础研究证明,SCI 后早期继发的中心性出血性坏死,是造成脊髓横断性损害的主要原因,是影响病人预后和治疗效果的关键^[1]。针灸作为一种重要的非药物疗法,对 SCI 的治疗作用越来越受到医学界的重视。目前,穴位注射疗法在临床上已有应用,且收效良好^[2~4],但动物实验研究报道甚少,故本试验采用国际公认的改良的 Allen 氏造模方法制备成大鼠 SCI 模型,分别以穴位注射治疗后脊髓损伤区组织内总钙、过氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)的含量变化为指标,通过组间对照,以探讨穴位注射疗法对 SCI 的治疗作用及其机理,从而为本病的穴注治疗提供了有力的实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 健康 SD 大鼠,雌雄各半(约 2~3 月龄)40 只,体重约 200 ± 20 g(由西安交通大学医学院实验中心提供。合格证:医动字第 08-005 号。编号:34 号)。

1.1.2 主要实验试剂及仪器 甲基强的松龙片(5 mg/片,将该药研末加蒸馏水制成每毫升含原药 0.3 mg 的混悬液,仙居制药有限公司,批号:040574);丹参注射液(10 ml/支,每毫升相当于原药材 1.5 g,正大青春宝药业有限公司,批号:040936);SOD 试剂盒、MDA 试剂盒(南京建成生物工程研究所);721 型分光光度计(上海第二分析仪器厂);日立 Z-8000 型塞曼偏振效应原子吸收光谱仪(日本产)。

1.2 实验方法

1.2.1 造模方法 参照 Freeman 和 Wright 改良的 Allen 氏造模方法^[5]。按 1 g/kg 剂量给予大鼠皮下注射 20% 乌拉坦麻醉后,以第 12 胸椎棘突为中心,作长约 2~2.5 cm 的正中切口,小心切除 T₁₁~L₁ 棘突及椎板,暴露硬脊膜,以 T₁₂ 棘突为中心放置脊髓固定器,将 2 g 砝码自 25 cm(50gcm)处沿导向管内壁自由下落撞击脊髓固定器,可听到局部钝性撞击声,同时可见大鼠身体颤动摆尾,随后双下肢出现瘫痪,表明造模成功,已造成中度脊髓损伤。每日肌注青霉素 8 万单位,以预防术后感染。手术全程严格按无菌操作。

1.2.2 分组及处理 分组:40 只大鼠适应性喂养 1 周后随机分为 4 组(按随机数字表):A. 正常对照组,B. 造模组,C. 甲基强的松龙,D. 穴位注射组,每组各 10 只。

处理方法:A 组正常喂养,仅剥离椎板,不做任何处理;B 组造模成功后 2 小时开始,以 2 mL 甲基强的松龙药液灌胃 1 次;C 组造模成功后 2 小时开始仅以生理盐水 2 mL 灌胃 1 次;D 组于造模成功后 2 小时开始行穴注治疗。选取“大椎”(位于第 7 颈椎与第 1 胸椎棘突之间,直刺约 3~4 mm)、“足三里”(腓骨小头前下约 5 mm 处,直刺深度约 6~7 mm)和脊髓损伤平面上下棘突旁的“华佗夹脊穴”(在距损伤段上下端两个椎体的棘突间隙旁开正中中线约 3~4 mm 处取穴,斜向内进针约 4~5 mm,左右交替使用),共 4 个穴位行穴位注射疗法,每穴注射丹参注射液 0.1 mL。

1.2.3 取材及指标的检测 取材:以上各组动物分别于造模后 8 小时在麻醉状态下活体取材。于原切口处暴露出脊髓,以打击处为中心取出伤段脊髓约 1 cm 长,先用生理盐水将其表面血迹冲干净,轻柔去除硬脊膜,滤纸吸干水分后,均

匀的分为两段放置—20℃冰箱备用。

总钙水平的测定:取出备好的伤段组织的其中一段,置于瓷坩埚中,放入马弗炉中,在500℃灰化2~3小时,取出冷却称重,加6 mol/L盐酸8 mL,加热促使残渣完全溶解。用蒸馏水稀释至50 mL;吸取稀释液10 mL加入6.4 mL盐酸,10 mL镧溶液[称取 $\text{La}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (A.R) 15.6 g溶于少量蒸馏水中,稀释至100 mL,此溶液含镧为50 mg/mL],借助原子吸收光谱仪,测定钙离子含量。

SOD及MDA的测定:将伤段脊髓组织另一段称重,以重量/体积(W/V)比1:9加入冰生理盐水,用玻璃组织研磨器制成10%的匀浆,采用硫代巴比妥酸法检测MDA的含量,用黄嘌呤氧化酶法测定SOD的活性。具体操作步骤严格按照试剂盒说明进行。

1.2.5 统计学处理 应用SPSS10.0统计处理软件,各组数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间差异两两比较用 t 检验。

2 实验结果

造模后8小时,大鼠伤区脊髓组织总钙、MDA含量,造模组均非常显著高于正常组($P < 0.01$);MP组和穴注组均显著低于造模组($P < 0.05$);穴注组与MP组比较无显著性差异($P > 0.05$)。脊髓组织中SOD的活性造模组呈非常显著性降低($P < 0.01$);MP组和穴注组均高于造模组,有显著性差异($P < 0.05$);穴注组SOD的活性与MP组的差异无显著性($P > 0.05$)。各组大鼠伤区脊髓组织总钙、MDA的含量及SOD活性的测定结果见表1:

表1 大鼠伤区脊髓组织总钙、MDA的含量及SOD活性含量的测定结果 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数 /n	总钙 / $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 干重	MDA / $\text{nmol} \cdot 100\text{mg}^{-1} \cdot \text{pr}$	SOD / $\mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{pr}$
A 正常组	10	96.27 ± 16.35	28.48 ± 3.36	2.7 ± 0.61
B 造模组	10	158.18 ± 12.87*	36.18 ± 1.87*	0.96 ± 0.29*
C MP组	10	116.5 ± 15.58#	31.5 ± 2.14#	1.43 ± 0.42#
D 穴注组	10	120.67 ± 19.21#△	32.09 ± 2.27#△	1.45 ± 0.37#△

注:与正常组比较* $P < 0.01$,与造模组比较# $P < 0.05$,与MP组比较△ $P > 0.05$ 。

3 讨论

SCI后开始时常为不完全性,其最后结果常为两种损害机制引起:一种是原发性脊髓损伤,包括神经元及血管破坏;另一种是继发性脊髓损伤(SSCI),因一系列生化机制引起,结果使最初病灶周围未损伤的组织发生自身破坏性病变。细胞内 Ca^{2+} 超载被认为是脊髓损伤后继发性损害的关键因素[6]。细胞内钙超载不仅可引起线粒体的损害,而且间接产生血栓素、白三烯及自由基,通过对血管的作用及炎症反应进一步加重组织损伤。近年来研究表明,脂质过氧化是脊髓损伤后组织进行性损害的主要因素之一。脊髓组织脂类含量非常丰富,具有众多的不饱和脂肪酸,SCI后其中不稳定的

弱键最易受到自由基的攻击,产生脂质过氧化,使病理性损害进一步恶化。研究表明,在SCI病理过程中伴随着由 Ca^{2+} 内流介导的自由基生成和脂质过氧化反应,加重了神经损伤的生化代谢紊乱[7]。

穴位注射疗法是以经络学说为指导,将经络、腧穴、药物效应有机结合起来,使临床疗效得以大幅提升[8]。穴位注射可在短时期内即产生与静注等同或更强的药效,药效强大而迅速[9]。本实验中穴位注射治疗组采用丹参注射液为注射药物,丹参味苦,性寒,具有活血化瘀、凉血消肿、调经止痛、清营除烦的功效。现代药理研究表明,丹参具有降低血粘度改善微循环,并具有清除自由基和抗脂质过氧化作用,丹参亦是一种钙拮抗剂,可阻止钙内流,据报道,丹参注射液对离体家兔浦肯野纤维钙通道有明显抑制作用[10]。穴位注射丹参可通过穴效和药效的整合作用而发挥其独特的治疗作用。

本试验结果表明,穴位注射疗法能有效地降低早期SCI后伤区脊髓组织内 Ca^{2+} 的含量,从而减轻继发性损害,保护残存脊髓神经的功能。穴位注射组MDA的含量显著低于造模组($P < 0.05$),SOD的活性显著高于造模组($P < 0.05$),说明穴位注射疗法能减轻自由基的脂质过氧化反应,其可能的机制是:穴注可降低损伤区 Ca^{2+} 含量,从而减少由于 Ca^{2+} 的内流而导致病理性自由基的生成;穴注可增加抗氧化物(SOD)的生成,减轻脂质过氧化反应。从而有效的减轻脊髓组织的继发性损害,促进脊髓神经功能的恢复。

参考文献

- [1]高绪文,郑明新. 临床脊髓病学[M]. 北京:人民卫生出版社, 1997:378~379
- [2]刘钦华,邹勇,刘建久. 穴位注射与针刺治疗肢体截瘫140例[J]. 陕西中医,1992,12(9):421
- [3]米建平,蒙昌荣,李建强. 以华佗夹脊穴及背俞穴为主治疗截瘫疗效观察[J]. 中国针灸,2002,20(9):517~519
- [4]刘志良. 针灸为主治疗外伤性截瘫224例临床观察[J]. 针灸临床杂志,2001,17(5):25~26
- [5]Freeman LW, Wright GW. Experimental observations of concussion of spinal cord[J]. Ann surg, 1953,137:433
- [6]章亚东,侯树勋,刘英炳,等. 脊髓损伤细胞内 Ca^{2+} 变化及其与神经功能损害的关系[J]. 中华骨科杂志,1997,17(5):291~295
- [7]何凤慈,龙在云,周立,等. 三七总皂对大鼠脊髓损伤组织总钙和脂质过氧化的影响[J]. 第三军医大学学报,1993,15(5):426~429
- [8]丁强,黄丽华. 穴位注射疗法临床研究进展[J]. 针灸临床杂志, 1998 14(9):54
- [9]周爱玲,邵政一,丁斐,等. 穴位药效与血药浓度关系研究[J]. 中国中医基础医学杂志,1999,5(8):5
- [10]王腾,李庚山,许家俐,等. 丹参注射液对离体家兔浦肯野纤维钙通道的抑制作用[J]. 湖北医科大学学报,1996,17(2):134

(收稿日期:2006-06-27)

欢 迎 投 稿 ! 欢 迎 订 阅 !