

· 论 著 ·

针刺对宫内缺血脑损伤大鼠行为学及脑组织病理形态的影响

吴至凤¹, 赵聪敏¹, 袁青², 赵雪晴¹, 赵永姣¹, 武燕¹, 刘莎莎¹

(1. 第三军医大学新桥医院儿科脑瘫康复中心, 重庆 400037; 2. 广州中医药大学, 广州 510405)

摘要:目的 观察针刺疗法对宫内缺血脑损伤大鼠学习记忆能力、运动能力及脑组织 HE 染色病理形态的影响。方法 采用结扎孕鼠双侧子宫动脉, 完全阻断血供 25min 娩出胎鼠, 制成宫内缺血脑损伤模型, 成功模型随机分入针刺组和模型组, 每组各 8 只; 正常对照组剖腹产取出胎鼠, 8 只; 其余胎鼠丢弃。正常对照组和模型组不治疗, 针刺组于出生后 14 日龄至 30 日龄行针刺治疗, 每日针刺 1 次, 不留针。所有实验鼠于 14 日龄及 30 日龄进行行为学测试(Y 型迷宫、悬吊实验、斜坡实验), 测试结束后断头取脑, HE 染色观察各组脑组织病理形态的变化。结果 (1)14 日龄时各行为学指标比较, 模型组和针刺组差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 该两组与正常对照组差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。30 日龄时, 针刺组 Y 型迷宫错误反应次数、悬吊实验维持时间及得分、斜坡实验耗时等指标均介于正常对照组与模型组之间, 与其余两组差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。(2)脑组织 HE 染色形态学观察结果表明, 模型组出现了较严重的皮质和海马神经细胞丢失、变性, 针刺组虽然较正常对照组仍有不同程度的神经细胞变性, 但较模型组脑细胞形态和结构完整。结论 针刺疗法对宫内缺血后大鼠学习记忆障碍、运动障碍有一定的改善, 且对神经元形态和超微结构具有保护作用。

关键词: 缺氧缺血; 脑损伤; 行为学; 病理形态; 针刺疗法

中图分类号: R365.741; R245.31

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2009)22-2795-03

Acupuncture effect on ethology and brain morphology of histopathology in intrauterine ischemic brain damage rats

WU Zhi-feng¹, ZHAO Cong-min¹, YUAN Qing², et al.

(1. Department of Pediatrics, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China;

2. College of Acupuncture and Massage, Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510405, China)

Abstract: Objective To observe the acupuncture effect on intrauterine ischemic brain damage rats' study memory ability, motor ability and HE staining pathological morphology of brain tissue. **Methods** To ligate bilateral uterine arteries of the pregnant rats and completely block the blood supply for 25min. Then birth fetus rats were made the intrauterine ischemic brain damage models. The successful-models were randomly divided into the acupuncture group and the model group, 8 rats each. The normal group came out of normo-caesarean, 8 rats. Discard the remaining fetal rats. **Results** (1) Ethology index comparison: on 14d, the model group and the acupuncture group did not have the difference ($P > 0.05$), these two groups had the difference with the normal group ($P < 0.05$). On 30d, comparing the error number of maze Y (EN), the maintenance time and the score of grasping experiment, the time-consuming of Pitch experiment in the three groups, those indexes of acupuncture group were situated between the normal group and the model group with significance difference ($P < 0.05$). (2) The result of HE staining pathological morphology of brain tissue showed that, the model group appeared more serious cortex and hippocampus nerve cell loss and degeneration. Although the acupuncture group still had varying degrees of nerve cell degeneration, its morphology and structural integrity of brain cells were better than those of the model group. **Conclusion** Acupuncture can improve the study memory ability, motor ability of intrauterine ischemic brain damage rats, also can protect the morphology and ultrastructure of the nerve cells.

Key words: hypoxic-ischemic; brain damage; ethology; pathomorphology; acupuncture

胎儿宫内窘迫是造成新生儿神经系统损伤的重要高危因素之一, 随着新生儿抢救技术的进一步提高, 新生儿病死率逐年下降, 而儿童神经系统后遗症的发病率却反而上升, 此类疾病的治疗至今仍为世界性医学难题。采用针灸治疗儿童神经系统后遗症在国际上日益引起重视, 如美国 Arizona 州立大学的 Duncan 等^[1]通过临床随机对照试验证实了针刺治疗脑瘫可改善肢体运动功能, 改善患儿睡眠质量; 有学者认为针灸治疗脑瘫有着极大的潜在社会效益和经济效益, 我国宜建立以针灸为中心的有中国特色的脑性瘫痪康复体系^[2]。因此, 针灸有望成为防治小儿脑损伤的重要方法。本研究结扎孕鼠双侧子宫动脉完全阻断血供娩出胎鼠制成宫内窘迫脑损伤模型, 采用针刺疗法干预治疗, 并对其所产生的康复效应做评定, 为针刺疗法在发育期脑损伤中的应用提供部分实验依据。

1 材料与方

1.1 模型制备与分组 购买妊娠精确到 18d 的清洁级 (SPF) SD 孕鼠 10 只 (由广州中医药大学实验动物中心提供), 参照薄涛等^[3]宫内窘迫脑损伤模型制作方法; 妊娠 21d 雌鼠腹部明显可摸到胎鼠, 这时采取 CO₂ 麻醉 9 只孕鼠, 分离并结扎双侧子宫动脉, 完全阻断血供 25min 娩出胎鼠, 存活胎鼠 20 只, 再随机分入针刺组和模型组, 每组各 8 只; 取孕鼠 1 只 CO₂ 麻醉, 手术过程中仅用止血钳夹住孕鼠子宫颈, 马上取出胎鼠, 存活胎鼠 9 只, 随机选取 8 只纳入正常对照组; 实验胎鼠均由代乳鼠喂养, 其余新生鼠丢弃。

1.2 干预方法 针刺组于出生后 14 日龄开始针刺治疗, 治疗至出生后 30 日龄。取穴参照文献^[4]结合同身寸类比法, 组穴参照“靳三针疗法”^[5]: (1) 四神针 (顶骨正中定百会, 前后旁开

表 1 EN、主动回避次数、TRT 比较 ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | n | 错误反应次数(EN) | | | 主动回避次数 | 总反应时间(TRT)(s) | |
|-------|---|------------|-------------------------|-------------------------|------------|---------------|-------------|
| | | 14d | 30d | EN 差值 | 30d | 14d | 30d |
| 正常对照组 | 8 | 4.25±0.70 | 0.75±0.46 | 3.50±0.93 | 1.25±0.89 | 158.43±47.92 | 47.43±7.32 |
| 模型组 | 8 | 7.13±1.73* | 5.75±0.71* [#] | 1.38±2.07* [#] | 0.16±0.35* | 206.46±57.58 | 51.21±18.37 |
| 针刺组 | 8 | 7.88±1.25* | 2.00±1.20* | 5.88±1.55* | 0.75±0.89 | 210.02±64.13 | 42.25±9.92 |
| F | | 17.450 | 75.830 | 16.140 | 4.495 | 2.048 | 2.716 |
| P | | <0.0001 | <0.0001 | <0.0001 | 0.024 | 0.154 | 0.089 |

3 组主动回避次数 14d 时均为 0。* :与正常对照组比较, $P < 0.05$; [#] :与针刺组比较, $P < 0.05$ 。

表 2 3 组悬吊实验得分比较 ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | n | 维持时间(s) | | 得分 | |
|-------|---|-------------|---------------------------|------------|-------------------------|
| | | 14d | 30d | 14d | 30d |
| 正常对照组 | 8 | 30.19±15.03 | 375.16±42.50 | 2.50±0.53 | 5.00±0.00 |
| 模型组 | 8 | 12.19±6.37* | 56.08±49.97* [#] | 1.75±0.46* | 2.50±1.07* [#] |
| 针刺组 | 8 | 10.22±7.03* | 177.86±93.22* | 1.25±0.46* | 3.75±0.71* |
| F | | 9.202 | 47.881 | 13.300 | 22.826 |
| P | | 0.001 | <0.001 | <0.001 | <0.001 |

* :与正常对照组比较, $P < 0.05$; [#] :与针刺组比较, $P < 0.05$ 。

1.5 寸);合谷(前肢第 1、2 掌骨之间);太冲(后肢足背第 1、2 跖骨间凹陷处取)。(2)颞三针(耳根上 1.5 寸及左右旁开 1 寸);劳宫(前肢掌心正中);足三里(在膝关节下外侧,腓骨小头前下方)。(3)脑三针(顶部枕骨后缘正中线上枕骨粗隆凹陷处及左右旁开 2.5 寸);曲池(桡骨近端的关节外侧前方的凹陷中);涌泉(后肢掌心前正中)。(4)智三针(内眦连线中点上 4 寸及左右旁开 2 寸);外关(前肢外侧,离腕关节约 2 寸左右的尺桡骨缝间);三阴交(后肢内踝直上 3 寸)。取苏州天一针灸器械有限公司生产“天协”牌一次性毫针针刺(规格 0.30mm×13mm),每日针刺 1 次,每日一个穴位。上述 4 组穴位交替轮换,头部穴位平刺,四肢穴位直刺,每个穴位刺入皮下后捻转 5s,不留针。正常对照组和模型组未予任何治疗。

1.3 主要仪器及试剂 图像分析系统(广州亿鸣图像分析软件),光学显微镜(Olympus BX50 生物组织显微镜),徕卡 2245 型半自动石蜡切片机,徕卡 EG1140 型石蜡包埋机,徕卡 TP1020 型生物组织脱水机(德国),徕卡 RM2255 型全自动石蜡切片机(德国),徕卡 5010 型石蜡切片染色机(德国),恒温水箱(型号 700,中国),摊烘片机(型号 ZMN200,中国),m256461 型小鼠 Y 型迷宫等;水溶性封片剂(批号:095071,中国广州晶美公司)。

1.4 实验方法 所有新生鼠于出生后 14 日龄及 30 日龄各行一次行为学测试(Y 型迷宫、悬吊实验、斜坡实验),30 日龄测试结束后断头取脑,快速在冰盘上剥离脑组织,经 10% 中性缓冲甲醛固定,常规包埋,石蜡切片厚 4 μ m,经脱蜡、脱二甲苯、水洗、HE 染色等步骤,最后中性树脂封片。在普通光镜 10×20 倍下随机观察每张切片 5 个视野内脑组织病理变化情况。

1.5 统计学方法 采用 SPSS 13.0 软件对实验数据进行统计学处理,所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多均数比较采用方差分析,方差不齐时采用秩和检验;两组均数比较采用 *t* 检验。

2 结 果

2.1 行为学指标

2.1.1 Y 型迷宫 14 日龄,针刺组和模型组 EN 及 EN 差值差异无统计学意义($P > 0.05$),上述两组与正常对照组差异有统计学意义($P < 0.05$),即模型组和针刺组基线无差别,该两组与正常对照组有差别。30 日龄时任何两组间差异均有统计学意义($P < 0.05$),且针刺组实验动物 EN 介于正常对照组与模型组之间,说明针刺疗法提高了动物的学习记忆能力,见表 1。

2.1.2 悬吊实验 14 日龄时,3 组悬吊实验维持时间及得分比较,模型组和针刺组差异无统计学意义($P > 0.05$),该两组与正常对照组差异有统计学意义($P < 0.05$)。30d 龄时任何两组间悬吊实验维持时间及得分差异有统计学意义($P < 0.05$),针刺组实验动物平衡能力介于正常对照组与模型组之间,即针刺疗法提高了动物的平衡能力,见表 2。

2.1.3 斜坡实验 14 日龄时,3 组斜坡实验耗时均较长,模型组和针刺组差异无统计学意义($P > 0.05$),该两组与正常对照组差异有统计学意义($P < 0.05$)。30 日龄时正常对照组很快就能判断反应,将向下倒置的头由下转向上,针刺组完成同样动作稍慢,模型组最慢,针刺组与模型组、正常对照组与模型组差异有统计学意义($P < 0.05$),针刺组实验动物反应能力介于正常对照组与模型组之间,说明针刺疗法提高了动物斜坡实验反应能力,见表 3。

表 3 3 组针刺前后斜坡实验耗时比较 ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | n | 14d(s) | 30d(s) |
|-------|---|-------------|------------------------|
| 正常对照组 | 8 | 7.13±2.06 | 2.94±1.08 [#] |
| 模型组 | 8 | 15.15±5.68* | 10.40±2.96 |
| 针刺组 | 8 | 11.80±5.53* | 5.78±4.03 [#] |
| F | | 6.874 | 24.493 |
| P | | 0.005 | <0.001 |

* :与正常对照组比较, $P < 0.05$; [#] :与模型组比较, $P < 0.05$ 。

2.2 HE 病理形态学的变化 正常对照组皮层脑细胞结构正常,胞核清晰,胞浆丰富,间质无水肿表现,海马锥体细胞 2~3 层,排列紧密,细胞核圆而大,核仁清晰。模型组大脑皮质和海马神经细胞丢失、变性最严重,而针刺组虽然仍有不同程度的神经细胞变性,但变性神经细胞数量显著减少,零星可见一些损伤的细胞,海马锥体细胞层细胞形态、排列基本正常(图 1~3)。

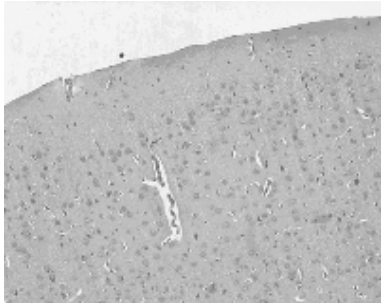


图 1 正常对照组脑组织 HE 染色(10×20)

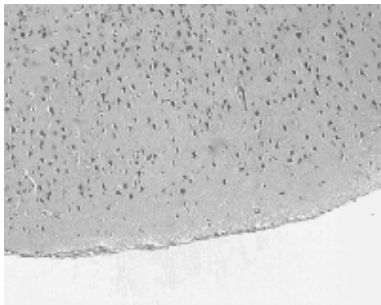


图 2 针刺组脑组织 HE 染色(10×20)

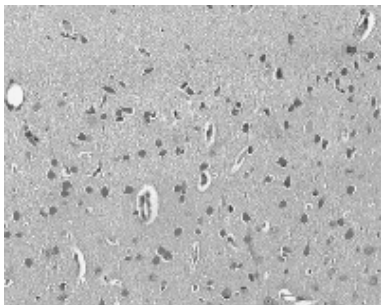


图 3 模型组脑组织 HE 染色(10×20)

3 讨论

经研究证实,Y 型迷宫实验、悬吊实验、斜坡实验等可区别实验大鼠与正常大鼠存在运动协调能力及神经行为能力的差异^[6]。本文试图通过上述实验观察针刺对提高宫内缺血脑损伤大鼠运动能力及学习记忆能力的疗效,结果显示,针刺疗法能显著提高大鼠的学习记忆能力(Y 型迷宫结果)和运动能力(悬吊实验和斜坡实验结果),证实针刺疗法有促进肢体运动能力恢复及健脑益智的作用。

有学者进行 Y 型迷宫实验采取“凡大鼠受电击后 10s 内一次性从起步区逃至安全区的反应称为‘正确反应’,否则为‘错误反应’”的评价规则^[7],本课题组成员认为这项规则对于

发育至青少年、成年以上的实验大鼠适用。在实验中观察发现新生大鼠一般出生 8 日龄才爬行出窝,14d 才睁眼,故而本实验根据幼鼠的生长发育特点,考虑到它们的实际能力,将初次 Y 型迷宫测试规定在 14 日龄时进行首次测试。大鼠 14d 时,爬行仍然较缓慢,正常对照组跑一趟迷宫耗时平均 15.84s,经宫内缺血打击后的针刺组和模型组的老鼠就更缓慢了,故而本研究根据实际情况,将 14 日龄大鼠的 Y 型迷宫评价标准放宽至 20s,即“凡大鼠受电击后 20s 内一次性从起步区逃至安全区的反应称为‘正确反应’,否则为‘错误反应’。”但 30 日龄时仍采取 10s 的时间标准。因为本研究所采取的评价标准均是同时同样针对所有实验动物,故而并不对实验结果造成不良影响。关于 Y 型迷宫实验,表 1 结果显示,3 组主动回避次数和总反应时间(TRT)比较,虽然 30 日龄时针刺组比模型组的数值优越,但从统计学上讲,不足以说明针刺组与模型组有差异,考虑可能是因为样本含量太少引起。

本研究所采用的 HE 染色能初步观察脑组织神经元的病理改变,对于细胞凋亡或死亡数较多且其形态容易辨别的组织细胞不失为一种好方法。本研究结果显示,模型组大脑皮质和海马神经细胞丢失、变性最严重,而针刺组虽然有不同程度的神经细胞变性,但变性神经细胞数量较模型组显著减少,零星可见一些损伤细胞,海马锥体细胞层细胞形态、排列基本正常。

综上所述,本研究结果提示,针刺疗法可以改善宫内缺血脑损伤大鼠的学习记忆及行为学能力,维护大脑皮层及海马区神经细胞的结构完整。但为什么针刺疗法具有上述疗效?其神经保护、再生和重塑作用的实现途径是什么?具体的机制尚待进一步研究证实。

参考文献:

- [1] Duncan B. Parental perceptions of the therapeutic effect from osteopathic manipulation or acupuncture in children with spastic cerebral palsy[J]. Clin Pediatr, 2004, 43(4): 349.
- [2] 王琴玉. 中国的脑性瘫痪康复现状及特色分析[J]. 上海针灸杂志, 2007, 26(6): 46.
- [3] 薄涛, 严超英, 霍淑芳, 等. 结扎孕鼠双侧子宫动脉复制围产期缺氧缺血性脑损伤动物模型[J]. 中风与神经疾病杂志, 2001, 18(1): 40.
- [4] 李忠仁. 实验针灸学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2003: 327.
- [5] 袁青. 靳三针疗法解说[M]. 上海: 上海科学技术文献出版社, 2004: 39.
- [6] 李湘云, 程书卿. 缺血缺氧动物实验模型制作分析[J]. 中国实用神经疾病杂志, 2006, 9(5): 65.
- [7] 余建, 黄育文, 陈忠. 经过改良的评价大鼠空间记忆能力的交替电刺激 Y 型迷宫[J]. 浙江大学学报(医学版), 2003, 32(2): 121.

(收稿日期: 2009-06-05)