

· 实验研究 ·

电针足三里穴对依托咪酯麻醉大鼠急性应激反应的影响

蒋奕红 胡越 熊威威 谭毅 李爱国 杨华 黄志华

【摘要】 目的 探讨电针足三里穴对依托咪酯麻醉大鼠应激反应的影响。**方法** 选择雄性 SD 大鼠 60 只,体重 280~310 g,随机分为六组:空白对照组(C 组)、模型组(M 组)、依托咪酯 60 mg/kg 组(E1 组)、依托咪酯 30 mg/kg 组(E2 组)、依托咪酯 60 mg/kg 联合电针组(EA1 组)和依托咪酯 30 mg/kg 联合电针组(EA2 组),每组 10 只。C 组大鼠不进行任何麻醉手术操作,其余五组均建立低位尾干切断模型。建模后,E1 组和 EA1 组大鼠腹腔注射依托咪酯 60 mg/kg,E2 组和 EA2 组大鼠腹腔注射依托咪酯 30 mg/kg。EA1 组和 EA2 组大鼠于麻醉状态行双侧足三里穴治疗 30 min (频率 2/100 Hz,疏密波,电流强度 1 mA)。采用 ELISA 法检测血清 ACTH 和 Cor 的浓度,Western blot 法检测下丘脑室旁核组织 c-fos 蛋白的含量。**结果** M 组 ACTH、Cor 浓度和 c-fos 蛋白含量明显高于 C 组($P < 0.05$);E1 组、E2 组、EA1 组、EA2 组 ACTH、Cor 浓度和 c-fos 蛋白含量明显低于 M 组($P < 0.05$);E2 组、EA1 组 ACTH、Cor 浓度和 c-fos 蛋白含量明显高于 E1 组($P < 0.05$);EA2 组 ACTH 浓度和 c-fos 蛋白含量明显低于 E2 组($P < 0.05$)。**结论** 电针大鼠足三里穴可双向调节依托咪酯对急性应激反应的影响,其机制可能与其调节下丘脑 c-fos 蛋白水平有关。

【关键词】 电针;依托咪酯;应激;足三里穴;c-fos 蛋白

Effect of electroacupuncture at tusanli on regulation of stress response under etomidate anesthesia in rats
JIANG Yihong, HU Yue, XIONG Weiwei, TAN Yi, LI Aiguo, YANG Hua, HUANG Zhihua.
Department of Anesthesiology, Affiliated Hospital of Guilin Medical College, Guilin 541001, China
Corresponding author: HUANG Zhihua, Email: HZHGL0411529@126.com

【Abstract】 Objective To explore the effect of electroacupuncture (EA) at tusanli (ST36) on regulation of stress response under different doses of etomidate anesthesia in rats. **Methods** Sixty male Sprague-Dawley rats, weighing 280-310 g, were randomly divided into control group (group C), model group (group M), etomidate 60 mg/kg group (group E1), etomidate 30 mg/kg group (group E2), etomidate 60 mg/kg combined with EA group (group EA1) and etomidate 30 mg/kg combined with EA group (group EA2), $n = 10$ in each group. All groups received inferior caudal trunk transection at the level between sacral spinal nerve 3 and 4 (S_3, S_4) to prepare acute stress response model except group C. Group M received no others treatment. The rats in group E1, group EA1, group E2 and group EA2 were intraperitoneally injected with 60, 60, 30 and 30 mg/kg etomidate, respectively. Group EA1 and group EA2 received EA ST36. The points were stimulated at a frequency of 2/100 Hz with 1 mA output and a dilatational wave, which lasted for 30 min. ACTH and Cor levels were measured by ELISA. The c-fos protein expression in hypothalamic tissue was examined by Western blot. **Results** Compared with group C, ACTH and Cor levels, and hypothalamic expression of c-fos protein in group M were significantly increased ($P < 0.05$). Compared with group M, serum ACTH and Cor levels, and hypothalamic expression of c-fos protein in groups E1, E2, EA1 and EA2 were significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with group E1, serum ACTH and Cor levels, and hypothalamic expression of c-fos protein were significantly higher in groups E2 and EA1 ($P < 0.05$). Compared with group E2, serum ACTH level and hypothalamic expression of c-fos protein were significantly lower in group EA2 ($P < 0.05$). **Conclusion** EA at ST36 regulating stress response under etomidate anesthesia in rats is effective and two-way, and the mechanism may be due to the release of neurotransmitters induced c-fos protein in hypothalamus.

【Key words】 Electroacupuncture; Etomidate; Stress; Tsusanli; c-fos Protein

基金项目:2012 年广西高等学校科研项目(201204LX243);
2014 年桂林市科学研究与技术开发计划课题(20140310-2-3)

作者单位:541001 桂林医学院附属医院麻醉科(蒋奕红、胡越、熊威威、谭毅、李爱国、黄志华),中医科(杨华)

通信作者:黄志华,Email: HZHGL0411529@126.com

有研究指出,依托咪酯会抑制肾上腺皮质功能,即使单次剂量也可造成暂时的肾上腺皮质水平下降,且这种抑制对促肾上腺皮质激素(adrenocor-

ticotropic hormone, ACTH) 刺激反应迟钝^[1]。电针能降低急性应激反应, 在各类手术中实施电针复合麻醉也取得了令人满意的临床效果^[2]。本实验拟探讨电针足三里穴对两种剂量依托咪酯麻醉大鼠应激反应的调控作用, 以期为临床提供参考。

材料与方法

动物选择及分组 清洁级成年雄性 SD 大鼠 60 只, 10 周龄, 体重 280~310 g, 由桂林医学院实验动物中心提供[动物许可证号: SCXK(桂) 2013-0001]。大鼠随机分为六组: 空白对照组(C 组)、模型组(M 组)、依托咪酯 60 mg/kg 组(E1 组)、依托咪酯 30 mg/kg 组(E2 组)、依托咪酯 60 mg/kg 复合电针组(EA1 组)和依托咪酯 30 mg/kg 联合电针组(EA2 组), 每组 10 只。

模型制备及药物电针干预 参考文献[3, 4]的方法建立低位尾干切断模型, 模拟急性应激反应: 用鼠笼固定大鼠后, 在靠近尾端的尾干处(S₃和 S₄脊髓神经之间)横切。C 组大鼠不进行任何麻醉手术操作。建模后, E1 组和 EA1 组大鼠腹腔注射依托咪酯 60 mg/kg, E2 组和 EA2 组大鼠腹腔注射依托咪酯 30 mg/kg。EA1 组和 EA2 组大鼠于依托咪酯麻醉状态时电针双侧足三里穴, 频率 2/100 Hz, 疏密波, 电流强度 1 mA, 以大鼠双后肢微微颤动为宜, 持续时间 30 min^[5, 6]。电针治疗结束后立即处死动物, 其余组同时处死, 检测有关指标。

血清 ACTH、皮质醇(corticosterone, Cor)浓度的测定 为排除皮质醇昼夜节律性的干扰, 实验中采血时间控制在上午 12 点左右。建模后 30 min, 常规胸腹联合切口, 开胸后经右心房用不凝管采血 5 ml, 血样室温放置 2 h 后, 4℃下 3 500 r/min 离心 15 min, 分离血清, -20℃保存备用。待所有标本收集完毕后按照试剂盒说明书采用 ELISA 法检测 ACTH 和 Cor 浓度。

下丘脑组织 c-fos 蛋白含量的测定 采血后即经左心室用生理盐水灌注大鼠, 取下丘脑背侧区(主要含下丘脑室旁核), 提取蛋白质, 进行蛋白定量。按 50 μg/100 μl 的比例将组织裂解液加入到下丘脑组织内匀浆, 4℃下 1.2×10⁴ r/min 离心后, 取上清液。采用 BCA 法测定样品的蛋白质含量, 取 50 μg 蛋白质, 加热变性后, 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白, 采用 PVDF 膜冰上进行恒流转膜。用 5% 脱脂奶粉 TBST 液室温封闭 2 h, 加入 c-fos 一抗(1:500, A1915), 4℃孵育过夜。次日, 洗膜后加

HRP 标记的羊抗兔二抗(1:5 000, 20150508)室温孵育 1 h。TBST 清洗 3 次, ECL 曝光显影。行相对灰度值分析。

统计分析 采用 SPSS 18.0 软件进行统计学分析。正态分布计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 SNK 法。P<0.05 为差异有统计学意义。

结 果

血清 ACTH、Cor 浓度 M 组 ACTH、Cor 浓度明显高于 C 组。E1 组、E2 组、EA1 组、EA2 组 ACTH、Cor 浓度均明显低于 M 组(P<0.05); E2 组、EA1 组 ACTH、Cor 浓度明显高于 E1 组(P<0.05); EA2 组 ACTH 浓度明显低于 E2 组(P<0.05)(表 1)。

表 1 六组大鼠血清 ACTH 和 Cor 浓度的比较 ($\bar{x} \pm s$)

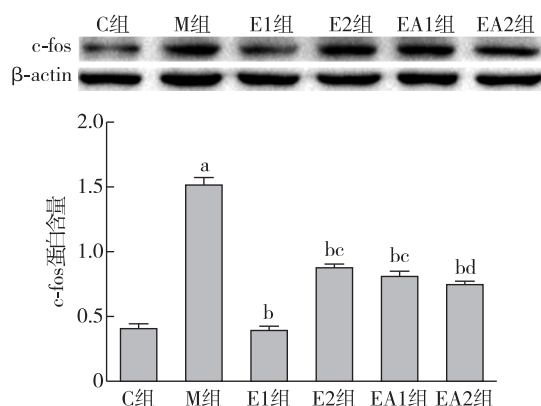
组别	只数	ACTH(pg/ml)	Cor(ng/ml)
C 组	10	39.09±3.33	80.75±4.52
M 组	10	84.64±4.33 ^a	146.96±5.33 ^a
E1 组	10	24.69±3.32 ^b	47.79±5.21 ^b
E2 组	10	66.18±3.59 ^{bc}	85.83±4.10 ^{bc}
EA1 组	10	66.29±2.98 ^{bc}	85.28±3.36 ^{bc}
EA2 组	10	58.02±4.17 ^{bd}	82.02±3.44 ^b

注: 与 C 组比较, ^aP<0.05; 与 M 组比较, ^bP<0.05; 与 E1 组比较, ^cP<0.05; 与 E2 组比较, ^dP<0.05

下丘脑 c-fos 蛋白含量 M 组 c-fos 蛋白含量明显高于 C 组(P<0.05); E1 组、E2 组、EA1 组、EA2 组 c-fos 蛋白含量明显低于 M 组(P<0.05); E2 组、EA1 组 c-fos 蛋白含量明显高于 E1 组(P<0.05); EA2 组 c-fos 蛋白含量明显低于 E2 组(P<0.05)(图 1)。

讨 论

全凭静脉麻醉中麻醉药物对围术期应激反应有一定影响。依托咪酯为非巴比妥类静脉镇静药, 因具有较好的血流动力学稳定性而应用于麻醉诱导^[7]。但有研究表明其对肾上腺皮质功能有抑制作用, 因此用于麻醉维持应相对谨慎^[8]。临床上依托咪酯的常用剂量为 0.15~0.3 mg/kg, 为达到同等药效, 腹腔注射剂量应为静脉注射剂量的 2 倍, 而大鼠剂量为人类剂量的 25~50 倍。根据 Sukhotinsky



注:与 C 组比较,^a $P < 0.05$;与 M 组比较,^b $P < 0.05$;与 E1 组比较,^c $P < 0.05$;与 E2 组比较,^d $P < 0.05$

图 1 六组大鼠下丘脑 c-fos 蛋白含量的比较

等^[9]的方法,对麻醉状态进行评估,结果表明腹腔注射依托咪酯 30 mg/kg 能使大鼠对断尾应激无反应,达到适度的麻醉状态;腹腔注射依托咪酯 60 mg/kg 能使大鼠处于深麻醉状态。本实验结果显示,与模型组比较,在实施依托咪酯干预后,各组血清激素水平和 c-fos 蛋白含量均降低,表明急性应激反应得到不同程度的抑制,麻醉剂量与麻醉状态呈剂量依赖性。与依托咪酯 30 mg/kg 组比较,依托咪酯 60 mg/kg 组血清激素和 c-fos 蛋白水平进一步降低,且 ACTH、Cor 浓度低于正常水平,表明依托咪酯 60 mg/kg 组给药后机体处于过度应激状态,且出现了肾上腺皮质功能抑制,呈剂量相关性。

针刺足三里穴在预防应激性疾病中具有重要作用,因此本实验选择该穴位^[10]。电针可通过调节 c-fos 蛋白含量参与疼痛刺激的缓解^[11]。采用 Western blot 法对下丘脑 c-fos 蛋白的表达进行分析,结果显示与依托咪酯 30 mg/kg 组比较,依托咪酯 30 mg/kg 复合电针组 c-fos 蛋白含量降低,ACTH 浓度降低,表明电针足三里穴通过调节下丘脑 c-fos 蛋白水平避免应激损伤,但 Cor 浓度并未进一步降低。这可能与电针可促进下丘脑 11-β-羟化酶的表达,使无活性的 11-β 脱氢皮质酮转化为有活性的皮质酮,从而提高皮质酮浓度密切相关^[12]。与依托咪酯 60 mg/kg 组比较,依托咪酯 60 mg/kg 复合电针组 c-fos 蛋白含量和 ACTH、Cor 浓度明显升高,提示电针足三里穴可提升机体应激的保护作用。电针本身作为一种疼痛刺激,应该使下丘脑 c-fos 蛋白表达进一步增加,但是本实验显示电针足三里穴对 c-fos 蛋白具有双向调节作用。当机体处于应激亢进时予以电针治疗,下丘脑 c-fos 蛋白含量

降低;当机体处于应激过度抑制时予以电针治疗,下丘脑 c-fos 蛋白含量升高。这就提示电针双向调控应激反应的作用可能与其调节下丘脑 c-fos 蛋白水平有关。

综上所述,电针足三里穴可提升大剂量依托咪酯麻醉后的机体的低应激水平状态,减轻小剂量依托咪酯麻醉后的高应激水平状态。电针足三里穴可能通过调节下丘脑 c-fos 蛋白水平,双向调节依托咪酯对急性应激反应的影响,但具体机制还有待于进一步研究。

参考文献

- [1] Lebowitz P, Cohen S, Weisberg S, et al. 在电休克治疗中重复间歇使用依托咪酯不会造成持久的肾上腺皮质功能抑制. 临床麻醉学杂志, 2013, 29(6): 622-624.
- [2] 樊文朝, 马文, 赵创, 等. 针药复合麻醉中不同频率电针对肺切除患者免疫功能的影响. 中国针灸, 2012, 32(8): 715-719.
- [3] Xu B, Descalzi G, Ye HR, et al. Translational investigation and treatment of neuropathic pain. Mol Pain, 2012, 8: 15.
- [4] 胡越, 熊威威, 谭毅, 等. 不同急性应激反应大鼠模型的比较. 中国比较医学杂志, 2016, 26(12): 51-54.
- [5] Han JS. Acupuncture analgesia: areas of consensus and controversy. Pain, 2011, 152(3 Suppl): S41-S48.
- [6] Eshkevari L, Permaul E, Mulrone SE. Acupuncture blocks cold stress-induced increases in the hypothalamus-pituitary-adrenal axis in the rat. J Endocrinol, 2013, 217(1): 95-104.
- [7] Forman SA. Clinical and molecular pharmacology of etomidate. Anesthesiology, 2011, 114(3): 695-707.
- [8] Qin B, Hu H, Cao B, et al. Effects of continuous infusion of etomidate at various dose rates on adrenal function in dogs. BMC Anesthesiol, 2016, 16: 2.
- [9] Sukhotinsky I, Zalkind V, Lu J, et al. Neural pathways associated with loss of consciousness caused by intracerebral microinjection of GABA A-active anesthetics. Eur J Neurosci, 2007, 25(5): 1417-1436.
- [10] Zhao Z, Lee BH, Lin F, et al. Effects of acupuncture at Zu-San-Li (ST36) on the activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis during ethanol withdrawal in rats. J Acupunct Meridian Stud, 2014, 7(5): 225-230.
- [11] Tobaldini G, Aisengart B, Lima MM, et al. Ascending nociceptive control contributes to the antinociceptive effect of acupuncture in a rat model of acute pain. J Pain, 2014, 15(4): 422-434.
- [12] 万顺伦, 尹岭. 电针足三里穴对大鼠海马 11-β-羟基类固醇脱氢酶 1 表达的影响. 中华物理医学与康复杂志, 2009, 31(3): 159-162.

(收稿日期: 2016-09-19)