

· 实验研究 ·

不同波形电针预处理对大鼠脓毒症脑损伤的影响

陈烨 雷宇 莫利群 李俊 魏继承 周军

【摘要】 目的 观察不同波形电针预处理对大鼠脓毒症脑损伤的影响。**方法** 成年雄性 SD 大鼠 80 只, 3 月龄, 体重 200~220 g, 随机分为五组: 假手术组 (Sham 组)、盲肠结扎穿孔组 (CLP 组)、连续波组 (CW 组)、疏密波组 (DW 组) 及间断波组 (IW 组), 每组 16 只。采用盲肠结扎穿孔 (CLP) 术制备脓毒症模型。观察大鼠脑水肿、额叶皮质病理结构 (HE 染色)、凋亡 (TUNEL 染色) 及 TLR4 表达变化 (免疫组织化学染色); 测定血清、额叶皮质肿瘤坏死因子 (TNF)- α 、白细胞介素 (IL)-6、丙二醛 (MDA) 浓度和超氧化物歧化酶 (SOD) 活性。**结果** 与 Sham 组比较, CLP 组、CW 组、DW 组及 IW 组出现脑水肿、脑损伤及神经元凋亡明显加重 ($P < 0.05$); 血清及额叶皮质 TNF- α 、IL-6 及 MDA 浓度明显升高, SOD 活性明显降低 ($P < 0.05$); TLR4 表达明显增加 ($P < 0.05$)。与 CLP 组比较, CW 组、DW 组及 IW 组脑水肿、脑损伤及神经元凋亡明显减轻 ($P < 0.05$); 血清及额叶皮质 TNF- α 、IL-6 及 MDA 浓度明显下降, SOD 活性明显升高 ($P < 0.05$); TLR4 表达量明显降低 ($P < 0.05$)。电针组之间比较, DW 组改善作用最明显, IW 组次之, CW 组较差 ($P < 0.05$)。**结论** 不同波形电针能减轻大鼠脓毒症脑损伤且疏密波最佳, 可能与抑制炎症、氧化应激及神经元凋亡有关。

【关键词】 脓毒症; 电针; 波形; 脑损伤; 炎症反应

Effect of electroacupuncture pretreatment with different waveforms on septic brain injury in rats

CHEN Ye, LEI Yu, MO Liqun, LI Jun, WEI Jicheng, ZHOU Jun. Department of Anesthesiology, The Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, China

Corresponding author: ZHOU Jun, Email: zhoujun800615@163.com

【Abstract】 Objective To observe the effects of three pretreatments of electroacupuncture with different waveforms for septic brain injury in rats, and to explore the optimal waveform. **Methods** Eighty male Sprague-Dawley rats were divided randomly into five groups ($n = 16$): sham group, cecal ligation and puncture group (group CLP), continuous wave group (group CW), dilatational wave group (group DW) and intermittent wave group (group IW). A rat sepsis model was prepared by cecal ligation and puncture. Brain water content was detected. Tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-6, malondialdehyde (MDA) and superoxide dismutase (SOD) in serum and frontal cortex were detected 48 h after sham or CLP operation. Pathological changes of frontal cortex, expression of Toll-like receptor-4 (TLR4), and apoptosis of nerve cells were observed by hematoxylin and eosin staining (H&E), immunohistochemistry and TUNEL assay, respectively. **Results** Compared with the sham group, encephaledema, as well as brain injury and neuron apoptosis increased in group CLP ($P < 0.05$). Concentrations of tumor necrosis factor- α , interleukin-6, and malondialdehyde in serum and frontal cortex significantly increased, and the activities of superoxide dismutase significantly decreased ($P < 0.05$). The expression of TLR4 significantly increased ($P < 0.05$). Compared with group CLP, the aforementioned indicators in the continuous, dilatational, and intermittent wave groups significantly improved ($P < 0.05$). Compared among the electroacupunctured groups, the effect of dilatational wave was the most significant, followed by intermittent wave, and continuous wave was the least one ($P < 0.05$). **Conclusion** EA pretreatment with different waveforms at Baihui and Tsusanli acupoints could reduce the septic brain injury, and DW might be the best one. The mechanism might be related with the inhibition of inflammation and oxidative stress response and the decrease in nerve cell apoptosis.

【Key words】 Sepsis; Electroacupuncture; Waveform; Brain injury; Inflammation

基金项目: 国家自然科学基金 (81301055); 西南医科大学科研课题 (20130422)

作者单位: 646000 四川省泸州市, 西南医科大学附属医院中医科 (陈烨、李俊), 麻醉科 (雷宇、莫利群、魏继承、周军)

通信作者: 周军, Email: zhoujun800615@163.com

脓毒症常引发全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS), 诱发多器官衰竭, 最终导致死亡^[1~3]。脓毒症所致脑损伤是影响脓毒症患者疾病发展和预后的重要因素, 患者死亡率与脓毒症脑损伤的严重程度呈正相关^[2]。研究表明, 电针具有脑保护作用^[4~6], 对脓毒症也有治疗作用^[7,8]。电针参数是影响和改变电针效应及其机制的重要因素, 包括电针仪输出脉冲的波形、频率和强度等。不同的电针参数所产生的效应以及其机制都可能不同^[9]。目前, 电针对脓毒症脑损伤治疗作用的研究极少, 尚不清楚不同波形电针脑保护作用是否有差异。为此, 本研究拟观察不同波形电针预处理对脓毒症脑损伤的影响, 并探讨其相关机制, 为临床上预防及治疗脓毒症脑损伤提供新的思路和方法。

材料与方法

主要试剂及仪器 TUNEL 凋亡检测试剂盒(批号: 11684817910); 大鼠 MDA(批号: A003-1)、SOD 试剂盒(批号: A001-4); 大鼠 TNF- α (批号: E10J0403)及 IL-6 试剂盒(批号: E10J105); TLR4 抗体(批号: 76B357); 二抗生物素标记羊抗兔(批号: bs-1021R)。紫外可见分光光度计(型号: UV751GD), 酶标仪(型号: Sunrise), 数码相机 Viewfinder 4.0 图像采集系统(型号: DP70)。

实验动物与分组 成年雄性 SD 大鼠 80 只, 3 月龄, 体重 200~220 g, 随机分为五组: 假手术组(Sham 组)、盲肠结扎穿孔组(CLP 组)、连续波组(CW 组)、疏密波组(DW 组)和间断波组(IW 组), 每组 16 只。

电针操作 参照文献^[10], 用无菌针灸针刺“百会”及“足三里”穴, 进针深度 2~4 mm, 接电针治疗仪进行电刺激 30 min。电针刺激波形参数选择: 电流强度固定为 2 mA, 频率根据波形而定, 为 2~15 Hz。CW 组为 2 mA+2 Hz, IW 组为 2 mA+2/0 Hz, DW 组为 2 mA+2/15 Hz。电针刺激后, 开始建立大鼠 CLP 模型或假手术操作。

动物模型制备 参照文献^[11]的方法制备盲肠结扎穿孔(cecal ligation and puncture, CLP)脓毒症模型。大鼠术前禁食 12 h, 自由饮水。腹腔注射 1%戊巴比妥钠(0.4 ml/100 g)麻醉大鼠, 下腹部正中 2 cm 切口, CLP 组轻轻暴露盲肠并在 50%处用 0 号慕丝线环形结扎, 用 18 号针头穿刺两个孔, 向腹腔内挤出粪便少许, 将盲肠还纳腹腔, 然后逐层

关腹。术后皮下注射生理盐水 3 ml/100 g 进行补液复苏。Sham 组只轻轻暴露盲肠, 不穿刺, CW 组、DW 组及 IW 组实施相应波形的电针刺激, 其余操作同 CLP 组。

标本采集 于术后 48 h, 每组取 8 只大鼠, 深麻醉后, 经心尖取血 5 ml, 通过心脏灌注预冷的肝素化生理盐水 200 ml 和 4%多聚甲醛 400 ml, 取出脑组织, 置于 4%多聚甲醛后固定液中, 用于免疫组织化学及 TUNEL 等形态学指标观察。每组另外取 8 只大鼠, 经心脏灌注肝素化生理盐水 200 ml, 开颅取出新鲜脑组织, 取左半球用于测定脑水肿, 剩余液氮速冻后于 -80℃保存, 用于氧化应激及炎症因子等检测。

脑水肿测定 取出脑组织, 迅速吸尽表面水分, 称取湿重后放入 105℃恒温烤箱中烘烤 48 h 后称取干重, 计算脑组织含水量: 含水量(%)=(湿重-干重)/湿重 $\times 100\%$ ^[11]。

脑形态学观察 取出多聚甲醛固定的脑组织, 制备 5 μm 厚的石蜡切片, HE 染色, 光学显微镜(Olympus 公司, 日本)下观察额叶皮质的病理结构并拍照, 并行正常神经细胞计数^[13]。

IL-6 及 TNF- α 浓度检测 采用双抗体夹心 ELISA 法, 严格按试剂盒说明书操作测定。所得样本用酶标仪 450 nm 波长测量各孔的吸光值(OD 值), 计算出对应的样品浓度。实验重复 3 次。

免疫组织化学检测 上述制备的石蜡组织切片, 经抗原修复后, 用牛蛋白血清封闭 30 min, 然后加入 TLR4 一抗(1:1 000), 37℃避光孵育 1 h 后静置于 4℃冰箱过夜, PBS 液洗 5 min $\times 3$ 次, 然后滴加二抗: 羊抗兔 IgG, 室温孵育 40 min, 再用 PBS 液洗 5 min $\times 3$ 次, 加入辣根酶标记链霉卵白素, 室温孵育 30 min, PBS 液洗 5 min $\times 3$ 次。经 DAB 显色、封片后, 用 OLYMPUS DP70 数码相机 Viewfinder 4.0 图像采集系统采图, Image pro plus 6.0 软件对图像进行分析。每张切片于同一部位采图观察, 随机选择 5 个高倍视野($\times 400$)计算阳性细胞数^[11]。

MDA 含量和 SOD 活性的测定 参考文献^[10], 取血 5 ml, 以 3 000 r/min 离心 12 min, 取上清液; 另制作同一部位脑额叶皮质组织匀浆, 离心后提取上清液。采用硫代巴比妥酸法测定 MDA 含量, 黄嘌呤氧化酶法测定 SOD 活性, 具体操作步骤参照说明书。实验重复 3 次。

神经元凋亡检测 取上述制作的石蜡切片, 常规脱蜡至水, PBS 液漂洗 5 min $\times 2$ 次, 加入蛋白酶 K 工作液, 室温下反应 30 min, PBS 液漂洗 5 min $\times$

2 次,室温封闭液中封闭 10 min,PBS 液漂洗 5 min $\times$ 2 次,用滤纸吸干,切片加 TUNEL 反应混合溶液 50 μ l,室温避光孵育 1 h,PBS 液漂洗 5 min $\times$ 3 次,用滤纸吸干,切片加入转化剂 50 μ l,室温避光孵育 30 min,PBS 液漂洗 5 min $\times$ 3 次,加入 100 μ l DAB 底物溶液,室温孵育 10 min,PBS 液漂洗 5 min $\times$ 3 次。经苏木精复染、封片后,光镜下随机选取额叶皮质 5 个不重叠的视野拍片($\times 400$),测定凋亡阳性细胞数。凋亡指数=(TUNEL 阳性细胞数/细胞总数) $\times 100\%$ ^[11]。

统计分析 采用 SPSS 17.0 统计软件分析。正态分布计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 SNK 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

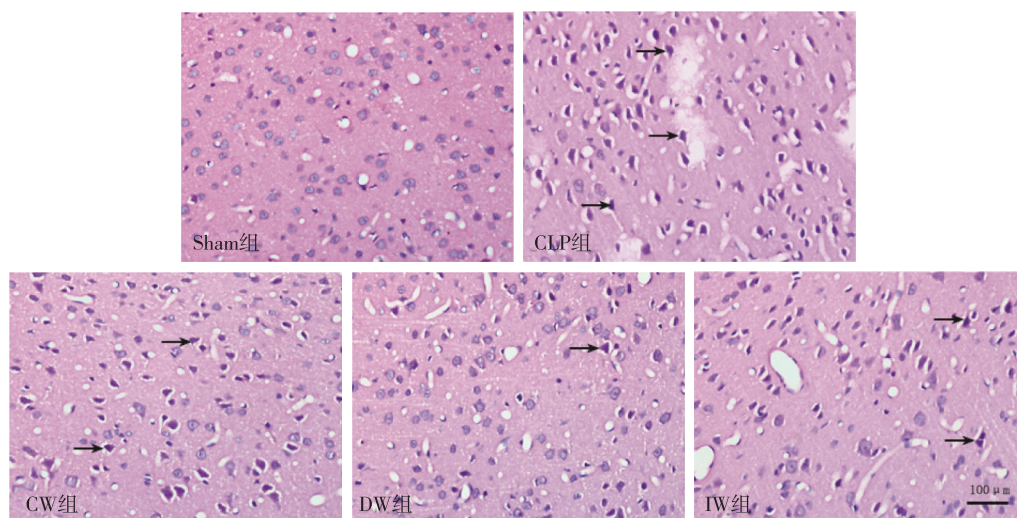
结 果

光镜下见 Sham 组大鼠脑额叶皮质层次结构清晰,神经元排列致密,胞核无固缩、变形。CLP 组脑组织损伤明显,神经细胞形态不规则,胞核固化、深

染、溶解或消失,胞浆嗜酸性变;CW 组、DW 组及 IW 组损伤较轻,大部分神经元结构基本正常,少数神经元胞核固缩(图 1)。

与 Sham 组比较,CLP 组、CW 组、DW 组及 IW 组正常神经元计数明显下降,凋亡指数、脑含水量及 TLR4 阳性细胞数明显增加($P<0.05$);与 CLP 组比较,CW 组、DW 组及 IW 组正常神经元计数明显增加,凋亡指数、脑含水量及 TLR4 阳性细胞数明显下降($P<0.05$)(表 1)。

与 Sham 组比较,CLP 组、CW 组、DW 组及 IW 组血浆及额叶皮质 TNF- α 、IL-6 及 MDA 浓度明显增加,SOD 活性明显降低($P<0.05$);与 CLP 组比较,CW 组、DW 组及 IW 组血浆及皮质 TNF- α 、IL-6 及 MDA 浓度明显降低,SOD 活性明显升高($P<0.05$);与 CW 组比较,DW 组、IW 组 TNF- α 、IL-6 及 MDA 浓度明显下降,SOD 活性明显升高($P<0.05$);与 IW 组比较,DW 组 TNF- α 、IL-6 及 MDA 浓度明显下降,SOD 活性明显升高($P<0.05$)(表 2,3)。



注:箭头示损伤细胞

图 1 五组大鼠脑额叶皮层组织 HE 染色图($\times 400$)

表 1 五组大鼠神经元、凋亡指数、含水量和 TLR4 阳性细胞数的比较($\bar{x}\pm s$)

组别	只数	正常神经元(个/ mm^2)	凋亡指数(%)	脑含水量(%)	TLR4 阳性细胞数(个/ mm^2)
Sham 组	8	509.9 $\pm$ 50.2	1.6 $\pm$ 1.1	74.4 $\pm$ 1.3	56.8 $\pm$ 7.1
CLP 组	8	223.8 $\pm$ 14.4 ^a	72.2 $\pm$ 7.1 ^a	85.2 $\pm$ 2.2 ^a	233.0 $\pm$ 13.1 ^a
CW 组	8	277.5 $\pm$ 59.7 ^{ab}	55.4 $\pm$ 5.7 ^{ab}	82.4 $\pm$ 1.7 ^{ab}	155.6 $\pm$ 10.2 ^{ab}
DW 组	8	395.0 $\pm$ 39.6 ^{abc}	19.5 $\pm$ 5.5 ^{abc}	77.5 $\pm$ 1.5 ^{abc}	93.4 $\pm$ 5.6 ^{abc}
IW 组	8	331.3 $\pm$ 49.2 ^{abcd}	41.9 $\pm$ 9.1 ^{abcd}	80.1 $\pm$ 1.1 ^{abcd}	122.0 $\pm$ 9.8 ^{abcd}

注:与 Sham 组比较,^a $P<0.05$;与 CLP 组比较,^b $P<0.05$;与 CW 组比较,^c $P<0.05$;与 DW 组比较,^d $P<0.05$

表 2 五组大鼠血浆 TNF- α 、IL-6、MDA 浓度和 SOD 活性的比较 (pg/ml, $\bar{x} \pm s$)

组别	只数	TNF- α	IL-6	MDA	SOD
Sham 组	8	58.53 $\pm$ 22.07	38.98 $\pm$ 8.83	9.75 $\pm$ 5.70	545.68 $\pm$ 31.09
CLP 组	8	187.59 $\pm$ 19.70 ^a	135.41 $\pm$ 12.20 ^a	53.72 $\pm$ 8.15 ^a	167.77 $\pm$ 45.90 ^a
CW 组	8	153.43 $\pm$ 13.59 ^{ab}	109.66 $\pm$ 9.94 ^{ab}	42.61 $\pm$ 7.49 ^{ab}	214.59 $\pm$ 34.00 ^{ab}
DW 组	8	97.06 $\pm$ 13.62 ^{abc}	74.20 $\pm$ 11.32 ^{abc}	15.89 $\pm$ 3.99 ^{abc}	480.24 $\pm$ 46.50 ^{abc}
IW 组	8	128.16 $\pm$ 12.26 ^{abcd}	91.37 $\pm$ 7.64 ^{abcd}	25.79 $\pm$ 5.38 ^{abcd}	315.82 $\pm$ 54.35 ^{abcd}

注:与 Sham 组比较,^a $P < 0.05$;与 CLP 组比较,^b $P < 0.05$;与 CW 组比较,^c $P < 0.05$;与 DW 组比较,^d $P < 0.05$

表 3 五组大鼠皮质 TNF- α 、IL-6、MDA 浓度和 SOD 活性的比较 (pg/mg, $\bar{x} \pm s$)

组别	只数	TNF- α	IL-6	MDA	SOD
Sham 组	8	83.37 $\pm$ 13.87	75.31 $\pm$ 11.80	10.31 $\pm$ 1.47	151.35 $\pm$ 21.07
CLP 组	8	317.55 $\pm$ 23.08 ^a	244.09 $\pm$ 16.74 ^a	57.25 $\pm$ 7.14 ^a	51.23 $\pm$ 12.42 ^a
CW 组	8	269.38 $\pm$ 18.35 ^{ab}	176.57 $\pm$ 13.81 ^{ab}	36.78 $\pm$ 3.75 ^{ab}	69.56 $\pm$ 13.91 ^{ab}
DW 组	8	131.29 $\pm$ 13.69 ^{abc}	83.21 $\pm$ 7.42 ^{abc}	18.32 $\pm$ 2.67 ^{abc}	121.58 $\pm$ 18.03 ^{abc}
IW 组	8	191.30 $\pm$ 22.42 ^{abcd}	119.20 $\pm$ 9.87 ^{abcd}	28.23 $\pm$ 6.38 ^{abcd}	97.45 $\pm$ 12.52 ^{abcd}

注:与 Sham 组比较,^a $P < 0.05$;与 CLP 组比较,^b $P < 0.05$;与 CW 组比较,^c $P < 0.05$;与 DW 组比较,^d $P < 0.05$

讨 论

本研究成功复制了 CLP 模型,光镜下可见 CLP 组脑额叶皮质组织结构不清,神经细胞体积缩小,核固缩深染,提示脑组织损伤严重,脓毒症脑损伤模型制备成功^[11]。不同波形电针预处理能改善上述异常变化,这表明电针可能对脓毒症导致的脑损伤有一定的临床治疗价值。

研究证实电针预处理可减轻非脓毒症导致的神经元损伤,具有脑保护作用^[4,5,12]。不同的电针刺激参数(波形、频率、电流强度等)对疗效有较大影响,会产生不同的效应^[9,13]。以往关于电针脑保护效应的研究,电针波形的选择多以疏密波为主^[5,6,11],也有选用连续波^[14],而间断波较少。本实验结果显示,不同波形电针预处理对 CLP 模型大鼠脓毒症所致脑损伤具有保护作用,DW 组作用明显优于 IW 组,IW 组又优于 CW 组。其具体原因尚不清楚,推测可能与以下因素有关:连续波容易使刺激对象对刺激产生耐受;间断波属非连续刺激,存在刺激量不足的可能;而疏密波不易被机体所适

应,能通过低、中、高频的变换,刺激不同种类的神经化学物质释放,通过不同途径在不同靶点产生神经保护作用。

脓毒症脑损伤发生机制复杂,研究表明炎症介质在脓毒症脑病的病理改变过程中起着关键性作用^[1,2]。本研究结果显示,脓毒症大鼠血清、皮质 TNF- α 、IL-6 浓度明显增加,同时皮质 TLR4 表达增加,提示炎症细胞因子在脓毒症所致脑损伤的发生、发展中可能起重要作用。三种波形电针组大鼠血清、皮质 TNF- α 和 IL-6 浓度,TLR4 表达降低,提示电针预处理的脑保护作用可能与抑制炎症反应有关。此外,炎症因子可诱发机体产生大量氧自由基,促使神经细胞凋亡,加重脑损伤。本研究显示,所有波形电针预处理在明显抑制细胞凋亡、减轻脑损伤的同时,也使血清、大脑 MDA 浓度降低、SOD 活性增强,提示电针预处理脑保护作用可能也与抑制氧化应激反应、降低神经细胞凋亡相关,与既往研究结果一致^[11]。

综上所述,不同波形电针预处理刺激“百会”及“足三里”穴,都能减轻大鼠脓毒症脑损伤,具有脑

保护作用;DW 作用最明显,IW 作用次之,CW 较差。机制可能与抑制炎症和氧化应激反应,减轻神经细胞的凋亡有关。

参 考 文 献

- [1] Gofton TE, Young GB. Sepsis-associated encephalopathy. *Nat Rev Neurol*, 2012, 8(10): 557-566.
- [2] 唐会, 罗丹, 纪木火, 等. 脓毒症相关性脑病的研究进展. *临床麻醉学杂志*, 2016, 32(7): 717-720.
- [3] 刘玲玲, 谢克亮, 陈红光, 等. 吸入氢气对脓毒症小鼠脑损伤的影响. *中华麻醉学杂志*, 2014, 34(8): 982-985.
- [4] Wang F, Zhong H, Li X, et al. Electroacupuncture attenuates reference memory impairment associated with astrocytic NDRG2 suppression in APP/PS1 transgenic mice. *Mol Neurobiol*, 2014, 50(2): 305-313.
- [5] Fan XW, Chen F, Chen Y, et al. Electroacupuncture prevents cognitive impairments by regulating the early changes after brain irradiation in rats. *PLoS One*, 2015, 10(4): e0122087.
- [6] 杨欢, 郑小兰, 徐国海, 等. 电针刺激对糖尿病患者术后认知功能及血清炎症因子的影响. *临床麻醉学杂志*, 2015, 31(11): 1073-1076.
- [7] Torres-Rosas R, Yehia G, Pena G, et al. Dopamine mediates vagal modulation of the immune system by electroacupuncture. *Nat Med*, 2014, 20(3): 291-295.
- [8] Song JG, Li HH, Cao YF, et al. Electroacupuncture improves survival in rats with lethal endotoxemia via the autonomic nervous system. *Anesthesiology*, 2012, 116(2): 406-414.
- [9] 朱丹, 白洁静, 张晓庆, 等. 电针参数定量化的研究进展. *中国针灸*, 2015, 35(5): 525-528.
- [10] Chen Y, Zhou J, Li J, et al. Electroacupuncture pretreatment prevents cognitive impairment induced by limb ischemia-reperfusion via inhibition of microglial activation and attenuation of oxidative stress in rats. *Brain Res*, 2012, 1432: 36-45.
- [11] Zhou J, Chen Y, Huang GQ, et al. Hydrogen-rich saline reverses oxidative stress, cognitive impairment, and mortality in rats submitted to sepsis by cecal ligation and puncture. *J Surg Res*, 2012, 178(1): 390-400.
- [12] Tao J, Zheng Y, Liu W, et al. Electroacupuncture at LI11 and ST36 acupoints exerts neuroprotective effects via reactive astrocyte proliferation after ischemia and reperfusion injury in rats. *Brain Res Bull*, 2016, 120: 14-24.
- [13] Xiang XH, Chen YM, Zhang JM, et al. Low- and high-frequency transcutaneous electrical acupoint stimulation induces different effects on cerebral mu-opioid receptor availability in rhesus monkeys. *J Neurosci Res*, 2014, 92(5): 555-563.
- [14] 邵瑛, 赖新生, 宫育卓, 等. 电针对血管性痴呆大鼠血浆和脑组织生长抑素、 β -内啡肽含量及学习记忆能力的影响. *针刺研究*, 2008, 33(2): 98-102.

(收稿日期:2016-12-13)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

《临床麻醉学杂志》关于学术不端行为的声明

为维护学术期刊的严肃性和科学性,并向广大读者负责,本刊编辑部重申坚决反对抄袭、剽窃、一稿两投、一稿两用等学术不端行为,一经查实,本刊将采取以下措施:(1)稿件刊出前所有作者须在校样首页亲笔签名,并加盖公章;稿件文责自负。(2)投稿后3个月内未收到稿件处理意见,稿件可能仍在审阅中;作者欲投他刊,请先与编辑部联系撤稿,切勿一稿两投。(3)来稿如有学术不端行为嫌疑时,编辑部在认真收集有关资料和仔细核对后将通知第一作者,作者须对此作出解释。(4)如稿件被证实系一稿两用,本刊将在杂志和网站上刊登撤销该文的声明,并向作者所在单位通报;2年内拒绝发表该作者的任何来稿。