

渗出等^[6],加快血流速度,缩小血管内皮间隙,减轻血管出血异常,提示 He-Ne 激光照射矿物质水能影响机体微循环功能,但其确切作用机制还有待进一步探讨。

参 考 文 献

- [1] 邱红方. 超低频磁场的生物效应和临床应用. 中华物理医学与康复杂志, 2002, 24: 247-249.
- [2] 田牛, 刘育英, 李向红, 等. 微循环的临床与基础. 北京: 原子能出版社, 1996: 122-142.
- [3] 邱冠英, 彭银祥. 生物物理学. 武汉: 武汉大学出版社, 2000: 228-

230.

- [4] 王长振, 吴可, 丛建波. 电磁辐射的生物学效应及生物医学应用. 中华物理医学与康复杂志, 2003, 25: 49-50.
- [5] 赵南明, 周海梦. 生物物理学. 北京: 高等教育出版社, 2000: 170-176.
- [6] 刘育英, 越秀梅. 不同刺激因素引起血管内白细胞黏附的研究. 中国应用生理学杂志, 2001, 7: 296-298.

(收稿日期: 2007-02-12)

(本文编辑: 易 浩)

电刺激足三里穴对肠缺血再灌注损伤的治疗作用

宋铁山 王欣 楼新法

肠道的缺血再灌注损伤普遍存在于创伤、休克、肠梗阻以及器官移植手术中, 目前认为其损伤机理与超氧自由基的大量产生有重要关系^[1]。早期采用有效措施对减轻肠损伤有重要意义。在临床上, 电针对肠缺血再灌注损伤的恢复的确有疗效, 但对其治疗作用机制的报道较少。为此, 本实验应用还原型尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸脱氢酶 (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-diaphorase, NADPH-d) 组织化学方法和生化检测技术, 分别检测并分析大鼠肠肌间神经丛一氧化氮合酶 (nitric oxide synthase, NOS) 阳性神经元数目和肠组织一氧化氮 (nitric oxide, NO) 含量及 NOS 活性的变化, 试图从一个侧面为探讨电针治疗肠缺血再灌注损伤的作用机制提供新的思路。

材料与方 法

一、实验动物及分组

健康 Wistar 大鼠 32 只, 体重 200 ~ 250 g, 雌雄不拘, 随机分为正常组、假手术组、缺血再灌注组 (模型组) 和针刺足三里穴组 (电针组), 每组 8 只。所有动物均在通风良好的条件下分笼喂养, 自由摄食和饮水。

二、主要实验试剂与仪器

尼可酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (β -NADPH)、氯化硝基四氮唑蓝 (nitro blue tetrazolium, NBT) 均购于美国 Sigma 公司。G6805-1 型电针治疗仪购于上海医疗仪器六厂。

三、实验模型的制作方法

模型组与电针组参照 Heithan 等^[2]的方法制作肠道缺血再灌注损伤动物模型: 用无损伤动脉夹夹闭肠系膜上动脉起始部, 阻断肠系膜血流 30 min 后, 松开动脉夹恢复肠系膜血流, 实现肠缺血-再灌注。假手术组只行开腹手术而不关闭肠系膜上动脉。

四、电刺激穴位治疗方法

电针组于造模 2 h 后用 G6805-1 型电针治疗仪进行治疗, 选双侧足三里穴, 采用疏密波, 频率为 40 Hz, 刺激强度为 1 ~

2 mA, 以双侧上肢微微颤动为度。足三里穴的定位依据华兴邦^[3]制定的实验动物穴位图谱。治疗每日 1 次, 每次 30 min, 连续治疗 3 d。其余各组不予治疗, 常规喂养。

五、检测方法

1. NO 含量及 NOS 活性的测定: 治疗 3 d 后, 各组分别取 4 只大鼠在戊巴比妥钠腹腔注射麻醉下开腹, 立即取出回肠, 置于冷生理盐水中冲洗, 滤纸拭干。用分析天平称取 0.2 g 肠组织, 放入 5 ml 小烧杯中, 用刻度吸管加入生理盐水, 制成 10% 的组织匀浆, 常温下以 3 500 转/min 离心 15 min, 吸取上清液。采用硝酸还原酶法测定 NO 含量, 采用紫外线分光光度法测定 NOS 活性。

2. 组织化学标本制备: 治疗 3 d 后, 各组剩余的大鼠在戊巴比妥钠腹腔注射麻醉下开胸, 用 300 ml 生理盐水快速灌注冲洗麻醉大鼠左心室, 再用 4% 多聚甲醛 300 ml 进行灌注固定, 固定完毕立即切取距回盲瓣 2 cm 的小肠, 置于冷生理盐水中冲洗, 然后于 4% 多聚甲醛中固定 2 h。按 Costa 等^[4]的方法稍作改进制备肠肌层和黏膜下层的分层铺片标本。

3. NADPH-d 组织化学方法: 参照文献^[5]介绍的方法, 将制备好的标本移入反应液内, 反应液用 0.1 mol/L 的 PBS (pH 值 8.0) 配制, 内含 3 g/L 的 Triton X-100、0.1 g/L 的 NADPH、0.5 g/L 的硝基四氮唑蓝。1 h 后用 0.01 mol/L PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min。常规贴片、脱水、透明, Olympus 显微镜下观察和摄像。

4. 肠肌间神经丛 NOS 阳性神经元的观察: 在光镜下定性观察 NOS 阳性神经元胞体及其染色程度, 计数阳性神经元, 计算每平方毫米 NOS 阳性神经元数。应用 ZL-2000 型细胞分析系统进行染色深度分析, 染色深度用吸光度值表示: 吸光度值 = $\log$ 空白灰度值/标本灰度值。吸光值越大, 表示 NADPH-d 染色越深。

六、统计学分析

数据用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 SPSS 10.0 版统计学软件包进行数据处理, 成组设计的两样本均数比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

结 果

一、肠组织 NO 含量及 NOS 活性的变化

正常组大鼠肠组织 NO 含量及 NOS 活性与假手术组相比,差异无统计学意义 ($P > 0.05$);模型组与正常组、假手术组相比,NO 含量及 NOS 活性明显提高,差异有统计学意义 ($P < 0.01$);电针组与模型组相比,NO 含量及 NOS 活性明显减低,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 电针治疗对大鼠肠组织 NO 含量及 NOS 活性的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组 别	n	NO ($\mu\text{mol}/\text{mg}$)	NOS (U/mg)
正常组	4	0.62 ± 0.11	0.043 ± 0.009
假手术组	4	0.67 ± 0.12	0.047 ± 0.010
模型组	4	1.72 ± 0.23^a	0.138 ± 0.014^a
电针组	4	0.58 ± 0.11^b	0.044 ± 0.009^b

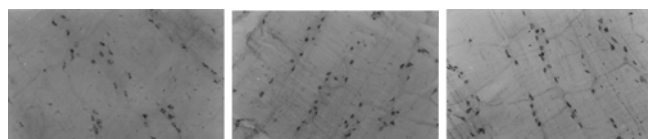
注:与正常组、假手术组比较, $^a P < 0.01$;与模型组比较, $^b P < 0.01$

二、肠肌间神经丛 NOS 阳性神经元数目的变化

正常组大鼠肠肌间神经丛 NOS 阳性神经元数与假手术组相比,差异无统计学意义 ($P > 0.05$);模型组与正常组、假手术组相比,NOS 阳性神经元数明显增加,差异有统计学意义 ($P < 0.01$);电针组与模型组相比,NOS 阳性神经元数明显减少,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。见表 2。

三、肠肌间神经丛 NOS 表达的变化

在光镜下,模型组 NOS 阳性细胞为神经细胞,突起明显,散在分布,呈三角形或椭圆形,胞核与胞浆模糊不清,多染成深蓝色;电针组 NOS 阳性神经元胞浆染色变浅,胞核与胞浆分界清楚(图 1)。模型组与正常组、假手术组相比,NOS 吸光度值明显增高,差异有统计学意义 ($P < 0.01$);电针组与模型组相比,NOS 吸光度值明显降低,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。见表 2。



假手术组

模型组

电针组

注:NOS 阳性神经元胞体着蓝色

图 1 肠肌间神经丛 NOS 阳性神经元(NADPH-d 组织化学染色, $\times 40$)

表 2 电针治疗对肠肌间神经丛 NOS 阳性神经元的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组 别	n	NOS 阳性神经元数 (个/ mm^2)	吸光度值 ($\times 10^{-3}$)
正常组	4	4.82 ± 1.36	228.76 ± 12.84
假手术组	4	4.90 ± 1.37	232.51 ± 13.44
模型组	4	9.38 ± 2.13^a	278.64 ± 15.62^a
电针组	4	5.47 ± 1.54^b	213.86 ± 12.23^b

注:与正常组、假手术组比较, $^a P < 0.01$;与模型组比较, $^b P < 0.01$

讨 论

消化道和血管壁等处的平滑肌主要接受以 NO 为递质的神经支配,支配胃肠道的氮能神经递质主要来源于肠肌间神经丛

的 NOS 神经元。NO 是一种活性氧自由基,NOS 是内源性 NO 合成的关键酶,因此 NOS 活性的变化必将伴随 NO 的合成变化。NOS 主要以 2 种类型存在于体内:一种是原生型 NOS(cNOS),在正常情况下能合成少量的 NO,发挥正常的生理作用;另一种是诱生型 NOS(iNOS),在生理情况下很少表达,在内毒素和某些细胞因子如肿瘤坏死因子、白细胞介素等的刺激下,iNOS 可被激活,产生大量的 NO,从而发挥神经毒性作用^[6-8]。

本实验结果显示,缺血再灌注后肠组织 NO 含量增加及 NOS 活性增强,提示 NO 在肠缺血再灌注损伤中发挥了重要作用。以往的研究证实:脑缺血再灌注引起 NOS 活性增强主要是由于诱导 iNOS 合成而不是 cNOS^[9];肠缺血再灌注时,肠组织大量分泌肿瘤坏死因子,引起局部和全身的炎症^[10]。因此,我们推测肠缺血再灌注引起 NOS 活性增强主要也是因其诱导 iNOS 合成,从而产生大量的 NO,发挥神经毒性作用,造成肠缺血再灌注损伤。

本实验结果还显示,缺血再灌注后肠肌间神经丛 NOS 阳性细胞数及染色深度明显高于对照组,表明肠肌间神经丛内 NOS 活性增强,NO 生成增多。与上述实验结果一致。其原因可能是:由于缺血再灌注引起 NOS 大量活化,包括原有 NOS 活性增强和(或)更多的 NOS 被激活,从而导致 NOS 阳性胞体数目增加。

足三里穴为足阳明胃经的合穴,为四合穴之一,是治疗胃肠疾病的经典穴和首选穴^[11]。孙锦平等^[12]研究证实:针刺足三里穴对冷应激溃疡的治疗作用是通过下调下丘脑 iNOS 的高表达而实现。本实验结果显示,电针组与模型组比较,肠组织 NO 含量及 NOS 活性显著降低,肠肌间神经丛 NOS 染色明显变浅,NOS 阳性神经元数明显减少。其原因可能是通过电刺激足三里穴发挥针刺效应,激发经气,经络得以畅通,减轻肠缺血再灌注后血管内皮细胞的损伤,从而抑制氧自由基的活性及某些超氧化物的产生,进而抑制 NOS 活性,使 NO 的合成、释放减少,减轻肠组织损伤。

综上所述,电刺激足三里穴的抗肠缺血再灌注损伤作用可能是通过下调 iNOS 的表达和活性、减少 NO 的产生而实现,这可能是电针治疗肠缺血损伤的作用机制之一。

参 考 文 献

- [1] Sun Z, Olanders K, Lasso A, et al. Effective treatment of gut barrier dysfunction using an antioxidation and monoclonal antibodies against the adhesion molecule PECAM-1. J Surg Res, 2002, 105:220-33.
- [2] Heithan TH, Bruce CK, David WM, et al. Post-injury multiple organ failure: the role of the gut. Shock, 2001, 15:1.
- [3] 华兴邦. 大鼠穴位图谱的研制. 实验动物与动物实验, 1991, 1:11.
- [4] Costa M, Buffa R, Furness JB, et al. Immunohistochemical localization of polypeptides in peripheral autonomic nerves using whole mount preparation. Histochemistry, 1980, 65:157-165.
- [5] Lei DL, Yang DL, Liu HM. Local injection kainic acid causes widespread degeneration of NADPH-d neurons and induction of NADPH-d in neurons, endothelial cells and reactive astrocytes. Brain Res, 1996, 730:199-206.
- [6] Matheis G, Sherman MP, Buchberg GD, et al. Role of L-arginine nitric oxide pathway in myocardial reoxygenation injury. Am J Physiol, 1992, 262:616.

- [7] Node K, Kitakaze M, Kosaka H. Plasma nitric oxide increased in the ischemic canine heart. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995, 211: 370-374.
- [8] Loscalzo J, Welch G. Nitric oxide and its role in the cardiovascular system. *Prog Cardiovasc Dis*, 1995, 38: 87-104.
- [9] Eendoh M, Maiese K, Wanger J. Expression of the inducible form of nitric oxide synthase by reactive astrocyte after transient global ischemia. *Brain Res*, 1994, 651: 92-100.
- [10] Van Lanschot JJ, Mealy K, Wilmore DW. The effects of tumor necrosis factor on intestinal structure and metabolism. *Ann Surg*, 1990, 212: 663-670.
- [11] 魏如恕, 主编. 针灸研究进展. 北京: 人民卫生出版社, 1981: 281.
- [12] 孙锦平, 尹岭, 田淑君, 等. 针刺足三里穴对冷应激溃疡大鼠下丘脑与肾上腺 NOS 表达的影响. *中华物理医学与康复杂志*, 2005, 27: 276-279.

(收稿日期: 2007-01-20)

(本文编辑: 吴倩)

· 短篇论著 ·

运动对骨质疏松症骨代谢生化指标的影响

明亮 何予工 黄宗强

中老年人随年龄的增长, 骨量逐渐减少, 骨的重建处于负平衡, 骨吸收大于骨形成, 导致骨质疏松症的发生^[1]。由于骨质疏松症早期大多无症状, 多数人在发生骨折后才发现, 一旦发生骨折, 就会造成生活自理能力和生活质量的下降。因此, 早期诊断和预防骨质疏松症的发生对提高中老年人的生活质量十分重要。我们回顾性研究长期坚持太极拳运动的骨质疏松症患者的骨代谢生化指标, 为中老年人合理参加健身运动, 防治骨质疏松症提出参考性意见。

一、资料与方法

1. 一般资料: 本组患者入选前均进行腰椎骨密度测定, 并参照世界卫生组织 1994 年制订的骨密度测定法诊断标准确认为骨质疏松症^[2]。纳入标准: 未应用糖皮质激素、雄激素、降钙素、大剂量钙剂、二磷酸盐及其他已知可影响骨代谢的药物。排除标准: 患有甲状腺功能亢进、甲状旁腺功能亢进、糖尿病、皮质醇增多症、肝肾功能不全等。入选患者 58 例, 分为运动组与非运动组, 每组又根据患者性别分为男性与女性两个亚组, 其中女性患者均为绝经后妇女。各组年龄及运动组内运动年限比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 具有可比性, 见表 1。

表 1 各组一般资料比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	年龄(岁)	运动年限(年)
男性运动组	5	73.6 ± 4.4	10.6 ± 4.4
男性非运动组	4	68.6 ± 4.4	-
女性运动组	30	63.5 ± 8.4	11.6 ± 3.4
女性非运动组	19	62.5 ± 5.4	-

2. 运动方法: 运动组患者在老师带领和音乐伴奏下进行太极拳运动, 要求躯干四肢动作舒展到位, 运动量以能够适应为原则。运动后正常饮食, 戒除烟酒等不良嗜好。运动均在早上进行, 每次持续运动 60 ~ 90 min, 每周 3 ~ 4 次。

3. 骨代谢指标的测定: 空腹采集静脉血, 测定患者血清骨钙素、钙、磷和碱性磷酸酶含量, 并留清晨空腹尿, 测定尿吡啶

啉含量。血清骨钙素和尿吡啶啉均采用酶联免疫吸附法检测, 试剂由美国 Metra 生物系统公司提供, 尿吡啶啉用肌酐校正。血清碱性磷酸酶的检测采用国际临床化学学会推荐的连续监测法^[3], 应用 Abbott-Aeroset 全自动生化分析仪。其中血清骨钙素和碱性磷酸酶含量为反映成骨细胞活性的骨形成指标, 尿吡啶啉/肌酐为反映破骨细胞活性的骨吸收指标。

4. 统计学分析: 所有数据应用 SPSS 10.0 版软件包进行计数资料 t 检验, 所测数值用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

二、结果

本实验室血清骨钙素正常值为 (4.80 ± 1.2) $\mu\text{g/L}$, 与正常值比较, 各组骨钙素水平均明显下降 ($P < 0.05$)。男性运动组与男性非运动组比较、女性运动组与女性非运动组比较, 运动组骨钙素含量明显高于非运动组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 0.01)。见表 2。

本实验室男性人群尿吡啶啉/肌酐比值的正常值为 2.3 ~ 5.5, 女性人群为 3.0 ~ 7.5。与正常值比较, 各组尿吡啶啉/肌酐的比值均增高, 男性非运动组与女性非运动组增高尤为明显 ($P < 0.05$)。男性运动组与男性非运动组比较、女性运动组与女性非运动组比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 0.01)。见表 2。

表 2 各组血清骨钙素、尿吡啶啉含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	骨钙素 ($\mu\text{g/L}$)	尿吡啶啉/肌酐 (nm/mm)
男性运动组	5	4.10 ± 0.8	2.80 ± 0.94
男性非运动组	4	2.50 ± 0.7 ^a	3.80 ± 0.76 ^b
女性运动组	30	4.48 ± 1.46	3.25 ± 1.05
女性非运动组	19	3.35 ± 1.14 ^c	4.67 ± 0.98 ^d

注: 与男性运动组比较, ^a $P < 0.01$, ^b $P < 0.05$; 与女性运动组比较, ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$

血清钙、磷及碱性磷酸酶正常值分别为 ($2.08 \sim 2.6$) mmol/L 、($0.83 \sim 1.48$) mmol/L 和 ($40 \sim 150$) U/L ^[4]。运动组与非运动组血清钙、磷及碱性磷酸酶检测值与正常值比较, 差异均无统计学意义, 见表 3。