

- 损伤后的排尿功能[J]. 中华骨科杂志, 2003, 23(5): 313-314.
- [17] Shaker H, Wang Y, Loung D, et al. Role of C-afferent fibres in the mechanism of action of sacral nerve root neuromodulation in chronic spinal cord injury [J]. BJU Int, 2000, 85(7): 905-910.
- [18] Yu JN, Ma XJ, Liu ZS, et al. Effect of electroacupuncture at "Ciliao" (BL 32) on c-fos expression in the sacral segment of spinal cord in rats with detrusor hyperreflexia[J]. Zhen Ci Yan Jiu, 2010, 35(3): 204-207.

(收稿日期:2013-09-29)

(本文编辑:黄凡)

运动训练结合中医外治疗法对大鼠缺血下肢骨骼肌毛细血管密度的影响

索炜 南晓红 李廷荃 化金凤

【摘要】 目的 观察运动训练结合中医外治(动脉2号方)疗法对大鼠缺血下肢骨骼肌毛细血管密度的影响。**方法** SD大鼠90只随机分为模型组、运动组、外治组、运动+外治组、正常组,每组18只。除正常组外,余组建立大鼠下肢缺血模型,术后3天开始治疗,术后10天、17天、21天,大鼠外周血酶测定、微血管密度(MVD)测定、HE病理染色,比较各组差异。结果 术后10天、17天、21天,运动+外治组血酶值均最低,术后17天、21天运动+外治组MVD值显著高于其他组($P < 0.01$)。**结论** 运动训练结合中医外治(动脉2号方)疗法可以改善下肢缺血,促进大鼠下肢缺血模型的毛细血管密度的增加,促进血管新生。

【关键词】 运动训练; 中医外治; 动脉2号方; 毛细血管密度

【中图分类号】 R658.3 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2013.12.003

Effects of exercise training combined with external therapy of traditional Chinese medicine on capillary density in rat skeletal muscle ischemia of lower extremities SUO Wei, NAN Xiao-hong, LI Ting-quan, et al. Department of internal medicine, Shanxi Academy of Traditional Chinese Medicine, Taiyuan 030012, China

Corresponding author: NAN Xiao-hong, E-mail: suowei010@163.com

【Abstract】 Objective To observe the effects of therapy of exercise combined with traditional Chinese medicine (artery No. 2) effects of therapy on capillary density of rat skeletal muscle ischemia of lower extremities. **Methods** 90 SD rats were randomly divided into model group, exercise group, treatment group, exercise + external treatment group, the normal group, 18 rats in each group. Except the normal group, the model of lower limb ischemia rats sets, treatment was started 3 days after surgery, after 10 days, 17 days, 21 days, serum enzyme determination, rat microvessel density (MVD) were determined, HE pathological staining. compared the difference. **Results** After 10 days, 17 days, 21 days, sports and external treatment group blood enzyme values were the lowest, 17 days after operation, 21 days of exercise + external treatment group MVD was significantly higher than other groups ($P < 0.01$). **Conclusion** External treatment of TCM combined with exercise training (artery No. 2) therapy can improve the lower limb ischemia, increase lower limb ischemia in the rat model of capillary density, angiogenesis.

【Key words】 Exercise; Therapy; Artery No. 2; Capillary density

基金项目:山西省中医药研究院院级课题(201116)

作者单位:030012 太原,山西省中医药研究院内科(索炜、化金凤),周围血管科(南晓红);山西中医学院附属医院特需科(李廷荃)

作者简介:索炜(1984-),硕士,住院医师。研究方向:中医内科学方向。E-mail: aihuajinfeng@126.com

通讯作者:南晓红(1968-),女,硕士,副主任医师。研究方向:中医药防治周围血管疾病方向。E-mail: suowei010@163.com

下肢缺血性疾病是临床上的常见疾病,其发病率随年龄的增长而明显增加^[1],随着中国人口老龄化的加剧,本病将急剧增加,无论药物、介入或手术治疗都有其局限性。近年来,促血管新生技术的出现,使得在缺血部位重建有效的侧支循环逐渐成为可能,从而为缺血性疾病提供了新的治疗策略^[2],血管新生越来越受到人们重视。中医治疗本病疗法多样,重在整体治疗,疗效稳定,安全可靠,可以减少并发症的发生,对患者进行个体化治疗,日益受到重视。特别是中医外用药物研究更迫在眉睫。

动脉 2 号方是山西省中医药研究院周围血管科南晓红主任结合多年临床经验研制的外用方,临床常嘱咐病人适当运动,坚持每日步行运动并配合动脉 2 号方外用,预防和改善患者症状,葛红卫等^[3]研究发现运动训练可以促进缺血下肢血管新生,但运动配合外用药物的研究尚少,笔者进行了实验研究,观察了运动训练加中药外治法对缺血下肢毛细血管密度的影响,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SD 大鼠体重 250 ~ 300 克,来源于山西省中医药研究院中心实验室动物房,实验动物生产许可证编号:SCXK(晋)2010-002,实验动物使用许可证编号:SYXK(晋)2010-002;动物适应性饲养 1 周后随机分为 5 组,模型组、运动组、外治组、运动 + 外治组、正常对照组,每组 18 只。

1.2 主要试剂及药品

一抗:CD34(北京博奥森),二抗:兔二抗(北京中杉金桥),显色剂:DAB(北京中杉产品)。

1.3 模型制作

90 只 SD 大鼠 10% 水合氯醛(0.35 ml/100 g)行大鼠腹腔注射麻醉,选左侧腹股沟中点向膝部作一长度约 2 cm 的纵行切口,紧贴腹股沟下方分离股动脉主干,除正常组外,余组行左下肢股动脉结扎及分支剔除术,造成下肢血管缺血模型。术后前三天给予抗生素(庆大霉素 2 万单位,肌肉注射),三天后待伤口结痂后开始治疗。术后 10 天、17 天、21 天,各组取大鼠 6 只,进行各项指标测定。

1.4 给药方法

动脉 2 号方(黄芪 30 g、桂枝 10 g、白芍 15 g、当归 10 g、川芎 10 g、莪术 10 g、三棱 10 g、水蛭 6 g、陈

皮 10 g、柴胡 10 g、香附 10 g、枳壳 10 g、甘草 6 g),取自山西省中医院周围血管科病房,取上药 1 剂加水煎煮 1 小时后,取药液浓缩成膏状。外治组:每天局部外敷中药,并用宽橡皮胶布固定。运动组:自制网状滚筒,顺时针匀速转动(10 转/分钟)给予运动训练,约 30 分钟,每天三次。运动 + 训练组给予运动和敷中药(动脉 2 号方)。模型组和对照组不予给药。

1.5 检测指标

1.5.1 血管数目及组织学观察 术后 10 天、17 天、21 天,各组取大鼠 6 只,取术侧内收肌群一小块肌肉组织,中性福尔马林固定标本,常规脱水,石蜡包埋,行苏木精-伊红(HE)染色,镜下观察骨骼肌细胞间血管数目及组织学改变。

1.5.2 毛细血管密度测定 取大鼠术侧内收肌群组织,免疫组化法处理,然后进行 400 倍的显微照相。选择有意义的组织相,经登录、编号、采集、分析、读取数据、最后存盘,进行图像分析。图象分析依据:计算机图像处理系统由 CMOS(日本 OLYMPUS 公司)及专用软件(美国 Media Cybernetics 公司 Image-Pro Plus)组成。依据阳性免疫反应的图象灰度选择合适的灰度分割阈值,实现双阈值分割,得到样品的灰度目标图象,以人机交互方式测定微血管密度。每例测 5 个视野,由计算机计算出所测阳性反应物微血管密度。

1.5.3 血酶测定 分别于术后 10、17、21 天,大鼠下腔静脉抽取血液 3 ml,采用免疫抑制法测量外周血肌酸激酶(CK)、谷草转氨酶(AST)。

1.5.4 坏死例数统计 统计大鼠缺血下肢皮肤暗红色、黑色,组织溃烂例数。

1.6 统计学分析

采用 SPSS13.0 统计软件处理。计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组大鼠 AST、CK、MVD 数据经正态检验 $P < 0.01$,不服从正态分布,所以采用多个样本比较的 Kruskal-Wallis H 检验,两两比较采用 LSD 检验, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 被认为是差异有显著性。

2 结果

2.1 坏死例数

术后三天,大鼠缺血后肢颜色发白,伤口结痂,未见明显出血,7 天后伤口愈合,14 天后痂脱落,未见肢体暗红色、黑色,无坏疽、未见坏死。

2.2 大鼠血酶测定结果

各组大鼠 AST 比较:术后 10 天,经 Kruskal-

Wallis H 检验, $H = 13.452, P = 0.009, P < 0.05$, 所以各组间 AST 水平总体不全相同; 两两比较采用 LSD 检验, 外治组和运动 + 外治组 AST 值明显低于模型组 ($P < 0.05$)。术后 17 天, 经 Kruskal-Wallis H 检验, $H = 10.327, P = 0.035, P < 0.05$, 所以各组间 AST 水平总体不全相同; 经 LSD 检验, 运动 + 外治组明显低于模型组 ($P < 0.05$)。术后 21 天, 经 Kruskal-Wallis H 检验, $H = 15.564, P = 0.004, P < 0.05$, 所以各组间 AST 水平总体不全相同; 经 LSD 检验, 运动组、外治组、运动 + 外治组 AST 值显著低于模型组 ($P < 0.05$), 其中运动 + 外治组值最低 ($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 五组实验大鼠不同时点外周血谷草转氨酶 (AST) 比较 (U/L, $\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	术后 10 天	术后 17 天	术后 21 天
空白	123.83 ± 17.34	123.00 ± 16.67	126.17 ± 18.58
模型组	125.00 ± 5.06	122.33 ± 5.68	127.17 ± 9.54
运动组	104.17 ± 14.09	106.33 ± 16.46	111.00 ± 12.25 ^b
外治组	97.17 ± 18.45 ^b	108.00 ± 20.32	105.17 ± 10.72 ^a
运动 + 外治组	94.17 ± 17.90 ^b	99.67 ± 10.07 ^b	96.00 ± 11.24 ^a

注:与模型组比较:^a $P < 0.01$,^b $P < 0.05$

各组大鼠 CK 比较: 术后 10 天, 经 Kruskal-Wallis H 检验, $H = 6.216, P = 0.183, P > 0.05$, 所以各组间 CK 水平总体相同。术后 17 天, 经 Kruskal-Wallis H 检验, $H = 5.933, P = 0.204, P > 0.05$, 各组间 CK 值差异不显著。术后 21 天, 经 Kruskal-Wallis H 检验, $H = 5.284, P = 0.036, P < 0.05$, 所以各组间 CK 水平总体不全相同, 经 LSD 检验, 运动 + 外治组 CK 值明显低于模型组 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 五组实验大鼠不同时点外周血肌酸激酶 (CK) 比较 (U/L, $\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	术后 10 天	术后 17 天	术后 21 天
空白	583.88 ± 110.26	636.02 ± 177.07	627.91 ± 177.08
模型组	523.68 ± 41.77	463.98 ± 163.17	662.60 ± 54.75
运动组	426.65 ± 74.14	527.72 ± 375.29	578.07 ± 145.17
外治组	454.33 ± 179.98	427.23 ± 193.62	525.37 ± 70.83
运动 + 外治组	460.83 ± 121.18	424.72 ± 84.93	469.38 ± 38.05 ^a

注:与模型组比较:^a $P < 0.05$

2.3 毛细血管密度 (MVD) 测定结果

术后 10 天, 经 Kruskal-Wallis H 检验, $H = 8.137, P = 0.087, P > 0.05$, 所以各组间 MVD 总体相同。

术后 17 天, 经 Kruskal-Wallis H 检验, $H = 12.006, P = 0.017, P < 0.05$, 所以各组间 MVD 水平总体不全相同。经 LSD 检验, 运动 + 外治组显著高于模型组 ($P < 0.05$)。

术后 21 天, 经 Kruskal-Wallis H 检验, $H = 18.767, P = 0.001, P < 0.05$, 所以各组间 MVD 水平总体不全相同, 经 LSD 检验, 运动 + 外治组 MVD 值显著高于模型组 ($P < 0.01$), 运动组 MVD 值显著高于模型组 ($P < 0.05$), 见表 3。

表 3 五组实验大鼠不同时点微血管密度 (MVD) 结果 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	术后 10 天	术后 17 天	术后 21 天
空白	11.45 ± 2.06	11.78 ± 1.51	11.78 ± 1.57
模型组	12.12 ± 3.06	14.21 ± 1.77	15.42 ± 3.64
运动组	14.40 ± 1.36	16.63 ± 4.06	19.11 ± 2.37 ^b
外治组	12.28 ± 3.15	13.65 ± 2.58	14.70 ± 2.92
运动 + 外治组	15.68 ± 4.66	18.66 ± 5.09 ^a	21.48 ± 3.77 ^a

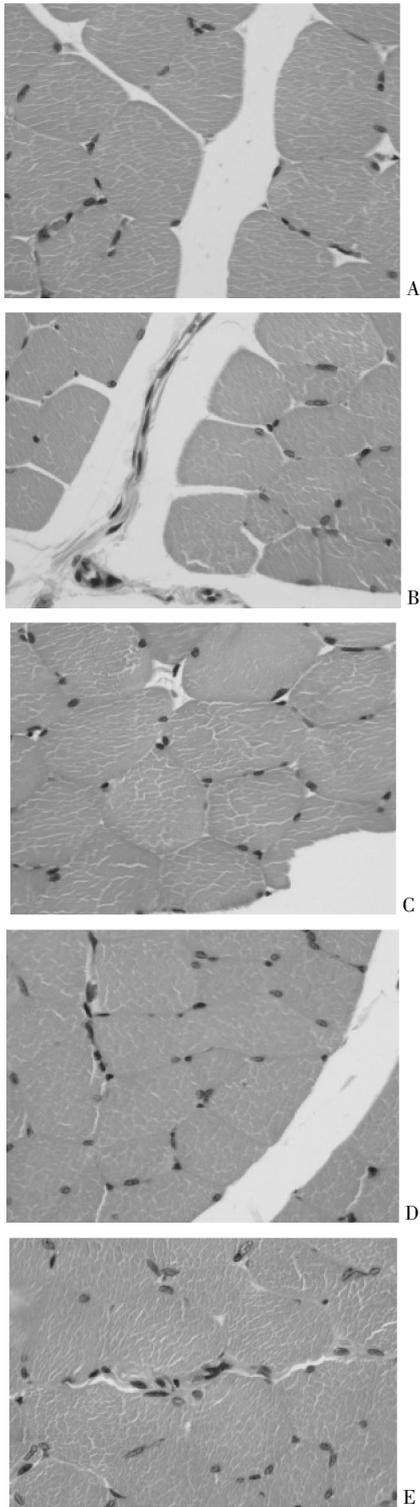
注:与模型组比较:^a $P < 0.01$,^b $P < 0.05$

2.4 病理

HE 染色后, 电镜下观察病理组织: 空白组大鼠肌细胞排列整齐, 肌纤维间有一定量血管分布 (A); 模型组大鼠肌细胞萎缩, 间质增生, 血管数目较空白组增多 (B); 外治组大鼠肌细胞萎缩较轻, 肌纤维间血管分布数目较模型组多 (C); 运动组肌纤维间血管数目增多 (D); 运动 + 外治组肌细胞萎缩轻, 肌纤维间血管数目明显增多 (E), 见图 1。

3 讨论

外治法是中医治疗动脉硬化闭塞症的独特疗法, 其作用直接, 见效快, 外敷疗法包括外用膏药、油膏、药粉、酊剂、洗药等, 以温通血脉, 扩张周围血管, 促进肢体血液循环, 改善患肢缺血状态。中医认为血管生成与气血相关, 补气活血、行气通脉等可能具有促血管新生作用, 动脉 2 号方由 (黄芪、白芍、桂枝、当归、川芎、莪术、三棱、水蛭、陈皮、柴胡、香附、枳壳、甘草) 组成, 功效: 益气活血, 滋阴复脉。



A 正常组; B 模型组; C 外治组; D 运动组; E 运动 + 外治组

图 1 大鼠缺血下肢组织病理学检查(HE 染色, ×400)

方中黄芪补气促血行, 莪术、三棱、水蛭活血去瘀, 当归、白芍、川芎养阴补血行血, 使阴血充, 脉络盈, 有助血行, 又可防祛瘀伤正, 本研究把外治与运动训练结合, 治疗下肢缺血性疾病, 外用药涂敷不经

过胃肠道, 可以直达病所, 促进药物吸收, 使用简单, 安全可靠, 患者易于接受, 依从性较好, 配合运动训练, 既可促进下肢血液循环, 又加快药物的吸收。从中医理论分析, 运动训练结合中医外治(动脉 2 号方)可补气活血祛瘀, 养阴复脉, 有效改善组织缺血。

本实验 MVD 值是评价血管生成的指标, MVD 值越高说明新生毛细血管越丰富, 血管新生须经历一系列复杂过程, 故本研究结果显示术后 10 天 MVD 值变化差异不显著, 但术后 17 天、21 天, 运动 + 外治组 MVD 均明显高于对照组, 得出运动 + 外治组可以促进新生血管的形成, 其促血管新生作用强于单纯的运动训练或外用药物。组织缺血的严重程度^[4]还可以通过酶学的变化来反映, 正常情况下, 外周血中的酶活性远比组织中的低, 随着造模结扎动脉后, 局部组织缺血缺氧, 可引起血清酶异常升高, 随着治疗的进行, 后期血酶呈下降趋势, 运动 + 外治组值最低, 也体现了运动 + 外治组下肢缺血最轻。证实了运动 + 外治组的血管新生程度最强。

中医药在防治下肢缺血性疾病中应用前景广阔, 在降低患病率, 致残率, 提高治愈率方面中将会起到更加重要的作用。本研究中我们得出运动 + 外治(动脉 2 号方)能够促进缺血下肢的血管新生, 但临床中一旦患者出现了坏疽感染等严重危及生命的情况, 慎用外用贴敷疗法, 缺血肢体创面忌用腐蚀性和刺激性药物, 应该及时给予必要的抗炎、手术治疗, 以免延误病情。运动加外用药物治疗下肢缺血性疾病临床价值有多大, 还有待进一步的实验及临床观察。相信随着人们对其机制的深入研究, 将为下肢缺血性疾病的治疗提供新的切入点。

参 考 文 献

- [1] Latza U, Stang A, Bergmann M, et al. The problem of response in epidemiological studies in germany [J]. Gesundheitswesen, 2004, 66(5):326-336.
- [2] 蓝海峰, 李尚珠. 干细胞移植治疗肢体缺血的进展[J]. 医学综述, 2006, 12(21):1289-1290.
- [3] 葛红卫, 何延政, 梅燕. 运动训练对大鼠缺血下肢血管新生的影响[J]. 中国康复医学杂志, 2008, 23(5):413-415.
- [4] 黄学阳, 林鸿国, 王建春, 等. 疏肝活血法对下肢缺血模型大鼠血管内皮祖细胞影响的实验研究[C]//中国中西医结合学会周围血管疾病专业委员会. 2009 全国中西医结合周围血管疾病学术交流会议论文集, 郑州, 2009:155-158.

(收稿日期:2013-08-24)

(本文编辑:蒲晓田)