

针刺耳神门穴对脑血栓大鼠脑血流的影响

刘丽婷 吴佳栩 闫菲 李悦 任秀君

【摘要】 **目的** 运用激光多普勒技术观察耳神门穴埋针 24 小时对脑缺血的治疗效果。**方法** 用 50% FeCl₃ 化学诱导制造大鼠中动脉血栓闭塞模型,耳针组采用铍针针刺耳神门,假针组将祛除针的铍针片胶布固定在神门穴上,药物组阿司匹林灌胃 60 mg/kg 一次,利用经颅激光多普勒检测缺血区脑血流,24 小时后采用行为学评分测定神经运动功能,TTC 技术测定脑梗死体积。**结果** 50% FeCl₃ 贴敷后,脑血流迅速下降,20 分钟下降至 22%,脑血栓闭塞模型制作成功。与模型组比较,针刺耳神门穴 20 分钟可显著提高脑血流量(174%),改善脑缺血后神经运动功能,减少脑梗死体积(28.3%), $P<0.01$ 。阿司匹林和假针亦有效,假针效果最差。**结论** 针刺耳神门穴治疗急性脑卒中,能迅速提高脑缺血后脑血流量,从而改善神经运动功能,减少梗死体积,效果优于药物和假针。

【关键词】 耳针; 脑缺血; 激光多普勒; 脑血流; 脑梗死体积

【中图分类号】 R245 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2017.10.007

Effect of needle embedment in auricular Shenmen (TF4) on cerebral blood flow and infarction area in cerebral thrombosis rats model LIU Liting, WU Jiaxu, YAN Fei, et al. School of Acupuncture-Moxibustion and Tuina, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China
Corresponding author: REN Xiujun, E-mail: rxiujun@163.com

基金项目: 2016 年北京市共建课题(BJGJ1626)

作者单位: 100029 北京中医药大学针灸推拿学院[刘丽婷(本科生)、吴佳栩(本科生)、闫菲(本科生)、李悦(本科生)、任秀君]

作者简介: 刘丽婷(1995-),女,2013 级在读本科生。研究方向: 针刺机理研究。E-mail: 1026423530@qq.com

通信作者: 任秀君(1972-),女,博士,副教授,硕士生导师。研究方向: 针刺适宜病种穴位配伍研究。E-mail: rxiujun@163.com

【Abstract】 Objective To observe the effect of needle embedment on auricular *Shenmen* (TF4) 24 hours on cerebral blood flow and Infarction area by laser doppler technique. **Methods** 50% FeCl₃ was used to induce the thrombosis occlusion model of middle cerebral artery. Needle embedment (24hours) was used to auricular *Shenmen* (TF4) in auricular needle group. Circle slice without needle was fixed on TF4 in sham-auricular needle group. Aspirin(60 mg/kg) was intragastric administration in drug group once a day. Regional cerebral blood flow (rCBF) was measured with Laser Doppler flowmeter. Nerve motor function was measured with Neurological deficit scores. Infarction area was measured by 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride staining method. **Results** After 50% FeCl₃ application, the cerebral blood flow decreased rapidly and decreased to 22% by 20 minutes. The model of cerebral thrombosis occlusion was successful. Compared with the model group, the rCBF in auricular needle group was raised to 174% in 20 min. Needle embedment on TF4 can improve the nerve motor function and reduce the infarction volume (34%), $P < 0.01$. Aspirin and sham-auricular were also effective. The effect of sham-auricular was the worst. **Conclusion** Needle embedment on auricular TF4 can rapidly improve the cerebral blood flow after cerebral ischemia, thereby improving the nerve motor function and reducing the infarct volume, and the effect is better than oral aspirin and sham-auricular needle.

【Key words】 Auricular acupuncture; Cerebral ischemia; Laser doppler flowmetry; Cerebral blood flow; Cerebral infarction

脑血管疾病是临床发病率最高的疾病之一,发病率和病死率均居国内外各种疾病之首。其中,缺血性脑血管疾病的发病率远远高于出血性脑血管疾病。脑缺血即脑的短暂性血液供应不足并出现症状,是一种常见的急性脑血管病,常突然发病,一般在 24 小时内完全恢复正常,但可以反复发作。短暂性脑缺血发作的患者在一至五年内,可能由于脑组织局部供血动脉血流的突然减少或停止,造成该血管供血区的脑组织缺血、缺氧,导致脑组织坏死、软化,并伴有相应部位的临床症状和体征,如偏瘫、失语等神经功能缺失的症候,即出现脑梗死。

耳针是一门新兴的技术,生物全息定律^[1-5]提出后,越来越多的实验开始研究耳针,并且耳针在临床上的运用愈加广泛。目前已经有部分学者^[6-10]研究出耳针可以起到改善脑血流的作用,减轻因供血不足而导致的神经功能损害,并能恢复受损的脑神经功能。作为耳穴中运用最广的神门穴是《耳穴国标》之一,位于三角窝内,对耳轮上、下脚分叉处稍上方的三角窝区。针刺耳神门穴在降血压、止晕等多方面发挥重要作用,常用于神经系统、心血管系统等多种疾病。神门穴具有调节大脑皮质兴奋与抑制过程的作用,同时具有镇痛、抗过敏、消炎等功能。法国诺吉氏曾在 1982 年发表了耳穴分布规律的三个位相^[5],其中第二位相表明人体的头部位于耳的三角窝的位置。《灵枢·经脉》记载:“足太阳之脉,会于巅,入络脑。其支者,从巅至耳上角。”《灵枢·寒热病》篇又认为,位于耳尖之上的角孙穴

又属足太阳,可以认为“神门穴”位于足太阳之支脉上,与脑关系密切。有学者^[11,12]研究得出耳神门穴可以增加大脑血流速度,而陈峰等^[13]学者在临床试验中证明单取耳神门穴针刺对脑硬化症患者左右椎动脉和基底动脉均有作用,可使大脑得到更多的血氧供应而达到治疗的效果。有些研究者^[14-15]发现针灸耳神门穴可以对脑卒中后遗症起到一定作用。

通过经颅激光多普勒技术,可以检测出大鼠脑血流的变化,以及给予相应的治疗措施后,对 SD 大鼠脑缺血的治疗效果如何。氯化三苯基四氮唑(2,3,5-triphenyltetrazolium chloride, TTC)染色是一种用来检测实验动物梗死面积最常见的染色方法,且其染色后颜色易于观察且灵敏性高而被广泛运用。经颅激光多普勒技术是借助脉冲多普勒技术和 2MHZ 发射频率,使超声束得以穿透颅骨较薄的部位,直接描记脑底动脉血流的多普勒信号,以获取脑底动脉的血流动力学参数,来反映脑血管功能状态。本研究旨在探讨耳神门穴贴敷掀针 24 小时改善脑缺血后神经运动功能及减小脑梗死体积方面的治疗效果。

1 对象与方法

1.1 实验动物

雄性健康 SPF 级 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 30 只,体重(200±20)g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,动物合格证号:11400700188950。

大鼠购入后入实验室分笼饲养,每笼 6 只。普通饲料及水足量饲养 5 天后进行实验。饲养室及行为学实验室温度为 23℃ ~ 25℃,每日 8:00 至 20:00 开灯,20:00 至次日 8:00 熄灯。

1.2 主要仪器

Periflux5010 型激光多普勒血流仪 (Periflux5010, Perimed, 斯德哥尔摩, 瑞典) 及 PROBE 407 探头,阿司匹林肠溶片 (陕西渭南华仁制药有限责任公司, 陕西, 中国), 环球一次性无菌掀针 (0.22 mm×1.5 mm, 苏州姑苏针灸器械有限公司, 江苏, 中国)。

1.3 实验药物

阿司匹林肠溶片用 0.5% 羟甲基纤维素钠 (sodium carboxymethyl cellulose Na, CMC-Na) 溶解, 配置成 10% 的阿司匹林溶液。0.5% 羟甲基纤维素钠用羟甲基纤维素钠粉 (国药集团化学试剂有限公司, 上海, 中国) 溶解在蒸馏水中。

1.4 大脑中动脉血栓模型建立

参照前期报道的方法^[12], 10% 的水合氯醛 (350 mg/kg, ip.) 给 SD 大鼠腹腔注射进行麻醉, 麻醉后右侧卧位于实验台上, 在大鼠自左眼眦和外耳道连线中点处剪一长约 1.5 cm 的切口, 暴露颞前窝及鳞状骨大部, 然后在颞弓和鳞状骨前联合的前下方约 2 mm 处钻孔, 开一直径约 2 mm 的颅窗, 暴露大脑中动脉, 并用一小片塑料薄膜保护血管周围组织。随后将蘸有 50% 三氯化铁 (用 0.1 mol/L HCL 配置) 溶液 (约 10 μL) 的大小为 2 mm×2 mm 的小片滤纸敷在该段大脑中动脉上 20 分钟, 再用生理盐水冲洗局部组织, 逐层缝合。假手术组除不滴加氯化铁溶液外, 其余手术步骤同模型组。

1.5 动物分组及处理

利用随机数字表法将 30 只大鼠随机分为 5 组: 模型组、假手术组、针刺组、假针刺组、阳性药物组, 每组 6 只。模型组: 50% FeCl₃ 滤纸贴敷大脑中动脉 20 分钟, 术后饲养 24 小时; 假手术组: 手术步骤同模型组, 暴露左侧大脑中动脉, 不贴敷 FeCl₃ 滤纸, 观察 20 分钟, 术后饲养 24 小时; 针刺组: 建立 FeCl₃ 大脑中动脉血栓大鼠模型, 用掀针针刺耳神门穴治疗 24 小时; 假针刺组: 建立 FeCl₃ 大脑中动脉血栓大鼠模型, 将祛除针的掀针片贴在神门穴上, 不刺破皮肤, 治疗 24 小时; 药物组: 阿司匹林灌胃 60 mg/kg 一次, 建立 FeCl₃ 大脑中动脉血栓大鼠模型, 术后饲养 24 小时。

除药物组, 其他各组 0.9% 生理盐水灌胃一次, 除针刺组和假针刺组, 其他各组抓取一次, 不做其他处理。

1.6 针刺耳神门穴操作方法

按照《实验针灸学》所附的常用实验动物针灸穴位, 选取双侧耳“神门”穴, 大鼠耳廓三角窝后 1/3 上部, 即三角窝 4 区。针刺组用掀针针刺耳神门穴后, 胶布固定, 留针 24 小时。假针刺组将祛除针的掀针片贴在神门穴上, 胶布固定, 留针 24 小时。留针期间注意防止大鼠将掀针抓落^[6,16]。

1.7 指标检测

1.7.1 血流灌注量 暴露大脑中动脉后, 采用 Periflux5010 型激光多普勒血流仪, 用 PROBE 407 探头固定于大鼠左侧脑部大脑中动脉, 测得该区域血流灌注量数据, 并观察其血流情况 1 小时。

1.7.2 行为学观察 各组大鼠在造模成功 24 小时后接受行为学检测, 所有的行为学检测由固定人员进行, 参照 Longa 评分的方法并加以改进。Longa 评分^[17]: 0 分, 无神经损伤症状; 1 分, 不能完全伸展手术对侧前爪或后爪; 2 分, 行走时, 向手术对侧转圈; 3 分, 行走时, 向手术对侧倾斜; 4 分, 不能自发行走, 意识丧失。

1.7.3 脑梗死体积 大鼠手术造模后 24 小时后, 断头处死, 取脑, 置 -20℃ 冰箱冷冻 10 分钟, 将脑均匀切成 5 片, 平均每片 2 mm, 用 2% TTC (Gene-bio 公司, 日内瓦, 瑞士) 染色, 放置于 37℃ 水浴锅中 15 分钟, 使其充分染色后, 用 10% 甲醛 (北京化工厂) 固定 24 小时后, 用 Image-Pro Plus 6.0 软件记录每只大鼠的左侧脑梗死面积, 梗死面积和乘以厚度 2 mm, 为梗死体积。

1.8 统计学处理

所有数据均应用 SPSS 20.0 (国际商业机器公司, 阿尔蒙克, 纽约州, 美国) 统计软件进行分析。实验数据以均值±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用单因素方差分析 (One way ANOVA) 比较组间差异, 两两组间比较选用 LSD 法, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义, $P < 0.01$ 为差异有极显著统计学意义。

2 结果

2.1 FeCl₃ 贴敷 20 分钟脑血流变化

实验结果显示, 50% FeCl₃ 贴敷后, 脑血流迅速下降, 8 分钟下降至 30%, 之后缓慢下降, 20 分钟下降至 22%。实验结果与文献报道数据近似^[18]。

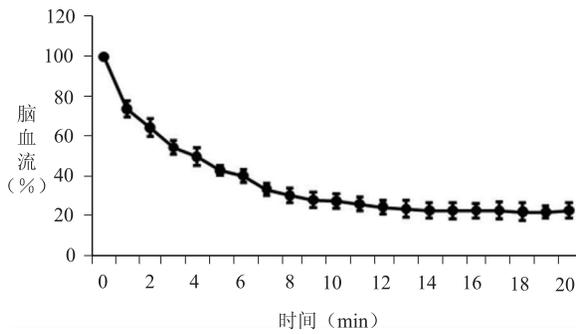


图 1 50% FeCl₃ 贴敷左侧大脑中动脉 20 分钟血流结果

2.2 治疗后脑血流结果

研究结果显示,治疗后 0~5 分钟,与假手术相比,模型组和所有治疗组脑血流降低有极显著差异, $P < 0.01$; 与模型组相比,针刺组脑血流上升 72%, 药物组上升 50%, 有极显著差异, $P < 0.01$, 假针组脑血流上升 17%, 有显著差异, $P < 0.05$; 与针刺组相比,假针组血流降低有极显著差异, $P < 0.01$, 药物组血流降低有显著差异, $P < 0.05$; 与假针组相比,药物组血流上升有极显著差异, $P < 0.01$ 。治疗后 15~20 分钟,与假手术相比,模型组和所有治疗组脑血流降低有极显著差异, $P < 0.01$; 与模型组相比,针刺组脑血流上升 174%, 药物组上升 74%, 有极显著差异, $P < 0.01$, 假针组脑血流上升 10%, 有显著差异, $P < 0.05$; 与针刺组相比,假针组和药物组血流降低有极显著差异, $P < 0.01$; 与假针组相比,药物组血流上升有极显著差异, $P < 0.01$ 。由于药物组中一只大鼠在测量的多普勒探头移位,数据缺失,导致药物组只有 5 只。结果见表 1。

表 1 各组大鼠在造模和针刺时的血流量($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	n	治疗	
		0~5 分钟	15~20 分钟
假手术组	6	99.75±0.81	99.65±1.05
模型组	6	21.48±3.18 ^a	21.23±3.21 ^a
针刺组	6	36.85±5.05 ^{ac}	58.15±2.30 ^{ac}
假针刺组	6	25.22±1.47 ^{abe}	23.28±1.56 ^{abe}
药物组	5	32.12±2.45 ^{acdf}	37.02±4.03 ^{acdf}

注:与假手术组比较,^a $P < 0.01$;与模型组比较,^b $P < 0.05$,^c $P < 0.01$;与针刺组比较,^d $P < 0.05$,^e $P < 0.01$;与假针组比较,^f $P < 0.01$ 。

2.3 行为学观察

24 小时后观察 SD 大鼠的行为学,Longa 评分显示,与模型组相比,针刺组及阳性药组有极显著差异($P < 0.01$);而假针刺变化不大,无显著性差异

($P > 0.05$)。与针刺组相比,假针刺组有明显差异($P < 0.01$);而阳性药组无显著性差异($P > 0.05$)。如表 2 所示。

表 2 24 小时后 Longa 评分($\bar{x} \pm s$, 分)

组别	n	神经功能评分
模型组	6	2.7±1.03
针刺组	6	0.3±0.52 ^a
假针刺组	6	2.5±1.05 ^b
阳性药组	6	0.5±0.84 ^{ac}

注:与模型组比较,^a $P < 0.01$;与针刺组比较,^b $P < 0.01$;与假针刺比较,^c $P < 0.01$ 。

2.4 各组 TTC 数据

在造模成功 24 小时之后,将每组大鼠断头处死后,取脑用 TTC 染色后,多聚甲醛固定,切成 2 mm 厚度的脑切片。24 小时后用直接算法计算左侧梗死体积,与模型组相比,脑梗死体积针刺组和药物组减少有极显著差异, $P < 0.01$; 针刺组降低 28.3%, 药物组降低 18.8%, 假针组降低 8.5%, 有显著差异, $P < 0.05$; 与针刺组相比,假针组面积增大有显著差异, $P < 0.05$; 针刺和药物组,脑梗死体积没有显著差异, $P > 0.05$; 与假针组比较,药物组脑梗死体积没有显著差异, $P > 0.05$ 。结果见表 3、图 2。

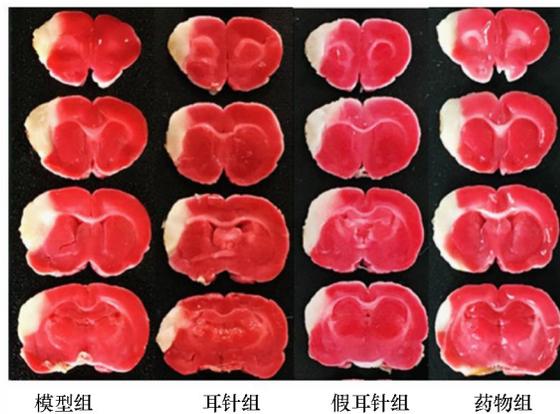


图 2 各组大鼠左侧脑梗死体积图

表 3 左侧梗死体积($\bar{x} \pm s, \text{mm}^3$)

组别	n	左侧梗死体积
模型组	6	139.82±26.76
针刺组	6	100.31±17.77 ^a
假针刺组	6	127.99±10.22 ^c
药物组	6	113.57±12.35 ^b

注:与模型组比较,^a $P < 0.01$,^b $P < 0.05$;与针刺组比较,^c $P < 0.05$ 。

3 讨论

缺血性脑卒中是因血液供应障碍导致缺血缺氧而引起的局限性脑组织的缺血性坏死或脑软化。针刺能调节能量代谢和改善脑微循环,拮抗自由基损伤,调整血脂异常,诱导保护性基因表达,干预损伤级联反应的发生等。

耳神门穴位于耳三角窝内,对耳轮上下脚分叉处稍上方。从其解剖结构来看,三角窝内的神经分布极其丰富,几乎所有支配耳廓的神经都有分支至三角窝内,有来自迷走神经的耳支、面神经的耳后神经、以及枕大神经、枕小神经,还有交感神经等,这些神经在三角窝内皮下形成神经丛。对心脑血管疾病、神经衰弱、精神分裂症,以及各种炎症性疾病、过敏性疾病和神经内分泌疾病等有较好疗效。

本研究主要采用敏针刺刺激耳神门穴,通过持续刺激 24 小时,对脑血流起一定的改善作用。本研究表明,通过经颅激光多普勒检测得知,针刺有即时效应,且其在麻醉的情况下,治疗 20 分钟比阳性药的效果要好。造模 20 分钟后对 SD 大鼠进行针刺耳神门穴治疗,脑血流量在 5 分钟内就能有较大的改善作用,与模型组相比,耳针埋针能够使脑血流上升 72%,20 min 能够上升 174%。给予阿司匹林肠溶剂治疗,5 分钟脑血流量上升 50%,20 分钟后上升 74%。假耳针对脑血流亦有调节作用,治疗 5 分钟,脑血流上升 17%,20 分钟上升 10%。实验结果提示,耳神门穴埋针能够迅速提高急性脑血栓后脑血流,20 分钟内脑血流持续升高。药物组和假针亦有疗效,耳针对脑血流的调节作用优于口服阿司匹林,假针对脑血流有微弱的调节作用,不随时间延长而增加。

24 小时后模型组的梗死灶体积约为 139.82 mm³,耳针神门穴后梗死体积减少约 28.3%,说明耳穴埋针可以减少梗死体积。阿司匹林和假针亦有效,阿司匹林可以减少梗死体积 18.8%,假针可以减少 8.5%。耳针穴埋针疗效优于药物,假针疗效最差。药物组在治疗后 20 分钟对脑血流的作用不如针刺组,但 24 小时后梗死体积的疗效和针刺组在统计学上没有统计学差异,考虑可能是由于持续用激光多普勒检测脑血流时,大鼠处于麻醉状态,对阿司匹林肠溶剂的吸收不足,24 小时后其发挥作用后则对脑血流和脑梗死体积有了较好的改善作用。

综上所述,用敏针刺耳神门穴治疗急性脑卒中有较好疗效,可以迅速提高脑缺血后脑血流,即时效应良好,改善 24 小时后脑缺血大鼠神经运动行为和脑梗死体积。但是由于本研究例数过少,实验结果有待进一步增大样本量进行重复验证。

参 考 文 献

- [1] 杜昌华. 以生物全息律为依据探索耳穴分布规律[J]. 中国针灸,1997,17(5):308-309.
- [2] 杨卉. 耳针疗法作用机理的研究进展[J]. 湖北中医药大学学报,2011,13(2):65-67.
- [3] 张颖清. 全息生物学-驳邹承鲁院士-爱国主义与诺贝尔奖[J]. 太原师范学院学报(社会科学版),2007,6(6):15-19.
- [4] 邢宏义,关新民. 针刺治疗脑缺血的机理研究述评[J]. 中国针灸,1996,16(5):56-58.
- [5] 赵百孝,林岷瑜. 法国耳穴疗法[C]//2011 中国针灸学会年会论文集(摘要),2011:2.
- [6] 卢雨微,付宗英. 耳针对血管性痴呆大鼠行为学及大脑皮质 STAT1 表达的影响[J]. 内蒙古中医药,2014,33(10):100-101.
- [7] 舒遵华,王国强,黎明全,等. 耳针治疗椎-基底动脉供血不足疗效观察[J]. 中国针灸,2014,34(12):1161-1164.
- [8] 孙晶. 针灸治疗脑缺血再灌注损伤炎症反应的研究进展[C]//浙江大学,嘉兴学院. 2012 年浙江省针灸学会年会暨学术交流会议论文集汇编,2012:6.
- [9] 史敏. 针灸对脑缺血保护作用机制综述[J]. 内蒙古中医药,2014,33(10):105.
- [10] 朱靛贤,王彩虹. 耳穴贴压应用于脑卒中可干预危险因素的临床研究进展[J]. 上海针灸杂志,2010,29(2):127-130.
- [11] 叶明柱,冯永昌. 试论耳穴“神门”[J]. 中国针灸,2002,22(增刊):208-210.
- [12] 包玉龙,朱竟赫,范英兰,等. 线栓法与改良三氯化铁法致大鼠大脑中动脉闭塞模型的对比研究[J]. 动物医学进展,2014,35(5):65-70.
- [13] 陈峰,杨易平,盛燮荪,等. 针刺耳神门穴治疗脑动脉硬化症的临床研究[J]. 中医杂志,1999,40(10):344-356.
- [14] 雷茹,王颖. 缺血性中风的针灸疗法研究进展[J]. 黑龙江中医药,2015,44(1):63-64.
- [15] 陈峰,戴晴,杨易平,等. 耳神门穴对脑动脉硬化症患者椎-基底动脉血流的即时作用观察[J]. 中国针灸,1997,17(12):717-718.
- [16] 窦如海. 动物的耳廓与耳穴穴位[M]. 济南:实验动物与动物实验技术,1992:81-84.
- [17] 陶静,邹榆龙,洪江从,等. 脑卒中大鼠模型的行为学评测方法概述[J]. 亚太传统医药,2013,9(3):73-74.
- [18] Karatas H, Erdener SE, Gursoy-Ozdemir Y, et al. Thrombotic distal middle cerebral artery occlusion produced by topical FeCl₃ application: a novel model suitable for intravital microscopy and thrombolysis studies [J]. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism, J Cereb Blood Flow Metab, 2011, 31(6):1452-1460

(收稿日期:2017-05-01)

(本文编辑:董历华)