

经皮穴位电刺激对力竭运动大鼠海马、中脑 5-HT 及代谢产物含量影响的机制*

方剑乔¹ 梁 宜¹ 汪存信¹ 邵晓梅¹

摘要 目的:观察经皮穴位电刺激(TEAS)抗运动性疲劳的中枢 5-HT 机制。方法:27 只雄性 SD 大鼠随机分为安静对照组、运动组和 TEAS 组,每组 9 组。应用跑台建立运动性疲劳模型,TEAS 治疗选用大鼠“后三里”穴(相当于人类的“足三里”穴),刺激参数:连续波、频率 2Hz、强度 5mA、时间 30min,左右交替,每日 1 次,连续治疗 7d。力竭运动后,记录力竭运动时间;用乳酸氧化酶法测定血浆乳酸含量;高效液相-电化学法(HPLC-ECD)测定脑内 5-HT、5-HIAA 含量。结果:TEAS 组力竭运动时间显著长于运动组($P<0.05$);运动组血浆乳酸含量显著高于安静对照组和 TEAS 组($P<0.05$);各组间海马和中脑 5-HT 含量比较差异无显著性($P>0.05$),但 TEAS 组大鼠海马 5-HIAA 含量明显高于安静对照组($P<0.01$),运动组大鼠中脑 5-HT/5-HIAA 比值显著高于 TEAS 组($P<0.01$)和安静对照组($P<0.05$)。结论:促进海马、中脑 5-HT 代谢速率可能是 TEAS 抗运动性疲劳的中枢机制之一。

关键词 运动性疲劳;经皮穴位电刺激;乳酸;海马;中脑;5-羟色胺;5-吲哚乙酸

中图分类号:R493 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2009)-03-0193-04

The mechanism of transcutaneous electrical acupoint stimulation on hippocampal and mesencephalic 5-HT and 5-HIAA contents in rats with exhaustive exercises/FANG Jianqiao, LIANG Yi, WANG Cunxin, et al// Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2009, 24(3): 193—196

Abstract Objective: To investigate the central 5-HT mechanism of transcutaneous electrical stimulation (TEAS) in treating exercises-inducing fatigue in rats. **Method:** Twenty-seven adult male SD rats were randomly divided into normal group, model group and TEAS group, 9 rats in each group. The rat model of exercises-inducing fatigue was established by treadmill running. TEAS (continuous wave, 2Hz, 5mA) was applied to unilateral (left and right alternately) Zusanli (ST 36) acupoint for 30min, once daily for 7d. Time for inducing exhaustion were recorded on the 7th. Plasma lactate levels were measured by lactate oxidase method. Both 5-HT and 5-HIAA contents in brain tissue were detected by HPLC-ECD. **Result:** TEAS at point Zusanli (ST 36) not only significantly prolonged the time for inducing exhaustion($P<0.05$), but also reduced plasma lactate levels markedly in rats with exercises-induced fatigue($P<0.05$). The 5-HT contents in hippocampus and mesencephalon showed no statistically significant difference among all the observed groups ($P>0.05$). However, compared with normal group, hippocampal 5-HIAA contents in TEAS group increased significantly ($P<0.01$), while mesencephalic 5-HT/5-HIAA ratios in model group were higher markedly than those in TEAS group($P<0.01$) and normal group($P<0.05$). **Conclusion:** This study indicates that TEAS may postpone exercises-inducing fatigue by accelerating the metabolism of 5-HT in hippocampus and mesencephalon.

Author's address The Third Clinical Medical College, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou, 310009

Key words exercises-inducing fatigue; transcutaneous electrical acupoint stimulation; lactate; hippocampus; mesencephalon; 5-hydroxytryptamine; 5-hydroxyindoleacetic acid

克服运动性疲劳一直是运动医学研究的难点和热点。由于某些运动性疲劳的出现并不能用肌肉本身的功能失调来解释,目前认为运动性疲劳的发生机制主要包括存在于肌肉本身的外周机制和存在于大脑的中枢机制。越来越多的证据表明,运动性疲劳与中枢神经系统密切相关,认为运动可造成中枢疲劳^[1-2]。自 1987 年 Newsholme 提出中枢性疲劳假说以来,5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)被认为是导致运动性中枢疲劳众多递质中反应最为明显的

递质。多项研究表明^[3-4],持续运动可导致海马等多个核团 5-HT 及其代谢产物 5-羟吲哚乙酸(5-hydroxyindole-acetic acid, 5-HIAA)含量增高。

经皮穴位电刺激(transcutaneous electrical acupoint stimulation, TEAS)是一种由经皮电神经刺

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(30572412)

1 浙江中医药大学第三临床医学院,杭州市庆春路 23 号,310009

作者简介:方剑乔,男,博士,教授

收稿日期:2008-08-21

激 (transcutaneous electrical nerve stimulation, TENS) 与针灸穴位疗法相结合的新型针灸治疗方法,具有无创伤、易操作、患者易接受和活动不受限制等优势。以往实验研究提示^[5-6]:TEAS“后三里”穴具有良好的抗大鼠运动性疲劳效应,但对于 TEAS 抗运动性疲劳的深层次的中枢机制研究目前未见报道。本实验采用五级递增跑台运动建立力竭运动动物模型,深入探讨 TEAS 抗运动性疲劳相关的中枢 5-HT 机制,旨在为 TEAS 在人体运动医学中的广泛应用提供实验研究基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

健康成年清洁级雄性 SD 大鼠 27 只,体重 300 ± 20 g,由浙江中医药大学实验动物中心提供。将实验大鼠随机分为安静对照组、运动组和 TEAS 组,每组 9 只。

1.2 仪器及试剂

LH202H 韩氏穴位神经刺激仪 (北京),SLY-RTML 六通道动物跑台 (北京),高效液相色谱仪 (美国),电化学检测器 (美国),MD-150 ODS-C18 柱 ($3.2\text{mm} \times 150\text{mm}$, $3\mu\text{m}$, ESA 公司),PURELAB UHQ 超纯水机 (美国)。5-羟色胺硫酸肌酐盐 (5-HT)、5-羟吲哚乙酸 (5-HIAA)、1-辛烷磺酸钠、三乙胺 (TEA)、四乙酸乙二胺 (EDTA) 均购自 Sigma 公司; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 购自 Merck 公司。

1.3 造模方法

大鼠适应性喂养 3d 后,运动组大鼠进行 1 周 5 级递增跑台运动:适应性训练在坡度为 5° 的跑台上,分别以 10、15、20、24、28m/min 的速度各运动 10min,每日 1 次,共 6d;第 7 天按训练模式运动至 28m/min 后持续运动直至力竭。力竭标准为动物不能坚持负荷跑速,滞留跑台后 1/3 处达 3 次以上,刺激驱赶无效 (10s)^[7]。TEAS 组有 1 只大鼠在适应性训练第 1 天拒绝跑台运动,故予以剔除。

1.4 处理方法

TEAS 组大鼠运动前在单侧“后三里”^[8] (相当于人类的“足三里”穴,位于膝关节后外侧,在腓骨小头下约 5mm 处) 与同侧小腿下 1/3 处前外侧缘非穴位处进行 TEAS 治疗:将小腿局部毛剃除,用医用胶布将自制的经皮探头 ($0.5\text{cm} \times 0.5\text{cm}$) 固定于相应部位,治疗参数为连续波、频率 2Hz、强度 5mA、治疗 30min,左右交替,每日 1 次,连续治疗 7d。运动组则给予与 TEAS 组相同的运动和固定处理;安静对照组不做任何处理,仅每天适应跑台环境 30min。

1.5 记录力竭时间

运动第 7 天,从大鼠开始运动到力竭标准出现的这段时间记作力竭运动时间。

1.6 血浆乳酸含量测定

大鼠力竭后即刻,用 2%戊巴比妥钠以 60mg/kg 的量腹腔注射麻醉,经腹主静脉采血,每毫升血用 2.5mg 氟化钠和 2.0mg 草酸钾抗凝,3000r/min 离心 20min 后取上清,置全自动生化分析仪检测。

1.7 海马和中脑 5-HT、5-HIAA 含量测定

1.7.1 样本提取: 大鼠处死后断头,置冰袋上迅速分离出海马和中脑,置 -80°C 冻存;精确称重,每 100mg 脑组织加 1ml 0.1M HClO_4 (含 0.02%EDTA) 溶液,剪碎,冰浴中超声粉碎;脑匀浆液 4°C 静置 10min 后;于 15000r/min 低温离心 15min;取上清液,经 $0.22\mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤后分装, -80°C 冻存,以待 HPLC-ECD 检测。

1.7.2 色谱条件 (根据 Singer 等^[9]报道略改进): 色谱柱: MD-150 ODS-C18 柱;流动相: 75mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1.7mM 1-辛烷磺酸钠, $100\mu\text{L/L}$ TEA, 25mM EDTA, 10%乙腈;流速: 0.6mL/min ;柱温: 32°C ;电化学检测器参数: E_1 : -150mV ; E_2 : $+220\text{mV}$; EGC: $+270\text{mV}$;全量程 (full scale/range): $1\mu\text{A}$;过滤时间常数 (filter time constant): 5mA ;信号输出电压 (signal output voltage): 1.0V , Ag/AgCl 为参比电极。

1.8 统计学分析

实验数据以均数 $\pm$ 标准差表示,用 SPSS12.0 统计软件分析。两组间比较采用独立样本 t 检验;多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 SNK 检验。均以 $P < 0.05$ 作为显著性差异的标准。

2 结果

2.1 TEAS 对大鼠力竭运动时间的影响

大鼠运动至力竭后,出现呼吸急促、神情倦怠、俯卧位、捕捉反应消失等表现。实验结果显示,TEAS 组 ($70.88 \pm 13.74\text{min}$) 大鼠力竭运动时间显著长于运动组 ($56.00 \pm 12.27\text{min}$),差异有显著性意义 ($P < 0.05$),说明 TEAS 可显著延长实验大鼠运动时间。

2.2 TEAS 对力竭运动大鼠血浆乳酸含量的影响

运动组 ($3.69 \pm 0.94 \text{ mmol/L}$) 血浆乳酸较安静对照组 ($2.48 \pm 0.80 \text{ mmol/L}$) 显著升高 ($P < 0.05$);与运动组比较,TEAS 组 ($2.82 \pm 0.49 \text{ mmol/L}$) 大鼠血浆乳酸明显降低 ($P < 0.05$),接近安静对照组大鼠 ($P > 0.05$),表明 TEAS 有利于促进运动后血浆乳酸的清除。

2.3 TEAS 对力竭运动大鼠海马和中脑 5-HT、5-HIAA 含量的影响

见表 1。HPLC-ECD 检测结果显示: 运动组和 TEAS 组大鼠海马中 5-HT 含量较安静对照组均呈升高趋势, 但无显著性差异 ($P>0.05$); TEAS 组大鼠海马中 5-HIAA 含量明显高于安静对照组 ($P<0.01$), 与运动组比较无明显差异 ($P>0.05$); 进一步观测实验大鼠海马组织中 5-HT/5-HIAA 比值表明:

TEAS 组与运动组和安静对照组相比, 有下降趋势, 但并不显著 ($P>0.05$)。TEAS 组大鼠中脑 5-HT 含量较之安静对照组、运动组略有下降, 但无显著差异 ($P>0.05$); 各组间中脑 5-HIAA 含量 $P>0.05$; 然而运动组大鼠中脑 5-HT/5-HIAA 比值显著高于 TEAS 组 ($P<0.01$) 和安静对照组 ($P<0.05$)。

表 1 TEAS 对力竭运动大鼠海马和中脑 5-HT、5-HIAA 含量及其比值的影响

($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	海马			中脑		
		5-HT (ng/g 组织湿重)	5-HIAA (ng/g 组织湿重)	5-HT/5-HIAA	5-HT (ng/g 组织湿重)	5-HIAA (ng/g 组织湿重)	5-HT/5-HIAA
安静对照组	9	387.08±85.69	184.47±37.11	2.12±0.36	858.91±179.91	392.26±75.50	2.20±0.30
运动组	9	446.62±80.20	202.64±37.47	2.22±0.24	838.22±333.12	345.76±176.38	2.63±0.54 ^①
TEAS 组	8	448.32±63.71	240.32±38.87 ^①	1.89±0.32	770.00±260.37	406.74±181.89	1.97±0.29 ^②

①与安静对照组比较 $P<0.05$, ②与运动组比较 $P<0.01$

3 讨论

运动性疲劳 (exercises-induced fatigue, EIF) 是指机体生理过程不能持续其机能在一特定水平上和/或不能维持预定的运动强度^[10], 属于中医“虚劳”、“劳倦”、“劳伤”等范畴。目前运动性疲劳的恢复多采用营养学的手段和局部肌肉的放松疗法, 以改善代谢、进行能量补充和调节外周神经肌肉系统。随着竞技体育的飞速发展, 寻求一种疗效显著 (对抗疲劳或促进疲劳恢复)、安全可靠 (不含兴奋剂、无毒副作用)、简便易行的治疗方法是国内外运动训练科学和运动医学领域中最为重要的亟待解决的问题; 关于各种治疗手段抗运动性疲劳和促疲劳恢复的机制研究也已成为当今运动医学的研究热点。

TEAS 是目前一种新型的针灸疗法, 既运用了 TENS 的物理治疗方法, 又结合了穴位的特异性治疗^[11-12]。该疗法突破了传统针灸的有创疗法, 更利于广泛应用, 在实验中, 我们观察 TEAS“后三里”穴后可显著延长实验大鼠的运动时间, 这与我们以往研究结果一致^[3]。乳酸是体内糖无氧代谢的终产物, 通常被用做反映运动能力的一种生化指标, 被广泛应用于运动员运动能力评价和训练强度的监控^[13]。有研究报道 TEAS 对运动时大鼠血糖乳酸有明显影响^[14]。我们在实验中亦观察到 TEAS 能显著降低力竭运动引起的血浆乳酸升高, 提示 TEAS 能有效提高乳酸的清除能力、减少乳酸堆积, 从而消除运动性肌肉疲劳。

5-HT 又称血清素 (serotonin), 属单胺类神经递质之一。脑内 5-HT 属于中枢抑制性神经递质, 长时间运动引起的脑 5-HT 升高可导致中枢兴奋性下降, 从而减少中枢向外周冲动的发放, 降低运动能力, 故认为 5-HT 是参与中枢疲劳发生的关键神经递质。5-HIAA 作为 5-HT 的代谢产物, 其脑内水平的变化反映 5-HT 分解代谢的状况, 通常神经递质与其主要代谢产物比值降低意味着神经递质更新率

提高或说明神经元活性增强。我们在实验中不但观测力竭运动大鼠海马和中脑 5-HT、5-HIAA 水平, 而且对各脑区 5-HT/5-HIAA 比值进行了分析。实验结果显示: 力竭运动后即刻, 运动组大鼠海马 5-HT 和 5-HIAA 水平有高于安静对照组的趋势, 并无显著差异, 与王斌等的研究结果一致^[15]。Wilson 等^[16]研究发现跑台运动大鼠海马细胞外液中 5-HT 含量显著高于安静大鼠, 但是这种升高只发生在那些跑台训练学习较慢且运动距离较短的大鼠上; 对于学习较快且运动距离较长的大鼠上, 却不存在升高现象, 由此推测海马内 5-HT 升高不显著可能是由于实验大鼠在力竭运动前曾接受连续 6d 的运动训练有关。TEAS 组大鼠运动即刻后海马 5-HT 水平略有升高, 5-HIAA 水平则升高显著, 5-HT/5-HIAA 比值降低, 表明 TEAS“后三里”穴可促进力竭运动大鼠海马 5-HT 分解代谢。实验中我们观察到力竭运动对实验大鼠中脑 5-HT、5-HIAA 含量干预并不明显, 与以往实验研究结果较为一致^[17-18]; 中脑 5-HT 在力竭运动后略有下降的趋势, 王斌等^[19]在实验研究亦观察到类似现象, 认为中脑可能因为 5-HT 的减少而表现为一定的兴奋性; 进一步观测中脑 5-HT/5-HIAA 比值, 发现运动组显著高于 TEAS 组和安静对照组, 表明运动性疲劳的产生与中脑内 5-HT 代谢速率减慢有关, TEAS“后三里”穴可显著促进中脑 5-HT 代谢为 5-HIAA, 从而发挥抗运动性疲劳作用。由此推测, TEAS 对力竭运动大鼠脑内 5-HT 水平及其代谢能力的干预可能存在着区域非均衡性。

综上所述, TEAS“后三里”穴能延长大鼠运动时间、促进血浆乳酸清除从而发挥有效抗运动性疲劳效应; 促进海马、中脑 5-HT 代谢速率可能是 TEAS 抗运动性疲劳的中枢机制之一。

参考文献

[1] 梁宜, 方剑乔. 5-羟色胺系统与运动中枢疲劳 [J]. 中国康复医

- 学杂志, 2008,23(2):176—178.
- [2] 张婧,熊正英. 运动中中枢疲劳的生物学机制 [J]. 体育学刊, 2003,10(5):42—44.
- [3] Blomstrand E, Perrett D, Parry-Billings M, et al. Effect of sustained exercise on plasma amino acid concentrations and on 5-hydroxytryptamine metabolism in six different brain regions in the rat [J]. Acta Physiol Scand, 1989,136(3):473—481.
- [4] Chaouloff F, Laude D, Elghozi JL. Physical exercise: evidence for differential consequences of tryptophan on 5-HT synthesis and metabolism in central serotonergic cell bodies and terminals [J]. J Neural Transm, 1989,78(2):121—130.
- [5] 吴立红,方剑乔,邵晓梅. 经皮穴位电刺激足三里对抗大鼠运动性疲劳 [J]. 中国临床康复, 2005,9(40): 114—117.
- [6] 梁宜,方剑乔,汪存信,等. 经皮穴位电刺激对力竭运动大鼠血浆超氧化物歧化酶和丙二醛的影响 [J]. 针刺研究, 2008,33(2): 120—123.
- [7] 王斌,张蕴琨,蒋晓玲,等. 力竭运动对大鼠纹状体、中脑及下丘脑单胺类物质含量的影响 [J]. 中国运动医学杂志, 2002,21(3):248—252.
- [8] 李忠仁. 实验针灸学 [M]. 北京:中国中医药出版社, 2003.327.
- [9] Singer S, Rossi S, Verzosa S, et al. Nicotine-induced changes in neurotransmitter level in brain areas associated with cognitive function [J]. Neurochem Res, 2004,29(9):1779—1792.
- [10] 戴艳. 关于运动性疲劳的研究 [J]. 吉林师范大学学报(自然科学版), 2003,24(3): 118—120.
- [11] 方剑乔,赵天征,陈海英. 经皮穴位电刺激“足三里”穴对大鼠胶原性关节炎的治疗作用 [J]. 针刺研究, 2001,26(1):21—24.
- [12] Wang B, Tang J, White PF, et al. Effect of the intensity of transcutaneous acupoint electrical stimulation on postoperative analgesic requirement [J]. Anesth Analg, 1997,5(2):406—413.
- [13] Jemni M, Sands WA, Friemel F, et al. Effect of active and passive recovery on blood lactate and performance during simulated competition in high level gymnasts [J]. Can J Appl Physiol, 2003,28(2):240—256.
- [14] 吴立红 李爱萍 林建强. 经皮穴位电刺激疗法对运动时大鼠血糖乳酸的影响[J].中国康复医学杂志,2007,22(1):63—64.
- [15] 王斌,张蕴琨,白宝丰,等. 运动应激对大鼠海马去甲肾上腺素、5-羟色胺及前体氨基酸的影响 [J]. 南京体育学院学报, 2005,4(4):34—37.
- [16] Wilson WM, Marsden CA. In vivo measurement of extracellular serotonin in the ventral hippocampus during treadmill running [J]. Behav Pharmacol, 1996,7(1):101—104.
- [17] 王斌,张蕴琨,蒋晓玲. 耐力训练后纹状体、中脑和下丘脑单胺类神经递质的变化 [J]. 中国临床康复, 2005,9(44):126—129.
- [18] 宋亚军,孙勤枢,王宁,等. 益气升阳、活血安神中药复方对急性耐力运动后大鼠不同脑区单胺类神经递质的影响 [J]. 中国运动医学杂志, 2004,23(1):38—41.
- [19] 王斌,张蕴琨,李靖,等. 力竭运动对大鼠纹状体、中脑及下丘脑单胺类神经递质含量的影响 [J]. 中国运动医学杂志, 2002,21(3):248—252.

2009 年康复医学新技术与新进展国际研讨班招生通知

随着科学技术的进步,神经生理学、神经生物学、功能神经影像学、计算机学、生物工程学等学科的发展,极大地推动了康复医学的快速前进,特别是各种新技术的应用给康复医学带来了新的气息。在传统治疗的基础上,各种康复新技术的应用有助于提高康复治疗效果,带来良好的经济效益和社会效益。推广先进的康复治疗技术是康复医学发展的需要。由中国医师协会康复医师分会、首都医科大学宣武医院举办的“2009 年康复医学新技术与新进展国际研讨班”于 2009 年 5 月在北京举行,届时将邀请美国纽约大学 Rusk 康复中心 Bryan O'young 教授、美国约翰·霍普金斯大学康复系 Zorowitz 教授、德国 Orthotrain Berlin 骨科和运动损伤康复医院 Oliver Kieffe 教授、德国科隆体育大学康复医院 PT 长 Eibo Schwitters 教授等国内外知名康复专家介绍最新的康复治疗技术和新进展。

授课主要内容:卒中康复治疗的新进展;脑损伤植物状态促醒研究的新进展;经颅磁刺激(TMS)在康复医学中的应用;功能性电刺激(FES)在康复医学中的应用;骨科康复治疗技术的基本理论及新进展;骨科康复治疗的临床原则实例;下腰背疼痛的康复、前十字交叉韧带重建术后的康复;肩痛的康复;疼痛的康复治疗技术及最新进展;康复治疗技术的新动态;失语症心理语言评价及吞咽障碍评价治疗技术进展;临床各种康复治疗新技术实习。

培训对象:康复科医师、治疗师、神经科医师、骨科医师以及相关临床、科研及治疗人员;**报到时间:**2009 年 5 月 7 日;**报到地点:**大府宾馆(北京市宣武区长椿街 45 号);**培训地点:**首都医科大学宣武医院(大府宾馆斜对面);**培训时间:**2009 年 5 月 8—10 日;**收费标准:**培训费 1000 元(包括学费和资料费),住宿费、膳食费、差旅费及往返车船机票自理。

培训结束后,将授予国家级继续教育 I 类学分及培训合格证书;届时符合条件人员可以现场办理中国医师协会康复医师分会会员证(会员费 100 元)。请于 2009 年 4 月 20 日前将报名回执寄到:北京市宣武区长椿街 45 号宣武医院康复医学科,100053,张艳明收;欢迎电话报名和电子邮件报名,咨询电话:010-83198326,手机:13641026802,传真:010-83156838;联系人:张艳明;电子信箱:kfysfh@yahoo.cn。

中国医师协会康复医师分会 首都医科大学宣武医院