

实验研究 EXPERIMENTAL STUDY

井穴放血对急性高原缺氧大鼠
视网膜组织HIF-1 α 、VEGF的影响*常晴晴 杨艳^{*} 洒玉萍 廖晓

(青海大学医学院, 青海 西宁 810016)

摘要:目的 观察急性高原缺氧条件下视网膜各项指标的变化规律,探讨井穴点刺放血疗法对急性高原缺氧的干预机制。方法 随机将健康SD大鼠分成3组:低氧模型组、低氧+井穴放血干预组及常氧对照组,前2组又分为6 h、24 h、48 h、72 h这4个亚组,每组4只,采用动物实验模拟舱制备大鼠急性视网膜缺氧模型,低氧+井穴放血干预组进行井穴放血预处理。使用苏木精-伊红(HE)染色法观察大鼠视网膜组织的损伤情况,用酶联免疫吸附实验(ELISA)法检测血清缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)及视网膜组织血管内皮生长因子(VEGF)的含量。结果 与常氧对照组相比,低氧模型组各时点血清VEGF、HIF-1 α 含量升高,各时点视网膜均有不同程度的损伤;与同时点低氧模型组比较,低氧+井穴放血干预组视网膜损伤程度较轻,各时点视网膜血清VEGF、HIF-1 α 含量降低,差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。结论 井穴点刺放血法干预可改善急性视网膜缺氧所致的损伤,其机制可能与降低血清VEGF、HIF-1 α 的含量相关。

关键词:井穴放血疗法;急性高原缺氧;视网膜;实验研究

doi:10.3969/j.issn.1672-2779.2024.01.045

文章编号:1672-2779(2024)-01-0142-04

Effect of Jing Acupoint Bloodletting on HIF-1 α and VEGF in Acute Plateau Hypoxic RatsCHANG Qingqing, YANG Yan^{*}, SA Yuping, LIAO Xiao

(Medical College, Qinghai University, Qinghai Province, Xining 810016, China)

Abstract: Objective To observe the changes of various retinal indexes under the plateau acute hypoxia conditions, and to explore the intervention mechanism of the plateau acute hypoxia therapy. **Methods** Healthy SD rats were randomly divided into hypoxic model group, hypoxia + Jing acupoint bloodletting intervention group and hypoxia model group. The first two groups were further divided into four subgroups as 6h, 24h, 48h and 72h. There were four individuals in each group. Using rat acute retinal hypoxia, Jing acupoint bloodletting intervention group performed pretreatment with Jing acupoint bloodletting. Rat retinal tissue damage was subsequently visualized using HE staining, Serum hypoxia-induced factor-1 α (HIF-1 α) and ELISA analysis of the vascular endothelial growth factor (VEGF) content. **Results** Compared with normal oxygen control group, the content of serum VEGF and HIF-1 α were increased at all time points in hypoxia model group, and the retina was damaged to different degrees at all time points. Compared with the simultaneous point hypoxia model group, the degree of retinal damage in the hypoxia + Jing acupoint bloodletting intervention group was less, and the contents of VEGF and HIF-1 α in retinal serum were decreased at each time point, and the difference was statistical significance ($P < 0.05$). **Conclusion** Jing acupoint bloodletting can improve the injury caused by acute retinal hypoxia, and its mechanism may be related to the decrease of serum VEGF and HIF-1 α content.

Keywords: Jing acupoint bloodletting; acute plateau hypoxic; retina; experimental study

不同海拔的高原会对人体造成不同的影响。据调查^[1],人体位于1500~1800 m的环境中时,会出现非显性的生理和病理变化;而位于3000 m以上的海拔高度时,人体可明显感受到缺氧刺激,使细胞、组织、器官均处于缺氧应激状态。其中,大脑是对缺氧最为敏感的人体组织器官,其次就是视觉系统。从组织胚胎学的角度来看,视网膜被视为中枢神经系统的延伸,二者的结构有很多相似的部分^[2]。在急性缺氧条件下,可出现视

盘水肿及视网膜出血;长时间处于缺氧环境当中,还可致使视网膜进一步缺血缺氧,破坏血-视网膜毛细血管屏障,最终引发高原视网膜病变(High altitude retinopathy, HAR)^[3]。HAR最早是由Singh^[4]提出。研究^[5, 6]显示,井穴放血疗法可显著缓解急性高原缺氧所致海马损伤以及保护脑缺血急性期的神经细胞。研究针灸对视网膜急性缺氧后视神经影响的分子机制,是运用针灸治疗急性缺氧疾病的关键切入点^[7, 8]。本实验建立大鼠高原缺氧模型,并采用井穴放血疗法进行提前干预,从而探讨其对急性高原缺氧的作用机制以及对急性高原缺氧大鼠防护作用的分子机制。

* 基金项目:青海大学中青年科研基金项目[No. 2018-QYY-4];国家自然科学基金项目[No. 81760890];青海大学医学部教育改革项目[No. 2020]

✉通信作者:1336287338@qq.com

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组 健康SD大鼠36只，体质量(200±20)g，来自西安交通大学动物中心[许可证号：scxk(陕)2018-001]，自然饲养2d，自然照明，自由摄食、饮水。常规外眼及眼底检查均正常。将大鼠随机分为3组：常氧对照组4只、低氧模型组16只(再分为D6、D24、D48、D72组，每组4只)、低氧+井穴放血干预组16只(再分为S6、S24、S48、S72组，每组4只)。常氧对照组在2260m海拔的常氧环境里喂养(西宁)，模型组给予井穴放血预处理。

1.2 主要试剂及仪器 盐酸(成都市科龙化工试剂厂)、10%水合氯醛(成都市科隆化学有限公司)和4%多聚甲醛溶液(西安化学试剂厂)，冰冷无菌PBS(上海远慕生物)，台式离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司)，酶标仪(美谷分子仪器有限公司)，封板试剂(天津市瑞金特化学品有限公司)，苏木精-伊红(HE)染色液(G1005，武汉赛维尔生物科技有限公司)，光学显微镜(日本尼康公司)，实验动物低压氧舱(西安富康空气净化设备工程有限公司)，酶联免疫吸附实验(ELISA)试剂盒(上海茁彩生物科技有限公司)。

1.3 干预方法 井穴放血干预组：一人固定大鼠头部和尾部，另一人分别点刺大鼠双侧肢趾端的十二井穴，即手太阳肺经井穴少商、手厥阴心包经井穴中冲、手少阴心经井穴少冲、手阳明大肠经井穴商阳、手少阳三焦经井穴关冲、手太阳小肠经井穴少泽，每穴以用毫针点刺出血3~5滴为度，每日上午定时治疗1次，左右两侧交替进行，持续5d。

低氧模型组与常氧对照组：2组大鼠均予同样抓取1次，但不给予放血干预，共5d。

1.4 造模方法 在第6天将低氧模型组与低氧+井穴放血干预组的大鼠移入实验动物低压模拟舱内以制备急性视网膜缺氧模型，模拟仓内海拔7000m，温度(22±2)℃，湿度50%~60%，在舱内暴露相应时间(6h、24h、48h、72h)后出舱，根据大鼠视网膜损伤判定造模成功与否。

1.5 观察指标及检测方法 取材：第6天时取材常氧对照组、低氧模型组与低氧+井穴放血干预组大鼠。于相应时间(6h、24h、48h、72h)出舱后，立即麻醉，随后取出眼球，去除玻璃体和晶状体，完整剥离视网膜，最后将视网膜一部分置于-80℃低温保存，用于制作匀浆液；另一部分用4%多聚甲醛溶液固定，用于制作病理切片。

ELISA法检测：按照ELISA检测试剂盒使用说明书进行操作：(1)解冻、匀浆、离心再保存：解冻视网膜组织，取0.2g于试管中，加PBS缓冲液1.8mL，制备视网膜组织匀浆液(10%)，采用低温离心机离心15min，转速3000r/min，离心半径12cm；(2)稀释与加样、温育、配液、洗涤后静置：吸取上清液，再次加入PBS溶

液进行稀释，制作成组织匀浆液，浓度为1%，用封板膜封板，恒温温育30min，用蒸馏水稀释30倍，取下封板膜，甩干液体后滴上洗涤剂静置，反复操作后甩干；(3)加酶、温育、洗涤、显色、终止：加入酶标试剂，温育洗涤后加入显色剂A和显色剂B，恒温箱内避光显色15min，加终止液50μL，终止反应；(4)测值与计算：计算大鼠视网膜组织血清中血管内皮生长因子(VEGF)及低氧诱导因子-1α(HIF-1α)的含量。

视网膜HE染色观察：首先取片、烤片，再进行脱蜡、复水，用苏木精液染色及1%盐酸酒精分化，用流水冲洗至返蓝后镜检。接着进行脱水、透明，用中性树脂胶封片，最终观察结果并拍片。

1.6 统计学方法 采用SPSS 26.0统计软件处理数据，计量资料用($\bar{x} \pm s$)表示，采用t检验；计数资料以率(%)表示，采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3组大鼠视网膜组织病理变化比较 常氧对照组大鼠视网膜组织未见明显异常，组织细胞排列规则，形态正常，各层结构完整、清晰、厚度均匀，且核仁明显，无水肿表现，视网膜神经节细胞呈密集单层排列分布，细胞核大小形状不一，核内染色质均匀分布。

低氧模型组6h组大鼠视网膜可见神经节细胞部分轻度水肿，结构欠清楚；而24h、48h、72h的3组中，大鼠视网膜的各层组织水肿，疏松明显，多见空泡变性，细胞核减少，结构层次紊乱。

低氧+井穴放血干预组相较于同时点低氧模型组，视网膜损伤较轻，但仍有不同程度损伤。见图1。

2.2 3组大鼠视网膜血清VEGF、HIF-1α含量比较 与常氧对照组比较，低氧模型组大鼠的血清VEGF、HIF-1α含量明显增加($P < 0.01$)；与同时点低氧模型组比较，低氧+井穴放血干预组大鼠血清VEGF、HIF-1α含量明显下降($P < 0.01$)，差异均具有统计学意义($P < 0.01$)。见表1。

3 讨论

本研究视网膜组织病理变化表明，在海拔7000m的条件下暴露72h，能够较好地建立大鼠急性视网膜缺氧损伤模型，同时显示低氧+井穴放血干预组相较于同时点低氧模型组大鼠急性视网膜缺氧损伤的程度更轻。

《医宗金鉴》中载述，针刺商阳能治疗中风、突发晕厥、头晕目眩、痰液流涎，少商、关冲和商阳等井穴能够促进气血的运行，为抢救的关键要点^[9]。因井穴系阴阳经气相交之处，针刺此处可达到通调十二经之气的效果。回顾近年大量国内外关于针灸治疗缺血性脑卒中的研究^[10]，发现针灸可能是通过参与缺血性脑损伤后神经结构与功能的修复与重塑，来达到治疗缺血性脑卒中的目的。视网膜被视作神经中枢系统的延伸，对缺氧刺激极为敏感，针灸的放血治疗对于缺氧所致的视网膜

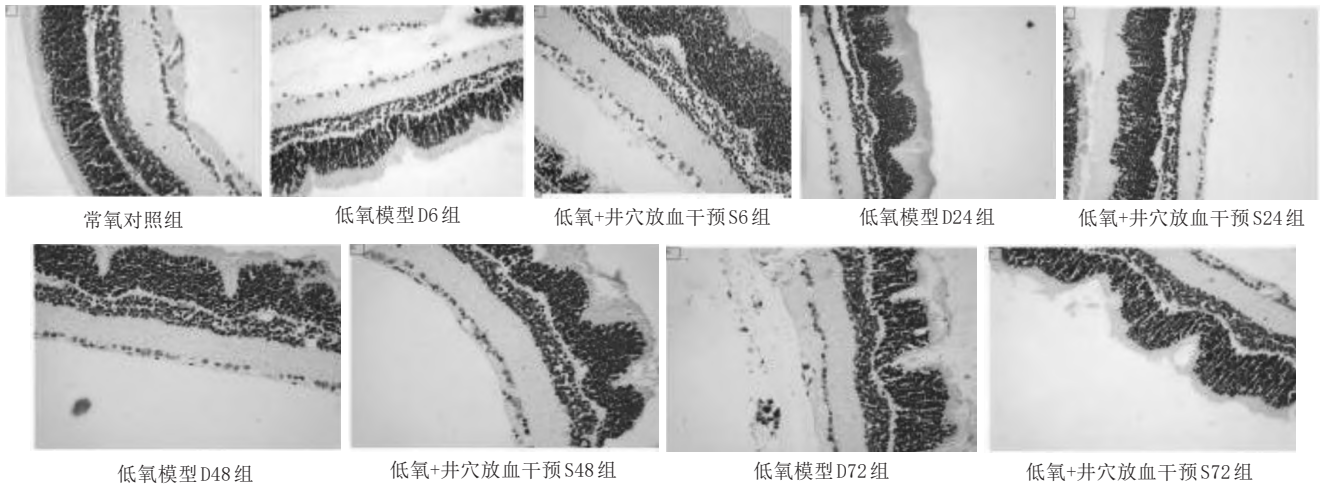


图1 各组大鼠视网膜组织病理变化(HE染色)

表1 各组大鼠视网膜血清VEGF、HIF-1 α 含量比较

($\bar{x} \pm s$, pg/g)

组别	鼠数	HIF-1 α	VEGF
常氧对照组	4	357.40 \pm 50.33	1038.40 \pm 50.33
低氧模型D6组	4	615.67 \pm 60.86 ¹⁾	2521.40 \pm 296.77 ¹⁾
低氧模型D24组	4	548.56 \pm 40.09 ¹⁾	2189.06 \pm 235.39 ¹⁾
低氧模型D48组	4	562.25 \pm 56.51 ¹⁾	1995.53 \pm 275.97 ¹⁾
低氧模型D72组	4	629.29 \pm 55.16 ¹⁾	2280.02 \pm 331.91 ¹⁾
低氧+井穴放血干预S6组	4	515.09 \pm 53.74 ²⁾	2018.06 \pm 214.42 ²⁾
低氧+井穴放血干预S24组	4	458.72 \pm 48.18 ²⁾	1376.64 \pm 353.62 ²⁾
低氧+井穴放血干预S48组	4	393.60 \pm 46.66 ²⁾	903.92 \pm 276.04 ²⁾
低氧+井穴放血干预S72组	4	395.75 \pm 47.19 ²⁾	689.74 \pm 224.09 ²⁾
F值		44.968	63.598
P值		<0.001	<0.001

注:与常氧对照组比较,¹⁾ $P < 0.01$;与同时点低氧模型组比较,²⁾ $P < 0.01$ 。

损伤改善效果明显^[11]。

HIF-1 α 是受缺氧调控的一种转录因子^[12]。有研究^[13]在光镜下观察各组大鼠的视网膜,发现缺氧模型组大鼠的视网膜在神经感觉层发生了水肿,以神经纤维层为著,此时大鼠神经节细胞出现肿胀且视网膜HIF的表达显著增多。本实验显示,正常大鼠视网膜血清HIF-1 α 、VEGF含量较低,而在模拟海拔7000m的环境中,大鼠血清HIF-1 α 、VEGF含量显著增加,且HIF-1 α 与VEGF的变化趋势基本相似,这也表明VEGF的表达受到了HIF-1 α 的调控。但低氧+井穴放血干预组与同时点低氧模型组比较,大鼠的视网膜血清HIF-1 α 、VEGF含量显著下降,这提示井穴放血可能通过降低视网膜新生血管中VEGF的表达来抑制VEGF mRNA、HIF-1 α ,从而减轻缺氧对视网膜组织造成的损伤,这对急性缺氧所致的视网膜损伤有一定的保护作用。井穴放血对于视网膜HIF-1 α 、VEGF mRNA表达的影响仍有待进一步研究^[14]。

综上所述,井穴放血对于急性缺血视网膜组织损伤有明显的保护作用,从分子机制观察,可能与降低视网膜

HIF-1 α 、VEGF含量有关。但本实验研究仅从视网膜血清HIF-1 α 、VEGF含量的角度研究井穴放血对视网膜损伤的保护作用,且大鼠的样本量相对偏少,后续仍需加大样本数量,对视网膜HIF-1 α 、VEGF的基因表达与调控及细胞线粒体机制等方面进行深入研究,为进一步阐释井穴放血治疗急性高原缺氧的作用机制奠定良好的基础。

参考文献

- [1] 王艳,高寒琦,陈富禄. 简论高原环境下影响对人体健康的因素[J]. 中国医学研究与临床,2008,6(4):37-39.
- [2] 马勇,李彬,王引虎,等. 慢性高原病与视网膜改变[J]. 高原医学杂志,2006,16(1):29-30.
- [3] SCHATZ A,WILLMANN G,FISCHER M D,et al. Electoretinographic assessment of retinal function at high altitude[J]. J Appl Physiol,2013,115(3):365-372.
- [4] SINGH I,KHANNA P K,SRIVASTAVA M C,et al. Acute mountain sickness[J]. N Engl J Med,1969,280(4):175-184.
- [5] 张静莎,郭义,耿连岐. 手十二井穴刺络放血、葱苡仁鼻饲联合亚低温对重型颅脑创伤影响的临床疗效评价的初步研究[J]. 世界中医药,2016,11(3):510-514.
- [6] 黄雅倩,李梦馨,王超,等. 井穴放血对急性高原缺氧脑损伤大鼠海

- 马线粒体自噬相关蛋白表达的影响[J]. 针刺研究, 2021, 46(4): 301-305.
- [7] 费霏. 缺血缺氧性视神经视网膜损伤的分子机制研究[D]. 西安: 第四军医大学, 2015.
- [8] IMRAY C, BOOTH A, WRIGHT A, et al. Acute altitude illnesses[J]. BMJ, 2011, 343: d4943.
- [9] 麻海英. “井穴”放血预处理对大鼠急性高原肺损伤 Ang II、ACE、ET-1 的影响[D]. 西宁: 青海大学, 2021.
- [10] 朱岩岩, 许晨, 王利春. 针刺治疗脑卒中后吞咽障碍临床研究进展[J]. 中国中医药信息杂志, 2022, 29(10): 150-153.
- [11] 逢凤凤. 刺络放血治疗视网膜静脉阻塞性黄斑水肿的临床观察[D]. 济南: 山东中医药大学, 2018.
- [12] 王莘莘, 孔繁平, 陈学群, 等. 低氧细胞应激的 HIF-1 信号通路[J]. 浙江大学学报(医学版), 2011, 40(5): 559-566.
- [13] 党鸿, 辛晓蓉. 急进高原大鼠视网膜功能变化及白藜芦醇干预效应研究[J]. 青海医学院学报, 2016, 37(4): 217-221.
- [14] 郝晓凤, 谢立科, 胥静, 等. 祛瘀通络方对 RVO 大鼠视网膜 HIF-1 α 、VEGF mRNA 表达的影响[J]. 中国中医眼科杂志, 2020, 30(11): 767-771.
- (本文责编: 刘言言 本文校对: 王仁媛 收稿日期: 2022-04-15)

牛蒡多糖的保湿性研究*

陈希瑞^{1,2} 张超杰² 张伟² 陈靠山^{1*}

(1. 山东大学生命科学院, 山东 济南 250100; 2. 山东博德医药研究院有限公司, 山东 德州 253084)

摘要: 此实验通过牛蒡多糖液对大鼠皮肤致敏性的评价, 发现该配方无致敏性。通过牛蒡多糖溶液对大鼠皮肤含水量影响的测定, 确定了牛蒡多糖具有一定的保湿能力, 并且随其浓度的升高, 保湿能力越强。实验表明, 牛蒡多糖不仅具有较强的皮肤保湿性, 在一定浓度范围内, 可以提高皮肤透明质酸(HA)和胶原蛋白的含量; 同时可以改善实验动物皮肤的含水量, 并且无致敏性, 可以作为一种天然安全的化妆品原料。

关键词: 牛蒡多糖; 保湿; 致敏性; 实验研究

doi:10.3969/j.issn.1672-2779.2024.01.046

文章编号: 1672-2779(2024)-01-0145-03

Study on Moisturizing Properties of Burdock Polysaccharide

CHEN Xirui^{1,2}, ZHANG Chaojie², ZHANG Wei², CHEN Kaoshan^{1*}

(1. School of Life Science, Shandong University, Shandong Province, Jinan 250100, China;

2. Shandong Burdock Medicine Research Institute, Shandong Province, Dezhou 250371, China)

Abstract: Through the burdock polysaccharide moisturizing solution to the evaluation of rat skin sensitization, it is found that the solution has no sensitization. Through the determination of water content in rat skin. The results showed that the burdock polysaccharide has a certain moisturizing ability, with the increase of its concentration the higher the level, the stronger the inhibitory ability. In conclusion, burdock polysaccharide has strong skin moisturizing ability, and can improve the water content of rat skin. It is non-sensitizing to the skin, safe and reliable, and can be used as a moisturizing ingredient used in cosmetic formulations.

Keywords: burdock polysaccharide; moisturizing; sensitization; experimental study

牛蒡 (*Arctium lappa* L.), 作为菊科牛蒡属直根系二年生大型草本植物, 根鲜嫩多汁、营养丰富^[1]; 既是食材, 也被作为中药用于治疗疾病^[2]。牛蒡菊糖灌胃可使酒精损伤小鼠的肝脏质量、肝指数显著降低^[3]; 牛蒡根中水溶性膳食纤维菊糖、绿原酸等组分也具有较弱的抗氧化活性^[4]; 相关研究^[5]表明, 以果蝇为动物模型进行的动物生存实验, 牛蒡根可以在一定程度上延缓衰老; 牛蒡叶多糖通过清除 DPPH 自由基, 对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌均有较明显的抑制作用^[6]。由此可见, 无论从细胞水平还是动物水平, 从牛蒡根部获得的化合物都有很重要的研究价值。

多糖由单糖以糖苷键连接而成^[7]。人类皮肤中的黏多糖主要包括透明质酸(HA)、硫酸软骨素和肝素等。其中

大部分多糖通过发挥各自的生物学功能来影响细胞的生命活动, 如机体免疫能力的提高, 机体抗衰老能力的提高, 抵抗肿瘤、病毒能力的改善和凝血功能的改善等^[8]。另外, 由于多糖本身的化学结构为多羟基, 从而使得多糖具备很强的吸水性、乳化性、高黏度等特性, 并且这些特性正是化妆品保湿原料所需要的。随着大众消费观念的改善, 普众对护肤的层次要求越来越高, 因此就要求化妆品的品质有相应的提高, 所以具备天然、有效、安全特性的护肤品越来越受到大众的瞩目。因此, 从动植物中提取天然组分, 作为保湿剂应用于化妆品, 成为保湿化妆品的发展趋势。本研究中的牛蒡根低聚菊糖, 根据前期郝林华等^[9]的研究成果表明是由糖苷键相连, 由葡萄糖和果糖链接形成的聚合度为13的低聚果糖。作为天然多糖, 牛蒡多糖易溶于水、无毒副作用, 广泛应用于化妆品、食品、生物医用材料等健康领域。本文主要研究牛蒡多糖的保湿效

* 基金项目: 德州首席科学家人才项目资助【No. 11200011181608】

通信作者: 810020929@qq.com