

“醒脑开窍”针刺法对缺血性脑卒中大鼠行为学的影响*

石永光^{1,2}, 董健健², 周 晟², 张亮亮², 喻绪恩², 韩永升^{1,2}

(1. 安徽中医药大学, 安徽 合肥 230012; 2. 安徽中医药大学神经病学研究所附属医院, 安徽 合肥 230061)

摘要: **目的** 探讨“醒脑开窍”针刺法对缺血性脑卒中大鼠行为学影响,为针刺治疗缺血性脑卒中提供理论依据。**方法** 将 80 只 SD 大鼠随机分为电针组、电针对照组、模型组、假手术组,每组 20 只。采用热凝闭法制造大鼠大脑中动脉闭塞模型。电针刺激在造模成功 24 h 内进行,采取“醒脑开窍”法,电针组取穴水沟、百会和双侧内关、三阴交,电针 30 min/次,1 次/d,每 7 d 为 1 疗程(连续针刺 6 d,后休息 1 d),共 14 d。余各组抓取、固定方法参数等同电针组,但不针刺。各组的大鼠在 7 d、14 d 随机各取 10 只进行神经功能评估、Barnes 记忆分析及滚筒掉落时间观察记忆及运动功能。**结果** 电针后,Barnes 记忆持续时间较模型组显著延长($P<0.001$),进入隐藏区的潜伏期较模型组显著缩短($P<0.001$),滚筒掉落时间较模型组明显延长($P<0.001$)。**结论** “醒脑开窍”针刺的方法能改善缺血性脑卒中大鼠记忆、运动功能等行为学。Barnes 记忆分析系统及滚筒掉落时间可客观地反映大鼠记忆及运动功能的变化,对于电针对大鼠行为学实验研究有重要意义。

关键词: “醒脑开窍”针刺法; 缺血性脑卒中; 行为学; Barnes 记忆分析系统

中图分类号: R285.5; R245

文献标志码: A

文章编号: 1000-2723(2018)04-0025-04

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2018.04.006

脑血管疾病是威胁人类健康的重大疾病之一,包括缺血性和出血性两类^[1]。缺血性脑血管病(ischemic cerebrovascular disease, ICVD)在老年人中具有高发病率、患病率、致残率和死亡率,且发病逐渐年轻化。加大脑血管病防治力度,改善预后,预防并发症,提高脑血管疾病的疗效是一项刻不容缓的重任。目前,虽然对 ICVD 的治疗取得了较大的进步,在溶栓和(或)取栓同时,也可使用神经保护剂来避免或减少再灌注损伤,但仍无一种神经保护的药物可使患者从中获益^[2],研究表明电针在 ICVD 中的应用中能促进其功能恢复^[3],已是缺血性脑血管病的常规治法。本实验主要通过电针来干预脑缺血大鼠模型,为针刺治疗 ICVD 提供实验研究依据。

1 材料

1.1 实验动物 选择 18 月龄,雄性,体质量 200~250 g 的 SD 大鼠 80 只,均购买并饲养于安徽中医药大学实验动物中心,预适应 1 周后方开始实验。大鼠选用清洁级颗粒饲料喂养,并予自由饮食及饮水,视垫料清洁的程度更换垫料。饲料和垫料均购

买于安徽中医药大学实验动物中心,饲养环境模拟标准日夜系统。

1.2 实验仪器 G6805 型电针治疗仪:苏州医疗用品厂有限公司;电凝器;牙科钻;华佗牌一次性针灸针:苏州,规格为直径 0.2 mm,针身长 0.5 寸;Barnes 迷宫测试板、圆形滚筒:上海欣软 XR-XB108 型巴恩斯迷宫视频分析系统。

2 实验方法

2.1 实验分组 80 只 SD 大鼠随机分为假手术组(该行血管分离)、模型组、电针对照组、电针组,每组 20 只。

2.2 大脑中动脉闭塞大鼠模型的建立及成功与否检测的方法 在室温 25 ℃条件下,SD 大鼠称重后,根据罗燕等^[4]提出的热凝闭大脑中动脉法制造局灶性脑缺血大鼠模型:将 SD 大鼠右侧卧位固定于手术台上,去除左侧颞顶部的鼠毛,碘伏对颞顶部局部皮肤消毒。左眼与左耳之间切开皮肤,钝性分离颞肌,暴露出颞骨翼板,术中避免损伤周围血管及神经等。用牙科钻经颞骨翼板钻至硬脑膜,用小咬骨钳向下咬去部

收稿日期:2018-08-10

* 基金项目:国家自然科学基金面上项目(81774425)

第一作者简介:石永光(1984-),男,主治医师,研究方向:中西医结合治疗脑血管疾病。

分颅骨,暴露大脑中动脉,用电凝器来凝闭大脑中动脉(嗅束到大脑下静脉),后缝合颞肌及皮肤。

假手术组:同上操作到暴露大脑中动脉,不进行热凝闭。

大鼠苏醒后参照 Zea Longa E 等^[5]提出的神经行为学评估法进行评分,评分 1~3 分表示造模成功,采用差额补充的方法保证每组实验的例数。

2.3 处理方法 电针组:造模成功后将不予麻醉的大鼠固定在自制鼠夹上。根据华兴邦等^[6]制定的大鼠针灸穴位进行定位,选用“醒脑开窍”针刺法^[7],主穴取水沟、百会和双侧内关、三阴交。先用捻转、提插泻法刺激双侧内关 1 mm 至筋间,刺激 1 min,留针 30 min;次用雀啄法由鼻中隔下部向上斜刺水沟 1 mm,强刺激 1 min;再应用提插法直刺三阴交 5 mm,持续 1 min;最后刺百会穴,取向前或向后斜刺 2 mm,采用平补平泻捻转手法刺激 1 min,留针 30 min。留针期间,分别用 G6805 电针治疗仪连接内关和三阴交穴位的针柄,施以疏密波,调整电压为 2~4 V,频率为 2/100 Hz,以针刺部位轻微抖动为刺激强度。第 1 次针刺在造模成功后的 24 h 内进行,以后每天上午固定时间针刺 1 次,每 7 d 为 1 个疗程(连续针刺 6 d,休息 1 d)^[8-9]。

电针对照组:SD 大鼠不进行任何手术,抓取、固定方法、针刺穴位、方法、频率、电针刺激参数等同电针治疗组。

假手术组、模型组:抓取、固定方法参数等同电针组,但不进行针刺。

2.4 观察指标

2.4.1 大鼠神经行为学评分^[5] 0 分:无神经缺损症状;1 分:将大鼠提尾倒悬时,左侧前爪不能完全伸展;2 分:爬行时左侧转圈;3 分:行走困难、向左侧倾倒;4 分:不能自发行走,意识丧失。

2.4.2 Barnes 记忆分析系统检测 训练过程:将大鼠逐只放在圆形漆黑 Barnes 迷宫测试板上,测试板的周围有 20 个洞口,底部放置底盒的一个洞口称之为隐藏区,其余称之为暴露区,每次训练开始时将大鼠放置于隐藏区,让其适应 30 s,然后将其放在迷宫中央,自由选择进入隐藏区,每次训练 240 s,每只老鼠做完以后都用酒精对迷宫进行擦拭。每天下午每只大鼠连续训练 2 次,连续训练 6 d。

测试过程:第 1 d 训练结束后按分组测试,然后连续训练 6 d 后第 7 d 开始测试,按分组开始测试,测试过程同训练过程,每只测试 2 次,Barnes 迷宫反

映了动物的空间记忆功能。

2.4.3 滚筒掉落时间检测 选用直径 20 cm 圆形滚筒,设定转速为 5 转/min,测试时间为 5 min,按照分组将大鼠放在滚筒中,倾斜 60°,每次可测试 3 只大鼠,每只测试 3 次,记录大鼠掉落平台时间,最长测试时间为 5 min。

2.5 统计学方法 所有计量资料均用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,Barnes 记忆持续时间、大鼠进入隐藏区的次数、进入的潜伏期以及滚筒掉落时间等参数的比较采用单因素方差分析。统计结果,均由 SPSS for windows 19.0 自动运算完成。 $P < 0.01$ 为有显著统计学意义, $P < 0.05$ 为有统计学意义, $P > 0.05$ 为无统计学意义。

3 结果

3.1 神经行为功能评分 假手术组、电针对照组未见神经行为功能缺损症状,电针后神经行为功能评分较模型组降低,其中电针 24 h 降低无统计学意义($P = 0.23$),电针 7 d 和 14 d 降低均有显著统计学意义($P_{7d} = 0.002, P_{14d} < 0.001$)说明电针可改善缺血性脑卒中大鼠的神经行为功能评分。见表 1。

表 1 各组大鼠神经行为功能评分比较($\bar{x} \pm s, n = 10$, 分)

分组	24 h	7 d	14 d
模型组	2.97±0.41	2.82±0.34	2.78±0.31
假手术组	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
电针对照组	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
电针组	2.78±0.28	2.38±0.41**	1.73±0.43**

注:与模型组比较,** $P < 0.01$

3.2 进入隐藏区的潜伏期分析结果 假手术组、电针对照组大鼠进入隐藏区的潜伏期均较短,两者比较差异无统计学意义($P_{24h} = 0.94, P_{7d} = 0.90, P_{14d} = 0.90$),说明电针刺激对大鼠进入隐藏区的潜伏期无直接影响。电针后大鼠进入隐藏区的潜伏期较模型组缩短,其中电针 24 h 缩短有统计学意义($P_{24h} < 0.05$),电针 7 d 和 14 d 缩短有显著统计学意义($P_{7d} < 0.001, P_{14d} < 0.001$),说明电针可改善缺血性脑卒中大鼠进入隐藏区的潜伏期。见表 2。

表 2 各组大鼠进入隐藏区的潜伏期比较($\bar{x} \pm s, n = 10$, 分)

分组	24 h	7 d	14 d
模型组	238.57±2.74	202.98±10.18	173.76±18.13
假手术组	3.27±0.97	3.02±0.94	2.74±1.07
电针对照组	3.19±1.33	3.07±1.31	2.87±1.13
电针组	233.10±4.11*	52.64±27.73**	20.93±11.69**

注:与模型组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,** $P < 0.01$

3.3 Barnes 记忆持续时间 假手术组、电针对照组大鼠 Barnes 记忆持续时间差异无统计学意义 ($P_{24\text{ h}}=0.89$ 、 $P_{7\text{ d}}=0.74$ 、 $P_{14\text{ d}}=0.86$), 说明电针刺激对大鼠 Barnes 记忆持续时间无直接影响; 电针后 Barnes 记忆持续时间较模型组延长, 电针 24 h、7 d 和 14 d 延长均有显著统计学意义 ($P_{24\text{ h}}<0.001$ 、 $P_{7\text{ d}}<0.001$ 、 $P_{14\text{ d}}<0.001$), 说明电针可改善缺血性脑卒中大鼠的空间记忆能力。见表 3。

表 3 各组大鼠 Barnes 记忆持续时间比较($\bar{x}\pm s$, $n=10$, s)

分组	24 h	7 ds	14 d
模型组	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
假手术组	14.79±2.75	16.35±3.01	18.66±3.77
电针对照组	14.92±3.23	16.71±2.93	18.41±2.66
电针组	0.00±0.00	7.13±2.42**	12.61±3.93**

注:与模型组比较, ** $P<0.01$

3.4 滚筒掉落时间分析结果 假手术组、电针对照组大鼠滚筒掉落时间差异无统计学意义 ($P_{24\text{ h}}=0.41$ 、 $P_{7\text{ d}}=0.68$ 、 $P_{14\text{ d}}=0.74$), 说明电针刺激对大鼠滚筒掉落时间无直接影响; 电针后滚筒掉落时间较模型组延长, 其中电针 24 h 延长无统计学意义 ($P=0.53$), 电针 7 d 和 14 d 延长均有显著统计学意义 ($P_{7\text{ d}}<0.001$ 、 $P_{14\text{ d}}<0.001$), 说明电针可延长大鼠从滚筒上掉落的时间。见表 4。

表 4 各组大鼠滚筒掉落时间比较($\bar{x}\pm s$, $n=10$, s)

分组	24 h	7 d	14 d
模型组	38.78±11.16	55.60±13.59	79.25±14.10
假手术组	289.16±8.17	289.49±8.69	290.87±6.72
电针对照组	284.77±13.78	286.0±12.89	289.17±10.32
电针组	42.13±11.27	109.54±31.99**	178.93±51.68**

注:与模型组比较, ** $P<0.01$

4 讨论

缺血性脑血管病(ICVD)属于中医学“中风”范畴,其病机多是阴阳失调,血气运行受阻,血瘀滞络,蒙蔽清窍而成^[10]。针刺治疗,包括头皮针、电针等因具有经济、简便、疗效确切等特点而广泛用于脑血管病的治疗^[11]。

采用石学敏院士“醒脑开窍”针刺法来刺激该实验大鼠,此法中的水沟、百会穴有醒脑、开窍、定志的功效。大鼠水沟穴的定位取唇裂鼻尖下 1 mm 正中处,直或向上刺 1 mm;百会为“诸阳之会”,取顶骨正中,向前、后斜刺 2 mm^[6]。关于电针水沟穴治疗脑血

管病的机制研究颇多,李莎莎等^[12]发现电针刺激水沟穴可能通过调控微小 RNA-126 及其靶基因、促进脑血管新生,从而提高反应神经功能损伤程度的 Berderson 评分,促进大鼠脑缺血后的神经功能恢复。Wang 等^[13]研究发现电针水沟穴通过大电导 Ca^{2+} -激活 K^{+} 通道(BKCa 通道)的过度激活和表达可能是脑缺血/再灌注损伤后神经元延迟死亡,从而改善缺血再灌注大鼠神经功能。该实验选用水沟穴既有“醒脑开窍”作用,又有现代机制方面研究的支撑。该实验发现通过“醒脑开窍”刺法,可改善缺血性卒中大鼠的神经功能评分,与李莎莎、Wang 等的研究结果类似。

认知和记忆功能的研究属于神经心理学研究范畴,神经心理学是当今“脑科学时代”的一门新兴学科,它把脑当作心理活动物质载体从而研究脑与行为的关系^[11]。临床检测记忆或认知功能有韦氏记忆量表、MMSE 简易智能精神状态量表以及 MoCA 量表等^[14],研究^[15-16]发现电针刺激可改善脑卒中后患者的记忆和认知功能。然而,对于动物实验的研究,相关量表完成困难,1976 年 Barnes 发明了 Barnes 迷宫,主要用于测量动物的空间记忆功能,这与 Morris 水迷宫相比对动物的刺激更少^[17]。近年,随着信号通路的不断被挖掘,研究动物认知和记忆功能则多基于认知和记忆相关传导通路^[18]、机制方面,Huang 等^[19]发现电针百会、神庭穴可下调大脑中动脉闭塞-再灌注大鼠的促炎因子白细胞介素-1 β 表达水平,抑制星形胶质细胞和小胶质细胞/巨噬细胞 P2 嘌呤受体介导的神经炎性损伤。Lin 等^[20]通过电针百会、神庭穴可抑制脑缺血再灌注大鼠模型的基质金属蛋白酶-2 和基质金属蛋白酶-9 的表达,减轻脑超微结构损伤,从而提高其记忆能力。Yu 等^[21]则从另一角度研究记忆能力,发现电针百会、大椎穴可提高事件相关电位 P300,改善脑梗死大鼠学习记忆能力。诱发电位中的事件相关电位主要反映认知过程中大脑电生理的变化,其中 P300 电位应用最广泛。该实验通过观察大鼠 Barnes 记忆持续时间、滚筒掉落时间等指标发现电针可改善脑梗死模型大鼠的记忆功能。

该实验研究结果提示,Barnes 迷宫实验表明电针对照组、假手术组大鼠进入隐藏区的潜伏期缩短、记忆持续时间延长优于电针组,电针组优于模型组;滚筒掉落时间测试也表明电针对照组、假手术组掉落时间延长优于电针组,电针组优于模型

组,反应“醒脑开窍”针刺法能使大脑中动脉闭塞模型大鼠记忆及运动能力改善,且在一定范围内,随着电针时间的延长,记忆及运动功能改善越明显。Barnes 记忆分析系统及滚筒掉落时间可客观地反映大鼠记忆及运动功能的变化。

虽然大鼠行为学研究的指标不能完全等同于人类,但由于伦理学的限制,先在动物模型上做实验是研究的必要途径。周鹏^[22]等发现电针治疗脑缺血再灌注损伤是通过多途径,作用于多靶点来实现的。该实验目前仅观察了神经功能评分、Barnes 记忆持续时间、滚筒掉落时间等指标,记忆相关信号通路的各个靶点,甚至大鼠事件相关电位 P300 等的是笔者下一步研究的方向。

参考文献:

- [1] 贾建平,陈生弟. 神经病学[M]. 8 版. 北京:人民卫生出版社,2018:156,186.
- [2] YOUNG A R, ALI C, DURETÊTE A, et al. Neuroprotection and stroke:time for compromise [J]. *J Neurochem*, 2007, 103(4):1302-1309.
- [3] KIM M W, CHUNG Y C, JUNG H C, et al. Electroacupuncture enhances motor recovery performance with brain-derived neurotrophic factor expression in rats with cerebral infarction [J]. *Acupuncture in Medicine*, 2012, 30(3):222.
- [4] 罗燕,许能贵,易玮,等. 电针对局灶性脑缺血大鼠大脑皮层缺血灶周围区星形胶质细胞的影响 [J]. *针刺研究*, 2009, 34(2):101-105.
- [5] LONGA E Z, WEINSTEIN P R, CALSON S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. *Stroke*, 1989, 20(1):84-91.
- [6] 华兴邦,周浩良,李辞荣,等. 大鼠穴位图谱的研制[J]. *实验动物与动物实验*, 1991(1):1-5.
- [7] 许明辉,石学敏. “醒脑开窍”针刺法及临床研究[J]. *辽宁中医杂志*, 2010(s1):29-32.
- [8] 李钦潘,韩永升,韩咏竹,等. “醒脑开窍”针刺法对脑缺血再灌注大鼠模型早期脑内血管内皮生长因子与胶质纤维酸性蛋白表达的影响 [J]. *中国康复医学杂志*, 2015, 30(7):645-650.
- [9] 李钦潘,王伟,韩永升,等. “醒脑开窍”针刺法对脑缺血再灌注大鼠模型早期运动功能恢复及 SYN 表达影响的研究[J]. *中国中医急症*, 2015, 24(1):19-23.
- [10] 周仲瑛,金实,李明富,等. 中医内科学[M]. 2 版. 北京:中国中医药出版社,2007:305.
- [11] 孟杰. “醒脑开窍”针刺法配头皮针特针法”治疗脑血管疾病后遗症 [J]. *清远职业技术学院学报*, 2012, 5(3):40-41.
- [12] 李莎莎,刘津溪,钱小路,等. 电针水沟穴对大脑中动脉闭塞大鼠脑缺血后微小 RNA-126 及靶基因的影响[J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2016, 23(3):232-235.
- [13] WANG Y, SHEN Y, LIN H P, et al. Large-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channel involvement in suppression of cerebral ischemia/reperfusion injury after electroacupuncture at Shuigou (GV26) acupoint in rats [J]. *Neural Regen Res*, 2016, 11(6):957-962.
- [14] 钟慧. 基于低频振幅算法探讨针刺神庭、百会穴改善脑卒中患者记忆功能的 fMRI 研究[D]. 福州:福建中医药大学, 2018.
- [15] 宋丰军,杨迎民,陈柄,等. 电针治疗脑卒中伴认知功能障碍 68 例观察[J]. *中国临床康复*, 2006, 10(27):44.
- [16] 薛洋,孙伟娟,刘飞来,等. 电针神庭、百会联合功能康复训练治疗脑卒中后认知障碍 42 例 [J]. *中医研究*, 2018, 31(1):57-60.
- [17] 邹涛,程明,朱熊兆,等. 急性心理应激对小鼠记忆的影响[J]. *中国行为医学科学*, 2005, 14(1):23-25.
- [18] 蒋持怡,艾琪,刘喆,等. 电针改善慢性脑低灌注大鼠空间学习记忆能力和海马 IL-6/JAK2/STAT3 的信号调节 [J]. *中国病理生理杂志*, 2018, 34(7):1170-1176.
- [19] HUANG J, YOU X, LIU W, et al. Electroacupuncture ameliorating post-stroke cognitive impairments via inhibition of peri-infarct astroglial and microglial/macrophage P2 purinoceptors-mediated neuroinflammation and hyperplasia [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2017, 17(1):480.
- [20] LIN R, YU K, LI X, et al. Electroacupuncture ameliorates post-stroke learning and memory through minimizing ultrastructural brain damage and inhibiting the expression of MMP-2 and MMP-9 in cerebral ischemia-reperfusion injured rats [J]. *Mol Med Rep*, 2016, 14(1):225-233.
- [21] YU Q, LI X H, JIANG W, et al. Combined Effects of Electroacupuncture and Behavioral Training on Learning-Memory Ability and Event-Related Potential P300 in Rats with Mid/Advanced Cerebral Infarction W [J]. *Chin Med J(Engl)*, 2018, 131(18):2172-2178.
- [22] 周鹏,马晓明. 电针治疗脑缺血再灌注损伤机理的研究概况[J]. *云南中医学院学报*, 2008, 31(6):72-75.