

电针对缺血性脑卒中大鼠记忆功能及脑内突触囊泡蛋白的影响^{*}

石永光^{1,2}, 徐 银², 喻绪恩^{1,2}, 李广大¹, 董健健², 张亮亮², 韩永升^{1,2△}

(1. 安徽中医药大学, 安徽 合肥 230038; 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 观察电针对缺血性脑卒中大鼠记忆功能及脑内突触囊泡蛋白 (synaptic vesicular protein, SYN) 的影响, 探讨其可能的作用机制。方法 选取 90 只 SD 大鼠随机分为模型组、电针组、假手术组, 每组各 30 只。线栓法制作急性大脑中动脉缺血大鼠模型。电针组取“百会”“水沟”“内关”“三阴交”穴位, 应用“醒脑开窍”法进行电针, 每天电针 30 min, 连续电针 6 d 休 1 d, 7 d 为一个疗程, 首次电针干预在造模成功 24 h 后进行。模型组和假手术组不进行电针干预。大鼠分别按 7、14、21 d 3 个亚组进行运动及记忆功能评分, TTC 染色测定脑梗死体积、Western blot 检测脑内 SYN 的蛋白表达。结果 电针组运动功能评分较模型组显著降低 ($P < 0.01$), 电针组进入隐藏区潜伏期时间较模型组显著缩短 ($P < 0.01$), 电针组脑梗死率较模型组显著缩小 ($P < 0.01$), SYN 的蛋白表达电针组较模型组明显增强 ($P < 0.01$)。假手术组无神经功能缺损及脑梗死灶, SYN 表达最弱。结论 电针干预能减小脑梗死体积, 上调脑内 SYN 的表达, 进而促进缺血性脑卒中大鼠的记忆及运动等神经功能的恢复。

关键词: 缺血性脑卒中; 突触囊泡蛋白; 电针; Barnes 记忆

中图分类号: R245

文献标志码: A

文章编号: 1000-2723(2020)02-0012-06

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2020.02.003

Effect of Electroacupuncture on Memory Function and Synaptic Vesicular Protein in Ischemic Stroke Rats

SHI Yongguang^{1,2}, XU Yin², YU Xuen^{1,2}, LI Guangda¹, DONG Jianjian²,
ZHANG Liangliang², HAN Yongsheng^{1,2}

(1. Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230038, China;

2. Affiliated Hospital of Neurology Institute, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230061, China)

ABSTRACT: **Objective** To observe the effect of electroacupuncture on memory function and synaptic vesicular protein (SYN) in the brain of rats with ischemic stroke then explore its possible mechanism. **Methods** 90 SD rats were randomly divided into model group, electroacupuncture group and sham operation group. The rat model of acute middle cerebral artery ischemia was made by thread tying. In the electroacupuncture group, Baihui, Shuigou, Neiguan and Sanyinjiao acupoints were treated with the method of Xingnao Kaiqiao. The electroacupuncture lasted for 30 min every day, one day off for 6 consecutive days and one course continued for 7 d. The first electroacupuncture intervention was treated after 24 h of successful modeling. Model group and sham operation group did not receive electroacupuncture intervention. 10 rats in the 3 groups were randomly divided into 3 subgroups: 7, 14, 21 d groups. The motor and memory function scores were measured. The cerebral infarction rate was measured by TTC staining and the expression of SYN in the brain was detected by Western Blot. **Results** The score of motor function in electroacupuncture group was significantly lower than that

收稿日期: 2020-01-18

^{*} 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: 脑血管疾病及神经肌肉疾病。

△通信作者: 韩永升, E-mail: hyssp@126.com

in model group ($P<0.01$), the latency time of entering the hidden area in electroacupuncture group was significantly shorter than that in model group ($P<0.01$), the cerebral infarction rate in electroacupuncture group was significantly smaller than that in model group ($P<0.01$), and the expression of SYN in electroacupuncture group was significantly higher than that in model group ($P<0.01$). In sham operation group, there was no neurologic defect or cerebral infarction, and SYN expression was the weakest. **Conclusion** Electroacupuncture could reduce the volume of cerebral infarction, up regulate the expression of SYN in the brain, and then promote the recovery of neurological functions such as memory and motor in rats with ischemic stroke.

KEY WORDS: ischemic stroke; SYN; electroacupuncture; Barnes memory

脑血管疾病(cerebrovascular disease,CVD)具有高发病率、高致残率及高死亡率等特点,是中枢神经系统最常见的疾病之一,是导致人类因病致残和死亡的主要原因,严重威胁人体健康及影响生活质量^[1-2]。缺血性脑血管病(ischemic cerebrovascular disease, ICVD)即缺血性脑卒中在脑血管疾病中占有较大比例,大约80%的脑血管疾病为缺血性脑卒中^[3]。随着对缺血性脑卒中的研究及医疗技术的进步,该病的治疗取得了很大的进展。目前,西医针对缺血性脑血管病血管介入及溶栓的开展,部分患者得到了极好的救治,但仍存在大部分患者因错过最佳治疗时间窗,或取栓(溶栓)后脑缺血再灌注损伤(cerebral ischemia-reperfusion injury,CIRI),进一步影响了预后。西医治疗脑卒中效果欠佳,特别是超过时间窗或存在CIRI的患者疗效不确定,而针灸治疗脑卒中疗效确切,能促进神经功能康复^[4-5],现已成为脑卒中的常规治疗手段。本实验主要通过电针干预治疗急性大脑中动脉缺血大鼠模型,研究其促进运动及记忆功能恢复的可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 选择8周龄、体质量约250 g的雄性SD大鼠90只,饲养环境设定为湿度保持在50%左右的恒温实验室,并12 h光照及12 h黑暗日夜系统。大鼠可自由进食及取水,选用清洁级颗粒饲料,定时依照垫料清洁度更换垫料。SD大鼠购自济南鹏悦试验动物繁殖有限公司,批号:SCXX(鲁)20190003。所需饲料、垫料均来源于安徽中医药大学实验动物中心。适应性喂养1周后称重,再进行造模等实验操作。

1.2 试剂与仪器 试剂:10%水合氯醛、PBS、TBST、TTC(购于Sigma公司)、SYN一抗(购于美国 abcam

公司)。仪器:G6805型电针治疗仪(苏州医疗用品厂)、Barnes 迷宫测试板及XR-XB108型巴恩斯迷宫视频分析系统(上海欣软)、JW-3021HR高速离心机。**1.3 造模与分组** 将90只SD大鼠随机分为模型组、电针组、假手术组,然后各大组再依据电针天数分为7、14、21 d 3小组。参照Koizumi方法^[6],制备急性大脑中动脉缺血动物模型。常规消毒麻醉后,取左颈部正中切开皮肤,钝性分离皮下组织,分别暴露左颈总、颈外动脉、颈内动脉、动脉,在颈外动脉远端处结扎并剪一小切口,将提前制备好的线拴缓慢插入颈内动脉,插入深度约18 mm,遇阻停止插入线拴,线拴保留1 h后退出线拴,逐层缝合皮下组织及皮肤;电针组手术同模型组,假手术组手术步骤同模型组,但不置线拴。参照Zea Longa E等^[7]进行评分,1~3分为造模成功,差额补充法保证每组最终SD大鼠的例数。

1.4 干预治疗方法 电针组:依据华兴邦^[8]大鼠针灸穴位图取“百会”“内关”“水沟”“三阴交”穴位,采用“醒脑开窍”针刺法进行电针。先用提插法直刺双侧“内关”1 min,再用雀啄法斜刺“水沟”1 min,其次提插法直刺“三阴交”1 min,最后刺“百会”1 min,“内关”“三阴交”“百会”均留针30 min。留针期间,用G6805电针仪刺激“内关”“三阴交”,电针仪设定为疏密波,电压2~4 V、频率1~20 Hz。首次电针在术后24 h进行,每日电针1次,连续电针6 d休息1 d。模型组及假手术组不予电针干预。

1.5 标本留取 各小组SD大鼠在做完行为学评估后进行标本留取,随机取5只,10%水合氯醛麻醉,用组织剪剪开胸腔,暴露心脏,剪开右心耳,用注射器向心脏注入0.9%生理盐水,至流出血水颜色变淡即停止注入,立即动作轻柔地剖颅取出完整大脑,

用冰的 0.9%生命盐水尽量洗去血水,置于-80 ℃冰箱保存,待行 Western blot 检测。同法取出剩余 5 只大鼠脑组织,然后放置于-20 ℃冰箱冷冻 15 min,进行 TTC 染色。

1.6 指标观察

1.6.1 行为学评分 分别在 7、14、21 d 对 3 组实验大鼠进行神经功能评分^[9]。①平衡木行走评分:快速无跌倒通过(1 分);通过大于 1/2 时跌倒(2 分);通过小于 1/2 时跌倒(3 分);仅能坐上平衡木(4 分);不能坐上平衡木(5 分)。②转棒上行走评分:能在转棒上行走大于 1 min(0 分);能在转棒上行走小于 1 min(1 分);转动后掉下(2 分);转动前即掉下(3 分)。③网屏试验评分:抓住网屏大于 5 s 且不滑落(0 分);抓住网屏大于 5 s 且有滑落未掉下(1 分);5 s 内掉下(2 分);不能抓住网屏(3 分)。

1.6.2 Barnes 空间记忆实验 Barnes 迷宫是由测试板、监控系统及电脑数据分析系统组成。测试板为直径 1 m 左右的圆形黑板,周边设有 20 个洞口,仅有 1 个洞口下放置底盒为隐藏区,其余为暴露区。每只 SD 大鼠训练时将其放置隐藏区,让其适应 30 s,然后置于测试板中心,让其自主寻找隐藏区。每次仅 1 只大鼠训练 240 s,每只 SD 大鼠连续训练 2 次。连续 6 d,第 7 天开始测试,连续测试 2 次,应用电脑数据分析系统分析数据,每只大鼠均取 2 次中的最优值。

1.6.3 TTC 染色 冰冻好的 SD 大鼠脑组织变硬后行冠状位切成 2 mm 的切片,将脑切片置于提前配置的 2%的 TTC 液中,TTC 液要完全覆盖切片,15 min 翻动一次切片,共染色 30 min。梗死组织不着色,正常组织染成红色。使用高清数码相机照相,应用捷达 JD801 图像分析软件计算脑梗死体积。先计算出每片梗死面积 V ,再累加乘以每片厚度。梗死体积=每片微梗死面积之和 $(V_1+\cdots+V_n)*2\text{ mm}$,最后计算得出梗死体积。

1.6.4 Western blot 法检测 SYN 剪取梗死区脑组织 100~200 mg,裂解提取总蛋白,BCA 测定蛋白浓度,SDS-PAGE 凝胶电泳,切胶、转模,NC 膜孵育 4 h,4 ℃孵育一抗过夜,孵育二抗室温摇床震荡 1.5 h,显

影成像,Image J 软件进行条带分析。

1.7 统计学分析 所有连续变量以均数 $\pm$ 标准差 $(\bar{x}\pm s)$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,然后进行 post-hoc 事后检验,对于方差齐时采用 LSD 法两两比较,方差不齐时采用 Dunnett's 法比较。统计结果均由统计软件包 SPSS for Windows 20.0 运算完成。以 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 神经行为功能评分 假手术组大鼠无神经功能缺损,电针组神经功能评分(平衡木实验、转棒实验、网屏试验)均较模型组降低($P<0.05$),3 组神经功能评分中电针组在 7 d 与模型组比较,差异无统计学意义,而在 14、21 d 与模型组比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。说明电针治疗可促进脑缺血后神经功能的恢复,见表 1。

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

项目	组别	神经功能评分		
		7 d	14 d	21 d
平衡木实验	假手术组	1.30 $\pm$ 0.48	1.40 $\pm$ 0.52	1.20 $\pm$ 0.42
	模型组	4.60 $\pm$ 0.52 $\blacktriangle\blacktriangle$	4.10 $\pm$ 0.74 $\blacktriangle\blacktriangle$	2.50 $\pm$ 0.8 $\blacktriangle\blacktriangle$
	电针组	4.20 $\pm$ 0.75	2.90 $\pm$ 0.99 $\blackstar\blackstar$	1.50 $\pm$ 0.53 $\blackstar\blackstar$
转棒实验	假手术组	0.40 $\pm$ 0.52	0.30 $\pm$ 0.48	0.40 $\pm$ 0.52
	模型组	2.70 $\pm$ 0.48 $\blacktriangle\blacktriangle$	2.10 $\pm$ 0.57 $\blacktriangle\blacktriangle$	1.90 $\pm$ 0.57 $\blacktriangle\blacktriangle$
	电针组	2.40 $\pm$ 0.52	1.60 $\pm$ 0.49	1.20 $\pm$ 0.63 $\blackstar$
网屏试验	假手术组	0.50 $\pm$ 0.53	0.40 $\pm$ 0.52	0.50 $\pm$ 0.53
	模型组	2.60 $\pm$ 0.52 $\blacktriangle\blacktriangle$	2.00 $\pm$ 0.67 $\blacktriangle\blacktriangle$	1.70 $\pm$ 0.48 $\blacktriangle\blacktriangle$
	电针组	2.30 $\pm$ 0.67	1.50 $\pm$ 0.50	0.90 $\pm$ 0.57 $\blackstar\blackstar$

注:与假手术组比较, $\blacktriangle P<0.05$, $\blacktriangle\blacktriangle P<0.01$;与模型组比较, $\blackstar P<0.05$, $\blackstar\blackstar P<0.01$ 。

2.2 Barnes 记忆实验进入隐藏区的潜伏期评分 通过图 1、表 2 看出,假手术组大鼠进入隐藏区的潜伏期用时较短,模型组及电针组潜伏期较长,其中电针组较模型组潜伏期明显缩短,在 7、14、21 d 均有显著差异($P<0.01$)。且在电针组组内比较,随着治疗时间的延长潜伏期时间呈下降趋势,有显著差异($P<0.01$),见图 1、表 2。

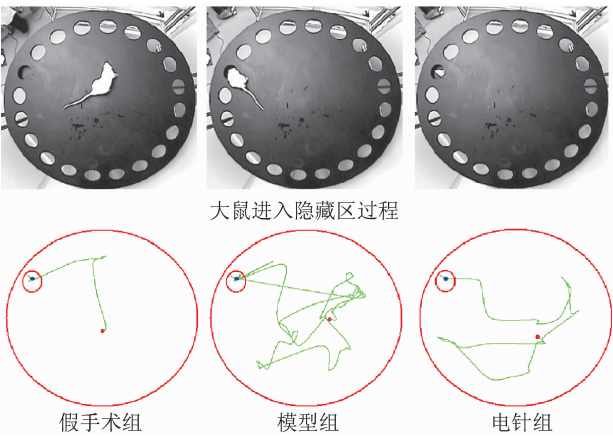


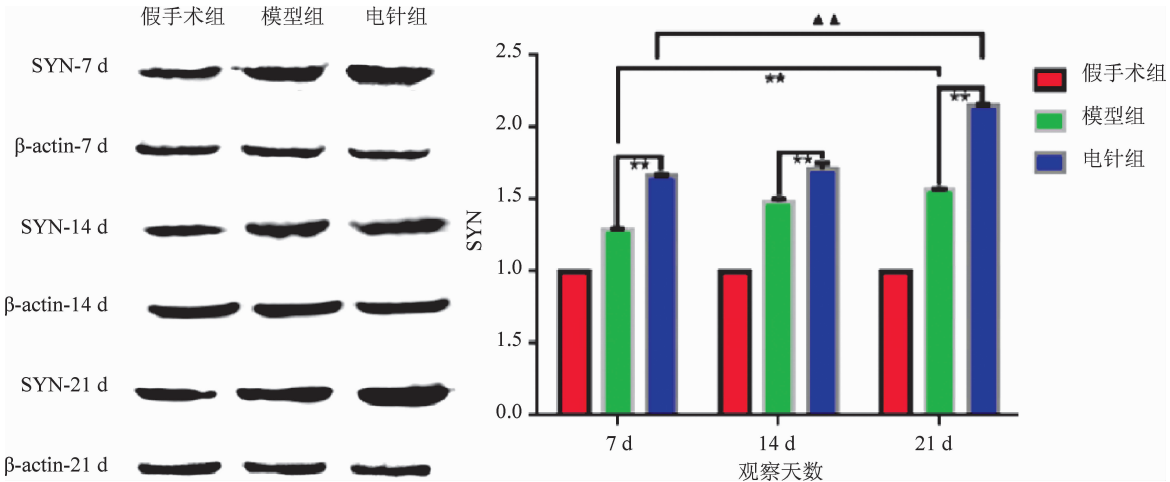
图1 Barnes 记忆实验截图及轨迹图

表2 各组大鼠不同时间点进入隐藏区的潜伏期时间
($\bar{x} \pm s, n=10, s$)

组别	潜伏期		
	7 d	14 d	21 d
假手术组	4.00±2.73	4.07±2.40	4.12±2.14
模型组	238.70±5.07 ^{▲▲}	147.21±41.33 ^{▲▲}	79.74±10.37 ^{▲▲}
电针组	146.45±47.49 ^{**}	59.53±25.30 ^{**}	33.04±7.16 ^{**}

注:与假手术组比较, [▲] $P<0.05$, ^{▲▲} $P<0.01$;与模型组比较, ^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$;与电针7 d组比较, [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$

2.3 TTC 染色脑梗死体积 假手术组脑组织各冠状位切面无梗死灶,而模型组及电针组的梗死区相应切面对比,电针组脑梗死体积与模型组相比在7、14、21 d均缩小。但在7 d时2组间差异无统计学意义,在14、21 d电针组与模型组差异有统计学意义 ($P<0.01$)。说明电针可促进脑缺血后梗死区的缩小,见图2、表3。



注:与模型组比较, ^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$;与电针7 d组比较, [▲] $P<0.05$, ^{▲▲} $P<0.01$

图3 SYN 的蛋白表达结果

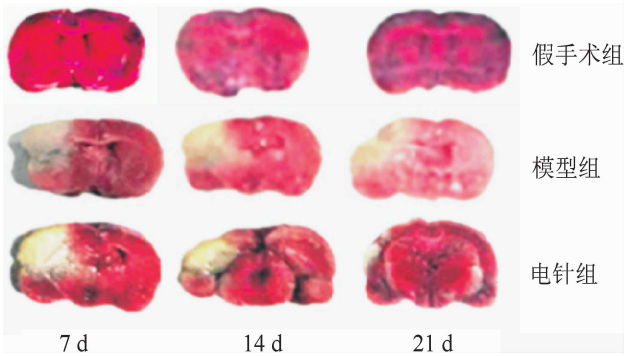


图2 TTC 脑组织染色

表3 各组大鼠不同时间点脑梗死体积($\bar{x} \pm s, n=10, \text{mm}^3$)

组别	脑梗死体积		
	7 d	14 d	21 d
假手术组	0	0	0
模型组	36.89±1.67	29.50±2.91	20.59±3.38
电针组	35.40±1.87	22.80±1.46 ^{**}	13.28±2.75 ^{**}

注:与模型组比较, ^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$

2.4 SYN 的蛋白表达 假手术组 SYN 弱表达,模型组及电针组表达上调,电针组表达较模型组明显增强,在7、14、21 d电针组表达均高于模型组。定量结果显示,与模型组比较,电针组在7、14、21 d SYN 表达均显著增加($P<0.01$);模型组组内比较,随着观察时间延长,SYN 蛋白表达逐步增加,第21天与第7天比较,SYN 表达显著增加($P<0.01$);电针组组内比较,随着观察时间延长,SYN 蛋白表达同样呈上升趋势,第21天与第7天相比,SYN 表达显著增加($P<0.01$),见图3。

3 讨论

脑卒中即缺血性脑血管病,分为出血性及缺血性脑中风两种类型,多以猝然昏仆、言语不能、口舌歪斜、半身不遂等为主症,好发于中老年人。针灸治疗脑中风疗效确切,具有独特优势,能促进脑卒中后神经功能缺损症状的恢复,因其经济、方便,目前在脑卒中治疗中应用较为广泛^[10-11]。

目前针刺干预缺血性脑卒中的疗效,不但有循证医学证据,亦有动物实验理论研究支持。王立童等^[12]通过采用子午流注针刺法对 78 例缺血性脑卒中患者的手功能障碍干预治疗,发现针刺可改善患者神经功能障碍,提高生活质量,且配合康复训练,更能改善神经运动功能。郑爱军等^[13]通过对比针刺干预 64 例脑卒中患者,发现针刺可避免患肢的肌张力增高,利于患肢的肌力恢复,进而促进神经功能恢复,尤其早期治疗疗效更加确切。黄倩茹等^[14]经造模新生缺血缺氧 SD 仔鼠,分别给予电针干预,对比发现电针可增加新生仔鼠的体重,并能促进其神经功能发育。

关于电针可促进缺血性脑卒中记忆功能的改善及其机制研究亦有较多报道^[15]。蒋持怡等^[16]通过对海马区 IL-1 β 、IL-6 及 p-STAT3、p-JAK2 等蛋白的检测,进一步从分子生物学水平证实电针可促进认知功能的改善,减轻海马神经元的损伤。梁慧英等^[17]通过电针干预“百会”及“足三里”发现可促进血管性痴呆大鼠记忆功能的改善。突触囊泡蛋白(SYN)在缺血性脑卒中神经功能缺损及记忆功能改善中均有重要作用^[18-20]。赵宇红等^[21]对认知功能障碍小鼠研究发现,芹黄素通过上调 SYN 的表达,促进突触修复及再生,从而改善其学习记忆功能。高海玲等^[22]研究发现 SYN 表达下降可导致突触可塑性下降,进而影响学习记忆能力。

本实验研究结果表明,电针干预治疗后,电针组 SD 大鼠神经功能评分在 7 d 时即有所改善,而在 14 d 及 21 d 时较模型组对比改善明显。在 Barnes 记忆实验中,电针后 SD 大鼠进入隐藏区潜伏期时间较模型组明显缩短,说明电针可改善缺血后大鼠运动及记忆功能。同时 TTC 染色图片及数据分析均提示电针后脑梗死体积较模型组明显缩小。通过检测脑梗死区

SYN 的表达,发现假手术组或正常脑组织中的 SYN 表达较弱,而缺血后 SYN 的表达均有所上调,但对比发现电针组较模型组 SYN 的表达明显上调,且在一定疗程时间内随电针时间的延长而增强。

综上所述,电针不但可改善缺血性脑卒中神经功能缺损症状,还可进一步改善其空间记忆功能,其机制可能与电针通过上调 SYN 的表达有关。

参考文献:

- [1] FONAROW G C,ZHAO X,SMITH E E,et al. Door-to-needle times for tissue plasminogen activator administration and clinical outcomes in acute ischemic stroke before and after a quality improvement initiative [J]. JAMA, 2014,311(16):1632-1640.
- [2] STURM J W,DEWEY H M,DONNAN G A,et al. Handicap after stroke:how does it relate to disability,perception of recovery,and stroke subtype?:the north North East Melbourne Stroke Incidence Study(NEMESIS)[J]. Stroke, 2002,33(3):762-768.
- [3] KAWAKITA F,SUZUKI H. Periostin in cerebrovascular disease[J]. Neural Regen Res,2020,15(1):63-64.
- [4] 朱海荣,王念,吴年宝,等. 天地饮联合针灸治疗急性脑卒中(风痰阻络)对照研究[J]. 实用中医内科杂志,2019,33(10):77-80.
- [5] 李永琿,秦莉玲,吴晓刚. 康复训练结合针灸治疗脑卒中后吞咽困难疗效观察 [J]. 实用中医药杂志,2019,35(9):1151-1152.
- [6] KOIZUMI J I,YOSHIDA Y,NAKAZAWA T,et al. Experimental studies of ischemic brain edema. I. A new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area [J]. Jap J Stroke,1986,8(1):1-8.
- [7] LONGA E Z,WEISTEIN P R,CALSON S,et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke,1989,20(1):84-91.
- [8] 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.
- [9] 穆峰,郑修广,刘圣恒,等. 康复训练联合神经生长因子对脑出血大鼠肢体功能的影响 [J]. 西部医学,2018,30(6):819-822.

- [10] 张颖铮,卓沛元,林如辉,等. 电针百会穴改善 APP/PS1 转基因小鼠空间学习记忆能力及对磁共振波谱的影响[J]. 康复学报,2016,26(5):42-46.
- [11] 张茜,张闯,张佳音,等. 电针对血管性痴呆大鼠海马谷氨酸、钙离子含量及 N-甲基-D-天冬氨酸受体表达的影响[J]. 针刺研究,2016,41(6):509-514.
- [12] 王立童,贾爱明,姜永梅. 子午流注针刺结合康复训练对脑卒中患者手功能的疗效观察 [J]. 中华中医药杂志, 2019,34(3):1278-1280.
- [13] 郑爱军,郑芳芳,池名,等. 针刺华佗夹脊穴对脑卒中后肢体功能障碍的改善作用观察 [J]. 广州中医药大学学报,2019,36(10):1575-1579.
- [14] 黄倩茹,萨喆燕,潘晓华,等. 电针长强穴对缺血缺氧脑损伤大鼠发育的影响 [J]. 云南中医学院学报,2018,41(1):25-28.
- [15] 石永光,董健健,周晟,等. “醒脑开窍”针刺法对缺血性脑卒中大鼠行为学的影响 [J]. 云南中医学院学报, 2018,41(4):25-28.
- [16] 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.
- [17] 梁慧英,廖琳,游国清,等. 电针对血管性痴呆大鼠记忆力及海马 BDNF、PSD-95 蛋白表达的影响[J]. 中国康复医学杂志,2019,34(8):902-906.
- [18] 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.
- [19] 韩清,徐鸣曙,张英杰,等. 电针风池穴对脑缺血再灌注大鼠突触素、生长相关蛋白-43 的影响[J]. 上海针灸杂志,2019,38(6):674-680.
- [20] 秦启忠,赵奇,陈纯海,等. 芦丁对三甲基锡损害学习记忆功能的保护作用与拮抗突触囊泡蛋白表达下调有关 [J]. 南方医科大学学报,2015,35(1):113-116.
- [21] 赵宇红,李芳芳,曾宇. 芹黄素对 SAMP8 小鼠学习记忆及突触可塑性的影响 [J]. 中国老年学杂志,2015,35(15):4113-4116.
- [22] 高海玲,管英俊,张彩霞,等. 突触囊泡蛋白在 ALS 转基因鼠海马的表达变化 [J]. 中国组织化学与细胞化学杂志,2013,22(4):286-289.