电针百会及神庭穴改善 MCAO 大鼠学习记忆能力的机制

于雪萍,李安洪,江一静

[摘要] 目的 观察电针百会及神庭穴改善大脑中动脉栓塞(MCAO)大鼠学习记忆能力的作用机制。方法 选取 72 只 SPF 级雄性大鼠,随机分为假手术组、模型组和电针组,每组 24 只,其中模型组和电针组行左侧 MCAO,造模成功后电针组予电针干预,模型组仅固定不干预;假手术组仅切开颈部皮肤,分离颈总、颈内和颈外动脉后直接缝合皮肤。观察大鼠学习记忆能力和海马组织病理形态学改变,计算脑梗死体积,检测 β-catenin和 GSK-3β 蛋白和基因表达水平变化。结果 与假手术组干预后和本组造模前比较,模型组和电针组干预后游泳轨迹和逃避潜伏期延长,且电针组干预后游泳轨迹和逃避潜伏期较模型组明显缩短,差异有统计学意义($P<0.05$)。假手术组未见脑梗死病灶,电针组干预后脑梗死体积百分比较模型组缩小,差异有统计学意义($P<0.05$)。假手术组海马组织细胞形态结构正常;模型组缺血侧海马组织细胞排列紊乱,出现坏死及神经元细胞缩小变形;电针组缺血侧海马组织细胞大部分形态结构正常,少数细胞序列散乱,可见部分神经元缺血。模型组和电针组 β-catenin 和 GSK-3β 蛋白和基因的表达水平较假手术组下降,同时电针组较模型组 β-catenin 和 GSK-3β 蛋白和基因的表达水平明显上升,差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 电针百会穴、神庭穴通过减轻海马神经元损伤及上调 β-catenin 与 GSK-3β 蛋白和基因表达水平起到脑保护作用,提高 MCAO 大鼠的学习记忆能力。

[关键词] 梗死,大脑中动脉;电针;记忆障碍;学习障碍
[中国图书资料分类号] R743 [文献标志码] A [文章编号] 1002-3429(2018)09-0103-05
[DOI] 10.3969/j.issn.1002-3429.2018.09.026

The Mechanism of Electroacupuncture at Baihui and Shenting Acupoint in Improving Learning and Memory Ability of MCAO Rats

YU Xu-ping[1], LI An-hong[2], JIANG Yi-jing[3] (1. Sichuan College of Traditional Chinese Medicine, Mianyang, Sichuan 621000, China; 2. the First Department of Acupuncture and Moxibustion, Mianyang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Mianyang, Sichuan 621000, China; 3. Rehabilitation Department, Rehabilitation Hospital Affiliated to Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350001, China)

[Abstract] **Objective** To observe the mechanism of electroacupuncture (EA) at Baihui and Shenting acupoint in improving learning and memory ability of rats with middle cerebral artery occlusion (MCAO). **Methods** A total of 72 specific pathogen-free (SPF) male rats were randomly divided into sham operation group, model group and EA group, with 24 rats in each group. MACO on the left side was established in the model group and the EA group. After successful modeling, the EA group was treated with EA, and the model group was only fixed without intervention. In the sham operation group, the neck skin was cut, and the skin was directly sutured after separation of common carotid artery, internal carotid and external carotid artery. The changes of learning and memory ability of rats and pathological changes of hippocampus in rats were observed, the area of cerebral infarction was calculated, and the expressions of β-catenin and GSK-3 β protein and gene expression were detected. **Results** Compared with the sham operation group after intervention and the groups before the modeling, the swimming trajectory and escape latency of the model group and EA group were prolonged, which were significantly shorter in EA group than in the model group ($P<0.05$). There was no infarction in the sham operation group, and the percentage of cerebral infarction volume in EA group was smaller than that in the model group after EA intervention, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). The morphological structure of hippocampal cells in the sham operation group was normal, whereas the cells in the ischemic side of the hippocampus in the model group were in disorder, and there was necrosis and shrinkage of neuron cells. Most of the cells in the ischemic side of hippocampal tissue in the EA group were nor-

基金项目:高校自然基金青年重点项目(JZ160443)

作者单位:621000 四川 绵阳,四川中医药高等专科学校(于雪萍);621000 四川 绵阳,绵阳市中医医院针灸一病区(李安洪);350001 福州,福建中医药大学附属康复医院康复科(江一静)

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

mal, while a small number of cells were scattered, and some neurons were ischemic. The levels of protein and gene expression of beta-catenin and GSK-3 beta in the model group and EA group were lower than those in the sham operation group. In the meantime, the expression level of β-catenin and GSK-3 β protein and gene was significantly upregulated in EA group, as compared with the model group, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** EA at Baihui and Shenting acupoint plays a protective role in the brain by reducing the damage to hippocampal neurons and upregulating the expression level of β-catenin and GSK-3 β and gene, thereby improving learning and memory ability of MCAO rats.

[Key words] Infarction, middle cerebral artery; Electroacupuncture; Memory disorders; Learning disorders

我国每年新发脑卒中事件约 70% 属于缺血性脑卒中[1]，多遗留明显肢体运动功能障碍及不同程度的认知功能障碍。针刺治疗脑部疾病历史悠久，电针百会穴、神庭穴可明显改善脑卒中认知能力[2-3]，但其作用机制尚未明确。有研究显示，神经元细胞的自我更新及凋亡均有 WNT 信号通路的相关蛋白参与，其标志性蛋白在维持脑组织内环境稳态中发挥核心效应，可促进新的突触连接形成，增强记忆时相[4]。针刺百会及神庭穴改善缺血性脑卒中学习记忆功能是否通过 WNT 信号通路介导不得而知。本研究以大脑中动脉栓塞（MCAO）模型大鼠为研究对象，探讨针刺百会及神庭穴改善学习记忆功能的作用机制，现报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物：选取雄性 SPF 级大鼠 72 只，购自上海斯莱克实验动物有限责任公司（SCXK2012-0002 沪），体重（260 ± 20）g，均为 3 月龄大鼠，室内恒温饲养，适应性喂养 1 周。

1.1.2 试剂及仪器：①试剂：10% 水合氯醛购于天津市光复精细化工研究所，β-catenin 和 GSK-3βm 一抗购自美国 CST 公司，β-catenin 和 GSK-3β 引物和反转录试剂盒购于上海生工生物技术有限公司。②仪器：MCAO 大鼠造模线栓、显微剪、眼科剪、动脉血管夹等均由深圳市瑞沃德生命科技有限公司购入，Morri 水迷宫实验装置、华佗牌针灸针和上海华谊仪器厂电针仪购于中国医学科学院药物研究所。

1.2 方法

1.2.1 分组与模型制备[5]：采用随机数字表法将大鼠分为假手术组、模型组和电针组，每组 24 只。假手术组仅切开颈部皮肤，分离颈总、颈内和颈外动脉后直接缝合皮肤。模型组和电针组则行左侧 MCAO 造模：术前禁食 12 h，腹腔注射 10% 水合氯醛 3 ml/kg 进行麻醉，切开大鼠颈部皮肤，分离左侧颈总动脉 - 颈外动脉 - 颈内动脉，按顺序结扎颈总动脉近端和颈外动脉远端，颈内动脉于颈外动脉分叉处预留结扎线。采用微动脉夹夹闭颈内动脉，在距离颈内外动脉分叉口 1.0 mm 处的颈总动脉用显微剪剪一微小切口，线栓顺着切口插入颈内动脉，阻断大脑中动脉血供，拴紧颈内动脉的结扎线，常规缝合颈部伤口，术后 1.5 h 轻柔回抽线栓 2 cm。

1.2.2 干预方法：用自制鼠套固定大鼠，仅暴露头部，防止干预过程中大鼠过度挣扎，影响治疗。电针组于造模成功后 24 h 开始第 1 次治疗，参照《实验针灸学》，采用华佗牌 30 号 0.5 寸毫针针刺大鼠百会和神庭穴，用 G6805 电针化设置电压峰值 6 V，使用疏密波及频率 20 Hz 进行电针干预，每次 20 min、1/d，治疗 7 d。模型组与假手术组大鼠饲养于普通笼，与电针组在同一时间抓取并固定 20 min 释放。

1.3 检测指标与方法

1.3.1 水迷宫实验：所有大鼠造模前和干预后均行 Morris 水迷宫实验，以直径 2.0 m、高 0.5 m、水深 0.3 m、水温（25 ± 2）℃ 等作为水迷宫参数，将圆形水池分为 4 等距离点象限，并任选一个象限作为第一象限。水迷宫实验定位航行是指在有标志的中央放置直径 6 cm 的平台，平台低于水面约 2 cm，大鼠寻找平台的游泳轨迹和逃避潜伏期作为研究数据。

1.3.2 2,3,5-氯化三苯基四氮唑（TTC）染色：干预后每组取 6 只大鼠，麻醉猝死后取完整的大脑组织，置于 -20℃ 冰箱内冰冻 30 min，沿冠状面切成厚度为 2 mm 的薄片，浸泡于配制好的 TTC 溶液中，在暗室 37℃ 恒温水箱中进行反应，每 3 min 用毛笔翻动 1 次，使每片脑组织充分均匀染色，根据冠状切面的顺序依次摆放，用高分辨率相机拍摄（佳能 power shot 600X），使用 Image-Pro Plus 图像分析处理系统（Motic Med 6.0 System）计算每片脑梗死体积。

1.3.3 HE 染色：干预后每组选择 6 只大鼠，麻醉猝死后取海马组织浸泡于 4% 福尔马林溶液中进行预处理，常规包埋后根据说明书进行 HE 染色，予二甲苯和梯度乙醇处理，苏木素染色 15 min，伊红染色数秒，再次冲洗后由低到高的梯度乙醇和二甲苯处理，中性树胶封片，置于光学显微镜下观察海马组织病理形态学改变。

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.3.4 免疫印迹检测：干预后每组选择 6 只大鼠，麻醉猝死后取左侧海马组织检测 β-catenin 和 GSK-3β蛋白表达水平。采用细胞裂解液提取蛋白，经 BCA 法测定蛋白浓度后加入 4 倍上样缓冲液，100℃水浴 5 min 使蛋白变性，保存于 -80℃冰箱。根据所测蛋白浓度计算每个样本的上样量，进行凝胶电泳、转膜，封闭过夜，-4℃孵育 β-Catenin、GSK-3β一抗过夜，漂洗后室温孵育二抗（1∶5000）2 h，显色显影，利用 Bio-Rad Image 软件显示图像。

1.3.5 反转录聚合酶链式反应：干预后每组选择 6 只大鼠，麻醉猝死后取左侧海马组织检测 β-catenin 和 GSK-3β 的基因表达水平。海马组织研磨加入相应体积的 Trizol 进行 RNA 提取，采用 TAKARA One Step SYBR ® Prime Script™ RT-PCR Kit II 试剂，根据说明书严格操作，进行反转录及定量 PCR，加样及相应目的基因引物与试剂，使用定量 PCR 仪进行扩增。PCR 反应条件：95℃预变性 10 min，95℃变性 30 s，60℃ 30 s，72℃延伸 1 min，共 40 个循环。所有目的基因阈值均与内参 β-actin 比较，计算基因相对表达量，引物序列见表 1。

1.4 统计学分析 应用 SPSS 20.00 统计学软件进行数据处理，计量资料采用配对 t 检验或秩和检验，以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示。以 $\alpha = 0.05$ 为检验水准。

2 结果

2.1 水迷宫实验结果比较 模型组和电针组均造模成功。三组造模前游泳轨迹和逃避潜伏期比较差异无统计学意义（$P > 0.05$）；与假手术组干预后和本组造模前比较，模型组和电针组干预后游泳轨迹和逃避潜伏期延长，差异有统计学意义（$P < 0.05$）；与模型组比较，电针组干预后游泳轨迹和逃避潜伏期缩短，差异有统计学意义（$P < 0.05$），见表 2、图 1。

2.2 脑梗死体积比较 假手术组未见脑梗死病灶，模型组和电针组可见明显脑梗死病灶。电针组、模型组干预后脑梗死体积百分比分别为（13.46 ± 1.32）%、（35.78 ± 8.19）%，差异有统计学意义（$P < 0.05$），见图 2。

2.3 海马组织 HE 染色比较 假手术组海马组织细胞形态结构正常；模型组缺血侧海马组织细胞排列紊乱，出现明显坏死及神经元细胞缩小变形；电针组缺血侧海马组织细胞大部分形态结构正常，少数细胞序列散乱，可见部分神经元缺血，见图 3。

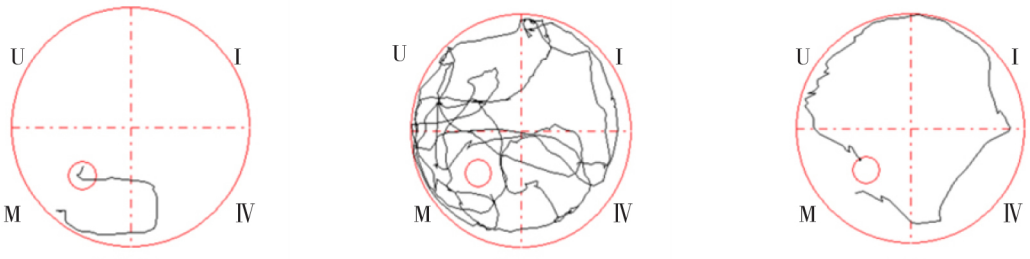
表 1 β-catenin、GSK-3β 和 β-actin 引物序列

基因名称	正反序列	引物序列
β-catenin	F	5′-GGAAAGCAAGCTCATCATTCT-3′
	R	5′-AGTGCCTGCATCCCACCA-3′
GSK-3β	F	5′-TAGGAACACCAACAAGGGAGC-3′
	R	5′-CGAGCGTGAGGAGCGATAAG-3′
β-actin	F	5′-CACCCGCGAGTACAACCTCC-3′
	R	5′-CCATACCCACCATCACACC-3′

表 2 采用不同处理方法的三组大鼠水迷宫实验结果比较（$\bar{x} \pm s$）

组别	例数	游泳轨迹（mm）	逃避潜伏期（s）
假手术组	24		
造模前		8013 ± 672	12.50 ± 3.46
干预后		7950 ± 701	13.02 ± 3.44
模型组	24		
造模前		8105 ± 641	13.03 ± 3.35
干预后		12074 ± 861[ac]	63.23 ± 7.89[ac]
电针组	24		
造模前		8098 ± 638	12.58 ± 3.39
干预后		9436 ± 656[ace]	42.17 ± 6.68[ace]

注：假手术组仅切开颈部皮肤，分离颈总、颈内和颈外动脉后直接缝合皮肤，模型组行 MCAO 造模，电针组行 MCAO 造模 + 电针干预；与假手术组干预后比较，[a]$P < 0.05$；与本组造模前比较，[c]$P < 0.05$；与模型组比较，[e]$P < 0.05$

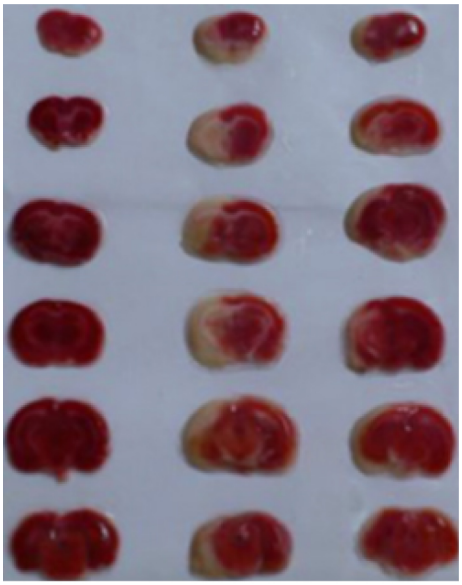


假手术组　　模型组　　电针组

图 1 采用不同处理方法的三组大鼠水迷宫实验结果比较

注：假手术组仅切开颈部皮肤，分离颈总、颈内和颈外动脉后直接缝合皮肤，模型组行 MCAO 造模，电针组行 MCAO 造模 + 电针干预

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net



假手术组 模型组 电针组

图 2 采用不同处理方法的三组大鼠脑梗死体积比较

注:假手术组仅切开颈部皮肤,分离颈总、颈内和颈外动脉后直接缝合皮肤,模型组行 MCAO 造模,电针组行 MCAO 造模 + 电针干预

2.4 β-catenin 和 GSK-3β 蛋白和基因表达水平比较 模型组和电针组 β-catenin 和 GSK-3β 蛋白和基因的表达水平较假手术组下降,同时电针组较模型组 β-catenin 和 GSK-3β 蛋白和基因的表达水平上升,差异均有统计学意义($P<0.05$),见表 3、图 4。

3 讨论

缺血性脑卒中认知障碍属于中医学“健忘”、“呆病”、“善忘”等范畴[6-7],认为督脉为“阳脉之海”,与任脉相连共同调节机体阴阳。《素问》中提到:“头者,精神之府,头倾视深,精神将夺矣”,认为心脑是调节人类情志、记忆的关键,督脉联系心脑肾,是肾气肾水通行的主要通道,而心肾乃机体精气神汇聚之所,因此,督脉上的穴位有宁心安神、开智益脑的功效[8-10]。百会穴乃三阳五会之穴,《针灸资生经》曰:“无心力,忘前失后,百会者,百脉之宗,治思虑过多,心下怔仲之要穴”,其与脑组织关系密切,有益心养脑之功效[11-12]。神庭穴亦是督脉之要穴,明代杨继洲在《针灸大成》指出:“神庭主惊悸不得安寐”,表明其有开窍安神的功效[13-14]。郭新荣等[15]对历年治疗脑部疾病的针灸穴位进行总结,发现百会穴及神庭穴是使用频率最高的组合穴,佐证了针刺百会及神庭穴治疗脑卒中认知功能障碍具有可行性。

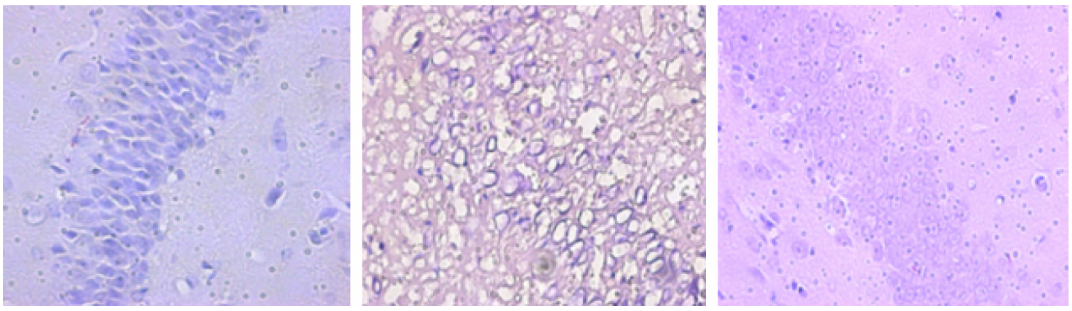


图 3 采用不同处理方法的三组大鼠海马组织病理形态学改变(HE ×400)

注:假手术组仅切开颈部皮肤,分离颈总、颈内和颈外动脉后直接缝合皮肤,模型组行 MCAO 造模,电针组行 MCAO 造模 + 电针干预

表 3 采用不同处理方法的三组大鼠 β-catenin 和 GSK-3β 蛋白和基因表达水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	β-catenin		GSK-3β	
	蛋白	基因	蛋白	基因
假手术组	2.76 ±0.47	0.58 ±0.16	2.37 ±0.52	1.35 ±0.48
模型组	0.91 ±0.32[a]	0.19 ±0.08[a]	0.41 ±0.23[a]	0.42 ±0.27[a]
电针组	1.64 ±0.41[ac]	0.37 ±0.11[ac]	0.98 ±0.26[ac]	0.71 ±0.24[ac]

注:假手术组仅切开颈部皮肤,分离颈总、颈内和颈外动脉后直接缝合皮肤,模型组行 MCAO 造模,电针组行 MCAO 造模 + 电针干预;与假手术组比较,[a]$P<0.05$;与模型组比较,[c]$P<0.05$

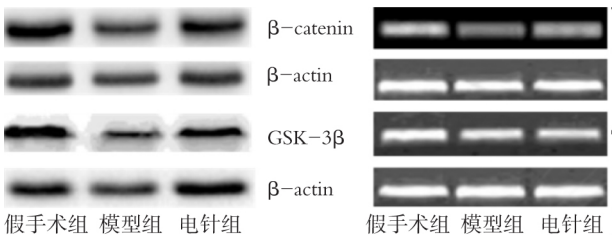


图 4 采用不同处理方法的三组大鼠海马组织 β-catenin 和 GSK-3β 蛋白和基因表达水平比较

注:假手术组仅切开颈部皮肤,分离颈总、颈内和颈外动脉后直接缝合皮肤,模型组行 MCAO 造模,电针组行 MCAO 造模 + 电针干预

本研究结果发现,电针百会穴、神庭穴后大鼠脑

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

梗死体积明显改善，说明电针百会及神庭穴可改善 MCAO 大鼠的神经缺损症状，发挥脑保护效应，且接受电针干预的大鼠在 Morris 水迷宫实验中穿越平台的次数及时间均较模型组有所改善，提示针刺干预的确可改善 MCAO 大鼠的学习记忆能力。学习记忆能力是认知功能的核心部分，与海马关系密切。有研究表明，海马区域包含的神经元突触信号的强弱直接决定机体学习记忆能力的水平，作为学习记忆的关键部位，海马组织神经元细胞对脑缺血的敏感性远高于其他区域，当脑组织缺血抑制海马神经元细胞增殖时，可进一步影响大脑皮质神经结构的完整性，导致长期学习记忆能力受损，故研究海马部位的分子生物学指标变化对 MCAO 大鼠认知改变的作用机制具有重要意义[16-17]。相关文献报道 WNT 信号通路广泛参与中枢神经系统的发育，其在维持神经干细胞稳定、扩增数量及调控分化等方面均发挥核心作用[18-19]。WNT 信号通路的标志性因子 β-catenin 和 GSK-3β 被视为神经元干细胞增殖的调控因子。正常状态下游离的 β-catenin 通过细胞核膜移位至细胞核内，作为底物与 GSK-3β 相结合而磷酸化，激活后的 β-catenin 通过干预神经元前体细胞的生长周期而影响神经元细胞的增殖分化。本研究结果显示，模型组及电针组大鼠 β-catenin 和 GSK-3β 水平均明显低于假手术组，提示脑组织缺血损伤抑制了神经元细胞增殖，经过电针干预后大鼠海马组织的 β-catenin 和 GSK-3β 水平有所上升，说明电针可促进神经元细胞的增殖，发挥脑保护效应。

综上，电针百会及神庭穴有效缩小了脑梗死体积，改善海马组织的病理学形态，提高学习记忆能力，同时可调节海马组织 WNT 信号通路相关基因及蛋白的表达，推测电针百会及神庭穴改善 MCAO 大鼠认知能力的作用机制可能与激活 WNT 信号通路有关。

[参考文献]

[1] 王栋，侯博儒，杨文桢，等. 小胶质细胞自噬在缺血性脑卒中作用的研究进展 [J]. 中国康复理论与实践，2016，22(12)：1416-1419.

[2] 刘娇，冯晓东. 电针百会、神庭穴配合康复训练治疗脑卒中后认知障碍临床研究 [J]. 中医学报，2013，28(4)：608-610.

[3] 詹杰. 针刺百会、神庭穴合康复训练治疗卒中后认知障碍的研究 [D]. 广州中医药大学，2015.

[4] 孙芳玲. 莫诺苷通过 Wnt/β-catenin 信号通路促进神经发生治疗缺血性脑损伤的研究 [C]. 第五届中国衰老与抗衰老学术大会暨第四届全国老年基础与转化医学论坛论文集，2015：94-94.

[5] 林晓敏，黄佳，游小芳，等. 电针百会、神庭对脑缺血再灌注损伤大鼠学习记忆能力及突触可塑性的影响 [J]. 康复学报，2017，27(1)：29-35.

[6] 植昌嘉，黄大红，张念希，等. 缺血性脑卒中 269 例中医辨证分型研究 [J]. 中医学报，2012，27(7)：876-877.

[7] 喻腾云，吴艳华，孙寒静，等. 缺血性脑卒中中医病因病机的层次关系 [J]. 吉林中医药，2016，36(4)：328-331.

[8] 邵敏明. 电针治疗脑卒中后轻度认知功能障碍的临床观察 [D]. 广州中医药大学，2012.

[9] 谢金山. 缺血中风后认知功能改变与中医证候相关性的研究 [D]. 福建中医药大学，2016.

[10] 周晓伟. 温阳通脉颗粒治疗缺血性中风合并轻度血管性认知障碍脾肾阳虚型的临床研究 [D]. 安徽中医药大学，2015.

[11] 林志诚，陈立典，陶静，等. 电针百会穴对脑梗死后认知障碍患者听觉 P300 的影响 [J]. 上海针灸杂志，2014，33(1)：14-17.

[12] 姜慧丽，陈利海，王丹丹，等. 电针预处理对于老年关节置换术后认知功能障碍的影响 [J]. 上海医学，2014，37(12)：1017-1019.

[13] 黄芳，王晓红，邵彬，等. 头针治疗脑外伤后认知障碍的临床效果 [J]. 中国康复理论与实践，2015，21(1)：79-81.

[14] 王莉娜，冯晓东，刘承梅，等. 温针灸对脑卒中后认知障碍的疗效 [J]. 中国康复理论与实践，2015，21(2)：199-201.

[15] 郭新荣，王瑞辉，李娜，等. 针灸治疗颅脑损伤用穴规律的现代文献研究 [J]. 时珍国医国药，2013，24(6)：1433-1434.

[16] 于永才，吴世政. 老年脑出血患者血清神经元特异性烯醇化酶、S100β 蛋白与认知功能障碍的相关性 [J]. 中国老年学杂志，2015，35(1)：90-92.

[17] 王相斌，宋福聪，郭鹏，等. 卒中后认知功能障碍与神经元特异性烯醇化酶相关性研究 [J]. 河北医药，2010，32(11)：1360-1361.

[18] 霍江涛，张小乔，严洁，等. Wnt 非经典途径对小鼠阿尔茨海默病模型的作用及机制的初步探讨 [J]. 临床和实验医学杂志，2015，14(23)：1932-1934.

[19] 李洋，肖婧姗，张忠秋，等. 慢性应激对小鼠空间学习记忆的影响及脑内 Wnt3a 的表达 [J]. 科技视界，2016(1)：12-13.

(收稿时间：2018-04-09 修回时间：2018-05-08)

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net