

· 基础研究 ·

电针不同时间介入对慢性脑缺血大鼠局灶性
脑血流、认知功能及炎性损伤的影响韩德雄¹ 刘 喆² 冯培培² 吴泽民²

摘要 **目的** 观察电针不同时间介入对慢性脑缺血(CCI)大鼠局灶性脑血流(rCBF)、认知功能及炎性损伤的作用。**方法** 清洁级健康雄性 SD 大鼠 37 只,随机分为假手术组 10 只,手术组 27 只。手术组采用双侧颈总动脉结扎法(2-VO)法复制 CCI 模型,再随机分为模型组、电针 4 周组、电针 1 周组 3 个组,各组均选取 8 只,假手术组亦取 8 只。电针 4 周组电针干预 4 周,电针 1 周组最后 1 周进行电针干预。采用激光多普勒血流仪检测造模前、造模后、处死前 rCBF, Morris 水迷宫评定大鼠认知功能,ABC-ELISA 法检测海马 IL-6、TNF- α 和 IL-1 β 水平。**结果** 与假手术组比较,手术组大鼠术后 rCBF 显著下降,且低于本组术前($P < 0.01$)。与假手术组比较,模型组 rCBF 水平降低,目标象限停留时间减短,第 2~5 日逃避潜伏时间明显增长,IL-6、TNF- α 和 IL-1 β 水平增高($P < 0.01$)。与模型组比较,电针 4 周组 rCBF 水平升高,目标象限停留时间增长,第 3~5 日逃避潜伏时间缩短,IL-6 水平增加,IL-1 β 水平下降($P < 0.05$, $P < 0.01$);电针 1 周组第 5 日逃避潜伏时间缩短($P < 0.05$)。与电针 1 周组比较,电针 4 周组目标象限停留时间增长,第 5 日逃避潜伏时间缩短($P < 0.05$)。**结论** 电针能改善 CCI 大鼠 rCBF 和认知功能,减轻炎性损伤,早期干预作用更显著。

关键词 电针;慢性脑缺血;局灶性脑血流;认知功能;炎性损伤

Effect of Electroacupuncture at Different Time Points on Regional Cerebral Blood Flow, Cognitive Function and Inflammatory Damage on Rats with Chronic Cerebral Ischemia HAN De-xiong¹, LIU Zhe², FENG Pei-pe², and WU Ze-min² 1 Department of Acupuncture and Moxibustion, the 3rd Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou (310005); 2 Acupuncture Research Laboratory, the 3rd Clinical Medical College of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou (310053)

ABSTRACT **Objective** To observe the effect of Electroacupuncture (EA) on regional cerebral blood flow (rCBF), cognitive function and inflammatory damage of rats with chronic cerebral ischemia (CCI). **Methods** 37 male SD rats were randomly divided into 2 groups including sham-operated group ($n = 10$) and operation group ($n = 27$). Bilateral common carotid artery occlusion (2-VO) method was used to establish the CCI model in operation group, and then the operation group was further randomly divided into 3 groups including model group, EA 4w group and EA 1w group, with 8 rats in each group, sham group also included 8 rats. 2/100 Hz dilatational wave EA was used in EA 4w group for 4 weeks, and in the last week in EA 1w group. rCBF pre-/post- 2-VO, and before execute were tested by laser Doppler flowmetry. Cognitive function was assessed by Morris water maze system, and IL-6/TNF- α /IL-1 β were detected by ABC-ELISA. **Results** Compared with the sham group, the rCBF in the operation group was decreased significantly after 2-VO, and was lower than that before operation ($P < 0.01$). Compared with the sham group, the level of rCBF decreased, the target quadrant time shortened, the escape latency prolonged from the 2nd to the 5th day, and the level of IL-6, TNF- α and IL-1 β increased in model group ($P < 0.01$). Compared with the model group, the level of rCBF increased, the target quadrant time prolonged, the escape latency

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81503645);浙江省重点科技创新团队计划资助项目(No. 2013TD15)

作者单位:1. 浙江中医药大学附属第三医院针灸科(杭州 310005); 2. 浙江中医药大学第三临床医学院针灸研究室(杭州 310053)

通讯作者:刘 喆, Tel: 0571-86613516, E-mail: ssrslu@163.com

DOI: 10.7661/j. cjim. 201700405. 071

shorted from the 3rd to the 5th day, IL-6 increased and IL-1 β decreased in EA 4w group ($P < 0.05$, $P < 0.01$); the escape latency shortened in the 5th day in EA 1w group ($P < 0.05$). Compared with the EA 1w group, the target quadrant time prolonged, and the escape latency in the 5th day shortened in EA 4w group ($P < 0.05$). Conclusion EA could improve rCBF, cognitive function and attenuate inflammatory damage in CCI rats, and its function was more significant in early intervention.

KEYWORDS electroacupuncture; chronic cerebral ischemia; regional cerebral blood flow; cognitive function; inflammatory damage

慢性脑缺血(chronic cerebral ischemia, CCI)是中枢神经系统常见的一种慢性病理状态,可伴发脑卒中、脑动脉粥样硬化等疾病,可导致持久或进展性的认知功能障碍^[1]。CCI 病理机制复杂,研究认为炎性损伤是其中重要环节^[2,3]。临床研究报道电针能改善慢性脑缺血状态,减缓认知下降,进而提高认知能力^[4,5],对其作用机制亦进行了部分有益的探讨^[5,6]。鉴于电针多靶点多通道的作用特点,本研究采用电针的方法,以不同缺血时间的 CCI 模型大鼠为对象,从早期干预的角度切入,探讨电针早期干预对 CCI 大鼠认知能力、脑血流量及炎性损伤的作用。

材料与方法

1 动物 健康雄性清洁级 SD 大鼠,体重 200 ± 20 g, 3~6 月龄,由浙江中医药大学实验动物中心提供,置于标准笼中饲养,饲养温度 $(23 \pm 2)^\circ\text{C}$,相对湿度 45%~50%,维持明暗周期 12 h/12 h,自由进食饮水,保持良好通风。手术前 12 h 禁食,4 h 禁水。

2 试剂及仪器 BCA-100 蛋白质定量测定试剂盒(上海博彩生物科技有限公司);IL-6 ELISA 试剂盒(上海西唐生物科技有限公司,批号:A3105);TNF- α ELISA 试剂盒(上海西唐生物科技有限公司,批号:F1696);IL-1 β ELISA 试剂盒(上海西唐生物科技有限公司,批号:A3000);韩氏穴位神经刺激仪(HANS-200A,联创科技南京济生医疗科技有限公司);华佗牌无菌针灸针(0.25 mm $\times$ 25 mm,苏州医疗用品厂有限公司);PeriFLUX 5000 激光多普勒血流仪(Perimed AB 公司);多功能酶标仪(美国 MD 公司,型号:SpectraMax M4);Morris 水迷宫系统(北京太极电子有限公司);JY92-II 超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司);Beckman 超高速离心机(美国贝克曼仪器公司)。

3 造模及分组方法 所有大鼠进行适应性喂养 3 天后按随机数字表法随机分为手术组与假手术组,两组模型制备方法如下:(1)手术组(27 只):采用双侧颈总动脉结扎法(2-VO)^[7]复制 CCI 模型。实验

大鼠称重后,用 10% 水合氯醛(40 mg/kg 体重)腹腔注射麻醉,仰卧固定于恒温手术台上,充分暴露颈部,用弯剪行颈部正中备皮术,PV 碘消毒后行颈部正中切开术,切开 1 cm 左右,钝性分离暴露双侧颈总动脉后用 4# 缝合线双线结扎,切口处用 PV 碘消毒后将大鼠置于 37°C 手术台上,采用激光多普勒血流仪检测局灶性脑血流变化,待其清醒后放回原饲养环境中喂养。术后连续 3 天肌肉注射青霉素 20 万 IU/Kg,以预防感染。(2)假手术组(10 只):抓取、固定、手术过程同手术组,仅分离双侧颈总动脉,但是不结扎。手术组造模后死亡 2 只,假手术组无大鼠死亡。手术组再选取 24 只采用随机数字表法分为模型组(8 只)、电针 4 周组(8 只)和电针 1 周组(8 只)。假手术组选取 8 只。

4 电针干预方法 电针 4 周组在造模成功后 1 h 即开始电针干预 1 次,以后 1 次/日,连续 6 日后休息 1 日,连续干预 4 周,完成最后一次电针及水迷宫测试后当日取材;电针 1 周组造模成功后前 3 周不进行电针治疗,第 4 周开始电针,1 次/日,连续 6 日,完成最后一次电针及水迷宫测试后当日取材。穴位及电针参数:参照大鼠穴位图谱^[8]取“百会”、“大椎”,针刺时固定大鼠头部,局部常规消毒后,取 0.25 mm $\times$ 25 mm 华佗牌无菌针灸针,百会穴沿大鼠头部正中向后平刺约 1 cm;大椎穴直刺约 0.5 cm,将韩氏穴位神经刺激仪正极接百会穴,负极接大椎穴。电针频率 2/100 Hz 疏密波,电流强度 (1 ± 1) mA,以大鼠头部出现轻微抖动且能安静耐受为度,持续 30 min 后停止。模型组抓取、固定方法同电针组,不进行电针干预。假手术组不予任何处理。

5 脑血流及行为学评定 激光多普勒血流仪分别测定大鼠术前、术后、电针完成后相应时间点各组局灶性脑血流(regional cerebral blood flow, rCBF)变化。以大鼠目外眦与耳孔连线的中点作为检测点,剔除毛发后做一长约 5 mm 的纵向切口,钝性分离肌肉组织露出骨面,用无菌棉球蘸 3% H_2O_2 充分清洁暴露骨面,用特制胶水将探头底座固定于骨面,将探头插

入底座,待电脑显示屏上数值稳定后记录脑血流数据并
存盘,记录时间≥3 min。

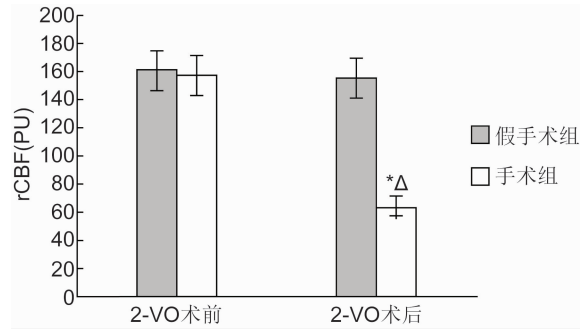
采用 Morris 水迷宫评价大鼠认知能力。所有大鼠
于处死前 5 日开始进行水迷宫测试,其中定位航行
试验连续进行 5 日,每日 2 次,两次间隔 15 min,第
5 日完成定位航行试验后,当日进行进行空间探索试
验,共进行 2 次,中间休息 15 min。具体方法为(1)
定位航行试验(2 次/日):将大鼠面向池壁,从平台的
对面或者相邻象限放入水中,从入水开始计时,找到隐
藏在水面下平台的时间为止,为一次逃避潜伏期时间。
若大鼠在 120 s 内未找到平台,则由研究员将其引至
平台,逃避潜伏期记为 120 s。(2)空间探索试验:连
续 5 日定位航行试验完成后,去除平台,以平台对侧象
限为入水点,开始计时,记录其在 120 s 内跨越原平台
所在象限的时间。

6 取材及指标检测 干预后,用 10% 水合氯醛
麻醉大鼠,剪下头部,放置于冰台上迅速取出脑组织并
分离海马区,然后将其组织存入 2 mL 离心管中,迅速
置于液氮罐中低温保存以备 ELISA 检测。严格按照
说明书流程,采用双抗体夹心 ABC-ELISA 法检测海
马 IL-6、TNF-α 和 IL-1β 水平。

7 统计学方法 采用 SPSS 16.0 进行统计,计
量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。定位航行试验采用重复测量数
据的多因素方差分析;组内前后比较采用配对 *t* 检验,
多组间比较采用单因素方差分析;组间两两比较,方
差不齐性时采用 *LSD* 检验,方差不齐时采用 *Dunnett's*
T3 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 手术组与假手术组手术前后 rCBF 水平比较
(图 1) 术前手术组和假手术组 rCBF 水平比较,差
异无统计学意义($P > 0.05$)。与假手术组比较,手术
组大鼠术后 rCBF 显著下降,且低于本组术前($P <$
 0.01)。手术组大鼠均有轻重不一的脑缺血表现:全
身毛发蓬乱、对刺激反应迟钝、自发动作缓慢减少,部
分模型大鼠有一侧或者两侧的眼睑轻度下垂,但无肢

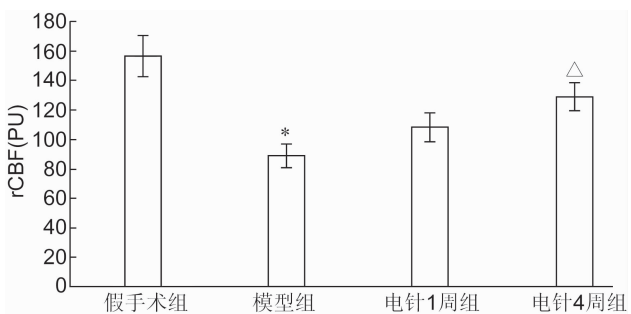


注:与假手术组比较, * $P < 0.01$;与本组术前比较,
 $\Delta P < 0.01$

图 1 手术组与假手术组手术前后
rCBF 水平变化 ($n = 8, \bar{x} \pm s$)

体残疾或者是四肢肌力不等表现,符合研究需要。

2 电针后各组 rCBF 比较(图 2) 与假手术组
比较,模型组 rCBF 水平降低($P < 0.01$)。与模型组
比较,电针 4 周组 rCBF 水平升高($P < 0.05$)。电针
1 周组 rCBF 较模型组亦有改善,但差异无统计学意
义($P > 0.05$)。



注:与假手术组比较, * $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$

图 2 电针组后各组 rCBF 比较($n = 8, \bar{x} \pm s$)

3 各组定位航行试验结果比较(表 1) 与假手
术组比较,模型组第 2~5 日逃避潜伏时间明显增长
($P < 0.01$);与模型组比较,电针 1 周组第 5 日逃避潜
伏时间缩短($P < 0.05$),电针 4 周组自第 3~5 日逃避
潜伏时间缩短,且第 5 日逃避潜伏时间少于电针 1 周
组($P < 0.05, P < 0.01$)。

表 1 各组定位航行试验比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	逃避潜伏期时间(s)				
		第 1 日	第 2 日	第 3 日	第 4 日	第 5 日
假手术	8	48.17 ± 4.87	23.11 ± 2.10	19.67 ± 2.30	13.87 ± 1.80	7.29 ± 1.05
模型	8	46.76 ± 4.65	42.15 ± 3.57 *	35.42 ± 3.08 *	32.77 ± 2.82 *	30.18 ± 2.73 *
电针 1 周	8	47.56 ± 4.54	40.08 ± 3.18	30.67 ± 2.64	26.22 ± 2.15	20.74 ± 2.00 Δ
电针 4 周	8	47.93 ± 4.37	35.51 ± 2.20	26.23 ± 2.0 Δ	18.92 ± 2.0 $\Delta\Delta$	10.89 ± 1.80 $\Delta\Delta\Delta$

注:与假手术组比较, * $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$;与电针 1 周组比较, $\Delta\Delta\Delta P < 0.05$

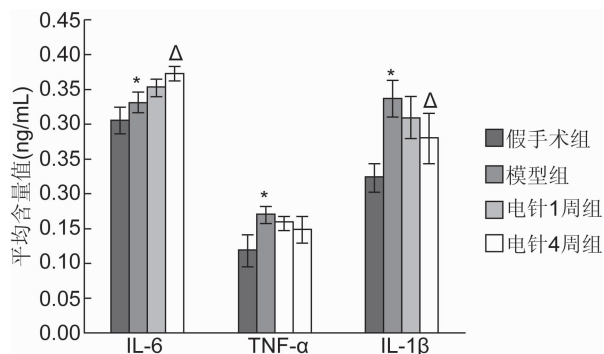
4 空间探索试验(表 2) 与假手术组比较,模型组目标象限停留时间明显减短($P < 0.01$)。与模型组比较,电针 4 周组目标象限停留时间明显增长,且长于电针 1 周组($P < 0.01$, $P < 0.05$)。

表 2 各组空间探索试验比较 ($s, \bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	目标象限停留时间
假手术	8	25.82 $\pm$ 2.29
模型	8	16.41 $\pm$ 1.88 *
电针 1 周	8	18.52 $\pm$ 2.06
电针 4 周	8	22.37 $\pm$ 2.13 Δ^{Δ}

注:与假手术组比较, * $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.01$;与电针 1 周组比较, $\Delta^{\Delta} P < 0.05$

5 各组 IL-6、TNF- α 和 IL-1 β 水平比较(图 3) 与假手术组比较,模型组 IL-6、TNF- α 和 IL-1 β 水平增高($P < 0.05$)。与模型组比较,电针 4 周组 IL-6 水平增加,IL-1 β 水平下降($P < 0.05$)。



注:与假手术组比较, * $P < 0.05$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$

图 3 各组 IL-6、TNF- α 和 IL-1 β 水平比较 ($n = 8, \bar{x} \pm s$)

讨 论

人口老龄化使慢性脑缺血患病率不断增加^[9],而且老龄化有加重的趋势,预计到 2020 年老年人口将达到 2.4 亿^[10],虽然 CCI 致病缓慢,但其对认知能力可以带来持久而进展性的破坏,给患者及其家庭,以及社会带来严重的影响。

海马、纹状体、小脑等结构的存在是空间学习、记忆能力的生理基础^[11],其中海马尤为重要。研究发现在认知能力下降前两年,血管性痴呆患者海马、额叶等重要区域的脑血流量已呈弥漫性下降^[12],进一步研究 CCI 大鼠模型显示,缺血 2.5 h 后大鼠大脑皮质及海马区的血流已有明显下降,最明显的是海马区域,下降率最高达 60%^[13],随着慢性脑缺血时间的不断延长,

敏感区域神经元逐渐出现缺血、水肿、变性坏死、脱失等病理改变^[14],若脑血流持续不能改善,上述敏感区域影响不断加重,认知能力也逐渐恶化。因此早期改善慢性脑缺血状态,增加敏感区域脑血流对减轻脑损伤,提高认知能力至关重要。

炎症免疫反应在脑缺血后脑组织坏死和继发性损伤中扮演了重要的角色已经成为专家共识^[15]。参与炎症损伤的主要有炎症免疫细胞、炎症免疫因子、黏附分子等。IL-1 β 、TNF- α 是中枢神经系统与慢性缺血损伤密切相关的炎症反应因子,可以导致髓鞘脱失、少突胶质细胞的凋亡、血栓形成、血管增殖、白细胞浸润及血脑屏障的破坏^[16]。普遍认为 IL-1 加重脑缺血损伤,尤其是 IL-1 β ^[17,18],还和 TNF- α 有协同脑损害作用,进一步加剧脑损伤^[19]。但是对 IL-6 尚缺乏统一的认识,有研究认为其在脑缺血中有益^[20],也有认为其加剧脑损伤^[21],但是多数研究认为其具有神经保护作用^[22],笔者的研究结果也显示电针能下调 IL-1 β 、TNF- α ,上调 IL-6 的表达,改善认知功能,提示 IL-6 可能有助于减轻中枢神经损伤。

本研究结果表明,两电针组大鼠认知能力较模型组均有改善,说明电针对改善认知能力具有较好的作用,尤其是早期介入的电针 4 周组改善更显著,证明电针早期干预疗效符合临床需要,符合中医学“治未病”早期诊断、早期治疗指导思想。进一步研究表明,电针改善认知功能的作用可能是通过改善局灶性脑血流量,减轻炎症损伤达到的。

当然,本研究尚处于初步阶段,还存在需要探讨的问题,如 CCI 模型的复制,经典的 2-VO 模型为术后 3 周左右进行 Morris 水迷宫测试和病理检测^[7]评价造模是否成功,而本研究强调早期干预,2-VO 造模后即进行电针干预,因此除了 rCBF,正试图寻求新的可行的评价指标。另外,与炎症损伤相关的细胞、因子、通路复杂,本研究将进一步研究探讨。

参 考 文 献

- [1] Daulatzai MA. Cerebral hypoperfusion and glucose hypometabolism: Key pathophysiological modulators promote neurodegeneration, cognitive impairment, and Alzheimer's disease[J]. J Neurosci Res, 2017, 95(4): 943-972.
- [2] Orellana DI, Quintanilla RA, Gonzalez-Billault C, et al. Role of the JAKs/STATs pathway in the intracellular calcium changes induced by interleukin-6 in hippocampal neurons[J]. Neurotox Res, 2005, 8(3-4): 295-304.

- [3] Wang J, Zhang HY, Tang XC. Huperzine A improves chronic inflammation and cognitive decline in rats with cerebral hypoperfusion[J]. *J Neurosci Res*, 2010, 88(4): 807–815.
- [4] 王澍欣, 廖穆熙, 张宾, 等. 耳针配合靳三针治疗非痴呆型血管性认知功能障碍的临床研究[J]. *中国针灸*, 2016, 36(6): 571–576.
- [5] 林舜艳, 尹正录, 高巨, 等. 针药复合麻醉对老年患者术后早期认知功能障碍及炎症细胞因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的影响[J]. *中国中西医结合杂志*, 2014, 34(7): 795–799.
- [6] 张业贵, 熊克仁. 电针联合复方丹参片对慢性脑缺血大鼠海马 CA1 区脑源性神经营养因子和血管内皮生长因子表达的影响[J]. *中国中西医结合杂志*, 2012, 32(5): 643–646.
- [7] De la Torre JC, Fortin T, Park GA, et al. Chronic cerebrovascular insufficiency induces dementia-like deficits in aged rats[J]. *Brain Res*, 1992, 582(2): 186–195.
- [8] 华兴邦, 周浩良. 大鼠穴位图谱的研制[J]. *实验动物与动物实验*, 1991, 2(1): 1–5.
- [9] 王定坤. 我国脑血管病的流行病学分析与防治对策[J]. *中医药管理杂志*, 2014, 22(6): 830–831.
- [10] 杜鹃. 中国人口老龄化现状与变化[J]. *中国社会保障*, 2013, 11(2): 23–26.
- [11] Rosi S, Andres-Mach M, Fishman KM, et al. Cranial irradiation alters the behaviorally induced immediate-early gene arc (activity-regulated cytoskeleton-associated protein) [J]. *Cancer research*, 2008, 68(23): 9763–9770.
- [12] Rogers RL, Meyer JS, Mortel KF, et al. Decreased cerebral blood flow precedes multi-infarct dementia, but follows senile dementia of Alzheimer type[J]. *Neurology*, 1986, 36(1): 1–6.
- [13] 舒怡, 张洪, 章军建. 慢性脑低灌注的实验研究进展[J]. *中华脑血管病杂志*, 2010, 4(3): 199–206.
- [14] 孙莉, 吴江, 王守春, 等. 血管性痴呆大鼠脑血流量及细胞凋亡的研究[J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2001, 3(6): 409–411.
- [15] Du SQ, Wang XR, Xiao LY, et al. Molecular Mechanisms of Vascular Dementia: What Can Be Learned from Animal Models of Chronic Cerebral Hypoperfusion? [J]. *Mol Neurobiol*, 2016. [Epub ahead of print].
- [16] 付清松, 夏玉军, 张明, 等. 三维球体间充质干细胞移植对大鼠缺血再灌注损伤脑组织 TNF- α 及凋亡相关蛋白表达的影响[J]. *第二军医大学学报*, 2015, 36(8): 845–850.
- [17] Pinteaux E, Rothwell NJ, Boutin H. Neuroprotective actions of endogenous interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra) are mediated by glia[J]. *Glia*, 2006, 53(5): 551–556.
- [18] Hurn PD, Subramanian S, Parker SM, et al. T- and B-cell-deficient mice with experimental stroke have reduced lesion size and inflammation[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2007, 27(11): 1798–1805.
- [19] Pan W, Kastin AJ. Tumor necrosis factor and stroke: role of the blood-brain barrier[J]. *Prog Neurobiol*, 2007, 83(6): 363–374.
- [20] Herrmann O, Tarabin V, Suzuki S, et al. Regulation of body temperature and neuroprotection by endogenous interleukin-6 in cerebral ischemia[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2003, 23(4): 406–415.
- [21] Smith CJ, Emsley HC, Gavin CM, et al. Peak plasma interleukin-6 and other peripheral markers of inflammation in the first week of ischaemic stroke correlate with brain infarct volume, stroke severity and long-term outcome[J]. *BMC Neurol*, 2004, 4:2.
- [22] Allan SM, Rothwell NJ. Cytokines and acute neurodegeneration[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2001, 2(10): 734–744.

(收稿:2016-11-10 修回:2017-03-13)

责任编辑: 汤 静