

督脉电针对慢性脑缺血大鼠记忆能力及食欲素受体 1 表达的研究

刘丹^{1a}, 刘瑜², 罗正凯^{1b}, 王淑荣^{1a}, 陈洪琳^{1a}, 于国强^{1a}

(1. 黑龙江中医药大学附属第一医院, a 针灸四科, b 血液科, 哈尔滨 150040; 2. 黑龙江中医药大学)

[摘要] **目的** 探讨督脉电针对慢性脑缺血大鼠记忆能力及食欲素受体 1(OX₁R)所产生的影响。**方法** 选用 70 只 Wistar 大鼠通过分次结扎双侧颈总动脉法建立慢性脑缺血的大鼠模型,分为 4 组。造模成功后,将实验大鼠按随机数字表法分为对照组、模型组、立即针刺组、针刺治疗组。对照组不予任何处理,正常饲养;模型组、立即针刺组及针刺治疗组又分为 1 个月、2 个月 2 小组,每组或亚组的大鼠各 10 只,立即针刺组首次造模即开始进行督脉电针干预,针刺治疗组在造模开始后第 3 周开始进行督脉电针干预。采用水迷宫对大鼠进行行为学评价,同时用免疫组织化学法测定 OX₁R 阳性细胞数。**结果** 模型组缺血 1 个月,大鼠学习记忆能力较对照组减退,2 个月时较 1 个月时有所好转;2 个月时针刺治疗组学习记忆能力优于模型组,而立即针刺组略优于针刺治疗组。模型组于造模开始后 1 个月 OX₁R 表达高于对照组,2 个月时进一步增高;1 个月时针刺治疗组与模型组相比,OX₁R 表达差异无统计学意义($P > 0.05$),而立即针刺组与模型组相比,OX₁R 表达有升高($P < 0.05$);2 个月时针刺治疗组与模型组相比 OX₁R 表达有明显升高($P < 0.05$),而立即针刺组与针刺治疗组相比 OX₁R 表达有升高($P < 0.05$)。**结论** 督脉电针干预后促进了脑组织 OX₁R 的表达,同时发现早期干预对 OX₁R 表达的影响优于正常治疗组中 OX₁R 的表达。

[关键词] 缺氧缺血,脑;记忆障碍;电针;大鼠, Wistar

中图分类号:R743 文献标识码: A DOI:10.3969/J.issn.1672-6790.2017.04.028

The study of Du meridian electroacupuncture on the ability to remember and OX₁R expression of rats with chronic cerebral ischemia Liu Dan*, Liu Yu, Luo Zhengkai, Wang Shurong, Chen Honglin, Yu Guoqiang (* Department IV of Acupuncture & Moxibustion, First Affiliated Hospital, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

[Abstract] **Objective** To explore the effect of Du meridian electroacupuncture on the memory ability and OX₁R expression of mice with chronic cerebral ischemia. **Methods** The cerebral ischemic models were established by fractionally ligating bilateral carotid arteries. Seventy mice were divided into four groups by random number table method: control, model, immediately acupuncture and acupuncture groups. The behavior of the models was evaluated by water maze. The number of OX₁R positive cells was determined by immunohistochemical. **Results** After 1 month ligation, the memory ability of mice was impaired in model group 1 month later, and improved after 2 months. The memory ability in acupuncture group was better than that in model group, immediately acupuncture group was better than that in acupuncture group, and there was significant difference. The expression level of OX₁R of model group was higher than that in control group, and the expression of OX₁R was further increased after 2 months. There were no significant differences between the model group and the acupuncture group at 1 month, but the expression of OX₁R in the immediate acupuncture group was higher than that of model group. The OX₁R expression in acupuncture group was higher than model group, and the same result between immediate acupuncture group and acupuncture group after 2 month. **Conclusions** The Du meridian electroacupuncture promote the brain tissue OX₁R expression of mice with chronic cerebral ischemia.

[Key words] Hypoxia-ischemia; Memory disorders; Electroacupuncture; Rats, Wistar

慢性脑供血不足(CCCI)是多种因素(脑动脉粥样硬化、颈椎骨质增生、精神因素等)综合作用导致

脑组织低灌注,脑部血流速度改变(增快或减慢),当供应量低于生理需要量就会出现相应敏感区域的

基金项目:黑龙江省教育厅科学技术研究项目(12541760)

作者简介:刘丹,主任医师,Email:gameckld@126.com

病理改变。食欲素受体 1 (OX₁R) 是能与 orexin-A 及 orexin-B 相结合的 G 蛋白受体,是主要存在于下丘脑背外侧区的一类神经肽^[1],研究表明慢性脑缺血可导致 OX₁R 发生变化^[2],本研究通过结扎双侧颈总动脉法建立慢性脑缺血的大鼠模型,观察慢性脑缺血大鼠皮质及海马 CA1 区的 OX₁R 表达阳性细胞数,同时运用督脉电针早期干预,观察干预后的疗效,并探讨其作用机制。

1 材料及方法

1.1 试剂与动物 Wistar 大鼠 70 只,由黑龙江中医药大学动物实验中心提供。大鼠山羊抗多克隆 OX₁R 抗体(200 mg/L)购自 Santa Cruz 公司,免疫组织化学 SP 试剂盒购自北京中山生物技术有限公司, CY3 标记的山羊、FITC 标记的小鼠 II 抗荧光试剂均购自武汉博士德生物试剂公司。

1.2 慢性脑缺血大鼠模型建立及实验分组 参照刘丹等^[3]方法分次永久性结扎大鼠双侧颈总动脉(2VO)制备慢性脑缺血大鼠模型。将实验大鼠按随机数字表法分为对照组、模型组、立即针刺组、针刺治疗组。对照组不予任何处理,正常饲养;模型组、立即针刺组及针刺治疗组又分为 1 个月、2 个月 2 小组,每组或亚组的大鼠各 10 只,立即针刺组首次造模即开始进行督脉电针干预,针刺治疗组在造模开始后第 3 周开始进行督脉电针干预。

1.3 操作方法 通过督脉电针进行干预,采用针刺督脉穴(神庭、百会和风府、大椎),再接上电疗仪,采用持续脉冲电流、疏波、频率 2 Hz、强度 2 mA,以头部出现轻微抖动为最佳,针刺时间 20 min,每日同一时间进行 1 次针刺。

1.4 大鼠的学习记忆能力测试 参照刘丹等^[3]方法制作水迷宫,分别于造模成功后的不同时间点游水迷宫同时评价其学习记忆能力,计算大鼠自水迷宫起点到安全台的终点所用时间(即逃避潜伏期)为评价大鼠学习记忆能力的指标,连续测量 5 次,并取其平均值。

1.5 脑组织切片的制备与 OX₁R 的表达水平测定 对照组、模型组、立即针刺组及针刺治疗组在同一规定时间点分别于造模后 1 个月、2 个月进行标本采集。使用 SP 染色试剂盒进行免疫组织化学染色,按照试剂盒说明书的操作步骤进行,DAB 显色,需镜下控制时间,光镜观察;OX₁R 主要表达在海马 CA1 区,随机选择 5 个镜下视野 1000 个细胞,计算阳性细胞数。

1.6 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件,应用单因

素方差分析、独立样本 *t* 检验及秩和检验分析数据。

2 结果

2.1 行为学评价 模型组 1 个月时慢性脑缺血大鼠逃避潜伏期较对照组明显延长($P < 0.05$);针刺治疗组 1 个月时与模型组 1 个月时比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);而立即针刺组 1 个月时较针刺治疗组大鼠的学习记忆能力稍有好转,差异有统计学意义($P < 0.05$);模型组 2 个月时逃避潜伏期较 1 个月时稍好转,差异有统计学意义($P < 0.05$);而 2 个月时针刺治疗组较模型组,差异有统计学意义($P < 0.05$);立即针刺组 2 个月时较针刺治疗组有好转,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 各组大鼠逃避潜伏期

组别	鼠数(只)	逃避潜伏期($\bar{x} \pm s, s$)
对照组	10	32.41 ± 19.18
模型组 1 个月	10	74.62 ± 26.55 ^a
模型组 2 个月	10	67.82 ± 27.34 ^a
针刺治疗组 1 个月	10	72.98 ± 20.66 ^a
针刺治疗组 2 个月	10	38.68 ± 13.59 ^b
立即针刺组 1 个月	10	67.12 ± 19.76 ^{ac}
立即针刺组 2 个月	10	31.59 ± 12.37 ^{bc}

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$;与模型组同时间亚组比较,^b $P < 0.05$;与针刺治疗组同时间亚组比较,^c $P < 0.05$

2.2 OX₁R 的表达 模型组于造模开始后 1 个月 OX₁R 表达高于对照组,2 个月时进一步增高。在同一时间组中,1 个月针刺治疗组与模型组相比 OX₁R 表达无明显差异($P > 0.05$),立即针刺组与模型组相比 OX₁R 表达有升高($P < 0.05$);2 个月时治疗组与模型组相比 OX₁R 表达有明显升高($P < 0.05$),而立即针刺组与针刺治疗组相比 OX₁R 表达有升高($P < 0.05$),见表 2。

表 2 OX₁R 阳性细胞数($\bar{x} \pm s, /5$ 个视野 1000 个细胞)

组别	鼠数(只)	皮层 OX ₁ R 阳性细胞数	海马 CA1 区 OX ₁ R 阳性细胞数
对照组	10	446.43 ± 16.54	416.71 ± 13.58
模型组 1 个月	10	459.24 ± 27.92 ^a	459.31 ± 28.02 ^a
模型组 2 个月	10	597.66 ± 11.24 ^a	589.29 ± 24.33 ^a
针刺治疗组 1 个月	10	461.33 ± 28.04 ^a	460.97 ± 29.13 ^a
针刺治疗组 2 个月	10	701.21 ± 31.32 ^{ab}	698.47 ± 39.12 ^{ab}
立即针刺组 1 个月	10	502.31 ± 38.24 ^{abc}	498.47 ± 39.12 ^{abc}
立即针刺组 2 个月	10	703.02 ± 32.41 ^{abc}	702.09 ± 32.03 ^{abc}

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$;与模型组同一时间亚组比较,^b $P < 0.05$;与针刺治疗组同时间亚组比较,^c $P < 0.05$

3 讨论

慢性脑缺血持续时间的长短与其对大脑的认知和中枢神经功能的损坏具有相关性^[4]。Siegel等^[5]发现食欲素系统有可能与神经的修复有关。采用水迷宫测量慢性脑缺血大鼠逃避潜伏期对其进行行为学评价,水迷宫是评价大鼠学习记忆能力有效的工具,结果显示模型组缺血1个月,大鼠学习记忆能力较对照组减退,2个月时较1个月时有所好转;2个月时针刺治疗组学习记忆能力优于模型组,而立即针刺组略优于针刺治疗组。同时,1个月时,模型组与治疗组OX₁R表达差异无统计学意义,但模型组与立即针刺组相比较OX₁R表达有升高;治疗组2个月时OX₁R的表达较模型组明显升高,而立即针刺组与治疗组相比,立即针刺组2个月时OX₁R的表达较治疗组有所上升。目前尚无明确机制解释这种现象,可能有以下原因:早期脑组织缺血时,应激、免疫及低血糖等反应刺激Orexin-A的释放,Orexin-A又促进了CRF、神经肽Y和ACTH的升高使糖皮质激素和肾上腺素含量升高。体内过度活化的自主神经系统,过多的NPY、CRF和糖皮质激素对Orexin-A产生强烈反馈抑制作用,加上Orexin-A被体内自由基破坏,使Orexin-A的表达下降,OX₁R出现反应性的升高。缺血1个月体内应激和免疫反应渐减弱,NPY与CRF、糖皮质激素与自由基水平下降,Orexin-A的表达上调,新平衡恢复^[6],OX₁R的表达开始下降;在2个月时机体为了促进自身修复,下丘脑表达的OX₁R再次升高。OX₁R在脑内海马区及大脑皮层等均有表达^[2],有研究证实皮层和海马区是缺血后最敏感的区域^[7-8],皮质及海马与信息的储存和记忆密切相关^[9],当皮质及海马区受损后大鼠会出现不同程度的学习记忆能力改变^[10]。相关研究^[11-16]亦表明督脉电针能够有效改善脑部血流量、保护脑部组织,进一步促进缺血后神经细胞的再生和存活。本研究发现经过督脉电针干预后对慢性脑缺血大鼠学习记忆能力及皮质和海马区OX₁R的表达均有提高,而早期进行针刺治疗对大鼠学习记忆能力及皮质和海马区OX₁R的表达又较针刺治疗组有所提高,提示经过督脉电针的干预后能够对大鼠脑内OX₁R的表达情况起到良性的调节作用,提示督脉电针可能对慢性脑缺血大鼠缺血后期导致的大脑的神经细胞的损伤有一定防治作用。

参考文献

[1] FERGUSON AV, SAMSON WK. The orexin/hypocretin sys-

- tem; a critical regulator of neuroendocrine and autonomic function[J]. *Front Neuroendocrinol*, 2003, 24(3): 141-150.
- [2] 吕瑞娟. 慢性脑缺血大鼠脑OX₁R的表达变化[J]. *中国病理生理杂志*, 2008, 24(3): 519-522.
- [3] 刘丹, 张子凡, 单芳宇. 督脉电针的早期干预对慢性脑缺血大鼠大脑皮质p53、BDNF表达的影响[J]. *中医药学报*, 2014, 42(3): 107-108.
- [4] 彭春平, 吴松鹰. 慢性脑供血不足中西医研究进展[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2014, 12(11): 1385-1386.
- [5] SIEGEL JM, NIENHUS R, GULYANI S, et al. Neuronal degeneration in canine narcolepsy[J]. *J Neurosci*, 1999, 19(1): 248-257.
- [6] SMART D, JERMAN J. The physiology and pharmacology of the orexins[J]. *Pharmacol Ther*, 2002, 94(8): 51-61.
- [7] JEONG HJ, YOO DY, KIM DW, et al. Neuroprotective effect of PEP-1 peroxiredoxin2 on CA1 regions in the hippocampus against ischemic insult[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1840(7): 2321-2330.
- [8] 张文丽, 唐慧, 周彩凤, 等. 延迟性脑缺血后处理对大鼠海马CA1区神经元及超微结构的影响[J]. *实用医学杂志*, 2015, 31(19): 3146-3149.
- [9] SHANG Y, CHENG J, OI J, et al. Scutellaria flavonoid reduced memory dysfunction and neuronal injury caused by permanent global ischemia in rats[J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2005, 82(13): 67-73.
- [10] 刘丹, 董艳娟, 周冬翠. 慢性脑供血不足患者认知功能与S100 β 蛋白、同型半胱氨酸水平的相关性[J]. *中国临床保健杂志*, 2016, 19(4): 360-362.
- [11] 沈彦喜, 范刚启. 论“督脉入脑”之径[J]. *上海中医药大学学报*, 2015, 29(5): 24-28.
- [12] 周兵, 张鸿宇, 杨文利, 等. 临床电针治疗研究进展[J]. *中国中医急症*, 2013, 22(8): 1379-1380.
- [13] 程红亮, 周婷, 张闻东, 等. 针刺督脉组穴治疗血管性认知障碍的临床研究[J]. *中国临床保健杂志*, 2015, 18(5): 512-514.
- [14] 曾超, 刘喆, 王改梅, 等. 电针对大鼠脑缺血再灌注后局部脑血流量的影响[J]. *上海针灸杂志*, 2012, 31(6): 441-443.
- [15] 詹宇豪, 张文丽, 王亚飞, 等. 从督脉看脑血管疾病的治疗进展[J]. *现代中西医结合杂志*, 2015, 24(25): 2848-2850.
- [16] 郭现军, 张平, 潘更毅, 等. 电针督脉治疗脊髓损伤52例疗效观察[J]. *新中医*, 2012, 44(9): 83-84.

(收稿日期: 2016-10-28)