

· 针灸经络 ·

耳针对血管性痴呆大鼠认知功能及海马神经细胞的影响

乔晓迪¹, 张媛媛², 张庆萍³, 井杰⁴

(1. 安徽中医药大学研究生院, 安徽 合肥 230012; 2. 安徽中医药大学第一附属医院, 安徽 合肥 230031; 3. 安徽中医药大学针灸推拿学院, 安徽 合肥 230012; 4. 杭州市余杭区第五人民医院, 浙江 杭州 311100)

[摘要]目的 动态观察耳针对血管性痴呆(vascular dementia, VD)大鼠认知功能及海马神经细胞的影响。方法 从60只健康雄性SD大鼠中随机选取10只为正常组,其余采用四血管阻断法复制VD大鼠模型,然后随机分为模型组、耳针组、西药组,每组10只。于模型复制后第4天,治疗第30、60天时,采用跳台实验检测各组大鼠的学习记忆成绩,并进行神经行为学评分;于模型复制后第4天、治疗第60天时,光镜下观察各组大鼠海马CA1区神经细胞形态。结果 模型复制后第4天,与正常组比较,模型组大鼠学习记忆成绩、神经行为学评分及海马CA1区锥体存活细胞数差异均有统计学意义($P < 0.05$);耳针治疗30、60 d后,与模型组比较,耳针组及西药组大鼠学习记忆成绩、神经行为学评分差异均有统计学意义($P < 0.05$),耳针组与西药组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);治疗60 d后,耳针组、西药组大鼠海马CA1区锥体细胞存活数与模型组比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$);耳针组与西药组相比,差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 耳针可以提高VD大鼠的学习记忆能力,降低神经行为学评分;耳针可改善变性的海马CA1神经细胞,促进其修复与再生,从而提高VD大鼠学习记忆功能,这可能是临床耳针治疗VD有效作用的可能机制。

[关键词]血管性痴呆;认知功能;耳针;海马

[中图分类号]R749.1⁺6 **[DOI]**10.3969/j.issn.2095-7246.2019.02.010

血管性痴呆(vascular dementia, VD)是指由各种脑血管疾病引起的,以记忆、认知功能缺损为主要症状的临床综合征^[1],VD是老年期痴呆的主要类型之一。在导致VD的各种脑血管性疾病中,以缺血性脑血管疾病最为多见,脑内缺血低氧性低灌注可直接或间接损伤海马区神经细胞,引起海马CA1区神经细胞损伤及突触丢失,从而导致学习记忆功能障碍。据流行病学调查,在欧美,VD占老年期痴呆的30%,而在我国则高达60%,且有渐增的趋势。然而,目前尚缺乏可改善VD认知障碍的疗效肯定的药物,因此,探索非药物治疗VD已日益受到国内外学者的重视。本研究选择以治疗持续性最佳的耳针为治疗手段,取大鼠耳穴“心”“肾”“皮质下”,分别在耳针治疗的不同时间节点,动态观察VD大鼠学习记忆成绩、神经行为学评分,并结合治疗前后VD大鼠海马CA1区神经细胞形态变化,探讨耳针治疗VD的作用机制,以期为其临床应用提供进一步的理论和实验依据。

基金项目:国家自然科学基金面上项目(8157151194);安徽省科技计划项目(11070403041)

作者简介:乔晓迪(1993-),女,硕士研究生

通信作者:张庆萍(1957-),女,教授, zhangqp66@163.com

1 材料

1.1 实验动物 体质量约350 g的健康雄性Wistar大鼠60只,购自南京实验动物中心[(SCXK(苏)2008-0004)],常规饲养于安徽中医药大学经络研究所实验室动物房。

1.2 药物 尼莫地平片(山西亚宝药业集团股份有限公司),研磨成粉末并与蒸馏水混合,制成0.01 g/mL的溶液。

1.3 主要试剂与仪器 水合氯醛:上海医药集团有限公司;DTT-2大鼠跳台仪:中国中医科学院;莱卡2135石蜡切片机:安徽电子科学研究所;BM-II型病理组织包埋机:安徽电子科学研究所;Olympas PM-20显微照相设备、Olympas BX-51光学显微镜:日本奥林巴斯光学株式会社。

2 方法

2.1 模型复制与分组 采用四血管阻断法^[2]复制VD模型,模型复制4 d后,利用跳台实验、神经行为学评分筛选VD模型大鼠30只,采用电脑生成随机数字法将其分为耳针组、西药组、模型组,每组10只。另取10只大鼠设为正常组。

2.2 治疗方法 正常组与模型组不采取治疗措施,常规饲养。①耳针组:取大鼠耳穴“心”“肾”“皮质下”,穴位定位参照华兴邦《大鼠图谱的研制》^[3]。采

用无菌掀针,将掀针固定留置于所选大鼠耳穴上12 h,每日1次,两耳交替治疗,30 d为1个疗程,共治疗2个疗程,两个疗程之间休息1 d。②西药组:尼莫地平12 mg/kg(相当于60 kg成人临床剂量的6倍),按20 mL/kg灌胃给药,疗程同耳针组。

2.3 观察指标及方法

2.3.1 跳台实验 按照金杰等^[4]的方法改制跳台仪。大鼠首次跳下平台时间为潜伏期,并记录其5 min内受电击的次数,作为学习记忆成绩数据。模型复制后第4天及治疗第30、60天,均测定各组大鼠学习记忆成绩。

2.3.2 神经行为学评分 模型复制后第4天,对正常组、模型组大鼠进行首次神经行为学评分。以治疗第30天、60天结束后6 h为时间节点,采用6级评分法^[5]分别对各组大鼠进行神经行为学评分。0分:无功能障碍;1分:不能伸展前肢;2分:向一侧旋转;3分:向一侧倾倒;4分:无自主活动伴意识抑制;5分:死亡。将评分为1、2、3分的大鼠纳入实验。

2.3.3 组织学观察 采用10%水合氯醛对大鼠进行腹腔麻醉,后断头取脑,经组织脱水,石蜡包埋,以厚度5~8 μm对海马部位连续切片,选取5张相同平面用于苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色观察,并在400倍光镜下选取海马CA1区3个不重复的视野,用于观察神经细胞形态的变化,分别记录3个视野的完整神经细胞数量,取平均值。

2.4 统计学方法 采用SPSS 20.0软件对数据进

行统计学分析。连续型变量采用“均数±标准差($\bar{x}\pm s$)”进行统计学描述。正常组与模型组均数比较采用两独立样本 t 检验,除正常组之外的其他组间均数多重比较采用LSD检验(方差齐时)或Dunnett's T_3 检验。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠学习记忆成绩、神经行为学评分比较 模型复制后4 d,与正常组比较,VD模型大鼠跳台错误次数和神经行为学评分均明显增加($P<0.05$),跳台潜伏期明显缩短($P<0.05$)。结果表明,VD大鼠模型复制成功。见表1。

表1 模型复制后4 d正常组与VD模型大鼠神经行为学评分和学习记忆成绩比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	神经行为学评分	跳台错误次数	跳台潜伏期/s
正常	10	0	1.30±0.26	158.40±17.94
VD模型	30	2.20±0.33*	4.10±0.38*	38.20±5.98*

注:与正常组比较,* $P<0.05$

治疗30、60 d后,与正常组比较,模型组大鼠神经行为学评分和跳台错误次数均明显增加($P<0.05$),跳台潜伏期明显降低($P<0.05$);与模型组比较,耳针组与西药组大鼠神经行为学评分和跳台错误次数均明显降低($P<0.05$),跳台潜伏期明显增加($P<0.05$);西药组与耳针组上述指标比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。见表2。

表2 治疗30、60 d后各组大鼠神经行为学评分和学习记忆成绩比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	神经行为学评分		跳台错误次数		跳台潜伏期/s	
		治疗30 d	治疗60 d	治疗30 d	治疗60 d	治疗30 d	治疗60 d
正常	10	0	0	0.90±0.74	0.80±0.63	144.40±17.91	146.10±18.85
模型	10	2.60±0.83*	3.00±0.70*	4.20±0.92*	4.30±0.95*	34.40±9.80*	29.00±8.86*
西药	10	1.00±0.67 [#]	0.90±0.74 [#]	1.70±0.68 [#]	1.50±0.71 [#]	85.80±11.95 [#]	101.30±8.33 [#]
耳针	10	1.20±0.63 [#]	0.80±0.63 [#]	1.50±0.71 [#]	1.40±0.70 [#]	91.20±12.44 [#]	109.60±14.36 [#]

注:与正常组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,[#] $P<0.05$

3.2 各组大鼠海马CA1区神经细胞形态学变化比较 正常组大鼠海马CA1区神经细胞结构完整,排列密集、整齐,胞浆充足透明,细胞核呈圆形或椭圆形,位置居中,胞核完整的神经细胞数量较多。模型组大鼠海马CA1区神经细胞间距变大,体积变小,排列紊乱,轮廓模糊,可见部分变性、坏死的细胞,细胞核固缩成三角形或形状不规则,胞核完整的神经细胞数量较少。见图1。正常组大鼠海马CA1区锥体细胞(胞核完整的神经细胞)存活数(189.10±10.86, $n=10$)明显多于模型组(95.10±8.58, $n=10$),差异有统计学意义($P<0.05$)。结果表明模型

组大鼠海马CA1区神经细胞严重变性、坏死,甚至大量丢失。

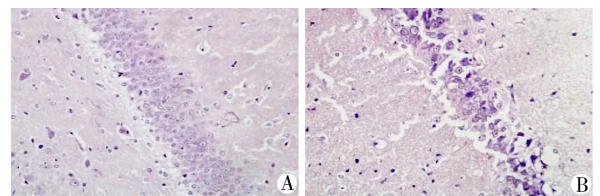
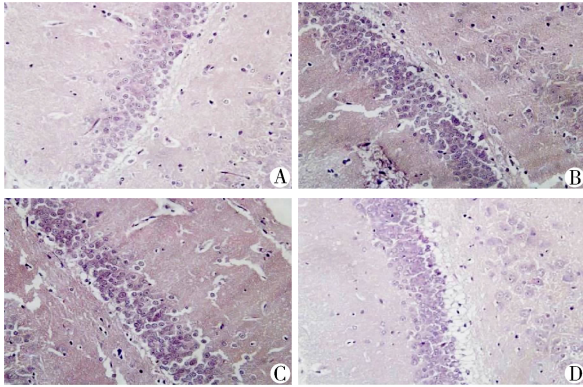


图1 正常组(A)、模型组(B)大鼠海马CA1区神经细胞形态学变化(HE染色,10×40倍)

治疗60 d后耳针组、西药组大鼠海马CA1区神经细胞结构接近正常,排列欠整齐,可见少量散在变性和坏死神经细胞,未见严重变性神经细胞,胞核

完整的神经细胞数量较多;模型组大鼠海马 CA1 区神经细胞形态结构不完整,排列紊乱且稀疏,轮廓较模糊,细胞核与胞浆界限不清,细胞间距变大,并见散在变性坏死的神经细胞,胞核完整的神经细胞数量较少。见图 2。



注:A.正常组;B.模型组;C.西药组;D.耳针组

图2 治疗60d后各组大鼠海马CA1区锥体细胞形态学比较(HE染色,10×40倍)

与正常组比较,模型组大鼠海马 CA1 区锥体细胞存活数显著减少($P<0.05$);与模型组比较,耳针组、西药组大鼠海马 CA1 区锥体细胞存活数显著增多($P<0.05$);耳针组与西药组大鼠海马 CA1 区锥体细胞存活数比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。表明耳针、西药治疗可改善变性的神经细胞,促使其修复和再生,西药与耳针的疗效无明显差异。见表 3。

表3 治疗60d后各组大鼠海马CA1区锥体细胞计数比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	锥体细胞计数
正常	10	189.10±10.86
模型	10	112.10±8.22*
西药	10	145.80±11.26#
耳针	10	147.10±12.85#

注:与正常组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,# $P<0.05$

4 讨论

VD属中医学“呆证”“善忘”范畴,其病位在脑,病变涉及五脏,尤与心、肾关系密切。五脏之中,肾藏精生髓,髓汇聚而成脑,且有赖于髓之营养;脑为元神之府,若肾精衰枯,则无以化生气血,精亏血少,髓海空虚,脑失津液之濡、精髓之养,致灵机、记性皆失。心主血脉,藏神,又为“五脏六腑之大主,精明之所舍也”,为人的精神意识思维活动的主宰,心血耗伤,心神失养则发为呆病。《灵枢·口问》:“耳者,宗脉之所聚也。”全身各大脉络汇聚于耳,且现代耳穴经络感传实验也发现,刺激耳穴可诱发循十二经脉的感传现象,说明耳与全身各脏腑都有着密切的联系,耳既依赖脏腑精气血津液的濡养,亦可反映脏腑

出现的病变。现代神经解剖学证实,耳廓神经分布十分丰富,在中枢神经系统各个节段与许多内脏神经纤维发生紧密联系,且刺激耳穴具有抑制神经细胞凋亡,改善脑血流,调和气血的作用^[6-7]。故本实验选取耳穴“心”“肾”“皮质下”,均为心、肾、大脑在耳廓的相应功能区。现代医学研究对于痴呆的发病机制尚无统一认识,治疗上也以西药为主。尼莫地平属二氢吡啶类钙通道阻滞剂,属临床常用药之一。诸多临床研究表明其在治疗多种原因造成的卒中后认知障碍中具有确切疗效^[8-11]。故本实验选取尼莫地平作为西药组,以期比较耳针与西药的疗效差异,为耳针能否成为西药替代疗法提供理论依据。

海马作为大脑边缘系统的重要组成部分,是调节学习记忆的关键部位。海马 CA1 区神经细胞对缺血具有选择性敏感,脑缺血缺氧或炎症等损伤易引起海马 CA1 区神经细胞损伤及突触丢失,胆碱神经细胞的受损,从而使脑内学习记忆的生物学基础的海马环路受损,导致记忆障碍^[12-15]。研究表明,耳针可延缓中枢胆碱能神经细胞的受损,减慢其降解过程^[16],抑制神经细胞凋亡,保护缺血后损伤的海马神经细胞^[17],改善脑组织能量代谢,促进损伤脑组织的修复与再生^[18]。本实验通过镜下观察 VD 大鼠海马神经细胞的数量及变性,结果显示与模型组比较,耳针组海马 CA1 区锥体细胞存活数明显增多,神经细胞结构更加趋于正常,神经细胞排列变整齐,变性神经细胞得到改善,且实验中随着耳针治疗疗程的延长,治疗的不断深入,VD 大鼠跳台实验潜伏期不断延长,错误次数不断减少,神经行为学评分不断下降,可知 VD 大鼠的认知障碍和神经损伤均在不断改善。结果表明针刺耳穴“心”“肾”“皮质下”可改善变性的海马 CA1 神经细胞,促进其修复与再生,从而提高 VD 大鼠学习记忆功能,提示这可能是临床耳针治疗 VD 有效作用的可能机制。

临床治疗 VD 疗程较长,长期不间断的治疗及药物带来的不良反应使患者往往缺乏依从性,失去治疗信心,不利于 VD 患者的治疗。耳针作为治疗 VD 的有效手段之一,尤其是耳穴压丸疗法,具有其独特的优势,不仅临床操作方便,无不良反应,且具有长时间、持续性的治疗效果,可明显减轻患者治疗的时间负担,提高就诊的依从性,有助于增强患者治疗信心。

参考文献:

- [1] 翁虹,黄坚红.血管性痴呆的定义及诊断进展[J].广东医学,2010,31(14):1881-1882.
- [2] PULSINELLI W A, BRIERLEY J B. A new model of

- bilateral hemispheric ischemia in the anaesthetized rat [J]. *Stroke*, 1979, 10(3):267-272.
- [3] 华兴邦. 大鼠穴位图谱的研制[J]. *实验动物与动物实验*, 1991, 11(6):1.
- [4] 金杰, 陈海燕, 关明智, 等. 建脑益智液作用的实验研究[J]. *成都中医药大学报*, 1998, 21(1):49.
- [5] LONGA E Z, WEINSTEIN P R, CARLSON S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniotomy in rats[J]. *Stroke*, 1989, 20(1):84-91.
- [6] 张雪朝, 吕明庄, 蒋乃昌, 等. 耳针对血管性痴呆大鼠记忆及海马凋亡相关蛋白表达的影响[J]. *中国针灸*, 2001, 21(8):499.
- [7] 陈峰, 戴晴, 杨易平, 等. 耳穴神门对脑动脉硬化症患者椎-基底动脉血即时作用观察[J]. *中国针灸*, 1997, 17(12):717.
- [8] 范丽. 尼莫地平治疗急性缺血性卒中后轻度认知障碍的疗效观察[J]. *世界最新医学信息文摘*, 2018(97):83,85.
- [9] 孟秀丽. 尼莫地平治疗脑出血后缺血性脑损伤的临床效果观察[J]. *中国医药指南*, 2018(33):81-82.
- [10] 孟丽梅. 脑小血管病患者伴发非痴呆血管性认知功能损害情况及尼莫地平疗效的分析[J]. *中国医药指南*, 2018(33):85-86.
- [11] 刘晓庆. 尼莫地平治疗脑出血后缺血性脑损伤的临床观察[J]. *中国处方药*, 2018, 16(11):90-91.
- [12] TORT A B L, KOMOROWSKI R W, MANN S J R, et al. Theta-gamma coupling increases during the learning of item-context associations [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(49):20942-20947.
- [13] NIKONENKO A G, RADENOVIC L, ANDJUS P R, et al. Structural features of ischemic damage in the hippocampus [J]. *Anat Rec*, 2009, 292(12):1914-1921.
- [14] KERCHNER G A, HESS C P, HAMMONDROSENBLUTH K E, et al. Hippocampal CA1 apical neuropil atrophy in mild Alzheimer disease visualized with 7-T MRI (Podcast) [J]. *Neurology*, 2010, 75(15):1381-1387.
- [15] KERCHNER G A, DEUTSCH G K, ZEINEH M, et al. Hippocampal CA1 apical neuropil atrophy and memory performance in Alzheimer's disease [J]. *Neuroimage*, 2012, 63(1):194-202.
- [16] 唐中生, 吕明庄, 贺志光, 等. 耳针、中药改善血管性痴呆大鼠学习记忆障碍与海马 AchE 的关系 [J]. *贵阳中医学院学报*, 2007(3):38-40.
- [17] 吕杭州, 王春庆, 吕明庄, 等. 耳针对血管性痴呆大鼠海马神经元细胞凋亡的干预研究 [J]. *河北医药*, 2009, 31(14):1713-1715.
- [18] 张雪朝, 肖茂磊, 孙国杰. 耳针改善血管性痴呆大鼠记忆障碍及其与 bcl-2 表达的关系 [J]. *针刺研究*, 2001(2):106-110.

(收稿日期:2018-10-23;编辑:曹健)

Effect of Ear Acupuncture on Cognitive Function and Hippocampal Neurons in Rats with Vascular Dementia

QIAO Xiao-di¹, ZHANG Yuan-yuan², ZHANG Qing-ping³, JING Jie⁴

(1. Graduate School of Anhui University of Chinese Medicine, Anhui Hefei 230012, China; 2. The First Affiliated Hospital of Anhui University of Chinese Medicine, Anhui Hefei 230031, China; 3. College of Acupuncture and Moxibustion, Anhui University of Chinese Medicine, Anhui Hefei 230012, China; 4. The Fifth People's Hospital of Yuhang District, Zhejiang Hangzhou 311100, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of ear acupuncture on cognitive function and hippocampal neurons in rats with vascular dementia (VD). **Methods** A total of 60 healthy male Sprague-Dawley rats were selected, among which 10 rats were enrolled as normal group and the remaining were treated with four-vessel occlusion to establish a model of VD and were then randomly divided into model group, auricular acupuncture group, and Western medicine group, with 10 rats in each group. On day 4 after modeling and on days 30 and 60 of treatment, the step-down test was performed to evaluate learning and memory performance and determine neurobehavioral score; on day 4 after modeling and on day 60 of treatment, the morphology of hippocampal CA1 neurons was observed under a light microscope. **Results** On day 4 after modeling, there were significant differences between the normal group and the model group in learning and memory performance, neurobehavioral score, and the number of viable pyramidal cells in the hippocampal CA1 region ($P < 0.05$). On days 30 and 60 of ear acupuncture therapy, there were significant differences in learning and memory performance and neurobehavioral score between the auricular acupuncture/Western medicine groups and the model group ($P < 0.05$), while there were no significant differences between the

通督调神针法结合夹脊穴治疗脑卒中后痉挛性瘫痪

孙培养, 储浩然, 李佩芳, 朱艳, 王涛, 吴杰, 李难, 刘辉

(安徽中医药大学第二附属医院, 安徽 合肥 230061)

[摘要]目的 观察比较通督调神针法结合夹脊穴与单纯通督调神针法治疗脑卒中后痉挛性瘫痪的疗效差异。**方法** 将61例患者随机分为观察组(通督调神针法结合夹脊穴)31例和对照组(单纯通督调神针法)30例,两组患者均给予康复治疗,对照组针刺取督脉穴百会、风府、水沟、大椎、至阳、腰阳关为主穴;观察组在对照组基础上结合夹脊穴针刺,取颈2—7、腰1—5夹脊穴,双侧交替针刺,每日针刺1次,每次40 min,每周6次,共治疗4周。两组患者均采用简易Fugl-Meyer运动能量表和修订的Barthel指数(Barthel index, BI)量表评定运动功能,比较两组的疗效差异。**结果** 治疗4周后,观察组肢体痉挛改善程度与对照组相当,差异无统计学意义($P>0.05$);两组治疗后Fugl-Meyer和BI评分均较治疗前显著升高($P<0.05$),观察组治疗后Fugl-Meyer和BI评分较对照组升高更为显著($P<0.05$)。**结论** 通督调神针法结合夹脊穴在改善脑卒中后痉挛性瘫痪患者的痉挛状态方面与单纯通督调神针法疗效相当,但在提高肢体运动功能和日常生活能力方面,通督调神针法结合夹脊穴均优于单纯通督调神针法。

[关键词] 脑卒中后痉挛性瘫痪;通督调神;针刺疗法;夹脊穴;随机对照试验

[中图分类号] R255.2 **[DOI]** 10.3969/j.issn.2095-7246.2019.02.011

脑卒中后痉挛性瘫痪是脑卒中后最严重的并发症之一,主要临床表现为患侧肢体肌张力增高,腱反射亢进,上肢多呈屈肌痉挛,下肢多呈伸肌痉挛,进而导致姿势异常和行走功能障碍。国外报道脑卒中后偏瘫肢体痉挛的患病率为17%~39%^[1],国内报道80%~90%的脑卒中后偏瘫患者中存在不同程度的痉挛^[2]。有研究显示,随着脑卒中发病时间的不同,脑卒中偏瘫患者痉挛的发病率亦不同,在发病后1个月为27%^[3],3个月为28%^[4],6个月为43%^[5],其中单纯上肢痉挛者占40%,单纯下肢痉

挛者仅占4%,上下肢均痉挛者达到56%^[3]。脑卒中后痉挛性瘫痪不利于患者的肢体功能康复,严重降低患者的日常生活活动能力。因此,寻找积极有效的手段,防治脑卒中后痉挛性瘫痪,具有重要的临床意义。笔者将传统特色针法与腧穴特异性相结合,运用通督调神针法结合夹脊穴治疗脑卒中后痉挛性瘫痪,取得满意的临床疗效,现报道如下。

1 临床资料

1.1 诊断标准

1.1.1 西医诊断标准 ①脑卒中(脑梗死、脑出血)诊断标准:参照2007年中华医学会神经病学分会制定的《中国脑血管病防治指南》^[6]。②痉挛性瘫痪诊断标准:参照改良Ashworth标准^[7],瘫痪肢体肌张力>0级,临床表现为单侧肢体肌张力增高,腱反射亢进,引出或引不出病理反射,即可诊断。

1.1.2 中医诊断标准 参照国家中医药管理局制定的《中风病诊断与疗效评定标准(1996年试行)》^[8]:

基金项目:国家自然科学基金项目(81774399);安徽省自然科学基金项目(1708085QH191);安徽省名医储浩然工作室建设项目(卫办秘[2015]404号)

作者简介:孙培养(1983-),男,副主任医师,硕士研究生导师

通信作者:储浩然(1962-),男,主任医师, chuhaoran62@163.com

auricular acupuncture group and the Western medicine group ($P>0.05$). After 60 days of treatment, there were significant differences in these indices between the auricular acupuncture/Western medicine groups and the model group ($P<0.05$), while there were no significant differences between the auricular acupuncture group and the Western medicine group ($P>0.05$). **Conclusion** Auricular acupuncture can improve the learning and memory ability of VD rats and reduce their neurobehavioral score. It can also improve the degenerative hippocampal CA1 neurons, promote their recovery and regeneration, and thus improve the learning and memory ability of VD rats, which might be the possible mechanism of auricular acupuncture in the treatment of VD in clinical practice.

[Key words] Vascular dementia; Cognitive function; Auricular acupuncture; Hippocampus