

穴位按摩对急性脑缺血再灌注损伤模型鼠认知及 Notch 通路的影响干预组

袁宇红 卢跃卿 韩 洋

(河南中医药大学第一附属医院, 郑州, 450000)

摘要 目的:观察百会穴及足三里穴对急性脑缺血再灌注损伤模型鼠认知能力的影响,并通过 Notch 信号通路进一步探讨其可能的机制。方法:选取无特定病原体(SPF)级 SD 大鼠 45 只,随机分为空白组 15 只,造模组 30 只,其中 24 只造模成功,再次随机分为缺血组及干预组,每组 12 只。空白组及造模组大鼠无任何干预,干预组大鼠在造模后 24 h 开始百会穴、足三里按摩,每次持续 20 min,2 次/d,连续 14 d。其中造模组鼠利用改良线栓法行大脑中动脉梗死(MCAO)制备急性脑缺血再灌注损伤模型,干预结束后用水迷宫评估各组大鼠认知能力变化,用 2,3,5-氯化三苯基四氮唑染色法(TTC)观察各组脑梗死体积变化,利用透射电镜法观察各组大鼠海马组织超微结构变化,用 Western blotting 法检测 Notch1、NICD 蛋白的变化。结果:干预第 14 天空白组与缺血组、干预组比较,逃避潜伏期差异有统计学意义($P < 0.05$);干预组与缺血组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);空白组和干预组穿越平台次数比缺血组多,差异有统计学意义($P < 0.05$)。干预 14 d 后,TTC 检测显示缺血组大鼠脑区出现明显的缺血梗死病灶,而干预组梗死体积较缺血组减少,差异有统计学意义($P < 0.05$)。透射电镜显示缺血组大鼠海马组织神经元结构破坏明显,导致脑组织细胞出现一系列变性坏死,而干预组大鼠缺血侧大脑海马神经元结构坏死及溶解明显减轻。Western blotting 法显示经过干预后 Notch1、NICD 蛋白有明显提高,与缺血组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论:百会穴、足三里穴按摩可改善大鼠的神经功能缺损情况,提高认知能力,减少脑梗死体积,促进脑的神经元细胞形态结构的修复,其作用机制可能通过 Notch 信号通路实现。

关键词 急性脑缺血,再灌注损伤,改良线栓法,穴位按摩,百会穴,足三里,机制,Notch 信号通路

Effects of Acupoint Massage on Cognition and Notch Pathway in Rats with Acute Cerebral Ischemia-reperfusion Injury

Yuan Yuhong, Lu Yueqing, Han Yang

(The First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China)

Abstract **Objective:** To observe the effects of Baihui (GV20) and Zusanli (ST36) on cognitive ability of rats with acute cerebral ischemia-reperfusion injury, and to further explore its possible mechanism through Notch signaling pathway. **Methods:** A total of 45 SPF SD rats were randomly divided into a blank group ($n = 15$) and a model group ($n = 30$). The model group was established by modified middle cerebral artery infarction (Middle Cerebral Artery Occlusion, MCAO), totally 24 were successfully modeled, which were then randomly divided into an ischemic group ($n = 12$) and an intervention group ($n = 12$). The rats in the blank group and the model group did not accept any intervention means, while the rats in the intervention group began massage at Baihui (GV20) and Zusanli (ST36) 24 hours after modeling, 20 mins each time and twice a day for 14 days. After the intervention, the cognitive ability of rats in each group was evaluated by water maze. The volume of cerebral infarction was observed by 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride staining (TTC), and the ultrastructural changes of hippocampus were observed by transmission electron microscopy (TEM). The changes of Notch1 and NICD proteins were detected by Western blotting. **Results:** 1) On the 14th day of intervention, there was significant difference in escape latency between the blank group, the ischemia group and the intervention group ($P < 0.05$), and there was significant difference between the intervention group and the ischemia group ($P < 0.05$). The blank group and the intervention group crossed the platform more times than the ischemic group, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). 2) After 14 days of intervention, TTC showed that there were obvious ischemic infarction lesions in the brain region of the ischemic group, but the infarct volume in the intervention group was significantly decreased than that in the ischemic group, with statistically significant difference ($P < 0.05$). 3) The results of transmission electron microscope (TEM) showed that the structure of hippocampal neurons in the ischemic group was obviously destroyed, resulting in a series of signs of degeneration and necrosis of brain tissue cells. In the intervention group, the degree of necrosis and dissolution of hippocampal neurons on the ischemic side of

基金项目:2015 年度河南省科技攻关计划(YWZY1013)

作者简介:袁宇红(1969.07—),女,本科,副主任医师,研究方向:临床疾病康复管理等工作,E-mail:yyhjxz@163.com

通信作者:韩洋(1977.08—),男,本科,副主任医师,研究方向:临床疾病康复管理等工作,E-mail:hnhanyang@126.com

the brain was significantly reduced in the intervention group. 4) Western blotting showed that Notch1 and NICD protein were significantly increased after intervention, which were different from those in ischemic group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Massage at Baihui (GV20) and Zusanli (ST36) can improve the neurological deficit, improve cognitive ability, reduce the volume of cerebral infarction and promote the repair of neuronal morphology and structure, and the mechanism may be realized by Notch signaling pathway.

Key Words Acute cerebral ischemia; Reperfusion injury; Modified suture method; Acupoint massage; Baihui (GV20); Zusanli (ST36); Mechanism; Notch signaling pathway

中图分类号: R245 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1673-7202.2019.05.019

缺血性脑卒中是脑卒中的主要类型,亦具有高发病率、高致残率、高死亡率等特点,已成为当今世界上危害人类健康最主要的致死和致残疾病之一^[1]。认知功能障碍是脑卒中的主要后遗症,不同程度的脑卒中后认知功能障碍可严重影响康复进展,降低患者生命质量,给家庭及社会带来了沉重的负担^[2-3],已成为当前国际脑卒中研究和干预的热点。穴位按摩是中医治疗重要手段,通过刺激人体特定穴位,激发经络之气,达到通经活络、调整功能、祛邪扶正,从而实现治疗疾病的目的^[4-6]。我们通过临床证实穴位按摩确可明显提高缺血性脑卒中患者的认知能力,现为进一步研究其机制,我们利用动物作为媒介,探讨按摩百会穴、足三里穴的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 选取45只健康无特定病原体(SPF)级雄性Sprague-Dawley(SD)大鼠(斯莱克,上海)[生产许可证号码:SCXK(沪)2017-0005],体质量(200 ± 20)g,由本校实验动物中心[许可证:SYXK(闽)2014-0005]统一无菌环境饲养,大鼠饲料统一为实验动物中心配置的灭菌饲料,饮用水为高温高压灭菌水,动物自由进食及饮水,温度 $20 \sim 26$ ℃,相对湿度40%~70%,定时通风换气,模拟标准昼夜系统即12h光照+12h黑夜。所有动物实验均经过本校实验动物管理委员会审批通过并严格按照我国相关实验动物的规定执行。

1.1.2 试剂与仪器 2,3,5-氯化三苯四唑(购自北京杰辉博高生物技术有限公司), β -actin鼠单克隆抗体(购自美国CST公司)、Nestin1一抗抗体(购自Proteintech公司)、NICD一抗抗体(购自美国CST公司)、DAB免疫组化试剂盒(购自ZYMED公司),全自动酶标仪(Model ELX800,购自美国Bio. Tek公司),凝胶成像系统(GELDOC2000,购自美国Bio. Rad公司)。

1.2 方法

1.2.1 分组与模型制备 选取45只健康SPF级雄

性Sprague-Dawley(SD)大鼠并随机分为空白组15只,造模组30只,其中24只造模成功,再次随机分为缺血组及干预组,每组12只。空白组及造模组大鼠无任何干预,干预组大鼠在造模后24h开始百会穴、足三里按摩,持续20min/次,2次/d,连续14d。

术前24h大鼠禁食不禁水,将直径为0.26mm的鱼制备成5cm长度,在0.18cm、0.2cm及0.22cm处用记号笔标记,在室温23℃条件下,将10%水合氯醛按照0.1mL/kg比例进行麻醉,沿颈部正中切开颈部皮肤,暴露分离左侧颈总动脉(CCA),随后逐级分离,使颈内动脉(Internal Carotid Artery, ICA)和颈外动脉(ECA)及其分支充分暴露。在CCA结扎处上方约0.5mm的上方做一小口,将鱼线从开口处推入至颈内动脉(从ECA与ICA分叉处起约18~22mm即鱼线标记处为准),2h后抽出鱼线实现大脑中动脉再灌注。整个实验过程至动物苏醒期间用加热垫进行保暖直至其苏醒。

假手术组只分离大鼠左侧颈总、颈内、颈外动脉,不结扎也不插线。造模过程中注意保暖。

1.2.2 干预方法 干预组采用百会穴、足三里穴按摩干预。操作时,先用胶布将钢珠(直径2mm)固定于右手示指指端,再用右手拇指和中指将大鼠稍固定,然后根据《实验针灸学》中大鼠穴位定位方法取百会穴(顶骨正中),足三里穴,以钢珠作为接触点进行按揉,力度维持在 (350 ± 50) g^[43],以大鼠能耐受为宜(实验前操作者先用大鼠体质量秤反复练习按摩力度,达到熟练控制后再对大鼠进行干预。当大鼠不耐受时,出现烦躁,抵抗,往四周爬走等表现),频率为40~60次/min,每次揉按20min,每日2次,连续14d。空白组和缺血组:同等条件下饲养,每天同等抓取20min后回笼饲养。

1.2.3 检测指标与方法 认知能力:各组大鼠在干预第3天开始每天进行水迷宫测试用于评估认知能力,将大鼠置于Morris水迷宫中进行定位航行实验和空间探索实验。水迷宫直径为200cm、高度为50cm,水的高度为30cm。水温保持恒温,水温保持

在 23 ~ 27 ℃ 之间;将水迷宫均分为 4 个象限,每次将实验大鼠分别从 4 个象限的入水点面壁式放入水池,大鼠入水后尽力游动逃避水患,当找到平台后则栖身其上。如大鼠在平台上停留时间大于 3 s,则认为大鼠找到平台,即为逃避潜伏期。将每次训练的时间设定为 90 s,作为最大潜伏期,如果大鼠在 90 s 内找到平台并在平台上停留 3 s 以上,则其从入水到找到平台时间为其逃避潜伏期;如果大鼠在 90 s 内未找到平台,其潜伏期按 90 s 计算。时间越短说明大鼠的学习能力越好。

空间探索实验:定位航行实验 4 d 后,即在干预的第 14 天将水迷宫中的平台移除,随后将大鼠头部背对平台,从平台对侧象限放入水中,观察 90 s 内大鼠游过原平台区域的次数。次数越多表明大鼠的记忆能力越好。

脑梗死体积:利用 TTC 染色法计算各组大鼠脑组织梗死体积,干预 14 d 后各组随机抓取 3 只大鼠,脱颈处死后断头取脑,取脑过程均于冰上操作,将大鼠脑组织取出后保存至 -20 ℃ 冰箱内 20 min,随后将全脑均匀切成 5 薄片,每片厚度约 2 mm,避光条件下将各脑片置于,3,5-氯化三苯四唑液体中充分反应,脑梗死组织呈苍白色,未梗死组织呈鲜红色。充分反应后取出脑组织整齐平铺于可现实刻度的标尺上,用高清数码相机进行拍摄,随后将相片传输至计算机中用 Image-ProPlus 图像软件计算梗死体积。梗死体积 = 梗死面积总和 × 2 mm。

透射电镜观察海马组织超微结构:利用透射电镜观察各组大鼠海马组织的超微结构,利用水合氯醛充分麻醉后夹闭腹主动脉切口近心端,从右心耳灌注生理盐水 100 mL 及电镜灌流液 100 mL 后于冰上迅速取海马组织浸泡于电镜固定液,然后放入 4 ℃ 冰箱中保存 48 h,随后用 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS)进行漂洗,在 30% 乙醇 5 min→50% 乙醇 10 min→70% 乙醇 10 min 进行脱水,并在 70% 乙醇 + 铀于 4 ℃ 冰箱过夜。再将标本置于纯丙酮 + 包埋剂(2:1)中浸透后环氧树脂包埋,手工修块,用徕卡切片机切成厚度为 0.5 μm 的半薄片定位海马,随后再用超薄切片机切成 90 nm 薄片,后进行醋酸双氧铀(20 min) + 柠檬酸铅(10 min)双重染色后利用透射电子显微镜 H-7650 拍摄观察超薄切片的超微结构。

Western blotting 检测 Notch1、NICD 蛋白水平变化:干预 14 d 后各组随机抓取 3 只大鼠进行充分麻醉后断头取左侧大脑皮质,将样本置于含 1% PMSF

的蛋白裂解液中,然后将组织放置冰里匀浆,放入冰中充分裂解,用 BCA 试剂盒进行蛋白定量并计算上样量,随后进行蛋白 SDS-PAGE 电泳,将目的蛋白转膜至聚偏二氟乙烯膜(PVDF),将 Notch1、NICD 以及 β-actin 一抗用抗体稀释液稀释后进行膜孵育置于条件为 4 ℃ 的摇床中过夜,次日用 TBST 液洗涤 3 次,每次洗 10 min 后加入稀释过生物辣根过氧化酶 HRP 标记的二抗,室温下孵育 2 h,随后用 ECL 液进行显影,并用 Image(美国 BIO-RAD 公司)的图像处理软件进行处理,测定各样本灰度值。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 20.0 统计软件进行研究数据的统计分析。计量资料用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用两样本 *t* 检验或两样本秩和检验;组内比较采用配对 *t* 检验或配对秩和检验。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠认知行为学比较 干预第 14 天逃避潜伏期空白组与缺血组、干预组比较,差异有统计学意义(*P* < 0.05),干预组与缺血组比较,差异有统计学意义(*P* < 0.05);见表 1。空白组和干预组穿越平台次数比缺血组多,差异有统计学意义(*P* < 0.05)。见表 2。

表 1 各组大鼠逃避潜伏期比较($\bar{x} \pm s, s$)		
组别	干预前	干预第 14 天
缺血组(<i>n</i> = 12)	76.71 ± 10.19 *	65.13 ± 9.57 * [△]
干预组(<i>n</i> = 12)	49.29 ± 3.34 * [△]	30.18 ± 8.02 * [△]
空白组(<i>n</i> = 15)	28.32 ± 3.23	20.33 ± 6.16 [△]

注:与空白组比较,**P* < 0.05;与缺血组比较,[△]*P* < 0.05

表 2 各组大鼠穿越平台($\bar{x} \pm s$)	
组别	穿越平台(次)
缺血组(<i>n</i> = 12)	0.65 ± 0.50 *
干预组(<i>n</i> = 12)	2.15 ± 0.85 * [△]
空白组(<i>n</i> = 15)	3.28 ± 0.37 [△]

注:与空白组比较,**P* < 0.05;与缺血组比较,[△]*P* < 0.05

2.2 各组脑梗死体积比较 干预 14 d 后,TTC 检测显示缺血组大鼠脑区出现明显的缺血梗死病灶,而干预组梗死体积较缺血组减少,差异有统计学意义(*P* < 0.05)。见表 3。

表 3 各组大鼠梗死体积比较($\bar{x} \pm s, \%$)		
组别	干预前	干预 14 d
缺血组(<i>n</i> = 12)	42.98 ± 1.26	29.86 ± 0.68
干预组(<i>n</i> = 12)	43.15 ± 1.79	19.36 ± 1.14 *
空白组(<i>n</i> = 15)	0	0

注:与缺血组比较,**P* < 0.05

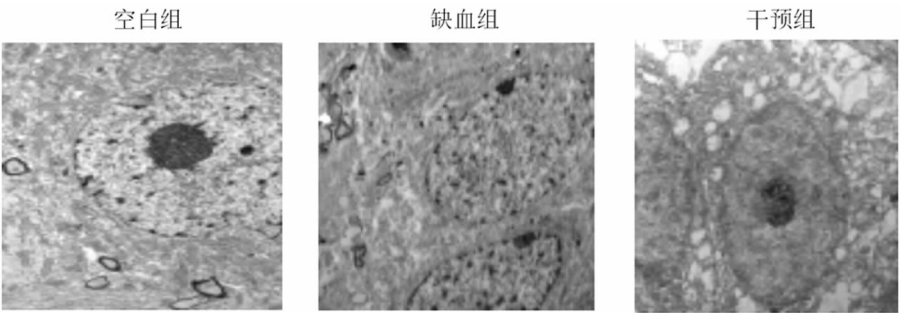


图1 各组海马组织超微结构比较(×1000)

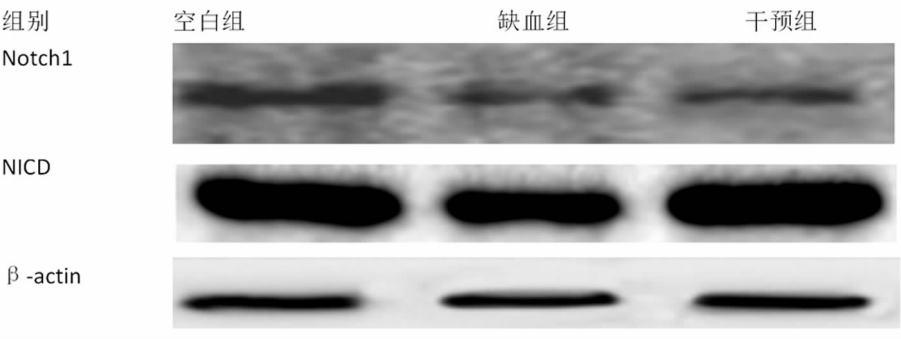


图2 各组 Western blotting 结果

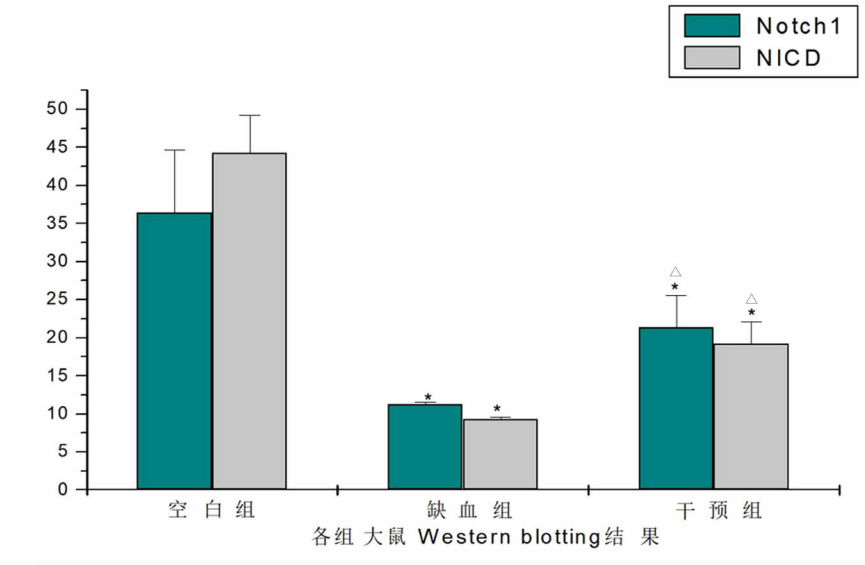


图3 各组 Notch1、NICD 蛋白比较

注:与空白组比较,* $P<0.05$;与缺血组比较, $\Delta P<0.05$

2.3 各组海马组织超微结构比较 透射电镜结果显示缺血组大鼠海马组织神经元结构产生明显破坏,导致脑组织细胞出现一系列变性坏死的征象,而干预组大鼠缺血侧大脑海马神经元结构坏死及溶解的程度明显减轻。见图1。

2.4 各组 Notch1、NICD 蛋白表达比较 Western blotting 法显示经过干预后 Notch1、NICD 蛋白有明显提高,与缺血组比较差异有统计学意义($P<0.05$)。见图2及图3。

3 讨论

知功能障碍主要包括学习记忆力、执行力、注意

力等的障碍,是缺血性脑卒中最常见并发症之一。如果卒中后认知功能障碍未得到及时合理控制,则将逐渐向痴呆进展^[7-8]。亦有研究人员证实认知障碍中,约83%脑卒中患者至少某一方面存在功能障碍,且有71%的生存患者即使在医院接受了3个月后的治疗,也仍然存在不同程度的认知功能障碍^[9]。本研究利用 Morris 水迷宫对各组大鼠干预前后的学习记忆能力进行检测,水迷宫实验是借助大鼠会游泳但又怕水的特点,将大鼠放置在水迷宫中被迫游泳,依靠设置的空间参照物判断水中平台的位置,从而逃避水患,被视为公认的评价学习记忆

功能较为客观的方法。结果显示经过 MCAO 造模的大鼠逃避潜伏期明显较假手术延长,且穿越平台的次数减少,这提示经过 MCAO 造模后大鼠的确出现认知功能障碍表现。

百会穴,其名最早见于晋代皇甫谧《针灸甲乙经》:“百会,一名三阳五会,在前顶后一寸五分,顶中央旋毛中,陷可容指,督脉足太阳之会”。百会穴隶属督脉,又名“三阳五会”,是督脉、手太阳小肠经、手少阳三焦经、手阳明大肠经、足少阳胆经、足阳明胃经、足太阳膀胱经的交会穴。所以,百会穴对脑髓有着举足轻重的调节作用。百会穴具有振奋诸阳、激发经气、调节脏腑、安神定志、滋养脑髓、醒脑开窍等功效^[10-12]。阳明经为多气多血之经,刺激阳明经可实现益气活血、扶正通络的效应,足三里穴属于足阳明胃经的下合穴,是汇聚天部精微物质的经典穴位,从而激发促进胃气升发,调整机体气血。百会穴和足三里穴合用遵循远近配穴原则,共奏健脑调神、扶正通络作用^[13-15]。本研究结果显示经过按摩百会穴及足三里穴后大鼠逃避潜伏期缩短,穿越平台次数增多,这说明穴位按摩的确改善了缺血性再灌注损伤大鼠模型的认知能力。我们利用 TTC 观察各组大鼠脑梗死体积的变化,结果发现空白组未出现明显梗死灶,而经过 MCAO 造模的大鼠脑组织均出现明显梗死灶,这说明本研究造模成功,且经过百会穴、足三里穴干预后大鼠脑梗死体积明显减少,在研究中发现缺血组大鼠海马组织神经元结构产生明显破坏,导致脑组织细胞出现一系列变性坏死,而干预组大鼠缺血侧大脑海马神经元结构坏死及溶解明显减轻,这说明脑组织缺血再灌注损伤确导致神经元细胞受损,而经过百会穴、足三里穴干预有脑保护效应。

本研究检测了 Notch 信号通路的标志因子,结果显示缺血组大鼠脑组织 Notch1、NICD 水平均降低,而干预组水平上调,由此认为脑缺血中 Notch 信号通路受到抑制,而百会穴、足三里穴干预激活了 Notch 信号通路。Notch 信号通路属于细胞信号装置器,相邻的神经元细胞之间的 Notch 受体与相对应的配体结合后促进了神经干细胞的自我更新。有研究认为 Notch 信号通路是神经干细胞增殖、分化的“决定者”,当 Notch 配体与相关的受体结合后可裂解释放出 NICD (Intracellular Domain of Notch),NICD 是 Notch 受体产生活性的主要细胞片段,随后 Notch 配体产生核移位,转移至细胞核内与 DNA 结合蛋白 RBP-J 发生反应,从而介导转录信息的调

节^[16-18]。由此可认为百会穴、足三里穴干预介导神经干细胞增殖与 Notch 信号通路密不可分。

总之,通过百会穴、足三里按摩可改善 MCAO 大鼠的认知能力,减少脑梗死体积,促进脑的神经元细胞形态结构的修复,其作用机制可能通过 Notch 信号通路实现。

参考文献

- [1]侯典宾,梅雨,吴洪亮,等.脑供血动脉闭塞的研究进展[J].中国实用神经疾病杂志,2019,22(2):228-232.
- [2]汪婷,熊丙建,薛昶,等.穴位按摩、足部反射疗法联合中药对老年前列腺增生患者的干预作用研究[J].湖南中医药大学学报,2019,39(3):381-384.
- [3]李志亚,张琦豪.补肾健脑针法辅助语言功能训练治疗脑瘫伴语言障碍患儿临床观察[J].光明中医,2019,34(1):98-100.
- [4]韩洁,曹丽娜,张超.穴位按摩对妊娠期高血压疾病孕妇睡眠及血压的影响[J].中国妇幼保健,2019,34(6):1426-1428.
- [5]江海洋,陈浩,顾中华.白藜芦醇保护缺血性脑卒中大鼠神经功能的作用机制研究[J].云南中医学院学报,2018,41(3):23-26.
- [6]温艺超,陈伟燕,谢富华,等.DAPT 阻断 Notch 通路对动脉粥样硬化型缺血性脑卒中大鼠的保护作用[J].中国病理生理杂志,2018,34(11):2031-2036.
- [7]董芳.代谢综合征与缺血性脑卒中后认知功能障碍相关性的研究[D].济南:山东大学,2018.
- [8]Kalaria RN, Akinyemi R, Ihara M. Stroke injury, cognitive impairment and vascular dementia[J]. Biochim Biophys Acta, 2016, 1862(5): 915-925.
- [9]Jokinen H, Melkas S, Ylikoski R, et al. Post-stroke cognitive impairment is common even after successful clinical recovery[J]. Eur J Neurol, 2015, 22(9): 1288-1294.
- [10]尚华杰.电针百会、足三里穴对血管性认知障碍大鼠认知功能及大脑皮质抗氧化因子的影响[D].北京:北京中医药大学,2018.
- [11]张颖铮.电针“百会”穴对 APP/PS1 双转基因小鼠海马区代谢物及空间学习记忆能力的影响[D].福州:福建中医药大学,2017.
- [12]祝日荣,任小巧,毛萌,等.神经血管单元和 Notch 信号通路在缺血性卒中的作用[J].现代生物医学进展,2017,17(10):1986-1989.
- [13]张佳音.近 10 年针灸治疗血管性痴呆的临床研究进展[D].石家庄:河北医科大学,2017.
- [14]吴霞.老年心房颤动与认知功能障碍的研究进展[J].现代医药卫生,2017,33(4):527-529.
- [15]井哲.头项针治疗血管性痴呆的临床观察[D].哈尔滨:黑龙江中医药大学,2016.
- [16]李斌,朱延霞,王涛.缺血性卒中后认知障碍的危险因素研究进展[J].中华临床医师杂志(连续型电子期刊),2013,7(16):7544-7546.
- [17]柳刚.针刺对注意网络功能影响的神经心理学研究[D].合肥:安徽医科大学,2013.
- [18]刘小萍.电针对轻度认知功能障碍的干预研究[D].乌鲁木齐:新疆医科大学,2010.