

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2021.02.013

实验研究

电针、加味芍药甘草汤及针药结合对脑卒中肢体痉挛模型大鼠海马突触超微结构及可塑性蛋白的影响

郭斌^{1,2}, 王彭汉², 黄麟苻², 谢志强², 谢丽娜², 刘未艾³, 岳增辉²✉

1. 宁夏医科大学中医学院, 宁夏回族自治区银川市兴庆区胜利街 1160 号, 750000; 2. 湖南中医药大学针灸推拿学院; 3. 湖南中医药大学第二附属医院

摘要 目的 比较电针“曲池”“阳陵泉”、加味芍药甘草汤及针药结合三种疗法缓解脑卒中肢体痉挛的疗效及可能作用机制。方法 将 54 只 SD 大鼠随机分为空白组、假手术组、模型组、针药组、中药组、电针组, 每组 9 只。采用改良 Zea-Longa 线栓法 + 内囊注射 N-甲基-D-天冬氨酸受体制备脑卒中肢体痉挛大鼠模型。造模后电针组大鼠行双侧“阳陵泉”“曲池”电针刺激, 每次 30 min, 每日 1 次, 持续 5 天; 中药组给予浓度为 10 g/ml 加味芍药甘草汤水煎剂 1 ml/100 g 灌胃, 每日 1 次, 持续 5 天; 针药组先给予加味芍药甘草汤灌胃, 再行电针, 方法同上; 模型组和假手术组大鼠进行相同束缚及等量生理盐水灌胃; 空白组不做任何干预。各组大鼠予行为学评分评价神经功能损伤情况, 电镜下观察海马突触的超微结构, 检测大鼠大脑海马中突触素 (SYN) 及突触后致密物 95 (PSD95) mRNA 与蛋白表达。结果 与空白组和假手术组比较, 模型组大鼠行为学评分升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 各干预组行为学评分降低 ($P < 0.05$), 各干预组间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。镜下观察: 模型组较空白组、假手术组突触数量减少明显, 囊泡数量减少密度不均, 前后膜及间隙发生融合界限模糊, 突触后细胞终末胞质变性溶解显著, 突触后致密带的密度也下降; 各干预组突触结构明显缓解, 且针药组突触细胞囊泡明显成形, 界限清晰, 间隙规则。与空白组、假手术组比较, 模型组大鼠海马 SYN、PSD95 mRNA 相对表达量与蛋白表达均降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 各干预组大鼠海马 SYN、PSD95 mRNA 相对表达量与蛋白表达升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 且针药组表达优于中药组、电针组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 电针“曲池”“阳陵泉”、加味芍药甘草汤及针药结合三种疗法均可以缓解脑卒中肢体痉挛的神经损伤情况, 其机制可能通过提高海马可塑性蛋白表达从而改善海马突出超微结构, 且以针药结合效果最优。

关键词 电针; 加味芍药甘草汤; 脑卒中; 肢体痉挛; 海马突触; 超微结构; 可塑性蛋白

脑卒中是危害中老年人群健康的主要疾病, 具有较高的发病率、致残率、病死率^[1]。我国脑卒中患者中约 80% 遗有不同程度的功能障碍, 其中肢体痉挛对患者的生活质量影响严重^[2]。关于脑卒中肢体痉挛治疗, 中医认为其病机为阴虚血少、气滞血瘀、经脉失养, 针灸“曲池”“阳陵泉”是临床常用的方法之一^[3-4]; 《伤寒论》中芍药甘草

汤酸甘化阴, 也常被用来治疗脑卒中肢体痉挛^[5-6]。神经环路的重建是脑卒中痉挛状态恢复的主要原因之一^[7], 重建神经环路主要是依靠重塑神经元突触实现的, 因此, 改善神经元突触的可塑性是脑卒中肢体痉挛治疗的关键^[8]。突触可塑性相关蛋白是突触可塑性的物质基础^[9], 突触素 (SYN) 及突触后致密物 95 (PSD95) 分别参与了突触前和突触后的重塑过程^[10]。本研究拟通过实验观察电针治疗、中药治疗以及针药结合治疗三种治疗方法对脑卒中肢体痉挛大鼠海马突触可塑性的调节效果, 分析最适合该病的治疗方法及其可能机制。

基金项目: 国家自然科学基金 (81673886); 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (2014CB543102); 湖南省自然科学基金 (2018JJ2294); 湖南省中医药科研计划 (201862)

✉ 通讯作者: 624755064@qq.com, (0731) 88457187

1 材料与方法

1.1 动物

健康成年 SPF 级 SD 雄性大鼠 77 只, 7 周龄, 体重 (240 ± 30) g, 实验动物合格证编号: XCXK (湘) 2009-0004, 购自湖南斯莱克景达动物实验有限公司。室温 (25 ± 2) °C, 相对湿度 65% ~ 70%。自然光照, 普通饲料投喂, 自由进食饮水。

1.2 药物

加味芍药甘草汤组成: 白芍 30 g, 甘草 10 g, 黄芪 30 g, 桑枝 30 g, 伸筋草 10 g, 山萸肉 10 g, 枸杞子 10 g, 当归 15 g, 川芎 15 g, 地龙 10 g, 鸡血藤 15 g, 木瓜 10 g。由湖南中医药大学第二附属医院中药房制备, 将饮片以蒸馏水浸泡 1 h, 继以武火急煎至沸腾, 再以文火煎煮 2 h, 取汁后以四层纱布过滤; 药渣再加蒸馏水文火煎煮 1 h, 过滤取汁, 两次药汁合并, 将药物浓缩至含生药 10 g/ml。

1.3 主要试剂及仪器

N-甲基-D-天冬氨酸受体 (NMDA, 批号: M3262), 美国 Sigma 公司; 水合氯醛 (批号: 30037516)、青霉素 G 钠 (批号: XW00695781)、咪塞米 (批号: XW00543191)、戊二醛 (批号: 30092436), 国药集团化学试剂有限公司; 葡萄糖注射液 (批号: H11020024), 华润紫竹药业有限公司; 戊二醛固定液 (批号: QY-ED2354), 上海乔宇生物科技有限公司; 醋酸铀 (批号: HF1236), 上海恒斐生物科技有限公司; 柠檬酸铅 (批号: GA10701), 北京中镜科仪技术有限公司; Trizol (批号: 15596026), 美国 Ambion 公司; PVDF 转移膜 (货号: IPVH00010)、化学发光试剂 (货号: WBKLS0010), 美国 Millipore 公司; β -Actin (货号: PAB36265)、山羊抗兔 IgG (货号: PAB160011)、SYBRGreenPCR 试剂盒 (货号: KM4101)、PBS 磷酸盐缓冲液 (货号: PAB180003), 武汉贝茵莱生物科技有限公司; SYN (货号: ab32127)、PSD95 (货号: ab18258), 英国 Abcam 公司。

针灸针 (0.30 mm × 13 mm), 苏州医疗用品厂有限公司; SN-2 型大鼠脑立体定位仪, 日本成茂公司; 微量注射器 (5 μ l), 上海科晓科学仪器有限公司; SDZ-V 型电子电针仪, 苏州医疗用品厂有限公司; CFX-Connect96 型荧光定量 PCR 仪, 美国 Bio-Rad 公司; GE48527 型 PCR 仪, 杭州柏恒科技有限公司; miniprotein3cell 型电泳仪, 美国 Bio-

Rad 公司; Tanon-5200 型全自动化学发光分析仪, 上海天能科技有限公司; H7650 型透射电镜, 日本日立高新科技公司; MD1000 型正置显微镜, 徕卡显微系统有限公司; Nano-300 型超微量分光光度计, 杭州奥盛仪器有限公司; Centrifuge5424R 型离心机, 德国 Eppendorf 公司。

1.4 造模方法

采用改良 Zea-longa 线栓法 + 内囊注射 NMDA 制作脑卒中肢体痉挛大鼠模型^[1-12]。10% 水合氯醛 3 ml/kg 腹腔注射进行麻醉。麻醉成功后仰卧位备皮、消毒、铺巾, 沿颈部正中偏右切口, 钝性分离大鼠右侧颈总动脉和迷走神经, 再向上暴露颈总动脉分叉处、颈内动脉与颈外动脉; 分别结扎颈外动脉近心端、颈总动脉远心端, 动脉夹夹闭颈内动脉; 离颈总动脉分叉膨大 5 mm 处做一小切口, 将栓线经切口插入颈内动脉, 松开动脉夹, 栓线深度约 18 ~ 20 mm 时稍感阻力停止插线; 插线完毕后, 将颈内动脉近心端和栓线一起结扎, 逐层缝合切口; 纳入清醒后 Zea-Longa 评分^[13] 1 ~ 3 分的大鼠, 第 2 天再行内囊注射 NMDA。将 5 mg NMDA 溶于 5 ml 灭菌生理盐水中, 制成浓度为 1 mg/ml 的溶液, 置于 37 °C 孵育箱中孵育 7 天, 形成凝聚态。麻醉成功后, 俯卧固定于大鼠脑立体定位仪上, 备皮、消毒、铺巾; 逐层分离暴露前囟、右侧顶骨和额骨交界骨缝; 按《大鼠立体定位图谱》^[14] 确定内囊位置 (前囟后 1.4 mm, 矢状缝右侧 2.4 mm), 用小型电钻在颅板上钻一直径约 2 mm 小孔, 将微量注射器垂直插入 7 mm, 以 1 μ l/min 速度缓缓注射 NMDA, 注射 5 μ l 后拔出用明胶海绵小心压迫止血, 消毒, 缝合。两次术后伤口均予以青霉素 G 钠 80 万 U/d 肌肉注射抗感染, 共 4 天; 按 0.1 mg/kg 剂量腹腔注射咪塞米, 防止脑水肿; 术后予单笼饲养, 保持呼吸道通畅。假手术组只做分离, 不结扎、插线。

1.5 动物分组及干预方法

适应性饲养 7 天后, 采用随机数字表法从 77 只大鼠选出 18 只分为空白组 (9 只)、假手术组 (9 只), 其余为模型储备组。大鼠质量增至 280 ~ 300 g 进行造模, 纳入符合 Zea-Longa 评分^[13] 1 ~ 3 分的大鼠 36 只, 再次按随机数字表法分为模型组、电针组、中药组和针药组, 每组 9 只。

电针组: 穴位定位根据《实验针灸学实验指导》^[15] 中“动物针灸穴位图谱”进行穴位定位。阳陵泉: 距足三里 (大鼠膝关节下侧腓骨小头下

约 3 mm) 上外侧 5 mm, 直刺 3 mm。曲池: 桡骨近端的关节外侧前方的凹陷中, 直刺 3 mm。大鼠仰卧位束缚, 常规消毒, 常规针刺, 捻转角度 $90^{\circ} \sim 180^{\circ}$, 频率 60 ~ 90 次/min, 持续 1 min, 选用 SDZ-V 型电针治疗仪, 密波、100 Hz, 电流强度 1 ~ 3 mA。正极接在肢体一侧的阳陵泉穴毫针针柄, 负极接在同侧曲池穴毫针针柄, 以形成刺激回路, 以大鼠肢体轻微抖动为度。每日 1 次, 每次 30 min, 连续 5 天。

中药组: 将制备好的加味芍药甘草汤水煎剂温热至 $40 \sim 50^{\circ}\text{C}$, 灌胃容积为 1 ml/100 g, 每日 1 次, 连续 5 天。

针药组: 先予加味芍药甘草汤水煎剂灌胃, 再行电针治疗, 剂量及方法同上, 每日 1 次, 连续 5 天。假手术组、模型组同电针组一样束缚 30 min, 同时予 1 ml/100 g 生理盐水灌胃, 每日 1 次, 连续 5 天。空白组不做任何干预。

1.6 观察指标及方法

1.6.1 大鼠行为学检测 治疗后采用 Zea-longa 神经功能评分^[13]进行评价, 0 级: 无神经功能缺损, 活动无异常, 计 0 分; 1 级: 神经功能轻微缺损, 患侧前爪伸展受限, 计 1 分; 2 级: 神经功能中度缺损, 向患侧转圈, 计 2 分; 3 级: 神经功能重度缺损, 向患侧倾斜, 计 3 分; 4 级: 自发行走丧失, 意识水平下降, 甚至意识全无, 计 4 分; 5 级: 死亡, 计 5 分。

1.6.2 大脑海马突触超微结构变化 冰盘上取患侧大脑半球迅速剥离出海马, 取一部分切成体积为 1 mm^3 左右大小的米粒状, 置于 2% 戊二醛混合固定液固定, 脱水、渗透、包埋后, 制成 70 nm 的超薄切片, 行醋酸铀-柠檬酸铅双染色, 透射电镜观察并采集照片。

1.6.3 大脑海马 SYN、PSD95 mRNA 表达 采用 RT-PCR 法检测, 冰盘上取患侧海马, 切取 30 g 组织块加入 1 ml Trizol 匀浆离心 (12 000 r/min, 半径 13.5 cm, 15 min) 后转移上清液至防冻管, 放液氮中迅速降温 1 天, 随后放入 -80°C 冰箱储存。提取组织总 RNA; mRNA 逆转录 cDNA; 梯度 PCR 技术扩增 (SYBR Green Mix 10 μl , 上下游引物各 5 mol, cDNA 模板 1 μl , ddH₂O 8 μl), Primer Premier 5.0 设计引物 (上下游各 5 mol), SYN: 上游: TGTGCCAACAAGACGG, 下游: CTTTGACG-CAGGAGGG, 产物长度为 100 bp; PSD95: 上游: TGGACCCACCAAAGAC, 下游: GCCAGCCTCAAT-

GAAC, 产物长度为 187 bp; β -Actin: 上游: CGTT-GACATCCGTAAAGAC, 下游: TAGGAGCCAGGGCAG-TA, 产物长度为 110 bp。数据采用 Qbase plus 2.0 软件分析荧光 CT 值, 计算 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 表达量表示基因表达的相对变化。

1.6.4 大脑海马 SYN、PSD95 蛋白表达 采用 Western Blot 法检测, 对样本进行蛋白提取后进行蛋白定量, 制备 SDS-PAGE 胶, 随后上样, 跑电泳, 转膜, 一抗稀释 (SYN: 1 : 20 000, PSD95: 1 : 2 000, β -Actin: 1 : 2 000), 膜封闭及受体孵育, 按照 1 : 10 000 稀释二抗孵育过夜, 显色后利用 Tanon-4100 GIS 3.0 软件获取相关条带灰度值。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析。计量资料符合正态分布用均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组比较采用单因素方差分析, 两两比较方差齐时采用 Dunnett T^3 法, 方差齐时采用 LSD- t 法。不符合正态分布用中位数 (四分位间距) [$M (Q)$] 表示, 则采用秩和检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠行为学评分比较

表 1 示, 与空白组、假手术组比较, 模型组大鼠行为学评分增高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 各治疗组大鼠行为学评分下降 ($P < 0.05$), 而各治疗组组间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 1 各组大鼠行为学评分比较 [分, $M (Q)$]

组别	鼠数	干预后行为学评分
空白组	9	0 (0)
假手术组	9	0 (0)
模型组	9	3 (1) ^{a)}
电针组	9	0 (2) ^{b)}
中药组	9	0 (2) ^{b)}
针药组	9	0 (2) ^{b)}

注: a) 与空白组、假手术组比较, $P < 0.01$; b) 与模型组比较, $P < 0.05$ 。

2.2 各组大鼠大脑海马突触超微结构比较

电镜下模型组较空白组、假手术组突触数量减少明显, 囊泡数量减少密度不均, 前后膜及间隙发生融合界限模糊, 突触后细胞终末胞质变性溶解显著, 突触后致密带的密度也下降。各治疗组均较模型组的突触数量明显增多也相对密集, 囊泡数量增多, 新生的凹形突触增加, 突触后致密物增厚, 间隙变得规则紧致。在 3 个治疗组中, 针药组突触细胞囊泡明显成形, 界限清晰, 间隙规则, 改善作用

最明显。

2.3 各组大鼠脑海马 SYN、PSD95 mRNA 相对表达量比较

表 2 示,与空白组、假手术组比较,模型组大鼠脑海马 SYN、PSD95 mRNA 相对表达量均降低 ($P < 0.01$);与模型组比较,各治疗组大鼠脑海马 SYN、PSD95 mRNA 相对表达量均升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);与针药组比较,中药组与电针组大鼠脑海马 SYN、PSD95 mRNA 相对表达量均降低 ($P < 0.05$);而电针组与中药组组间比较,SYN、PSD95 mRNA 相对表达量差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 2 各组大鼠脑海马 SYN、PSD95 mRNA 相对表达量比较 ($2^{-\Delta\Delta CT}$, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	SYN	PSD95
空白组	9	1.00 ± 0.000	1.00 ± 0.000
假手术组	9	1.10 ± 0.119	0.93 ± 0.046
模型组	9	0.40 ± 0.126 ^{a)}	0.45 ± 0.050 ^{a)}
电针组	9	0.61 ± 0.057 ^{b) d)}	0.56 ± 0.072 ^{b) d)}
中药组	9	0.59 ± 0.144 ^{b) d)}	0.54 ± 0.038 ^{b) d)}
针药组	9	0.80 ± 0.093 ^{c)}	0.66 ± 0.033 ^{c)}

注: SYN, 突触素; PSD95, 突触后致密物 95。

a) 与空白组、假手术组比较, $P < 0.01$; b) 与模型组比较, $P < 0.05$; c) 与模型组比较, $P < 0.01$; d) 与针药组比较, $P < 0.05$ 。

2.4 各组大鼠脑海马 SYN、PSD95 蛋白表达比较

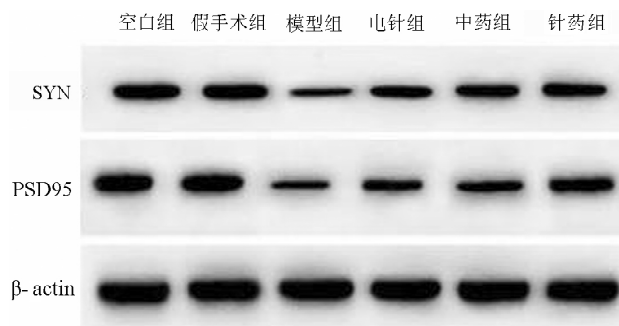
表 3 示,与正常组、假手术组比较,模型组大鼠脑海马 SYN、PSD95 蛋白表达均降低 ($P < 0.01$);与模型组比较,各治疗组大鼠脑海马 SYN、PSD95 蛋白表达均升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与针药组比较,中药组、电针组大鼠脑海马 SYN、PSD95 蛋白表达均降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),而中药组和电针组组间比较,SYN、PSD95 蛋白表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。各组大鼠脑海马 SYN、PSD95 蛋白电泳图见图 1。

表 3 各组大鼠脑海马 SYN、PSD95 蛋白表达比较 (灰度值, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	SYN	PSD95
空白组	9	0.64 ± 0.025	0.91 ± 0.055
假手术组	9	0.63 ± 0.012	0.89 ± 0.053
模型组	9	0.34 ± 0.023 ^{a)}	0.48 ± 0.027 ^{a)}
电针组	9	0.39 ± 0.041 ^{b) c)}	0.59 ± 0.034 ^{c) d)}
中药组	9	0.38 ± 0.024 ^{b) c)}	0.58 ± 0.017 ^{c) d)}
针药组	9	0.49 ± 0.016 ^{c)}	0.68 ± 0.025 ^{c)}

注: SYN, 突触素; PSD95, 突触后致密物 95。

a) 与空白组、假手术组比较, $P < 0.01$; b) 与模型组比较, $P < 0.05$; c) 与模型组比较, $P < 0.01$; d) 与针药组比较, $P < 0.05$; e) 与针药组比较, $P < 0.01$ 。



注: SYN, 突触素; PSD95, 突触后致密物 95。

图 1 各组大鼠脑海马 SYN、PSD95 蛋白表达条带

3 讨论

依据脑卒中肢体痉挛临床表现,可属于中医学“中风”“偏枯”范畴。《百症赋》曰“半身不遂,阳陵远达于曲池”,既符合针灸局部取穴、循经取穴及特殊取穴的原理,又属于上下配伍、特殊配伍。《伤寒论》中记载的芍药甘草汤是治疗“足痉挛,不得伸”的名方,白芍味苦、酸,微寒,可平肝止痛,敛阴止汗;甘草味甘、性平,可补中缓急。二者相伍酸甘化阴,使筋脉得阴津濡润,则挛急诸证皆平。补阳还五汤是治疗中风病气虚血瘀证的经典方,与芍药甘草汤加减化裁形成本研究中的加味芍药甘草汤,方中白芍、甘草为君药,柔肝缓急,解痉止痛;补阳还五汤去赤芍、桃仁、红花,加鸡血藤、木瓜、桑枝、伸筋草为臣药,以益气活血,通经活络;佐以山萸肉、枸杞子以滋补肝肾养阴。诸药合用,共奏滋阴柔肝缓急、益气活血通络之功。研究发现,芍药甘草汤对末梢神经有抑制及镇痛作用,其解除痉挛与直接弛缓骨骼肌、平滑肌有关^[14],具有改善神经功能、解痉止痛的作用^[17]。近年来医家将针灸与中药结合,发挥二者的优势,在临床上取得了一定的疗效^[18-19]。我们前期通过临床观察^[20]发现,针刺与中药配合使用能更好缓解脑卒中后偏瘫患者肌张力,改善运动功能,提高日常生活活动能力。另有报道^[21]发现,针刺可以促进药物的吸收。本研究验证了电针“曲池”“阳陵泉”、加味芍药甘草汤及针药结合三种疗法治疗脑卒中肢体痉挛是有效的,均可以改善脑卒中大鼠缺损的神经功能,有效调节脑卒中肢体痉挛状态,但三种方法无明显差异。

各神经元之间连接及信息传递主要依托突触而实现^[22],因此突触结构和功能的完整,是神经元彼此之间信息传递、加工和存储顺利进行的基础。

通过训练海马区的突触神经元可以发生一种修饰建构, 神经系统损伤后也会引发类似的神经修饰^[23], 突触可塑性就是可随环境改变而发生适应性变化的神经系统特性^[24]。脑卒中疾病导致大量的神经元细胞凋亡及损伤, 如何调节突触可塑性发生使得突触重建且恢复原有的运动功能, 是缓解脑卒中痉挛状态的关键。本研究采用透射电镜观察大鼠大脑海马突触超微结构变化发现, 各治疗组均对脑突触结构可塑性有一定的调节作用, 而针药组突触细胞囊泡明显成形, 界限清晰, 间隙规则, 说明针药组的作用最明显。

SYN 位于轴突终末端的突触前囊泡膜, 主要分布在中枢及周围神经系统的突触前终末素内, 是密切相关于突触结构和功能的钙结合蛋白物质, SYN 的免疫活性增加可以促进轴突末端分支形成, 通过它可以准确反映突触数量及密度, 是突触重建和神经可塑的重要指标之一^[25]。脑缺血性损伤之后, 神经元 SYN 的代谢和蛋白合成能力不足导致运输能力减退大量神经元细胞死亡或凋亡的时候, 突触的结构发生破坏、神经元胞体出现病变, 最终轴突的终末段蜕变甚至丢失, 突触素的数目下降^[26-27]。PSD95 分布于突触后膜下方, 是突触后致密区的核心构架蛋白, 能够调节、聚合受体, 并且稳定突触连接结构, 最终起到传导膜受体信号的作用^[28]。缺血信号直接通过 PSD95 影响突触传递, PSD95 及其相关蛋白减少诱发突触后神经元细胞去磷酸化、膜内外 Ca^{2+} 浓度发生改变等^[29], 树突棘损伤而导致受体聚合减少, 一系列的病理改变产生了神经细胞兴奋性而发生肌张力增强^[30]。

本研究对各组大鼠海马 SYN、PSD95 mRNA 与蛋白表达检测结果显示, 3 个治疗组均可提高海马 SYN、PSD95 mRNA 与蛋白表达, 以改善脑卒中肢体痉挛的突触可塑性情况, 从而促进大鼠神经功能的恢复。同时, 针药结合提高海马 SYN、PSD95 mRNA 与蛋白表达优于电针、中药单独治疗, 提示临床中使用针药结合的方法可更好地缓解脑卒中肢体痉挛状态, 但针药结合如何发挥作用的机制, 还待后续进一步研究探索。

本实验还存在一些不足, 假手术组仅束缚, 却没有进行非经非穴位刺激的对照, 在之后的实验中我们会补充完善。

参考文献

[1] 高海滨, 李子木, 唐蓓蓓, 等. 人类免疫缺陷病毒感染并

发脑卒中研究新进展 [J]. 中国全科医学, 2019, 22 (26): 3255-3259.

[2] 刘丹阳, 任建伟. 针灸联合 Bobath 疗法治疗脑卒中后痉挛性瘫痪的系统评价与 Meta 分析 [J]. 广州中医药大学学报, 2019, 36(12): 1967-1974.

[3] 周星娅, 刘维红, 刘涛, 等. 针灸治疗脑梗死后痉挛性瘫痪临床选穴规律研究 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2018, 24(7): 974-977.

[4] 王东雁, 吴河山, 王建宇, 等. 电针配合穴位注射治疗脑出血后肩-手综合征临床观察 [J]. 新中医, 2018, 50(7): 182-185.

[5] 芦宇. 芍药甘草汤加味对卒中后肢体痉挛患者脑脊液谷氨酸- γ -氨基丁酸的影响 [J]. 西部中医药, 2019, 32(9): 1-4.

[6] 杨旭, 王景霞, 张建军, 等. 芍药甘草汤对中枢性肌张力增高大鼠解痉止痛最佳配比的筛选研究 [J]. 北京中医药大学学报, 2015, 38(1): 33-36.

[7] 王鑫, 孙彩花, 徐旸, 等. 卒中后认知障碍小鼠胆碱能神经环路蛋白乙酰化内稳态失衡的机制研究 [J]. 中国康复理论与实践, 2016, 22(6): 621-628.

[8] 邹兆鹏, 范锦阁, 赵博, 等. 脑缺血后突触可塑性研究进展 [J]. 广东医学, 2018, 39(23): 3573-3577.

[9] 张秋月, 郑卉, 姚智超, 等. 康复训练对缺血性脑卒中小鼠突触蛋白 I 和突触后致密蛋白-95 表达的影响 [J]. 中国康复医学杂志, 2019, 34(3): 262-266, 279.

[10] 朱旭红, 张萍淑, 程赞赞, 等. 突触可塑性相关蛋白及其与临床疾病的关系 [J]. 华北理工大学学报(医学版), 2017, 19(3): 237-241.

[11] 岳增辉, 谢志强, 谢莉娜, 等. 脑卒中后肢体痉挛大鼠模型制备方法 [J]. 中国中医药现代远程教育, 2019, 17(5): 129-131.

[12] 刘鸿燕, 周奇志, 蔡定均, 等. 构建大鼠内囊电毁损痉挛模型 [J]. 中国老年学杂志, 2008, 28(22): 2214-2215.

[13] LONGA EZ, WEINSTEIN PR, CARISON S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91.

[14] 诸葛后钊. 大鼠脑立体定位图谱 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 47.

[15] 郭义. 实验针灸学实验指导 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2012: 47-48.

[16] 王景霞, 杨旭, 张建军, 等. 芍药甘草汤对中枢性肌张力增高大鼠脑内氨基酸及其受体的影响 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(6): 1100-1106.

[17] 黄勇, 杨晓姣, 申震, 等. 芍药甘草汤对脊髓抑制性神经递质及大鼠脊髓损伤后肌痉挛的影响 [J]. 中华中

- 医药杂志, 2018, 33(9): 4200-4203.
- [8] 陈岚榕, 刘呈艳, 王林林, 等. 针药结合治疗脑卒中后吞咽障碍并发肺炎的疗效观察 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2019, 25(11): 1569-1571.
- [9] 唐卫华, 张蓓蓓, 丁砚兵. 针药“病证结合”早期治疗急性缺血性中风的疗效观察 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2018, 16(18): 2733-2735.
- [20] 刘未艾, 岳增辉, 付磊, 等. 经筋刺法结合加味芍药甘草汤治疗脑卒中后肢体痉挛的效果 [J]. 中国康复理论与实践, 2018, 24(3): 323-327.
- [21] 孙培养, 储浩然, 李佩芳, 等. 通督调神针刺干预对药物治疗脑卒中后抑郁的影响 [J]. 中国针灸, 2015, 35(8): 753-757.
- [22] 黄龙舰, 张泳, 王晓良, 等. 2-(α -羟基戊基) 苯甲酸钾盐 (PHPB) 对 APP/PS1 转基因小鼠海马神经元、突触和轴突损伤的保护作用 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2019, 33(6): 437-438.
- [23] 王珏, 吴俞莹, 张新化. 海马突触可塑性与神经系统相关疾病关系的研究进展 [J]. 神经解剖学杂志, 2019, 35(5): 557-560.
- [24] 张希, 袁德培, 张誉丹. 从突触可塑性探讨中医对阿尔茨海默病的三期论治 [J]. 中医杂志, 2019, 60(22): 1916-1919, 1934.
- [25] GARRINGER HJ, MURRELL J, SAMMETA N, et al. Increased tau phosphorylation and tau truncation, and decreased synaptophysin levels in mutant BRI2/tau transgenic mice [J]. PLoS One, 2013, 8(2): e56426.
- [26] CHEN YY, ZHANG L, SHI DL, et al. Resveratrol attenuates subacute systemic inflammation-induced spatial memory impairment via inhibition of astrocyte activation and enhancement of synaptophysin expression in the hippocampus [J]. Ann Clin Lab Sci, 2017, 47(1): 17-24.
- [27] 赵嘉培, 黄丹霞, 黄赛娥, 等. 电针“曲池”和“足三里”对脑缺血大鼠皮质突触素、脑源性神经营养因子表达的影响 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2017, 25(11): 1099-1106.
- [28] 韩雪峰, 张析哲, 周琪. PSD95 在神经损伤后表达作用的研究进展 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2018, 18(77): 37, 47.
- [29] 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.
- [30] 陶涛, 秦文熠, 秦新月, 等. 米诺环素对大鼠脑缺血再灌注损伤后学习记忆能力及海马神经元 PSD95 蛋白表达的影响 [J]. 重庆医科大学学报, 2015, 40(1): 23-26.

The Effects of Electroacupuncture and Modified *Shaoyao Ganciao Decoction* (芍药甘草汤) Used Alone or in Combination on the Synaptic Ultrastructure and Plasticity Protein in Hippocampus of Stroke Model Rats with Limb Spasticity

GUO Bin^{1,2}, WANG Penghan², HUANG Linxing², XIE Zhiqiang², XIE Lina², LIU Weiai³, YUE Zenghui²

1. School of Traditional Chinese Medicine, Ningxia Medical University, Yinchuan, 750000; 2. School of Acupuncture, Moxibustion & Tuina, Hunan University of Chinese Medicine; 3. The Second Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine

ABSTRACT Objective To compare the effect of acupuncture at ‘Quchi’ (LI 11) and ‘Yanglingquan’ (GB 34) acupoints, the modified *Shaoyao Ganciao Decoction* (芍药甘草汤), and the combination of two therapies on relieving limb spasticity after stroke, and to explore the possible mechanism. **Methods** Fifty-four SD rats were randomly divided into a blank group, a sham operation group, a model group, a combination therapy group, an herbal medicine group, and an electroacupuncture group, with nine rats in each group. The stroke rats model with limb spasticity was developed by modified Zea-Longa thread embolization and internal capsule syringe of N-methyl-D-aspartate receptor. After modeling, the rats in electroacupuncture group were given electroacupuncture at bilateral ‘Quchi’ and ‘Yanglingquan’ acupoints, 30 minutes each time, once daily, for 5 days. The herbal medicine group was administered with 10 g/ml modified *Shaoyao Ganciao Decoction*, once daily, for 5 days. The combination therapy group was given electroacupuncture and modified *Shaoyao Ganciao Decoction*, in the same way with electroacupuncture group and herbal medicine group. The rats in model group and sham operation group were all blinding and received equal amount of normal saline by gavage. No intervention was implemented in the blank group. The behavioral scores were used to assess the neurological damage; the ultrastructure of hippocampal synapses was observed under electron microscope; and the mRNA and protein expression of synaptophysin (SYN) and postsynaptic compact 95 (PSD95) in the hippocampus of rats were detected. **Results** There was significantly higher behavioral score in the model group compared

to blank group and sham operation group ($P < 0.01$), as well as significantly lower score in all treatment groups compared to model group ($P < 0.05$); the comparison between six groups was not statistically significant ($P > 0.05$). Compared to blank group and sham operation group, the number of synapses significantly decreased in model group; the number of vesicles was reduced and the density was uneven; the front and back membranes and gaps were blurred; the terminal cytoplasm of postsynaptic cells was degenerated and dissolved significantly; and the density of the postsynaptic density zone also decreased. In all treatment groups, the structure of synapses was significantly relieved; and the synaptic cell vesicles in combination treatment group were clearly formulated with clear boundaries and regular gaps. The mRNA and protein expression of SYN and PSD95 were significantly lower in model group than blank group and sham operation group ($P < 0.01$), and were significantly higher in all treatment groups than model group ($P < 0.05$; $P < 0.01$); the increase was more significant in combination treatment group compared to herbal medicine group and electroacupuncture group ($P < 0.05$; $P < 0.01$). **Conclusion** Electroacupuncture at ‘Quchi’ and ‘Yanglingquan’ acupoints and modified *Shaoyao Gancan Decoction*, used alone or in combination, can alleviate the neurological damage caused by stroke limb spasticity, through improving synaptic ultrastructure and increasing plasticity protein expression; and the combination of electroacupuncture and herbal medicine is the most effective.

Keywords electroacupuncture; modified *Shaoyao Gancan Decoction* (芍药甘草汤); stroke; limb spasticity; hippocampal synapse; ultrastructure; plasticity protein

(收稿日期: 2020-02-23; 修回日期: 2020-03-26)

编辑: 邓 媛