

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2022.19.014

“百会”“四神聪”放血对颅内低灌注模型大鼠脑微梗死及神经血管耦合功能的影响

冯晴殷, 王少松[✉], 王鑫, 李倩倩, 崔莹雪, 张文旭, 王子仪, 岑盼临

首都医科大学附属北京中医医院, 北京市东城区美术馆后街 23 号, 100010

[摘要] **目的** 探讨“百会”“四神聪”放血对颅内低灌注模型大鼠认知障碍的影响及可能作用机制。**方法** 30 只 SD 大鼠随机分为实验组、模型组、空白组各 10 只。实验组、模型组采用双侧颈总动脉结扎法建立颅内低灌注大鼠模型。实验组造模 1 周后开始给予“百会”“四神聪”放血, 每周一、三、五放血, 干预 4 周, 共 12 次; 模型组及空白组大鼠不做干预。各组大鼠干预 4 周后采用 Morris 水迷宫评价大鼠认知行为学改变, 包括隐蔽平台实验(持续 5 天, 记录每天逃避潜伏期时间)和空间探索实验(隐蔽平台实验结束 24 h 后开始, 记录大鼠平台象限停留时间、平台位置穿越次数、平台象限游泳距离)。水迷宫实验完成后取大鼠脑组织进行 HE 染色, 根据染色结果统计脑微梗死灶数量, 观察脑白质损伤情况并分为 0 度、I 度、II 度; 免疫组织化学法测定大鼠脑组织髓鞘碱性蛋白(MBP)、神经元型一氧化氮合酶(nNOS)、花生二烯酸(AA)、神经胶质抗原 2(NG2)蛋白表达; ELISA 法检测大鼠外周血清一氧化氮(NO)含量。**结果** 与空白组同时时间比较, 模型组和实验组大鼠 Morris 水迷宫隐蔽平台实验第 5 天逃避潜伏期延长 ($P < 0.05$); 与模型组同时时间比较, 实验组大鼠第 5 天逃避潜伏期缩短 ($P < 0.05$)。各组大鼠 Morris 水迷宫空间探索实验平台位置穿越次数、平台象限游泳距离比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与空白组比较, 模型组大鼠平台象限停留时间缩短 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 实验组大鼠平台象限停留时间延长 ($P < 0.05$)。与空白组比较, 模型组大鼠脑组织中脑微梗死灶数量增多, 脑白质损伤程度分级以 II 度为多, 脑组织 MBP、NG2、AA 蛋白表达和外周血清 NO 含量升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 实验组大鼠脑白质损伤程度分级以 0 度和 I 度为主, 脑组织 MBP、NG2 蛋白表达和外周血清 NO 含量降低, AA 蛋白表达升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 实验组大鼠脑微梗死灶数量有减少趋势但两组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。**结论** “百会”“四神聪”放血可以改善颅内低灌注模型大鼠的认知功能, 减轻脑白质损伤程度, 其机制可能与调节皮质神经元介导的神经血管耦合通路相关。

[关键词] 脑微梗死; 颅内低灌注; 认知障碍; 神经血管耦合; 放血疗法; 百会; 四神聪

脑微梗死(cerebral microinfarcts, CMI)是由于缺血引起的颅内直径为 0.05~3 mm 的脑内微小病变, 可广泛形成分布在大脑皮质及皮质下区域, 导致大脑结构连接的破坏^[1]。微梗死发生后的局部神经元破坏、周围神经元连接紊乱、大脑皮质高级认知网络的拓扑结构损害可引起认知功能障碍^[1]。研究表明, 脑微梗死已不仅仅是简单的一种脑小血

管疾病的病变表现, 其相关研究结论将影响未来缺血性脑血管病及血管性认知障碍的治疗思路^[2]。研究发现, 脑微梗死与颅内动脉狭窄明确相关, 并且狭窄常发生在同侧, 提示低灌注可造成脑微梗死灶的增多^[3], 且脑低灌注可加速颅内脑白质脱髓鞘损害, 从而促进脑微梗死的发生^[4]。百会、四神聪穴位放血疗法为名老中医王乐亭治疗急性脑梗死的针刺方法之一, 具有醒神开窍的作用^[5]。前期研究^[6]发现, 醒神开窍针刺法可以加快急性脑梗死患者大脑中动脉血流速度, 改善患者脑血管储备功能, 提

基金项目:北京市医院管理中心重点医学专业发展计划(ZYLX202140)

✉ 通讯作者:wangssmail@163.com

高颅内灌注量。本实验采用大鼠双侧颈总动脉结扎造成颅内低灌注模型,采用“百会”“四神聪”穴位放血对模型进行干预,通过认知行为学、组织病理学、免疫组化等方法评价其对大鼠脑微梗死及脑白质损害的影响,并从神经血管耦合(NVC)角度探讨其可能的作用机制。本研究经首都医科大学实验动物伦理委员会审查批准,批号:BJTCM-R-2021-11-03。

1 材料与方法

1.1 动物

雄性SD大鼠30只,SPF级,6周龄,体质量180~220 g,购自北京斯贝福生物技术有限公司,实验动物生产许可证号:SCXK(京)2019-0010。饲养于首都医科大学实验动物中心SPF级实验室,动物实验设施许可证号:SYXK(京)2018-0003。温度18~22℃,湿度40%~60%,自由饮食。动物在实验室适应1周后正式进行实验。

1.2 药物、试剂及主要仪器

庆大霉素注射液(批号:H41020089),无锡济民可信山禾药业股份有限公司;10%水合氯醛(批号:202107500)、双蒸水(批号:202110754),北京化工厂;二氨基联苯胺(DAB)显色剂(批号:EPR23752-147)、苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(批号:HH5309101),北京中杉金桥生物技术有限公司;多聚甲醛(批号:2021100749823)、无水乙醇(货号:32061)、过氧化氢(H_2O_2 ,货号:H13022556),北京市化学试剂研究所;二甲苯(批号:106-42-3),上海建贝邦工公司;髓鞘碱性蛋白(MBP)、神经元型一氧化氮合酶(nNOS)、花生二烯酸(AA)抗体试剂盒(批号分别为:PAA539Ma01、PAA815Re01、PAB098Ge01),武汉云克隆科技股份有限公司;神经胶质抗原2(NG2)抗体试剂盒(批号:ab259324),Abcam公司;一氧化氮(NO)ELISA试剂盒(批号:OD45),北京欧北生物科技有限公司;封闭用正常山羊血清(批号:20211225),Solarbio公司。

华佗牌小号三棱针(1.6 mm×65 mm),苏州医疗用品厂有限公司;XR-XM101型Morris水迷宫,上海欣软信息科技有限公司;T10型匀浆机,德国IKA公司;ASP300S型全自动组织脱水机、RM2245半型自动轮转式切片机,德国徕卡仪器有限公司;BX53型显微镜,日本奥林巴斯有限公司;Dmi8型透射电子显微镜,美国FEI公司;

Microfuge22R型低温高速离心机,美国Beckman公司。

1.3 分组及造模方法

30只SD大鼠根据体质量应用随机数字表法分为空白组、模型组和实验组,每组10只。空白组不做任何处理,其余两组大鼠采用双侧颈总动脉结扎法建立颅内低灌注大鼠模型^[7]:腹腔注射10%水合氯醛0.3 ml/100 g麻醉大鼠;固定大鼠仰卧位,颈部褪毛后行纵向正中切口,切口长度1 cm;眼科镊逐步钝性分离甲状腺、肌肉、筋膜组织后小心分离出颈总动脉;向锁骨方向分离颈总动脉并定位,用可吸收外科缝合线先右侧后左侧结扎颈总动脉,使大鼠双侧颈总动脉完全闭塞,使后交通动脉代偿供血出现颅内血流灌注减少,以大鼠脑组织HE染色光镜观察示大鼠脑组织符合缺血性改变证明造模成功^[8]。复位缝合伤口,术后及术后第1天用碘伏对伤口进行消毒,肌肉注射庆大霉素40万U/kg预防感染。

1.4 干预方法

实验组造模1周后开始进行放血干预,应用自制布袋固定后暴露大鼠头部取“百会”“四神聪”放血,取穴参照《实验动物常用穴位名称与定位第2部分:大鼠》^[9]进行定位,局部应用75%乙醇消毒,用三棱针迅速刺入皮下2 mm,立即出针,挤压针孔周围,使血液流出2~4滴即可,每周一、三、五放血干预,干预4周,共放血12次。模型组和空白组大鼠正常饲养,不进行干预。

1.5 观察指标及方法

造模过程中实验组大鼠死亡1只,剩余大鼠均完成实验。为便于统计,其余各组均采用随机数字表法选取9只大鼠的实验数据进行分析。干预4周后各组大鼠进行Morris水迷宫实验共6天。水迷宫实验结束后,每组采用随机数字表法选取3只行心室灌注处死后去除小脑、脑干,取大脑组织行6 μm石蜡切片,进行HE染色、免疫组织化学法检测;剩余6只腹主动脉取血,用于ELISA法检测。

1.5.1 Morris水迷宫实验 各组大鼠干预4周后的第1天进行平台适应,第2天开始进行Morris水迷宫实验,包括隐蔽平台实验和空间探索实验。1)隐蔽平台实验:平台位置固定不变,置于Ⅱ象限中央,平台中点离池壁22.5 cm。在除平台所在象限外的其余3个象限各选距离水池圆心相等的点作为入水点,训练时先将大鼠置于平台上10 s,然后分别从Ⅲ、Ⅳ、Ⅰ象限将大鼠面朝池壁轻轻放入水

中,记录大鼠从入水至找到平台的时间(逃避潜伏期),每天训练3次,以3次逃避潜伏期的算术平均值作为当日的成绩,持续5天。2)空间探索实验:隐蔽平台实验结束24 h后,撤除平台,然后分别在I、Ⅲ、Ⅳ3个象限的入水点放入大鼠,记录大鼠在60 s内的平台象限游泳距离、大鼠穿越Ⅱ象限平台位置的次数和平台象限停留时间。

1.5.2 脑组织 HE 染色 对每组3只大鼠大脑行6 μm 石蜡切片,将切片行常规脱蜡后,经苏木精液染3~4 min,水洗冲掉表面的染料,于自来水中返蓝5 min,待切片全部变蓝,再用双蒸水洗2 min。然后伊红溶液染色30 s,75%乙醇洗脱伊红1~2 min,后分别采用两个浓度梯度(90%-85%-70%、70%-85%-90%)无水乙醇分别脱水3 min,两级二甲苯分别透明3 min,最后用中性树胶封固。结果判断:1)选取冠状位切片2张,矢状位切片2张(每组3只大鼠共12个样本),将染色的切片置于普通光学显微镜下,在放大100倍镜下读取各组微梗死灶数量,微梗死灶表现为镜下梗死区域变为囊性^[7],后在放大200倍镜下观察微梗死灶形态。2)放大200倍镜下观察脑白质损伤程度,参照Uehara等制定的方法^[10]分级,0度:正常;Ⅰ度:轻度异常(白质轻度疏松,神经纤维排列不整齐);Ⅱ度:重度异常(白质严重疏松,神经纤维排列紊乱,有凝固性坏死和囊腔形成)。

1.5.3 免疫组织化学法检测脑组织 MBP、NG2、nNOS、AA 蛋白表达 将每组3只大鼠大脑组织石蜡切片脱蜡后,30 g/L过氧化氢孵育10 min,100 g/L山羊血清封闭液室温孵育30 min;加入MBP(1:200)、NG2(1:100)、nNOS(1:200)、AA(1:200)单克隆抗体,4℃孵育过夜;加入过氧化物酶标记二抗(1:200)工作液,37℃孵育1 h;DAB显色,苏木精复染,脱水透明封片镜检。以磷酸盐缓冲液作阴性对照。应用Image-Pro Plus 6.0软件对图像进行分析,计算MBP、NG2、nNOS、AA蛋白图像积分光密度(IOD)值。

1.5.4 ELISA 法检测外周血清 NO 含量 剩余每组6只大鼠麻醉后打开腹腔,手持干净棉球移开肠胃,夹闭腹主动脉后用采血针从远心端向心刺入,取血3 ml分离血清,4℃冰箱内保存,严格按照ELISA试剂盒说明书步骤测定外周血清NO含量。

1.6 统计学方法

运用统计学软件SPSS 20.0对实验数据进行统计分析。本研究计量数据均符合正态分布,以平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。Morris水迷宫隐蔽平台实验结果运用球形检验分析后,若检验结果为 $P>0.05$,表明资料满足Huynh-Feldt检验条件,可以用重复测量单因素方差分析;若检验结果为 $P\leq 0.05$,表明资料不满足Huynh-Feldt检验条件,采用多因素方差分析。Morris水迷宫空间探索实验、免疫组织化学法检测、ELISA法检测结果均采用单因素方差分析,组间比较采用LSD方法进行两两比较。等级资料采用秩和检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 各组大鼠不同时间 Morris 水迷宫隐蔽平台实验逃避潜伏期比较

球形检验结果显示,假设球形度 F 值=2.424, $P=0.022$,故采用多因素方差分析。由于Morris水迷宫隐蔽平台实验前4天为大鼠学习记忆训练,主要是比较第5天的实验结果,故仅对第5天结果进行组间比较。表1示,与空白组同时间比较,模型组和实验组大鼠第5天逃避潜伏期均延长($P<0.05$);与模型组同时间比较,实验组大鼠第5天逃避潜伏期缩短($P<0.05$);实验组大鼠第5天逃避潜伏期明显短于本组第1天和第2天($P<0.05$)。

2.2 各组大鼠 Morris 水迷宫空间探索实验结果比较

表2示,与空白组比较,模型组大鼠平台象限停留时间缩短($P<0.05$);与模型组比较,实验组大鼠平台象限停留时间延长($P<0.05$)。各组大鼠平台位置穿越次数、平台象限游泳距离比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

表1 各组大鼠不同时间 Morris 水迷宫隐蔽平台实验逃避潜伏期比较 (s, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	第1天	第2天	第3天	第4天	第5天
空白组	9	48.09 $\pm$ 16.57	30.01 $\pm$ 22.74	38.16 $\pm$ 24.35	22.50 $\pm$ 17.88	8.99 $\pm$ 6.09
模型组	9	48.76 $\pm$ 12.56	39.94 $\pm$ 18.73	31.72 $\pm$ 17.51	26.84 $\pm$ 23.57	32.74 $\pm$ 20.47 ^{a)}
实验组	9	52.04 $\pm$ 18.98	42.90 $\pm$ 20.75	19.68 $\pm$ 14.77	19.33 $\pm$ 19.71	16.19 $\pm$ 13.28 ^{a) b) c) d)}

注:a)与空白组同时间比较, $P<0.05$;b)与模型组同时间比较, $P<0.05$;c)与本组第1天比较, $P<0.05$;d)与本组第2天比较, $P<0.05$ 。

表 2 各组大鼠 Morris 水迷宫空间探索实验结果比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	平台象限停留	平台位置穿	平台象限游泳
		时间/s	越次数/次	距离/mm
空白组	9	16.21 $\pm$ 3.47	4.40 $\pm$ 1.43	3554.83 $\pm$ 774.81
模型组	9	13.22 $\pm$ 4.10 ^{a)}	3.89 $\pm$ 1.62	2880.72 $\pm$ 1030.92
实验组	9	17.13 $\pm$ 3.71 ^{b)}	5.22 $\pm$ 2.28	3439.07 $\pm$ 1143.57

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

2.3 各组大鼠脑组织 HE 染色结果

表 3 示, 与空白组比较, 模型组和实验组大鼠脑微梗死灶数量明显增多, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。与模型组比较, 实验组大鼠脑微梗死灶数量有降低趋势, 但两组比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

表 3 各组大鼠脑组织微梗死灶数量比较 (个, $\bar{x}\pm s$)

组别	样本数	微梗死灶数量
空白组	12	0
模型组	12	3.50 $\pm$ 0.93 ^{a)}
实验组	12	2.37 $\pm$ 1.06 ^{a)}

注: a) 与空白组比较, $P<0.05$ 。

表 4 示, 各组大鼠脑组织脑白质损伤程度分级结果差异有统计学意义, 实验组损伤程度轻于模型组 ($P<0.05$)。

HE 染色结果见图 1, 空白组未见脑微梗死, 仅见 1 个样本脑白质轻微病变。模型组可见多处皮层及皮层下微梗死表现, 即病变局部及周围见纤维

表 4 各组大鼠脑组织脑白质损伤程度分级结果

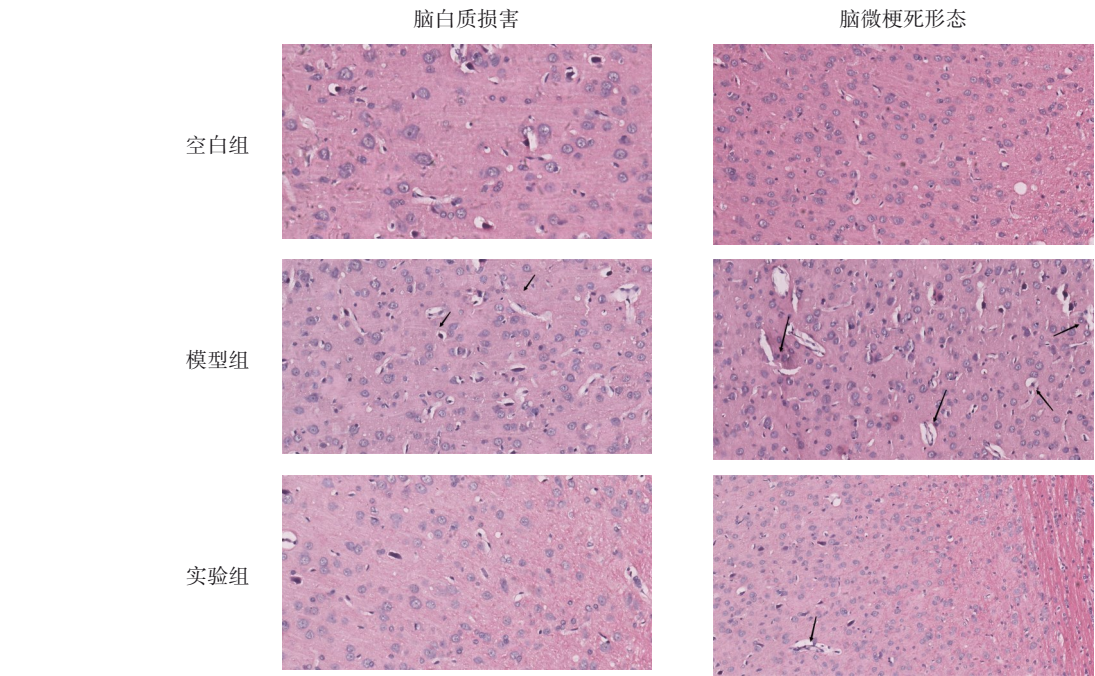
组别	样本数	0 度	I 度	II 度
空白组	12	11	1	0
模型组	12	1	4	7
实验组	12	4	6	2

状胶质细胞增生、神经元固缩, 梗死区域变为囊性, 脑白质严重疏松, 神经纤维排列紊乱。实验组脑微梗死灶数量减少, 梗死区域较模型组小, 脑白质轻度疏松, 神经纤维排列不整齐。

2.4 各组大鼠脑组织 MBP、NG2、nNOS、AA 蛋白表达比较

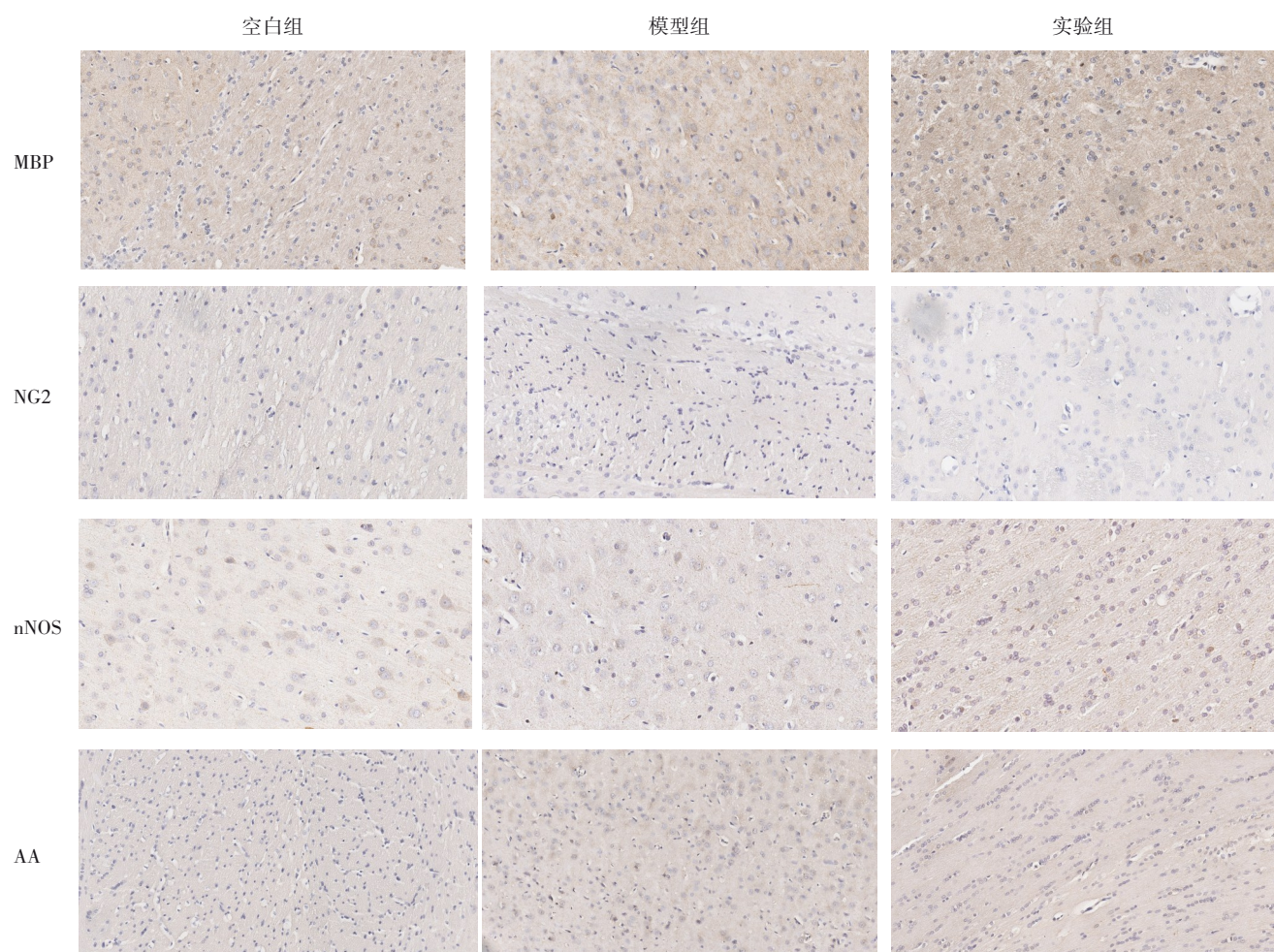
免疫组化染色结果见图 2, 空白组 MBP 蛋白表达可见脑白质走形区域黄染明显, 多个细胞核周边黄褐色染色; NG2 蛋白表达可见神经元细胞暗青色染色, 局部细胞核周边暗青色染色明显; nNOS 蛋白表达可见神经元细胞黄色深染; AA 蛋白表达可见神经元细胞及周围黄色深染。与空白组比较, 模型组及实验组 MBP、NG2、nNOS、AA 蛋白表达更为明显, 但模型组及实验组比较差异不明显。

表 5 示, 与空白组比较, 模型组大鼠脑组织 MBP、NG2、AA 蛋白表达明显升高 ($P<0.05$); 与模型组比较, 实验组大鼠脑组织 MBP、NG2 蛋白表达降低, AA 蛋白表达升高 ($P<0.05$); 各组大鼠脑组织 nNOS 蛋白表达比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。



注: 脑白质损害图中黑色箭头指示脑白质疏松; 脑微梗死形态图中黑色箭头指示为脑微梗死病变。

图 1 各组大鼠脑组织 HE 染色图 ($\times 200$)



注：MBP，髓鞘碱性蛋白；NG2，神经胶质抗原2；nNOS，神经元型一氧化氮合酶；AA，花生二烯酸。

图2 各组大鼠脑组织MBP、NG2、nNOS、AA蛋白免疫组化染色图（×200）

表5 各组大鼠脑组织MBP、NG2、nNOS、AA

		蛋白表达比较 (IOD值, $\bar{x} \pm s$)			
组别	样本数	MBP	NG2	nNOS	AA
空白组	12	8.12±0.35	9.19±0.29	4.02±0.19	13.60±0.44
模型组	12	14.18±1.62 ^{a)}	15.13±0.59 ^{a)}	6.13±0.15	17.09±0.43 ^{a)}
实验组	12	10.02±0.47 ^{b)}	12.32±0.26 ^{b)}	6.56±0.27	19.72±0.28 ^{b)}

注：MBP，髓鞘碱性蛋白；NG2，神经胶质抗原2；nNOS，神经元型一氧化氮合酶；AA，花生二烯酸。

a) 与空白组比较， $P<0.05$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ 。

2.5 各组大鼠外周血清NO含量比较

表6示，模型组和空白组大鼠外周血清NO含量比较差异无统计学意义（ $P>0.05$ ）；实验组大鼠外周血清NO含量显著低于空白组和模型组，差异均有统计学意义（ $P<0.05$ ）。

3 讨论

脑微梗死是由于颅内缺血引起的微小病变，研究发现脑微梗死发生后可造成局部神经元及神经元

表6 各组大鼠外周血清NO含量比较（ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $\bar{x} \pm s$ ）

组别	鼠数	NO含量
空白组	6	4.20±0.65 ^{a)}
模型组	6	4.28±1.13 ^{a)}
实验组	6	3.12±0.66

注：NO，一氧化氮。

a) 与实验组比较， $P<0.05$ 。

周围脑白质破坏，可对脑功能造成严重持续影响，引起认知障碍及视觉、语言等脑功能减低^[8]。因为灰质和白质的脑微梗死也会破坏邻近的联络纤维，导致脱髓鞘和轴突结构损伤，因此会对局部神经元及脑功能造成很大的影响^[10]。脑微梗死常为多发，加重了脑功能损害，所以控制脑微梗死的发病和减少局部及远端神经元破坏、非神经元损伤有重要的临床意义。针刺治疗缺血性脑梗死的疗效已逐渐获得临床认可，已有研究证实其可有效改善脑梗死患者脑灌注、减少神经功能缺损、提高日常生活能力^[11-13]。

百会穴为督脉穴位,四神聪为经外奇穴,两穴均具有醒脑开窍、调神镇静的治疗效果。放血疗法为中医传统治疗方法,早在《黄帝内经》中便有“凡用针者,虚则实之,满则泄之,宛陈则除之,邪胜则虚之”“宛陈则除之者,去血脉也”等对放血疗法的记载,后世亦一直延续了该疗法在临床中的应用。现代研究认为,放血疗法可以改善局部血流循环、调整免疫功能^[14],可提高缺血后神经细胞对缺血、缺氧的耐受和适应能力,抵抗细胞凋亡的发展,增强脑修复能力^[15]。本研究 Morris 水迷宫实验结果显示,模型组较空白组大鼠隐蔽平台实验第 5 天时逃避潜伏期延长,空间探索实验平台象限停留时间缩短,说明低灌注导致大鼠学习记忆能力下降,脑功能受到损伤;与模型组比较,实验组大鼠逃避潜伏期缩短、平台象限停留时间延长,说明“百会”“四神聪”放血可以改善大鼠学习记忆能力,修复脑功能。HE 染色结果显示,模型组大鼠脑组织出现微梗死区域,即梗死区域变为囊性,且微梗死灶数量较多,脑白质损伤程度分级以 II 度多见,提示大鼠脑白质受到破坏,符合脑微梗死病理表现;而实验组大鼠病理损伤得到改善,脑白质损伤程度分级以 0 度和 I 度多见,说明“百会”“四神聪”放血可以明显改善低灌注导致的大鼠脑组织病理损伤。实验组大鼠脑微梗死灶数量与模型组比较差异无统计学意义,分析原因可能与干预时间较短有关,后期需进一步观察。

MBP 是中枢神经系统髓鞘的主要蛋白,位于髓鞘浆膜面,维持髓鞘结构和功能的稳定。当脑微梗死发生,中枢神经系统受到损伤,MBP 则释放到脑组织中^[16]。有研究^[17]显示,大鼠局灶性脑缺血后缺血区 NG2 阳性表达增加,而 NG2 可能参与启动炎症反应、影响细胞因子以及趋化因子的释放、调节细胞的增殖、迁移和黏附等脑缺血的病理过程。人脑作为中枢神经系统的核心器官,其功能调节需要与之匹配的脑血流增加以供应足够的氧和葡萄糖^[18]。既往研究^[19]表明,脑内神经元兴奋性增加,可直接或间接引起脑血流动力学改变,皮质神经元兴奋直接引起小动脉和毛细血管扩张,这种自发性功能性充血的功能称为 NVC。在持续脑缺血过程中,缺血早期即可出现 NVC 功能下降^[20],进一步导致微血栓形成和微循环障碍^[21]。皮质内神经元介导的 NVC 功能是指皮质内谷氨酸能神经元的兴奋性增加,并能够直接调控皮层小血管的扩张与收缩^[22],是将神经活动与脑血流局部增加联

系起来的信号机制。当局部出现缺血、缺氧改变,皮质内谷氨酸能神经元的兴奋性增加,神经元和星形胶质细胞钙含量增加,触发释放血管活性化合物,包括神经元中 nNOS-NO 通路和星形胶质细胞中前列腺素 E (PGE) 等通路,通过 NO 及 AA 等浓度升高扩张毛细血管和穿透小动脉,从而增加血流量^[23]。本研究结果显示,模型组大鼠外周血清 NO 浓度升高,脑组织 MBP、NG2、AA 蛋白表达明显升高。实验组大鼠外周血清 NO 浓度明显降低,脑组织 MBP、NG2 蛋白表达降低,说明实验组大鼠脑白质损害程度较模型组减轻;AA 蛋白表达较模型组升高,提示“百会”“四神聪”放血可能促进 AA 蛋白表达,通过皮质内神经元介导的 NVC 功能,进一步扩张毛细血管,从而改善颅内低灌注的病理损伤。

综上所述,“百会”“四神聪”放血可明显减少低灌注导致的脑微梗死的发生,改善脑白质损害,从而提高模型大鼠的学习记忆能力,其机制可能与调节 NVC 功能有关。本研究只对 NVC 皮质内神经元介导的经典通路进行了初步研究,并且实验样本量较少、干预时间较短,可能导致脑微梗死灶数量差异无法显示出统计学意义,后期需要完善实验设计、增大样本量进行证实,同时关于“百会”“四神聪”放血是否影响 NVC 功能的其他通路进而改善颅内低灌注也需要进一步研究。

参考文献

- [1]ZHANG L, BIESELS GJ, HILAL S, et al. Cerebral microinfarcts affect brain structural network topology in cognitively impaired patients [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2021, 41(1):105-115.
- [2]VAN VELUW SJ, SHIH AY, SMITH EE, et al. Detection, risk factors, and functional consequences of cerebral microinfarcts[J]. Lancet Neurol, 2017, 16(9):730-740.
- [3]FERRO DA, MUTSAERTS HJ, HILAL S, et al. Cortical microinfarcts in memory clinic patients are associated with reduced cerebral perfusion [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2020, 40(9):1869-1878.
- [4]FU R, WANG Y, WANG Y, et al. The development of cortical microinfarcts is associated with intracranial atherosclerosis: data from the Chinese intracranial atherosclerosis study [J]. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2015, 24(11): 2447-2454.
- [5]王桂玲,程金莲,孙敬青. 金针王乐亭治疗中风病经验 [J]. 北京中医药, 2012, 31(1):23-25.
- [6]王少松,王麟鹏,马婷婷,等. 醒神开窍针刺法对脑梗死

- 急性期患者脑血管储备功能的影响[J]. 中医杂志, 2018, 59(15):1314-1317.
- [7] SHIH AY, HYACINTH HI, HARTMANN DA. Rodent models of cerebral microinfarct and microhemorrhage[J]. Stroke, 2018, 49(3):803-810.
- [8] WANG M, ILIFF JJ, LIAO Y, et al. Cognitive deficits and delayed neuronal loss in a mouse model of multiple microinfarcts[J]. J Neurosci, 2012, 32(50):17948-17960.
- [9] 中国针灸学会. 实验动物常用穴位名称与定位第 2 部分:大鼠[J]. 针刺研究, 2021, 46(4):351-352.
- [10] UEHARA H, YOSHIOKA H, KAWASE S, et al. A new model of white matter injury in neonatal rats with bilateral carotid artery occlusion[J]. Brain Res, 1999, 837(1/2): 213-220.
- [11] WANG S, YANG H, ZHANG J, et al. Efficacy and safety assessment of acupuncture and nimodipine to treat mild cognitive impairment after cerebral infarction: a randomized controlled trial[J]. BMC Complement Altern Med, 2016, 16(1):361.
- [12] ZHANG SH, LIU M, ASPLUND K, et al. Acupuncture for acute stroke[J]. Cochrane Database Syst Rev, 2005(2): CD003317. doi:10.1002/14651858.CD003317.pub2.
- [13] 刘德芳, 赵波, 吕云利, 等. 针刺治疗对脑梗死急性期患者血液循环、神经功能及日常生活能力的影响[J]. 现代中西医结合杂志, 2015, 24(28):3095-3097.
- [14] 杨丽, 袁秀丽. 刺络放血疗法机理探讨及研究进展[J]. 亚太传统医药, 2016, 12(2):67-69.
- [15] 金军, 岳颖, 屈超超, 等. 手十二井穴刺络放血对一氧化氮中毒昏迷小鼠促醒作用及其机制的初步研究[J]. 天津中医药, 2012, 29(1):62-64.
- [16] VALDIVIA AO, FARR V, BHATTACHARYA SK. A novel myelin basic protein transcript variant in the murine central nervous system[J]. Mol Bio Rep, 2019, 46(2):2547-2553.
- [17] 赵培园. NG2 在局灶性脑缺血大鼠脑内的免疫组织化学研究[D]. 昆明:昆明医科大学, 2011.
- [18] IADECOLA C. The neurovascular unit coming of age: a journey through neurovascular coupling in health and disease[J]. Neuron, 2017, 96(1):17-42.
- [19] O'HERRON P, CHHATBAR PY, LEVY M, et al. Neural correlates of single-vessel haemodynamic responses in vivo[J]. Nature, 2016, 534(7607):378-382.
- [20] YATA K, NISHIMURA Y, UNEKAWA M, et al. In Vivo imaging of the mouse neurovascular unit under chronic cerebral hypoperfusion[J]. Stroke, 2014, 45(12):3698-3703.
- [21] HILL RA, TONG L, YUAN P, et al. Regional blood flow in the normal and ischemic brain is controlled by arteriolar smooth muscle cell contractility and not by capillary pericytes[J]. Neuron, 2015, 87(1):95-110.
- [22] KANNURPATTI SS. Mitochondrial calcium homeostasis: implications for neurovascular and neurometabolic coupling[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2017, 37(2):381-395.
- [23] SWEENEY MD, KISLER K, MONTAGNE A, et al. The role of brain vasculature in neurodegenerative disorders[J]. Nat Neurosci, 2018, 21(10):1318-1331.

Effects of Bloodletting at “*Baihui* (DU 20)” and “*Sishencong* (EX-HN1)” on Cerebral Microinfarcts and Neurovascular Coupling in Intracranial Hypoperfusion Model Rats

FENG Qingyin, WANG Shaosong, WANG Xin, LI Qianqian, CUI Yingxue, ZHANG Wenxu, WANG Ziyi, CEN Panlin

Beijing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing, 100010

ABSTRACT Objective To investigate the effect and possible mechanism of bloodletting at *Baihui* (DU 20) and *Sishencong* (EX-HN1) on cognitive impairment caused by hypoperfusion. **Methods** Thirty SD rats were randomly divided into treatment group, model group and blank group with 10 rats in each group. Intracranial hypoperfusion rat model was established in the treatment group and the model group by bilateral common carotid artery ligation. One week after successful modeling, bloodletting treatment at *Baihui* (DU 20) and *Sishencong* (EX-HN1) was given to the rats in the treatment group, administered on every Monday, Wednesday and Friday for 4 weeks, 12 times in total. No intervention was performed in the model group and blank group. Morris water maze was used to evaluate the cognitive behavior changes of rats after 4-week intervention, including hidden platform experiment continuously for five days to record daily escape latency time, and space exploration experiment 24 h later to record the time in platform quadrant, number of platform crossings, and swimming distance in the platform quadrant. After water maze experiment, the brain tissues of the selected rats were sacrificed for HE staining to calculate the number of cerebral microinfarcts and observe the white matter injury (grading as 0, I and II). The protein expression of myelin basic protein (MBP),

neuronal nitric oxide synthase (nNOS), arachidonic acid (AA) and glial antigen 2 (NG2) were determined by immunohistochemistry. The serum NO content was detected by ELISA. **Results** Compared to that of the blank group, the latency time of escape in Morris water maze test was significantly prolonged in model group and treatment group ($P < 0.05$), and prolonged latency time was also found in the model group compared to treatment group ($P < 0.05$). There was no significant difference in the number of platform crossings and the swimming distance in the platform quadrant between groups ($P > 0.05$). The time in platform quadrant in the model group was shorter than that in the blank group ($P < 0.05$), and was also shortened compared to that of treatment group ($P < 0.05$). The number of cerebral microinfarcts in brain tissue increased, with mostly grade II damage of cerebral white matter, and the protein expression of MBP, NG2 and AA in the brain tissue and peripheral serum NO content increased in the model group than the blank group ($P < 0.05$). Compared to those in the model group, the damage degree of cerebral white matter was mainly at grade 0 and I, and the protein expression of MBP and NG2 in brain tissue and peripheral serum NO content decreased, while the expression of AA protein increased in the treatment group ($P < 0.05$). The number of cerebral microinfarcts showed a decreasing trend in the treatment group compared to the model group, but there was no statistical difference ($P > 0.05$). **Conclusion** Bloodletting at *Baihui* (DU 20) and *Sishencong* (EX-HN1) can improve the cognitive function of intracranial hypoperfusion model rats and alleviate the damage degree of cerebral white matter, and its mechanism may be related to the regulation of neurovascular coupling pathway mediated by cortical neurons.

Keywords cerebral microinfarcts; intracranial hypoperfusion; cognitive impairment; neurovascular coupling; bloodletting; *Baihui* (DU 20); *Sishencong* (EX-HN1)

(收稿日期: 2022-02-22; 修回日期: 2022-03-31)

[编辑: 焦 爽]

读者·作者·编者

《中医杂志》论文中关于伦理审查与利益冲突的规定

1 伦理审查

依据中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会公布的《涉及人的生物医学研究伦理审查办法》，报告涉及人的生物医学研究时，需说明所采用的试验程序是否经过国家的或所在机构设立的伦理审查委员会的评估与批准，并注明批准文号。涉及人的生物医学研究包括以下活动：1) 采用现代物理学、化学、生物学、中医药学和心理学等方法对人的生理、心理行为、病理现象、疾病病因和发病机制，以及疾病的预防、诊断、治疗和康复进行研究的；2) 医学新技术或者医疗新产品在人体上进行试验研究的；3) 采用流行病学、社会学、心理学等方法收集、记录、使用、报告或者储存有关人的样本、医疗记录、行为等科学研究资料的活动。

如果所在机构没有正式的伦理委员会，作者需说明研究是否符合世界卫生组织《涉及人的生物医学研究国际伦理准则》和世界医学协会最新修订的《赫尔辛基宣言》的相关规定。临床研究报告应说明受试者保护情况。在没有获得知情同意的情况下，可辨认身份的信息，包括患者姓名和其首字母缩写，或住院号，都不应在书面描述、照片或遗传谱系中公开，以保护患者的隐私权。研究对象为实验动物时，应说明是否经过相关伦理委员会审查，并注明批准文号，或说明是否遵循了国家或机构的有关实验动物管理和使用的规定。

2 利益冲突

作者投稿时需告知与该研究有关的潜在利益冲突，说明可能导致其研究结果和论文撰写产生偏倚的经济关系和私人关系，并对所提供的利益冲突公开声明的真实性负责。同行审稿专家应向编辑部公开任何可能使其对稿件评价产生偏倚的利益冲突，必要时应主动回避对稿件的审阅。

(本刊编辑部)