

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2023.11.014

# 交叉电项针对脑出血延髓损伤模型豚鼠延髓组织 cAMP-PKA 通路的影响

贾坤平<sup>1,2</sup>, 梁群<sup>3</sup>, 刘关平<sup>1,2</sup>, 蔡国锋<sup>2</sup>, 吴建丽<sup>✉</sup>

1. 黑龙江中医药大学, 黑龙江省哈尔滨市香坊区和平路 24 号, 150040; 2. 黑龙江中医药大学附属第二医院哈南分院; 3. 黑龙江中医药大学附属第一医院

**[摘要]** **目的** 探讨交叉电项针对脑出血延髓损伤豚鼠神经功能的影响及可能作用机制。**方法** 240 只豚鼠随机分为空白组、模型组、针刺组、交叉电项针组和电项针组, 每组又分为干预 1、3、7、14 天 4 个时间点, 每个时间点各 12 只。除空白组外, 其余各组豚鼠采用自体血注入法制备脑出血延髓损伤模型。造模 12 h 后开始干预, 针刺组豚鼠选取双侧“风池”“翳风”针刺, 每次 20 min, 每日 1 次。交叉电项针组豚鼠以电针仪电极在项部交叉连接双侧“风池”“翳风”, 电项针组豚鼠电针电极不交叉连接双侧“风池”“翳风”, 均每次 20 min, 每日 1 次。空白组、模型组豚鼠给予同样的抓取固定, 但不干预。分别于干预 1、3、7、14 天采用改良神经功能缺损量表 (mNSS) 评定豚鼠神经功能缺损程度; 各时间点取豚鼠延髓组织免疫组织化学法检测突触生长相关蛋白 43 (GAP-43)、突触素 (SYN) 阳性表达, ELISA 法检测环磷酸腺苷 (cAMP)、蛋白激酶 A (PKA) 含量, Western blot 法检测 cAMP 蛋白及磷酸化环磷酸腺苷反应元件结合蛋白 (p-CREB) 表达。**结果** 空白组豚鼠无神经损伤。与空白组同时间比较, 其余各组豚鼠在各时间点 mNSS 评分均显著增加 ( $P < 0.01$ ); 与模型组同时间比较, 针刺组、电项针组和交叉电项针组豚鼠在干预 3、7、14 天 mNSS 评分均有不同程度降低 ( $P < 0.01$ ), 各干预组间各时间点比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。与空白组同时间比较, 模型组豚鼠延髓组织各时间点 GAP-43 阳性表达升高, SYN 阳性表达降低, cAMP、PKA 含量及 cAMP、p-CREB 蛋白表达均降低 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。与模型组同时间比较, 各干预组在干预 3、7、14 天 GAP-43、SYN 阳性表达, cAMP、PKA 含量及 cAMP、p-CREB 蛋白表达均升高 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 且交叉电项针组在干预 7、14 天时各指标改善优于针刺组和电项针组 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。**结论** 交叉电项针可改善脑卒中延髓损伤豚鼠神经功能缺损情况, 其机制可能与激活延髓组织 cAMP-PKA 通路从而改善延髓突触可塑性有关。

**[关键词]** 脑出血; 延髓损伤; 交叉电项针; 突触可塑性; cAMP-PKA 通路

发生在两侧大脑半球的脑出血可引起延髓孤束核、疑核等组织的损伤, 继而引发吞咽困难、营养不良、卒中相关肺炎或其他并发症, 严重影响患者康复及预后, 延长患者治疗周期, 增加治疗费用<sup>[1-2]</sup>。延髓作为重要的生命中枢, 参与各种躯体性、内脏性感觉的调节, 对呼吸、心跳、血压、胃肠活动、内分泌以及免疫反应等均有影响, 是重要

的应激反应调控中枢。因此, 采取积极有效的措施治疗延髓损伤对于卒中患者的康复具有重要意义。交叉电项针即予双侧翳风、风池交叉连接电针正负极, 是黑龙江中医药大学附属第二医院常用的一种治疗手段, 在临床中对改善卒中合并延髓麻痹患者吞咽功能<sup>[3-4]</sup>、重症卒中气管切开插管患者咳嗽功能<sup>[5]</sup>及呼吸机辅助通气患者通气功能辅助撤机<sup>[6]</sup>、意识障碍恢复<sup>[7]</sup>均具有良好效果, 且疗效优于常规电项针和普通针刺。前期基础研究<sup>[8]</sup>结果表明, 交叉电项针可改善卒中豚鼠咳嗽功能和神经功能缺

**基金项目:**国家自然科学基金(82105030);教育部“春晖计划”合作科研项目(HLJ2019031);黑龙江中医药大学科研基金(2019MS19)

✉ 通讯作者:wujianli2017@163.com

损程度,改善延髓神经细胞形态和突触超微结构,促进延髓突触重塑。环磷酸腺苷(cAMP)-蛋白激酶A(PKA)通路是调节突触可塑性的经典通路<sup>[9]</sup>。基于此,本研究选择不同时间点连续观察脑卒中豚鼠神经功能缺损程度,从cAMP-PKA通路角度探讨交叉电项针治疗脑卒中延髓损伤的可能作用机制。本实验由黑龙江中医药大学医学与实验动物伦理委员会审核通过(批号:2021111101)。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物

健康 SPF 级雄性白色豚鼠 240 只,体质量(300±15)g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,实验动物生产许可证号:SCXK(京)2016-006。实验动物饲养于黑龙江中医药大学实验动物中心,室温(20±2)℃,湿度 45%,12 h 明暗交替同室、分笼饲养,自由进食水。

### 1.2 主要试剂和仪器

戊巴比妥钠(批号:P3761,美国 Sigma 公司);兔抗多克隆突触生长相关蛋白 43(GAP-43)一抗(货号:BA0878)、兔抗多克隆突触素(SYN)一抗(货号:BA3623)、蛋白激酶 A 催化亚基(PKAc)一抗(货号:A00653)、磷酸化环磷酸腺苷反应元件结合蛋白(p-CREB)一抗(货号:P00577),武汉博士德生物工程有限公司;二抗(货号:PV6001,北京博奥森生物技术有限公司);DAB 显色试剂盒(货号:K135925C,北京中杉生物技术有限公司);cAMP ELISA 检测试剂盒(批号:H164)、PKA ELISA 检测试剂盒(批号:H233-1),南京建成生物技术有限公司;RIPA 蛋白抽提试剂(货号:P0013B)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(货号:P0012),上海碧云天生物技术有限公司。

脑立体定位仪(型号:68025)、微型手持式颅钻(型号:78001),深圳市瑞沃德生命科技有限公司;微量注射器(50 μl,上海高鸽工贸有限公司);脉冲针灸治疗仪(常州英迪电子医疗器械有限公司,型号:KWD-808 II);无菌针灸针(北京中研太和医疗器械有限公司,0.25 mm×13 mm);光学显微镜(日本 Olympus 公司,型号:Scipu001158);石蜡切片机(德国 Leitz Welzlar,型号:RM2235);酶标仪(北京普朗新技术有限公司,型号:DNM-9602);电泳仪(北京六一仪器厂,型号:DYY-7C);台式离心机(上海安亭科学仪器厂,型号:TGL-16G)。

### 1.3 豚鼠脑出血延髓损伤模型的建立

参照课题组前期实验以自体血注入法复制豚鼠脑出血延髓损伤模型<sup>[8]</sup>,将各组豚鼠用 2% 戊巴比妥钠(40 mg/kg)腹腔注射麻醉,先仰卧固定,于股三角区切开皮肤暴露股动脉,止血钳夹闭远心端,以采血针采集未肝素化的股动脉血备用。局部皮肤缝合后,将豚鼠俯卧位固定于立体定位仪上,局部消毒,头部正中切开头皮,暴露颅骨。根据《豚鼠脑立体定位图谱》<sup>[10]</sup>及课题组前期实验<sup>[8]</sup>对该造模部位切片的对照观察,以前囟为坐标原点,向左 4.0 mm、前 0.3 mm,确定注射点坐标,深度 5.0 mm 即基底节区,钻一直径为 1 mm 的小孔,立体定向穿刺后,用微量注射器向左侧基底节内,将未肝素化的自体股动脉血 50 μl,以 20 μl/min 速度推进基底节区,留针 10 min,缓慢出针。术后用牙科水泥封闭颅骨伤口,缝合头皮,局部皮肤采用碘伏消毒。将豚鼠保温至苏醒后分笼饲养,术后 6 h 再恢复进食。神经功能缺损评价标准 Longa 评分法<sup>[11]</sup>≥1 分为造模成功。造模未成功或死亡随时补充。

### 1.4 分组及干预方法

豚鼠适应性饲养 1 周后,采用随机数字表法分成空白组、模型组、针刺组、交叉电项针组和电项针组,每组 48 只;每组又分为干预 1、3、7、14 天四个时间点,每个时间点各 12 只豚鼠。除空白组外,其余各组豚鼠建立脑出血延髓损伤模型,造模 12 h 后开始干预。针刺组:取穴参照《豚鼠针灸穴位图谱的研制》<sup>[12]</sup>定位,选取双侧“风池”“翳风”,针刺操作均由同一人完成。常规消毒,毫针直刺,进针深度 5 mm,平补平泻捻转行针,隔 10 min 捻转 1 次,每次 30 s,共捻转 2 次,留针 20 min,每日 1 次,按相应时间点分组进行干预。交叉电项针组:以电针仪电极在项部交叉连接,双侧“风池”“翳风”均连接电针,即一根导线连接左侧“翳风”和右侧“风池”,另一个导线连接左侧“风池”和右侧“翳风”,正极连接“翳风”,负极连接对侧“风池”,连续波,脉冲宽度(0.50±0.15)ms,脉冲重复频率 2 Hz,强度 0.5 mA,每次 20 min,每日 1 次,按相应时间点分组进行干预。电项针组:电针电极不交叉,双侧“风池”“翳风”均连接电针,即一根导线连接左侧“翳风”和左侧“风池”,另一个导线连接右侧“风池”和右侧“翳风”,正极连接“翳风”,负极连接同侧“风池”,电针参数设置及干预时长同交叉电项针组。空白

组、模型组豚鼠给予同样的抓取、固定，但不进行针刺。

1.5 观察指标及方法

1.5.1 神经功能缺损评分 分别于干预1、3、7、14天采用改良神经功能缺损评分（mNSS）<sup>[13]</sup> 评估豚鼠神经功能，分别从感觉、运动、反射、平衡4方面对神经功能进行综合评估。总分0~18分，0分为正常，评分越高代表神经功能损伤越严重。

1.5.2 免疫组织化学法检测损伤延髓组织 GAP-43 和 SYN 阳性表达 分别于干预1、3、7、14天各组采用随机数字表法选取6只豚鼠进行神经功能缺损评分后迅速心脏灌注固定取脑，留取延髓组织约6 mm×5 mm×3 mm，取4 mm×2 mm×3 mm置于4%多聚甲醛以备石蜡包埋切片，用10%缓冲甲醛室温下固定，梯度酒精脱水，优质石蜡浸润包埋切出5 μm的切片，后常规脱蜡到水，孵育，PBS冲洗修复，滴加一抗（1：200）、二抗（1：200）孵育，PBS冲洗，DAB显色，苏木素复染，常规脱水透明，中性树胶封片，×400光学显微镜下观察。采用Image-pro plus 6.0病理图像分析系统对阳性表达进行定量分析，以积分光密度（IOD）代表蛋白相对表达量，IOD=阳性面积×平均光密度。

1.5.3 ELISA 法检测损伤延髓组织 PKA、cAMP 含量 在干预1、3、7、14天将1.5.2切取剩余延髓组织样本研磨匀浆，加入9倍体积的生理盐水，制备成10%组织匀浆后4℃、3000 r/min离心20 min（离心半径13.5 cm）取上清备用，参照ELISA试剂盒说明书步骤检测，用酶标仪在450 nm波长处测定各孔OD值；以OD值为纵坐标，标准品浓度为横坐标，得到相应曲线换算出相应的浓度。

1.5.4 Western blot 法检测损伤延髓组织 PKAc、p-CREB 蛋白表达 分别于干预1、3、7、14天选取余下的6只豚鼠延髓组织样本，配制含抑制剂的RIPA蛋白抽提试剂进行蛋白抽提，根据BCA法蛋

白浓度测定试剂盒使用说明进行蛋白定量，SDS-PAGE凝胶电泳转印至PVDF膜，将膜置于用一抗稀释液分别稀释的相应目的蛋白一抗工作液中，4℃孵育过夜（β-actin 1：1000，PKAc 1：1000，p-CREB 1：1000），洗膜3次，将膜置于二抗（1：10000）稀释液，分别稀释对应一抗的荧光标记二抗，室温孵育，洗膜。按照Odyssey红外荧光扫描成像系统操作说明进行扫描。用Gel-Pro-Analyzer 4.0软件对各条带灰度值进行分析，以目的条带灰度值/内参β-actin灰度值表示目的蛋白相对表达水平。

1.6 统计学方法

采用SPSS 20.0统计软件进行数据处理。本研究计量资料均符合正态分布且满足方差齐性，以均数±标准差（ $\bar{x}\pm s$ ）表示，采用单因素方差分析，组间两两比较采用最小显著差异法（LSD）。以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组豚鼠不同时间点 mNSS 评分比较

表1示，空白组豚鼠mNSS评分为0分，无神经损伤。与空白组同时间比较，其余各组豚鼠在各时间点mNSS评分均显著升高（ $P<0.01$ ）。与模型组同时间比较，针刺组、电项针组和交叉电项针组豚鼠在干预1天mNSS评分差异无统计学意义（ $P>0.05$ ），在干预3、7、14天mNSS评分均有不同程度降低（ $P<0.01$ ）。各干预组间各时间点比较差异无统计学意义（ $P>0.05$ ）。

2.2 各组豚鼠不同时间点延髓组织 GAP-43 阳性表达比较

免疫组织化学法检测示，各组豚鼠损伤延髓组织GAP-43阳性细胞呈黄棕色。空白组可见GAP-43浅淡阳性表达。干预1、3、7天，除空白组外其余各组可见GAP-43阳性细胞数逐渐增多，颜色逐渐加深。干预14天，模型组GAP-43阳性细胞数较前

表1 各组豚鼠不同时间 mNSS 评分比较

Table 1 Comparison of mNSS score of guinea pigs in each group at different timepoints (分,  $\bar{x}\pm s$ )

| 组别     | 鼠数 | 1天                       | 3天                         | 7天                         | 14天                        |
|--------|----|--------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 空白组    | 12 | 0                        | 0                          | 0                          | 0                          |
| 模型组    | 12 | 10.75±1.67 <sup>a)</sup> | 12.12±2.10 <sup>a)</sup>   | 7.38±1.92 <sup>a)</sup>    | 4.12±1.13 <sup>a)</sup>    |
| 针刺组    | 12 | 10.00±2.27 <sup>a)</sup> | 7.38±2.00 <sup>a) b)</sup> | 5.25±1.58 <sup>a) b)</sup> | 1.88±0.84 <sup>a) b)</sup> |
| 电项针组   | 12 | 10.12±1.55 <sup>a)</sup> | 7.12±1.81 <sup>a) b)</sup> | 4.88±1.64 <sup>a) b)</sup> | 1.88±0.84 <sup>a) b)</sup> |
| 交叉电项针组 | 12 | 10.25±1.75 <sup>a)</sup> | 7.38±1.85 <sup>a) b)</sup> | 4.50±1.20 <sup>a) b)</sup> | 1.75±0.71 <sup>a) b)</sup> |

注：mNSS，改良神经功能缺损评分。

a) 与空白组同时间比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组同时间比较， $P<0.01$ 。

减少, 颜色变浅; 针刺组和电项针组较前无明显变化; 交叉电项针组 GAP-43 阳性细胞数仍较前增多, 颜色变深。

表 2 示, 与空白组同时间比较, 其余各组各时间点 GAP-43 阳性表达 IOD 值均升高 ( $P<0.05$ )。与模型组同时间比较, 各干预组在干预 1 天 GAP-43 阳性表达 IOD 值比较差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ), 在干预 3、7、14 天均升高 ( $P<0.05$ )。与针刺组同时间比较, 交叉电项针组和电项针组在干预 7、14 天 GAP-43 阳性表达 IOD 值均升高 ( $P<0.05$ )。与电项针组同时间比较, 交叉电项针组在干预 7、14 天 GAP-43 阳性表达 IOD 值均升高 ( $P<0.05$ )。

### 2.3 各组豚鼠不同时间延髓组织 SYN 阳性表达比较

免疫组织化学法检测示, 各组豚鼠损伤延髓组织 SYN 阳性细胞呈黄棕色。空白组可见 SYN 强阳性表达。干预 3 天, 模型组 SYN 阳性细胞数稍有减少, 颜色稍变浅, 针刺组、交叉电项针组和电项针组变化不明显。干预 7、14 天, 模型组、针刺组、电项针组和交叉电项针组 SYN 阳性细胞数逐渐增多, 颜色逐渐加深。表 3 示, 与空白组同时间比较, 模型组和针刺组在各时间点 SYN 阳性表达 IOD

值均降低, 电项针组和交叉电项针组在干预 1、3、7 天 SYN 阳性表达 IOD 值均降低 ( $P<0.01$ )。与模型组同时间比较, 各干预组在干预 3、7、14 天 SYN 阳性表达 IOD 值均升高 ( $P<0.05$ )。与针刺组同时间比较, 交叉电项针组在干预 7、14 天和电项针组在干预 14 天 SYN 阳性表达 IOD 值升高 ( $P<0.05$ )。与电项针组比较, 交叉电项针组在干预 7、14 天 SYN 阳性表达 IOD 值升高 ( $P<0.05$ )。

### 2.4 各组豚鼠不同时间延髓组织 cAMP、PKA 含量比较

表 4、表 5 示, 与空白组同时间比较, 其余各组各时间点延髓组织 cAMP、PKA 含量均降低 ( $P<0.05$ )。与模型组同时间比较, 各干预组在干预 3、7、14 天延髓组织 cAMP、PKA 含量均升高 ( $P<0.05$ )。与针刺组同时间比较, 电针组在干预 14 天和交叉电项针组在干预 7、14 天延髓组织 cAMP、PKA 含量升高 ( $P<0.05$ )。与电项针组同时间比较, 交叉电项针组在干预 7、14 天延髓组织 cAMP、PKA 含量升高 ( $P<0.05$ )。

### 2.5 各组豚鼠不同时间延髓组织 PKAc、p-CREB 蛋白表达比较

表 6、表 7 示, 与空白组同时间比较, 其余各

表 2 各组豚鼠不同时间延髓组织 GAP-43 蛋白阳性表达比较

Table 2 Comparison of GAP-43 protein positive expression in medullary tissue of guinea pigs in each group at different timepoints (IOD 值,  $\bar{x}\pm s$ )

| 组别     | 鼠数 | 1 天                          | 3 天                             | 7 天                                   | 14 天                                  |
|--------|----|------------------------------|---------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| 空白组    | 6  | 1225.94±146.71               | 1342.69±139.73                  | 1394.45±155.37                        | 1312.34±177.82                        |
| 模型组    | 6  | 1516.24±195.67 <sup>a)</sup> | 1829.77±206.49 <sup>a)</sup>    | 2146.97±270.38 <sup>a)</sup>          | 1808.49±257.67 <sup>a)</sup>          |
| 针刺组    | 6  | 1603.26±201.61 <sup>a)</sup> | 2124.38±242.51 <sup>a) b)</sup> | 2570.90±307.16 <sup>a) b)</sup>       | 2418.21±299.81 <sup>a) b)</sup>       |
| 电项针组   | 6  | 1612.08±232.90 <sup>a)</sup> | 2150.03±227.10 <sup>a) b)</sup> | 2962.54±286.13 <sup>a) b) c)</sup>    | 2789.33±291.84 <sup>a) b) c)</sup>    |
| 交叉电项针组 | 6  | 1631.53±181.61 <sup>a)</sup> | 2256.43±232.03 <sup>a) b)</sup> | 3339.50±399.18 <sup>a) b) c) d)</sup> | 3806.77±431.52 <sup>a) b) c) d)</sup> |

注: GAP-43, 突触生长相关蛋白 43。

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) 与针刺组同时间比较,  $P<0.05$ ; d) 与电项针组同时间比较,  $P<0.05$ 。

表 3 各组豚鼠不同时间点延髓组织 SYN 蛋白阳性表达比较

Table 3 Comparison of SYN protein positive expression in medullary tissue of guinea pigs in each group at different timepoints (IOD 值,  $\bar{x}\pm s$ )

| 组别     | 鼠数 | 1 天                          | 3 天                             | 7 天                                   | 14 天                               |
|--------|----|------------------------------|---------------------------------|---------------------------------------|------------------------------------|
| 空白组    | 6  | 2931.13±403.99               | 2902.95±377.61                  | 3168.13±315.79                        | 3187.75±331.75                     |
| 模型组    | 6  | 2008.50±239.98 <sup>a)</sup> | 1493.57±262.09 <sup>a)</sup>    | 1800.04±262.23 <sup>a)</sup>          | 2152.34±224.22 <sup>a)</sup>       |
| 针刺组    | 6  | 2076.39±227.62 <sup>a)</sup> | 1919.35±245.77 <sup>a) b)</sup> | 2223.33±240.21 <sup>a) b)</sup>       | 2571.24±273.27 <sup>a) b)</sup>    |
| 电项针组   | 6  | 2097.39±254.29 <sup>a)</sup> | 1904.47±243.62 <sup>a) b)</sup> | 2237.95±245.03 <sup>a) b)</sup>       | 2979.96±331.73 <sup>b) c)</sup>    |
| 交叉电项针组 | 6  | 2105.58±217.66 <sup>a)</sup> | 2002.50±260.26 <sup>a) b)</sup> | 2602.15±295.46 <sup>a) b) c) d)</sup> | 3395.32±435.27 <sup>b) c) d)</sup> |

注: SYN, 突触素。

a) 与空白组同时间比较,  $P<0.01$ ; b) 与模型组同时间比较,  $P<0.05$ ; c) 与针刺组同时间比较,  $P<0.05$ ; d) 与电项针组同时间比较,  $P<0.05$ 。

表 4 各组豚鼠不同时间延髓组织 cAMP 含量比较

Table 4 Comparison of cAMP content in medullary tissue of guinea pigs in each group at different timepoints (nmol/L,  $\bar{x}\pm s$ )

| 组别     | 鼠数 | 1 天                      | 3 天                         | 7 天                                | 14 天                                |
|--------|----|--------------------------|-----------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|
| 空白组    | 6  | 129.17±13.07             | 131.81±13.86                | 127.26±12.97                       | 136.58±15.46                        |
| 模型组    | 6  | 57.66±7.18 <sup>a)</sup> | 38.27±5.33 <sup>a)</sup>    | 56.51±8.27 <sup>a)</sup>           | 55.80±9.58 <sup>a)</sup>            |
| 针刺组    | 6  | 58.86±6.70 <sup>a)</sup> | 49.08±5.82 <sup>a) b)</sup> | 71.54±10.59 <sup>a) b)</sup>       | 85.58±12.98 <sup>a) b)</sup>        |
| 电项针组   | 6  | 59.35±6.27 <sup>a)</sup> | 50.16±7.12 <sup>a) b)</sup> | 71.58±10.04 <sup>a) b)</sup>       | 103.87±13.62 <sup>a) b) c)</sup>    |
| 交叉电项针组 | 6  | 60.68±6.62 <sup>a)</sup> | 49.42±6.09 <sup>a) b)</sup> | 85.41±10.81 <sup>a) b) c) d)</sup> | 120.56±14.28 <sup>a) b) c) d)</sup> |

注: cAMP, 环磷酸腺苷。  
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) 与针刺组同时间比较,  $P<0.05$ ; d) 与电项针组同时间比较,  $P<0.05$ 。

表 5 各组豚鼠不同时间延髓组织 PKA 含量比较

Table 5 Comparison of PKA content in medullary tissue of guinea pigs in each group at different timepoints (ng/L,  $\bar{x}\pm s$ )

| 组别     | 鼠数 | 1 天                        | 3 天                           | 7 天                                 | 14 天                                |
|--------|----|----------------------------|-------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| 空白组    | 6  | 226.96±26.59               | 226.39±30.23                  | 230.22±27.47                        | 240.87±27.04                        |
| 模型组    | 6  | 120.51±13.97 <sup>a)</sup> | 85.92±14.58 <sup>a)</sup>     | 110.51±13.59 <sup>a)</sup>          | 126.79±14.89 <sup>a)</sup>          |
| 针刺组    | 6  | 119.36±14.24 <sup>a)</sup> | 110.77±18.52 <sup>a) b)</sup> | 134.79±16.69 <sup>a) b)</sup>       | 161.77±17.83 <sup>a) b)</sup>       |
| 电项针组   | 6  | 122.10±13.76 <sup>a)</sup> | 117.35±17.02 <sup>a) b)</sup> | 146.15±14.79 <sup>a) b)</sup>       | 188.86±20.70 <sup>a) b) c)</sup>    |
| 交叉电项针组 | 6  | 122.64±13.62 <sup>a)</sup> | 115.81±17.48 <sup>a) b)</sup> | 170.60±23.55 <sup>a) b) c) d)</sup> | 214.95±25.43 <sup>a) b) c) d)</sup> |

注: PKA, 蛋白激酶 A。  
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) 与针刺组同时间比较,  $P<0.05$ ; d) 与电项针组同时间比较,  $P<0.05$ 。

表 6 各组豚鼠不同时间延髓组织 PKAc 蛋白表达比较

Table 6 Comparison of PKAc protein expression in medullary tissue of guinea pigs in each group at different timepoints ( $1/\beta$ -actin,  $\bar{x}\pm s$ )

| 组别     | 鼠数 | 1 天                     | 3 天                        | 7 天                              | 14 天                             |
|--------|----|-------------------------|----------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| 空白组    | 6  | 1.02±0.01               | 1.02±0.01                  | 1.01±0.02                        | 1.01±0.02                        |
| 模型组    | 6  | 0.37±0.03 <sup>a)</sup> | 0.32±0.02 <sup>a)</sup>    | 0.40±0.01 <sup>a)</sup>          | 0.42±0.01 <sup>a)</sup>          |
| 针刺组    | 6  | 0.37±0.02 <sup>a)</sup> | 0.38±0.02 <sup>a) b)</sup> | 0.56±0.02 <sup>a) b)</sup>       | 0.67±0.03 <sup>a) b)</sup>       |
| 电项针组   | 6  | 0.40±0.02 <sup>a)</sup> | 0.40±0.01 <sup>a) b)</sup> | 0.53±0.03 <sup>a) b)</sup>       | 0.74±0.04 <sup>a) b) c)</sup>    |
| 交叉电项针组 | 6  | 0.40±0.01 <sup>a)</sup> | 0.41±0.02 <sup>a) b)</sup> | 0.72±0.02 <sup>a) b) c) d)</sup> | 0.87±0.05 <sup>a) b) c) d)</sup> |

注: PKAc, 蛋白激酶 A 催化亚基。  
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) 与针刺组同时间比较,  $P<0.05$ ; d) 与电项针组同时间比较,  $P<0.05$ 。

表 7 各组豚鼠不同时间延髓组织 p-CREB 蛋白表达比较

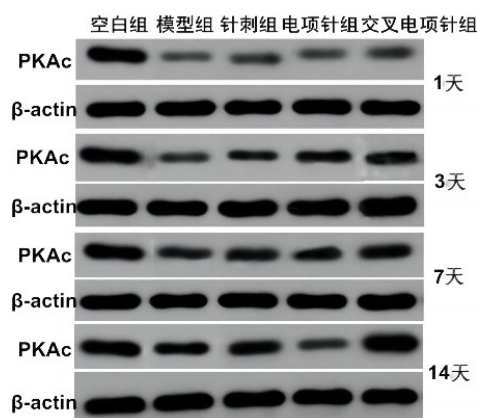
Table 7 Comparison of p-CREB protein expression in medullary tissue of guinea pigs in each group at different timepoints ( $1/\beta$ -actin,  $\bar{x}\pm s$ )

| 组别     | 鼠数 | 1 天                     | 3 天                        | 7 天                              | 14 天                             |
|--------|----|-------------------------|----------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| 空白组    | 6  | 1.02±0.05               | 1.01±0.05                  | 1.02±0.04                        | 1.02±0.07                        |
| 模型组    | 6  | 0.33±0.02 <sup>a)</sup> | 0.24±0.04 <sup>a)</sup>    | 0.39±0.04 <sup>a)</sup>          | 0.36±0.06 <sup>a)</sup>          |
| 针刺组    | 6  | 0.35±0.02 <sup>a)</sup> | 0.36±0.03 <sup>a) b)</sup> | 0.48±0.05 <sup>a) b)</sup>       | 0.58±0.06 <sup>a) b)</sup>       |
| 电项针组   | 6  | 0.36±0.01 <sup>a)</sup> | 0.35±0.03 <sup>a) b)</sup> | 0.54±0.05 <sup>a) b)</sup>       | 0.74±0.04 <sup>a) b) c)</sup>    |
| 交叉电项针组 | 6  | 0.37±0.02 <sup>a)</sup> | 0.35±0.02 <sup>a) b)</sup> | 0.72±0.06 <sup>a) b) c) d)</sup> | 0.88±0.10 <sup>a) b) c) d)</sup> |

注: p-CREB, 磷酸化环磷酸腺苷反应元件结合蛋白。  
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) 与针刺组同时间比较,  $P<0.05$ ; d) 与电项针组同时间比较,  $P<0.05$ 。

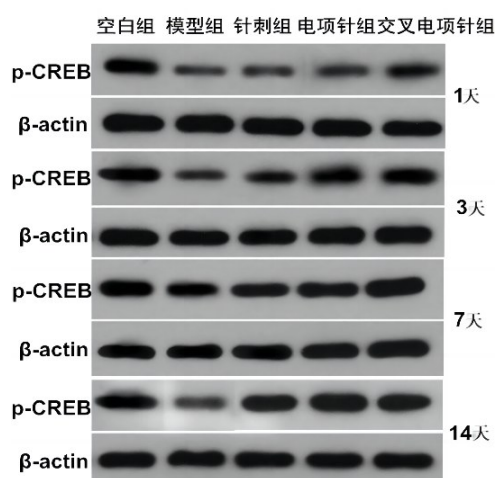
组豚鼠各时间点延髓组织 PKAc、p-CREB 表达均降低 ( $P<0.05$ )。与模型组同时间比较, 各干预组在干预 3、7、14 天延髓组织 PKAc、p-CREB 表达均升高 ( $P<0.05$  或  $P<0.01$ )。与针刺组同时间比较, 电项针组在干预 14 天和交叉电项针组在干预 7、14 天延髓组织 PKAc、p-CREB 表达均升高 ( $P<$

0.05)。与电项针组同时间比较,交叉电项针组在干预7、14天延髓组织PKAc、p-CREB表达均升高( $P<0.01$ )。各组豚鼠不同时间延髓组织PKAc、p-CREB蛋白表达电泳图见图1、图2。



注: PKAc, 蛋白激酶A催化亚基。

图1 各组豚鼠不同时间延髓组织PKAc蛋白表达电泳图  
Figure 1 Protein electrophoresis of PKAc in the medullary tissue of guinea pigs in each group at different timepoints



注: p-CREB, 磷酸化环磷酸腺苷反应元件结合蛋白。

图2 各组豚鼠不同时间损伤延髓组织p-CREB蛋白电泳图  
Figure 2 Protein electrophoresis of p-CREB in the injured medullary tissue of guinea pigs in each group at different timepoints

### 3 讨论

脑出血属于中医学“中风病”范畴,而风池、翳风穴是临床治疗中风病的经验要穴<sup>[14]</sup>。风池穴为足少阳胆经穴,具有祛风通络利咽之效,《类经图翼》提及风池穴治中风不语及不得食。翳风穴是手少阳三焦经穴,《针灸甲乙经》云:“瘖, (暗)不能言, 翳风主之”,《针灸资生经》曰:“暴暗不能言, 翳风、通里”。局部深刺翳风穴可促进受损神经反射弧的恢复,激发大脑的代偿功能,促进神

经功能恢复<sup>[14]</sup>。我们团队在临床治疗中发现,将风池和翳风穴交叉连接电针,即交叉电项针治疗延髓麻痹、脑干出血等均具有显著疗效<sup>[3,5]</sup>,且前期动物实验研究显示交叉电项针具有脑保护作用<sup>[15]</sup>。本研究表明,针刺组、电项针组和交叉电项针组豚鼠在干预3、7、14天mNSS评分均较同时间点模型组不同程度降低,但各干预组间不同时间点比较差异无统计学意义,说明3种干预方法均可改善脑出血延髓损伤豚鼠神经功能,但组间比较并未显示出统计学意义,分析可能与本研究样本量较少或干预时间较短有关,需进一步研究证实。

GAP-43在突触可塑性诱导中发挥着核心作用<sup>[16]</sup>。研究表明,针灸可通过调控其合成和分泌以发挥神经保护作用<sup>[17]</sup>。本研究结果表明,模型组各时间点的GAP-43蛋白表达均较空白组增强,说明脑出血后中枢神经轴突在术后1天已经开始进行自我修复再生,这与Crestini等<sup>[18]</sup>的研究结果相一致。针刺组、交叉电项针组和电项针组在干预3天起各时间点GAP-43蛋白表达均较模型组同时点明显升高,其中交叉电项针组在干预7、14天升高更明显,提示交叉电项针可以增强GAP-43蛋白的表达。交叉电项针组GAP-43蛋白表达在干预14天仍有所升高,提示交叉电项针有利于GAP-43蛋白的持续表达,至于持续的时间以及是否达到峰值、何时下降回归正常值,尚需后续试验进一步验证。

SYN被广泛认为是突触密度的标志,是参与突触结构可塑性的主要蛋白<sup>[19]</sup>。本研究结果表明,模型组SYN表达在干预1天下降,3天降至最低,说明在脑出血急性期突触发生损害,这与3天时神经功能缺损症状最严重相一致,体现了功能与体征的一致性。各干预组在干预3天开始SYN表达升高且有统计学意义,且交叉电项针方法优于其他两种方法。干预14天,交叉电项针组和电项针组SYN表达与正常组差异无统计学意义,说明其水平趋于正常;且交叉电项针仍优于电项针,说明在促进SYN表达方面,交叉电项针疗效更优。

有研究<sup>[20-21]</sup>证实,cAMP-PKA信号通路作为神经系统重要的调节机制之一,在调节神经元存活和轴突生长方面起重要的作用。CREB是PKA的一个下游靶点,通过自磷酸化调节转录,参与突触可塑性形成<sup>[22-23]</sup>。PKA由两个调节亚基(PKAr)和两个催化亚基(PKAc)构成,当PKAr与cAMP结合后,会进一步释放PKAc,促进CREB磷酸化<sup>[24]</sup>。本研究结果表明,除空白组外,其余各组豚鼠延髓组织

干预1天时出现cAMP、PKA含量和PKAc、p-CREB蛋白表达的下降,提示脑出血后cAMP-PKA信号通路活性降低。各干预组在干预3天开始激活cAMP-PKA信号通路,7、14天作用更强,且交叉电项针作用最显著,提示交叉电项针可能是通过激活cAMP-PKA信号通路改善延髓突触可塑性,发挥脑保护作用。

综上,交叉电项针可改善脑出血延髓损伤豚鼠神经功能缺损情况,其作用可能是通过激活延髓组织cAMP-PKA信号通路从而改善突触可塑性实现的。本实验过程中未加入cAMP-PKA信号通路抑制剂进行对照观察,考虑到实验动物已接受股动脉采血及钻颅注血两项有创性操作,若再予抑制剂组侧脑室注入可能会增加实验动物的死亡风险,故后期可在把握交叉电项针对于脑出血cAMP-PKA信号通路表达的趋势后进行抑制剂组的观察,进一步探讨交叉电项针对该信号通路的影响。

## 参考文献

- [1]王陇德,彭斌,张鸿祺,等.《中国脑卒中防治报告2020》概要[J]. 中国脑血管病杂志,2022,19(2):136-144.
- [2]李傲,朱素英,陈梦飞,等. 高血压脑出血患者流行病学及临床特征分析[J]. 中华脑科疾病与康复杂志(电子版),2018,8(1):11-14.
- [3]焦敏娜. 交叉电项针治疗中风后假性延髓麻痹的临床观察[D]. 哈尔滨:黑龙江中医药大学,2020.
- [4]彭艳霞,唐明,陈天龙,等. 交叉电项针结合吞咽训练对脑卒中后气管切开患者吞咽功能及肺部感染的影响[J]. 广州中医药大学学报,2022,39(1):83-87.
- [5]贾坤平,王秀珍,吴建丽,等. “交叉电项针”治疗重症脑出血后气管切开临床观察[J]. 上海针灸杂志,2020,39(3):300-304.
- [6]裴思颖,蔡国锋,刘凯,等. 交叉电项针对脑出血合并机械通气患者撤机的影响[J]. 中国中医急症,2021,30(11):1944-1946.
- [7]CAI G, ZHUANG Z, JIA K, et al. Effects of cross electro-nape-acupuncture (CENA) on recover of consciousness and tracheotomy tube sealing in serious cerebral hemorrhage[J]. Am J Transl Res, 2022, 14(3):1868-1876.
- [8]TAO C, ZHANG R, HU X, et al. A novel brainstem hemorrhage model by autologous blood infusion in rat: white matter injury, magnetic resonance imaging, and neurobehavioral features[J]. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2016, 25(5):1102-1109.
- [9]GAO F, YANG S, WANG J, et al. cAMP-PKA cascade: an outdated topic for depression?[J]. Biomed Pharmacother, 2022, 150:113030. doi: 10.1016/j.biopha. 2022. 113030.
- [10]诸葛启钊. 豚鼠脑立体定位图谱[M]. 北京:人民卫生出版社,2005:47.
- [11]LONGA EZ, WEINSTEIN PR, CARLSON S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. Stroke, 1989, 20(1):84-91.
- [12]李辞蓉,华兴邦,周浩良,等. 豚鼠针灸穴位图谱的研制[J]. 上海针灸杂志,1992(2):28-30.
- [13]CHEN J, LI Y, WANG L, et al. Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats[J]. Stroke, 2001, 32(4):1005-1011.
- [14]姜泽飞,贾宏彬,岳广晴,等. 针刺治疗假性延髓麻痹吞咽障碍的取穴规律研究[J]. 中国针灸,2022,42(4):465-470.
- [15]CAI GF, SUN ZR, ZHUANG Z, et al. Cross electro-nape-acupuncture ameliorates cerebral hemorrhage-induced brain damage by inhibiting necroptosis [J]. World J Clin Cases, 2020, 8(10):1848-1858.
- [16]MERINO P, DIAZ A, TORRE ER, et al. Urokinase-type plasminogen activator (uPA) regulates the expression and function of the growth-associated protein-43 (GAP-43) in the synapse [J]. J Biol Chem, 2019, 295(2):619-630.
- [17]魏玉婷,朱田田,贾静,等. 针灸干预阿尔茨海默病的作用机制研究进展[J]. 针刺研究,2022,47(4):362-368.
- [18]CRESTINI A, PISCOPO P, CAMPEGGI LM, et al. Pro-teic marker of hypoxic-ischemic damage [J]. Ann Ist Super Sanita, 2001, 37(4):581-591.
- [19]ZAK N, MOBERGET T, BØEN E, et al. Longitudinal and cross-sectional investigations of long-term potentiation-like cortical plasticity in bipolar disorder type II and healthy individuals [J]. Transl Psychiatry, 2018, 8(1):103.
- [20]HWANG YS, OH SW, PARK SH, et al. Melanogenic effects of maclurin are mediated through the activation of cAMP/PKA/CREB and p38 MAPK/CREB signaling pathways [J]. Oxid Med Cell Longev, 2019, 2019:9827519. doi: 10.1155/2019/9827519.
- [21]MASSENGILL CI, DAY-COONEY J, MAO T, et al. Genetically encoded sensors towards imaging cAMP and PKA activity in vivo [J]. J Neurosci Methods, 2021, 362:109298. doi: 10.1016/j.jneumeth. 2021. 109298.
- [22]JIANG HL, ZHANG XH, WANG Y, et al. Mechanisms underlying the antidepressant response of acupuncture via PKA/CREB signaling pathway [J]. Neural Plast, 2017, 2017:4135164. doi: 10.1155/2017/4135164.
- [23]LIN R, LI X, LIU W, et al. Electro-acupuncture ameliorates cognitive impairment via improvement of brain-

derived neurotropic factor-mediated hippocampal synaptic plasticity in cerebral ischemia-reperfusion injured rats [J]. *Expe Ther Med*, 2017, 14(3):2373-2379.

[24] 吕靖. cAMP/PKA/CREB 信号通路在缺氧预处理逆转丙泊酚致发育期豚鼠海马神经元毒性中的作用[D]. 南宁:广西医科大学, 2018.

## Effect of Cross Electro-nape-acupuncture on cAMP-PKA Pathway in Medullary Tissue of Cerebral Hemorrhage Bulbar Injury Model Guinea Pigs

JIA Kunping<sup>1,2</sup>, LIANG Qun<sup>3</sup>, LIU Guanping<sup>1,2</sup>, CAI Guofeng<sup>2</sup>, WU Jianli<sup>1</sup>

1. Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin, 150040; 2. Hanan Branch of the Second Affiliated Hospital of Heilongjiang University of Chinese Medicine; 3. The First Affiliated Hospital of Heilongjiang University of Chinese Medicine

**ABSTRACT** **Objective** To observe the effect and possible mechanism of cross electro-nape-acupuncture (CENA) on neurological function of guinea pigs with cerebral hemorrhage bulbar injury. **Methods** A total of 240 guinea pigs were randomly divided into blank group, model group, acupuncture group, CENA group and electro-nape-acupuncture (ENA) group, and each group was further divided into 1-, 3-, 7- and 14-day intervention timepoints, with 12 guinea pigs at each timepoint. The model of cerebral hemorrhage bulbar injury was established by injection of the guinea pigs' autologous blood in all the groups except for the blank group. Twelve hours after modelling, the guinea pigs in the acupuncture group were needled at bilateral "Fengchi (GB 20)" and "Yifeng (SJ 17)", 20 minutes each time, once a day. In CENA group, the positive pole of the needle was connected to "Fengchi (GB 20)", while the negative pole was connected to the opposite side of "Yifeng (SJ 17)"; in ENA group, the positive pole of the needle was connected to "Fengchi (GB 20)", while the negative pole was connected to "Yifeng (SJ 17)" on the same side; the intervention was applied 20 minutes each time, once a day. The guinea pigs in the blank group and the model group were given the same grabbing and fixation without intervention. After 1-, 3-, 7- and 14-day intervention, the neurologic function was assessed by using modified neurological severity scale (mNSS). Positive expression of synapse growth-associated protein 43 (GAP-43) and synaptophysin (SYN) in guinea pig medullary tissue were detected by immunohistochemistry at each timepoint. Contents of cyclic adenosine monophosphate (cAMP) and protein kinase A (PKA) were detected by ELISA. The protein expressions of cAMP and phosphorylated cyclic AMP response element binding protein (p-CREB) were detected by Western blot. **Results** The guinea pigs in the blank group had no neurological deficit. Compared to those in the blank group, the mNSS score at different timepoints in the other groups significantly increased ( $P < 0.01$ ). The mNSS score showed different degrees of reduction after 3-, 7- and 14-day intervention in the acupuncture, ENA and CENA groups compared to those measured at the same timepoints in the model group ( $P < 0.01$ ). There was no significant difference among acupuncture, ENA and CENA groups in mNSS score ( $P > 0.05$ ). Compared to the blank group, the model group had increased positive expression of GAP-43, decreased positive expression of SYN, reduced cAMP, PKA content and p-CREB protein expression in the medullary tissue at each timepoint ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). Compared to those in the model group measured at the same timepoint, the positive expression of GAP-43 and SYN, the cAMP and PKA content, and the protein expression of cAMP and p-CREB in the acupuncture, CENA and ENA groups after 3-, 7- and 14-day intervention significantly increased ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ), and the CENA group showed more significant improvements than the acupuncture group and ENA group in all above mentioned outcomes measured after 7- and 14-day intervention ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). **Conclusion** CENA can improve the neurological deficit in the guinea pigs with medullary injury after stroke, which is likely related to the activation of the cAMP-PKA pathway in the medullary tissue to improve the synaptic plasticity of the medulla.

**Keywords** cerebral hemorrhage; bulbar injury; cross electro-nape-acupuncture; synaptic plasticity; cAMP-PKA pathway

(收稿日期: 2022-10-08; 修回日期: 2023-01-23)

[编辑: 邓媛]