

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2023.23.011

实验研究

通督醒神针刺法对脑缺血再灌注后学习记忆障碍模型大鼠海马组织 AMPA 受体及其辅助蛋白表达的影响

阮晓迪¹, 高静², 吕转², 李琪¹, 苏凯奇², 顾一鸣¹, 余明月¹,
齐士魁¹, 罗萌¹, 吴明莉², 王慧灵², 申昕², 冯晓东^{1,2}✉

1. 河南中医药大学, 河南省郑州市金水东路156号, 450046; 2. 河南中医药大学第一附属医院

[摘要] **目的** 探讨通督醒神针刺法治疗脑卒中后认知障碍的可能作用机制。**方法** SD大鼠随机分为正常组、假手术组、模型组各12只, 通督醒神组13只。模型组和通督醒神组大鼠均接受线栓法建立脑缺血再灌注后学习记忆障碍大鼠模型。造模成功后通督醒神组大鼠选取“神庭”“百会”穴电针干预, 每日1次, 每次30 min, 持续14天, 其余各组只抓取不进行其他干预。于干预的第9天开始进行5天的定位航行实验, 于干预的第14天进行空间探索实验评价大鼠学习记忆能力。空间探索实验后, 每组大鼠取材海马组织, 采用TTC染色法观察脑梗死体积变化; 高尔基染色法观察大鼠海马CA1区锥体神经元形态及树突棘密度改变; 运用蛋白质免疫印迹法检测各组大鼠海马组织 α -氨基-3-羧基-5-甲基异恶唑-4-丙酸 (AMPA) 受体亚基谷氨酸受体1 (GluR1)、谷氨酸受体2 (GluR2)、谷氨酸受体3 (GluR3) 及辅助蛋白跨膜AMPA受体调节蛋白 γ 2 (TARPP2)、跨膜AMPA受体调节蛋白 γ 8 (TARPP8) 蛋白相对表达量; 运用实时荧光定量PCR法检测大鼠海马组织GluR1、GluR2、GluR3 mRNA水平。**结果** 定位航行实验中, 与正常组和假手术组比较, 模型组大鼠在第1、2、3、4、5天时逃避潜伏期和总路程延长 ($P<0.05$); 通督醒神组大鼠在各时间点逃避潜伏期和总路程较模型组缩短 ($P<0.05$)。在空间探索实验中, 与正常组和假手术组比较, 模型组大鼠穿越平台次数明显减少 ($P<0.05$); 通督醒神组大鼠穿越平台次数较模型组明显增加 ($P<0.05$)。TTC染色结果显示, 模型组大鼠脑梗死体积较假手术组明显增大, 而通督醒神组大鼠脑梗死体积较模型组明显减小 ($P<0.05$)。高尔基染色结果显示, 与正常组和假手术组比较, 模型组大鼠海马CA1区锥体神经元树突分支数减少, 树突棘密度降低, 而通督醒神组大鼠海马CA1区锥体神经元树突分支数及树突棘较模型组增多, 且树突棘密度较模型组升高 ($P<0.05$)。与正常组和假手术组比较, 模型组大鼠海马组织中GluR1、GluR2、GluR3、TARPP2及TARPP8蛋白相对表达量及GluR1、GluR2、GluR3的mRNA水平降低 ($P<0.05$); 与模型组比较, 通督醒神组大鼠海马组织中GluR1、GluR2、GluR3、TARPP2、TARPP8的蛋白相对表达量及GluR1、GluR2、GluR3的mRNA水平升高 ($P<0.05$)。**结论** 通督醒神针刺可改善脑缺血再灌注后学习记忆障碍, 其作用可能与上调海马组织中AMPA受体及其辅助蛋白TARP的表达, 促进突触可塑性有关。

[关键词] 脑卒中; 认知障碍; 脑缺血再灌注; 电针; 学习记忆障碍; AMPA受体; 通督醒神

脑卒中具有高发病率、高死亡率、高致残率的特点, 多数患者遗留不同程度的功能障碍。其中脑卒中后认知障碍 (post-stroke cognitive impairment,

PSCI) 是卒中后常见的功能障碍, 若不及时干预, 会严重影响患者的生存时间, 而且延缓神经功能康复进程, 给社会带来负面效应^[1]。目前针对PSCI的西医治疗主要为药物治疗, 但易引起胃肠紊乱等多种不良反应, 且经济成本较高^[2]。针刺作为传统中医疗法, 在PSCI临床治疗中运用广泛。课题组前期临床研究表明, 以神庭、百会为主的通督醒神

基金项目: 国家自然科学基金(U2004131, 81574042); 河南省医学“双一流”创建科学研究专项(HSRP-DFCTCM-2023-1-05); 河南省科技研发计划联合基金(222301420064); 河南省二〇二三年科技发展计划(232102311210)

✉ 通讯作者: fxd0502@163.com

针刺法可改善 PSCI 患者的认知功能和精神行为,尤其在提高个人日常生活能力和生活质量方面具有显著优势,且安全性较佳^[3-5]。最新研究^[6]证明,兴奋性谷氨酸(Glu)通过激活 α -氨基-3-羧基-5-甲基异恶唑-4-丙酸(AMPA)受体调节中枢神经系统的兴奋性突触传递,从而在学习记忆和空间思维方面发挥作用。AMPA受体辅助蛋白TARP与AMPA受体共同调控中枢神经突触,促进突触可塑性,介导包括学习记忆等在内的大脑功能^[7-8]。前期研究证实,通督醒神针刺法通过促进海马突触可塑性改善大脑中动脉栓塞/再灌注大鼠学习记忆障碍^[9],但针刺是否通过影响AMPA受体来改善脑缺血再灌注后学习记忆障碍机制尚不明确。因此,本研究观察通督醒神针刺法对脑缺血再灌注后学习记忆障碍模型大鼠海马锥体神经元及树突棘的病理形态、AMPA受体及其辅助蛋白TARP的影响,探讨通督醒神针刺法改善PSCI的可能作用机制,为该法的临床应用提供基础支持。本研究方案已通过河南中医药大学伦理委员会审批(实验动物伦理审查批号:YFYDW2019037)。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF级雄性SD大鼠70只,6~8周龄,体质量(260±20)g,济南朋悦实验动物公司,实验动物生产许可证号:SCXK(鲁)2019-0003。饲养于河南中医药大学动物实验中心,自然照明,自由摄食与饮水,术前禁食24h。

1.2 主要试剂与仪器

线栓(北京西浓科技有限公司,货号:2036A6);庆大霉素[上海现代哈森(商丘)药业有限公司,货号:1405-41-0];2% TTC染色溶液(货号:T8170)、5×蛋白上样缓冲液(货号:P1040)、RIPA裂解液(货号:R0010)、ECL Plus超敏发光液(货号:PE0010)、总RNA提取试剂盒(货号:R1200)、BCA蛋白定量试剂盒(货号:PC0020),北京索莱宝科技有限公司;戊巴比妥钠(上海氟德化工有限公司,货号:21642-83-1);凝胶配制试剂盒(货号:PG112)、广谱蛋白Marker(货号:WJ103),上海雅酶生物医药科技有限公司;RNA反转录试剂盒(东洋纺生物科技有限公司,货号:FSQ-101),谷氨酸受体1(GluR1)抗体(货号:PB9204)、谷氨酸受体3(GluR3)抗体(货号:BA3396),武汉博士德生物工程有限公司;谷氨酸

受体2(GluR2)抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,货号:11994-1-AP);跨膜AMPA受体调节蛋白 γ 2(TARP γ 2)抗体(货号:YN1524)、跨膜AMPA受体调节蛋白 γ 8(TARP γ 8)抗体(货号:YM3399),美国Immunoway公司;生物素标记山羊抗兔IgG(美国Abcam公司,货号:ab150077);2×Universal SYBR Green Fast qPCR Mix(美国AB-clonal公司,货号:RK21203);高尔基染色试剂盒(哥伦比亚FD NeuroTechnologies公司,货号:PK401)。

华佗牌一次性使用无菌针灸针(苏州医疗用品厂,规格:0.25 mm×13 mm);电针仪(苏州华佗医疗用品厂,型号:GM01);电泳仪(型号:1658001)、转膜仪(型号:170-3930)、凝胶成像系统(型号:Gel Doc XR+),美国Bio Rad公司;RT-PCR仪(型号:FC-96)、全波长酶标仪(型号:MK3)、核酸蛋白浓度微量测定仪(型号:Nano Drop One),美国Thermo公司;高速组织研磨仪(武汉Servicebio公司,型号:SWE-FP);光学显微镜(日本Olympus公司,型号:BX41)。

1.3 动物分组及造模方法

按随机数字表法将70只大鼠分为正常组12只、假手术组12只、造模组46只。造模组大鼠通过线栓法^[10]构建脑缺血再灌注模型:大鼠禁食24h后,采用3%戊巴比妥钠溶液30 mg/kg腹腔注射麻醉后,以仰卧位姿势固定于鼠板上,沿颈部中线正中偏左行纵向切口,钝性分离皮下组织、筋膜等,逐渐暴露左侧颈总动脉、颈外动脉和颈内动脉,并分离动脉血管。用缝线结扎颈外动脉、颈总动脉近心端,在靠近颈内动脉、颈外动脉的分叉处打活结备用,使用动脉夹短暂夹闭颈内动脉。在颈总动脉距离颈外动脉和颈内动脉分叉处约1 cm作出“V”字切口后,把栓线插入颈内动脉,松掉动脉夹,缓慢插入栓线直至感到轻微阻力后停止,结扎并固定栓线,缝合颈部切口,最后将留置在外的栓线尾端做好标记以便后续操作。术后2 h,用镊子回抽栓线实现大脑中动脉的再灌注,完成手术。正常组大鼠在同等条件下只抓取不固定,不进行任何其他干预措施,假手术组暴露出颈部动脉后,不进行线栓插栓造模。在造模手术结束后的连续3天内,每日腹腔注射1次庆大霉素(2 U/只)以防感染。

造模24 h后对大鼠进行连续5天的水迷宫定位航行实验,以假手术组大鼠定位航行实验的逃避潜伏期的平均值作为参考值,计算造模组大鼠逃避潜伏期平均值与参考值之差占该鼠平均逃避潜伏期的

比值,若该值大于 20%,则造模成功^[10]。最终筛选出 32 只存在学习记忆障碍的大鼠。

1.4 干预方法

连续 5 天的水迷宫定位航行实验验证造模成功后次日,采用随机数字表法将 32 只模型大鼠分为模型组和通督醒神组各 16 只。通督醒神组大鼠予通督醒神针刺法电针干预:将大鼠固定在自制电针固定木架上,电针期间大鼠保持清醒状态。穴位选取“神庭”“百会”^[11]。以无菌一次性针灸针(0.25 mm×13 mm)15°斜刺 2 mm 后,针灸柄分别连接 GM01 型电针仪(疏密波,1~20 Hz,1 mA),每日 1 次,每次 30 min,连续干预 14 天。其余各组大鼠在相同条件下只抓取不固定,不给予其他干预。干预期间,模型组 2 只因感染死亡,2 只因体质弱、营养不良死亡,最终模型组为 12 只;通督醒神组 3 只不明原因死亡,最终通督醒神组为 13 只。

1.5 观察指标及方法

1.5.1 Morris 水迷宫实验观察大鼠学习记忆功能

将圆形水池[直径 160 cm×高 50 cm×水深 30 cm,水温(25±2)℃]分为四个相等的象限,其中第三象限有一无色透明且低于水面 2 cm 的逃生平台(直径 12 cm×高 28 cm)。视觉参照物悬挂于高于水面的池壁四周,并根据分析软件调整位置。实验包括:1)定位航行实验:于干预的第 9 天开始进行定位航行实验,每日固定在同一时间段内实验,每个时间段训练 4 次,持续 5 天。具体操作为:将受试大鼠面向池壁,按顺时针方向依次由第一、二、三、四象限入水点顺序放入水池中,记录 90 s 内寻找平台的时间,即为逃避潜伏期。若大鼠 90 s 内未找到平台,则让实验者引导至平台处并停留 10 s,逃避潜伏期记录为 90 s。2)空间探索实验:于干预的第 14 天进行空间探索实验,将平台撤去后,选第一象限相同的入水点将大鼠面向池壁放入水中,观察大鼠在 90 s 内跨越原平台区域的次数和总路程,以评估大鼠的学习记忆能力。

1.5.2 TTC 染色观察大鼠脑梗死体积 空间探索实验后,每组大鼠采用随机数字表法选出 3 只用于 TTC 染色,3 只用于高尔基染色,6 只用于蛋白质免疫印迹实验和实时荧光定量 PCR 实验。大鼠麻醉后迅速取全脑,置于-20℃冰箱冷冻 20 min。沿冠状面将全脑切成 5 或 6 片的切片(2 mm)。将切片置于 2% TTC 溶液中,避光,37℃孵育 30 min。期间翻动切片,使切片充分染色。染色完成后,使用数码相机拍摄,并用 Image Pro Plus 6.0 图像处理

软件分析脑组织相对梗死体积。

1.5.3 高尔基染色观察大鼠海马 CA1 区锥体神经元树突分支形态和树突棘密度 大鼠大脑按照高尔基染色试剂盒将等量溶液 A 和溶液 B 混合制成浸渍溶液,将大脑置于浸渍溶液中。放置 14 天后,将大脑转移至 C 溶液保存 3 天后,放入-80℃冰箱内备用。冰冻切片机将脑组织切成 150 μm 的冠状面全脑切片,严格按照高尔基染色试剂盒说明书步骤进行染色。运用光学显微镜观察大鼠海马 CA1 区锥体神经元和树突形态及密度。运用 Image J 1.54 软件对树突棘计数和长度测量,计算树突棘总密度。

1.5.4 蛋白质免疫印迹法检测大鼠海马组织 GluR1、GluR2、GluR3、TARPγ2 及 TARPγ8 蛋白相对表达量 断头取脑分离海马组织,置于-80℃冰箱备用。取出海马组织,加入 10 倍体积 RIPA 裂解液,高速组织研磨仪中研磨,样品离心后(4℃、离心半径 19.97 cm、12 000 r/min 离心 5 min),取上清液。按照 BCA 蛋白定量法进行蛋白定量,50 μl 蛋白液上样,5%浓缩胶,电泳,PVDF 膜电转印,5%脱脂奶粉封闭 2 h,依次加入 GluR1、GluR2、GluR3、TARPγ2、TARPγ8 和 GAPDH 一抗(1:5000)孵育过夜,加入二抗山羊抗兔 IgG(1:10 000)孵育 1 h。用 ECL 化学发光显影液,室温孵育 3 min,曝光显影。采用 Image J 1.54 软件分析条带的灰度值,以目的蛋白与内参 GAPDH 蛋白条带灰度值的比值为相对表达量。

1.5.5 实时荧光定量 PCR 法检测大鼠海马组织 GluR1、GluR2、GluR3 mRNA 表达 取出冰冻的海马组织于 EP 管内,按试剂盒说明提取总 RNA,将提取的 RNA 样品进行逆转录获取 cDNA,再根据逆转录的 cDNA 配置 RT-PCR 体系,进行 PCR 扩增,变化循环 40 次,最后按照仪器自动设置参数绘制熔解曲线。以 GAPDH 作为内参分析,用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法分析目的基因的相对表达量。PCR 引物由江苏金唯智生物科技公司合成, GluR1:上游 CTCCTCGTA-CACAGCCAACC,下游 CCCCTGCTCGTTTCAGTTTAA,产物长度 433 bp; GluR2:上游 ACACTGCAAGCT-GTTCTGGA,下游 TGTGTGTGCTCCAGGGTATT,产物长度 393 bp; GluR3:上游 ACATCTGCGCT-GACACATGA,下游 TCACTACAATGGTCCGGTTCT,产物长度 367 bp; GAPDH:上游 CAACTCCCTCA-AGATTGTCAGGAA,下游 GGCATGGACTGTGTCATGA,产物长度 118 bp。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 26.0 软件进行统计分析。计量资料符合正态分布用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 方差齐性多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用最小显著差值法 (LSD) 法; 若方差不齐则采用 *Dunnett's* 检验。不满足正态分布的数据以中位数 (四分位数) [$M(P_{25}, P_{75})$] 表示, 采用 Kruskal-Wallis *H* 非参数检验。采用 GraphPad Prism 7.0 软件绘制图表。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠定位航行实验结果比较

表 1、表 2 示, 正常组和假手术组大鼠各时间点游泳总路程和逃避潜伏期比较差异均无统计学意义 ($P>0.05$); 与正常组和假手术组同时间比较, 模型组大鼠各时间点游泳总路程和逃避潜伏期延长 ($P<0.05$); 与模型组同时间比较, 通督醒神组大鼠各时间点游泳总路程和逃避潜伏期缩短 ($P<0.05$)。

2.2 各组大鼠空间探索实验结果比较

表 3 示, 正常组和假手术组大鼠穿越平台的次数比较差异无统计学意义 ($P>0.05$); 与正常组和假手术组比较, 模型组大鼠穿越平台的次数明显减少 ($P<0.05$); 与模型组比较, 通督醒神组大鼠穿越平台的次数明显增加 ($P<0.05$)。

2.3 各组大鼠脑梗死体积比较

TTC 染色结果显示: 假手术组与正常组大鼠大

表 3 各组大鼠穿越平台次数比较

Table 3 Comparison of the number of crossing times of rats in each group (次, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	穿越平台次数
正常组	12	7.08 $\pm$ 1.31
假手术组	12	6.91 $\pm$ 1.31
模型组	12	2.33 $\pm$ 0.89 ^{a)}
通督醒神组	13	4.54 $\pm$ 1.33 ^{b)}

注: a) 与正常组和假手术组比较, $P<0.05$; b) 与模型组比较, $P<0.05$ 。

脑切片脑梗死体积为 0; 模型组大鼠脑梗死体积为 (22.33 $\pm$ 2.70) %, 通督醒神组大鼠脑梗死体积为 (8.77 $\pm$ 1.50) %。与正常组和假手术组比较, 模型组大鼠的脑梗死体积明显增大 ($P<0.05$); 与模型组比较, 通督醒神组大鼠的脑梗死体积明显减小 ($P<0.05$)。

2.4 各组大鼠海马神经元形态及树突棘密度比较

高尔基染色 (图 1、图 2) 示, 正常组与假手术组大鼠的海马 CA1 区锥体神经元形态规则, 树突分支及树突棘密集; 模型组大鼠海马 CA1 区中树突分支数及树突棘减少; 通督醒神组大鼠海马 CA1 区中树突分支数及树突棘较模型组增多。表 4 示, 正常组和假手术组大鼠海马 CA1 区锥体神经元树突棘密度差异无统计学意义 ($P>0.05$); 与正常组和假手术组比较, 模型组大鼠海马 CA1 区锥体神经元树突棘密度降低 ($P<0.05$); 与模型组比较, 通督醒神组大鼠海马 CA1 区锥体神经元树突棘密度升高 ($P<0.05$)。

表 1 各组大鼠定位航行实验不同时间游泳总路程比较

Table 1 Comparison of the total distance of swimming at different times in the localisation navigation experiment for each group of rats (cm, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天
正常组	12	947.68 $\pm$ 105.83	722.47 $\pm$ 142.41	540.66 $\pm$ 71.60	473.33 $\pm$ 81.94	361.58 $\pm$ 94.11
假手术组	12	957.79 $\pm$ 8.91	835.93 $\pm$ 96.53	618.57 $\pm$ 84.90	405.03 $\pm$ 82.38	390.21 $\pm$ 97.24
模型组	12	1146.92 $\pm$ 168.19 ^{a)}	1269.75 $\pm$ 195.54 ^{a)}	1051.61 $\pm$ 157.01 ^{a)}	743.62 $\pm$ 92.56 ^{a)}	622.12 $\pm$ 91.04 ^{a)}
通督醒神组	13	1003.81 $\pm$ 167.96 ^{b)}	910.19 $\pm$ 93.13 ^{b)}	728.39 $\pm$ 95.07 ^{b)}	502.74 $\pm$ 78.71 ^{b)}	395.15 $\pm$ 52.23 ^{b)}

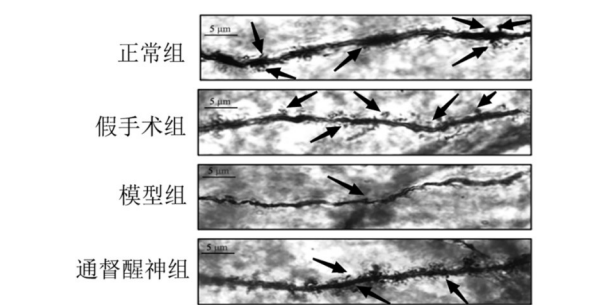
注: a) 与正常组和假手术组同时间比较, $P<0.05$; b) 与模型组同时间比较, $P<0.05$ 。

表 2 各组大鼠定位航行实验不同时间逃避潜伏期比较

Table 2 Comparison of escape latency at different times in the localisation navigation experiment for each group of rats (s, $\bar{x}\pm s$)

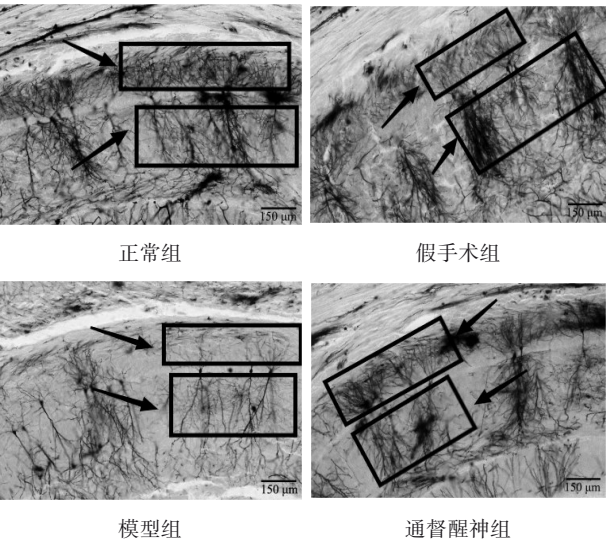
组别	鼠数	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天
正常组	12	47.91 $\pm$ 8.26	33.90 $\pm$ 6.88	24.15 $\pm$ 6.39	21.79 $\pm$ 7.90	15.77 $\pm$ 6.75
假手术组	12	47.49 $\pm$ 8.76	36.44 $\pm$ 7.09	26.63 $\pm$ 7.79	20.70 $\pm$ 7.35	17.07 $\pm$ 8.17
模型组	12	55.21 $\pm$ 9.01 ^{a)}	61.07 $\pm$ 8.39 ^{a)}	46.90 $\pm$ 9.24 ^{a)}	38.25 $\pm$ 7.13 ^{a)}	31.00 $\pm$ 6.73 ^{a)}
通督醒神组	13	49.41 $\pm$ 8.85 ^{b)}	41.71 $\pm$ 9.03 ^{b)}	32.38 $\pm$ 8.62 ^{b)}	26.81 $\pm$ 6.53 ^{b)}	18.13 $\pm$ 7.28 ^{b)}

注: a) 与正常组和假手术组同时间比较, $P<0.05$; b) 与模型组同时间比较, $P<0.05$ 。



注：图中黑色箭头指示为树突棘。
图 1 各组大鼠海马 CA1 区树突棘密度比较
(高尔基染色, ×1000)

Figure 1 Comparison of dendritic spine density in the CA1 region of the hippocampus of rats in each group (Golgi staining, ×1000)



注：图中黑色箭头指示框内为神经元。
图 2 各组大鼠海马 CA1 区锥体神经元形态结果
(高尔基染色, ×40)

Figure 2 Morphology of pyramidal neurons in the CA1 region of the hippocampus of rats in each group (Golgi staining, ×40)

2.5 各组大鼠海马组织中 GluR1、GluR2、GluR3、TARPγ2 及 TARPγ8 蛋白相对表达量比较

表 5 示, 假手术组与正常组比较, 海马组织中

表 5 各组大鼠海马组织中 GluR1、GluR2、GluR3、TARPγ2 及 TARPγ8 蛋白相对表达量比较

Table 5 Comparison of relative expression of GluR1, GluR2, GluR3, TARPγ2 and TARPγ8 proteins in the hippocampal tissues of rats in each group (/GAPDH, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	GluR1	GluR2	GluR3	TARPγ2	TARPγ8
正常组	3	1.24±0.20	1.16±0.06	1.15±0.03	1.08±0.11	1.07±0.09
假手术组	3	1.12±0.10	0.98±0.10	0.97±0.09	1.10±0.09	0.91±0.09
模型组	3	0.45±0.12 ^{a)}	0.68±0.08 ^{a)}	0.67±0.08 ^{a)}	0.57±0.14 ^{a)}	0.57±0.06 ^{a)}
通督醒神组	3	0.88±0.11 ^{b)}	0.84±0.09 ^{b)}	0.92±0.06 ^{b)}	0.93±0.12 ^{b)}	0.87±0.10 ^{b)}

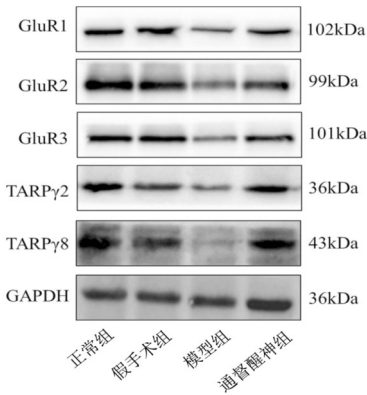
注: GluR1, 谷氨酸受体 1; GluR2, 谷氨酸受体 2; GluR3, 谷氨酸受体 3; TARPγ2, 跨膜 AMPA 受体调节蛋白 γ2; TARPγ8, 跨膜 AMPA 受体调节蛋白 γ8。
a) 与正常组和假手术组比较, $P < 0.05$; b) 与模型组比较, $P < 0.05$ 。

表 4 各组大鼠海马 CA1 区锥体神经元树突棘密度比较
Table 4 Comparison of dendritic spine density of pyramidal neurons in the CA1 region of the hippocampus of rats in each group (个/10 μm, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	海马 CA1 区树突棘密度
正常组	3	8.00±1.72
假手术组	3	8.33±1.53
模型组	3	4.67±0.58 ^{a)}
通督醒神组	3	6.33±0.57 ^{b)}

注: a) 与正常组和假手术组比较, $P < 0.05$; b) 与模型组比较, $P < 0.05$ 。

GluR1、GluR2、GluR3、TARPγ2 及 TARPγ8 的蛋白相对表达量差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与正常组和假手术组比较, 模型组 GluR1、GluR2、GluR3、TARPγ2 及 TARPγ8 的蛋白相对表达量降低 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 通督醒神组 GluR1、GluR2、GluR3、TARPγ2 及 TARPγ8 的蛋白相对表达量升高 ($P < 0.05$)。各组大鼠海马组织中 GluR1、GluR2、GluR3、TARPγ2 及 TARPγ8 蛋白电泳图见图 3。



注: GluR1, 谷氨酸受体 1; GluR2, 谷氨酸受体 2; GluR3, 谷氨酸受体 3; TARPγ2, 跨膜 AMPA 受体调节蛋白 γ2; TARPγ8, 跨膜 AMPA 受体调节蛋白 γ8。

图 3 各组大鼠海马组织中 GluR1、GluR2、GluR3、TARPγ2 及 TARPγ8 蛋白电泳图

Figure 3 Electrophoresis of GluR1, GluR2, GluR3, TARPγ2 and TARPγ8 proteins in the hippocampal tissues of rats in each group

2.6 各组大鼠海马组织中 GluR1、GluR2、GluR3 mRNA 相对表达量比较

表 6 示, 假手术组与正常组比较, 大鼠海马组织中 GluR1、GluR2、GluR3 的 mRNA 相对表达量差异无统计学意义 ($P>0.05$); 与正常组和假手术组比较, 模型组海马组织中 GluR1、GluR2、GluR3 mRNA 相对表达量降低 ($P<0.05$); 与模型组比较, 通督醒神组海马组织中 GluR1、GluR2、GluR3 mRNA 相对表达量升高 ($P<0.05$)。

表 6 各组大鼠海马组织中 GluR1、GluR2、GluR3 mRNA 相对表达量比较

Table 6 Comparison of the mRNA relative expression level of GluR1, GluR2 and GluR3 in the hippocampal tissues of rats in each group ($2^{-\Delta\Delta CT}$, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	GluR1	GluR2	GluR3
正常组	3	1.00±0.18	1.00±0.16	1.00±0.14
假手术组	3	1.07±0.24	1.01±0.17	1.01±0.17
模型组	3	0.58±0.20 ^{a)}	0.47±0.25 ^{a)}	0.61±0.23 ^{a)}
通督醒神组	3	1.22±0.19 ^{b)}	0.85±0.12 ^{b)}	0.96±0.08 ^{b)}

注: GluR1, 谷氨酸受体 1; GluR2, 谷氨酸受体 2; GluR3, 谷氨酸受体 3。

a) 与正常组和假手术组比较, $P<0.05$; b) 与模型组比较, $P<0.05$ 。

3 讨论

根据 PSCI 患者的记忆力、注意力下降、学习能力衰减等临床症状, 可将其归属于中医学“痴呆”“呆病”等范畴, 其病位在脑, 为脑与神志疾病。脑为元神之府, 五脏六腑之气上输于脑, 濡养头脑, 使其发挥正常生理功能。脑卒中患者因痰浊瘀血内阻所致脑髓不充, 痰蒙清窍而出现神识不清、表情呆滞等症状^[12]。《灵枢·海论》谓: “脑为髓之海”“髓海不足, 则脑转耳鸣, 腰酸眩暈, 目无所见, 懈怠安卧”。因此, 该病病机归纳为痰浊、血瘀阻扰脑神, 脑髓失养, 神机失用。督脉入络脑, 督脉通畅是维持脑功能的关键, 督脉经气虚衰或瘀阻可导致神志异常。激发督脉经气可起调节阴阳、填精益髓、醒神开窍之功^[13]。因此, 督脉为治疗脑部疾病的首选。课题组在总结名老中医思想与经验的基础上, 提出“通督醒神”为治疗 PSCI 的治则, 选取神庭、百会为主穴。前期研究^[5]已证实, 通督醒神针刺可有效改善 PSCI。本研究利用 Morris 水迷宫实验对各组大鼠的空间学习、记忆等认知水平进行评估, 结果显示, 通督醒神组能缩短脑缺血再灌注后学习记忆障碍模型大鼠的游泳总

路程和逃避潜伏期、增加穿越平台次数, 提示通督醒神针刺可以改善脑缺血缺氧大鼠的认知能力, 该结果与前期研究^[9]结果一致。

突触可塑性是指突触连接强度可调节的特性, 主要包括了传递效率的功能可塑性和信息贮存相关的结构可塑性^[14], 其变化与学习记忆能力有着紧密联系。AMPA 受体具有参与中枢神经系统发育进程, 调节突触可塑性、改变学习记忆的亚细胞功能等作用^[15]。AMPA 受体广泛分布于中枢神经系统中, 基于自身结构来保持突触可塑性和稳定性, 在学习记忆过程中发挥重要作用。研究证实, AMPA 受体在突触后膜的分布变化与兴奋性突触传递相关, 而突触传递效率是突触可塑性的重要部分, 其作用改变对学习记忆起着关键作用^[16]。AMPA 受体在神经元中有多个亚基表达, 其中 GluR1 是 AMPA 受体蛋白参与突触可塑性的重要亚基。GluR1 参与了 AMPA 受体诱导长时程增强 (LTP), 促进受损组织突触可塑性功能, 从而恢复神经功能^[17]。GluR2 对长期记忆的存储和巩固起着重要作用, 参与调节 CA1 区树突棘密度, 其可诱导长时程增强并促进突触可塑性, 进而达到改善学习和记忆的目的^[18]。GluR3 已成为部分中枢神经性脑病的靶点, 海马神经元中 GluR3 可介导快速兴奋性突触传递, 但其异常表达也证实会损害神经元^[19]。AMPA 受体的变化所致突触功能障碍已经成为多种中枢性神经类疾病共同的生理病理过程^[20]。同时, TARP 作为 AMPA 受体辅助蛋白, 其结构增强了 AMPA 受体突触间信号传导, 并诱导 AMPA 受体蛋白转变为更高的电导水平, 激活中枢神经系统的兴奋性突触传递, 促进突触可塑性和神经元回路, 调节学习记忆能力^[21]。TARP γ 2 调节 AMPA 受体转运, 参与可塑性过程, 对 AMPA 受体具有高度特异性^[22]。TARP γ 8 在海马体中是含量最高辅助蛋白, 能对 LTP 发挥关键作用^[23]。本研究结果显示, 与正常组和假手术组比较, 模型组大鼠海马组织 AMPA 受体 GluR1、GluR2、GluR3、TARP γ 2、TARP γ 8 的蛋白表达及 GluR1、GluR2、GluR3 的 mRNA 表达均降低, 同时高尔基染色结果显示海马锥体神经元树突分支数和树突棘密度均减少。电针干预后, 模型大鼠海马组织 AMPA 受体各亚型的蛋白及 mRNA 表达和辅助蛋白 TARP 的蛋白表达均升高, 同时海马锥体神经元树突分支数及树突棘密度均增加。上述结果提示电针改善脑缺血再灌注后学习记忆障碍与调控 AMPA 受体、增加突触可塑性有关。

综上所述,通督醒神针刺法可上调 AMPA 受体 GluR1、GluR2、GluR3 及辅助蛋白 TARP γ 2、TARP γ 8 的表达,增强海马突触可塑性,减轻脑缺血再灌注后学习记忆障碍模型大鼠神经功能缺损,这可能是其改善 PSCI 的作用机制之一。本研究还存在一定不足,如缺乏药物阳性对照组和假针刺对照组以更加全面地验证通督醒神针刺的作用。另外,AMPA 受体介导的突触可塑性还受到上游信号通路的调控,电针对其上游信号通路的调控作用仍待进一步研究。

参考文献

- [1] EINSTAD MS, SALTVEDT I, LYDERSEN S, et al. Associations between post-stroke motor and cognitive function: a cross-sectional study[J]. *Bmc Geriatrics*, 2021, 21(1): 103.
- [2] 高静,白艳杰,冯晓东.《欧洲卒中组织与欧洲神经病学学会卒中后认知障碍的联合指南》解读[J]. *华西医学*, 2022, 37(5): 641-645.
- [3] 薛洋,孙伟娟,刘飞来,等.电针神庭、百会联合功能康复训练治疗脑卒中后认知障碍 42 例[J]. *中医研究*, 2018, 31(1): 57-60.
- [4] 刘娇,冯晓东.电针百会、神庭穴配合康复训练治疗脑卒中后认知障碍临床研究[J]. *中医学报*, 2013, 28(4): 608-610.
- [5] 王岩,白艳杰,张铭,等.通督醒神针刺法对卒中后轻度认知障碍患者认知功能及精神行为症状的改善效果研究[J]. *中国全科医学*, 2021, 24(33): 4223-4228.
- [6] MOROZ LL, NIKITIN MA, POLICAR PG, et al. Evolution of glutamatergic signaling and synapses [J]. *Neuropharmacology*, 2021, 199: 108740. doi: 10.1016/j.neuropharm. 2021. 108740.
- [7] COOMBS ID, CULL-CANDY SG. Transmembrane AMPA receptor regulatory proteins and AMPA receptor function in the cerebellum [J]. *Neuroscience*, 2009, 162(3): 656-665.
- [8] CHEN Z, MORI W, ZHANG X, et al. Synthesis, pharmacology and preclinical evaluation of ¹⁴C-labeled 1,3-dihydro-2H-benzo[d]imidazole-2-ones for imaging γ 8-dependent transmembrane AMPA receptor regulatory protein [J]. *Eur J Med Chem*, 2018, 157: 898-908. doi: 10.1016/j.ejmech. 2018. 08. 019.
- [9] 余明月,苏凯奇,申昕,等.电针对脑缺血再灌注学习记忆障碍大鼠海马脑源性神经营养因子前体向成熟型脑源性神经营养因子转化和突触可塑性的影响[J/OL]. *针刺研究*. (2023-03-26) [2023-06-27]. <https://doi.org/10.13702/j.1000-0607.20221313>.
- [10] LONGA EZ, WEINSTEIN PR, CARLSON S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91.
- [11] 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.
- [12] 中医康复临床实践指南·脑卒中制定工作组. 中医康复临床实践指南: 脑卒中[J]. *康复学报*, 2019, 29(6): 6-9, 15.
- [13] 刘宏伟,焦雪蕾,刘晶晶,等.基于“督脉通于脑”理论探讨“通督益脑”法的形成及其治疗中医脑病的实践意义[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2021, 19(3): 515-518.
- [14] CHI X, WANG L, LIU H, et al. Post-stroke cognitive impairment and synaptic plasticity: a review about the mechanisms and Chinese herbal drugs strategies [J]. *Front Neurosci*, 2023, 17: 1123817. doi: 10.3389/fnins. 2023. 1123817.
- [15] KAMALOVA A, NAKAGAWA T. AMPA receptor structure and auxiliary subunits[J]. *J Physiol*, 2021, 599(2): 453-469.
- [16] SCHWENK J, BOUDKKAZI S, KOCYLOWSKI MK, et al. An ER assembly line of AMPA-receptors controls excitatory neurotransmission and its plasticity [J]. *Neuron*, 2019, 104(4): 680-692.
- [17] SHARMA H, REETA KH, SHARMA U, et al. AMPA receptor modulation through sequential treatment with perampanel and aniracetam mitigates post-stroke damage in experimental model of ischemic stroke [J]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2023. doi: 10.1007/s00210-023-02544-z.
- [18] CASTRO CC, DE SOUZA PA, MUNHOZ CD, et al. Coumestrol pre-treatment improves spatial learning and memory deficits following transient cerebral ischemia recruiting hippocampal GluR2 AMPA receptors [J]. *Hippocampus*, 2022, 32(6): 413-418.
- [19] DAY C, SILVA JP, MUNRO R, et al. Anti-AMPA receptor autoantibodies reduce excitatory currents in rat hippocampal neurons[J]. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2023, 16(1): 77.
- [20] 吴丽阳,章军建. AMPA 受体内化与认知功能关系的研究进展[J]. *神经损伤与功能重建*, 2021, 16(1): 33-36.
- [21] GOLUBEVA EA, LAVROV MI, RADCHENKO EV, et al. Diversity of AMPA receptor ligands: chemotypes, binding modes, mechanisms of action, and therapeutic effects[J]. *Biomolecules*, 2022, 13(1): 56.
- [22] YU J, RAO P, CLARK S, et al. Hippocampal AMPA receptor assemblies and mechanism of allosteric inhibition[J]. *Nature*, 2021, 594(7863): 448-453.
- [23] CARRILLO E, SHAIKH SA, BERKA V, et al. Mechanism of modulation of AMPA receptors by TARP- γ 8[J]. *J Gen Physiol*, 2020, 152(1): e201912451. doi: 10.1085/jgp. 201912451.

Effect of Tongdu Xingshen Needling Method (通督醒神针刺法) on Expression of AMPA Receptors and Their Accessory Proteins in the Hippocampus of Rats with Learning Memory Impairment After Cerebral Ischaemia-Reperfusion

RUAN Xiaodi¹, GAO Jing², LYU Zhuan², LI Qi¹, SU Kaiqi², GU Yiming¹, YU Mingyue¹, QI Shikui¹, LUO Meng¹, WU Mingli², WANG Huiling², SHEN Xin², FENG Xiaodong^{1,2}

1. Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou, 450046; 2. The First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine

ABSTRACT **Objective** To explore the possible mechanism of Tongdu Xingshen needling method (通督醒神针刺法) on post-stroke cognitive impairment. **Methods** SD rats were randomly divided into a normal group (n=12), a sham surgery group (n=12), a model group (n=12), and an electroacupuncture group (n=13). The rats in the model group and electroacupuncture group were subjected to the wire bolus method to establish the rats model with learning memory impairment after cerebral ischaemia-reperfusion. After successful modelling, the rats in the electroacupuncture group were given electroacupuncture interventions at “Shenting (GV 24)” and “Baihui (GV 20)” once a day for 30 minutes for 14 days. The other three groups did not receive other interventions but grasp. A 5-day localisation navigation experiment was conducted on the 9th day of intervention, and a spatial exploration experiment was conducted on the 14th day of intervention to evaluate the learning and memory abilities of the rats. After the spatial exploration experiment, hippocampal tissues were taken from each group of rats, and the changes in the volume of cerebral infarction were observed by TTC staining; the changes in the morphology of pyramidal neurons and the density of dendritic spines in the CA1 area of the hippocampus were observed by Golgi staining; protein immunoblotting was used to detect the relative protein expression of the subunits of the α -amino-3-carboxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid (AMPA) receptor including glutamate receptor 1 (GluR1), glutamate receptor 2 (GluR2), glutamate receptor 3 (GluR3) and auxiliary proteins TARP γ 2, TARP γ 8 in hippocampal tissues of rats in each group; the real-time fluorescence quantitative PCR was used to detect GluR1, GluR2, GluR3 mRNA levels in the hippocampal tissues of rats. **Results** In the localisation navigation experiment, compared with the normal group and sham surgery group, the escape latency and total distance of rats in the model group were significantly extended ($P<0.05$) at day 1, 2, 3, 4, and 5; and the escape latency and total distance of rats in the electroacupuncture group tended to be significantly shorter than those in the model group ($P<0.05$). In the spatial exploration experiment, compared with the normal group and the sham surgery group, the number of rats crossing the platform in the model group was significantly reduced ($P<0.05$), and the number of crossings of the platform in the electroacupuncture group increased significantly ($P<0.05$). The results of TTC staining showed that the volume of cerebral infarction increased clearly in the model group compared with the sham surgery group ($P<0.05$), and apparently decreased in the electroacupuncture group compared with the model group ($P<0.05$). Golgi staining showed that the number of dendritic branches of pyramidal neurons and dendritic spines in hippocampal CA1 region significantly decreased in the model group compared with the normal group and the sham surgery group ($P<0.05$). The number of dendritic branches of pyramidal neurons and the density of dendritic spines in hippocampal CA1 region significantly increased in the electroacupuncture group compared with the model group ($P<0.05$). The protein relative expression levels of GluR1, GluR2, GluR3, TARP γ 2 and TARP γ 8, and the mRNA levels of GluR1, GluR2 and GluR3 in hippocampus decreased in the model group compared with the normal group and the sham surgery group ($P<0.05$). The protein relative expression levels of GluR1, GluR2, GluR3, TARP γ 2 and TARP γ 8, and the mRNA levels of GluR1, GluR2 and GluR3 in hippocampus increased in the electroacupuncture group compared with model group ($P<0.05$). **Conclusion** The Tongdu Xingshen needling method can improve learning memory impairment after cerebral ischaemia-reperfusion, which may be related to up-regulation of the expression of AMPA receptor and their auxiliary protein TARP, and promoting the synaptic plasticity of hippocampal tissues.

Keywords stroke; cognitive impairment; cerebral ischaemia-reperfusion; electroacupuncture; learning and memory impairment; AMPA receptors; Tongdu Xingshen

(收稿日期: 2023-06-27; 修回日期: 2023-09-25)

[编辑: 邓媛]