

引用:刘庆臻,罗来,易婉莎,等.电针神庭、百会穴对 MCAO/R 大鼠 γ -氨基丁酸受体 *Gabbr1* 表达的影响[J].陕西中医药大学学报,2024,47(3):105-109.

电针神庭、百会穴对 MCAO/R 大鼠 γ -氨基丁酸受体 *Gabbr1* 表达的影响*

刘庆臻¹ 罗来^{2,3} 易婉莎¹ 张叶¹ 刘淑如^{2,3} 许金森^{2,3} 潘晓华^{2,3**}

(1.福建中医药大学针灸推拿学院,福建 福州 350108;2.福建省中医药科学院,福建 福州 350003;
3.福建省经络感传重点实验室,福建 福州 350003)

摘要:目的 通过观察电针神庭、百会穴对大鼠中动脉缺血再灌注模型(middle cerebral artery occlusion and reperfusion, MCAO/R)认知功能障碍大鼠海马区 γ -氨基丁酸 B 受体 *gabbr1* 表达的影响,探讨电针改善 MCAO/R 大鼠学习记忆能力的可能机制。方法 27 只雄性健康 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组、电针组;模型组、电针组采用 longa 线栓法制备 MCAO/R 模型,假手术组仅分离颈总、颈内及颈外动脉,不插入线栓,造模后通过 longa 五分法验证模型。电针组取神庭、百会穴在造模后 24 h 进行干预,治疗 7 d;干预第 3 d 采用 Morris 水迷宫实验检测各组大鼠学习记忆能力,为期 4 d;干预第 7 d 断头取大鼠完整海马组织,采用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)检测各组大鼠海马组织中 *gabbr1* mRNA 的表达。结果 与假手术组相比,模型组水迷宫实验的第三象限距离比显著减小($P<0.05$),穿越平台次数减少($P<0.01$);与模型组相比,电针组经治疗后第三象限距离比扩大($P<0.05$),穿越平台次数增加($P<0.05$)。与假手术组相比,模型组海马区 *gabbr1* mRNA 表达量显著增高($P<0.01$);与模型组相比,电针组海马区 *gabbr1* mRNA 表达降低($P<0.01$)。结论 电针神庭、百会穴能改善脑缺血再灌注大鼠的学习记忆能力,其机制可能与调节 *gabbr1* mRNA 在海马中的表达有关。

关键词:MCAO/R;学习记忆能力;电针;神庭;百会;*gabbr1*

中图分类号:R245.9⁺7

文献标识码:A

文章编号:2096-1340(2024)03-0105-05

DOI:10.13424/j.cnki.jsctcm.2024.03.015

脑卒中在我国患病率为 1700/10 万,居世界首位^[1],死亡率和伤残率分别为 149.49/10 万和 1148/10 万^[2],具有高发病率、高死亡率、高致残率的特点。卒中后认知障碍(post-stroke cognitive impairment, PSCI)是脑卒中的常见后遗症,为血管性认知障碍亚型^[3],约 72.5%的卒中患者会经历卒中后认知障碍^[4],表现为记忆、学习、执行能力低下、注意力不集中等,严重影响生活质量,极大增加了家庭负担,被世界卫生组织列为公共卫生严峻挑战之一^[5]。针刺疗法因其简便有效的优点,被运用于脑卒中的治疗中,其中电针因其可量化、可控制、可调节的特点在治疗中被广泛运用,大量

的实验及临床研究表明电针在确保安全的前提下,可以较好改善 PSCI 患者的认知功能障碍^[6]。

γ -氨基丁酸(γ -Aminobutyric acid, GABA)是大脑中枢神经系统(central Nervous System, CNS)的抑制性神经递质,与认知功能损害密切相关^[7]。GABAB 受体是 GABA 的亚型之一, *gabbr1* 为 GABAB 受体的重要亚基,由 *gabbr1* 基因编码,影响 GABAB 受体的表达以及对认知功能的改善^[8]。*gabbr1* 的表达改变影响认知功能在阿尔兹海默病相关研究中也得到证实^[9]。本实验意在通过观察电针神庭、百会对脑缺血再灌注(middle cerebral artery occlusion and reperfusion, MCAO/R)大鼠海

* 基金项目:福建省自然科学基金面上项目(2022J01355);福建省属公益类科研院所基本科研专项(2021R1003008, 2022R1003009);福建省卫健委科技计划项目(2021zyjc18)

** 通讯作者:潘晓华,硕士研究生导师,副研究员。E-mail:pxhmm@126.com

马 *gabbr1* mRNA 表达的影响,探讨电针治疗脑卒中后认知障碍的作用机制,以期为脑卒中的理论研究及临床靶向治疗拓展一定思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物 SPF 级,雄性 SD 大鼠 27 只,由北京华阜康生物科技股份有限公司提供,许可证号 SCXK(京)2019-0008,体质量(270 ± 10)g,由福建省中医药科学院实验动物中心负责喂养,每笼 4~5 只,将大鼠放置在温度 $24 \sim 26\text{ }^{\circ}\text{C}$,湿度(50 ± 20)%,保持通风和光照的环境下喂养,自由饮食,为期 1 周的适应性喂养后进行实验动物模型的制备,实验中对动物的各项处理均按照 2021 年公布的《实验动物管理条例》(征求意见稿)执行。

1.2 主要仪器与试剂 R407 小动物呼吸麻醉机(深圳瑞沃德生命科技公司),L3800 号线栓(广州佳灵生物技术有限公司),MT-200 型 Morris 水迷宫实验装置(四川成都泰盟科技有限公司),ABI step one plus 荧光定量 PCR 检测仪(美国应用生物系统公司),华佗牌 SDZ-II 型电子针疗仪(苏州医疗用品厂有限公司),环球牌 $0.25\text{ mm} \times 13\text{ mm}$ 无菌毫针(苏州针灸用品有限公司),Fast Quantity RT Kit 逆转录试剂盒(货号 KR106,北京天根生化科技公司),Trizol 试剂(批号 380710,美国默赛飞公司)。*gabbr-1* 引物(序列 F: $5'\text{-AGCCAGTTCCCGTTTGTCT-3'}$, R: $5'\text{-GGGTCTTCCTCCACTCCTTCT-3'}$;大小 145 bp)、GAPDH 引物(序列 F: $5'\text{-GGCAAGT-TCAACGGCACA-3'}$, R: $5'\text{-CCCCATTTGATGTTA-GCGG-3'}$;大小 93 bp)。

1.3 模型分组与制备 采用随机数字表法将实验大鼠分为:电针组、假手术组和模型组,每组各 9 只。大鼠术前禁食,参考 Zea Longa 线栓法^[10]制备 MCAO/R 模型。用异氟烷吸入麻醉,设定诱导浓度为 2.5%,将大鼠放入麻醉诱导盒中,持续 2 min 左右,待大鼠呼吸均匀、触碰四肢无反应后取出,将其头鼻放置于麻醉面罩里固定,并将诱导浓度调至 1.5%维持麻醉深度。将麻醉状态大鼠仰卧状固定于手术板上,备皮消毒,从颈前正中偏左轻剪开皮肤,充分暴露左侧颈总动脉(common carotid artery, CCA)、颈外动脉(external carotid artery,

ECA)、颈内动脉(internal carotid artery, ICA),在颈外动脉远心端进行结扎,动脉夹夹闭 CCA 和 ICA,然后在 ECA 和 CCA 相接靠近 ECA 3 mm 处剪开一小口,缓慢插入部分线栓,并用缝合线打一活结固定住线栓,调整角度,将线栓缓慢插入大脑中动脉约 $18 \sim 20\text{ mm}$,遇到轻微阻力时即停止,固定线栓,缝合伤口并消毒。待缺血 2 h 后回抽线栓至 CCA 分叉处,完成再灌注。假手术组仅分离颈总、颈内和颈外动脉,不做其他措施。参照 longa 五分法^[10]评估造模大鼠神经功能缺损情况,其中 0 分:无明显神经缺损症状;1 分:提尾时不能伸展对侧前爪;2 分:提尾时向对侧转圈;3 分:行走时自发性向对侧倾倒;4 分:不能自发行走,意识丧失。1~3 分则代表模型制备成功。本次实验共制备模型大鼠 20 只,根据 longa 五分法剔除 0 分、4 分大鼠各 1 只;模型检验成功的 18 只 MCAO/R 大鼠随机分为电针组和模型组,每组各 9 只。

1.4 干预措施 电针组依据《实验针灸学》^[11]选取神庭穴和百会穴,提捏进针 $0.3 \sim 0.5\text{ mm}$,连接电针仪,设定电流 $1 \sim 3\text{ mA}$,疏密波,频率 $2/20\text{ Hz}$,以大鼠耐受及穴位周边肌肉组织轻微抖动为度。于术后第 1 d 开始干预,每天 1 次,每次 20 min,持续 7 d。假手术组与模型组同样条件抓取后回笼饲养,不予电针干预。

1.5 观察及检测方法

1.5.1 Morris 水迷宫测试 在造模后的第 3 d,采用 Morris 水迷宫测试大鼠空间学习和记忆能力。在 Morris 水迷宫的水池放置一个直径 5 cm 的透明圆形逃生平台,池内水位 30 cm,水池分为 4 个象限,逃生平台放置于第 3 象限。水迷宫定位航行实验:实验开始前先将大鼠放置于平台适应学习 2 min,之后将大鼠分别从水池的 4 个象限以顺时针方向按顺序依次将大鼠面朝池壁放入水中,测试其在 90 s 内到达第三象限的距离路程与总路程之间的比值(第三象限距离比=第三象限距离/总路程)。以此类推再进行下一象限的测试,共测试 4 d。水迷宫空间探索实验:造模后第 7 d,撤去平台,将大鼠依次从 4 个象限按顺序放入水池,观察 90 s 内大鼠穿越原平台放置象限的次数。

1.5.2 qRT-PCR 检测脑海马组织 *gabbr1* mRNA 表达 大鼠用异氟烷麻醉后,断头取出全脑,在冰台上迅速分离出左侧海马组织,放于液氮罐中冻存,−80 ℃ 冰箱保存。取冰箱冻存的左侧整块海马组织放入研磨仪中,加入少许液氮预冷后,研磨成极细的粉末。参照 Trizol 试剂盒说明提取样本中 RNA。引物序列通过 NCBI 网站 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 下载基因序列,基因 ID:81657,再由 Primer Premier 5 软件设计完成。参照 Fast Quantity RT Kit 逆转录试剂盒说明书反转录为 cDNA,以 cDNA 为模板进行 qPCR,反应体系 10 μL:上下游引物各 0.3 μL,cDNA 2 μL,q-PCR master Mix 5 μL,ddH₂O 2.4 μL。反应参数设置为:95 ℃ 预变性 2 min,95 ℃ 15 s,50 ℃ 15 s,72 ℃ 20 s,40 个循环。以 GAPDH 作为内参基因,按照 2^{−ΔΔCt} 方法处理数据,计算 *gabbr1* mRNA 相对表达量,引物序列,见表 1。

1.6 统计学方法 采用 SPSS 23.0 进行统计学分

析,计量资料用($\bar{x} \pm s$)表示,正态检验符合正态分布且方差齐性采用单因素方差分析,并以 LSD 法进行组间的两两比较。不符合正态分布则采用非参数秩和检验,成对比较。 $P < 0.05$ 表明差异有统计学意义。

表 1 引物序列

基因	序列	产物长度(bp)
<i>gabbr1</i>	上游:5'-AGCCAGTTCGCGTTTGTCT-3'	145
	下游:5'-GGGTCTTCCTCCACTCTTCT-3'	
GAPDH	上游:5'-GGCAAGTTCAACGGCACA-3'	93
	下游:5'-CCCCATTGTGATGTTACCGG-3'	

2 结果

2.1 Morris 水迷宫测试结果

2.1.1 定向航行实验 与假手术组相比,模型组每日第三象限距离比相较假手术组均显著减小($P < 0.05$)。与模型组相比,电针组每日第三象限距离比显著增加($P < 0.05$),且电针组每日第三象限距离与总路程比呈上升趋势。结果见表 2。

表 2 各组大鼠定向航行实验每日第三象限距离比($\bar{x} \pm s$)

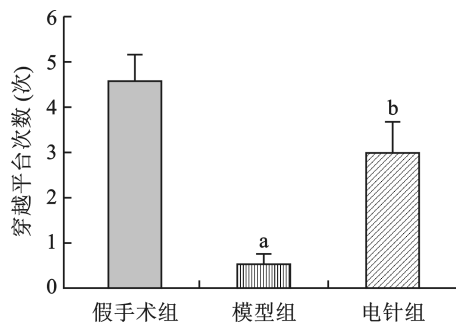
组别	<i>n</i>	造模后第 3 天	造模后第 4 天	造模后第 5 天	造模后第 6 天
假手术组	9	0.46±0.03	0.43±0.03	0.46±0.03	0.36±0.03 ^c
模型组	9	0.30±0.04 ^a	0.31±0.03 ^a	0.35±0.04 ^a	0.30±0.02 ^a
电针组	9	0.39±0.02 ^b	0.41±0.03 ^b	0.45±0.04 ^b	0.45±0.02 ^b

注:^a与假手术组比较, $P < 0.05$;^b与模型组比较, $P < 0.05$;^c与电针组相比较, $P < 0.05$

2.1.2 空间探索实验 模型组穿越平台次数显著少于假手术组($P < 0.01$),电针组相较于模型组穿越平台次数显著增多($P < 0.05$)。结果见图 1。

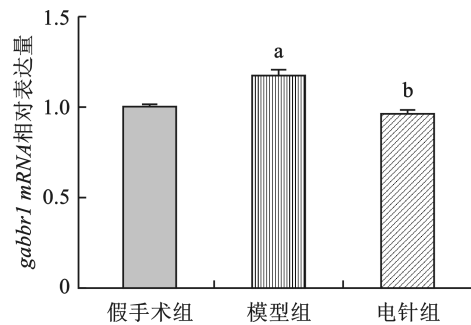
2.2 左侧海马 *gabbr1* mRNA 表达情况 与假手术

组相比,模型组 *gabbr1* mRNA 表达量显著增高($P < 0.01$);与模型组相比,电针组、假手术组 *gabbr1* mRNA 表达量均显著降低($P < 0.01$)。结果见图 2, *gabbr1* 的溶解与扩增曲线见图 3。



注:a.与假手术组比较, $P < 0.01$;b.与模型组比较, $P < 0.05$

图 1 各组大鼠空间探索实验穿越平台次数



注:a.与假手术组比较, $P < 0.01$;b.与模型组比较, $P < 0.01$

图 2 *gabbr1* mRNA 相对表达量

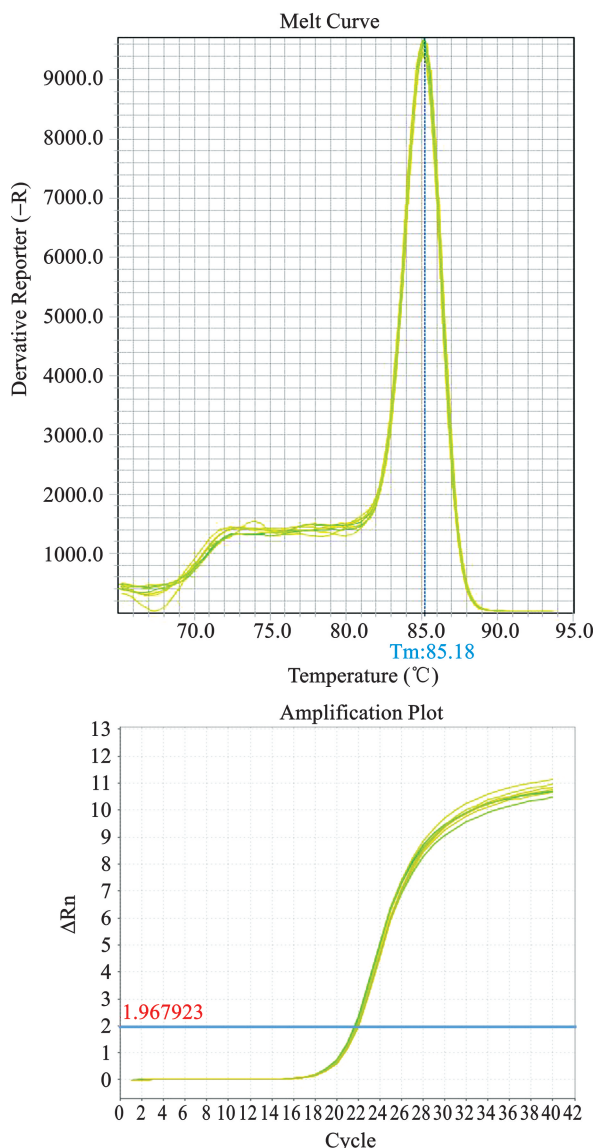


图3 溶解与扩增曲线

3 讨论

PSCI在中医临床上将其归属于“呆病”“健忘”等范畴,病位在脑,病理因素多为虚、痰、瘀,病性虚实夹杂^[12]。《灵枢·邪气脏腑病形》云:“病变在脑,首取督脉。”表明了督脉是治疗脑疾的首选。督脉畅通,调控全身阳气,髓海充足,元神得养。神庭和百会是督脉上的要穴,分别为脑神所居和百神之会,有宁神醒脑、调神益智之功效。有研究^[13-16]发现神庭、百会穴对PSCI患者认知功能改善具有明显疗效。胡延超等^[17]表明电针可通过调节信号通路反应,参与神经突触的重塑等改善学习记忆功能。因此本次研究通过电针大鼠神庭、百会穴探索其改善学习记忆功能的效果,水迷宫结果提示电针组大鼠较模型组大鼠的空间

及学习能力有所改善。

GABAB属于G蛋白偶联受体,介导神经传递,在中枢神经系统中起抑制效应。GABAB受体的功能障碍与抑郁、记忆和癌症等多种疾病有关^[18-19]。研究发现GABAB受体在海马、额叶皮层和丘脑等与学习认知相关的大脑区域中高度表达,影响神经元的活性、可塑性以及突触传递之间的平衡^[20-22]。最近研究表明^[23]缺血性脑卒中会导致GABAB的表达改变,影响它所介导的抑制神经兴奋性毒性功能,加剧脑神经死亡,引起学习记忆功能障碍^[24]。

*gabbr1*参与GABAB的基因转录,调控GABAB的反应性,是影响突触兴奋性与抑制性平衡的关键^[25-26]。树突棘是神经元树突分支上的棘状突起,是GABAB神经元产生突触的主要结构,能调控神经信号传递,与突触的形态重塑密切相关。树突棘数量减少或形态异常,会引起认知、学习记忆功能下降^[27]。*gabbr1*主要在海马突触后表达,能通过激活 K^+ 通道阻断树突细胞的电压门钙通道,减少树突内的 Ca^{2+} 浓度,破坏树突棘中肌动蛋白细胞骨架的稳定性,导致树突棘数量丢失和形态变化,改变突触传递效能,影响突触可塑性^[28-29]。杨培丹等^[30]发现智三针电针治疗会增加树突棘密度,增强突触信号连接,改善血管性痴呆小鼠的工作记忆能力。且本实验结果显示,模型组大鼠海马组织中*gabbr1* mRNA的表达量明显上升,提示脑卒中会激活*gabbr1*的表达。经过电针干预后,电针组的*gabbr1* mRNA表达量有了显著下降,说明电针神庭、百会穴抑制*gabbr1*的表达。推测电针可能通过降低*gabbr1*,提高树突棘密度,增强GABAB神经元突触间的神经信号传导,调节突触重塑,从而改善脑卒中后的学习记忆水平。

综上所述,结合Morris水迷宫测试结果,研究表明电针神庭、百会穴可以降低*gabbr1*的mRNA表达水平影响突触可塑性从而改善MCAO/R大鼠的学习记忆能力。所以,*gabbr1*是影响学习记忆的重要靶点。但脑卒中发生机制复杂,电针干预*gabbr1*是否会产生不同的上下游联动机制来达到改善卒中后认知障碍的症状还有待继续深入探索。

参考文献

- [1]GBD 2019 STROKE COLLABORATORS.Global, regional, and national burden of stroke and its risk factors, 1990-

- 2019; a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019 [J]. The Lancet Neurology, 2021, 20 (10): 795-820.
- [2] 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.
- [3] 齐宝云, 刘飞. 基于外泌体探讨卒中后认知障碍的中医辨治[J]. 现代中医药, 2023, 43(3): 20-24.
- [4] IADECOLA C, DUERING M, HACHINSKI V, et al. Vascular Cognitive Impairment and Dementia; JACC Scientific Expert Panel [J]. Journal Of The American College Of Cardiology, 2019, 73(25): 3326-3344.
- [5] SUN JH, TAN L, YU JT. Post-stroke cognitive impairment: epidemiology, mechanisms and management [J]. Annals of Translational Medicine, 2014, 2(8): 80.
- [6] 詹杰, 王学文, 程南方, 等. 电针治疗脑卒中后认知障碍的系统评价[J]. 中国针灸, 2017, 37(10): 1119-1125.
- [7] PRÉVOT T, SIBILLE E. Altered GABA-mediated information processing and cognitive dysfunctions in depression and other brain disorders [J]. Molecular Psychiatry, 2021, 26(1): 151-167.
- [8] 朱学芳, 顾永健, 陈芬. γ -氨基丁酸对慢性脑缺血致血管性痴呆大鼠认知功能的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2010, 30(22): 3331-3333.
- [9] IWAKI M, MIZUKAMI K, KONOMOVIC MD, et al. Changes in hippocampal GABABR1 subunit expression in Alzheimer's patients: association with Braak staging [J]. Acta Neuropathologica, 2005, 109(5): 467-474.
- [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] 郭义. 实验针灸学指导 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2021: 78-81.
- [12] 孙盼盼, 张敬华, 虞鹤鸣. 卒中后认知障碍中医研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2020, 22(9): 114-117.
- [13] 刘芳, 姚立群, 陈金辉. 针刺百会、神庭穴治疗脑卒中后认知功能障碍效果的系统评价 [J]. 上海针灸杂志, 2018, 37(1): 104-111.
- [14] 陈晓琳, 单晓倩, 史维霞, 等. 针刺百会、神庭穴治疗卒中后认知障碍机制研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2023, 25(08): 67-71.
- [15] 陈磊, 焦鹏, 李方辉. 针刺百会、神庭穴联合康复训练治疗卒中后认知功能障碍 [J]. 中国老年保健医学, 2020, 18(02): 11-13.
- [16] 刘润利. 电针神庭、百会对脑卒中后轻度认知障碍的临床研究 [J]. 临床医学研究与实践, 2017, 2(29): 101-102.
- [17] 胡延超, 李瑞青, 郝文雪, 等. 电针治疗脑卒中后认知障碍的机理研究 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2021, 27(7): 1186-1190.
- [18] EVENSETH L, GABRIELSEN M, SYLTE I. The GABA (B) Receptor-Structure, Ligand Binding and Drug Development [J]. Molecules, 2020, 25(13).
- [19] BETTELLER B, KAUPMANN K, MOSBACHER J, et al. Molecular Structure and Physiological Functions of GABAB Receptors [J]. Physiological Reviews, 2004, 84(3): 835-867.
- [20] BOWERY NG, HUDSON AL, PRICE GW. GABAA and GABAB receptor site distribution in the rat central nervous system [J]. Neuroscience, 1987, 20(2): 365-383.
- [21] BASSETTI D. Keeping the Balance: GABAB Receptors in the Developing Brain and Beyond [J]. Brain Sciences, 2022, 12(4): 419.
- [22] SERRATS J, CUNNINGHAM M O, DAVIES C H. GABA (B) receptor modulation-to B or not to be B a pro-cognitive medicine? [J]. Current Opinion In Pharmacology, 2017, 35: 125-132.
- [23] BALAKRISHNAN K, HLEIHIL M, BHAT M A, et al. Targeting the interaction of GABA (B) receptors with CaMKII with an interfering peptide restores receptor expression after cerebral ischemia and inhibits progressive neuronal death in mouse brain cells and slices [J]. Brain Pathology, 2023, 33(1): e13099.
- [24] 于静, 田俊杰, 王建福, 等. 补阳还五汤加水蛭对脑梗死大鼠学习记忆能力和神经元自噬的影响 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2022, 24(10): 4007-4014.
- [25] FAVUZZI E, HUANG S, SALDI G A, et al. GABA-receptive microglia selectively sculpt developing inhibitory circuits [J]. Cell, 2021, 184(15): 4048-4063.
- [26] FRITZIUS T, STAWARSKI M, ISOGAI S, et al. Structural Basis of GABAB Receptor Regulation and Signaling [J]. Current Topics in Behavioral Neurosciences, 2022, 52: 19-37.
- [27] FU M, ZUO Y. Experience-dependent structural plasticity in the cortex [J]. Trends In Neurosciences, 2011, 34(4): 177-187.
- [28] SANCHEZ-VIVES MV, BARBERO-CASTILLO A, PEREZ-ZABALZA M, et al. GABA (B) receptors: modulation of thalamocortical dynamics and synaptic plasticity [J]. Neuroscience, 2021, 456: 131-142.
- [29] 郝玉蕾. CaMK II/cofilin/F-actin 通路影响神经元细胞骨架重组调控颞叶癫痫树突棘可塑性 [D]. 长春: 吉林大学, 2022.
- [30] 杨培丹, 贺君. 智三针电针治疗对血管性痴呆小鼠工作记忆改善及作用机制的研究 [J]. 新中医, 2022, 54(20): 165-170.

(修回日期: 2023-05-15 编辑: 宋蓓)