

# 针刺对老年大鼠腹部 手术后海马促炎因子表达的影响\*

曾素冰<sup>1</sup> 徐少群<sup>2\*\*</sup> 叶新梅<sup>1</sup> 李 中<sup>1</sup>

(1. 中山大学附属第六医院神经内科, 广东 广州 510665; 2. 广东省中医院麻醉科, 广东 广州 510120)

**摘 要:**目的 观察针刺对老年大鼠腹部手术后海马促炎因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 表达的影响。方法 20 月龄 SD 大鼠 40 只随机分成 5 组: 对照组(C 组), 手术后 1 天处死组(S1 组)、手术后 3 天处死组(S3 组), 针刺后 1 天处死组(A1 组), 针刺后 3 天处死组(A3 组), 每组 8 只。采用开腹行脾切除术方法复制手术创伤模型。Y 迷宫法检测大鼠的空间学习记忆能力; 术后 1 天及 3 天取大鼠海马组织, 实时定量 PCR 法测定海马组织 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 mRNA 表达。结果 与 C 组比较, 各实验组大鼠训练达标时间、学习次数、海马促炎因子表达显著增多( $P < 0.05$ ), 尤以 S1 组增多显著; 分别与 S1 组、S3 组比较, A1 组、A3 组大鼠训练达标时间、学习次数、海马促炎因子表达显著降低( $P < 0.05$ ), 尤以 S3 组下降显著。结论 手术创伤可引发老年大鼠空间记忆能力减弱, 海马促炎因子表达增多, 针刺可抑制海马促炎因子表达, 减轻老年大鼠空间记忆能力损害, 这可能是针刺防治 POCD 的作用机理之一。

**关键词:** 针刺; 术后认知功能障碍; 促炎细胞因子

**中图分类号:** R 245.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-168X(2015)06-0099-03

**DOI:** 10.13424/j.cnki.jsctcm.2015.06.035

术后认知功能障碍(postoperative cognitive dysfunction, POCD)是指手术麻醉后数天内发生的意识、认知、定向、思维、记忆以及睡眠等方面的紊乱, 是一种老年患者手术后常见的急性精神紊乱综合征<sup>[1]</sup>。本课题组前期研究表明<sup>[2]</sup>, 针刺可明显改善老年患者肠癌切除术后认知功能障碍。为进一步探讨其中枢作用机制, 2013 年 5 月~2013 年 10 月, 我们观察了针刺对老年大鼠腹部手术后海马促炎因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 表达的影响。

## 1 材料与方法

**1.1 动物选择和分组** 20 月龄 SPF 级老年 SD 大鼠 40 只, 雌雄各半, 体重 550~640 g, 由长沙勤勤生物技术有限公司提供, 许可证编号: SCXK(湘)2009-0012。将大鼠随机分成 5 组: 对照组(C 组), 手术后 1 天处死组(S1 组)、手术后 3 天处死组(S3 组), 针刺后 1 天处死组(A1 组), 针刺后 3 天处死组(A3 组), 每组 8 只。

**1.2 针刺处理与模型制备** C 组不予任何干预措

施; S 组按照 Wan Y<sup>[3]</sup>报道方法开腹行脾切除术。具体步骤: 予腹腔内注射 10% 水合氯醛(0.25 mL/100 g)后, 将大鼠固定于手术台上, 手术切口处备皮、消毒, 以 0.25% 布比卡因作局部浸润麻醉, 在上腹部左锁骨中线做一 1.5 cm 小切口, 游离出脾脏, 结扎脾门神经血管后, 完整切除脾脏, 然后用手术缝线逐层关腹, 所有手术步骤均无菌操作。A 组于麻醉前 20 min, 取百会穴+印堂穴行针刺, 接微电脑脉冲针灸治疗仪(英迪 KWD-808I)连续刺激, 20 min 后进行 S 组操作, 电针刺激持续至手术操作完毕。选穴方法: 根据中国针灸学会实验针灸研究会制定的《动物针灸学位图谱》进行选择; 针刺方法: 选用型号为 15 mm×0.26 mm 的毫针, 采用疏密波, 频率为 2/15 Hz, 电针强度为引起局部肌肉微抖动。

各组大鼠于术后 1 d、3 d 进行行为学测试后, 于术后 1 天腹腔注射 10% (w/V) 水合氯醛(0.4 mL/kg)过量麻醉 S1 组、A1 组, 于术后 3 天腹腔注射 10% (w/V) 水合氯醛(0.4 mL/kg)过量麻醉 C 组、S3 组

\* 基金项目: 广东省中医药局科研课题项目(20131221)

\*\* 通讯作者: 徐少群(1982-), 男, 主治医师, 医学博士, 研究方向: 围手术期器官保护。E-mail: 50975376@qq.com.

及 A1 组,经心脏灌注 0.9 % 生理盐水后,以 4 % 多聚甲醛灌注固定,断头取脑后,冰上分离出大鼠海马组织,迅速置于液氮中保存备测 PCR。

### 1.3 观察指标与测定方法

**1.3.1 空间记忆能力(Y 迷宫法)检测** 分别于手术前,术后 1 d、3 d 将各组大鼠行 Y 迷宫检测,实验前先将大鼠放入迷宫,让其适应 5 min,训练组大鼠在起步区予以电击致其逃至安全区,灯光持续 15 s,然后熄灯休息 10 s,开始下一次操作。每次实验在每只大鼠上重复 10 次为一轮。实验在黑暗、安静的环境中进行。凡大鼠受电击后 10 s 内一次性从起步区逃至安全区的反应称为“正确反应”,否则为“错误反应”。直至连续 10 次中有 9 次正确反应即为达到学会标准,记录学习次数及训练达标时间。

表 1 TNF-α、IL-1β、IL-6/GAPDH 上引物序列和扩增产物长度

基因	上游引物	下游引物	bp
TNF-α	5'-AACTGGCAGAGGAGGCC-3'	5'-CAGAAGACGCTGGTGCG-3'	115
IL-1β	5'-CTGGGATGATGACGACC-3'	5'-TACGACCAGAGGCATACAGC-3'	241
IL-6	5'-CCGGAGAGGAGACTTCACAG-3'	5'-CAGAATTGCCATTGCACAAC-3'	134
GAPDH	5'-CCCCCAATGTATCCGTTGTG-3'	5'-TAGCCCAGGATGCCCTTTACT-3'	118

**1.4 统计学方法** 各组数据以( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用 SPSS13.0 统计软件行单因素方差分析(ANOVA)及 LSD 检验。 $P < 0.05$  为差异有显著统计学意义。

## 2 结果

**2.1 空间记忆能力检测** 如表 2 所示,与 C 组比较,各实验组大鼠训练达标时间、学习次数显著增多( $P < 0.05$ ),尤以 S1 组增多显著;分别与 S1 组、S3 组比较,A1 组、A3 组大鼠训练达标时间、学习次数显著降低( $P < 0.05$ ),尤以 S3 组下降显著。

表 2 各组空间记忆能力指标比较( $n = 8, \bar{x} \pm s$ )

组别	训练达标时间(min)	学习次数(次)
C 组	35.95±0.61	31±2.14
S1 组	49.04±1.41 *	43.75±1.75 *
S3 组	44.51±0.93 *	39.88±2.36 *
A1 组	42.84±0.92 *△	37.38±2.39 *△
A3 组	38.24±0.87 **	34.13±2.75 **

注: \* $P < 0.05$  versus C 组, △ $P < 0.05$  versus S1 组, # $P < 0.05$  versus S3 组。

**2.2 TNF-α、IL-1β、IL-6 mRNA 相对表达量变化** 与 C 组比较,各实验组大鼠海马促炎因子表达显著增多( $P < 0.05$ ),尤以 S1 组增多显著;分别与 S1 组、S3 组比较,A1 组、A3 组大鼠海马促炎因子表达显著降低( $P < 0.05$ ),尤以 S3 组下降显著。

**1.3.2 实时定量 PCR 法测定 TNF-α、IL-1β、IL-6 mRNA** 液氮中取出海马组织,加入 TRIZOL (roche,瑞士)提取总 RNA,测定其浓度并计算其纯度。按照 Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒(roche,瑞士)说明进行逆转录。实时定量 PCR 采用 SYBR Green 法,使用 SYBR Green 定量 PCR 试剂盒(roche,瑞士)进行检测,各组分添加完成充分混匀后稍离心,在 Roter-Gene 6000 定量 PCR 仪(QIAGEN,德国)中进行荧光定量 PCR 扩增反应。主要热循环参数为:预变性 95 ℃ 10 min,变性 5 ℃ 15 s,退火 64 ℃ 30 s,延伸 72 ℃ 30 s,循环 40 次,通过软件分析得到各组样品的  $C_t$  值,以  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  值表示各组基因的相对表达量。各促炎因子引物合成由英潍捷基(上海)贸易有限公司完成,引物序列为见表 1。

见表 3。

表 3 各组海马促炎因子 mRNA 相对表达量( $n = 4, \bar{x} \pm s$ )

组别	TNF-αmRNA	IL-1βmRNA	IL-6 mRNA
C 组	1±0	1±0	1±0
S1 组	54.74±5.48 *	4.47±0.24 *	22.03±2.71 *
S3 组	22.20±2.77 *	2.59±0.30 *	8.53±1.34 *
A1 组	36.80±4.58 *△	3.66±0.28 *△	9.59±1.64 *△
A3 组	9.60±1.64 **	1.57±0.17 **	4.63±0.77 **

注: \* $P < 0.05$  versus C 组, △ $P < 0.05$  versus S1 组, # $P < 0.05$  versus S3 组。

## 3 讨论

术后认知功能障碍(postoperative cognitive dysfunction, POCD)是老年患者手术后常见神经系统并发症,在非心脏手术后 1 周内发病率高达 25.8 % - 48.6 %<sup>[1]</sup>。当前,随着世界老龄化的加剧,65 岁以上的老年人所占比例接近 12 %,据估计这些老年人在其余生至少有一半会接受一次手术,而 POCD 不仅延长住院时间,增加术后死亡率,严重危害老年人术后身心恢复,更进一步加重了家庭及社会医疗保障体系的负担。因此,采取积极措施防治 POCD 有着十分重要的临床和社会意义,并已成为全世界关注的热点课题。本课题组成员根据长期从事围手术期重大疾病的中西医结

合防治工作的经验总结,结合中医脑病学理论的独特优势,针刺在多种缺血缺氧性脑病所致认知功能障碍中良好的防治效果,积极探索围手术期进行针刺干预对防治 POCD 的作用<sup>[4-5]</sup>,即往临床研究已表明<sup>[2]</sup>,针刺可明显改善老年患者肠癌切除术后认知功能障碍。本实验也提示,手术创伤可引发老年大鼠空间记忆能力减弱,而针刺可减轻这种记忆能力的损害。这充分表明,针刺可用于防治 POCD。

根据 POCD 的临床表现,该病应属于中医“健忘”范畴。中医理论认为,此病为风火痰瘀阻滞脑络、上扰脑神或肝、肾、脾亏虚、脑髓失充所致。病位在脑。故治法应立足于通络启闭,醒神开窍。经络学说认为:督脉起于胞中,上行人脑达巅。因此历代医家素有“病变在脑,首取督脉”之说。百会为督脉之要穴,是诸阳之会,针刺百会可调督脉、提升阳气,开窍启闭,醒神安神;印堂虽属经外奇穴,但实位于督脉循行路线之上,针刺印堂穴,可推动督脉气血的运行,故可治督脉所过部位的病证,有凝神定志,改善脑部缺血之功,二穴效应皆直接作用于脑神经,开窍醒神通络,使机体血氧新分配,以保护脑组织故此,本研究选取了百会及印堂两个穴位对老年腹部手术大鼠进行术前干预。

研究表明<sup>[6]</sup>,电针百会印堂穴可对脑损伤大鼠神经元起保护作用。这种保护作用在于针刺能增加大鼠皮质和海马神经元 Bcl-2 蛋白表达,降低 Bax 蛋白表达,抑制神经元凋亡和坏死,保护缺血损伤后的皮质和海马神经元,改善大鼠的学习记忆功能<sup>[7]</sup>。其机理可能在于针刺能抑制脑内 TNF- $\alpha$ mRNA 等促炎因子的表达从而减少 TNF- $\alpha$ mRNA 蛋白的合成有关<sup>[8]</sup>。大脑海马及其神经元突触的长时程增强(long-term potentiation LTP)与学习记忆密切相关,结构及功能的受损均可导致学习记忆的障碍<sup>[9]</sup>。既往研究表明,促炎介质释放会促进海马神经元凋亡、抑制 LTP,导致动物出现认知障碍<sup>[10]</sup>。TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 等促炎介质通过直接或间接途径影响中枢神经功能,IL-1 和 TNF- $\alpha$  可通过脑室区域的血脑屏障进入大脑内,引起中枢神经炎症反应<sup>[11]</sup>。本实验在老年腹部手术大鼠模型中发现,腹部手术可导致大鼠海马促炎因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 mRNA 表达明显增高,并持续至术后 3 天仍入于高水平,通过术前针刺干预,大鼠海马促炎因子表达水平在术后 1 天

即明显下降,至术后 3 天仅有少量促炎因子表达。这表明针刺可明显抑制海马促炎因子表达。

综上所述,手术创伤可引发老年大鼠空间记忆能力减弱,海马促炎因子表达增多,针刺可抑制海马促炎因子表达,从而减轻老年大鼠空间记忆能力损害,这可能是针刺防治 POCD 的作用机理之一。

#### 参考文献

- [1] Wang W, Wang Y, Wu H, et al. Postoperative cognitive dysfunction: current developments in mechanism and prevention[J]. Med Sci Monit, 2014, 12(20): 1908-1912.
- [2] 林舜艳, 尹正录, 高巨, 等. 针刺麻醉对老年患者肠癌切除术后认知功能障碍影响及其 S-100 $\beta$  蛋白的变化[J]. 中国针灸, 2013, 33(1): 63-66.
- [3] Wan Y, Xu J, Zeng Y, et al. Postoperative impairment of cognitive function in rats: a possible role for cytokine-mediated inflammation in the hippocampus. Anesthesiology, 2007, 106(3): 436-443.
- [4] 林舜艳, 高巨, 尹正录, 等. 老年肠癌患者术后认知功能障碍与血清 S-100 $\beta$  蛋白关系及中医证型分布的研究[J]. 广东医学, 2011, 32(10): 1282-1284.
- [5] 林舜艳, 高巨. 老年患者术后认知功能障碍研究新进展[J]. 广东医学, 2010, 31(2): 243-244.
- [6] 李真姬, 田贵华, 黄长军, 等. 督脉电针对颅脑损伤大鼠 48h 后差异蛋白组学的机理研究[J]. 云南中医中药杂志, 2010, 31(9): 61-62.
- [7] 李敏, 徐国峰. 电针对血管性痴呆大鼠海马神经元凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax 和 HO-1 的影响[J]. 中华中医药杂志, 2006, 21(8): 502-504.
- [8] 庞勇, 冯卓, 畅英才, 等. 益肾调督针法对脑缺血再灌注大鼠 TNF- $\alpha$ mRNA 和蛋白表达的影响[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(6): 1422-1423.
- [9] Jevtovic-Todorovic V, Hartman RE, Izumi Y, et al. Early Exposure to Common Anesthetic Agents Causes Widespread Neurodegeneration in the Developing Rat Brain and Persistent Learning Deficits. J Neurosci, 2003, 23(3): 876-882.
- [10] Jevtovic-Todorovic V, Benshoff N, Olney JW. Ketamine potentiates cerebrocortical damage induced by the common anaesthetic agent nitrous oxide in adult rats. Br J Pharmacol, 2000, 130(7): 1692-1698.
- [11] Bernardino L, Xapelli S, Silva AP, et al. Modulator effects of interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha on AMPA-induced excitotoxicity in mouse organotypic hippocampal slice cultures. J Neurosci, 2005, 25: 6734-6744.