

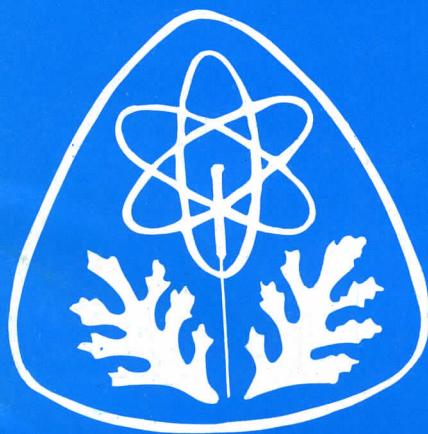
主管单位：国家中医药管理局

ISSN 1000-0607

CN 11-2274/R

针刺研究

ZHEN CI YAN JIU
ACUPUNCTURE RESEARCH



2001

2

第二十六卷

Vol. 26

中国中医研究院针灸研究所 中国针灸学会 主办

SPONSORED BY: Institute of Acupuncture and Moxibustion, China Academy of TCM
China Association of Zhenjiu

针 刺 研 究

2001 年 6 月

第 26 卷 第 2 期

目 次

☆实验研究☆

- 电针和兴奋尾核对苍白球自发放电的影响 吴国冀 石 宏 陈正秋(85)
 不同频率电针对大鼠尾壳核头部一氧化氮合酶表达的影响 熊克仁 杨解人 李怀斌, 等(90)
 酶联免疫吸附实验法测定缺血大鼠电针后皮质神经营养因子含量的变化 陈英辉 黄显奋(93)
 即早表达基因 c-fos 在电针抗局灶性脑缺血损伤中作用的研究 董劲松 陈伯英(97)
 针刺对局灶性脑缺血大鼠脑细胞凋亡的影响 张春红 王 舒 郑瀛泳, 等(102)
 耳针改善血管性痴呆大鼠记忆障碍及其与 bcl-2 表达的关系 张雪朝 肖茂磊 孙国杰(106)
 针灸对亚急性衰老小鼠脑组织中一氧化氮、丙二醛、超氧化物歧化酶的影响 关晨霞 高希言 梁 杰(111)
 肾上腺切除哮喘大鼠针刺血清的抗哮喘作用研究 杨永清 崔龙革 马淑兰, 等(114)
 电针“内关”穴对家兔急性心肌缺血区肌原纤维、线粒体和血小板的影响 罗明富 王 平 刘俊岭, 等(119)
 针刺对肥胖大鼠纹状体作用的研究 刘志诚 孙凤岷 朱苗花, 等(122)
 电针“会阳”、“中膂俞”对非细菌性前列腺炎大鼠尿流动力学影响的实验研究 陈跃来 申鹏飞 陈国美, 等(127)

☆临床研究☆

- 针刺手少阳经穴治疗中风后上臂痉挛的临床观察 睿明河(131)
 天灸疗法对支气管哮喘患者血浆 SP 和 VIP 含量的影响 戴文军 赖新生(134)
 应用针刺复合安氟醚全麻食管癌根治术的临床研究 唐育民 秦必光 胡北喜, 等(138)
 针刺复合小剂量硬膜外麻醉胆囊切除临床研究总结 秦必光 任业川 张兰英, 等(143)
 针刺复合小剂量硬膜外麻醉胆囊切除术临床研究 李长根 彭小云 徐明玉, 等(150)
 针刺复合硬膜外麻醉胆囊切除术胆心反射发生率探讨 张兰英 彭 莉 秦必光(156)

ACUPUNCTURE RESEARCH

June 2001

Vol. 26 No. 2

CONTENTS

- (85) Influence of Electroacupuncture and Excitation of the Caudate Nucleus on Spontaneous Discharges of Neurons in the Globus Pallidus
Wu Guoji, Shi Hong, Chen Zhengqiu
- (90) Influence of Electroacupuncture at Different Frequencies on Nitric Oxide Synthase Expression in the Head of Nucleus Caudatus and Putamen in Rats
Xiong Keren, Yang Jieren, Li Huaibin, et al
- (93) Measurement of Changes of Brain-derived Neurotrophic Factor Content in Rat Ischemic Cerebral Cortex after Electroacupuncture with Enzyme Linked Immunosorbent Assay
Chen Yinghui, Huang Xianfen
- (97) Study on the Effect of c-fos Expression in Electroacupuncture Resisting Cerebral Focal Ischemic Injury
Dong Jinsong, Chen Beying
- (102) Effect of Acupuncture on Cerebral Apoptosis in Rats with Local Cerebral Ischemia
Zhang Chunhong, Wang Shu, Zheng Haoyong, et al
- (106) Correlation between Auricular Acupuncture-induced Improvement of Memory and bcl-2 Expression in Vascular Dementia Rats
Zhang Xuezhao, Xiao Maolei, Sun Guojie
- (111) Effect of Acupuncture on NO, MDA and SOD Levels in Cerebral Tissues of Sub-acute Aging Mice
Guan Chenxia, Gao Xiyan, Liang Jie
- (114) Anti-asthma Effects of Serum Derived from Adrenalectomized Asthma Rats Treated with Acupuncture
Yang Yongqing, Cui Longping, Ma Shulan, et al
- (119) Influence of Electroacupuncture of "Neiguan" on Myofibrilla, Mitochondria and Platelets of Myocardial Ischemic Area in the Rabbit
Luo Mingfu, Wang Ping, Liu Junling, et al

耳针改善血管性痴呆大鼠记忆障碍 及其与 bcl-2 表达的关系*

张雪朝 肖茂磊¹ 孙国杰

(湖北中医药大学针灸推拿系, 武汉 430061;

¹ 中国科学院上海生理研究所神经生物研究室, 上海 200031)

内容提要 目的: 探讨耳针对血管性痴呆大鼠(VD)学习记忆障碍的改善与 bcl-2 调亡蛋白表达的关系。方法: 采用 4-血管阻断制备 VD 大鼠模型, 针刺脑、肾耳穴后, 作免疫组化、Nissl 染色、行为学测试及图像分析。结果: 与正常对照比较, VD 大鼠海马 CA₁ 区神经元严重丢失, 而 bcl-2 蛋白表达增加, 大鼠学习记忆产生明显障碍; 耳针治疗后海马 CA₁ 区神经元丢失减轻, 但 bcl-2 增加更为明显, 此时大鼠学习记忆障碍得到明显改善。结论: 耳针改善 VD 大鼠学习记忆, 可能是通过针刺调控细胞凋亡, 达到对 VD 大鼠海马神经元的保护作用。

关键词 耳针 血管性痴呆 学习记忆 bcl-2 海马

Correlation between Auricular Acupuncture-induced Improvement of Memory and bcl-2 Expression in Vascular Dementia Rats

Zhang Xuezhao, Xiao Maolei¹, Sun Guojie

(Department of Acumoxi and Massage, Hubei College of TCM, Wuhan, 430061;

¹Department of Neurobiology, Shanghai Institute of Physiology,

Chinese Academy of Science, Shanghai, 200031)

Objective: To study the relationship between auricular acupuncture improving dysmnesia and expression of bcl-2 protein in vascular dementia (VD) rats. **Methods:** 40 Wistar rats were randomly and evenly divided into control group, VD group, acupuncture + VD group and pseudo-operation group. Rat VD model was established by using 4-vessel occlusion method. Otopoint "Nao"-point and "Shen" (MA-SC) were punctured, once daily continuously for 15 days. Rats' memory capability was tested with Y-maze method and bcl-2 expression in the brain tissues displayed with immunohistochemical method and detected with MIAS-2000 Image Analyzer. **Results:** After auricular acupuncture treatment, the VD rats' memory was raised significantly in comparison with VD group ($P < 0.01$). In control, VD and auricular acupuncture groups, bcl-expression positive neurons in CA₁ region of the hippocampus were 14.31 ± 4.87 , 28.67 ± 5.63 and 65.74 ± 8.19 respectively, suggesting that the improvement of memory caused by acupuncture may be via up-regulation of bcl-2 expression (an in-

* 广西青年自然科学基金资助(桂科青 9811002)

hibitory gene of apoptosis) to lighten neuron lesion of hippocampus. Conclusion: Auricular acupuncture can raise the learning and memory capability, which may be realized by regulation of apoptosis and protecting hippocampal neurons.

Key Words: Auricular acupuncture Vascular dementia Memory bcl-2 expression Hippocampus

随着社会人口老龄化,血管性痴呆(Vascular Dementia, VD)的发病逐年增加,已成为当今医学领域研究的重要课题之一。近年来针灸治疗VD的临床研究报道逐渐增多,其研究成果表明,体针和头针可使患者的智力明显提高,同时改善VD的其他症状^[1],但是耳针治疗VD的临床和实验研究尚缺乏相关资料。鉴于耳针有效改善脑循环,临床常用于脑血管病的后期治疗,另外耳针具有安全、无副作用、易于推广的优势,因此,本实验选用改良的Pulsinelli-4-血管阻断(4-vessel occlusion, 4-VO)法制备近似人类临床发病特点的、国际公认的VD大鼠模型^[2],而后对其进行耳针治疗,采用免疫组化、组化、图像分析、Y型迷宫等方法,研究大鼠治疗后学习记忆及海马CA₁区神经元丢失及抑制凋亡蛋白bcl-2表达的改变,旨在观察耳针治疗VD的疗效,并探讨VD发病以及耳针治疗VD的可能机制,为临床治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物及分组

雄性Wistar大鼠40只,体重200~250g,随机分为:VD模型组、耳针治疗组、假手术组及正常对照组,每组10只,大鼠由本院动物中心提供。免抗鼠bcl-2单抗、DAB购于Sigma公司,免疫组化试剂盒(HABC)购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.2 模型制备及耳针治疗

采用改良的Pulsinelli 4-VO法,建立近似人类学习记忆障碍的血管性痴呆大鼠模型。用水合氯醛(0.5mL/100g体重)腹腔麻醉大鼠,

背侧正中切口,用电凝针经第一颈椎横突翼小孔,闭塞双侧椎动脉。腹侧颈正中切口,分离双侧颈总动脉,24 hr后,可逆性夹闭双侧颈总动脉3次,每次5 min,间隔1 hr,之后放回笼中,常规饲养、观察。4-VO成功的检测指标:①在大鼠额、顶、枕区左右两侧对称地分别安放电极各一个,参考电极放在鼻骨正中,2~3 min内,EEG呈等位线,表示4-血管完全阻断。②翻正反射消失。根据华兴帮提供的方法^[3],定位大鼠脑、肾耳穴。模型制备成功后,即用自制耳针埋于大鼠耳穴进行治疗,每天1次,治疗15天,每日检查耳针是否脱落,若有脱落即补上,直至处死。

1.3 学习记忆测试

用Stanes三等臂Y型迷宫箱测试大鼠学习记忆能力。反应箱设三条通道,其顶端有一盏15 W信号灯,箱底可施以电击,训练大鼠按信号灯跑向安全通道。每天上、下午各测试10次,其间休息1 min,术前、术后各连续测试8天。大鼠的学习记忆成绩分别以其测试达到连续10次中有9次正确反应时所需的电击次数表示。

1.4 免疫组织化学及Nissl染色

大鼠经3%戊巴比妥钠(40 mg/kg体重)腹腔注射麻醉后,立即开胸暴露心脏,经左心室插管,同时剪开右心房,快速灌注生理盐水,至肝脏变白改灌注液为4%多聚甲醛,灌注时间约30 min。然后取脑放入30%蔗糖多聚甲醛溶液中固定,至脑组织下沉后做冠状连续冰冻切片,厚30 μm。bcl-2一抗抗体稀释度为1:500,染色步骤按免疫组化试剂盒说明书进行,经DAB显色,阳性细胞呈红棕色。用PBS代替一抗作为阴性对照。同时,每个脑组织的相

邻切片用 10% 的甲苯胺蓝进行 Nissl 染色。

1.5 图像分析及统计学处理

用 MIAS-200 显微图像分析仪对阳性细胞进行图像分析。数据用均数±标准差 ($\bar{X} \pm S$) 表示, 组间均数比较用单因素以方差分析。

2 结 果

2.1 行为学测试结果

从 Y-迷宫检测结果可见, 4-VO 手术前各组大鼠的学习记忆能力基本一致。假手术组和对照组始终无明显变化, 表明未出现学习记忆障碍。VD 模型组在术后所需电击次数较对照组、假手术组和术前明显增加 ($P < 0.01$), 表明大鼠在术后空间分辨学习记忆能力发生严重障碍。耳针治疗组所需电击次数较 VD 模型组明显减少 ($P < 0.01$), 但与对照组比较无显著差异, 表明学习记忆障碍得到明显改善。见表 1。

2.2 免疫组织化学染色及 Nissl 染色结果

bcl-2 免疫组织化学阳性细胞在对照组海马有少量的、散在的、中等或弱阳性的表达; VD 模型组与对照组比较, 海马 CA₁ 区各层细胞 bcl-2 阳性细胞着色增强、数量增加、突起明显, 特别是锥体细胞层 bcl-2 免疫阳性细胞数量及

突起较为明显; 耳针治疗组与 VD 模型组比较, bcl-2 阳性细胞数量增加更加明显, 着色增深 (图 1)。各组大鼠海马 CA₁ 区 bcl-2 阳性细胞相对密度见表 2。Nissl 染色显示, VD 模型组与对照组比较, 海马 CA₁ 区锥体细胞层神经元严重丢失, 而且可见许多空洞; 耳针治疗组与对照组比较, 海马 CA₁ 区锥体细胞层神经元数量无显著差别。但各组之间海马 CA₁ 区其他细胞层 Nissl 染色无明显变化 (图 2)。

表 1 大鼠 Y-型迷宫学习记忆成绩 ($\bar{X} \pm S$)

	对照组 (n = 10)	模型组 (n = 10)	耳针治疗组 (n = 10)
术前	5.68 ± 1.29	6.07 ± 1.67	5.86 ± 1.74
术后	5.81 ± 1.51	$18.06 \pm 2.68^*$	$8.31 \pm 1.85^\#$

与对照组比较: * $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.01$ 。

表 2 大鼠海马 CA₁ 区 bcl-2 免疫阳性细胞数
($\bar{X} \pm S$, 单位: /mm²)

	对照组 (n = 10)	VD 模型组 (n = 10)	耳针治疗组 (n = 10)
bcl-2	14.31	28.67	65.74
	± 4.87	$\pm 5.63^*$	$\pm 8.19^{**}$

与对照组比较: * 差异显著, ** 差异极显著。

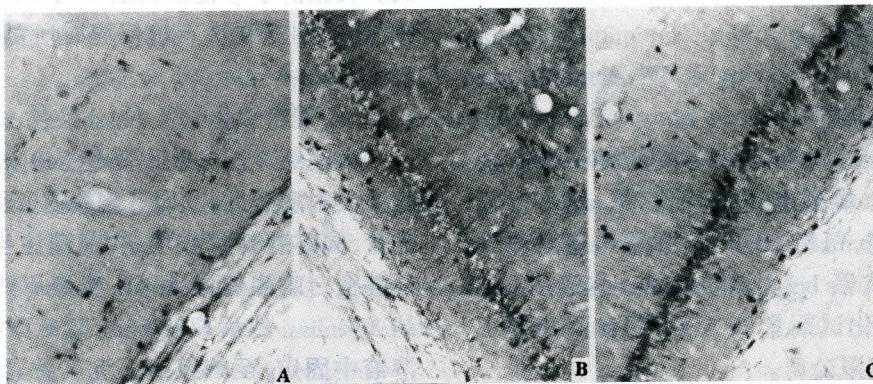
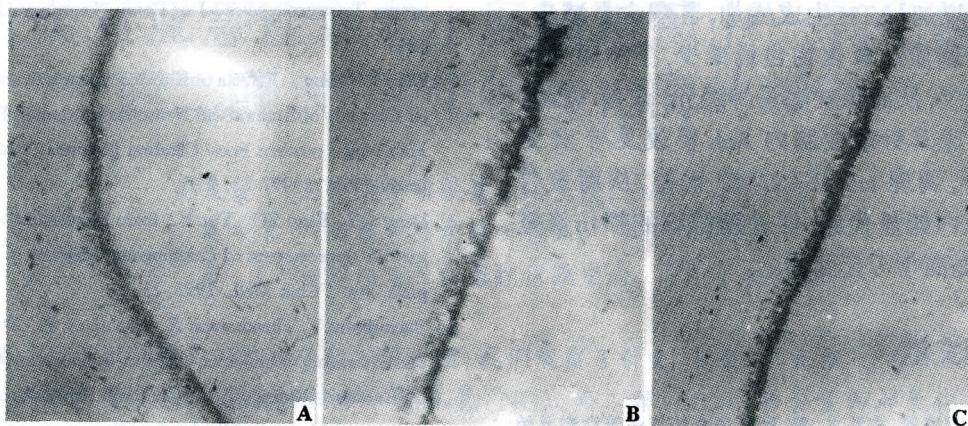


图 1 大鼠海马 CA₁ 区 bcl-2 免疫组织化学阳性细胞的显微照相 ($\times 100$)

A. 对照组, 有少量的、散在的弱阳性表达。

B. VD 模型组, 海马 CA₁ 区各层细胞 bcl-2 阳性细胞着色增强, 数量增加, 突起明显。

C. 耳针治疗组, bcl-2 阳性细胞数量增加更加明显, 着色增深。

图2 大鼠海马CA₁区Nissl染色显微照相(×100)

A.对照组。 B.VD模型组,海马CA₁区锥体细胞层神经元严重丢失,而且可见许多空洞。
C.耳针治疗组,与对照组比较,海马CA₁区锥体细胞层神经元数量无显著差别。

3 讨 论

VD是以脑血管疾病引起的学习记忆障碍为主要表现的一种病症。祖国医学将其归属到“健忘”、“痴呆”等症范畴,认为肾虚髓空是其根本。《内经》云:“耳为宗脉之所聚”,十二经脉均上于耳,针刺耳穴可调节全身脏腑器官的病症。有实验证明耳针可改善脑血流速度^[4]。鉴于耳穴脑具有调节大脑皮层兴奋、抑制的作用,耳穴肾可益精血,补脑髓,畅活气血,本实验选用脑、肾耳穴治疗VD大鼠。结果显示,耳针治疗组海马神经元丢失减少,bcl-2阳性细胞数量明显增加,同时学习记忆障碍得到显著的改善。

近年研究表明,脑反复缺血是VD发病的主要病因。海马作为缺血损伤最敏感脑区,直接参与信息贮存和回忆。有实验报道,缺血性脑损伤后产生大量的自由基、兴奋性氨基酸、NO聚集,并导致细胞内Ca²⁺超载,诱导细胞凋亡的发生^[5]。我们过去的实验证实,VD发病时,海马CA₁区锥体细胞层除有神经元坏死外,还存在细胞凋亡,bcl-2通过调控细胞凋亡或坏死,对VD大鼠海马神经元起保护作用,因而参与了VD大鼠学习记忆障碍的形成。

本实验显示,VD模型组海马锥体细胞层

神经元严重丢失,而耳针治疗组海马神经元丢失减少;VD模型组bcl-2锥体细胞层阳性细胞增多,耳针治疗组bcl-2阳性细胞数量增加更明显。提示针刺脑、肾耳穴可能是通过影响bcl-2调控细胞凋亡的途径,从而改善VD大鼠的学习记忆障碍。大量的研究显示,针刺可以通过双向调节细胞内外的兴奋性氨基酸、自由基、NO聚集以及Ca²⁺的浓度,减轻脑缺血引起的神经元的损伤^[6]。另有实验证实,针刺可通过对老年大鼠脑内Ca²⁺的调节而提高其学习记忆能力^[7];针刺还可以使大鼠海马内神经肽、去甲肾上腺素、多巴胺增加,进而提高学习记忆的成绩^[8,9]。临床研究也显示,针刺可明显改善脑损伤引起的痴呆病人的认知功能^[10]。因此,从我们的实验结果及上述资料可以推测,针刺脑、肾耳穴,可刺激体内高表达细胞凋亡抑制基因bcl-2,从而减轻海马神经元的丢失,改善VD大鼠的学习记忆障碍。其作用机制可能以下几个途径:①耳针改善脑供血、供氧,减轻脑水肿,改善细胞膜功能,缓解细胞内Ca²⁺超载,减轻脑缺血引起的神经元的损伤。②耳针调节脑内兴奋性氨基酸递质代谢,减轻神经细胞的损伤。③耳针促进脑血流增加,脑内葡萄

糖利用率增加,ATP生成增加,乳酸含量减少,脑组织中脂质过氧化物含量减少,生物膜变性和破坏减少,从而保护海马神经元,改善VD智能状态。④耳针改变脑内Ach释放及与M受体的结合,调理cAMP/cGMP比值,从而改善了脑组织内能量代谢,促进脑组织的损伤修复与再生,提高学习记忆力。

4 参考文献

- 1 杨文辉,李艳慧,庄礼兴,等.针药结合治疗血管性痴呆的临床观察.针灸临床杂志,1996,12:14
- 2 Pulsinelli WA, Brierley JB. A New Model of Bilateral Hemispheric Ischemia in the Unanesthetized Rat. Stroke, 1979, 10: 267
- 3 华兴帮,李辞蓉,周浩良,等.大鼠穴位图谱的研制.实验动物与动物实验,1991,1:1
- 4 陈峰,戴晴,杨易平,等.耳穴神门对脑动脉硬化症患者椎基底动脉血即时作用观察.中国针灸,1997,12:717
- 5 Nakamura M, Raghupathi R, Merry DE, et al. Overexpression of bcl-2 Is Neuroprotective after Experimental Brain Injury in Transgenic Mice. J of Comp Neurology, 1999, 412: 681
- 6 Zhao P, Cheng J. Effects of Electroacupuncture on Extracellular Contents of Amino Acid Neurotransmitters in Rat Striatum Following Transient Focal Cerebral Ischemia. Acupunct Electrother Res, 1997, 22: 119
- 7 Deng QS, Fang ZC, Yin Y. Ionic Mechanism of Acupuncture on Improvement of Learning and Memory in Aged Mammals. Am J Chin Med, 1995, 23: 1
- 8 Bucinskaite V, Theodorsson E, Crumpton K. Effects of Repeated Sensory Stimulation (Electro-acupuncture) and Physical Exercise (Running) on Open-field Behaviour and Concentrations of Neuropeptides in the Hippocampus in WKY and SHR Rats. Eur J Neurosci, 1996, 8: 382
- 9 Torii K, Okumura M, Iijima K. Acupuncture Inhibits the Decrease in Brain Catecholamine Contents and the Impairment of Passive Avoidance Task in Ovariectomized Mice. Acupunct Electrother Res, 1999, 24(1): 45
- 10 刘军,彭晓虹,林大东,等.电针头穴治疗血管性痴呆临床研究.中国针灸,1998,18:197

(收稿日期:2000-05-30)

《针刺研究》和《世界针灸杂志》 联合通知

《针刺研究》是中国中医研究院针灸研究所与中国针灸学会联合主办的学术性刊物;《世界针灸杂志》是世界针联的国际性、专业性期刊,由世界针联与中国中医研究院针灸研究所共同主办。内容主要报导针灸临床、原理和经络等有关方面的研究以及针灸教育与学术讲座、医史文献、针灸仪器等。欢迎广大作者投稿。我们出版的两种杂志均采用计算机排版,有条件的作者除投文稿外,还希望送计算机录入的软盘。另外投稿时请同时寄稿件处理费30元。