

电针对慢性疲劳综合征大鼠学习记忆能力及血清细胞因子分泌的影响

杨燕¹, 李超然¹, 王德龙¹, 王玉琳¹, 孙忠人¹, 郭静¹, 石天宇¹, 屈媛媛¹, 王月¹, 马帅¹, 王庆勇¹, 杨添淞²

摘要 目的:探讨电针对慢性疲劳综合征(CFS)大鼠学习记忆能力及大鼠血清中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素-10(IL-10)和干扰素- γ (IFN- γ)含量的影响。**方法:**SD大鼠36只,随机分为对照组、模型组、电针组各12只。电针组和模型组采用负重强迫游泳联合慢性应激刺激造模28 d,电针组于造模14 d后对大鼠进行电针治疗,选取双侧感觉区、百会穴、宁神穴,连续治疗14 d,模型组给予相同时间的捆绑,不予治疗。治疗结束后采用Morris水迷宫实验评价大鼠学习记忆能力,并用ELISA检测大鼠血清中TNF- α 、IL-10和IFN- γ 的变化情况。**结果:**与对照组相比,模型组大鼠平台潜伏期延长($P<0.01$),穿越平台次数减少($P<0.01$);与模型组相比,电针组大鼠平台潜伏期缩短($P<0.01$),穿越平台次数增多($P<0.01$)。模型组大鼠的血清TNF- α 和IL-10含量较对照组显著上升($P<0.01$),IFN- γ 含量显著下降($P<0.01$);电针组大鼠的血清TNF- α 和IL-10水平较模型组显著降低($P<0.01$),IFN- γ 水平显著升高($P<0.01$)。**结论:**电针可明显改善CFS大鼠的学习记忆能力,调节其血清炎性细胞因子水平。

关键词 电针;慢性疲劳综合征;学习记忆能力;细胞因子

中图分类号 R741;R741.05 **文献标识码** A **DOI** 10.16780/j.cnki.sjssgncj.2019.11.001

杨燕, 李超然, 王德龙, 等. 电针对慢性疲劳综合征大鼠学习记忆能力及血清细胞因子分泌的影响[J]. 神经损伤与功能重建, 2019, 14(11): 541-543.

Effect of Electroacupuncture on Learning and Memory and Secretion of Serum Cytokine in Rats with Chronic Fatigue Syndrome YANG Yan¹, LI Chao-ran¹, WANG De-long¹, WANG Yu-lin¹, SUN Zhong-ren¹, GUO Jing¹, SHI Tian-yu¹, QU Yuan-yuan¹, WANG Yue¹, MA Shuai¹, WANG Qing-yong¹, YANG Tian-song². 1. Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China; 2. Department of Neurology, The First Affiliated Hospital of Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150040, China

Abstract Objective: To investigate the effects of electroacupuncture on the learning and memory capabilities and serum levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-10 (IL-10), and interferon- γ (IFN- γ) in rats with chronic fatigue syndrome. **Methods:** Thirty-six male SD rats were randomly divided into the control group, model group, and electroacupuncture group, with 12 rats in each group. The electroacupuncture group and model group were subjected to forced weight-bearing swimming and chronic stress stimulation for 28 days. The electroacupuncture group was treated with electroacupuncture from the 14th day after modeling. The bilateral sensory area, Baihui point, and Ningshen point were selected for electroacupuncture, and continuous treatment was given for 14 days. The model group was bound for the same length of time but was not treated. After treatment, the learning and memory capabilities of rats were evaluated by the Morris Water Maze test. Blood was drawn and centrifuged to isolate serum, and changes in serum TNF- α , IL-10, and IFN- γ were detected by ELISA. **Results:** In the Morris water maze test, compared with that of the control group, the escape latency in the model group was prolonged ($P<0.01$) and the number of platform crossings was decreased ($P<0.01$). Compared with the model group, the escape latency in the electroacupuncture group was shortened ($P<0.01$) and the number of platform crossings increased ($P<0.01$). In addition, the serum levels of TNF- α and IL-10 were significantly increased and that of IFN- γ significantly decreased in the model group compared to those in the control group (all $P<0.01$). The serum levels of TNF- α and IL-10 were significantly decreased and that of IFN- γ significantly increased in the electroacupuncture group compared to those in the model group (all $P<0.01$). **Conclusion:** Electroacupuncture can significantly improve the learning and memory capability and regulate the serum inflammatory cytokine levels of rats with chronic fatigue syndrome.

Key words electroacupuncture; chronic fatigue syndrome; learning and memory capability; cytokines

作者单位

1. 黑龙江中医药大学
哈尔滨 150040

2. 黑龙江中医药大学
附属第一医院神经内
科

哈尔滨 150040

基金项目

国家自然科学基金
(No. 81704170);

黑龙江中医药大学创
新科研基金(No. 201

8yjscx053);

黑龙江省博士后科研
启动金(No. LBH-Q1

8117);

黑龙江省中医管理局
项目(No. ZHY16-00

3)

收稿日期

2019-03-02

通讯作者

杨添淞

958218699@qq.com

慢性疲劳综合征(chronic fatigue syndrome, CFS)是一种以运动后疲劳或持续疲劳加重,不以休息缓解、负性情绪明显为主要特征,临床表现多样的慢性、复杂综合征,严重影响人们的学习、工作和生活。自1987年CFS被美国疾病控制与预防中心(CDC)首次定义以来,有报道的CFS发病比率逐年上升,且趋于城市化、年轻化。目前,CFS的发病机制不明,且缺乏有效的诊疗手段。针刺作为祖国传统医学的特色疗法之一,治疗CFS有显著疗效,有研究表明针刺治疗CFS可能是通过抑制脑组织炎症反应而发挥作用^[1,2]。本实验采用负重强迫游泳联合慢性应激刺激诱导CFS大鼠模型,通过观察电针作用下CFS大鼠的学习记忆能力改善情况及血清中肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白介素-10(interleukin-10, IL-10)和干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ)的变化情况,探究针刺对CFS症状的改善作用及对机体的免疫调节作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物与分组 健康雄性SPF级SD大鼠36只,体质量200~240 g,购自黑龙江中医药大学实验动物中心,许可证号SCXK黑2008004。实验过程中遵循2006年中华人民共和国科技部颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》对动物进行处置。全部大鼠在安静环境下进行为期1周的适应性饲养(室温20℃~24℃,相对湿度55%~60%)。1周后将动物随机分为对照组、模型组和电针组,每组各12只。

1.1.2 主要试剂与仪器 TES-1350A型噪音计(购于台湾泰仕公司);大鼠声光电刺激实验装置(黑龙江中医药大学实验中心自制);Morris水迷宫(购于淮北正华生物仪器设备有限公司);G6805-II电针仪(购于常州市武进长城医疗器械有限公司);IL-10 ELISA试剂盒、TNF- α ELISA试剂盒、IFN- γ ELISA试剂盒(购于武汉博士德生物工程有限公司);Ht2型酶标仪、Ht2洗板机(购于奥地利博塞公司);TGL-16G台式离心机(购于上海安亭科学仪器厂);BRAND系列单道可调移液器(德国)。

1.2 方法

1.2.1 模型选择及制作 采用强迫游泳和慢性复合应激方式对模型组和电针组大鼠进行28 d持续造模:①负重强迫游泳:大鼠尾部负重体重5%的铅块,在室温水池中游泳至力竭(力竭标准:游泳动作明显失调,大鼠头部沉入水下9 s不能上浮);②慢性应激刺激:大鼠

负重游泳后,进行不可预知性应激刺激,为避免动物对刺激产生适应,每天按照随机数字表随机给予两种不同刺激,包括:12 h禁食,12 h禁水,夹尾(1 min),通宵照明和噪声刺激(110 dB,1 h)。

1.2.2 穴位选择及干预方法 参照人类大脑功能定位分区及《实验针灸学》^[3]中动物标准穴位图谱选取双侧感觉区、百会、宁神。于造模14 d后对电针组大鼠进行针刺治疗,用0.35 mm×25 mm毫针于百会穴、宁神穴、双侧感觉区进行针刺,针刺后连接G6805-II电针仪,调节电针参数为连续波,频率50 Hz,每日一次,每次30 min,连续电针治疗14 d。模型组每天给予电针组相同时间的捆绑,不予治疗。对照组不给予任何干预。

1.2.3 Morris水迷宫实验 ①定位航行实验:用于评价大鼠对水迷宫的学习能力。每天分上、下午各训练1次,共进行5 d。每次训练将大鼠依次从水迷宫东、西、南、北四个方位放入。同时记录大鼠寻找并爬上水下平台所需时间(潜伏期),每次训练时间为90 s。如果大鼠在90 s内未能找到平台,须将大鼠引至平台,这时潜伏期记为90 s。每次训练后让大鼠在平台上停留10 s。造模后,模型组、电针组大鼠潜伏期明显延长,与对照组相比有统计学意义($P<0.05$);表明模型大鼠的学习记忆能力明显减退,提示模型制备成功。②空间搜索实验:用于评价大鼠对平台空间位置的记忆能力。在第6天撤除水下平台,开始90 s的探索训练。将大鼠头朝池壁由原先平台象限的对侧放入水中,记录其在90 s内跨过原平台相应位置的次数。造模后,模型组、电针组大鼠穿越平台次数明显减少,与对照组相比有统计学意义($P<0.05$);表明模型大鼠的空间探索能力明显减退,也提示模型制备成功。

1.2.4 取材及处理方法 治疗结束后,全部动物经10%水合氯醛麻醉,心脏取血,静置后离心15 min(3 000 rpm)分离血清,放入-20℃冰箱中保存,ELISA法检测血清中TNF- α 、IL-10和IFN- γ 的含量,操作步骤严格按照ELISA试剂盒说明进行。

1.3 统计学处理

应用SPSS 22.0软件分析数据,计量资料以($\bar{x}\pm s$)表示,单因素方差分析,组间两两比较用LSD法。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠治疗后平台潜伏期及平台穿越次数比较 模型组大鼠平台潜伏期较对照组显著延长,穿越平台次数显著减少,均有显著性差异($P<0.01$);电针

组大鼠平台潜伏期较模型组显著缩短,穿越平台次数显著增多,均有显著性差异($P<0.01$),见表1。

2.2 各组治疗后大鼠血清IL-10和TNF- α 含量变化比较
与对照组相比,模型组大鼠血清中IL-10和TNF- α 含量增高,IFN- γ 含量下降,均有显著性差异($P<0.01$);与模型组相比,电针组大鼠血清中IL-10和TNF- α 含量降低,IFN- γ 含量升高,均有显著性差异($P<0.01$),见表1。

表1 各组水迷宫测试结果及血清细胞因子水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	只数	平台潜伏期/s	
		治疗前	治疗后
对照组	12	27.43±3.84	27.38±4.05
模型组	12	58.23±7.47 ^①	56.92±7.26 ^①
电针组	12	57.92±8.40 ^①	30.92±6.63 ^①
组别		穿越平台次数/次	
		治疗前	治疗后
对照组		6.93±1.73	6.38±1.76
模型组		3.69±1.18 ^①	3.77±1.30 ^①
电针组		3.83±1.27 ^①	5.83±1.75 ^②
组别	IL-10/(pg/mL)	TNF- α /(pg/mL)	IFN- γ /(pg/mL)
对照组	42.19±4.90	39.54±5.11	119.04±12.53
模型组	72.94±7.29 ^①	56.01±5.59 ^①	65.37±6.90 ^①
电针组	47.86±9.52 ^②	43.22±4.62 ^②	94.18±10.32 ^{①②}

注:与对照组比较,^① $P<0.01$;与模型组相比,^② $P<0.01$

3 讨论

CFS属于中枢性疲劳,除表现为肢体倦怠、不适、活动减少外,认知功能减退也较常见,尤其学习记忆能力。头针作为一种常见的针刺疗法,取穴除选用传统经络腧穴外,还根据大脑功能分区,选取头皮表面的功能投影区,针刺后连接电麻仪可使针刺作用区得到持续刺激,加强针感,从而醒脑开窍、调神益智、改善肢体功能,同时还能改善循环、调节代谢、缓解免疫损伤。本研究中,与模型组相比,电针组的平台潜伏期缩短($P<0.01$),穿越平台次数增加($P<0.01$),说明针刺可显著改善CFS大鼠的学习记忆能力。

目前对于CFS的发病机制说法不一,主要集中在免疫-炎症、神经-内分泌和能量代谢等方面,其中免疫功能异常、炎症反应发生占主导地位。既往研究发现CFS的发病常伴细胞因子等免疫系统标志物的改变,因此本研究选取TNF- α 、IL-10和IFN- γ 作为观察指标。一项最新的研究表明CFS患者血清中TNF- α 水平上升,且其含量与CFS患者的精神症状如焦虑、抑郁等

显著相关^[4]。本研究中,模型组大鼠血清中TNF- α 水平显著高于对照组($P<0.01$),电针组大鼠血清中TNF- α 含量低于模型组($P<0.01$),说明针刺治疗CFS有效。IL-10又称细胞因子合成抑制因子,主要由Th2细胞产生,IL-10的增加在降低细胞毒活性和介导持续病毒感染中起重要作用^[5]。CFS患者血清中IL-10含量高于健康对照组,这可能与CFS患者的Th2优势应答相关^[6]。一项纵向研究表明,在为期1年的观察中,CFS患者血清中IL-10的含量上升,并伴随IFN- γ /IL-10比例下降^[7]。本研究中,模型组大鼠血清中的IL-10含量显著高于对照组($P<0.01$),电针组血清中IL-10含量低于模型组($P<0.01$),证明电针干预对CFS大鼠症状有一定的改善作用。IFN- γ 具有抗病毒、免疫调节作用,主要由Th1细胞分泌产生,属于促炎性细胞因子之一。IFN- γ 与CFS的严重程度密切相关,且呈线性上升趋势^[8]。Hardcastle等^[9]发现IFN- γ 在重症CFS患者中明显升高,与中度患者相比有显著性差异。本研究中CFS大鼠的IFN- γ 含量显著低于对照组($P<0.01$),而电针治疗逆转CFS大鼠血清中IFN- γ 的下降趋势($P<0.01$)。

综上所述,头部电针可以改善CFS大鼠的学习记忆能力,其作用机制不仅与针刺的局部作用有关,还与针刺对机体的整体调节有关。

参考文献

[1] 杨添淞, 杨燕, 王德龙, 等. 电针干预对慢性疲劳综合征大鼠海马和下丘脑区p65及COX-2蛋白表达的影响[J]. 神经损伤与功能重建, 2018, 13: 325-327.

[2] 王德龙, 杨燕, 姜凡, 等. 电针对慢性疲劳综合征大鼠脑组织转化生长因子- β_1 基因转录和蛋白表达的影响[J]. 神经损伤与功能重建, 2018, 13: 169-171, 203.

[3] 李忠仁. 实验针灸学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2003.

[4] Groven N, Fors EA, Iversen VC, et al. Association between cytokines and psychiatric symptoms in chronic fatigue syndrome and healthy controls [J]. Nord J Psychiatry, 2018, 72: 556-560.

[5] White L, Krishnan S, Strbo N, et al. Differential effects of IL-21 and IL-15 on perforin expression, lysosomal degranulation, and proliferation in CD8 T cells of patients with human immunodeficiency virus-1 (HIV) [J]. Blood, 2007, 109: 3873-3880.

[6] Brenu EW, van Driel ML, Staines DR, et al. Immunological abnormalities as potential biomarkers in Chronic Fatigue Syndrome/Myalgic Encephalomyelitis [J]. J Transl Med, 2011, 9: 81.

[7] ter Wolbeek M, van Doornen LJ, Kavelaars A, et al. Longitudinal analysis of pro- and anti-inflammatory cytokine production in severely fatigued adolescents [J]. Brain Behav Immun, 2007, 21: 1063-1074.

[8] Montoya JG, Holmes TH, Anderson JN, et al. Cytokine signature associated with disease severity in chronic fatigue syndrome patients [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017, 114: E7150-E7158.

[9] Hardcastle SL, Brenu EW, Johnston S, et al. Serum Immune Proteins in Moderate and Severe Chronic Fatigue Syndrome/Myalgic Encephalomyelitis Patients [J]. Int J Med Sci, 2015, 12: 764-772.

(本文编辑:王晶)