

【电针治疗专题】

编者按 针灸是一种中医治疗方法,是在中医理论的指导下把针具按照一定的角度刺入患者体内,运用捻转与提插等针刺手法对人体特定部位进行刺激,达到治疗疾病的目的。电针是针灸的一种,是将针刺入穴位得气后,在针上通过接近人体生物电的微量电流,利用针和电的两种刺激组合,防治疾病。电针是针灸技术中操作较简便、易于标准化的一种。临床上,电针对神经系统疾病的治疗效应主要集中于镇痛、脑保护、神经功能康复等方面。电针治疗对神经系统疾病的疗效肯定,但其机制尚不完全清楚。本期“电针治疗专题”包括《电针对慢性睡眠剥夺大鼠行为学及海马神经元形态学的影响》、《不同频率督脉电针促进不完全脊髓损伤大鼠运动功能重建的比较研究》及《眶内电针治疗缺血性脑卒中后外展神经麻痹的疗效分析》,主要聚焦于电针对失眠、脊髓损伤和颅神经麻痹等的疗效,并对其机制进行初步探索。

电针对慢性睡眠剥夺大鼠行为学及海马神经元形态学的影响

王永亮¹,贾坤平²,袁珍²,梁吉²,祁美慧²,吴咚咚²,吴建丽²

摘要 目的:观察电项针对慢性睡眠剥夺(CSD)大鼠自主活动能力及海马CA1区和齿状回神经元形态结构的影响。**方法**:将筛选出的24只Wistar大鼠随机分为大平台对照(TC)组、模型(M)组和电项针(ENA)组,每组8只。采用多平台水环境法建立CSD模型,电项针组在造模21 d后电针项部两侧的风池和供血穴,20 min/次,共14 d。每周称量大鼠体质量并计算变化差值。治疗14 d后,用旷场实验评估大鼠的自主探究行为,用HE染色观察海马CA1区和齿状回神经元形态结构改变。**结果**:睡眠剥夺后,M组和ENA组大鼠体质量较TC组明显减轻,干预后体质量逐渐增加,且ENA组体质量增加差值明显多于M组($P<0.01$)。干预14 d后,M组大鼠中央区滞留时间较TC组明显延长,行走总路程和中央区运动速度则显著下降($P<0.05$);与M组相比,ENA组中央区滞留时间缩短,行走总路程和运动速度均显著上升($P<0.05$)。HE染色结果显示,TC组海马CA1区和齿状回神经元排列有序,包膜完整,染色均一;M组锥体细胞和颗粒细胞数量减少,部分出现肿胀和坏死;ENA组神经元数量增多,水肿减轻或消失。**结论**:电项针可以明显改善CSD模型大鼠的自主探究能力,并有保护海马CA1区和齿状回受损神经元的作用。

关键词 电项针;慢性睡眠剥夺;海马;旷场实验

中图分类号 R741;R741.02;R741.05 **文献标识码** A **DOI** 10.16780/j.cnki.sjssgnj.20200690

本文引用格式:王永亮,贾坤平,袁珍,梁吉,祁美慧,吴咚咚,吴建丽.电针对慢性睡眠剥夺大鼠行为学及海马神经元形态学的影响[J].神经损伤与功能重建,2021,16(4):187-190.

Effects of Electro-Acupuncture on Rat Behavior and Morphology of Hippocampal Neurons in Rats with Chronic Sleep Deprivation WANG Yong-liang¹, JIA Kun-ping², YUAN Zhen², LIANG Ji², QI Mei-hui², WU Dong-dong², WU Jian-li². 1. The Third Affiliated Hospital of Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150090, China; 2. Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China

Abstract Objective: To observe the effects of electro-nape-acupuncture (ENA) on the autonomous activity and morphological changes of neurons in hippocampal CA1 area and dentate gyrus in rats with chronic sleep deprivation (CSD). **Methods:** Twenty-four Wistar rats were randomly divided into the tank control (TC) group, model (M) group, and electro-nape-acupuncture (ENA) group, with 8 rats per group. The CSD model was established by the multi-platform water environment method. ENA group rats were treated by electro-acupuncture to the Fengchi and Gongxue acupoints on both sides of the neck; treatment began 21 days after modeling and continued for 14 days at 20 min/session. The rats were weighed weekly, and the difference was calculated. After 14 days of treatment, the exploratory behavior of rats was evaluated by the open field test. The morphological changes of neurons in the hippocampal CA1 region and dentate gyrus were observed by HE staining. **Results:** After modeling, rats in the M group and ENA group showed significant weight loss compared with those in the TC group; their weight gradually in-

作者单位

1. 黑龙江中医药大学附属第三医院
哈尔滨 150090

2. 黑龙江中医药大学
哈尔滨 150040

基金项目

黑龙江省中医药管理局项目
(No. ZYH18-070);

黑龙江省自然科学基金优秀青年项目
(No. YQ2020H029)

收稿日期

2020-11-06

通讯作者

吴建丽

wujianli2017@163.com

creased after intervention, and the weight gain in the ENA group was significantly greater than that in the M group ($P<0.01$). The open field test data showed that, after 14 days of intervention rats in the M group spent a longer time in the center zone and were demonstrated a reduced walking distance and movement speed, compared with those in the TC group ($P<0.01$). Compared with those in the M group, rats in ENA group spent a shorter time in the center zone and showed an increased walking distance and movement speed ($P<0.05$). HE staining revealed orderly arranged neurons with intact capsules and uniform staining in the hippocampal CA1 and dentate gyrus of the TC group. In the M group, the number of pyramidal and granular cells was decreased, and some showed swelling and necrosis. In the ENA group, the number of neurons increased, and the swelling diminished or disappeared. **Conclusion:** ENA can significantly improve the autonomous activity of rats with CSD and protect the injured neurons in the hippocampal CA1 area and dentate gyrus.

Key words electro-nape-acupuncture; chronic sleep deprivation; hippocampus; open field test

慢性睡眠剥夺 (chronic sleep deprivation, CSD) 是指由于疾病或环境因素导致机体长期缺乏正常睡眠, 从而引发生理心理功能紊乱和行为异常的一种状态。CSD 后人体新陈代谢加快, 警觉性和判断力降低, 焦虑、抑郁等消极情绪呈现指数增长, 心脑血管病的发病率和死亡率明显升高^[1,2]。CSD 的西药治疗主要以巴比妥类和苯二氮卓类镇静催眠类药物为主, 虽能延长睡眠时间, 但容易产生耐药性、依赖性和反跳性等副作用, 长期服用还会导致反应迟钝、定向力减退, 促进痴呆的发生^[3]。针灸具有醒脑开窍、调神益智的作用, 对失眠及诱发的焦虑、健忘等精神和认知障碍具有很好的调节作用^[4,5], 但其机制尚不明确。本研究即观察电项针治疗对 CSD 大鼠的一般行为学及海马神经元形态结构改变的影响, 为临床采用电项针治疗失眠提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 主要试剂与材料

1.1.1 实验动物与分组 健康清洁级 Wistar 大鼠 30 只, 6~7 周龄, 体质量为 (190±10)g, 购自黑龙江中医药大学药物安全评价中心, 许可证号 SYXK(黑)2016004。本实验对动物的处置符合 2006 年科技部颁发的《关于善待实验动物的指导性意见》。适应性饲养 1 周后, 将 30 只大鼠用水迷宫试验剔除学习成绩最差的 6 只大鼠, 将筛选出的 24 只大鼠按体质量编号, 用随机数字分为大平台对照 (tank control, TC) 组、模型 (model, M) 组和电项针 (electro-nape-acupuncture, ENA) 组, 每组 8 只。

1.1.2 主要仪器和试剂 主要仪器和试剂包括: 微电流刺激仪 (美国 BioMedical Life System); 睡眠剥夺箱 (100 cm×60 cm×50 cm, 自制); 组织包埋机 EG1160、切片机 RM2235、光学显微镜 DM4000B (德国 LEICA 公司); 黑白格旷场箱 (自制); moticam3000 显微摄像系统 (美国 Motic 公司); 苏木素-伊红染色试剂盒 (碧云天生物技术有限公司); 不锈钢针灸针 (0.16 mm×7 mm, 云

龙牌), 酒精、二甲苯 (天津富宇精细化工有限公司)。

1.2 方 法

1.2.1 造模 采用改良的多平台水环境法制备 CSD 模型^[6]。造模前将大鼠置于睡眠剥夺箱内直径为 6.5 cm 的圆形小平台上适应实验环境, 2 h/次, 1 次/d, 连续适应 5 d。正式实验时在剥夺箱内注入自来水至箱内平台下约 1 cm 处, 在平台上方约 15 cm 处上方覆盖铁丝网, 放置鼠粮和水瓶以保证正常饮食水, 每日剥夺睡眠 18 h (16 时~次日 10 时), 然后恢复睡眠 6 h, 连续 21 d。TC 组大鼠的剥夺箱内小平台上方铺设一张细密的铁丝网, 大鼠可自由活动 and 睡眠, 排除水环境和隔离造成的影响。

1.2.2 干预方法 CSD 造模结束后, ENA 组大鼠予以针灸治疗。参照大鼠腧穴图谱^[7]和人体项部腧穴的解剖结构采用比较解剖学定位风池和供血穴。风池穴定位于枕骨顶嵴后枕寰关节背凹陷处旁开约 2 mm, 供血穴定位于风池穴下约 0.5 cm, 平第 4 颈椎棘突。操作方法: 将大鼠用异氟烷吸入麻醉后, 将四肢用纱布固定于鼠板上, 不锈钢毫针刺入穴位约 3~4 mm, 上下腧穴连接一组导线, 正极在上, 负极在下, 给予疏波刺激, 频率 2 Hz, 电流强度 0.5 mA, 以项部轻轻振动且大鼠不烦躁为度。治疗 20 min/次, 1 次/d, 连续 14 d。其余 2 组除进行相同时间的捆绑外, 不给予任何干预。

1.2.3 指标检测 ①体质量及差值: 于实验的第 1、7、14、21、28 和 35 天, 用电子秤称取各组大鼠体质量, 并计算每周体质量的变化差值。②旷场实验: 干预后进行旷场实验评估大鼠的自主活动能力。在遮光、无噪音的环境中, 将大鼠放入旷场箱, 记录大鼠在 5 min 内的总路程 (total distance, TD)、中央区的运动速度 (moving speed in center, MSC) 及中央区的滞留时间 (retention time in center, RTC)。③海马神经元形态学观察: 行为学测试后, 断头取脑, 置于 4% 的多聚甲醛固定, 流水冲洗、脱水后常规石蜡包埋, 冠状切片 4 μm, 37℃ 低温烤片过夜, HE 染色后光镜下观察海马 CA1 区和齿状回的形态结构。

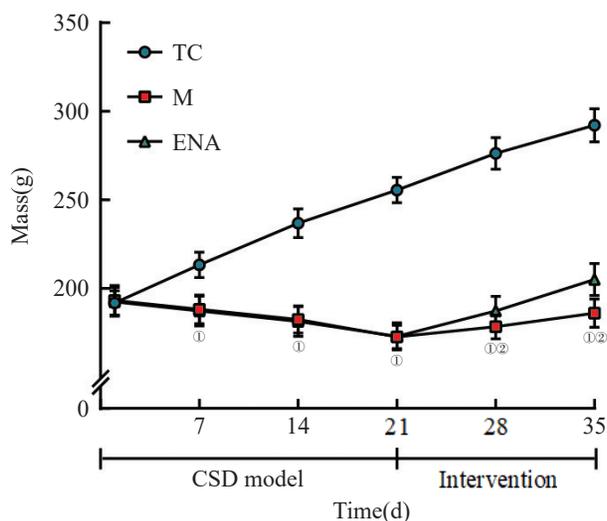
1.3 统计学处理

用SPSS 24.0软件统计数据,符合正态分布以及方差齐性的计量资料以($\bar{x}\pm s$)表示,单因素方差分析,组间两两比较采用LSD检验;若方差不齐则采用Tamhane's T_2 检验; $P<0.05$ 表示差异具有显著性。

2 结果

2.1 各组大鼠体质量的变化

造模前,3组大鼠体质量差异无统计学意义($P>0.05$),均为正常发育;随着睡眠剥夺时间的延长,M组和ENA组大鼠体质量逐渐下降,而TC组大鼠体质量逐渐上升;停止睡眠剥夺或给予电针治疗后,M组和ENA组大鼠体质量逐渐上升,TC组大鼠体质量继续逐渐上升。造模7、14和21 d后,M组和ENA组大鼠体质量均显著低于TC组($P<0.05$),而2组体质量的减少差值差异无统计学意义($P>0.05$);干预7 d后,M组和ENA组体质量增加,但增加的差值明显小于TC组,ENA组增加差值显著高于M组($P<0.05$);干预14 d后,M组体质量增加差值仍明显小于TC组($P<0.05$),ENA组增加差值明显高于M组($P<0.05$),且与TC组差异无统计学意义($P>0.05$),见图1和表1。



注:与TC组比较,① $P<0.01$;与M组比较,② $P<0.01$

图1 各组大鼠不同时间点体质量变化($\bar{x}\pm s, n=8$)

表1 各组大鼠不同时间点体质量变化差值比较(g, $\bar{x}\pm s$)

组别	只数	造模7 d后	造模14 d后	
TC组	8	21.50±1.93	23.50±3.12	
M组	8	-5.00±1.31 ^①	-5.75±1.04 ^①	
ENA组	8	-5.00±1.20 ^①	-6.00±1.69 ^①	
组别		造模21 d后	干预7 d后	干预14 d后
TC组		18.62±2.13	20.75±2.31	15.87±2.03
M组		-9.87±2.03 ^①	5.88±1.25 ^①	7.50±1.60 ^①
ENA组		-8.35±1.41 ^①	13.67±6.44 ^{①②}	17.75±2.38 ^②

注:与TC组比较,① $P<0.05$;与M组比较,② $P<0.05$

2.2 各组大鼠自主活动能力的变化

造模21 d后,与TC组相比,M组和ENA组大鼠在旷场内TD和MSC均明显缩短或减慢,而RTC显著延长,差异有统计学意义($P<0.05$)。干预14 d后,M组的TD和MSC仍少于或慢于TC组,RTC长于TC组,差异有统计学意义($P<0.05$);ENA组的TD、MSC和RTC与TC组比较,差异无统计学意义($P>0.05$),与M组比较,ENA组TD和MSC均显著增加,RTC明显缩短,差异有统计学意义($P<0.05$)。

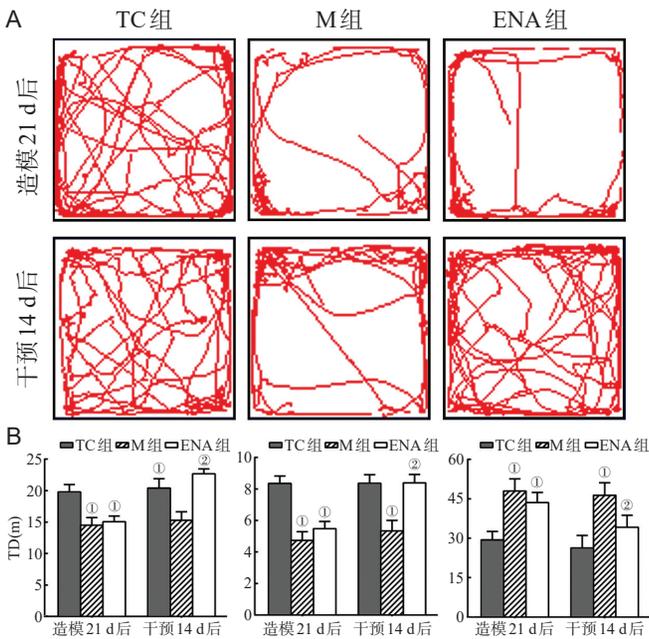
2.3 各组大鼠海马形态学改变

光镜下可见,TC组海马CA1区和齿状回锥体细胞和颗粒细胞层较厚,细胞排列整齐、密集,胞质染色均一、清亮,细胞边界清晰,核膜核仁明显;M组锥体细胞数量明显减少,部分细胞肿胀或胞体变小而不对称,细胞间隙变大,排列松散、紊乱,核膜界限不清,有核固缩或碎裂的表现,可见坏死的神经元,齿状回下层神经前体细胞消失;ENA组颗粒细胞和神经前体细胞数量明显增加,排列整齐,水肿减轻,核仁明显,形态接近正常;见图3。

3 讨论

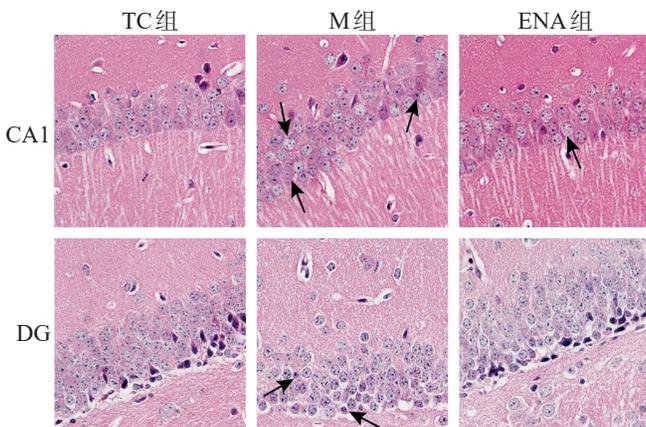
睡眠是维持人体生命活动的重要生理过程,睡眠不足或长期保持觉醒状态会诱发糖尿病、高血压、心脏病及痴呆等多种慢性病^[8,9],影响疾病的预后和转归。目前,动物睡眠模型制备的方法主要有水平台、强迫运动、应激刺激、轻柔刺激和化学刺激等5种^[10],综合各种因素,本实验采用改良的多平台水环境法制备模型,最大程度地模拟CSD状态。本研究发现,造模21 d后,大鼠昼夜节律消失,新陈代谢加快,能量消耗增加,体质量较TC组明显减轻($P<0.01$);干预14 d后,ENA组大鼠体质量增加差值明显高于M组($P<0.01$),说明电项针有助于调节睡眠剥夺后的高代谢紊乱,恢复正常新陈代谢过程。

项针是以针刺项部风池和供血穴为主治疗脑源性疾病的一种特定针法,治疗脑卒中后的延髓麻痹有奇效^[11],曾获得国家科技进步二等奖。通以脉冲电刺激后称为电项针。临床实践发现^[12-14],电项针能明显提高各种急慢性失眠的睡眠质量,恢复睡眠功能,对失眠诱发的焦虑抑郁等精神异常也有很好的改善作用。风池穴为足少阳和阳跷脉的交会穴,供血穴与足太阳、足少阳和督脉联系密切,针刺二穴可以疏肝利胆、安神益智、调节阴阳跷脉平衡,从而恢复昼精夜瞑的状态。此外,二穴深层有椎动脉,还能通过脊髓后角与脑干网状结



注:(A)各组大鼠在旷场活动箱内的运动轨迹;(B)各组的TD、MSC和RTC的统计柱状图;与TC组比较,①P<0.05;与M组比较,②P<0.05

图2 各组大鼠在旷场活动箱内的运动轨迹



注:箭头所指为海马颗粒细胞出现细胞肿胀、胞体变小、细胞核固缩或碎裂等病理改变

图3 海马CA1区和齿状回病理染色结果(HE染色,×400倍) 构相连,电刺激二穴可改善脑部血液循环,活化脑细胞,恢复大脑皮质兴奋与抑制平衡,改善睡眠-觉醒周期。

有研究报道,短期睡眠剥夺后动物出现兴奋性提高,攻击性和警觉性增强的表现,长期剥夺后则表现出烦躁、抑郁、兴趣减少、辨别力和探索力下降等负性情绪^[15],导致精神心理发生异常。孟庆立等^[16]调查分析113例失眠患者的心理健康,发现其焦虑和抑郁量表评分明显高于国内人群的普遍水平。本研究发现,M组大鼠运动总路程和中央区活动速度较TC组明显减少($P<0.05$),说明长期睡眠剥夺降低了大鼠的活动量、兴奋性和好奇心,中央区滞留时间较TC组延长($P<0.05$),说明大鼠对陌生环境的认知能力也下降。与M

组相比,ENA组大鼠总路程增多,中央区活动速度加快,滞留时间缩短($P<0.05$),说明电项针能提高CSD后的自主探究能力,改善失眠所致的焦虑抑郁样行为。

海马是脑内参与学习、记忆、情绪和行为的重要部位,对睡眠不足特别敏感^[17]。本实验HE染色结果发现,与TC组相比,M组大鼠海马CA1区神经元排列疏松不规整,部分细胞核膜边界不清,有核固缩的表现,齿状回下层的神经前体细胞数量明显较少或消失,提示长期失眠可造成海马结构发生病理改变,从而引发精神和行为障碍。电项针治疗的海马组织在光镜下可见排列规整,胞质染色均匀,核仁明显,神经前体细胞增殖数量较多,形态接近正常,说明电项针能改善CSD大鼠海马形态结构,减轻海马神经元的损伤程度。

综上所述,电项针能调节睡眠剥夺后能量代谢紊乱的状态,提高自主探索能力,并且具有促进海马CA1区和齿状回受损神经元修复作用。

参考文献

- [1] Liu H, Chen A. Roles of sleep deprivation in cardiovascular dysfunctions[J]. Life Sci, 2019, 219: 231-237.
- [2] Bolin DJ. Sleep Deprivation and Its Contribution to Mood and Performance Deterioration in College Athletes[J]. Curr Sports Med Rep, 2019, 18: 305-310.
- [3] Espinoza RT. Clarifying the Relationship Between Benzodiazepines and Dementia[J]. J Am Med Dir Assoc, 2020, 21: 143-145.
- [4] 于学平,高全冲.针刺对老年原发性失眠症患者睡眠质量及认知功能影响的临床研究[J].江苏中医药,2019,51:62-64.
- [5] 李佳,刘娇萍.针刺“神门”穴对睡眠剥夺大鼠脑电波及其认知能力的影响[J].针刺研究,2017,42:502-506.
- [6] Machado RB, Suchecki D, Tufik S. Sleep homeostasis in rats assessed by a long-term intermittent paradoxical sleep deprivation protocol[J]. Behav Brain Res, 2005, 160: 356-364.
- [7] 徐东升,赵硕,崔晶晶,等.绘制实验大鼠脑穴图谱的新尝试[J].针刺研究,2019,44:62-65,封63.
- [8] Yamamoto R, Shinzawa M, Isaka Y, et al. Sleep Quality and Sleep Duration with CKD are Associated with Progression to ESKD[J]. Clin J Am Soc Nephrol, 2018, 13: 1825-1832.
- [9] Shokri-Kojori E, Wang GJ, Wiers CE, et al. β -Amyloid accumulation in the human brain after one night of sleep deprivation[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2018, 115: 4483-4488.
- [10] 魏砚君,卞宏生,叶晓楠,等.睡眠剥夺动物模型及其在中医药改善睡眠研究中的应用[J].中国实验方剂学杂志,2018,24:227-234.
- [11] 刘双岭,王伟华,高维滨.高维滨教授针灸学术思想简介[J].上海针灸杂志,2016,35:906-908.
- [12] 栾依含,高维滨,胡霖霖,等.电项针治疗女性失眠症的临床观察[J].针灸临床杂志,2012,28:35-36.
- [13] 周磊,高维滨.电项针治疗抑郁症的临床观察[J].针灸临床杂志,2011,27:26-27.
- [14] 吴建丽,祁美慧,梁吉,等.电项针疗法治疗原发性失眠症临床观察[J].上海针灸杂志,2020,39:153-157.
- [15] Tempesta D, Soccia V, De Gennaro L, et al. Sleep and emotional processing[J]. Sleep Med Rev, 2018, 40: 183-195.
- [16] 孟庆立,张福英,陈成雨,等.失眠症患者的心理健康分析[J].临床精神医学杂志,2015,25:257.
- [17] Rolls ET. The cingulate cortex and limbic systems for emotion, action, and memory[J]. Brain Struct Funct, 2019, 224: 3001-3018.

(本文编辑:唐颖馨)