

文章编号: 1005-0957 (2023) 06-0644-09

· 动物实验 ·

# 电项针对颅脑损伤后神经功能障碍大鼠神经可塑性的促进作用及机制研究

王亚芳, 李志芳, 王涛

(平顶山市第一人民医院, 平顶山 467000)

**【摘要】** 目的 观察电项针对颅脑损伤(traumatic brain injury, TBI)后神经功能障碍大鼠神经可塑性的促进作用及机制研究。方法 将 Sprague-Dawley (SD) 大鼠随机分为空白组、模型组和电项针组, 每组 30 只。除空白组外其余大鼠制备颅脑损伤模型。电项针组大鼠给予电项针干预, 空白组和模型组大鼠仅给予相同时间和方式的捆绑固定。比较 3 组大鼠水迷宫实验相关指标(逃避潜伏期和 90 s 内经过原平台所在区域次数)以及海马区突触长时程增强(long-term potentiation, LTP)测试的群体锋电位(population spike, PS)幅值变化;光镜下观察 3 组大鼠海马齿状回(dentate gyrus, DG)、CA1、CA3 区和突触结构;电镜下观察 3 组大鼠海马 CA1、CA3 区和突触超微结构;采用 Western blot 法检测 3 组海马区突触相关蛋白[突触囊泡蛋白(synaptophysin, SYP)、突触后致密蛋白-95(postsynaptic density protein-95, PSD-95)和生长相关蛋白 43(growth-associated protein 43, GAP43)]及脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)/络氨酸激酶受体 B(tyrosine kinase receptor B, TrkB)/环磷腺苷效应元件结合蛋白(cAMP-response element-binding protein, CREB)通路相关蛋白的表达。结果 与空白组比较, 模型组大鼠逃避潜伏期均明显较长, 90 s 内经过原平台所在区域次数明显减少, PS 幅值在 0~120 min 内均明显增加, 光镜下海马 DG、CA1、CA3 区和突触大体形态结构及电镜下海马 CA1、CA3 区和突触超微结构均发生改变, 大鼠海马区突触相关蛋白 SYN、PSD95 和 GAP43 及信号通路相关蛋白 BDNF、TrkB 和 CREB 相对含量均明显降低, 差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。与模型组比较, 第 8~12 次电项针组逃避潜伏期明显缩短, 90 s 内经过原平台所在区域次数明显增加, PS 幅值在 0~120 min 内均明显降低, 海马组织和突触大体形态结构及电镜观察到超微结构均有所改善, 大鼠海马区突触相关蛋白 SYN、PSD95 和 GAP43 及信号通路相关蛋白 BDNF、TrkB 和 CREB 相对含量均明显升高, 差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论 电项针疗法能够改善 TBI 大鼠的学习记忆能力, 改善海马区脑组织结构及突触结构和功能, 上调突触相关蛋白表达, 发挥神经保护作用, 且电项针疗法发挥上述作用的机制可能与激活 BDNF/TrkB/CREB 信号通路有关。

**【关键词】** 电针; 颅脑损伤; 功能障碍; 神经可塑性; 大鼠

**【中图分类号】** R2-03 **【文献标志码】** A

DOI:10.13460/j.issn.1005-0957.2021.13.2027

**Promoting effect and mechanism research of nape electroacupuncture on neural plasticity in rats with neurological dysfunction after traumatic brain injury** WANG Yafang, LI Zhifang, WANG Tao. Pingdingshan First People's Hospital, Pingdingshan 467000, China

**[Abstract]** **Objective** To observe the effect of nape electroacupuncture on the neural plasticity in rats with neurological dysfunction after traumatic brain injury (TBI) and explore its mechanism. **Method** Sprague-Dawley (SD) rats were randomized into a blank group, a model group, and a nape electroacupuncture group, with 30 rats in each group. All rats were established to be TBI models except those in the blank group. Rats in the nape electroacupuncture group received nape electroacupuncture intervention, and those in the blank and model groups were only fixed in the same way at the intervention time points. The water maze test results (escape latency and the number of times crossing

作者简介: 王亚芳(1980—), 女, 主管护师, Email:1824740455@qq.com

the original platform in 90 s) and the change in the population spike (PS) amplitude in the hippocampal synaptic long-term potentiation (LTP) test were compared among the three groups; the hippocampal dentate gyrus (DG), CA1, CA3, and synaptic structures were observed under a light microscope for the three groups of rats; the hippocampal CA1, CA3, and synaptic ultrastructures were observed using an electron microscope; Western blot was used to determine the expression of synapse-associated proteins [synaptophysin (SYP), postsynaptic density protein-95 (PSD-95), and growth-associated protein 43 (GAP43)] and proteins related to the brain-derived neurotrophic factor (BDNF)/tyrosine kinase receptor B (TrkB)/cAMP-response element-binding protein (CREB) signaling pathway in the hippocampus. **Result** Compared with the blank group, the escape latency extended, and the number of crossing the original platform in 90 s reduced significantly in the model group rats; the PS amplitude increased notably during 0-120 min; the general structures of hippocampal DG, CA1, CA3, and synapses under the light microscope and the ultrastructures of hippocampal CA1, CA3, and synapses under the electron microscope showed alterations; the relevant concentrations of the synapse-associated proteins SYN, PSD95, and GAP43 and the signaling pathway-associated proteins BDNF, TrkB, and CREB in the hippocampus all showed notable decreases in the model group, all showing statistical significance ( $P < 0.05$ ). Compared with the model group, the escape latency was significantly shortened, and the number of crossing the original platform in 90 s increased significantly from the 8th to the 12th times in the nape electroacupuncture group; the PS amplitude during 0-120 min dropped notably; the gross structures of hippocampal tissues and synapses and the ultrastructures observed by the electron microscope showed improvements; the relevant concentrations of the synapse-associated proteins SYN, PSD95, and GAP43 and the pathway-associated proteins BDNF, TrkB, and CREB in the hippocampus all increased significantly, showing statistical significance ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Nape electroacupuncture can improve the learning and memory abilities of TBI rats, improve the hippocampal brain structure and synaptic structure and function, up-regulate the expression of synapse-associated proteins, and play a role in neuroprotection; the mechanism for nape electroacupuncture producing these effects may be related to the activation of the BDNF/TrkB/CREB signaling pathway.

**[Key words]** Electroacupuncture; Craniocerebral trauma; Dysfunction; Neural plasticity; Rats

颅脑损伤 (traumatic brain injury, TBI) 是一种常见的神经外科疾病, 发病率和死亡率均较高<sup>[1]</sup>。作为学习与记忆基础, 海马区神经可塑性损伤会使患者学习与记忆能力降低, 但在海马损伤之后存在生理性恢复过程, 认知水平会得到提高, 该过程对于修复 TBI 至关重要。突触作为神经系统重要组成部分, 有研究<sup>[2]</sup>认为, 突触功能障碍是 TBI 后神经功能障碍的始动因素。目前改善认知功能的药物主要有吡拉西坦片 (脑复康)、盐酸美金刚片等促进脑血液循环的药物及抗氧化剂等, 可暂时提升患者认知功能, 但无法延缓病情发展。而针灸疗法具有醒神、开窍、益智的作用, 是改善认知功能的有效措施。其中最为突出的是电项针疗法, 对改善预后确有确切疗效<sup>[3-4]</sup>, 但其作用机制尚未明确。本研究使用电项针治疗 TBI, 观察其对 TBI 后神经功能障碍大鼠神经可塑性的保护作用, 揭示其对神经可塑性保护作用的具体机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 128 只, SPF 级, 体重 (220 ± 10) g, 由北京科兴生物制品有限公司提供, 使用许可证号为 SYXK(京)2019-0053, 饲养条件为温度 (20~26) °C, 湿度 52%~56%, 昼夜节律 12 h/12 h, 自由饮水摄食。适应性喂养 1 周后用于模型构建。本研究所有操作均符合优化、替代、减少的 3R 原则, 实验开展前获得医院的动物伦理委员会批准 (IACUC-20190611-35)。第 1 周先对 128 只大鼠进行适应性喂养, 然后每只大鼠在每天上午固定时间进行 1 次水迷宫实验, 直到第 4 次结束后, 将 90 s 始终无法找到平台的大鼠找出并剔除, 此过程共剔除 10 只大鼠, 将剩余 118 只大鼠纳入本研究, 按照随机数字表法分为空白组 (30 只) 和造模组 (88 只)。

## 1.2 主要试剂与仪器

2%戊巴比妥钠(上海默克化工技术有限公司),  $\beta$ -actin(北京康为世纪生物科技有限公司), 兔抗大鼠突触后致密蛋白-95(postsynaptic density protein-95, PSD-95)多克隆抗体(ab13552, abcam), 兔抗突触膨体素(synaptophysin, SYN) (P4092Rb-h, Santa Cruz), 兔抗大鼠突触囊泡蛋白(synaptophysin, SYP)多克隆抗体(ab32594, abcam), 兔抗大鼠脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)单克隆抗体(ab18258, abcam), 兔抗大鼠酪氨酸激酶受体 B(tyrosine kinase receptor B, TrkB)多克隆抗体(ab18987, abcam), RIPA 裂解液(P0013B, 上海碧云天生物技术有限公司)。兔抗生长相关蛋白 43(growth-associated protein 43, GAP43) (ABP51399-1), 蛋白激酶 A-环磷酸腺苷反应元件结合蛋白(protein kinase A-cyclic adenosine monophosphate-response element-binding protein, CREB)抗体(K11964, 北京博奥森生物技术有限公司)。ST-3ND 型脑立体定位仪(上海康威医疗科技发展有限公司), WMT-100S Morris 水迷宫视频分析系(成都泰盟软件有限公司), JYD-650L 型超声波细胞粉碎仪(上海五相仪器仪表有限公司), H-7650 型日立投射电子显微镜(日本日立), SDZ-V 型华佗牌电子针疗仪购自苏州医疗用品厂有限公司。

## 1.3 模型制备

根据参考文献<sup>[5]</sup>, 所有大鼠禁食禁水 8 h 后腹腔注射 3%戊巴比妥钠溶液[60 mg/(kg·bw)]麻醉并在脑立体定位仪上固定, 常规消毒后, 切开皮肤, 定位冠状缝后 3 mm 及中线右侧旁开 2.5 mm, 用微型魔钻钻骨窗, 大鼠移至电子颅脑损伤仪, 设置深度 3 mm 和速度 4 m/s, 打击后处理伤口。将大鼠置于棉垫上, 待苏醒后进行单笼饲养。术后为预防感染, 每日肌肉注射 1 次氨苄西林钠, 每次 125 g, 连用 3 d。造模过程中造模组存活的 82 只大鼠继续按照逃避潜伏期用时由多到少依次筛选出 60 只, 随机分为模型组和电项针组, 每组 30 只。

## 1.4 干预方法

造模成功后, 电项针组大鼠参照《大鼠穴位图谱的研制》<sup>[6]</sup>中的大鼠穴位图及顶部腧穴的神经解剖结构选取双侧风池和供血穴进行针刺。其中风池穴位于大鼠枕骨顶嵴后枕寰关节背凹陷处旁约 2 mm, 供血穴位于第 4 颈椎棘突旁约 2 mm。常规消毒后进行针刺, 进

针深度为 0.25~0.30 mm。取毫针从大鼠头顶部进针向鼻尖方向刺入, 刺入深度约为 3~4 mm, 连接电子针疗仪, 其正负极与双侧风池穴和供血穴的毫针联通。使用 2 Hz 的疏波进行电刺激, 此时观察大鼠颈部肌肉轻度收缩, 留针 30 min。每日 1 次, 连续 12 d。其余组大鼠仅给予相同时间和方式的捆绑固定。

## 1.5 观察指标及方法

### 1.5.1 水迷宫实验

自电项针组大鼠进行电项针干预完成后, 3 组随机取 6 只大鼠进行水迷宫实验。定位航行实验将大鼠分别从 4 个象限入水, 若在 90 s 内爬回平台, 则记录该时长为逃避潜伏期, 若大鼠在 90 s 内未找到平台则将逃避潜伏期定义为 90 s。实验期间, 3 组大鼠于上午固定时间进行 1 次水迷宫实验测试, 实验周期为 12 d。空间探索实验在定位航行实验结束后, 撤除平台, 将大鼠放入水中并观察记录大鼠 90 s 内经过原平台所在区域的次数。

### 1.5.2 海马区突触长时程增强(long-term potentiation, LTP)测试

电项针干预完成后次日, 3 组从剩余大鼠中随机选取 6 只大鼠, 使用 2%戊巴比妥钠麻醉大鼠, 根据《大鼠脑立体定位图谱》<sup>[7]</sup>(图 1), 将刺激电极插入内嗅皮层的前穿通前卫(perforant path, PP), 记录电极插入海马齿状回(dentate gyrus, DG)。使用单个方波刺激 PP(频率 0.5 Hz, 波宽 0.1 ms), 在 DG 处找到稳定的群体锋电位(population spike, PS)后, 每 5 min 记录 1 次 PS 幅值作为基线值(100%), 连续测试 30 min。采用高频强直电刺激(high-frequency stimulation, HFS), 然后再恢复到测定基础水平时的参数, PS 幅值记录周期为 5 min, 连续观察 2 h。以 HFS 后 PS 幅值增加的百分率作为突触长时程的增强效应。与基础水平比较, PS 波幅增加 20%以上并持续超过 30 min, 则说明 LTP 诱导成功。测试完成后, 给予直流电 20 min, 以损毁此处脑组织。利用脑组织冰冻切片 HE 染色技术, 判断电极是否准确插入相应区域, 偏离位置的实验数据不予统计。

### 1.5.3 大鼠海马 DG、CA1、CA3 区大体形态结构

治疗结束后, 3 组随机取 3 只大鼠, 给予 4%多聚甲醛溶液 200 mL 进行心脏灌注, 断头取脑组织, 区分海马 CA1、CA3 和 DG 区。制备组织切片, 然后进行苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色, 在光镜下观察上述脑组织区域大体形态结构。

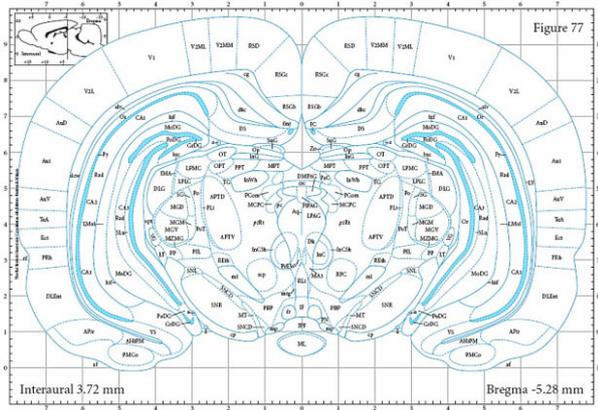


图 1 大鼠脑立体定位图谱

#### 1.5.4 透射电镜观察海马 CA1、CA3 区超微结构

从 3 组剩余大鼠中随机取 3 只大鼠, 同上方方法取脑组织。区分海马 CA1、CA3 区, 在目标部位取材, 长、宽约为 2 mm 大小, 放入 2.5%戊二醛溶液总固定。经清洗、脱水、包埋、切片和染色后制成厚度 50~70 nm 的切片, 电镜下观察上述脑组织区域超微结构。

#### 1.5.5 Golgi-Cox 染色观察海马区突触形态

麻醉后取 3 只大鼠脑组织, 用 4%多聚甲醛溶液固定 24 h, 避光, 用高尔基染液染色 14 d。浸泡 48 h 后, 将脑组织转移到新的高尔基染液中。每 3 d 换 1 次高尔基染液。取出脑组织, 置于 15%蔗糖溶液中 4 °C 下脱水 1 d, 然后再置于 30%蔗糖溶液中 4 °C 脱水 2 d。取出脑组织, 分别用蒸馏水洗 1 min, 浓氨水洗 45 min, 蒸馏水洗 1 min, 固定液洗 45 min、蒸馏水洗 1 min。脑组织被放置在 30%的蔗糖溶液 4 °C 脱水, 避光 3 d。脱水后用冷冻切片机制 100 μm 厚度的切片, 用甘油明胶密封。在油镜下观察切片并拍照, 使用图像处理软件 Image J 计算每个截面的树突分支和树突棘的密度。

#### 1.5.6 透射电镜观察海马区突触超微结构

海马组织切块, 2.5%戊二醛溶液固定 3 d, 1%锇酸溶液避光固定 2 h, 梯度丙酮脱水, 树脂包埋, 50 nm 超薄切片, 采用醋酸铀、枸橼酸铅双重染色, 透射电镜观察海马神经元突触超微结构变化。

#### 1.5.7 Western blot 检测海马区突触和 BDNF/TrkB/CREB 通路相关蛋白表达

分离大鼠海马区脑组织, 加入 RIPA 裂解液后制备脑匀浆。冰上孵育, 离心, 取上清于离心管。采用 BCA 法测定蛋白浓度后, 3 组取 30 μg 蛋白煮沸变性后进行 SDS-PAGE, 恒流转膜 1.5 h, TBST 洗膜 3 次, 按 1:1 000 比例加入 SYN、GAP43、PSD95、TrkB、CREB、BDNF 抗体稀释液, 4 °C 孵育过夜, TBST 洗膜 3 次, 1:1 000 比例

加入 HRP 标记二抗, 室温孵育 1 h。Image-ProPlus 6.0 软件测定目的蛋白灰度值, 以 β-actin 为内参蛋白, 以蛋白与内参 β-actin 灰度值之比表示相对表达量。

#### 1.6 统计学分析

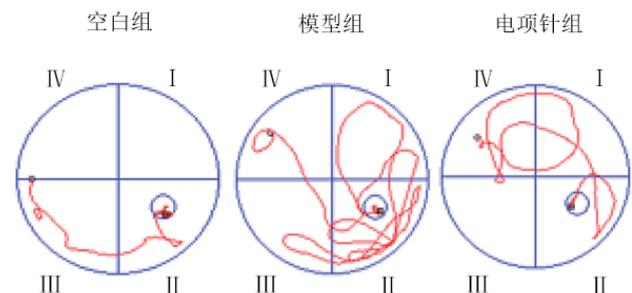
采用 SPSS21.0 软件对数据进行统计分析。符合正态分布的计量资料以均数 ± 标准差表示, 3 组间比较采用单因素方差分析, 方差齐时组间两两比较采用 LSD 检验, 方差不齐时采用 Dunnett's 检测进行两两比较。重复测量资料使用重复测量方差分析。以  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 电项针对颅脑损伤大鼠运动功能的影响

#### 2.1.1 3 组大鼠水迷宫轨迹图

比较 3 组的迷宫轨迹图, 结果发现, 空白组寻找目标平台的路径清晰直接; 模型组大鼠路径杂乱无章、毫无目标性; 与模型组比较, 电项针组路径清晰度有所改善。详见图 2。



注: I、II、III、IV 为 4 个象限, 目标平台置于第 II 象限。

图 2 3 组大鼠水迷宫轨迹图

#### 2.1.2 3 组大鼠逃避潜伏期比较

比较第 1~12 次水迷宫实验结果发现, 与空白组比较, 模型组和电项针组鼠逃避潜伏期均明显增长, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。与模型组比较, 第 1 次电项针组逃避潜伏期较长, 第 2~7 次缩短, 差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 第 8~12 次电项针组逃避潜伏期明显缩短, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。详见表 1。

#### 2.1.3 3 组大鼠 90 s 内过原平台区域次数比较

比较 3 组大鼠 90 s 内经过原平台所在区域次数发现, 与空白组比较, 模型组次数明显较少, 电项针组次数明显较多, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。与模型组比较, 电项针组次数明显增加, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。详见表 2。

表 1 3组大鼠逃避潜伏期比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

单位: s

时间	n	空白组	模型组	电项针组
第 1 次	6	89.77±11.10	102.97±11.14 <sup>1)</sup>	105.22±11.69 <sup>1)</sup>
第 2 次	6	86.73±10.21	102.55±9.98 <sup>1)</sup>	99.08±15.16 <sup>1)</sup>
第 3 次	6	81.95±10.10	98.18±12.69 <sup>1)</sup>	93.50±13.30 <sup>1)</sup>
第 4 次	6	78.06±9.68	94.01±17.31 <sup>1)</sup>	89.74±14.87 <sup>1)</sup>
第 5 次	6	77.76±10.76	90.66±12.28 <sup>1)</sup>	87.57±13.05 <sup>1)</sup>
第 6 次	6	71.29±6.52	87.32±12.38 <sup>1)</sup>	78.03±13.26 <sup>1)</sup>
第 7 次	6	65.86±9.27	82.77±13.83 <sup>1)</sup>	73.00±12.54 <sup>1)</sup>
第 8 次	6	60.09±8.12	80.39±9.21 <sup>1)</sup>	66.64±11.89 <sup>1)2)</sup>
第 9 次	6	59.75±10.45	76.45±10.75 <sup>1)</sup>	63.68±8.59 <sup>1)2)</sup>
第 10 次	6	56.24±10.44	74.91±10.52 <sup>1)</sup>	60.58±13.04 <sup>1)2)</sup>
第 11 次	6	47.54±13.27	72.18±9.52 <sup>1)</sup>	52.44±11.20 <sup>1)2)</sup>
第 12 次	6	41.09±11.72	68.24±11.23 <sup>1)</sup>	44.46±9.05 <sup>1)2)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup>P<0.05;与模型组比较<sup>2)</sup>P<0.05。

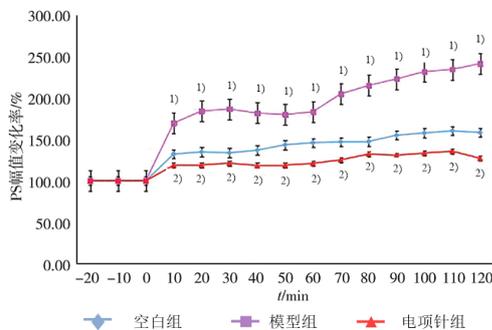
表 2 3组大鼠 90 s 内过原平台所在区域次数比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	次数/次
空白组	6	6.89±1.65
模型组	6	3.08±1.12 <sup>1)</sup>
电项针组	6	6.76±1.38 <sup>2)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup>P<0.05;与模型组比较<sup>2)</sup>P<0.05。

### 2.2 电项针对大鼠海马突触 LTP 的影响

高频强直刺激后,相比于基线值,3组大鼠的PS幅值均增加20%以上并持续超过30 min,提示LTP诱发成功;与空白组比较,模型组的PS幅值在0~120 min均明显增加,差异有统计学意义(P<0.05);与模型组比较,电项针组的PS幅值在0~120 min均明显降低,差异均有统计学意义(P<0.05)。详见图3。



注:与空白组比较<sup>1)</sup>P<0.05;与模型组比较<sup>2)</sup>P<0.05。

图 3 电项针对大鼠海马突触 LTP 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

### 2.3 电项针对大鼠海马 DG、CA1、CA3 区大体形态结构的影响

光镜下观察 3 组大鼠海马区脑组织大体形态结构,

结果发现,空白组大鼠海马区椎体细胞结构完整,分布均匀,排列整齐。与空白组比较,模型组大鼠海马区椎体细胞层较薄且稀疏,细胞结构不完整,大量细胞缺失,细胞间隙较大,排列紊乱。与模型组比较,电项针组大鼠海马区椎体细胞层厚实,神经元萎缩。详见图4。

### 2.4 电项针对大鼠海马 CA1、CA3 区超微结构的影响

空白组大鼠海马 CA1、CA3 区神经元染色质均匀,细胞核饱满;突触及前膜内囊泡分布广泛,后膜致密物质厚,前后膜边界清晰,活动区较长。与空白组大鼠比较,模型组海马 CA1、CA3 区神经元染色质分布不均匀,核膜明显皱缩,细胞核固缩;线粒体有空泡、肿胀;突触及前膜内囊泡明显减少,后膜致密物质稀疏,前后膜边界不清晰,活动区长度较短。与模型组比较,电项针组大鼠的海马 CA1、CA3 区神经元染色质均匀,细胞核饱满;突触及前膜囊泡增多,后膜致密物质厚,前后膜边界清晰,活动区较长。详见图5。

### 2.5 电项针对大鼠海马区突触形态的影响

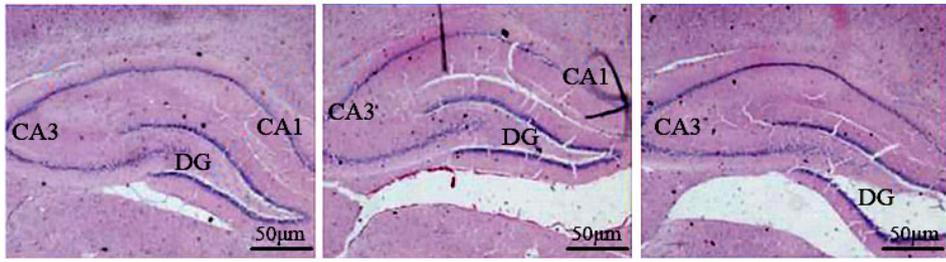
通过Golgi-Cox染色分析3组大鼠突触形态,结果发现,空白组大鼠神经元饱满,树突棘分枝叶均一且较长;与空白组大鼠比较,模型组海马树突棘萎缩,密度较低,分枝较短,排列杂乱;与模型组比较,电项针组大鼠树突损伤情况有所缓解,树突棘密度、分枝长度及排列情况均明显改善。详见图6。

### 2.6 电项针对大鼠海马区突触超微结构的影响

空白组大鼠海马突触数量较多,囊泡丰富,大小均匀,结构完整,前后膜边界清晰;与空白组大鼠比较,模

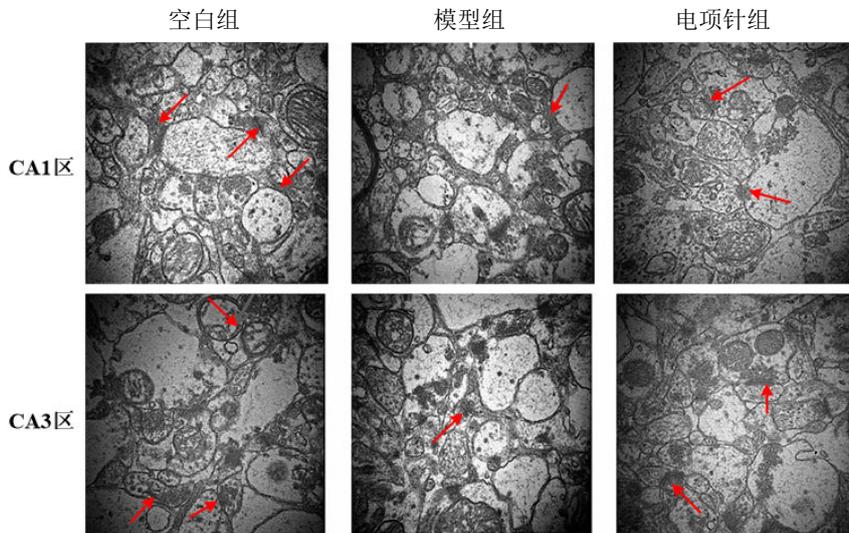
型组海马突触数量较少,前膜囊泡减少,神经元胞核皱缩,前后膜边界较模糊;与模型组比较,电项针组染色

质均匀,突触和突触小泡数量均增加,前后膜边界清晰。详见图 7。



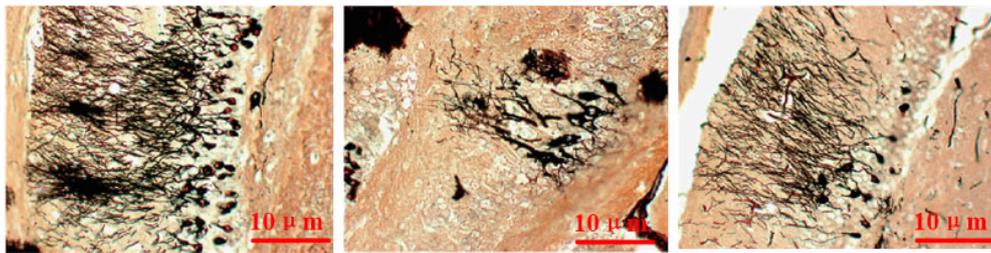
空白组                      模型组                      电项针组

图 4 电项针对大鼠海马 DG、CA1、CA3 区大体形态结构的影响(HE 染色, ×40)



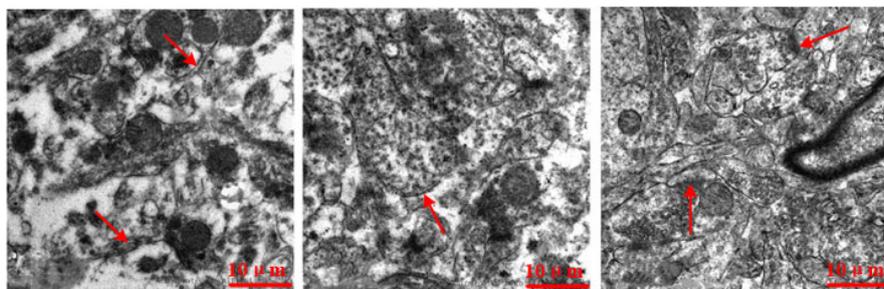
注:红色箭头示突触结构。

图 5 电镜下 3 组大鼠海马 CA1、CA3 区超微结构比较(透射电镜, ×40 000)



空白组                      模型组                      电项针组

图 6 电项针对大鼠海马区突触形态的影响(Golgi-Cox 染色, ×150)



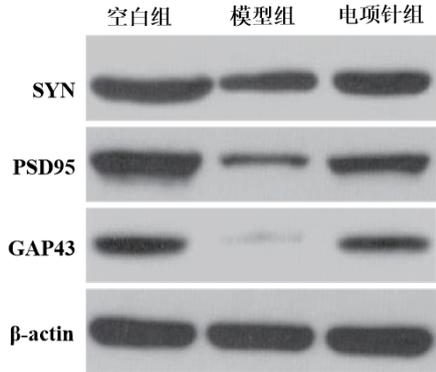
空白组                      模型组                      电项针组

注:红色箭头示突触结构。

图 7 电项针对大鼠海马区突触超微结构的影响(透射电镜, ×25 000)

### 2.7 电项针对大鼠海马区突触相关蛋白 SYN、PSD95 和 GAP43 的影响

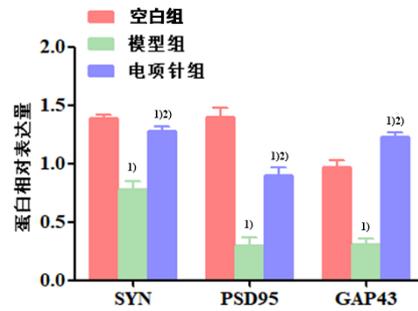
与空白组比较,模型组大鼠海马区 SYN、PSD95 和 GAP43 蛋白表达均明显减少,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )



注:与空白组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ;与模型组比较<sup>2)</sup> $P < 0.05$ 。

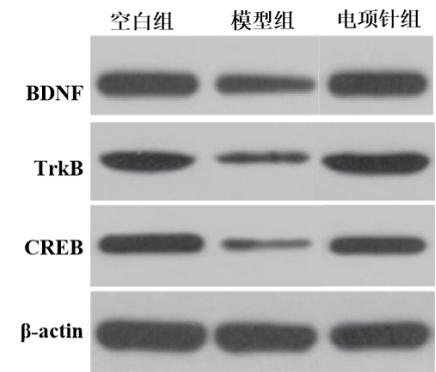
图 8 电项针对大鼠海马区 SYN、PSD95 和 GAP43 蛋白的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

0.05);与模型组大鼠比较,电项针组海马区 SYN、PSD95 和 GAP43 蛋白表达均明显增加,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。详见图 8。



### 2.8 电项针对大鼠海马区 BDNF/TrkB/CREB 通路相关蛋白的影响

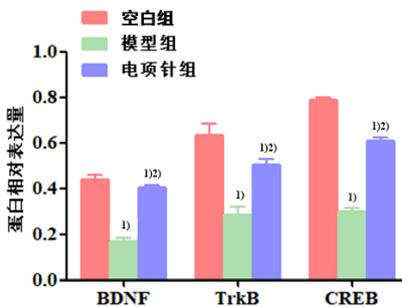
与空白组比较,模型组大鼠海马区通路相关蛋白 BDNF、TrkB 和 CREB 蛋白表达均明显减少,差异有统计



注:与空白组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ;与模型组比较<sup>2)</sup> $P < 0.05$ 。

图 9 电项针对大鼠海马区 BDNF/TrkB/CREB 信号通路的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

学意义 ( $P < 0.05$ );与模型组比较,电项针组大鼠海马区通路相关蛋白 BDNF、TrkB 和 CREB 表达均明显增加;差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。详见图 9。



## 3 讨论

### 3.1 电项针对 TBI 大鼠疗效显著

电项针是结合现代医学和传统针灸治疗,由项针疗法联合电刺激进行治疗<sup>[8]</sup>。风池穴属足少阳胆经,位于头项交界处,是椎动脉的投射区,是为进入头部的通道,针灸此穴可祛外风、利头目,阳经升发,滋养髓海。供血穴位于风池穴以下,与足少阴经相通,是醒脑开窍的经验穴,从解剖学角度来看,风池穴和供血穴深层结构均具有椎动脉、静脉,同时电项针两穴,可加快椎-基底动脉血流速度,改善大脑血流及氧分供应,从而有助于脑神经元功能的恢复<sup>[9]</sup>。因此,本研究使用电项针风池、供血二穴,可以改善大鼠脑组织损伤部位的血流

供应,提高摄氧能力,达到醒神开窍的目的。本研究发现,电项针干预后 TBI 大鼠海马区解剖结构均有一定改善作用。水迷宫实验依赖于大脑海马区的结构功能,是用于实验动物宏观行为学评估的经典实验,其中定位航行实验和空间探索实验主要用于衡量学习与记忆能力<sup>[10]</sup>。本研究通过水迷宫实验发现,TBI 模型组水迷宫轨迹图杂乱无章,毫无目标性,逃避潜伏期时间延长,空间探索实验表现也较差,而通过电项针干预的大鼠症状均有所改善,另外本研究发现 3 组大鼠逃避潜伏期时间随着时间的延长均有明显的缩短,原因可能是水迷宫实验对大鼠的认知功能回复也有一定的作用,其本身也是一种治疗方法,但其中电项针干预效果更

加明显。

### 3.2 电项针对 TBI 大鼠突触可塑性的改善作用

突触是维持神经系统功能稳定的基础。已有研究<sup>[11]</sup>表明,突触是神经系统发挥生物学功能的重要关键元件,神经功能的稳定依靠突触的功能及结构的可塑性来实现。其中突触结构可塑性由树突棘形态和数量决定<sup>[12]</sup>;突触功能可塑性主要与 LTP 和 LTD 的协同作用有关。一般认为,在正常情况下,突触是神经信号传递的中枢,发挥生理功能;而在病理状态下,突触可塑性损伤会造成多种中枢神经性疾病<sup>[13]</sup>。本研究进一步从海马神经元突触结构和功能检测电项针干预对 TBI 大鼠突触损伤的改善效果,结果发现,电项针干预后,TBI 大鼠突触结构和功能均有显著改善,证实电项针干预可有效改善海马神经元突触可塑性。

### 3.3 电项针疗法可通过上调海马区突触相关蛋白的表达发挥神经保护作用

多种突触相关蛋白共同维持突触的功能,调控神经递质的释放。SYN、PSD-95 和 GAP-43 均是突触结构相关且可反映突触重建水平的特异性蛋白,与神经的可塑性和修复再生相关,其中 SYN 位于突触前膜,主要调节神经递质的释放<sup>[14]</sup>;PSD-95 位于突触后膜,在维持突触结构和功能可塑性方面起着关键作用<sup>[15]</sup>;GAP43 与突触发育形成和神经细胞再生有关<sup>[16]</sup>。已有研究<sup>[17]</sup>发现,GAP43、SYN 和 PSD-95 在脑出血后可增强神经可塑性。已有研究<sup>[18]</sup>报道,电针疗法可促进大鼠海马区 PSD-95 表达,增强突触可塑性,维持突触后膜稳定性。也有研究<sup>[19]</sup>发现,电针疗法联合补阳还五汤可改善神经行为障碍,其机制与电针疗法上调 MCAO 大鼠海马 CA1 区 SYN、GAP43 有关。本研究发现,电项针可增加大鼠海马区 SYN、GAP43 和 PSD95 阳性细胞数量。提示电项针可上调 TBI 大鼠突触相关蛋白表达,改善突触功能,促进大脑的神经可塑性功能。

### 3.4 电项针疗法可通过 BDNF/TrkB/CREB 信号通路发挥神经保护作用

已有一些研究<sup>[20]</sup>发现,BDNF/TrkB/CREB 信号通路与多种神经性疾病的突触功能具有密切联系。BDNF 是海马新突触生成的关键因子之一,其可促进神经元轴突及树突生长,有助于增强突触可塑性<sup>[21]</sup>。BDNF 通过与高亲和性受体 TrkB 结合,引起 TrkB 的磷酸化,是脑源神经营养因子的关键通路,通过激活其下游通路,从而发挥生物学作用<sup>[22]</sup>。CREB 作为 BDNF/TrkB 信号通路

下游的重要因子,负责信号通路的调控,其主要位于真核生物细胞核内<sup>[23]</sup>。已有研究<sup>[24]</sup>报道,在神经活动的刺激下,BDNF/TrkB/CREB 信号通路在神经元细胞再生、突触形成等方面具有重要的调节作用。为探究电项针疗法促进 TBI 大鼠神经可塑性的具体机制,本研究对 3 组大鼠的海马区 BDNF/TrkB/CREB 信号通路进行初步探究,结果发现,电项针干预可增加大鼠海马区 BDNF/TrkB/CREB 通路蛋白表达。提示电项针可能通过 BDNF/TrkB/CREB 信号通路改善 TBI 大鼠症状。

综上所述,电项针能够改善 TBI 大鼠海马区脑组织结构及神经元突触结构和功能,促进记忆能力的恢复,上调突触相关蛋白表达,其机制可能与激活 BDNF/TrkB/CREB 信号通路有关。然而,本研究的局限性在于,电镜检测仅观察分析了 CA1、CA3 区超微结构,未观察 DG 区;只检测了治疗结束时各相关蛋白表达情况,进一步可探讨相关蛋白含量的动态变化及各分区表达差异。

### 参考文献

- [1] DENG Q J, XU X F, REN J. Effects of SDF-1/CXCR4 on the repair of traumatic brain injury in rats by mediating bone marrow derived mesenchymal stem cells[J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2018, 38 (2) : 467-477.
- [2] GOOSTREY K J, LEE C, JONES K, *et al*. Adapting a traumatic brain injury goals-of-care decision aid for critically ill patients to intracerebral hemorrhage and hemispheric acute ischemic stroke[J]. *Crit Care Explor*, 2021, 3 (3) : e0357.
- [3] 刘勇,魏鑫甜.通过脑干听觉诱发电位观察电项针治疗脑干缺血大鼠即时效应[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2020, 22 (3) : 8-11.
- [4] 谷婷,王瑞辉,吴涛,等.基于 PI3K/Akt 通路探讨电针对创伤性颅脑损伤大鼠脑神经细胞凋亡的影响[J]. *中国针灸*, 2020, 40 (8) : 851-856.
- [5] 谷婷,王鑫,杨欢,等.电针对颅脑损伤大鼠神经功能及凋亡相关蛋白 Cyt-C、Caspase-9 表达的影响[J]. *中国针灸*, 2020, 40 (7) : 749-755.
- [6] 华兴邦,李辞荣,周浩良,等.大鼠穴位图谱的研制[J]. *实验动物与动物实验*, 1991, 1 (1) : 1-5.
- [7] 郭海波,全睿,王慧. SD 大鼠中缝背核脑立体定位的最佳参数研究[J]. *实用医药杂志*, 2020, 37 (3) : 257-259.

- [8] 盛国滨, 苏航, 李慧玲, 等. 电项针疗法对难治性平坦下降型突发性聋患者听力的影响[J]. 中国针灸, 2020, 40(7):726-730.
- [9] 刘慧慧, 曹焱, 蒋巍, 等. 电项针联合局部针刺治疗视网膜中央动脉阻塞的效果[J]. 中国医药导报, 2021, 18(16):133-136.
- [10] YOUNG M E, HOANE M R. Mixed effects modeling of morris water maze data revisited: bayesian censored regression[J]. *Learn Behav*, 2021, 49(3):307-320.
- [11] LI Y, ZHANG L, LI J, *et al.* A Role for transmembrane protein 16C/slack impairment in excitatory nociceptive synaptic plasticity in the pathogenesis of remifentanil-induced hyperalgesia in rats[J]. *Neurosci Bull*, 2021, 37(5):669-683.
- [12] CHEN R, ZHANG Q, YAN Y, *et al.* Legumain knockout protects against A $\beta$ 1-42-induced AD-like cognitive deficits and synaptic plasticity dysfunction via inhibiting neuroinflammation without cleaving APP[J]. *MolNeurobiol*, 2021, 58(4):1607-1620.
- [13] LIU Y, XU S, BIAN H, *et al.* Xing Nao Jing ameliorates synaptic plasticity and memory deficits in an A $\beta$ 1-42 induced mouse model of Alzheimer's disease[J]. *J Pharmacol Sci*, 2020, 143(4):245-254.
- [14] FAN X Y, SHI G, ZHAO P. Methylation in syn and Pcd95 genes underlie the inhibitory effect of oxytocin on oxycodone-induced conditioned place preference[J]. *Eur Neuropsychopharmacol*, 2019, 29(12):1464-1475.
- [15] XIE M J, ISHIKAWA Y, YAGI H, *et al.* PIP3-Phldb2 is crucial for LTP regulating synaptic NMDA and AMPA receptor density and PSD95 turnover[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1):e4305.
- [16] EL-SHERBEENY N A, IBRAHIEM A T, ALI H S, *et al.* Carbamazepine conquers spinal GAP43 deficiency and sciatic Nav1.5 upregulation in diabetic mice: novel mechanisms in alleviating allodynia and hyperalgesia[J]. *Arch Pharm Res*, 2020, 43(7):724-734.
- [17] DENG L, GAO X, FAN G, *et al.* Effects of GDNF-transfected marrow stromal cells on rats with intracerebral hemorrhage[J]. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 2019, 28(9):2555-2562.
- [18] 梁慧英, 廖琳, 游国清, 等. 电针对血管性痴呆大鼠记忆力及海马 BDNF、PSD-95 蛋白表达的影响[J]. 中国康复医学杂志, 2019, 34(8):902-906, 949.
- [19] 张运克, 车志英, 李可. 补阳还五汤联合骨髓间充质干细胞对脑缺血大鼠血脑屏障通透性的影响[J]. 中华中医药学刊, 2019, 37(7):1548-1553.
- [20] CHE H, ZHANG L, DING L, *et al.* EPA-enriched ethanolamine plasmalogen and EPA-enriched phosphatidylethanolamine enhance BDNF/TrkB/CREB signaling and inhibit neuronal apoptosis *in vitro* and *in vivo*[J]. *Food Funct*, 2020, 11(2):1729-1739.
- [21] DU Q, ZHU X, SI J. Angelica polysaccharide ameliorates memory impairment in alzheimer's disease rat through activating BDNF/TrkB/CREB pathway[J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2020, 245(1):1-10.
- [22] GUO C, LIU Y, FANG M S, *et al.*  $\omega$ -3PUFAs improve cognitive impairments through Ser133 phosphorylation of CREB upregulating BDNF/TrkB signal in schizophrenia[J]. *Neurotherapeutics*, 2020, 17(3):1271-1286.
- [23] LEE Y J, KIM H R, LEE C Y, *et al.* 2-Phenylethylamine (PEA) ameliorates corticosterone-induced depression-like phenotype via the BDNF/TrkB/CREB signaling pathway[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(23):e9103.
- [24] QIN X, LIU Y, FENG Y, *et al.* Ginsenoside Rf alleviates dysmenorrhea and inflammation through the BDNF-TrkB-CREB pathway in a rat model of endometriosis[J]. *Food Funct*, 2019, 10(1):244-249.

收稿日期 2022-05-30