

智三针电针预刺激对围手术期神经认知障碍老年大鼠海马组织炎症反应的影响

王翔锋*, 黄锦燕, 刘威, 罗慧琴, 王观惠, 林芬, 陈斌

福建中医药大学附属人民医院, 福建 福州 350004

* 通信作者: 王翔锋, E-mail: 11375451@qq.com

收稿日期: 2022-10-10; 接受日期: 2023-01-08

基金项目: 国家自然科学基金项目(81804175); 福建省卫生健康委员会科研人才培养项目(2018-ZQN-70);

国家中医临床研究基地专项科研课题(JDZX201926)

DOI: 10.3724/SP.J.1329.2023.04006

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



摘要 **目的:** 观察智三针电针预刺激对围手术期神经认知障碍(PND)老年大鼠海马组织炎症反应的影响。**方法:** 选择24只老年雄性SD大鼠采用随机数字表法分为对照组、麻醉组、手术组和针刺组, 每组6只。针刺组行“智三针”电针预刺激, 其他组未行干预。手术组、针刺组采用股骨颈骨折髓内钉内固定术建立老年PND大鼠模型。采用旷场实验、Morris水迷宫实验评价大鼠认知功能; 采用ELISA法测定血浆白细胞介素(IL)-1 β 、IL-6、肿瘤坏死因子(TNF)- α 浓度; 采用HE染色法观察海马组织细胞形态; 采用TUNEL染色法观察海马组织细胞凋亡情况; 采用Western blot法和实时荧光定量PCR法分别检测海马组织IL-1 β 、IL-6、TNF- α 蛋白含量及其mRNA表达量。**结果:** ① 认知功能: 与对照组、麻醉组比较, 手术组中央格停留时间、跨格次数、站立次数、游泳总距离、游泳速度和穿越平台次数明显减少, 潜伏期、目标象限停留时间百分比明显延长($P < 0.05$); 与手术组比较, 针刺组中央格停留时间、跨格次数、站立次数、游泳总距离、游泳速度和穿越平台次数明显增加, 潜伏期、目标象限停留时间百分比明显缩短($P < 0.05$)。② 血浆IL-1 β 、IL-6和TNF- α 含量: 与对照组比较, 麻醉组、手术组、针刺组IL-1 β 、IL-6和TNF- α 含量明显升高($P < 0.05$); 与麻醉组比较, 手术组IL-1 β 、IL-6和TNF- α 含量明显升高($P < 0.05$); 与手术组比较, 针刺组IL-1 β 、IL-6和TNF- α 含量明显下降($P < 0.05$)。③ 海马组织细胞形态和细胞凋亡情况: 手术组海马神经元损伤最严重, 可见细胞间质水肿, 少量胶质细胞增生; 针刺组海马神经元损伤轻微, 形态较为正常。与对照组、麻醉组比较, 手术组、针刺组海马组织凋亡细胞百分比明显升高($P < 0.05$); 与手术组相比较, 针刺组海马组织凋亡细胞百分比明显下降($P < 0.05$)。④ 海马组织IL-1 β 、IL-6、TNF- α 蛋白含量及其mRNA水平: 与对照组、麻醉组比较, 手术组IL-1 β 、IL-6和TNF- α 蛋白表达量及其mRNA水平明显升高($P < 0.05$); 与手术组比较, 针刺组IL-1 β 、IL-6和TNF- α 蛋白含量及其mRNA水平明显下降($P < 0.05$)。**结论:** 智三针电针预刺激可减轻PND老年大鼠海马组织细胞损伤和细胞凋亡, 从而改善认知功能, 这可能与电针智三针可以抑制老年大鼠海马区IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的过度表达, 减轻脑组织炎症反应有关。

关键词 围手术期神经认知障碍; 智三针; 电针; 海马; 炎症反应

围手术期神经认知障碍(periooperative neurocognitive disorders, PND)是一种围手术期常见的神经精神并发症, 多发于老年患者。国际术后认知功能

障碍研究小组报道, 60岁以上患者在非心脏手术后1周内PND发生率为25.8%, 术后3个月其发病率仍高达9.9%, 其中髋关节手术后的发病率高达16%~

引用格式: 王翔锋, 黄锦燕, 刘威, 等. 智三针电针预刺激对围手术期神经认知障碍老年大鼠海马组织炎症反应的影响[J]. 康复学报, 2023, 33(4): 325-332.

WANG X F, HUANG J Y, LIU W, et al. Effect of electroacupuncture prestimulation with mental tri-needles on the inflammatory response of hippocampus in aged rats with periooperative neurocognitive disorders [J]. Rehabil Med, 2023, 33(4): 325-332.

DOI: 10.3724/SP.J.1329.2023.04006

43.9%^[1]。PND导致的注意力、精神状态和意识水平的变化可能持续影响患者生活质量和疾病预后,若发生认知功能障碍,甚至会增加患者的死亡风险。PND发生率高,临床表现复杂,病情严重,治疗手段有限,需要及时确诊和有效干预^[2]。目前有关PND的病因尚不明确,中枢神经系统的炎症反应可能是其发生的主要机制之一。中枢神经系统的炎症反应(特别是脆弱区海马组织的炎症反应)可影响中枢神经系统功能,导致认知功能改变。在中医学中,智三针主治情感、智力障碍等疾病^[3]。有研究显示,智三针电针刺激能改善老年髋关节手术术后患者认知功能,但其作用机制不明。本研究采用股骨颈骨折髓内钉内固定术建立老年PND大鼠模型,探究智三针对PND老年大鼠海马组织炎症反应的影响,以期对智三针治疗PND提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 实验动物

选择SPF级老年雄性大鼠24只,20月龄,体重220~290 g,由上海普尔-必凯实验动物有限公司提供,实验动物生产许可证号:SCXK(沪)2018-0006,实验动物饲养于福建中医药大学实验动物中心,温度18~26℃,湿度40%~70%,自由采食、饮水。所有实验动物操作均严格遵循动物实验减少、替代、优化原则。

1.2 主要仪器

电子针疗仪(江苏医疗用品有限公司,型号:SDZ-V型);水迷宫(安徽正华生物仪器设备有限公司);X-光机(日本MIKASA公司,型号:HF100Ha);普通PCR仪(美国BIO-RAD公司);低温高速离心机(美国贝克曼公司);自动组织脱水机(湖北孝感阔海医疗科技有限公司,型号:KH-TS型);荧光定量PCR仪(美国ABI公司,型号:7300型)。

1.3 主要试剂

人白介素(interleukin, IL)-6 ELISA试剂盒(批号:MM-0049H1)、人肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)- α ELISA试剂盒(批号:MM-0122H1)、人IL-1 β ELISA试剂盒(批号:MM-1709H1)均购自江苏酶免实业有限公司;TUNEL细胞凋亡检测试剂盒购自江苏凯基生物技术股份有限公司(批号KGA7061);RNAiso Plus(批号:9109)、PrimeScriptTM RT Reagent试剂盒(批号:RR037A)均购自日本Takara公司;RIPA裂解液(批号P0013)购自上海碧云天有限公司;BCA蛋白浓度测定试剂盒(批号:

23227)购自美国赛默飞公司;PVDF膜(批号:IPVH 00010)购自美国默克密理博公司。

1.4 实验动物分组与模型制备

1.4.1 实验动物分组 所有大鼠按照1~24号进行打耳标编号,采用随机数字表法分为对照组、麻醉组、手术组和针刺组,每组6只。

1.4.2 模型制备方法

1.4.2.1 模型制备前干预 针刺组行智三针电针针刺刺激,其他组未行干预。根据中国针灸学会实验针灸研究会制定的《动物针灸穴位图谱》取神庭穴及左右本神穴行针刺,选用15 mm \times 0.26 mm毫针(无锡佳健医疗器械股份有限公司,无菌针灸针),连接华佗牌电子针疗仪(江苏医疗用品厂有限公司,型号:SDZ-V型),采用疏密波连续刺激,频率为2/10 Hz,电针强度为刚好能引起局部肌肉轻微抖动能量的2倍。共干预6次,手术前干预1次/d,20 min/次,干预5 d;手术当天麻醉前20 min电针刺激1次。

1.4.2.2 动物模型制备 手术组和针刺组采用股骨颈骨折髓内钉内固定术复制PND模型。大鼠给予腹腔注射2%戊巴比妥钠溶液0.25 mL/100 g进行麻醉,逐层打开左侧股骨近心端,沿股骨颈方向进行钻孔,深度以接近关节软骨为宜,钻孔结束后取出针,用折弯装置将股骨颈折断,然后旋入灭菌自攻螺丝钉(1.7 mm \times 12 mm),逐层缝合创口,并用碘伏进行消毒。整个手术时间为30 min,手术后用0.25%布比卡因浸润切口,缝合固定,待动物清醒后放回铺有棉纱布垫的笼具,注意保暖。术后给大鼠伤口涂擦1%活力碘消毒,2次/d,直至伤口愈合。造模后,通过X线检测能明显看到自攻螺丝钉说明已造模成功。对照组仅常规饲养,不进行模型制备;麻醉组仅麻醉,不手术。

1.5 观察指标

1.5.1 认知功能 于麻醉前及造模后第3、5、7天采用旷场实验、Morris水迷宫实验评价大鼠认知功能。

1.5.1.1 旷场实验 旷场分析箱高40 cm,长和宽均为100 cm,底面划分为面积相等的25个方格(20 cm \times 20 cm),沿墙壁为外周格,其余为中央格。大鼠适应环境3 min后,放入旷场分析箱正中格,观察3 min内大鼠的活动情况,记录中央格停留时间、跨格次数及站立次数,每次实验后清洗旷场内部及底面。

1.5.1.2 Morris水迷宫实验 包括定位航行实验和空间探索实验2个部分。术前进行定位航行实验,历时5 d,动物面向池壁随机从4个入水点放入水迷宫中,共4次;寻找平台(平台置于I象限,直径

10 cm, 没于水面下 1 cm), 最大时限设定为 60 s, 取当天 4 次测试结果平均值。造模后第 3、5 天取大鼠进行空间探索实验, 第 7 天撤去平台, 选择平台正对象限(Ⅲ象限)的中点为入水点将动物面向池壁放入水中, 自由游泳 60 s; 摄像系统及相应分析软件自动分析记录动物游泳轨迹、逃避潜伏期、游泳总距离、游泳速度、目标象限停留时间百分比、60 s 内穿越平台次数等参数。

1.5.2 血浆炎症因子表达 认知功能测试完毕后, 大鼠腹腔内注射 2% 戊巴比妥钠溶液 0.25 mL/100 g, 麻醉成功后在大鼠腹主动脉处, 用真空抗凝管采取血液 8~10 mL, 2 600×g 离心 10 min 以获得血浆, 通过 ELISA 试剂盒测定 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 含量。

1.5.3 细胞形态和细胞凋亡情况观察

1.5.3.1 HE 染色法观察细胞形态 采血后, 用急性失血法处死大鼠, 取其海马组织, 将固定的海马组织进行脱水, 包埋到石蜡中, 并连续切片, 每片 5 μ m, 随后用二甲苯脱蜡并进行 HE 染色以制作载玻片样本, 并在 40 倍光学显微镜下观察细胞形态。

1.5.3.2 TUNEL 染色观察细胞凋亡情况 将固定的海马组织进行脱水, 包埋到石蜡中, 并连续切片, 每片 5 μ m, 对载玻片样本进行 TUNEL 染色。40 倍镜下计数和标记清晰的 TUNEL 阳性细胞。

凋亡细胞百分比 = 凋亡细胞数 / 有核细胞总数 \times 100%

1.5.4 海马组织蛋白和核蛋白表达

1.5.4.1 Western blot 法检测 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 蛋白含量 取海马组织加入裂解液, 低温匀浆, 4 $^{\circ}$ C 下 12 000×g 离心 5 min, 取上清液。BCA 法测定样品蛋白浓度。取蛋白样品 40 μ g 与等体积的 2×上样缓冲液混合, 煮沸 10 min 后进行 SDS 凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 脱脂奶粉封闭 1 h, 加入一抗 (1:1 000) 和 β -actin (1:1 000), 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, TBST 洗膜, 加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗体 (1:4 000) 及鼠抗 β -actin 抗体 (1:5 000), 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h, TBST 洗膜, ECL 化学发光液 X 线片曝光显色。采用 UVP 凝胶成像系统分析仪采集图像, Quantity One 软件进行分析, 以目的蛋白与 β -actin 灰度值的比值代表 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 蛋白含量。

1.5.4.2 荧光定量 PCR 法检测 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α mRNA 水平 用 TRIzol 总 RNA 提取试剂盒提取大鼠海马组织中的总 RNA, 参照逆转录试剂盒进行逆转录反应。采用 Premier 5.0 软件设计其扩增引物, 引物序列见表 1。采用 SYBR Green Real Time PCR 试剂盒对逆转录产物进行扩增。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 1 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 35 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 共 40 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。以 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法计算 IL-1 β 、IL-6、TNF- α mRNA 水平。

表 1 qPCR 引物序列

Table 1 qPCR primer sequence

基因	扩增引物序列	扩增产物大小/bp
GAPDH	上游: 5'-CCCATCTATGAGGGTTACGC-3' 下游: 5'-TTTAATGTCACGCACGATTTTC-3'	150
IL-1 β	上游: 5'-TCCAGGATAAGGACATGAGCAC-3' 下游: 5'-GAACGTCACACACCAGCAGGTTA-3'	105
IL-6	上游: 5'-AAATTCGGTACATCCTCGAC-3' 下游: 5'-CCTCTTTGCTGCTTTCACAC-3'	48
TNF- α	上游: 5'-GTTCTATGGCCAGACCCTCAC-3' 下游: 5'-GGACCACTAGTTGGTTGTCTTTG-3'	175

1.6 统计学方法

采用 SPSS 25.0 统计软件进行数据分析。计量资料服从正态分布, 数据以 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较方差齐时采用 LSD-*t* 检验, 方差不齐时采用 Tamhane's T2 法。P < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 4 组认知功能比较

2.1.1 旷场实验 与对照组、麻醉组比较, 手术组中央格停留时间、跨格次数、站立次数明显减少 (P < 0.05); 与手术组比较, 针刺组中央格停留时间、跨格次数、站立次数明显增加 (P < 0.05)。见表 2。

表2 4组旷场实验结果比较($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Comparison of results of open field test in four groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	中央格停留时间/s	跨格次数/次	站立次数/次
对照组	6	2.0±0.9	10.0±1.3	3.1±0.7
麻醉组	6	1.7±0.5	9.2±1.4	2.8±0.8
手术组	6	1.1±0.4 ¹⁾²⁾	5.1±0.7 ¹⁾²⁾	0.8±0.7 ¹⁾²⁾
针刺组	6	2.0±0.9 ³⁾	9.7±0.8 ³⁾	1.7±0.8 ³⁾

注:与对照组比较,1) $P<0.05$;与麻醉组比较,2) $P<0.05$;与手术组比较,3) $P<0.05$ 。

Note: Compared with the control group, 1) $P<0.05$; compared with the anesthesia group, 2) $P<0.05$; compared with the operation group, 3) $P<0.05$.

2.1.2 Morris水迷宫实验 与对照组、麻醉组比较,手术组潜伏期、目标象限停留时间百分比明显延长,游泳总距离、游泳速度和穿越平台次数明显减少,差异具有统计学意义($P<0.05$);与手术组比较,

针刺组潜伏期、目标象限停留时间百分比明显缩短,游泳总距离、游泳速度和穿越平台次数明显增加($P<0.05$)。见图1、表3。

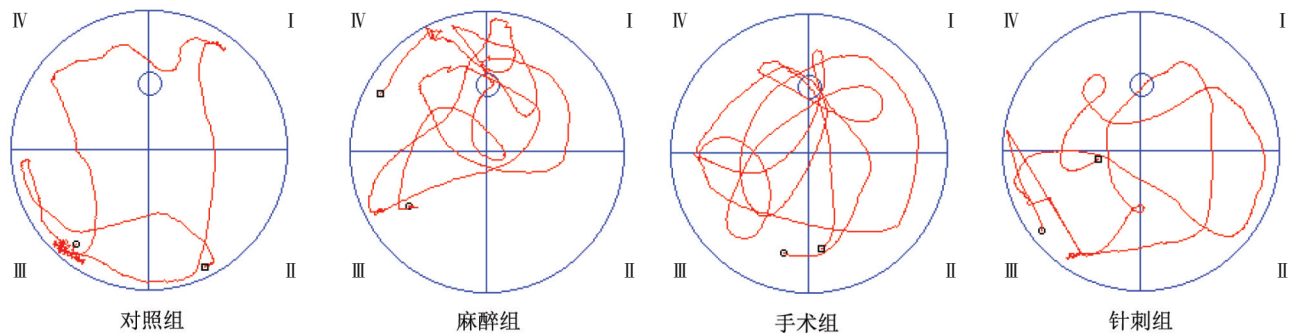


图1 4组水迷宫实验运动轨迹图

Figure 1 Motor trajectories in Morris water maze test in four groups

表3 4组水迷宫实验结果比较($\bar{x}\pm s$)

Table 3 Comparisons of results of Morris water-maze test in four groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	潜伏期/s	游泳总距离/cm	游泳速度/(cm/s)	穿越平台次数/次	目标象限停留时间百分比/%
对照组	6	33.3±0.6	1181.5±18.2	23.3±2.6	5.2±0.3	23.9±3.3
麻醉组	6	31.2±1.4	1293.5±46.6	23.8±2.8	4.2±0.3	22.7±3.9
手术组	6	52.0±3.6 ¹⁾²⁾	822.1±16.2 ¹⁾²⁾	18.8±3.5 ¹⁾²⁾	1.3±0.2 ¹⁾²⁾	51.2±3.7 ¹⁾²⁾
针刺组	6	38.5±3.1 ³⁾	961.3±17.3 ³⁾	22.7±2.1 ³⁾	3.3±0.3 ³⁾	28.2±0.8 ³⁾

注:与对照组比较,1) $P<0.05$;与麻醉组比较,2) $P<0.05$;与手术组比较,3) $P<0.05$ 。

Note: Compared with the control group, 1) $P<0.05$; compared with the anesthesia group, 2) $P<0.05$; compared with the operation group, 3) $P<0.05$.

2.2 4组血浆IL-1 β 、IL-6和TNF- α 含量比较

与对照组比较,麻醉组、手术组、针刺组IL-1 β 、IL-6和TNF- α 含量明显升高($P<0.05$);与麻醉组比较,手术组IL-1 β 、IL-6和TNF- α 含量明显升高($P<0.05$);与手术组比较,针刺组IL-1 β 、IL-6和TNF- α 含量明显降低,差异具有统计学意义($P<0.05$)。见表4。

2.3 4组细胞形态和细胞凋亡情况比较

2.3.1 4组细胞形态比较 对照组海马神经元形态正常、结构完整;手术组海马神经元损伤最严重,可见神经元数量减少,细胞间质水肿,少量胶质细胞增生,颗粒细胞变性呈空泡样;麻醉组海马神经元损伤略轻,仅可见少量颗粒细胞变性呈空泡样;针刺组海马神经元损伤轻微,形态较为正常。见图2。

表4 4组血浆IL-1 β 、IL-6和TNF- α 含量比较($\bar{x}\pm s$)
 Table 4 Comparison of levels of IL-1 β , IL-6 and TNF- α in plasma in four groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	IL-1 β	IL-6	TNF- α
对照组	6	23.0 \pm 1.5	19.7 \pm 2.6	49.1 \pm 2.6
麻醉组	6	26.8 \pm 1.5 ¹⁾	27.3 \pm 0.9 ¹⁾	65.3 \pm 8.3 ¹⁾
手术组	6	36.1 \pm 1.6 ¹⁾²⁾	45.0 \pm 3.7 ¹⁾²⁾	275.6 \pm 11.0 ¹⁾²⁾
针刺组	6	27.6 \pm 1.5 ¹⁾³⁾	32.3 \pm 1.8 ¹⁾³⁾	99.3 \pm 5.4 ¹⁾³⁾

注:与对照组比较,1) $P<0.05$;与麻醉组比较,2) $P<0.05$;与手术组比较,3) $P<0.05$ 。

Note: Compared with the control group, 1) $P<0.05$; compared with the anesthesia group, 2) $P<0.05$; compared with the operation group, 3) $P<0.05$.

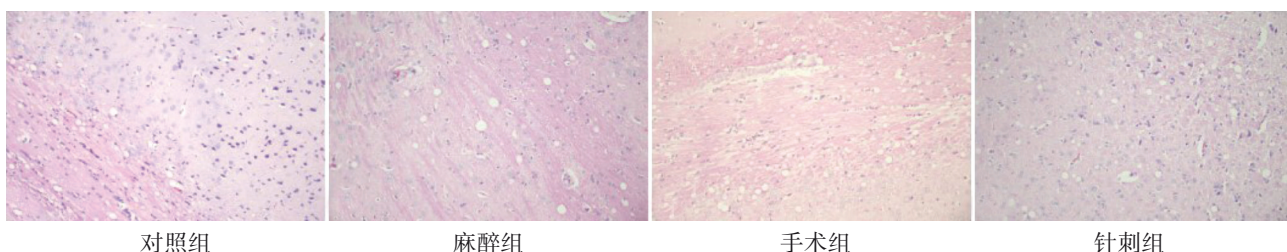


图2 4组细胞形态比较($\times 200$)

Figure 2 Comparison of the morphology of cell in four groups ($\times 200$)

2.3.2 4组海马组织凋亡细胞比较 与对照组、麻醉组比较,手术组、针刺组海马组织凋亡细胞百分比明显升高($P<0.05$);与手术组相比较,针刺组

海马组织凋亡细胞百分比明显下降($P<0.05$)。见图3、4。

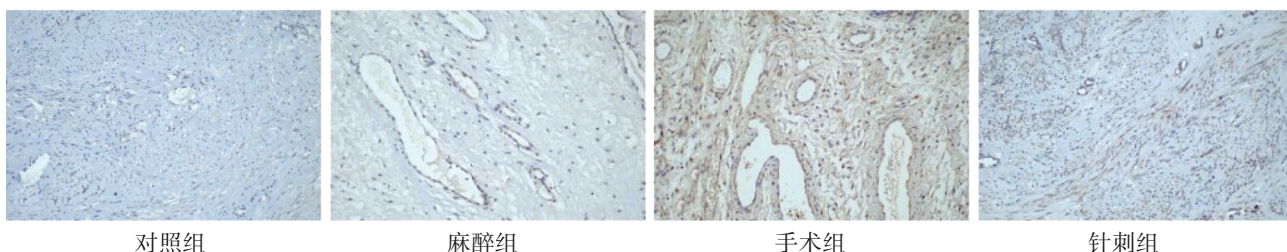


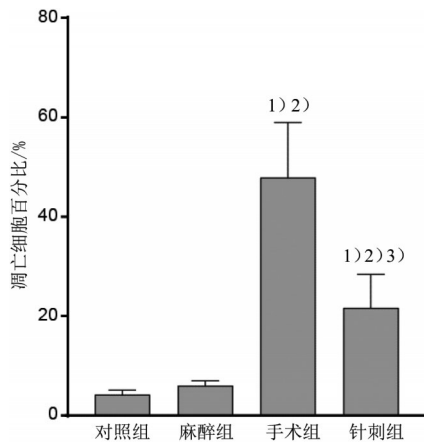
图3 4组凋亡细胞形态比较($\times 200$)

Figure 3 Comparison of the morphology of cell apoptosis in four groups ($\times 200$)

2.4 4组海马组织蛋白含量和mRNA水平比较

2.4.1 4组海马组织IL-1 β 、IL-6和TNF- α 蛋白含量比较 与对照组、麻醉组比较,手术组IL-1 β 、IL-6和TNF- α 蛋白含量明显升高($P<0.05$);与手术组比较,针刺组IL-1 β 、IL-6和TNF- α 蛋白含量明显下降($P<0.05$)。见图5、图6。

2.4.2 4组海马组织IL-1 β 、IL-6和TNF- α mRNA水平比较 与对照组、麻醉组比较,手术组IL-1 β 、IL-6和TNF- α mRNA水平明显升高,差异具有统计学意义($P<0.05$);与手术组比较,针刺组IL-1 β 、IL-6和TNF- α mRNA水平明显下降,差异具有统计学意义($P<0.05$)。见表5。

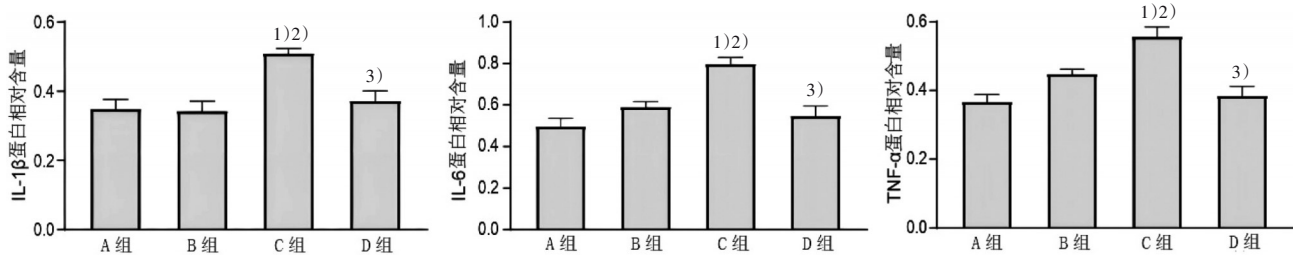


注:与对照组比较,1) $P < 0.05$;与麻醉组比较,2) $P < 0.05$;与手术组比较,3) $P < 0.05$ 。

Note: Compared with the control group, 1) $P < 0.05$; compared with the anesthesia group, 2) $P < 0.05$; compared with the operation group, 3) $P < 0.05$.

图4 4组细胞凋亡百分比比较

Figure 4 Comparison of percentage of cell apoptosis in four groups



注:A为对照组;B为麻醉组;C为手术组;D为针刺组。与对照组比较,1) $P < 0.05$;与麻醉组比较,2) $P < 0.05$;与手术组比较,3) $P < 0.05$ 。

Note: A is the control group; B is the anesthesia group; C is the operation group; D is the acupuncture group. Compared with the control group, 1) $P < 0.05$; compared with the anesthesia group, 2) $P < 0.05$; compared with the operation group, 3) $P < 0.05$.

图6 4组海马组织IL-1β、IL-6和TNF-α蛋白含量比较

Figure 6 Comparison of protein expression levels of IL-1β, IL-6 and TNF-α of the hippocampus in four groups

表5 4组海马组织IL-1β、IL-6和TNF-α mRNA水平比较($\bar{x} \pm s$)

Table 5 Comparison of IL-1β, IL-6 and TNF-α mRNA levels of hippocampus in four groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	IL-1β	IL-6	TNF-α
对照组	6	1.0±0.2	1.0±0.2	1.0±0.2
麻醉组	6	1.1±0.3	1.1±0.3	1.1±0.2
手术组	6	2.6±0.3 ¹⁾²⁾	3.4±0.3 ¹⁾²⁾	2.6±0.2 ¹⁾²⁾
针刺组	6	1.5±0.2 ³⁾	1.7±0.4 ³⁾	1.2±0.3 ³⁾

注:与对照组比较,1) $P < 0.05$;与麻醉组比较,2) $P < 0.05$;与手术组比较,3) $P < 0.05$ 。

Note: Compared with the control group, 1) $P < 0.05$; compared with the anesthesia group, 2) $P < 0.05$; compared with the operation group, 3) $P < 0.05$.

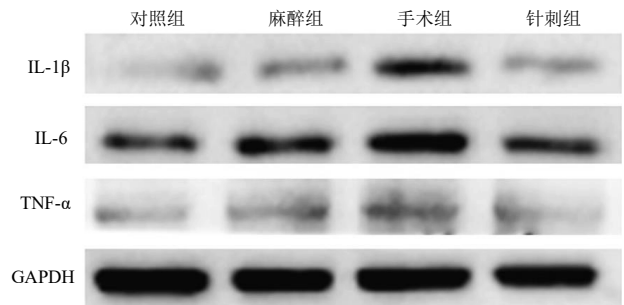


图5 4组IL-1β、IL-6和TNF-α蛋白条带图

Figure 5 Protein band figure of IL-1β, IL-6 and TNF-α in four groups

3 讨论

3.1 电针智三针可改善PND老年大鼠认知功能

本研究结果显示,与手术组比较,针刺组中央格停留时间、跨格次数、站立次数明显增加,潜伏期、目标象限停留时间百分比明显缩短,穿越平台次数明显增加。这提示电针智三针可以有效改善PND老年大鼠认知功能。这可能与以下因素有关:根据PND临床表现及病理特征,认知功能障碍属于中医“健忘”的范畴。根据“病变在脑,首取督脉”理论,本研究选择智三针干预PND老年大鼠。“智三针”(神庭穴及左右本神穴)中“神庭”为督脉脉气所发,足太阳膀胱经与督脉的交会穴,入络于脑;“本

神”为足少阳胆经脉气所发,足少阳与阳维脉交汇之处。电针智三针具有通督调髓作用,对大脑具有保护作用,可明显降低神经功能缺损程度,改善患者脑功能,提高学习、记忆和认知功能^[4-5]。这与赵凌等^[6]研究显示电针法可提高轻度认知功能障碍患者的综合认知能力和短时记忆能力的结果相似。

3.2 电针智三针改善PND大鼠认知功能可能与调控海马组织炎症反应有关

本研究结果显示,与手术组比较,针刺组IL-1 β 、IL-6和TNF- α 蛋白含量明显下降,IL-1 β 、IL-6和TNF- α 的mRNA水平明显下降,提示电针智三针改善PND大鼠认知功能可能与调控海马组织炎症反应相关。这与以下因素有关:生理状态下促炎因子和抗炎因子处于脆弱的平衡,但这种平衡很容易被手术创伤打破,引起局部和全身炎症反应^[7-8]。手术创伤激活外周免疫系统释放各种炎性因子,外周炎性因子透过血脑屏障激活小胶质细胞和血管内皮细胞,导致海马区长时程增强(long-term potentiation, LTP)效应的破坏,介导认知功能的损伤^[9]。在PND大鼠海马组织中,各种炎症细胞因子(TNF- α 、IL-1 β 、IL-6等)水平明显升高^[10],出现神经炎症。海马神经元创伤是认知功能障碍发生的关键步骤^[11-12]。PND大鼠海马组织IL-1 β 表达增强,大量IL-1 β 与TNF- α 产生相互作用,TNF- α 可作为激动因子使NF- κ B活化,从而使黏附分子以及促炎因子(TNF- α 、IL-6、IL-1 β 等)基因转录增加,形成正反馈圈,启动细胞因子的级联效应,进而引起组织炎症损伤,导致认知功能下降^[13]。电针智三针可能会下调NF- κ B炎症通路的活性,调节过度炎症反应,减少神经损伤;此外,电针智三针还可能抑制凋亡蛋白的表达,抑制细胞凋亡线粒体途径的级联反应,减少细胞凋亡,从而恢复认知功能^[14-15]。

4 小 结

本研究显示,电针智三针可以减轻PND老年大鼠海马细胞损伤和细胞凋亡,从而改善认知功能,这可能与电针智三针可以抑制老年大鼠海马区IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的过度表达,减轻脑组织炎症反应有关。但本研究并未就炎症反应和细胞凋亡细胞核内信号通路启动和相互作用等进行深入研究,下一步还需从分子生物学角度开展研究,以期为电针智三针治疗PND提供理论依据。

参考文献

[1] BEISHUIZEN S J E, VAN MUNSTER B C, DE JONGHE A, et al.

Distinct cognitive trajectories in the first year after hip fracture [J]. *J Am Geriatr Soc*, 2017, 65(5): 1034-1042.

[2] 陈健林,冷雯. 头皮针对脑外伤患者认知功能和日常生活自理能力的影响[J]. *中国针灸*, 2021, 41(2): 127-130.

CHEN J L, LENG W. Effect of scalp acupuncture on cognitive function and self-care ability of daily life in patients with traumatic brain injury [J]. *Chin Acupunct Moxibust*, 2021, 41(2): 127-130.

[3] 谢飞林,徐洲发,熊向华. “智三针”电针刺激对老年髋关节置换术后认知功能的影响[J]. *广州中医药大学学报*, 2016, 33(6): 813-817.

XIE F L, XU Z F, XIONG X H. Effect of mental tri-needle electro-acupuncture on postoperative cognitive function in elderly patients after hip joint replacement surgery [J]. *J Guangzhou Univ Tradit Chin Med*, 2016, 33(6): 813-817.

[4] 杨木强,闫俊强,张沛,等. 针刺预处理治疗前列腺增生TURP术后早期认知功能障碍临床研究[J]. *新中医*, 2018, 50(9): 192-195.

YANG M Q, YAN J Q, ZHANG P, et al. Clinical study of acupuncture preconditioning for prostatic hypertrophy with postoperative cognitive dysfunction in early stage [J]. *J N Chin Med*, 2018, 50(9): 192-195.

[5] LIU T L, YIN C P, LI Y N, et al. Effects of transcutaneous electrical acupoint stimulation on postoperative cognitive decline in elderly patients: a pilot study [J]. *Clin Interv Aging*, 2021, 16: 757-765.

[6] 赵凌,张富文,张虹,等. 电针治疗轻度认知功能障碍:多中心随机对照研究[J]. *中国针灸*, 2012, 32(9): 779-784.

ZHAO L, ZHANG F W, ZHANG H, et al. Mild cognitive impairment disease treated with electroacupuncture: a multi-center randomized controlled trial [J]. *Chin Acupunct Moxibust*, 2012, 32(9): 779-784.

[7] ILVAN G, ÖZKÖSE H Z. The effect of total intravenous anesthesia on the postoperative cognitive functions of young and elderly patients after lumbar disk surgery [J]. *Turk J Med Sci*, 2015, 45(1): 191-196.

[8] CALLAWAY J K, JONES N C, ROYSE A G, et al. Memory impairment in rats after desflurane anesthesia is age and dose dependent [J]. *J Alzheimers Dis*, 2015, 44(3): 995-1005.

[9] 付益计,李丹丹,宋丹丹,等. 核苷酸结合寡聚化结构域受体蛋白3炎性小体在心肺转流大鼠围术期神经认知障碍中的作用[J]. *临床麻醉学杂志*, 2020, 36(8): 789-792.

FU Y J, LI D D, SONG D D, et al. Effect of nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3 inflammasome on perioperative neurocognitive disorders in rats after cardiopulmonary bypass [J]. *J Clin Anesthesiol*, 2020, 36(8): 789-792.

[10] DELHAYE E, MECHANIC-HAMILTON D, SAAD L, et al. Associative memory for conceptually unitized word pairs in mild cognitive impairment is related to the volume of the perirhinal cortex [J]. *Hippocampus*, 2019, 29(7): 630-638.

[11] YU L Y, SUN L, CHEN S L. Protective effect of senegenin on splenectomy-induced postoperative cognitive dysfunction in elderly rats [J]. *Exp Ther Med*, 2014, 7(4): 821-826.

[12] HUANG C X, CHU J M T, LIU Y, et al. Varenicline reduces DNA

- damage, tau mislocalization and post surgical cognitive impairment in aged mice [J]. *Neuropharmacology*, 2018, 143:217-227.
- [13] 李丹丹, 宋丹丹, 韩楠, 等. Ca^{2+} -CaMK II-CREB 信号通路在 U50488H 减轻 CPB 致大鼠围术期神经认知障碍中的作用[J]. *中华麻醉学杂志*, 2020, 40(2):160-163.
- LI D D, SONG D D, HAN N, et al. Role of Ca^{2+} -CaMK II-CREB signaling pathway in U50488H-induced reduction of CPB-caused perioperative neurocognitive disorders in rats [J]. *Chin J Anesthesiol*, 2020, 40(2):160-163.
- [14] SUBRAMANIYAN S, TERRANDO N. Neuroinflammation and perioperative neurocognitive disorders [J]. *Anesth Analg*, 2019, 128(4):781-788.
- [15] 陈坤黄寓, 王东, 杨欢, 等. 电针对颅脑损伤大鼠海马 CA1 区细胞凋亡的影响[J]. *针灸临床杂志*, 2019, 35(7):61-64, 97.
- CHEN K, WANG D, YANG H, et al. Effects of electro-acupuncture on apoptosis of hippocampal CA1 region in TBI rats [J]. *J Clin Acupunct Moxibust*, 2019, 35(7):61-64, 97.

Effect of Electroacupuncture Prestimulation with Mental Tri-Needles on the Inflammatory Response of Hippocampus in Aged Rats with Perioperative Neurocognitive Disorders

WANG Xiangfeng*, HUANG Jinyan, LIU Wei, LUO Huiqin, WANG Guanhui, LIN Qin, CHEN Bin

The People's Hospital Affiliated to Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, Fujian 350004, China

*Correspondence: WANG Xiangfeng, E-mail: 11375451@qq.com

ABSTRACT Objective: To observe the effect of electroacupuncture (EA) prestimulation with mental tri-needles on the inflammatory response of hippocampus in aged rats with perioperative neurocognitive disorders (PND). **Methods:** A total of 24 aged male SD rats were randomly divided into control group, anesthesia group, operation group and acupuncture group, with 6 cases in each group. The acupuncture group received EA prestimulation with mental tri-needles, and the other groups didn't receive any intervention. The aged PND rat model was established by intramedullary nailing surgery for femoral neck fracture in the operation group and the acupuncture group. Open field experiment and water maze test were used to evaluate the cognitive function; ELISA method was used to detect interleukin (IL)-1 β , IL-6 and tumor necrosis factor (TNF)- α in the plasma; HE staining was used to observe the cell morphology of hippocampal tissue; TUNEL staining was used to observe the apoptosis of hippocampal tissue; Western blot and real-time fluorescence quantitative PCR were used to detect the protein content and mRNA expression of IL-1 β , IL-6 and TNF- α in hippocampal tissue. **Results:** (1) Cognitive function: compared with the control group and the anesthesia group, the time of staying in the central quadrant, the number of crossings of the quadrant, the number of standing ups, the total distance of swimming, the swimming speed and the number of platform crossings in the operation group significantly decreased, and the latency and the time of staying in the target quadrant were significantly prolonged ($P < 0.05$); compared with the operation group, the time of staying in the central square, the number of crossings of the quadrant, the number of standing ups, the total distance of swimming, the swimming speed and the number of platform crossings in the acupuncture group significantly increased, and the latency and the time of staying in the target quadrant were significantly shortened ($P < 0.05$). (2) Levels of IL-1 β , IL-6 and TNF- α in plasma: compared with the control group, the levels of IL-1 β , IL-6 and TNF- α significantly increased in the anesthesia group, operation group and acupuncture group ($P < 0.05$); compared with the anesthesia group, the levels of IL-1 β , IL-6 and TNF- α in the operation group significantly increased ($P < 0.05$); compared with the operation group, the levels of IL-1 β , IL-6 and TNF- α in the acupuncture group significantly decreased ($P < 0.05$). (3) Morphology and apoptosis of hippocampal neurons: the most severe injury of hippocampal neurons occurred in the operation group, showing as interstitial edema and a small amount of glial cell proliferation, while the injury of hippocampal neurons was slight and the morphology was relatively normal in the acupuncture group. Compared with the control group and the anesthesia group, the percentages of apoptotic cells in the hippocampus of the operation group and the acupuncture group significantly increased ($P < 0.05$); and compared with the operation group, the percentage of apoptotic cells in the hippocampus of the acupuncture group significantly decreased ($P < 0.05$). (4) Protein contents and mRNA levels of IL-1 β , IL-6 and TNF- α in hippocampus: compared with the control group and the anesthesia group, the protein contents and mRNA levels of IL-1 β , IL-6 and TNF- α in the operation group significantly increased ($P < 0.05$); compared with the operation group, the protein expression of IL-1 β , IL-6 and TNF- α and their mRNA levels in the acupuncture group significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion:** EA prestimulation with mental tri-needles can reduce the injury and apoptosis of hippocampal cells in aged rats with PND, and improve cognitive function, which may be related to the inhibition of the overexpression of IL-1 β , IL-6 and TNF- α in the hippocampus of aged rats and reducing the inflammatory reaction in brain tissue.

KEY WORDS perioperative neurocognitive disorders; mental tri-needles; electroacupuncture; hippocampus; inflammatory reaction

DOI:10.3724/SP.J.1329.2023.04006