

电针对东莨菪碱诱导谵妄大鼠远期认知功能障碍的影响

徐英, 楼屹, 刘美真, 吴燕

宁波市中医院, 浙江 宁波 315000

[摘要] 目的: 观察电针对东莨菪碱诱导谵妄大鼠远期认知功能障碍的影响及可能的作用机制。方法: 将30只SD大鼠按随机数字表法随机分为空白组、模型组与电针组各10只, 除空白组外, 其余2组腹腔注射东莨菪碱建立谵妄模型, 电针组建模后电针神庭、印堂穴, 连续7d, 7d后对3组大鼠进行Y型迷宫测试, 测试结束后取大鼠脑海马组织, 用酶联免疫吸附法检测肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和白细胞介素-1 β (IL-1 β) 浓度, 用TUNEL法检测神经细胞凋亡, 用蛋白质印迹法检测天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-3 (Caspase-3)、B淋巴细胞瘤-2 (Bcl-2) 表达。结果: 与空白组比较, 模型组大鼠Y型迷宫测试总训练次数增加 ($P < 0.05$), 达标时间延长 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 电针组大鼠Y型迷宫测试总训练次数减少 ($P < 0.05$), 达标时间缩短 ($P < 0.05$)。与空白组比较, 模型组大鼠海马组织TNF- α 、IL-1 β 水平均升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 电针组大鼠海马组织TNF- α 、IL-1 β 水平均降低 ($P < 0.05$)。与空白组比较, 模型组海马组织棕黄色颗粒明显增多, 提示海马组织神经细胞凋亡增多, 而电针组海马组织棕黄色颗粒较模型组明显减少, 提示电针干预可抑制东莨菪碱诱导的神经细胞凋亡。与空白组比较, 模型组海马组织Caspase-3蛋白相对表达水平升高 ($P < 0.05$), Bcl-2蛋白相对表达水平降低 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 电针组Caspase-3蛋白相对表达水平降低 ($P < 0.05$), Bcl-2蛋白相对表达水平升高 ($P < 0.05$)。结论: 电针神庭、印堂穴可改善东莨菪碱诱导谵妄大鼠远期认知功能障碍, 其机制可能是减轻中枢炎症反应, 逆转凋亡蛋白异常表达, 进而抑制神经细胞凋亡。

[关键词] 谵妄; 电针; 认知功能障碍; 炎症因子; 动物实验; 大鼠

[中图分类号] R245.97 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2023) 01-0159-05

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2023.01.035

Effect of Electro-Acupuncture on Long-term Cognitive Dysfunction in Delirium Rats Induced by Scopolamine

XU Ying, LOU Yi, LIU Meizhen, WU Yan

Abstract: **Objective:** To observe the effect of electro-acupuncture on long-term cognitive dysfunction in delirium rats induced by scopolamine and its possible mechanism. **Methods:** A total of 30 SD rats were divided into the blank group, the model group and the electro-acupuncture group according to the random number table method, with 10 rats in each group. Except for those in the blank group, the other two groups were given intraperitoneal injection with scopolamine to establish delirium models. After establishment, rats in the electro-acupuncture group was given electro-acupuncture at *Shenting* point (GV24) and *Yintang* point (GV29) for seven consecutive days. After seven days, Y-maze was conducted on rats in the three groups. After the test, the hippocampus of rats was taken, the concentration of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-1 β (IL-1 β) was detected by enzyme-linked immunosorbent

[收稿日期] 2021-05-28
[修回日期] 2022-09-25
[基金项目] 宁波市自然科学基金项目 (2018A610414)
[作者简介] 徐英 (1980-), 女, 副主任护师, E-mail: 1420002686@qq.com。

assay, the apoptosis of nerve cells was detected by the TUNEL method, and the expressions of cysteinyl aspartate specific proteinase-3 (Caspase-3) and B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) were detected by Western blot. **Results:** Compared with those in the blank group, the total training times of Y-maze for rats in the model group were increased ($P < 0.05$), and the time of reaching standard was prolonged ($P < 0.05$); compared with those in the model group, the total training times of Y-maze for rats in the electro-acupuncture group were decreased ($P < 0.05$), and the time of reaching standard was shortened ($P < 0.05$). Compared with those in the blank group, the levels of TNF- α and IL-1 β in hippocampus in rats in the model group were increased ($P < 0.05$); compared with those in the model group, the levels of TNF- α and IL-1 β in hippocampus in rats in the electro-acupuncture group were decreased ($P < 0.05$). Compared with those in the blank group, the brown granules in the hippocampus in the model group were significantly increased, indicating that the apoptosis of nerve cells in the hippocampus was increased; compared with those in the model group, the brown granules in the hippocampus in the electro-acupuncture group were significantly decreased, indicating that the electroacupuncture intervention can inhibit the apoptosis of nerve cells induced by scopolamine. Compared with that in the blank group, the expression of Caspase-3 protein in the hippocampus in the model group was increased ($P < 0.05$), and the expression of Bcl-2 protein was decreased ($P < 0.05$); compared with those in the model group, the expression of Caspase-3 protein in the hippocampus in the electro-acupuncture group was decreased ($P < 0.05$), and the expression of Bcl-2 protein was increased ($P < 0.05$). **Conclusion:** Electro-acupuncture at *Shenting* point and *Yintang* point can improve cognitive dysfunction in delirium rats induced by scopolamine, whose mechanism may be to reduce the central inflammatory responses, reverse the abnormal expression of apoptotic proteins, and then inhibit the apoptosis of nerve cells.

Keywords: Delirium; Electro-acupuncture; Cognitive dysfunction; Inflammatory factors; Animal experiment; Rats

随着重症医学的发展,重症监护病房(ICU)患者存活率显著上升,但ICU存活患者可能发生明显影响日常生活质量的远期并发症,认知功能障碍就是其中之一。ICU后认知功能障碍指ICU出院或病情恢复后转出的患者出现的不同程度及不同类型的认知功能受损,表现为记忆力下降、注意力不集中、执行功能障碍、逻辑思维损害等,是ICU后综合征中最常见的症状,造成患者反复再入院,耗费大量医疗资源^[1]。研究显示,89.57%的谵妄患者发生了ICU后认知功能障碍^[2]。谵妄和ICU后认知功能障碍都属于器质性脑损伤,是同一病理生理过程在不同时期的表现,尽管对两者发生机制还未完全阐明,但越来越多的研究显示通过临床手段控制ICU谵妄,有可能改善远期认知功能障碍的发生^[3-4]。研究发现,电针神庭、印堂穴对东莨菪碱诱导谵妄大鼠具有脑保护作用,可逆转谵妄状态^[5],但能否改善谵

妄大鼠远期认知功能障碍尚不清楚。笔者旨在观察电针对东莨菪碱诱导谵妄大鼠远期认知功能的影响并探讨其可能的影响机制,为临床改善ICU后认知功能障碍探寻新方法。

1 材料与方法

1.1 实验动物 SPF级7~8周龄雄性SD大鼠30只,体质量(200±20)g,由宁波大学医学院实验动物中心提供,许可证号:SYXK(浙)2019-0005。于20~25℃,50%相对湿度,12h明暗周期的环境下适应性饲养7d后进行实验。

1.2 实验试剂与仪器 东莨菪碱注射液(上海禾丰制药有限公司);肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)酶联免疫吸附法(ELISA)检测试剂盒购自上海桥社生物科技有限公司;TUNEL检测试剂盒购自杭州联科生物技术股份有限公司;天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)兔多克隆抗体、B

淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)兔多克隆抗体、辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔免疫球蛋白 G(IgG)二抗购自武汉爱博泰克生物科技有限公司。G6805-2A 型低频电子脉冲治疗仪购自上海华谊医用仪器有限公司;Y 型迷宫视频分析系统购自广州飞迪生物科技有限公司;余实验室常规试剂及仪器由宁波大学医学院实验动物中心提供。

1.3 动物分组、模型制备及治疗方法 用随机数字表法将 30 只 SD 大鼠随机分为空白组、模型组、电针组各 10 只,除空白组外,其余 2 组均参照参考文献[6]推荐剂量(1.8 mg/kg)腹腔注射东莨菪碱,注射后 10 min 大鼠兴奋性显著增加,空间认知能力下降,修饰行为减少,提示大鼠焦虑情绪增加,对环境满意度下降,说明谵妄模型建立成功。空白组腹腔注射等剂量 0.9%氯化钠溶液。电针组模型制备成功后 1 h 将大鼠捆绑在自备固定器中,取神庭、印堂穴,常规消毒穴位,选用 0.25 mm×25 mm 毫针,印堂穴、神庭穴取与皮肤成 15°向鼻尖方向刺入 0.5 寸留针,银针连接穴位神经刺激仪,电针刺激参数:连续波,频率 2/100 Hz,强度 5 mA,以大鼠肢体轻微抖动为度。每天 1 次,每次 30 min,连续 7 d。

1.4 观察各组大鼠一般行为 7 d 后通过 Y 型迷宫视频分析系统测定大鼠学习记忆功能。测试时调节刺激电压以保证大鼠在 10 s 内逃走,设置电流强度 0.7 mA,电击延时 5 s,电压 38 V。置大鼠于 Y 型迷宫仪的一臂适应 5 min 后开启安全区和刺激区,通电刺激使其逃至安全区。大鼠受电刺激后直接跑到安全区为正确反应,否则为错误反应。每次大鼠跑至安全区后持续光亮 15 s,继而熄灯 10 s 后行下一次测试,直至连续 10 次中有 9 次正确反应即为达标。将各组大鼠分别编号测试,记录总训练次数和达标时间。

1.5 检测各组大鼠海马组织 TNF- α 和 IL-1 β 浓度 各组大鼠 Y 型迷宫测试结束后,断头处死大鼠,迅速在冰上取脑组织,去首尾两端,保留海马组织,在冰 0.9%氯化钠溶液中洗去血液,滤纸拭干后加入磷酸缓冲盐溶液(PBS)(pH 7.2~7.4),放入液氮冷冻备用,用于后续检测。取部分海马组织,充分研磨制备组织匀浆,4℃下离心后取上清,采用 ELISA 法检测海马组织 TNF- α 、IL-1 β 浓度,操作按照试剂盒说明书进行。

1.6 检测各组大鼠海马组织神经细胞凋亡 取部分海马组织制备切片,采用 TUNEL 法进行海马组织神经细胞凋亡检测,操作按试剂盒说明书进行。将海马组织切片脱蜡入水,经 2% H₂O₂ 的甲醇液孵育后,与蛋白酶 K 孵育,加入 TUNEL 反应混合液,其中含末端脱氧核苷酸转移酶和生物素标记的核苷酸孵育,再与过氧化物酶(POD)转化液孵育,3,3'-二氨基联苯胺四盐酸(DAB)底物显色,苏木精复染,中性树胶封片,荧光显微镜下调亡细胞细胞核呈棕黄色颗粒。

1.7 免疫蛋白印迹法(Western Blot)检测海马组织 Caspase-3、Bcl-2 表达 取部分海马组织,加入 RIPA 裂解液冰上裂解,4℃离心后取上清液,采用考马斯亮蓝法(BCA 法)进行蛋白定量,按 30 μ g 总蛋白进行上样,经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳后转印到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上,5%脱脂奶粉封闭 2 h,加入目的蛋白一抗[Caspase-3 抗体(1:1 000 稀释)、Bcl-2 抗体(1:1 000 稀释)]4℃孵育过夜,Tris-盐酸缓冲液(TBST)洗膜后加入 HRP 标记的二抗(1:2 000 稀释)孵育 2 h。采用增强化学发光法(ECL)显影,凝胶成像仪采集图像,用 Image J 软件测定各条带灰度值,以目的蛋白/ β -actin 比值作为目的蛋白表达量。

1.8 统计学方法 采用 SPSS21.0 统计学软件分析数据。计量资料均符合正态分布,以($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠 Y 型迷宫测试结果比较 见表 1。与空白组比较,模型组大鼠 Y 型迷宫测试总训练次数增加($P < 0.05$),达标时间延长($P < 0.05$);与模型组比较,电针组大鼠 Y 型迷宫测试总训练次数减少($P < 0.05$),达标时间缩短($P < 0.05$)。

表 1 各组大鼠 Y 型迷宫测试结果比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	总训练次数(次)	达标时间(min)
空白组	10	18.41 $\pm$ 3.22	20.54 $\pm$ 3.86
模型组	10	52.11 $\pm$ 7.86 ^①	67.54 $\pm$ 9.57 ^①
电针组	10	34.54 $\pm$ 5.98 ^②	42.33 $\pm$ 6.28 ^②

注:①与空白组比较, $P < 0.05$;②与模型组比较, $P < 0.05$

2.2 各组大鼠海马组织 TNF- α 、IL-1 β 水平比较 见表 2。与空白组比较,模型组大鼠海马组织 TNF- α 、

IL-1 β 水平均升高($P<0.05$);与模型组比较,电针组大鼠海马组织 TNF- α 、IL-1 β 水平均降低($P<0.05$)。

表2 各组大鼠海马组织 TNF- α 、IL-1 β 水平比较($\bar{x}\pm s$) ng/mL

组别	鼠数	TNF- α	IL-1 β
空白组	10	136.54 $\pm$ 4.33	166.86 $\pm$ 4.89
模型组	10	563.56 $\pm$ 13.68 ^①	498.63 $\pm$ 11.96 ^①
电针组	10	312.68 $\pm$ 8.94 ^②	301.68 $\pm$ 7.54 ^②

注:①与空白组比较, $P<0.05$; ②与模型组比较, $P<0.05$

2.3 各组大鼠海马组织 TUNEL 染色结果比较 见图1。与空白组比较,模型组大鼠海马组织棕黄色颗粒明显增多,提示海马组织神经细胞凋亡增多,而电针组大鼠海马组织棕黄色颗粒较模型组明显减少,提示电针干预可抑制东莨菪碱诱导的神经细胞凋亡。

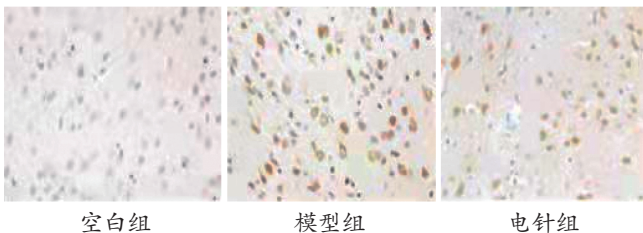


图1 各组大鼠海马组织 TUNEL 染色结果比较 ($\times 200$)

2.4 各组大鼠海马组织 Capase-3、Bcl-2 蛋白相对表达水平比较 见图2、表3。与空白组比较,模型组海马组织 Capase-3 蛋白相对表达水平升高($P<0.05$), Bcl-2 蛋白相对表达水平降低($P<0.05$);与模型组比较,电针组 Capase-3 蛋白相对表达水平降低($P<0.05$), Bcl-2 蛋白相对表达水平升高($P<0.05$)。

3 讨论

认知功能障碍是指各种原因引起的脑神经接受外界信息后加工处理过程缺失,由于 ICU 的特殊环境、药物影响及自身疾病等多重因素导致重症患者 ICU 后认知功能障碍发生率远远高于其他普通患者。ICU 后认知功能障碍的高发生率已越来越引起临床医师的关注和重视,为此已有学者进行了相应研究,发现 ICU 谵妄的发生与远期认知功能障碍密切相关^[3,7],谵妄和 ICU 后认知功能障碍均是一种复杂的脑功能障碍综合征,两者既有联系又有区别,谵妄可能是 ICU 后认知功能障碍的前驱症状,而认知功能障碍是谵妄的远期并发症。研究显示,发生谵妄

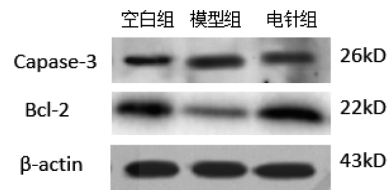


图2 各组大鼠海马组织 Capase-3、Bcl-2 蛋白表达水平电泳图

表3 各组大鼠海马组织 Capase-3、Bcl-2 蛋白相对表达水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	Capase-3 蛋白	Bcl-2 蛋白
空白组	10	0.41 $\pm$ 0.02	0.68 $\pm$ 0.05
模型组	10	0.75 $\pm$ 0.06 ^①	0.22 $\pm$ 0.02 ^①
电针组	10	0.58 $\pm$ 0.04 ^②	0.42 $\pm$ 0.04 ^②

注:①与空白组比较, $P<0.05$; ②与模型组比较, $P<0.05$

的远期认知功能障碍患者影像学上存在脑组织海马区及上额叶体积的缩小^[8]。说明谵妄可引起脑损伤,谵妄所并发的远期认知功能障碍一定以脑组织病理性损伤作为物质基础。因此,对早期 ICU 谵妄患者采取有效手段,减轻脑损伤,可能改善远期认知功能障碍。但目前谵妄的病理生理机制还不清楚,尚无明确有效的药物疗法^[9]。

中医认为 ICU 患者的脑功能障碍多由各种因素导致气血运行受阻、脏腑虚衰、阴阳失调、脑失所养、神明无主所致。电针是电刺激与针刺的结合,可通过经络传感效应起到疏通气血、调和阴阳的作用。本研究通过腹腔注射东莨菪碱构建谵妄模型,大鼠首先出现精神兴奋等谵妄症状,7 d 后通过 Y 型迷宫测试评估学习记忆能力,与空白组比较,模型组总训练次数增加,达标时间延长,说明模型组存在远期认知功能障碍,而电针组上述指标较模型组明显减少。神庭穴主精神智慧相关的神志、认知病,而印堂穴是精气元神聚集之处,对于神经系统可起到调整改善作用,本研究中电针此二穴可部分改善东莨菪碱诱导谵妄大鼠远期认知功能障碍,这符合电针改善脑功能障碍的中医理论基础。

炎症反应与脑功能障碍之间存在一种复杂的关系,重症患者病程中伴随一系列炎症级联反应,炎症因子如 TNF- α 、IL-1 β 可能通过增加血脑屏障通透性和改变神经传递引起中枢炎症反应,损伤脑组织,继而导致谵妄^[10]。但谵妄引起的急性脑功能障碍如及时干预一般是可逆的,而 ICU 后认知功能障碍

是一种不可逆的脑损伤。炎症因子同样在认知功能障碍发展进程中扮演一个重要角色,中枢炎症反应会诱导脑组织神经细胞(尤其是海马组织神经细胞)凋亡,最终导致认知功能障碍并发症的发生^[11]。这也间接反映了及时控制谵妄的重要性,通过有效手段抑制中枢炎症反应可能逆转谵妄状态,减轻神经细胞凋亡,进而改善远期认知功能障碍。炎症反应过程中的细胞凋亡是通过几种抗凋亡和促凋亡蛋白严格调控的细胞死亡过程^[12], Bcl-2 和 Caspase-3 是两个重要的抑制和促进细胞凋亡的蛋白^[13-14]。本研究结果显示,与空白组比较,模型组谵妄大鼠海马组织炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 水平、TUNEL 染色阳性比例、Caspase-3 表达均升高, Bcl-2 降低,提示海马组织高炎症状态介导神经细胞凋亡蛋白异常表达,进而发生细胞凋亡。而电针神庭、印堂穴可减轻炎症反应,逆转炎症介导的凋亡蛋白异常表达,从而抑制神经细胞凋亡,这可能是电针控制谵妄,改善远期认知功能障碍的重要机制之一。

综上,电针神庭、印堂穴可改善东莨菪碱诱导谵妄大鼠远期认知功能障碍,其机制可能与减轻中枢炎症反应,逆转海马组织 Bcl-2、Caspase-3 的异常表达,进而抑制神经细胞凋亡有关。

[参考文献]

- [1] 韦秀霞,张秀伟,彭剑英,等. 国外ICU后综合征的研究现状[J]. 中华护理杂志, 2016, 51(1): 84-89.
- [2] 魏月清,李红,李芸,等. ICU后认知障碍风险预测模型的构建及验证[J]. 中华护理杂志, 2021, 56(1): 14-20.
- [3] 颜秀侠,韩若东,岳亚杰,等. 危重症患者ICU治疗后早期认知功能障碍的临床相关因素分析[J]. 中华全科医学, 2020, 18(5): 746-748.
- [4] PATEL J, BALDWIN J, BUNTING P, et al. The effect of a multicomponent multidisciplinary bundle of interventions on sleep and delirium in medical and surgical intensive care patients[J]. *Anaesthesia*, 2014, 69(6): 540-549.
- [5] 吴擎,徐英,刘美真,等. 电针神庭、印堂穴对谵妄状态大鼠下丘脑 5-羟色胺及白细胞介素-1 β 的影响[J]. 新中医, 2020, 52(12): 126-129.
- [6] STEMMELIN J, CASSEL J C, WILL B, et al. Sensitivity to cholinergic drug treatments of aged rats with variable degrees of spatial memory impairment[J]. *Behav Brain Res*, 1999, 98(1): 53-66.
- [7] 姚丽,丁楠楠,杨丽平,等. 重症患者转出ICU后认知损害危险因素 Meta 分析[J]. 中国护理管理, 2018, 18(12): 1634-1643.
- [8] GÜNTHER M L, MORANDI A, KRAUSKOPF E, et al. The association between brain volumes, delirium duration, and cognitive outcomes in intensive care unit survivors: the VISIONS cohort magnetic resonance imaging study[J]. *Crit Care Med*, 2012, 40(7): 2022-2032.
- [9] 中华医学会重症医学分会. 中国成人ICU镇痛和镇静治疗指南[J]. 中华重症医学电子杂志, 2018, 4(2): 90-113.
- [10] 刘天琳,霍星,王国年,等. 谵妄病理生理机制研究进展[J]. 新乡医学院学报, 2014, 31(12): 1057-1060.
- [11] 李雅巍,王东信. 炎症反应与术后认知功能并发症的关系研究进展[J]. 解放军医学杂志, 2014, 39(8): 673-677.
- [12] AMINI K A, JAVADINIA F, MIRZAEI A, et al. Apoptosis markers of circulating leukocytes are associated with the clinical course of inflammatory bowel disease[J]. *Gastroenterology and hepatology from bed to bench*, 2018, 11(Suppl 1): S53-S58.
- [13] EDLICH F. BCL-2 proteins and apoptosis: Recent insights and unknowns[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 500(1): 26-34.
- [14] LIU J, WANG F, YIN D, et al. Caspase 3 may participate in the anti-tumor immunity of dendritic cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 511(2): 447-453.

(责任编辑: 钟志敏)