·短篇论著·

针刺对慢性疲劳综合征大鼠认知功能及海马神经元的影响*

刘长征[1] 雷 波[1] 张 鹏[1]

慢性疲劳综合征(chronic fatigue syndrome,CFS)是以严重疲劳为主要表现,伴睡眠障碍、短期记忆力减退、注意力下降、头痛、关节痛等症状的一组症候群[1]。研究表明,CFS患者认识功能障碍存在普遍性和典型性,其兼症中记忆力、注意力下降最为突出[2—4]。认知功能的受损严重影响了患者的学习、工作和生活[5]。既往研究表明,针刺对改善CFS患者认知功能具有较好的疗效,但其机制研究甚少,已有的研究见于观测脑组织中自由基代谢、神经递质代谢水平,或通过磁共振影像、脑电位变化推测其机制[6—8]。海马神经元与认知功能密切相关,但既往报道中未见从海马神经组织学角度探讨针刺改善CFS认知功能作用机制的报道,故本研究通过观察针刺对CFS大鼠认知功能及海马神经元的影响,为针刺治疗CFS临床应用及机制研究打下基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

健康雄性SD大鼠48只(由长沙天勤生物技术有限公司提供,许可证号SCXK2009-0013),清洁级,体质量180—220g。适应性喂养7d后,采用随机数字表法将其分为4组:空白对照组、CFS模型组、针刺组、阳性对照组,每组各12只。动物处置符合2006年9月中华人民共和国科技部颁发的《关于善待实验动物的指导性意见》(国科发财字〔2006〕398号)。

1.2 试剂及仪器

人参皂甙片,25mg/片,沈阳东昂制药有限公司生产;水溶性伊红,Sigma公司生产;苏木素,Sigma公司生产;Leica病理石蜡切片机RM2016(德国Leica公司);OLYMPUS 生物显微镜(日本奥林巴斯株式会社);电热恒温水浴锅HH-W420S(上海精科实业有限公司)。

1.3 造模方法

采用悬吊游泳法制备CFS大鼠模型。上午悬吊:距离大鼠尾根部3cm处置一空心玻棒,穿线将大鼠悬吊在悬吊架上,头部距地面约1m,第1天悬吊时间为1h,3d加量1次,即悬吊时间分别为1h、1.5h、2h、2.5h,连续悬吊12d。下午游泳:令大鼠在水温为(24±1)℃、水深50cm的池中游泳,造模开始前3天每天适应性游泳30min,后每天强制游泳2h,共计12d。除空白对照组外,其余三组均采用上述方法制备CFS大鼠模型。

1.4 干预方法

空白对照组和CFS模型组不予任何处理,针刺组和阳性对照组于造模开始时给予相应处理。针刺组:选取百会、足三里(双)、三阴交(双),腧穴定位参考李忠仁主编《实验针灸学》,固定大鼠,针刺部位常规消毒,采用0.28×25mm的毫针进行针刺,百会穴斜刺进针3mm,足三里、三阴交垂直进针3—5mm,施捻转补法,每穴每次行针10s左右,120r/min,每5min行针1次,留针20min,1次/d,共治疗12d。阳性对照组:予人参皂甙水溶液灌胃(按总皂甙含量计,浓度为5.83mg/ml),每次3ml,每日1次,连续灌胃12d。

1.5 观察指标与检测方法

1.5.1 跳台实验:治疗结束前1d开始实验,实验分为两个阶段:训练阶段和试验阶段。训练阶段先将大鼠放在跳台箱内适应3min,然后通电,大鼠受到电击后通常会跳上平台躲避电击。训练结束24h后进行测试,记录5min内大鼠第1次从平台跳下的时间,即跳台潜伏期(step down latency,SDL),以及5min内大鼠跳下平台的次数,即错误次数(error times, ET)。若大鼠5min内未跳下平台,错误次数记录为0,潜伏期记录为5min。

1.5.2 Morris迷宫实验:治疗结束前6d开始实验,每天于针刺治疗结束2h后进行训练。Morris水迷宫为一直径150cm、高50cm的圆桶,池内水深30cm,平台直径9cm,置于水面下2cm处,水温22℃,水中加入奶粉使其变成不透明乳白色隐蔽平台。水池壁标记4个入水点,将水池分为4个象限。①定位航行实验(place navigation test,PNT):实验前1d,让大鼠在水池内自由游泳120s以熟悉环境,实验开始后每天进行4次训练,依次从4个象限入水点处面向池壁将大鼠放入池中,记录大鼠爬上平台所用时间,即逃避潜伏期(escape la-

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2021.08.021

*基金项目:江西省教育厅科学技术研究资助项目(GJJ161028)

1 宜春学院,江西省宜春市,336000

第一作者简介:刘长征,女,副教授,副主任中医师; 收稿日期:2020-03-23

tent period)，如果大鼠在120s内未能爬上平台，则将其引导至平台，并将逃避潜伏期记录为120s，2次训练之间休息60s，共训练5天。②空间探索实验（spatial probe test，SPT）：定位航行实验结束后，将平台撤除，从第Ⅲ象限入水点处将大鼠放进水中，记录120s内大鼠穿越平台位置的次数以及在平台象限逗留的时间。

1.5.3 海马神经元形态学变化：实验结束后将各组实验大鼠脱颈椎处死，迅速取出脑组织，分离海马，置于10%的福尔马林溶液中固定备测。石蜡包埋，切片，HE染色光镜下观察海马神经元变化。

1.6 统计学分析

实验所得数据以均数±标准差表示，采用SPSS 18.0软件包进行统计学分析，组间比较采用方差分析，继以q检验，以P<0.05为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 针刺对大鼠跳台实验的影响

跳台实验结果显示，CFS模型组与空白对照组相比，大鼠潜伏期缩短，错误次数增多；阳性对照组及针刺组大鼠潜伏期均比CFS模型组长，错误次数比CFS模型组少，而针刺组的潜伏期更长于阳性对照组。说明人参皂甙水溶液及针刺均能延长CFS模型大鼠逃避潜伏期时长，减少其错误次数，而针刺的效果更优于人参皂甙。见表1。

2.2 针刺对大鼠Morris 迷宫实验的影响

2.2.1 针刺对大鼠逃避潜伏期的影响：训练期间，随着训练天数的增加，各组大鼠逃避潜伏期逐渐缩短。CFS模型组在1—5d逃避潜伏期均长于空白对照组（P<0.05），针刺组在2—5d逃避潜伏期均短于模型组（P<0.05），与阳性对照组比较，针刺组在d3、4、5天逃避潜伏期短于阳性对照组（P<0.05）。见表2。

2.2.2 针刺对大鼠空间探索实验的影响：空间探索实验结果显示，CFS模型组大鼠穿越平台象限的次数比空白对照组少（P<0.05），平台象限的逗留时间比空白对照组短（P<0.05）；针刺组及阳性对照组大鼠穿越平台象限的次数比模型组多（P<0.05），平台象限的逗留时间比模型组长（P<0.01），针刺组与阳性对照组相比平台象限的逗留时间也存在差异（P<0.05）。见表3。

表1 针刺对大鼠跳台实验的影响 （$\bar{x}\pm s$）

组别	动物数	潜伏期(s)	错误次数(次)
空白对照组	12	284.33±27.43	0.5±0.67
CFS模型组	12	195.25±52.14①	1.67±0.98①
针刺组	12	260.42±39.82②	0.83±0.72②
阳性对照组	12	226.33±35.74③	1.25±0.62

①与空白对照组比较P<0.05；②与CFS模型组比较P<0.05；③与针刺组比较P<0.05。

表2 针刺对CFS大鼠逃避潜伏期的影响 （$\bar{x}\pm s$，s）

组别	动物数	d1	d2	d3	d4	d5
空白对照组	12	36.91±7.65	29.09±8.08	24.98±7.91	15.95±8.21	10.23±6.15
CFS模型组	12	63.99±22.97①	52.38±22.75①	42.27±15.71①	35.83±13.74①	28.08±7.90①
针刺组	12	47.25±16.28	33.99±12.27②	23.21±7.69②	18.04±8.10②	14.10±8.54②
阳性对照组	12	52.68±27.60	43.02±16.89	39.33±21.94③	29.43±10.61③	22.59±9.61③

①与空白对照组比较P<0.05；②与CFS模型组比较P<0.05；③与针刺组比较P<0.05

表3 针刺对大鼠空间探索实验的影响 （$\bar{x}\pm s$）

组别	动物数	穿越平台象限的次数(次)	平台象限的逗留时间(s)
空白对照组	12	6.83±3.07	55.98±9.16
CFS模型组	12	4.17±1.99①	40.39±8.84①
针刺组	12	6.42±2.07②	50.92±9.20②
阳性对照组	12	5.75±1.60②	42.13±10.02③

①P<0.05，与空白对照组比较；②P<0.05，与CFS模型组比较；③P<0.05，与针刺组比较。

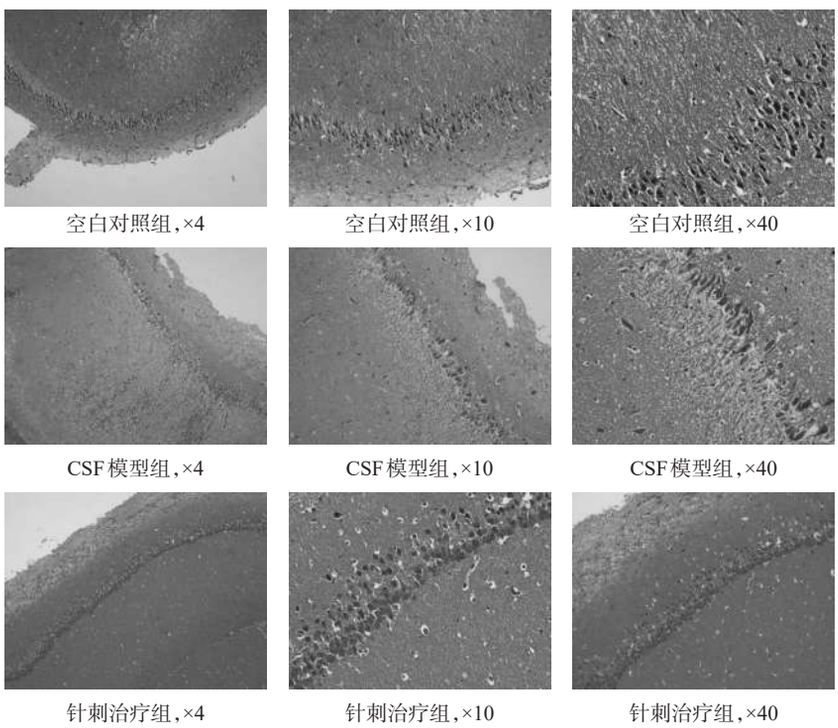
2.3 针刺对大鼠海马神经元的影响

镜下观察显示：空白对照组大鼠海马回神经元排列整齐，神经元呈圆形或椭圆形，轴突、树突清楚，核染色质均匀，神经纤维清楚，彼此无缠结现象，神经元胞质尼氏体分布均匀，核膜清晰，染色质呈颗粒状，核仁清晰；CFS模型组大鼠海马神经元排列明显紊乱，细胞间隙明显增大，周围可见小胶质细胞浸润，部分神经元坏死，出现红色神经细胞现象，大部分神经元核结构不清晰，核仁不清，胞质浓缩深染，尼氏体消失，神经纤维彼此缠结明显；阳性对照组大鼠海马神经元排列较紊乱，神经元细胞核、核膜结构较模型组明显清楚，大部分神经元胞浆颜色加深，神经纤维缠结现象存在；针刺组大鼠海马神经元排列较整齐，神经元细胞核、核膜结构较模型组明显清晰，部分神经元胞浆颜色加深，尼氏体存在，结构稍模糊，神经纤维缠结现象明显减轻。见图1。

3 讨论

针灸具有良好的整体调节作用，对CFS具有显著疗效，且无不良反应，在CFS的治疗中具有一定的优势[9]。“百会”、“足三里”、“三阴交”均为针灸治疗CFS的常用穴位，研究显示，“足三里+三阴交+百会”在针灸治疗CFS三穴配伍项中，

图1 针刺对慢性疲劳综合征大鼠海马神经元的影响 （HE染色）



集中支持度和置信度均最高[10]。百会为督脉要穴,可安神益智、开窍醒脑,足三里补益脾胃、益气养血,“三阴交”为足三阴经交会穴,调补肝、脾、肾三经气血。三穴合用共奏补肝、健脾、益肾之功,使CFS患者疲劳、健忘、失眠等诸症自消[6,11]。

跳台实验、Morris水迷宫实验是较好的测试大脑空间学习、记忆能力的工具[12]。本实验结果显示,CFS模型组大鼠与空白对照组相比,跳台实验潜伏期缩短,错误次数增多,Morris迷宫实验逃避潜伏期延长,穿越平台象限的次数减少,平台象限的逗留时间缩短,说明CFS模型组大鼠学习记忆能力下降,认知功能受损;针刺组与CFS模型组相比,潜伏期更长,错误次数减少,逃避潜伏期缩短,穿越平台象限的次数增多,平台象限的逗留时间延长,且针刺组与阳性对照组相比也存在差异,说明针刺能增强CFS大鼠学习记忆能力,改善其认知功能受损,且针刺对改善CFS大鼠认知功能的作用更优于人参皂甙。研究结果与既往研究基本一致[6]。

海马是目前公认的与认知功能有密切关系的重要脑区,是学习记忆的解剖学基础,而海马发挥正常的学习记忆功能依赖于其完整的组织结构。本研究中通过病理组织学对比观察,发现CFS模型组神经元排列紊乱,明显变性,部分神经元坏死,神经纤维彼此缠结,这些均为海马区神经组织受损表现。针刺组和阳性对照组神经元排列明显好转,细胞胞质浓缩,尼氏体虽结构不清,但神经纤维缠结现象减轻。对比阳性对照组,针刺组镜下改变尤为明显,这与跳台实验、Morris迷宫实验的结果相吻合。说明针刺可能通过影响海马神经组织结构起到改善CFS认知功能的作用。

参考文献

[1] 王拯. 慢性疲劳综合征轻度认知障碍形成机制研究[J]. 中国卫生产业,2019,16(6):196—198.

[2] 陈若宏,张振贤,王拯. 慢性疲劳综合征认知功能损伤临床特征研究[J]. 辽宁中医杂志,2019,46(6):222—1227.

[3] 李永杰,高旭光,王得新,等.慢性疲劳综合征患者心理学特征的研究[J]. 中华医学杂志,2005,85(41):2926—2929.

[4] Cockshell SJ, Mathias JL. Cognitive deficits in chronic fatigue syndrome and their relationship to psychological status, symptomatology, and everyday functioning[J]. Neuropsychology, 2013,27:230—242.

[5] Abbey SE, Garfinkel PE. Chronic fatigue syndrome and depression: cause, effect, or covariate[J]. Rev Infect Dis, 1991, 13 (Suppl 1) :S73—83.

[6] 刘长征,雷波. 针刺对慢性疲劳综合征大鼠学习记忆能力及脑组织超氧化物歧化酶活性、丙二醛含量的影响[J]. 针刺研究,2013,38(6):478—481.

[7] 唐乐微. 基于多模态磁共振技术对针刺治疗慢性疲劳综合征认知功能改善的中枢机制研究[D].成都:成都中医药大学,2015.

[8] 韩亮. 针刺治疗慢性疲劳综合征认知功能障碍的事件相关电位研究[D]. 成都:成都中医药大学,2016.

[9] 李克嵩,庄礼兴,贺君,等. 基于累积meta分析模型:针灸治疗慢性疲劳综合征系统评价[J]. 中华中医药学刊,2017,35(12):3087—3091.

[10] 谭惠娟,罗婷婷,瞿玉竹,等. 基于数据挖掘的针灸治疗慢性疲劳综合征腧穴运用规律[J]. 中国中医基础医学杂志,2017,(2):242—244.

[11] 王向义,刘长征,雷波. 针刺对慢性疲劳综合征大鼠血浆 T细胞转录因子/GATA结合蛋白3表达的影响[J]. 针刺研究,2017,42(3):246—248,262.

[12] 周景慧. 地黄饮子对脑缺血再灌注损伤大鼠脑组织超氧化物歧化酶、丙二醛及其空间学习记忆能力的影响[J]. 海军医学杂志,2017,38(2):116—118,136.