

· 针灸推拿 ·

本文引用:高音来,陈芯仪,何灏龙,郑慧娥,朱钰,谭涛,陈楚洵,田浩梅.调心通督法对血管性痴呆大鼠学习记忆能力及海马区 bFGF 表达的影响[J].湖南中医药大学学报,2020,40(1):87-91.

## 调心通督法对血管性痴呆大鼠学习记忆能力及 海马区 bFGF 表达的影响

高音来<sup>1</sup>,陈芯仪<sup>1</sup>,何灏龙<sup>1</sup>,郑慧娥<sup>1</sup>,朱钰<sup>2</sup>,谭涛<sup>2</sup>,陈楚洵<sup>1</sup>,田浩梅<sup>1\*</sup>

(1.湖南中医药大学,湖南长沙 410208;2.湖南中医药大学第二附属医院,湖南长沙 410005)

**〔摘要〕**目的 探讨调心通督法对血管性痴呆(vascular dementia,VD)大鼠学习记忆功能及海马碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor,bFGF)表达的影响。**方法** SD大鼠行 Morris 水迷宫实验筛选出特异性大鼠后随机分出 6 只假手术组,其余大鼠采用双侧颈总动脉永久性结扎法(2-VO)复制 VD 大鼠模型,造模后再按随机数字表法分为模型组、西药对照组、调心通督法针刺组,每组 6 只。于造模成功后及治疗后分别采用 Morris 水迷宫实验观察大鼠学习记忆能力,Western Blot 法检测双侧海马 bFGF 蛋白表达。**结果** 造模后,与假手术组比较,各组大鼠平均逃避潜伏期时间明显增加,且找到平台次数明显减少( $P<0.01$ )。治疗后,与模型组相比,西药对照组、调心通督法针刺组平均逃避潜伏期明显缩短( $P<0.01$ ),穿越原平台次数增加( $P<0.05$ );与西药对照组比较,调心通督法针刺组差异不具有统计学意义( $P>0.05$ )。与假手术组比较,各组大鼠海马区 bFGF 表达均升高( $P<0.01$ );与模型组比较,西药对照组及调心通督法针刺组海马 bFGF 表达均明显增高( $P<0.05$ )。**结论** 调心通督法能明显改善 VD 大鼠学习记忆能力、上调海马 bFGF 表达,可能是其重要作用机制之一。

**〔关键词〕** 血管性痴呆;调心通督法;碱性成纤维细胞生长因子;学习记忆

**〔中图分类号〕**R246.6

**〔文献标志码〕**A

**〔文章编号〕**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2020.01.019

### Effects of Tiaoxin Tongdu Method on Learning and Memory Ability and bFGF Expression in Hippocampus of Vascular Dementia Rats

GAO Yinlai<sup>1</sup>, CHEN Xinyi<sup>1</sup>, HE Haolong<sup>1</sup>, ZHEN Hui'e<sup>1</sup>, ZHU Yu<sup>2</sup>, TAN Tao<sup>2</sup>, CHEN Chutao<sup>1</sup>, TIAN Haomei<sup>1\*</sup>

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. The Second Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410005, China)

**〔Abstract〕 Objective** To explore the effects of Tiaoxin Tongdu method on learning and memory function and basic fibroblast growth factor (bFGF) expression in hippocampus of vascular dementia (VD) rats. **Methods** SD rats were selected by Morris water maze test and then randomly divided into 6 sham operation groups. VD rat model was established by permanent ligation of bilateral common carotid artery (2-VO). The other rats were divided into a model group, a western medicine control group and Tiaoxin Tongdu method acupuncture group according to the random number table method, with 6 rats in each group. Morris water maze test was used to observe the learning and memory ability of rats after successful modeling and after treatment. Western Blot method was used to detect the expression of bFGF protein in bilateral hippocampus. **Results** Compared with sham operation groups, the average escape latency time of rats in each group increased significantly, and the number of platforms found decreased significantly ( $P<0.01$ ). Compared with the model group, the average escape latency was significantly shortened ( $P<0.01$ ) and the number of times crossing the original platform was increased ( $P<0.05$ ) in the western medicine control group and the Tiaoxin Tongdu method

**〔收稿日期〕**2019-10-13

**〔基金项目〕**国家自然科学基金项目(81874508、81303051);湖南省科技计划项目(2015JJ4105)。

**〔作者简介〕**高音来,女,在读硕士研究生,研究方向:针灸推拿临床应用及机制研究。

**〔通讯作者〕**\* 田浩梅,女,博士,副教授,硕士研究生导师,E-mail:451358104@qq.com。

acupuncture group. Compared with the western medicine control group, the difference of the Tiaoxin Tongdu method acupuncture group was not statistically significant ( $P>0.05$ ). Compared with the sham operation groups, the expression of bFGF in hippocampus of each group was increased ( $P<0.01$ ). Compared with the model group, the expression of bFGF in hippocampus of the western medicine control group and the Tiaoxin Tongdu method acupuncture group increased significantly ( $P<0.05$ ). **Conclusion** Tiaoxin Tongdu method can significantly improve the learning and memory ability of VD rats, and up-regulation of bFGF expression in hippocampus may be one of its important mechanisms.

[**Keywords**] vascular dementia; Tiaoxin Tongdu method; basic fibroblast growth factor; learning and memory

血管性痴呆(vascular dementia, VD)是主要由长期慢性低灌注的颅内血管疾病所致的记忆障碍综合征。随老龄化社会的到来,血管性痴呆的发病率逐年递增<sup>[1]</sup>。该病严重影响着患者自身、家庭乃至整个社会,预防及医治 VD 已被世界卫生组织列为 21 世纪重点科研项目之一<sup>[2-3]</sup>。前期临床研究<sup>[4]</sup>表明由名老中医严洁教授提出以心包经和督脉为主的“调心通督”法能提高 VD 患者简易智力状态检查(mini-mental state examination, MMSE)评分,改善其自理能力,提示慢性低灌注脑组织的保护、修复过程与调心通督法相关,但其作用机制尚待探讨。

碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)是一种能作用于体内及体外的多效性血管生长因子<sup>[5-6]</sup>,作为主要的血管生长因子之一,对促进细胞有丝分裂、血管生成、神经修复、创面愈合及内皮细胞新生具有不可替代的调节作用<sup>[7-9]</sup>。陈倩倩<sup>[10]</sup>、唐强<sup>[11]</sup>、王亚军等<sup>[12]</sup>均观察到针刺可通过上调 bFGF 的表达来促进脑缺血区的血管新生。因此,本实验研究将从重要的血管新生因子 bFGF 着手,观察调心通督法对 VD 大鼠学习记忆能力的改变及 bFGF 蛋白的表达情况,探讨调心通督法医治 VD 的作用机制,为今后针灸治疗 VD 提供充分的理论和实验支持。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验动物及分组

45 只 SPF 级雄性 SD 大鼠,体质量控制在 200~250 g,购自湖南中医药大学动物实验中心,许可证号:SCXK(湘)2016-0002,合格证号:43004700057075。将大鼠置于 SPF 级动物实验房饲养,保持室温 20~22 ℃,湿度 50%~60%,饮食、饮水自由,喂养及治疗

期间隔天清洗笼盒及更换垫料,水迷宫实验期间每天清洗并更换。适应性喂养 1 周,行 Morris 水迷宫实验后筛选出特异性大鼠,保留 43 只,按随机数表法选出 6 只为假手术组,其余大鼠造模后行水迷宫实验检测,筛选出造模成功的 VD 大鼠 18 只,分为模型组、西药对照组、调心通督法针刺组,6 只/组。实验过程中大鼠死亡时,剔除并补录,统一为发现情况的第 2 日上午采取签盒抽签的方式进行补录。本实验大鼠死亡率约为 50%。实验动物处理的伦理学依据参照中华人民共和国科学技术部发布的《关于善待实验动物的指导性意见》。

### 1.2 主要试剂与仪器

10%水合三氯乙醛(长沙-维尔生物科技有限公司),络合碘(长沙-欧润消毒科技有限公司),注射用青霉素钠(江西-科达动物药业有限公司),ABclonal 抗体(北京-鼎国生物技术有限公司),安迪牌 0.30 mm×25 mm 无菌针灸针(贵州-安迪药械有限公司),Morris 水迷宫视频分析系统(法国 View-point 公司),电子天平(杭州-恒仪仪表科技有限公司)。

### 1.3 动物模型复制与评定标准

所有大鼠术前 12 h 禁食,不禁水。除假手术组外,其余各组采用双血管阻断法<sup>[13]</sup>(2-VO)模拟 VD 模型,用 10%的水合三氯乙醛(0.3 mL/100 g)将大鼠麻醉后固定于鼠板上,待备皮、消毒后沿颈部中央前方逐层分离皮肤及皮下组织,依次暴露双侧颈总动脉,以 4~0 号线分别于近心端与远心端结扎并从中断剪断,伤口内撒入适量青霉素,以 3~0 号线缝合皮肤。注意手法柔和、无菌操作。假手术组操作方法一致,但不结扎剪断双侧颈总动脉。

模型成功的判断标准<sup>[14]</sup>:造模 2 周后行 Morris 水迷宫实验,以假手术组作参照,计算各造模组大鼠

逃避潜伏期分别与假手术组逃避潜伏期平均值之差占该鼠平均逃避潜伏期的比值,若该值大于 20%,则为血管性痴呆模型。

#### 1.4 各组干预方法

假手术组和模型组:只捆绑,不给药,不针刺。调心通督针刺组:根据《实验针灸学》及华兴邦《实验动物图谱》,选取“命门”“大椎”直刺 5 mm,“风府”向下斜刺 5 mm,“百会”“神庭”平刺 10 mm,“水沟”向鼻中隔方向斜刺 2 mm,“内关”直刺 5 mm,“大陵”“劳宫”直刺 2 mm;不给药,捆绑后针刺,采取平补平泻手法,留针 30 min。西药对照组:予尼莫地平(0.0625 g/kg)与蒸馏水混合至 0.01 g/mL 灌胃,给药后捆绑,不针刺。各组干预 1 次/d,持续 2 周。

#### 1.5 Morris 水迷宫行为学检测

Morris 水迷宫<sup>[15]</sup>外形为一圆形水池,分为 4 个象限,任一象限中央可放置直径 10 cm 低于水面 2 cm 的无色透明平台。前 5 天为定位航行试验:每天固定时段训练 4 次,设定时限为 120 s,将大鼠四肢完全站上平台耗时,记为“逃避潜伏期”。前 2 天作为大鼠适应期,不计入成绩,最终以第 3 天到第 5 天平均耗时作为其有效成绩。第 6 天为空间探索试验:撤除小平台,任选同一象限将大鼠放入水中,测出 120 s 内大鼠经过平台区域次数。

#### 1.6 脑组织取材及指标检测

各组大鼠先以 10%的水合三氯乙醛(0.3 mL/100 g)进行腹腔注射麻醉后迅速断头取脑,再将双侧海马分离放入标记好编号的 EP 管中,置于干冰箱中低温保存,随后移至 -80 °C 冰柜冻存,采取 Western Blot 检测法进行样品制备。

Western Blot 法检测海马中 bFGF 蛋白表达:按比例将海马组织加入裂解液,提取海马总蛋白。进行蛋白定量取上清液用 BCA 蛋白定量试剂盒,计算出蛋白浓度。采用 10%分离胶和 5%浓缩胶行 SDS-PAGE 电泳,NC 膜转移,转膜后在室温摇晃闭存 1 h,之后加入一抗(兔多抗),4 °C 孵育一宿, TBST 洗膜,5 min×4 次;将膜转入二抗(兔多抗),室温孵育 1 h, TBST 洗膜,5 min×5 次;用化学发光法(ECL)显影,扫描、存档,Image-J 软件测出各条带灰度值

进行分析。

#### 1.7 统计学方法

实验数据应用 SPSS 22.0 统计软件进行分析,对所有数据均使用“ $\bar{x}\pm s$ ”表示。水迷宫实验数据采用重复测量方差分析,多组间比较可用单因素方差分析(One-way ANOVA),以  $P<0.05$  作为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 定位航行实验-逃避潜伏期时长

组间比较:造模前,各组大鼠平均逃避潜伏期差异无统计学意义( $P>0.05$ )。造模后,与假手术组比较,各组大鼠平均逃避潜伏期时间明显增加( $P<0.01$ )。治疗后,与模型组相比,西药对照组、调心通督法针刺组平均逃避潜伏期明显缩短,差异有统计学意义( $P<0.01$ );与西药对照组比较,调心通督法针刺组差异无统计学意义( $P>0.05$ )。组内比较:假手术组造模前、造模后及治疗后两两比较差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。与造模前比较,造模后与治疗组模型组平均逃避潜伏期时间明显增加( $P<0.01$ );与造模后比较,治疗后模型组平均逃避潜伏期时间差异无统计学意义( $P>0.05$ )。与造模前比较,造模后西药对照组、调心通督法针刺组平均逃避潜伏期时间明显增加( $P<0.01$ ),治疗后西药对照组、调心通督法针刺组平均逃避潜伏期时间差异无统计学意义( $P>0.05$ );与造模后比较,西药对照组、调心通督法针刺组平均逃避潜伏期缩短,差异有统计学意义( $P<0.01$ )。见图 1、表 1。

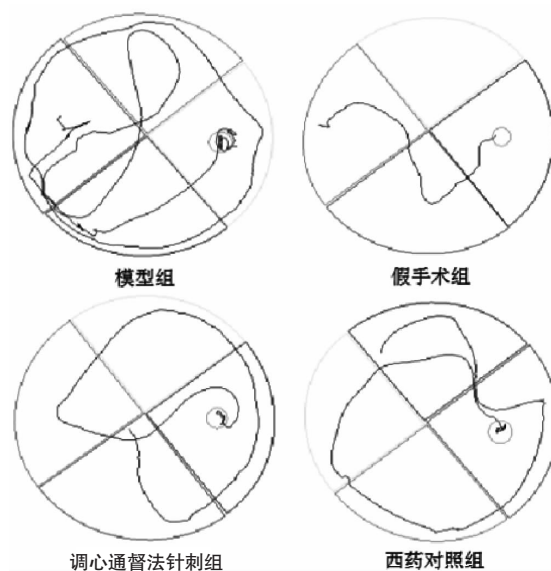


图 1 各组大鼠 Morris 水迷宫运动轨迹



表1 各组大鼠 Morris 水迷宫逃避潜伏期比较 ( $\bar{x}\pm s$ , s)

组别	n	造模前	造模后	治疗后
假手术组	6	24.67±4.54	22.46±4.35	19.50±5.10
模型组	6	25.28±5.41	49.52±6.61 <sup>○○△△</sup>	55.58±6.03 <sup>○○△△</sup>
西药对照组	6	28.06±5.92	49.99±3.75 <sup>○○△△</sup>	29.03±7.13 <sup>●●○○▲▲</sup>
调心通督法针刺组	6	26.37±6.30	51.14±6.57 <sup>○○△△</sup>	31.51±3.61 <sup>●●○○▲▲</sup>

注:与假手术组相比,○○ $P<0.01$ ;与模型组比较,●● $P<0.01$ ;与造模前相比,△△ $P<0.01$ ;与造模后相比,▲▲ $P<0.01$

## 2.2 空间探索实验-穿越平台次数

组间比较:造模前,各组大鼠穿越平台次数差异无统计学意义( $P>0.05$ )。造模后,与假手术组比较,各组大鼠穿越原平台次数明显减少( $P<0.01$ )。治疗后,与模型组相比,西药对照组、调心通督法针刺组穿越原平台次数增加,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),与西药对照组比较,调心通督法针刺组差异无统计学意义( $P>0.05$ )。组内比较:假手术组造模前、造模后及治疗后两两比较差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。与造模前比较,造模后与治疗后模型组穿越原平台次数明显减少( $P<0.01$ );与造模后比较,治疗后模型组穿越原平台次数差异无统计学意义( $P>0.05$ )。与造模前比较,造模后西药对照组、调心通督法针刺组穿越原平台次数明显减少( $P<0.05$ ),治疗后西药对照组、调心通督法针刺组穿越原平台次数差异无统计学意义( $P>0.05$ );与造模后比较,西药对照组、调心通督法针刺组穿越原平台次数增加,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。见表2。

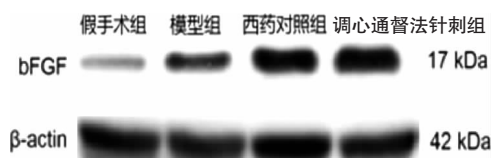
表2 各组大鼠 Morris 水迷宫穿越平台次数比较 ( $\bar{x}\pm s$ , 次)

组别	n	造模前	造模后	治疗后
假手术组	6	5.00±0.58	5.17±0.60	5.67±0.49
模型组	6	5.17±0.60	2.33±0.61 <sup>○○△△</sup>	2.50±0.50 <sup>○○△△</sup>
西药对照组	6	4.83±0.87	2.17±0.60 <sup>○○△△</sup>	4.33±0.42 <sup>●●</sup>
调心通督法针刺组	6	5.00±0.73	2.00±0.58 <sup>○○△△</sup>	4.33±0.49 <sup>●●</sup>

注:与假手术组相比,○○ $P<0.01$ ;与模型组比较,●● $P<0.05$ ;与造模前相比,△△ $P<0.01$ ,△ $P<0.05$ ;与造模后相比,▲▲ $P<0.05$

## 2.3 各组大鼠海马区 bFGF 蛋白的表达情况

与假手术组比较,造模组大鼠海马区 bFGF 蛋白表达明显增加( $P<0.01$ );与模型组比较,西药对照组、调心通督法针刺组海马 bFGF 蛋白表达均明显增高( $P<0.05$  或  $P<0.01$ );西药对照组与调心通督法针刺组比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )。见图2、表3。

图2 各组大鼠海马区 bFGF、 $\beta$ -actin 蛋白表达电泳图表3 各组大鼠海马内 bFGF 蛋白表达的比较 ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	n	bFGF
假手术组	6	0.13±0.03
模型组	6	0.40±0.10 <sup>△△</sup>
西药对照组	6	0.63±0.16 <sup>△△○○</sup>
调心通督法针刺组	6	0.55±0.08 <sup>△△○○</sup>

注:与假手术组相比,△△ $P<0.01$ ;与模型组相比,○○ $P<0.05$ ,○○ $P<0.01$

## 3 讨论

中医古籍中血管性痴呆多属于“痴呆”“呆病”的范畴,其病位在脑,头为“清阳之腑”,脏腑之精血清气皆上注入脑,而督脉的循行与其密切相关。心为“君主之官”,因心包络作为脂膜护卫心于外,说明心包经协助心经完成心主血脉、主神明之功。因此心包代心受邪,故治疗以心包经与督脉为主。“调心通督”法为名老中医严洁教授多年来的临床和科研实践总结,以督脉上“百会”“神庭”“大椎”“风府”“水沟”“命门”,配以心包经上“内关”“大陵”“劳宫”等穴,达到醒脑开窍、清利头目、平衡阴阳等作用,其临床疗效显著。

本研究实验发现,造模后与假手术组比较,各组大鼠平均逃避潜伏期时间明显增加,且找到平台次数明显减少,说明造模组耗时长,学习记忆能力下降,提示 VD 大鼠模型制备成功。治疗后与模型组相比,药物及针刺组平均逃避潜伏期明显缩短,穿越原平台次数增加,与西药对照组比较,调心通督法针刺组差异不显著,提示西药、针刺均能明显改善 VD 大鼠的学习记忆能力,且治疗效果旗鼓相当。组内间与造模后比较,治疗后调心通督法针刺组平均逃避潜伏期缩短,穿越原平台次数增加,说明调心通督法治疗 VD 大鼠疗效肯定。bFGF 是最为有效的血管生长因子之一,可增强内皮细胞黏附迁移、分裂增殖、促进血管新生。大量实验研究表明<sup>[16-17]</sup>bFGF 是血管发生的启动因子,能修复毛细血管,使血管得以再生或重塑,并能刺激 VEGF 的增殖,上调血管内皮细胞生

长因子发挥作用<sup>[18-20]</sup>,共同促进血管生成。与假手术组比较,造模组大鼠海马区 bFGF 蛋白表达明显增加;与模型组比较,西药对照组、调心通督法针刺组海马 bFGF 蛋白表达均明显增高,有显著性差异,但两组差异无统计学意义。本实验说明调心通督法可促进 VD 大鼠海马区 bFGF 蛋白的表达,从而实现血管的修复与再生,提高其学习记忆能力。

综上所述,调心通督法针刺 VD 大鼠可以改善其学习记忆能力可能与增加海马区 bFGF 蛋白表达有关。它作为具有中医特色的针刺疗法,不仅得到验证其临床疗效好,且相比目前其它治疗其不良反应小、安全性高,具备多方面临床治疗优势。本实验从动物实验研究调心通督法治疗 VD 的作用机制,以便更好的为临床针刺治疗 VD 提供客观的实验依据,值得加快推广应用。

## 参考文献

- [1] MANES F. The huge burden of dementia in Latin America[J]. *The Lancet Neurology*,2016,15(1):29.
- [2] 任晨斌,伍大华,张发友,等.滋肾活血方对血管性痴呆大鼠学习记忆能力和海马形态学的影响[J].*湖南中医药大学学报*,2017,37(10):1082-1085.
- [3] 李 涛,田桂杰,韩景献.血管性痴呆的中西医结合临床研究现状与展望[J].*中西医结合心脑血管病杂志*,2008,6(3):333-336.
- [4] 谭 涛,任 珍,覃佐爱,等.调心通督法治疗血管性痴呆的临床研究[J].*中医药报*,2017,23(4):66-68.
- [5] 边双义,孟艺哲,冯建伟.丹龙醒脑汤对 MCAO 模型大鼠血管新生及 bFGF 蛋白、Ang-1 蛋白表达的影响[J].*四川中医*,2017,35(5):69-71.
- [6] 沈丹萍,戈东辉,陈显达,等.bFGF 通过促进心脏血管新生改善心肌梗死后小鼠心脏重构[J].*中国病理生理杂志*,2018,34(1):47-51.
- [7] LIU Q, HUANG Y, LAN Y, et al. Acceleration of skin regeneration in full-thickness burns by incorporation of bFGF-loaded alginate microspheres into a CMCS-PVA hydrogel [J]. *Journal of Tissue Engineering & Regenerative Medicine*,2017,11(5):1562.
- [8] RUI L, JIANFENG M, YANGING W, et al. Dual Delivery of NGF and bFGF Coacervator Ameliorates Diabetic Peripheral Neuropathy via Inhibiting Schwann Cells Apoptosis [J]. *International Journal of Biological Sciences*,2017,13(5):640-651.
- [9] ZBINDEN A, BROWNE S, ALTIOK E I, et al. Multivalent conjugates of basic fibroblast growth factor enhance in vitro proliferation and migration of endothelial cells [J]. *Biomaterials Science*,2018, 6(5):1076-1083.
- [10] 陈倩倩. 针灸通督法对缺血性脑卒中患者 BFGF、VEGF 的干预作用研究[D].合肥:安徽中医药大学,2014.
- [11] 唐 强,姜云飞,朱路文,等.针康法对局灶性脑缺血大鼠神经功能缺损及缺血区碱性成纤维细胞生长因子、血管抑制素蛋白表达的影响[J].*中国康复理论与实践*,2015,21(10):1151-1155.
- [12] 王亚军,方晓丽,黄春换,等.子午流注纳甲法对局灶性脑缺血模型大鼠脑区 NSE、NGF、bFGF 的影响[J].*中国中医基础医学杂志*,2017,23(1):63-67.
- [13] 谭 洁,韩国栋,张 泓,等.改良大鼠双侧颈总动脉结扎方式建立血管性痴呆模型的评价研究[J].*中国康复医学杂志*,2017,32(3):264-268.
- [14] 郑先振,马光瑜,林珏龙.纳洛酮对血管性痴呆大鼠学习记忆和海马神经细胞内钙离子的影响[J].*中国新药与临床杂志*,2005,24(3):185-188.
- [15] 方 松,余化霖.Morris 水迷宫实验中海马相关空间学习记忆的研究进展[J].*国际病理科学与临床杂志*,2010,30(4):321-326.
- [16] SALEHI A, ZHANG J H, OBENAUS A. Response of the cerebral vasculature following traumatic braininjury[J]. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 2017,37(7):2320-2339.
- [17] WANG Z G, CHENG Y, YU X C, et al. bFGF protects against blood-brain barrier damage through junction protein regulation via pi3k-akt-rac1 pathway following traumatic brain injury[J]. *Molecular Neurobiology*, 2015,53(10):1-14.
- [18] LIU Q, HUANG Y, LAN Y, et al. Acceleration of skin regeneration in full-thickness burns by incorporation of bFGF-loaded alginate microspheres into a CMCS-PVA hydrogel[J]. *Journal of Tissue Engineering & Regenerative Medicine*, 2017, 11(5):1562-1573.
- [19] LI W, LAN Y, GUO R, et al. In vitro and in vivo evaluation of a novel collagen/cellulose nanocrystals scaffold for achieving the sustained release of basic fibroblast growth factor[J]. *Journal of Biomaterials Applications*,2015,29(6):882-893.
- [20] ZHANG X, ZHU D, WEI L, et al. OSM Enhances Angiogenesis and Improves Cardiac Function after Myocardia Infarction[J]. *Biomed Research International*, 2015,2015:317905.

(本文编辑 匡静之)