

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.20.003

电针对术后认知功能障碍大鼠认知功能及海马 $\alpha 7$ nAChR 受体表达的影响*

周玉弟 张 杰 田伟千 崔耀梅 解 珂[△]

(南京中医药大学附属医院(江苏省中医院)麻醉科 江苏 南京 210029)

摘要 目的:探讨电针对术后认知功能障碍大鼠认知功能及海马 $\alpha 7$ 型神经烟碱胆碱能受体(nicotinic acetylcholine receptor, $\alpha 7$ nAChR)表达含量的影响。**方法:**选择 120 只雄性 SD 大鼠, 将其随机分为以下 5 组: 对照组 (Ctrl 组)、手术组 (Op 组)、电针组(EA)、 $\alpha 7$ nAChR 抑制剂 (EA+ α -BGT)组、 $\alpha 7$ nAChR 激动剂 (PHA-543,613 组), 每组 12 只, 每组又分为 1 d 和 3 d 两个亚组。采用 Morris 水迷宫检测认知功能, ELISA 检测血清肿瘤坏死因子(Tumor necrosis factor, TNF)和白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、高迁移率族蛋白 1(High mobility group box 1, HMGB-1)含量, RT-PCR 检测海马 TNF- α 和 IL-1 β 、HMGB-1 m-RNA 表达, 蛋白印迹法检测海马 $\alpha 7$ nAChR 表达, 甲苯胺蓝法检测海马 CA1 区肥大细胞活化情况, Tunel 法检测海马 CA1 区细胞凋亡情况。**结果:**与 Op 组相比, EA 组、PHA-543,613 组术后第 1 d、第 3 d 逃避潜伏期显著缩短, 穿越平台次数增加 ($P<0.05$); 与 EA 组相比, EA+ α -BGT 组术后第 1 d、第 3 d 逃避潜伏期显著延长, 穿越平台次数明显减少 ($P<0.05$)。与 Op 组相比, EA 组、PHA-543,613 组术后第 1 d、第 3 d 血清 TNF- α 和 IL-1 β 、HMGB-1 含量显著降低, 海马 TNF- α 和 IL-1 β 、HMGB-1 m-RNA 表达亦明显下调, 海马 $\alpha 7$ nAChR 蛋白含量表达上调、海马 CA1 区肥大细胞活化数目、Tunel 阳性细胞数目减少, 两组比较差异有统计学意义 ($P<0.05$)。与 EA 组相比, EA+ α -BGT 组大鼠术后第 1 d、第 3 d 血清 TNF- α 和 IL-1 β 、HMGB-1 含量增加, 海马 TNF- α 和 IL-1 β 、HMGB-1 m-RNA 表达亦明显上调, 海马 $\alpha 7$ nAChR 蛋白表达上调, 海马 CA1 区肥大细胞活化数目、Tunel 阳性细胞数目亦明显增加 ($P<0.05$)。**结论:**电针可能通过抑制中枢肥大细胞活化, 上调脑内 $\alpha 7$ nAChR 蛋白表达, 抑制 TNF- α 和 IL-1 β 、HMGB-1 表达和释放, 进而改善胫骨骨折术后大鼠学习与记忆能力。

关键词:电针; 术后认知功能障碍; $\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体

中图分类号:R-33; R683.42; R245 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2020)20-3815-07

Effect of Electroacupuncture on the Cognitive Function and Expression of $\alpha 7$ nAChR Receptor in the Hippocampus of Rats with Postoperative Cognitive Dysfunction*

ZHOU Yu-di, ZHANG Jie, TIAN Wei-qian, CUI Yao-mei, XIE Ke[△]

(Department of Anesthesiology, Affiliated hospital, Nanjing Medical University of TCM, Nanjing, Jiangsu, 210029, China)

ABSTRACT Objective: To observe the effects of electroacupuncture on cognitive function and hippocampal $\alpha 7$ nAChR expression in rats with postoperative cognitive function. **Methods:** 120 male SD rats were selected and randomly divided into 5 groups: control group (Ctrl group), operation group (Op group), electroacupuncture group (EA), $\alpha 7$ nAChR inhibitor (EA + α -BGT) group, $\alpha 7$ nAChR agonist (PHA-543,613 group), 12 in each group. Each group was divided into two subgroups for 1 day and 3 days. Morris water maze was used to detect cognitive function, ELISA to detect serum TNF- α and IL-1 β , HMGB-1 levels, RT-PCR to detect hippocampal TNF- α and IL-1 β HMGB-1 m-RNA, Western blotting to detect hippocampal $\alpha 7$ nAChR protein expression, toluidine blue method to detect hippocampal CA1 region mast cell activation number. Tunel method to detect cell apoptosis in hippocampal CA1 area. **Results:** Compared with the Op group, the EA group, PHA-543,613 group had significantly shorter escape latency on the 1st and 3rd day after surgery, and increased the number of platform crossings ($P<0.05$). Compared with the EA group, the EA+ α -BGT group on the 1st and 3rd day after surgery, the escape latency was significantly extended, and the number of crossing platforms was significantly reduced ($P<0.05$). Compared with the Op group, the levels of serum TNF- α , IL-1 β and HMGB-1 in the EA group, PHA-543,613 group decreased significantly on the 1st and 3rd day after operation, and the hippocampal TNF- α , IL-1 β and HMGB-1 m-RNA expression was also significantly down-regulated, hippocampal $\alpha 7$ nAChR protein expression was up-regulated, the number of activated mast cells in hippocampal CA1 area, and the number of Tunel-positive cells decreased. The difference between the two groups was statistically significant ($P<0.05$). Compared with the EA group, the levels of serum TNF- α , IL-1 β and HMGB-1 in the EA + α -BGT group increased on the 1st and 3rd

* 基金项目:国家自然科学基金项目(NSFC 81673741)

作者简介:周玉弟(1983-),男,硕士,副主任医师,研究方向:脑保护,电话:18114704198, E-mail: guloulanwtt@163.com

[△] 通讯作者:解珂(1979-),男,硕士,副主任医师,研究方向:临床麻醉,电话:13951713595, E-mail: jackodin@sina.com

(收稿日期:2020-05-29 接受日期:2020-06-25)

day after operation. The m-RNA expression of TNF- α , IL-1 β and HMGB-1 in the hippocampus was also significantly up-regulated, the expression of α 7nAChR protein in the hippocampus was up-regulated, and the number of activated mast cells and number of TUNEL positive cells in the hippocampal CA1 area also increased significantly ($P < 0.05$). **Conclusion:** Electroacupuncture may inhibit the activation of central mast cells, up-regulate the expression of α 7nAChR protein in the brain, inhibit the expression and release of TNF- α , IL-1 β , and HMGB-1, thereby improving the learning and memory ability of rats after tibial fracture.

Key words: Electroacupuncture; Postoperative cognitive dysfunction; α 7nAChR

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R683.42; R245 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2020)20-3815-07

前言

术后认知功能障碍 (postoperative cognitive dysfunction, POCD) 是患者在麻醉、手术后常见的中枢神经系统并发症之一,在老年患者中有较高的发生率^[1]。研究表明手术的应激反应可造成机体的中枢神经系统发生级联炎症反应,是 POCD 发生的重要机制^[2,3]。以往的研究表明电针预处理可以通过激活体内的胆碱能抗炎通路,在 LPS 刺激脓毒症小鼠发挥明显抗炎作用,提高小鼠的生存率^[4,5]。此外,电针刺激能减轻非手术创伤大鼠脑组织炎症反应,改善学习记忆能力,但其对于手术创伤大鼠的影响尚不完全明确。 α 7nAChR 受体作为 nAChR 中枢神经系统分布较多的亚型之一,在改善认知功能和空间学习中发挥着重要作用^[6],研究显示随着大鼠认知功能的进行性减退 α 7nAChR 也逐渐减少^[7]。本研究采用胫骨骨折手术模型建立 POCD 模型,主要探讨了电针对 POCD 大鼠的认知功能以及海马 α 7nAChR 受体表达的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物

雄性 SD 大鼠购自南京中医药大学实验动物中心,体重 200~250 g,分笼饲养,每笼 5 只,喂养标准饲料,自由饮水,室温 $22 \pm 1^\circ\text{C}$,湿度 50%~60%,自然的昼夜规律。本研究经南京中医药大学实验动物伦理委员会同意。

1.2 实验方法

1.2.1 侧脑室立体定位置管和注射 ① 采用 40 mg/kg (10%) 水合氯醛腹腔注射麻醉大鼠。② 待翻正反射消失后,将其俯卧位固定在脑立体定位仪上。③ 剪去头顶部毛发,碘酊消毒,切开皮肤,暴露骨面的前囟。以前囟为零点,对定位仪校零。④ 确定右侧侧脑室的位置。前囟中线旁开 1.5 mm,向后 0.8 mm,深 3.7 mm。用牙科钻钻开颅骨,挑破硬脑膜,置入套管针,用不锈钢螺钉和牙科水泥固定,缝合皮肤。术后单笼饲养,由同一实验者喂食,检查套管针。⑤ 1 w 后,经套管针给药,给予 α -BGT,30 min 后进行胫骨骨折手术模型制备。用药剂量为:2 μL (0.05 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)。给药 5 min 后,将注射针从大鼠大脑中缓慢退出。

1.2.2 实验动物分组 将 120 只 SD 大鼠随机分为 5 组:对照组 (Ctrl 组)、手术组 (Op 组)、电针组 (EA)、 α 7nAChR 抑制剂 (EA+ α -BGT) 组、 α 7nAChR 激动剂 (PHA-543,613 组),每组 12 只。对照组不给予任何操作;手术组为胫骨骨折手术模型;EA 组在麻醉后连续电针 5 d,末次电针后 24 h 行胫骨骨折手术模型, α 7nAChR 抑制剂 (EA+ α -BGT) 组为麻醉后侧脑室置管,3 d 后开始电针,连续 5 d,每次电针前 30 min 侧脑室注射 α -BGT:

0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$,药液 0.05 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (2 μL),末次注射后 24 h 行胫骨骨折手术模型;PHA-543,613 组:1.0 mg/kg 的 PHA-543,613 连续 5 d 腹腔注射,药液浓度 0.2 mg/mL,末次注射后 24 h 行胫骨骨折手术模型,每组分别于手术后 1 d 或 3 d 后,进行行为学测试之后处死。

1.2.3 胫骨骨折手术模型的制备 采用 10% 水合氯醛麻醉 (40 mg/kg,腹腔注射),待大鼠睫毛反射消失,对疼痛刺激没有反应后,在无菌条件下行胫骨骨折手术。先将大鼠仰卧位固定,之后剃除左下肢胫骨表面的毛发,后以 10% 碘伏和 75% 酒精消毒表面皮肤,用手术刀划出约 1.5 cm 的切口,暴露胫骨下段,镊子分离软组织,剥除该胫骨周围骨膜。采用无菌性 20 G 注射器针头从胫骨髓腔刺入,远端到达骨质,随后剪断针尖和针尾,最后截断胫骨。冲洗伤口后缝合,结束麻醉。待大鼠自然苏醒,各组大鼠均给与镇痛药丁丙诺啡 (皮下注射 0.1 mg/kg) 予以止痛,整个过程使用温毯维持其直肠温度 $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 。

1.2.4 电针预处理 10% 水合氯醛麻醉 (40 mg/kg,腹腔注射) 下,定位大鼠 "百会穴",经皮向前插入针灸针 (0.25 mm $\times$ 13 mm),深度约 6 mm。连接电针治疗仪,设定参数:2/15 Hz 疏密波,电流强度 1 mA,持续时间 30 min,连续刺激 5 d。大鼠耳微颤代表刺激成功。电针预处理期间,给予 100% 氧气吸入,维持肛温于 $37.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 。

1.2.5 样本制备 各组大鼠在各亚组时间点术后第 1 d 和第 3 d 在 10% 水合氯醛麻醉 (40 mg/kg,腹腔注射) 下,待大鼠对疼痛不任何刺激反应,开腹后从下腔静脉处用 2 mL 注射器取血,血液放置离心管中,置于室温下静置 30 min,便于凝固。然后将血液于 4°C 离心 10 min (2,000 rpm),吸取上清即血清,然后编号分装。抽取血液后将大鼠翻转,后将大鼠断头处死,迅速取出脑组织,分离海马组织。所有的组织在检测前均保存在 -80°C 。

1.3 观察指标

1.3.1 行为学测定 Morris 水迷宫实验:室温、水温保持 $24 \sim 26^\circ\text{C}$ 。安置与电脑系统连接的摄像机,同步记录。术前水迷宫训练 5 d,4 次/d。定位巡航实验:大鼠放于离平台最远的象限 1/2 弧度的水中,观察找平台情况,记为潜伏期 (设定最长游动时间为 90 s)。空间探索实验:撤除平台,在平台相对的象限中点为入水点,记录 90 s 内老龄大鼠搜索平台,穿过平台区的次数。能连续 3 次在 90 s 内从起始点找到平台,作为训练成功的大鼠,进入后面的试验。分别记录术后 1 d、3 d 老龄大鼠的逃避潜伏期及穿越平台次数。

1.3.2 TNF- α 和 IL-1 β 、HMGB-1 含量 采用 ELISA 检测大鼠术后 1 d、3 d 血清 TNF- α 和 IL-1 β 、HMGB-1 含量,严格按照试剂盒说明进行操作 (华美生物)。RT-PCR 检测大鼠术后 1 d、3

d 海马 TNF- α 和 IL-1 β /HMGB-1 mRNA 表达。取出冻存海马组织 20 mg,在研磨器中研磨裂解后,离心。脑组织总 RNA 的提取严格按照试剂盒说明进行,所提总 RNA 经核酸测定仪测定样品 RNA 含量和纯度。根据总 RNA 的含量逆转录为 cDNA,以此 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,引物由苏州金唯智科技有限公司提供(基因引物序列列表),反应条件如下:先 95℃ 预变性 5 min,后 95℃ 变性 15 s,57℃ 退火 30 s,60℃ 延伸 60 s,总共 40 个循环。由扩增曲线得到 Ct 值,即每个反应管内的荧光信号到达设定的阈值时所经历的循环数。采用 $\Delta\Delta Ct$ 法进行相对定量(定量公式为: $Q=2^{-\Delta\Delta Ct}$)。

表 1 基因引物序列表

Table 1 Gene primer sequence list

Gene	Primer
GAPDH-F	AGTGCCAGCCTCGTCTCATA
GAPDH-R	GGTAACCAGGCGTCCGATAC
TNF- α -F	CCGAGATGTGGAAGTGGCAGAG
TNF- α -R	CCACGAGCAGGAATGAGAAGAGG
IL-1 β -F	CAGCTTTCGACAGTGAGGAGA
IL-1 β -R	TTGTCGAGATGCTGCTGTGA

1.3.3 α 7nAChR 蛋白表达 Western Blot 定量检测鼠术后 1 d、3 d 海马 α 7nAChR 蛋白定量表达情况。取出冻存海马组织,在研磨器中研磨裂解后,离心,BCA 法测定蛋白浓度,取 50 μ g 样品蛋白。10 % SDS-PAGE 电泳,随后转移至 PVDF 膜上。室温封闭 2 h,分别用 α 7nAChR(1:10000,abcam 公司)和 β -actin(1:8000,武汉博士德公司)一抗孵育,4℃ 过夜,加入相应二抗(1:5000)室温 1 h。将 PDVF 膜置于图像扫描仪上,避光配置显色液并覆盖 PVDF 膜,反应 1 min,使用 Gel-Pro 32 软件对结果进行灰度分析。

1.3.4 大鼠术后第 3 d 海马 CA1 区肥大细胞甲苯胺蓝染色和计数 取脑组织石蜡切片,先进行脱蜡、PBS 漂洗,将水化好的切片滴入 2 滴甲苯胺蓝工作液(北京索莱宝科技有限公司),浸

染 1~2 min 左右,用蒸馏水冲洗切片,分化:用 1 %冰醋酸将尼氏体分化至深蓝色,肥大细胞分化至细胞浆紫红色即可,随后进行烘片、封片。每只大鼠选取三张切片,光学显微镜(200 $\times$)视野下拍照海马 CA1 区 5 张,用 NIH ImageJ 软件(Bethesda, MD, USA)计数。单位以细胞数 /mm² 表示。

1.3.5 大鼠术后第 3 d 海马 CA1 区细胞凋亡 TUNEL 染色和计数 严格按照 TUNEL 试剂盒进行细胞凋亡检测(上海碧云天公司)。取脑组织石蜡切片,先进行脱蜡、PBS 漂洗,将水化好的切片,加入配制 Proteinase K 工作液:每个样本 90 μ L 加入 10 μ L 10 $\times$ Proteinase K,随后加入配制 3 % H₂O₂ 封闭液,样本片进行封闭处理;随后在加入 45 μ L Equilibration Buffer 加入 1 μ L Biotin-11-dUTP 和 4 μ L TDT Enzyme,PBS 洗 3 次,加入 49.5 μ L PBS 加入 0.5 μ L Streptavidin-HRP, PBS 浸洗 3 次之后切片滴加 50 μ L DAB 工作液,室温显色反应 30 s~5 min。显色后样本浸入 PBS 浸洗 3 min $\times$ 3 次,然后进行复染:在玻片上滴加 50~100 μ L 的苏木素染液,染色 10 min 左右,用蒸馏水冲洗掉多余染液,再浸入 0.1 % HCl 分化 5 s,蒸馏水冲洗。脱水封片,晾干后在切片上加中性树胶,进行封片。观察:每只大鼠选取三张切片,用光学显微镜(200 $\times$)视野下拍照 5 张,并用 NIH ImageJ 软件(Bethesda, MD, USA)进行细胞计数,单位为细胞数 /mm²。光学显微镜下观察组织海马 CA1 区 Tunel 染色阳性细胞,每只大鼠选取三张切片,用光学显微镜(200 $\times$)视野下拍照 15 张,计数同 1.3.4。

1.4 统计学处理

应用 SPSS 20.0 进行数据分析,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较用方差分析,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 各组行为学检测结果的比较

与 Op 组相比,EA 组、PHA-543,613 组术后第 1 d、第 3 d 逃避潜伏期显著缩短,穿越平台次数明显增加;与 EA 组相比,EA+ α -BGT 组术后第 1 d、第 3 d 逃避潜伏期明显延长,穿越平台次数显著减少($P < 0.05$),见表 2。

表 2 各组大鼠行为学结果的比较

Table 2 Comparison of determination results of rats between different groups

Index	Group	1 d postoperatively	3 d postoperatively
Evasion latency (S)	Ctrl group	12 $\pm$ 3	11 $\pm$ 2
	Op group	33 $\pm$ 5*	27 $\pm$ 6*
	EA group	22 $\pm$ 4**	17 $\pm$ 3**
	EA+ α -BGT group	27 $\pm$ 6**	24 $\pm$ 3**
	PHA-543,613 group	20 $\pm$ 4**	16 $\pm$ 3**
Number of crossings (times)	Ctrl group	4.6 $\pm$ 0.8	4.8 $\pm$ 0.8
	Op group	2.6 $\pm$ 0.4*	2.8 $\pm$ 0.5 *
	EA group	3.6 $\pm$ 0.6**	3.8 $\pm$ 0.5**
	EA+ α -BGT group	2.9 $\pm$ 0.5**	3.0 $\pm$ 0.6**
	PHA-543,613 group	3.7 $\pm$ 0.7**	3.6 $\pm$ 0.4**

Note: * $P < 0.05$, compared with Ctrl group, ** $P < 0.05$, compared with Op group, ** $P < 0.05$, compared with EA group.

2.2 各组大鼠血清 TNF- α 、IL-1 β 和 HMGB-1 含量的变化比较
与 Op 组比较,EA 组、PHA-543,613 术后 1 d、3 d 血清 TNF- α 、IL-1 β 和 HMGB-1 含量明显降低($P<0.05$);与 EA 组比

较,EA+ α -BGT 组术后 1 d、3 d 血清 TNF- α 和 IL-1 β 含量明显升高 ($P<0.05$);与 EA 组比较,EA+ α -BGT 组术后 3 d 血清 HMGB-1 含量明显升高($P<0.05$),见图 1。

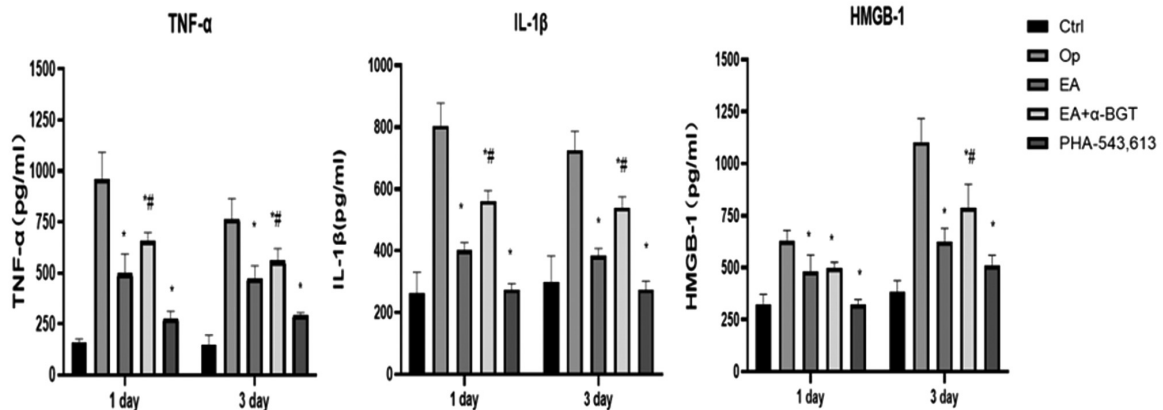


图 1 各组大鼠血清 TNF- α 和 IL-1 β 、HMGB-1 含量的变化比较

Fig.1 Comparison of changes of serum TNF- α , IL-1 β and HMGB-1 levels between different groups

Note: * $P<0.05$ compared with Op group, # $P<0.05$ compared with EA group.

2.3 各组大鼠海马 TNF- α 和 IL-1 β 、HMGB-1 mRNA 表达的比
较
与 Op 组比较,EA 组、PHA-543,613 术后 1 d、3 d 海马的

TNF- α 、IL-1 β 和 HMGB-1 mRNA 表达明显降低 ($P<0.05$);与 EA 组比较,EA+ α -BGT 组术后 1 d、3 d 海马的 TNF- α 、IL-1 β 和 HMGB-1 mRNA 表达明显升高($P<0.05$),见图 2。

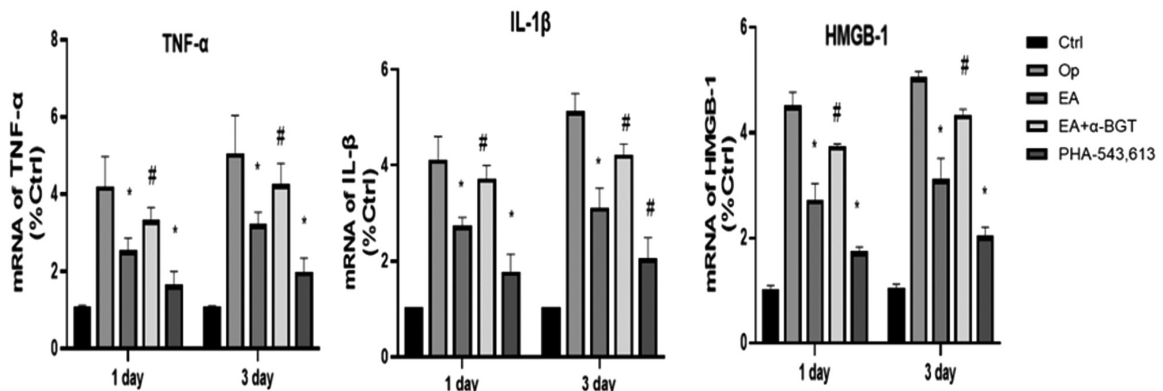


图 2 各组大鼠海马 TNF- α 和 IL-1 β 、HMGB-1m RNA 表达的比较

Fig.2 Comparison of the expression of TNF- α , IL-1 β and HMGB-1m RNA in the hippocampus of rats between different groups

Note: * $P<0.05$ compared with Op group, # $P<0.05$ compared with EA group.

2.4 各组大鼠海马 α 7nAChR 蛋白表达的比较

胫骨骨折手术后,与 Op 组比较,EA 组、PHA-543,613 组海马 α 7nAChR 表达明显上调 ($P<0.05$);与 EA 组比较,EA+ α -BGT 组海马 α 7nAChR 表达明显下调($P<0.05$),见图3。

2.5 各组大鼠术后第 3 d 海马 CA1 区肥大细胞活化的比较

对照组海马 CA1 区几乎无甲苯胺蓝染色阳性细胞,OP 组术后第 3 d 海马 CA1 区活肥大细胞明显增多,与 OP 组比较,EA 组、PHA-543,613 组术后第 3 d 活肥大细胞显著减少 ($P<0.05$),见图 4;与 EA 组比较,EA+ α -BGT 组术后第 3 d 活肥大细胞显著增多($P<0.05$),见图 5。

2.6 各组大鼠术后第 3 d 海马 CA1 区细胞凋亡情况的比较

对照组海马 CA1 区几乎无 TUNEL 阳性细胞,OP 组术后第 3 d 海马 CA1 区活化 TUNEL 染色阳性细胞明显增多,与 OP 组比较,EA 组、PHA-543,613 组术后第 3 d 的 TUNEL 染色

阳性细胞明显减少($P<0.05$),见图 6;与 EA 组比较,EA+ α -BGT 组术后第 3 d 的 TUNEL 染色阳性细胞明显增多 ($P<0.05$),见图7。

3 讨论

POCD 是中枢神经系统术后并发症,多见于老年人^[8,9]。目前,POCD 模型较多,我们选用胫骨骨折手术模型,主要是考虑其应用广泛,操作简单,而且可控性很强,可以将模型标准化,减少模型之间的异质性^[10]。针灸是我国传统医学中治疗各种疾病的重要手段,如神经元退行性疾病,可以帮助患者提高生活质量,延缓认知功能的减退^[11,12]。电针是传统针灸和电刺激的结合,不仅继承了传统针灸的优势,还可将电刺激的生理效应相结合^[13],因此疗效比单纯针灸更加显著,这也是本研究选用电针作为研究手段的重要依据。中医中,百会穴位于颅骨的

最高点、经络汇聚的位置,针刺其可提神醒脑,促进机体功能恢复,因而被广泛用于神经精神疾病的首选穴位,本研究采用连

续电针针刺百会穴^[14,15]。

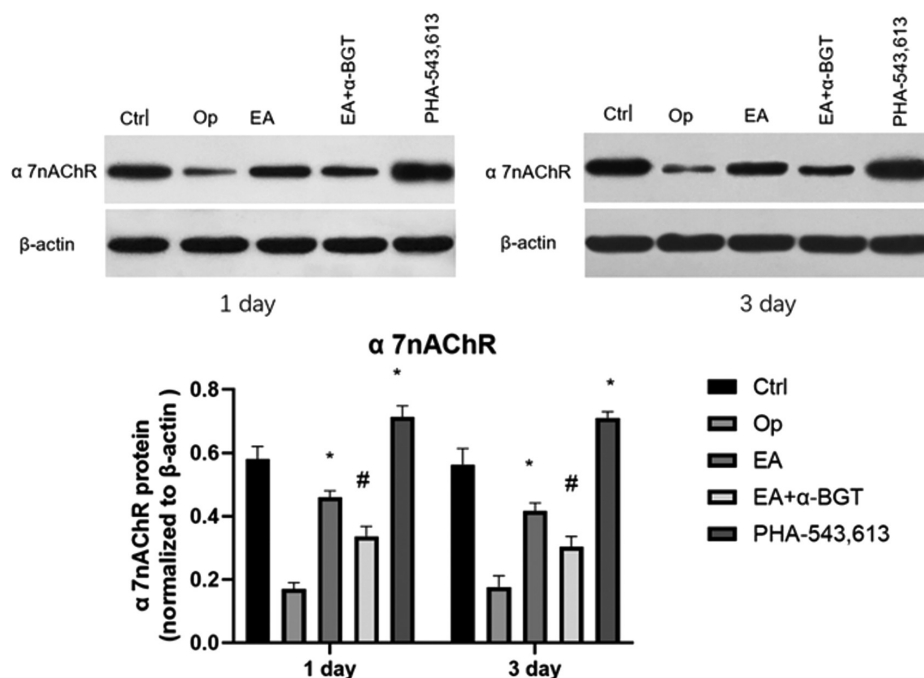


图3 各组大鼠海马 $\alpha 7nAChR$ 蛋白表达的比较

Fig.3 Comparison of the expression of $\alpha 7nAChR$ protein in the hippocampus of rats between different groups

Note: * $P < 0.05$ compared with Op group, # $P < 0.05$ compared with EA group.

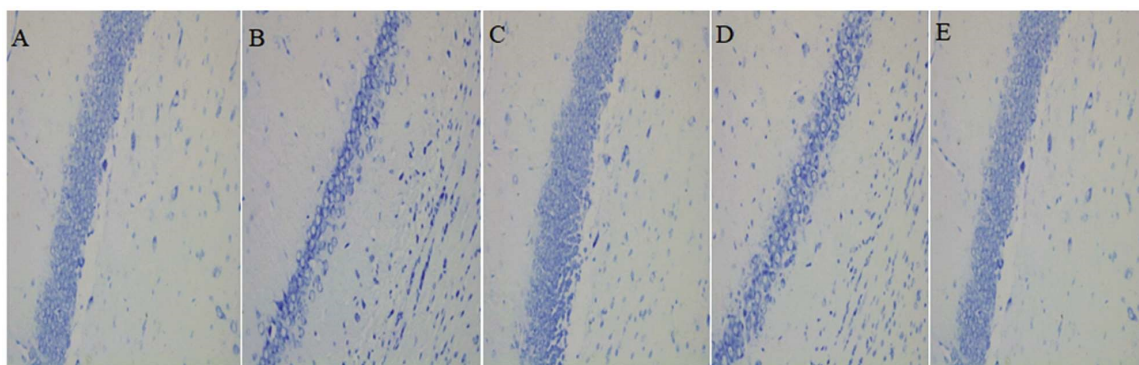


图4 各组大鼠海马 CA1 区肥大细胞甲苯胺蓝染色的比较

Fig.4 Comparison of the toluidine blue staining of mast cells in the hippocampus CA1 area of rats between different groups

Note: A: Ctrl group, B: Op group, C: EA group, D: EA + α -BGT group, E: PHA-543,613 group.

在过去的三十年中,尼古丁和其他作用于烟碱乙酰胆碱受体的配体作为控制炎症已有大量研究^[16]。这些受体在中枢和周围神经系统以及免疫细胞中广泛表达,在脑内尤其海马存在高表达,这也是本研究选择海马作为取材的重要原因。尽管在许多动物模型中使用许多非选择性 $\alpha 7nAChR$ 激动剂取得了令人鼓舞的结果,但人类研究显示这些激动剂大多副作用较多^[17]。近年来,由于化学药物的进展,选择性 $\alpha 7nAChR$ 激动剂表现出来很大的潜力^[18,19],其中 PHA-543,613 是一种高选择性 $\alpha 7nAChR$ 激动剂,因其为脂溶性,可透过 BBB,因此本研究采用腹腔注射; α -BGT 是 $\alpha 7nAChR$ 高选择性拮抗剂,其不易通过 BBB,故本实验前通过提前置入侧脑室管,通过侧脑室的方法给药,保证其脑内达到有效的血药浓度。

Morris 水迷宫实验是常用的测试学习记忆功能的手段,可

客观地反映动物的认知水平,将动物的学习障碍与感觉、运动缺陷分离^[20,21]。本研究中,与手术组相比,电针组、 $\alpha 7nAChR$ 激动剂(PHA-543,613)组逃避潜伏期明显缩短,穿越平台次数显著增加,提示其可改善大鼠术后学习与记忆能力。国内有研究学者发现^[22]在肝脏部分切除 POCD 模型中,给予电针预处理的老鼠大鼠术后 1 d、3 d 和 7 d 的逃避潜伏期明显缩短,并且跨平台时间减少,学习记忆能力改善明显,与我们本研究结果相似。

手术或麻醉引起的神经炎症是发生的主要因素,但炎症和 POCD 之间的具体关系仍然未知。在大鼠胫骨骨折模型中,手术创伤增加了大鼠海马肥大细胞活化数,与认知功能的损伤有关。而术前使用色甘酸钠预处理能抑制神经炎症,减轻学习记忆能力的损伤^[23,24]。多种啮齿动物手术模型显示外周组织和 CNS

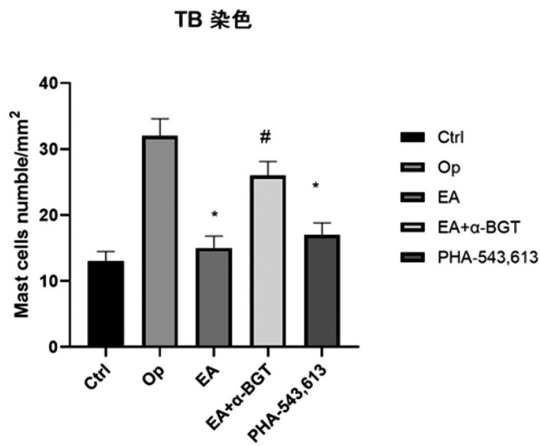


图5 各组大鼠海马CA1区活化肥大细胞的比较

Fig.5 Comparison of the activated mast cells in the hippocampus CA1 area of rats between different groups

Note: * $P < 0.05$ compared with Op group, # $P < 0.05$ compared with EA group.

中的促炎细胞因子和炎症介质均上调,其中 $\text{TNF-}\alpha$ 和 $\text{IL-1}\beta$ 已被证明能够加剧认知功能的受损^[25]。研究表明血浆 HMGB-1 水平与非心脏手术和非手术性炎症状态下的炎症水平相关^[26]。本研究表明与手术组相比,电针组、 $\alpha 7\text{nAChR}$ 激动剂 (PHA-543,613) 组大鼠外周血 $\text{TNF-}\alpha$ 和 $\text{IL-1}\beta$ 、HMGB-1 含量及海马 $\text{TNF-}\alpha$ 、 $\text{IL-1}\beta$ 、HMGB-1 mRNA 表达水平显著降低,海马 CA1 区活化肥大细胞数目减少,而给予 $\alpha 7\text{nAChR}$ 抑制剂 $\alpha\text{-BGT}$ 可以逆转电针对上述炎症介质抑制作用,提示电针可能通过抑制 $\alpha 7\text{nAChR}$,介导中枢和外周抗炎作用。此外,我们近期的研究结果表明外源性给予 HMGB-1 可以激活大鼠脑内肥大细胞的活化,此作用与 RAGE/NF- κB 信号通路的激活相关^[27,28]。

研究表明在认知功能障碍大鼠神经元内 nAChR 表达水平下降,其中亚基 $\alpha 7\text{nAChR}$ 主要参与感觉、认知、镇痛、递质释放和神经元的保护等多种作用,可以通过调节钙的活化及神经介质乙酰胆碱的释放调节神经功能^[29]。电针预处理可以通过激活体内的胆碱能抗炎通路,在 LPS 刺激脓毒症小鼠发挥明显抗炎

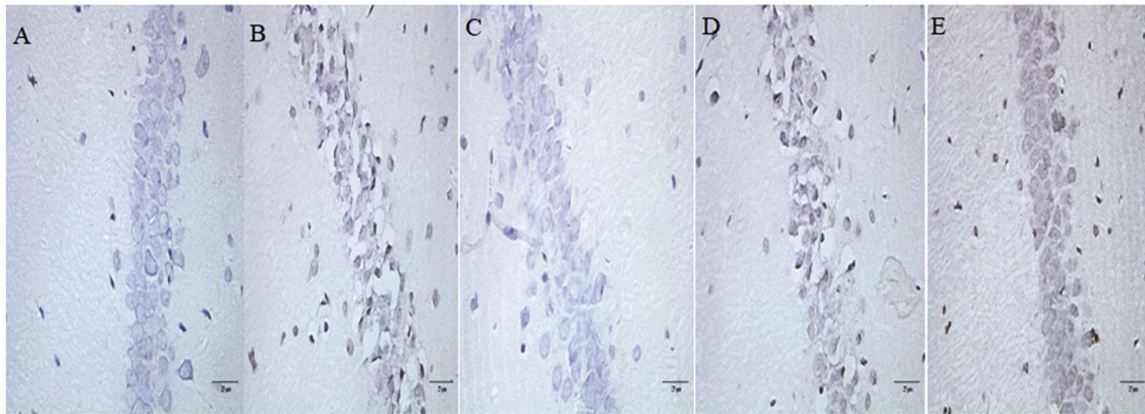


图6 各组大鼠海马CA1区细胞TUNEL染色的比较

Fig.6 Comparison of the TUNEL staining in hippocampal CA1 area of rats between different groups

Note: A: Ctrl group, B: Op group, C: EA group, D: EA + $\alpha\text{-BGT}$ group, E: PHA-543, 613 group.

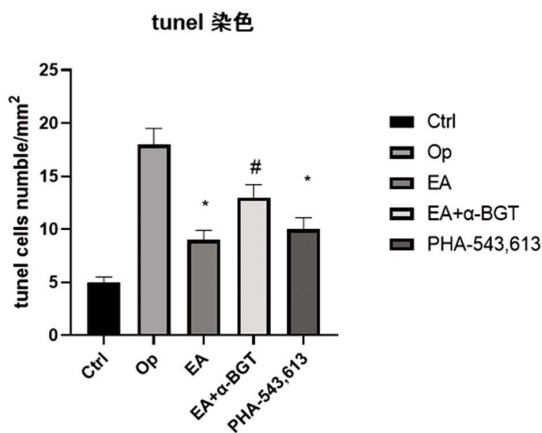


图7 各组大鼠海马CA1区细胞凋亡的比较

Fig.7 Comparison of the apoptosis in the hippocampus CA1 area of rats between different groups

Note: * $P < 0.05$ compared with Op group, # $P < 0.05$ compared with EA group.

蛋白表达显著上调,而给予 $\alpha 7\text{nAChR}$ 抑制剂 $\alpha\text{-BGT}$ 可以显著削弱电针对脑内海马 $\alpha 7\text{nAChR}$ 蛋白表达上调的作用。

综上所述,电针可能通过抑制中枢肥大细胞活化,上调脑内 $\alpha 7\text{nAChR}$ 蛋白表达,抑制 $\text{TNF-}\alpha$ 和 $\text{IL-1}\beta$ 、HMGB-1 表达和释放,进而改善胫骨骨折术后大鼠学习与记忆能力。

参考文献 (References)

- [1] Meier J, Wunschel M, Angermann A, et al. Influence of early elective tracheostomy on the incidence of postoperative complications in patients undergoing head and neck surgery [J]. Bmc Anesthesiology, 2019, 19(1): e43
- [2] Palmer J, Pandit V, Zeeshan M, et al. The Acute Inflammatory Response after Trauma is heightened by Frailty: A Prospective Evaluation of Inflammatory and Endocrine System Alterations in Frailty[J]. J Trauma Acute Care Surgery, 2019, 87: e256
- [3] Cao XZ, Ma H, Wang JK, et al. Postoperative cognitive deficits and neuroinflammation in the hippocampus triggered by surgical trauma are exacerbated in aged rats [J]. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2010, 34(8): 1426-1432
- [4] Jian-gang Song, Hong-hai Li, Yun-fei Cao, et al. Electroacupuncture

作用,提高小鼠的生存率^[30,31]。我们的研究显示与手术组相比,电针组、 $\alpha 7\text{nAChR}$ 激动剂 (PHA-543,613) 组脑内海马 $\alpha 7\text{nAChR}$

- Improves Survival in Rats with Lethal Endotoxemia via the Autonomic Nervous System [J]. *Anesthesiology*, 2012, 116 (2): 406-414
- [5] Zhang XF, Xiang SY, Geng WY, et al. Electro-acupuncture regulates the cholinergic anti-inflammatory pathway in a rat model of chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Journal of Integrative Medicine*, 2018, 16(6): 418-426
- [6] Zhou Y, Li C, Li R, et al. Exercise improves nicotine reward-associated cognitive behaviors and related $\alpha 7$ nAChR-mediated signal transduction in adolescent rats[J]. *J Cellular Physiology*, 2018, 233(8): 5756-5767
- [7] 吴振宇, 杨洋, 林夏妃, 等. 七氟烷对衰老模型大鼠认知功能及海马 $\alpha 7$ nAChR 的影响[J]. *医学研究生学报*, 2020, 33(4): 341-347
- [8] Green CM, Schaffer SD. Postoperative cognitive dysfunction in noncardiac surgery: A review [J]. *Trends Anaesthesia Critical Care*, 2018, 24: 40-48
- [9] Chenxi H, Johan M, Ismail G, et al. Exploring Postoperative Cognitive Dysfunction and Delirium in Noncardiac Surgery Using MRI: A Systematic Review[J]. *Neural Plasticity*, 2018, 2018: 1-12
- [10] Zhu YJ, Peng K, Meng XW, et al. Attenuation of neuroinflammation by dexmedetomidine is associated with activation of a cholinergic anti-inflammatory pathway in a rat tibial fracture model[J]. *Brain Res*, 2016, 1644(1): 1-8
- [11] Liu Y, Wang XJ, Wang N, et al. Electroacupuncture ameliorates propofol-induced cognitive impairment via an opioid receptor-independent mechanism [J]. *Am J Chin Med*, 2016, 44(4): 705-719
- [12] 栗凯迪, 高伟, 孙琦月, 等. 针灸治疗阿尔茨海默病的临床研究进展[J]. *针灸临床杂志*, 2019, 35(5): 83-86
- [13] Vitaly Napadow, Nikos Makris, Jing Liu, et al. Effects of electroacupuncture versus manual acupuncture on the human brain as measured by fMRI[J]. *Hum Brain Mapp*, 2005, 24(3): 193-205
- [14] Bombi Lee, Bongjun Sur, Jaegul Shim, et al. Acupuncture stimulation improves scopolamine-induced cognitive impairment via activation of cholinergic system and regulation of BDNF and CREB expressions in rats [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2014, 17(14): e338
- [15] 彭昌梅, 赵俊莺. 针刺百会穴对异氟醚吸入麻醉老年大鼠 POCD 影响及电生理机制分析[J]. *四川中医*, 2019, 12(5): 72-74
- [16] Dani JA, Bertrand D. Nicotinic Acetylcholine Receptors and Nicotinic Cholinergic Mechanisms of the Central Nervous System[J]. *Annual Review Pharmacology Toxicology*, 2007, 47(1): 699-729
- [17] Shytle RD, Mori T, Townsend K, et al. Cholinergic modulation of microglial activation by alpha 7 nicotinic receptors [J]. *J Neurochemistry*, 2004, 89(2): 337-343
- [18] Vallés, Ana Sofía, Borroni, María Virginia, Barrantes FJ. Targeting Brain $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptors in Alzheimer's Disease: Rationale and Current Status[J]. *Cns Drugs*, 2014, 28(11): 975-987
- [19] Yang He, Jingshan Shen. Aminobenzisoxazole compounds as agonists of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors: a patent evaluation [J]. *Expert Opin Ther Pat*, 2018, 28(5): 429-436
- [20] Lester Maxwell Gallivan, Neil Schmitzer-Torbert. A Low-Cost Morris Water Maze for Undergraduate Research: Construction and Demonstration in a Rat Model of Obesity-Induced Diabetes [J]. *J Undergrad Neurosci Educ*, 2018, 16(2): A143-A151
- [21] Higaki A, Mogi M, Iwanami J, et al. Predicting outcome of Morris water maze test in vascular dementia mouse model with deep learning [J]. *PLoS ONE*, 2018, 13(2): e0191708
- [22] Liu PR, Zhou Y, Zhang Y. Electroacupuncture alleviates surgery-induced cognitive dysfunction by increasing $\alpha 7$ -nAChR expression and inhibiting inflammatory pathway in aged rats [J]. *Neurosci Lett*, 2017, 659: 1-6
- [23] Zhang S, Dong H, Zhang X, et al. Cerebral mast cells contribute to postoperative cognitive dysfunction by promoting blood brain barrier disruption[J]. *Behav Brain Res*, 2016, 298(Pt B): 158-166
- [24] Shirai T, Shuai M, Nakamura K, et al. Chiral lyotropic chromonic liquid crystals composed of disodium cromoglycate doped with water-soluble chiral additives[J]. *Soft Matter*, 2018, 14(9): 1511-1516
- [25] Skvarc David R, Berk Michael, Byrne Linda K, et al. Post-Operative Cognitive Dysfunction: An exploration of the inflammatory hypothesis and novel therapies [J]. *Neuroscience Biobehavioral Reviews*, 2018, 84: 116-133
- [26] C Yoshihara-Hirata, K Yamashiro, T Yamamoto, et al. Anti-HMGB1 neutralizing antibody attenuates periodontal inflammation and bone resorption in a murine periodontitis model[J]. *Infect Immun*, 2018, 86 (5): e00111-e00118
- [27] Terrando Niccolò, Ting Y, Xueqin W, et al. Systemic HMGB1 Neutralization Prevents Postoperative Neurocognitive Dysfunction in Aged Rats[J]. *Frontiers in Immunology*, 2016, 7(1): e441
- [28] Qian Q, Zhang Q, Wang X, et al. Pro-inflammatory role of high-mobility group box-1 on brain mast cells via the RAGE/NF- κ B pathway[J]. *J Neurochem*, 2019, 151(5): 595-607
- [29] Zheng C, Gao LY, Zhang HH, et al. Electrophysiological phenotypes of synaptic transmission and neural network in hippocampal neurons of the $\alpha 7$ -nAChR knockout mice [J]. *Acta physiologica Sinica*, 2019, 71(2): 261-270
- [30] Wang Q, Wang F, Li X, et al. Electroacupuncture pretreatment attenuates cerebral ischemic injury through $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor-mediated inhibition of high-mobility group box 1 release in rats[J]. *J Neuroinflammation*, 2012, 9: e24
- [31] 王硕, 李丽娜, 齐文升, 等. 大肠经原合配穴电针治疗肺炎所致脓毒症的效果及其对胆碱能抗炎通路的影响研究[J]. *实用心脑血管病杂志*, 2018, 26(8): 74-77