

论著·基础研究

# 头针丛刺疗法对老年痴呆大鼠学习记忆能力及海马乙酰胆碱水平的影响<sup>▲</sup>

黄东挺<sup>1</sup> 夏猛<sup>2</sup> 庞声航<sup>3</sup> 卢琰琰<sup>1</sup> 黄洪<sup>1</sup> 熊进<sup>4</sup> 温静怡<sup>4</sup> 马玥<sup>4</sup>

(1 广西壮族自治区江滨医院针灸科,南宁市 530021,电子邮箱:1109010326@qq.com;

2 广西中医药大学基础医学院,南宁市 530200;3 广西壮族自治区工人医院老年医学科,

南宁市 530021;4 广西中医药大学研究生学院,南宁市 530001)

**【摘要】 目的** 观察头针丛刺疗法对老年痴呆大鼠学习记忆能力及海马组织乙酰胆碱(ACh)水平的影响。

**方法** 将32只大鼠随机分为正常组、假手术组、模型组、头针丛刺组各8只。模型组、头针丛刺组进行穹窿—海马伞损害以建立老年痴呆大鼠模型,假手术组打开颅骨但不给予穹窿—海马伞损害,正常组不给予处理。手术后第7天头针丛刺组给予头针丛刺治疗28d,其他3组进行等时固定。应用Morris水迷宫实验检测大鼠学习记忆能力,酶联免疫吸附法检测海马组织ACh水平。**结果** 实验结束前3d,模型组大鼠每天达到所经过的路程及逃避潜伏期的时间均长于其余3组,跨越平台次数少于其余3组(均 $P < 0.05$ );干预结束后,模型组海马ACh水平低于其余3组( $P < 0.05$ )。**结论** 头针丛刺法治疗可以改善老年痴呆大鼠学习记忆能力,其机制可能与上调海马组织ACh水平有关。

**【关键词】** 老年痴呆;头针丛刺;Morris水迷宫;乙酰胆碱;海马;大鼠

**【中图分类号】** R 749.16 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 0253-4304(2018)13-1457-04

**DOI:**10.11675/j.issn.0253-4304.2018.13.18

## Effects of cluster needling at scalp point on learning and memory abilities and hippocampal acetylcholine level in rats with Alzheimer's disease

HUANG Dong-ting<sup>1</sup>, XIA Meng<sup>2</sup>, PANG Sheng-hang<sup>3</sup>, LU Yan-yan<sup>1</sup>, HUANG Hong<sup>1</sup>, XIONG Jin<sup>4</sup>, WEN Jing-yi<sup>4</sup>, MA Yue<sup>4</sup>

(1 Department of Acupuncture and Moxibustion, Jiangbin Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021, China;

2 College of Basic Medicine, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China;

3 Department of Geriatrics, Guangxi Zhuang Autonomous Region Worker's Hospital, Nanning 530021, China;

4 Graduate School, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China)

**【Abstract】 Objective** To observe the effects of cluster needling at scalp point on learning and memory abilities and hippocampal

acetylcholine(ACh) level in rats with Alzheimer's disease(AD). **Methods** Thirty-two rats were randomly divided into normal group, sham group, model group and cluster needling group. The fimbria-fornix injury was developed in the rats of the model group and cluster needling group to establish the rat model of AD, skull opening was conducted in the sham group without inducing fimbria-fornix injury, and no intervention was performed in the normal group. On the 7th day after operation, the cluster needling group received cluster needling at scalp point, and the treatment lasted for 28 days, meanwhile, the rats of other three groups received fixation with the same duration. Morris water maze test was used to detect the learning and memory abilities of rats, and enzyme-linked immunosorbent assay was used to detect the ACh level. **Results** Three days before the end of experiment, the daily distance and the duration of avoidance latency of the rats in the model group were longer than those in the other three groups, the number of flatform crossing in the model group was less than that in the other three groups(all  $P < 0.05$ ); after intervention, the level of hippocampal ACh in the model group was lower than that in the other three groups( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Cluster needling at scalp point can improve the learning and memory abilities of AD rats, which might be related to up-regulating the level of hippocampal ACh.

**【Key words】** Alzheimer's disease, Cluster needling at scalp point, Morris water maze, Acetylcholine, Hippocampus, Rat

▲基金项目:广西自然科学基金(2013GXNSFAA253004)

作者简介:黄东挺(1969~),男,本科,主任医师,研究方向:针灸治疗老年心脑血管疾病及其机理。

老年痴呆是一种进行性发展的神经系统退行性疾病,其起病隐匿临床上以记忆障碍、失语、失用、失认、视空间技能损害、执行功能障碍以及人格和行为改变等全面性痴呆表现为特征。65岁以前发病者称早老性痴呆,65岁以后发病者称老年性痴呆。目前我国老年痴呆患病率呈增长趋势,65岁以上老年人痴呆患病率为5.21%,75~85岁老年人患病率达到15%~20%,85岁以上的老年人患病率可高达30%左右<sup>[1-3]</sup>。目前,老年痴呆大多以对症治疗为主,常用的药物有抗焦虑药、抗抑郁药、抗精神病药,如阿普唑仑、帕罗西汀、利培酮等,其次还有一些益智和改善认知功能的药物,如作用于胆碱能神经的药物和扩张脑血管、改善脑细胞的药物<sup>[4-5]</sup>。但老年痴呆发病原因尚未明确,涉及多方面因素,单纯药物治疗仅能从某些层面缓解症状或延迟发病,并不能真正有效解除老年痴呆的症状。中医药尤其是针灸治疗具有多层次、多靶点的特点,在老年痴呆的治疗中也取得一定的成果。本研究观察头针丛刺对老年痴呆大鼠学习记忆能力以及海马组织乙酰胆碱(acetylcholine, ACh)水平的影响,探讨头针针刺治疗老年痴呆的作用机制,现报告如下。

## 1 材料与方法

1.1 实验动物 32只无特定病原体级雄性SD大鼠购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,体重(410.36±15.84)g,动物许可证号: CXK(湘)2013-0004。所有动物均饲养于广西中医药大学科学实验中心无特定病原体级动物房。大鼠饲养环境:12h/12h明暗周期,70%湿度,温度20℃。实验前,所有大鼠经过1周的适应性驯养。

1.2 实验试剂及仪器 即用型ACh酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒(R&D Systems,批号DY7574-05);WMT-100型Morris水迷宫设备全套(成都泰盟科技有限公司);颅脑立体定位仪(天津市医疗器械研究所,型号: DY-1);牙科钻(上海岭之崎精密工具公司,型号: LZQ);微电极脑立体定位仪(西北光明仪器厂,型号: WDT-11)。

### 1.3 方法

1.3.1 分组及建立动物模型:按照随机数字表法将32只SD大鼠分为正常组、假手术组、模型组、头针丛刺组,每组8只。(1)正常组:正常饲养,不进行任何手术及针刺治疗,在头针丛刺组进行施针治疗时行等时固定,每次固定30min,固定期间不做任何处置。(2)假手术组:4%水合氯醛腹腔注射,待大鼠麻醉后,将其固定于颅脑立体定位仪,用剪刀剪掉颅顶毛发,碘伏和70%酒精对颅脑顶部皮肤进行消毒。沿颅顶中线剪开皮肤,钝形分离骨膜。在前囟后2mm、中线旁1mm处,用牙科钻打开颅骨,但不进行后续穹窿—海马伞损害的操作,缝合

伤口。在头针丛刺组进行施针治疗时行等时固定,方法同正常组。(3)模型组,在假手术组基础上,进行穹窿—海马伞损害操作,操作方法同文献[6],在头针丛刺组进行施针治疗时行等时固定,方法同正常组。(4)头针丛刺组:造模方法同模型组,在手术后第7天,行头针丛刺治疗,治疗时间28d,其他处理方法同模型组。

1.3.2 针刺方法:(1)针刺取穴:采用于氏头部腧穴分区法—七区分法<sup>[7]</sup>,并根据动物的特点进行调整,其中顶区为百会至前顶及其向左、右各1~2mm的平行线,顶前区为前顶至囟会及其向左、右各3mm、5mm的平行线,额区为神庭透囟会、与其平行的曲差和本神向上透刺,枕区为强间透脑户、与其平行的旁开1mm向下透刺,枕下区为脑户透风府、玉枕透天柱,颞区为头维、承灵及二者之间,向下刺入3~5mm,项区为风府、风池及两穴之间。(2)针刺方法:常规消毒后,选用28号华佗牌1~1.5寸毫针,在上述各区向前向后透刺,同时刺3针,针体与皮肤呈15°至帽状腱膜下,快速捻转进针,得气后接6805-D型电针仪治疗20min,刺激强度以大鼠耐受为度(大鼠不剧烈挣扎为可耐受),1次/d,每周6次,休息1次后再进行治疗,共治疗28d。

1.3.3 动物水迷宫实验:将Morris水迷宫圆形水池(见图1)注满水,水面高度距离池面5cm,加入适量白色水溶性颜料至水不透明,保持池水温度恒定(23℃~25℃)。大鼠头朝池壁,在东、西、南、北四个象限任何一个起始位置将大鼠放入池中。图像处理系统观察记录大鼠找到位于4个象限中心位置的平台位于水下3cm处,直径为12cm,高为20cm所用的时间(s)及路线图。在前几次训练中,如果这个时间超过90s未游入平台,则引导大鼠自行寻找到平台并在平台上停留10s,此时逃避潜伏期记为90s。将大鼠移开、擦干放回笼中。每只大鼠每天训练4次,每次训练间隔时间为60min,连续训练5d。在干预结束前5d,将各组大鼠按照以上方法进行为期5天的空间学习记忆能力训练,再测量逃避潜伏期,即大鼠寻找并爬上平台时所需时间,并观察大鼠对水迷宫学习记忆的获取能力(即路程距离)、撤去平台后90s内跨过原平台相应位置的次数。

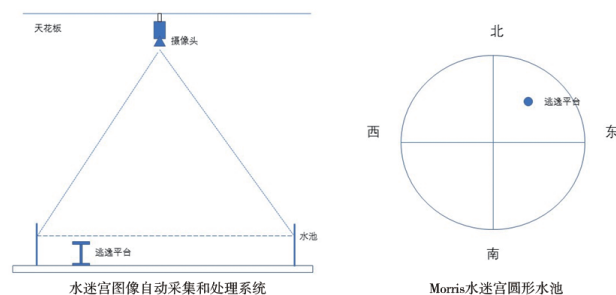


图1 水迷宫示意图

1.3.4 ACh的检测:干预结束后,麻醉大鼠,生理盐水

心脏灌注,然后迅速冰浴剥离海马组织,取约 150 mg 海马组织,制备为 10% 的海马匀浆。按照试剂盒说明书进行 ELISA 检测:(1)从铝箔袋中取出室温平衡 20 min 后的板条,剩余板条用自封袋密封放回 4℃。(2)设置标准品孔和样本孔,标准品孔各加不同浓度的标准品 50 μl,样本孔中加入待测样本 50 μl;空白孔不加样本。(3)除空白孔外,标准品孔和样本孔中每孔加入辣根过氧化物酶标记的抗体 100 μl,用封板膜封住反应孔,37℃水浴锅或恒温箱温育 60 min。(4)弃去液体,吸水纸上拍干,每孔加满洗涤液(350 μl),静置 1 min,甩去洗涤液,吸水纸上拍干,如此重复洗板 5 次(也可用洗板机洗板)。(5)每孔加入底物 A、B 各 50 μl,37℃避光孵育 15 min。(6)每孔加入终止液 50 μl,15 min 内,在 450 nm 波长处测定各孔的 A 值。绘制标准曲线,根据标本的 A 值,计算标本的浓度。

1.4 统计学分析 采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析。计量资料以( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组样本间均数比较采用单因素方差分析。以  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

2.1 4 组大鼠在 Morris 水迷宫中达平台所经过的路程比较 4 组大鼠达到平台所经过路程比较,差异有统计学意义( $F_{\text{组间}} = 539.155, P_{\text{组间}} < 0.001$ ),4 组均有随时间变化的趋势( $F_{\text{时间}} = 47.140, P_{\text{时间}} < 0.001$ ),分组与时间无交互作用( $F_{\text{交互}} = 0.371, P_{\text{交互}} = 0.693$ );实验结束前 3 d,模型组大鼠达到平台所经过的路程均长于假手术组及正常组,头针丛刺组达到平台经过的路程均短于模型组(均  $P < 0.05$ )。见表 1。

表 1 各组大鼠达到平台所经过的路程比较( $\bar{x} \pm s, \text{cm}$ )

组别	n	干预第 26 天	干预第 27 天	干预第 28 天
正常组	8	472.36 ± 48.91	293.65 ± 40.23	275.36 ± 35.48
假手术组	8	491.28 ± 63.21	310.94 ± 56.38	292.34 ± 44.62
模型组	8	872.47 ± 133.68**	822.35 ± 125.68**	720.36 ± 94.51**
头针丛刺组	8	552.33 ± 81.25 <sup>☆</sup>	475.65 ± 76.25 <sup>☆</sup>	380.49 ± 53.29 <sup>☆</sup>

注:与正常组比较,\* $P < 0.05$ ;与假手术组比较,★ $P < 0.05$ ;与模型组比较,☆ $P < 0.05$ 。

2.2 4 组大鼠在 Morris 水迷宫中逃避潜伏期的时间比较 4 组大鼠逃避潜伏期比较,差异有统计学意义( $F_{\text{组间}} = 3\ 802.778, P_{\text{组间}} < 0.001$ ),4 组均有随时间变化的趋势( $F_{\text{时间}} = 449.485, P_{\text{时间}} < 0.001$ ),分组与时间有交互作用( $F_{\text{交互}} = 6.967, P_{\text{交互}} = 0.004$ );实验结束前 3 d,模型组大鼠逃避潜伏期时间均长于假手术组及正常组,头

针丛刺组逃避潜伏期时间短于模型组(均  $P < 0.05$ )。见表 2。

表 2 4 组大鼠逃避潜伏期的时间比较( $\bar{x} \pm s, \text{s}$ )

组别	n	干预第 26 天	干预第 27 天	干预第 28 天
正常组	8	43.29 ± 12.47	36.48 ± 9.78	29.51 ± 7.58
假手术组	8	46.82 ± 13.54	38.52 ± 11.38	32.98 ± 8.41
模型组	8	82.68 ± 16.77**	78.35 ± 15.33**	63.25 ± 12.49**
头针丛刺组	8	61.23 ± 15.55 <sup>☆</sup>	52.36 ± 14.37 <sup>☆</sup>	39.51 ± 15.79 <sup>☆</sup>

注:与正常组比较,\* $P < 0.05$ ;与假手术组比较,★ $P < 0.05$ ;与模型组比较,☆ $P < 0.05$ 。

### 2.3 4 组大鼠在 Morris 水迷宫中跨越平台次数比较

正常组跨越平台(8.23 ± 1.77)次,假手术组跨越平台(6.24 ± 1.48)次,模型组跨越平台(3.12 ± 1.01)次,头针丛刺组跨越平台(7.13 ± 1.56)次,差异具有统计学意义( $F = 3.124, P = 0.032$ ),其中模型组跨越平台次数少于其余 3 组( $P < 0.05$ ),头针丛刺组与假手术组比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

### 2.4 4 组大鼠海马组织 ACh 水平比较

正常组大鼠海马组织 ACh 水平为(0.51 ± 0.04) μmol/L,假手术组为(0.47 ± 0.04) μmol/L,模型组为(0.23 ± 0.02) μmol/L,头针丛刺组为(0.41 ± 0.03) μmol/L,差异具有统计学意义( $F = 3.864, P = 0.018$ ),其中模型组海马 ACh 水平低于其余 3 组( $P < 0.05$ ),头针丛刺组与假手术组差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

## 3 讨论

ACh 是一种神经递质,是进行及维持高级神经系统功能的一种重要介质,其能特异性作用于各类胆碱受体。研究表明,当机体受到刺激时,大脑内胆碱能神经元被激活,大脑、海马、皮层等区域的 ACh 释放与学习记忆、注意、自发活动、探究等认知活动密切相关<sup>[8]</sup>。Winters 等<sup>[9]</sup>研究发现,基底前脑向海马的投射受到广泛损毁后,可以引起认知功能总体水平下降甚至可以直接导致痴呆。Grön 等<sup>[10]</sup>研究指出,轻度认知损伤者认知活动能力的低下是由于其海马胆碱能神经元的功能被抑制所致,增加海马的胆碱能神经传递后,轻度认知损伤者的注意、认知灵活性、口头和空间工作记忆能力均得到改善。因此,海马内 ACh 与认知活动有关,其含量的高低能从一定程度上反映大脑的认知功能水平,在老年痴呆等记忆受损的疾病中,海马 ACh 水平下降。

Morris 水迷宫是研究神经系统病症最常用的工具之一,目前已经被广泛用于啮齿类动物神经认知疾病模型的研究<sup>[11-12]</sup>,且该装置可以让动物单纯依靠空间记忆

能力来寻找平台,不受气味、嗅觉的影响,操作相对简单,可信度高,是目前为止检测啮齿类动物空间学习记忆能力最佳的工具。

针刺疗法是临床常见的一种治疗老年痴呆方法,已受到国内外专家和学者的广泛关注。头针丛刺是于致顺教授结合传统中医与现代医学对大脑皮层功能的定位理论,并结合自己丰富的临床实践提出的一种新疗法<sup>[7,13]</sup>。该疗法选择的头部穴位均于脑神经处,通过头部各经络的交会、联络、衔接,达到疏通人体气血,通经活络开窍的作用,起到直接疏通病灶气血经络,发挥益智安神、疏调元神、醒脑开窍、调神解郁、舒畅气机之功效。前期临床实验研究表明<sup>[13-14]</sup>,头针丛刺通过对头部特定区域的有效刺激,较好地改善阿尔茨海默病患者的临床症状,并提高患者日常生活质量。本研究在前期研究的基础上,建立老年痴呆大鼠模型,即穹窿—海马伞损害模型复制老年痴呆。研究结果显示,模型组大鼠学习记忆能力以及海马 ACh 水平差于或低于假手术组 ( $P < 0.05$ ),提示老年痴呆大鼠模型建模成功;给予头针丛刺后,头针丛刺组大鼠的学习记忆能力优于模型组,且海马 ACh 水平也高于模型组(均  $P < 0.05$ ),提示头针丛刺法治疗老年痴呆大鼠效果明显,其治疗机制可能与调节海马 ACh 水平有关,具体机制还有待进一步探讨。

## 参 考 文 献

- [1] 李秋琴. 2013 年我地区老年痴呆流行病学调查分析[J]. 浙江中医药大学学报, 2014(5): 654-656.
  - [2] 汤 哲, 孟 琛, 陈 彪. 北京地区老年痴呆流行病学研究[J]. 中华流行病学杂志, 2003, 24(8): 734-736.
  - [3] 张葆樽. 老年痴呆流行病学进展[J]. 解放军保健医学杂志, 1999, 1(4): 1-3.
  - [4] 李 岩, 冯宗妹, 李 宁, 等. 老年痴呆症的药物治疗[J]. 职业与健康, 2016, 32(1): 131-134.
  - [5] 张瑞堂, 石晓峰. 老年痴呆症的药物治疗概述[J]. 甘肃医药, 2009, 28(1): 20-24.
  - [6] Berg KO, Wood-Dauphinee SL, Williams JI, et al. Measuring balance in the elderly: validation of an instrument[J]. Can J Public Health, 1992, 83(Suppl 2): S7-S11.
  - [7] 陈世龙, 孙小斐. 于氏头针治疗脑梗塞的研究进展[J]. 承德医学院学报, 2013, 30(6): 492-494.
  - [8] Pepeu G, Giovannini MG. Changes in acetylcholine extracellular levels during cognitive processes[J]. Learn Mem, 2004, 11(1): 21-27.
  - [9] Winters BD, Bussey TJ. Removal of cholinergic input to perirhinal cortex disrupts object recognition but not spatial working memory in the rat[J]. Eur J Neurosci, 2005, 21(8): 2263-2270.
  - [10] Grön G, Brandenburg I, Wunderlich AP, et al. Inhibition of hippocampal function in mild cognitive impairment: targeting the cholinergic hypothesis[J]. Neurobiol Aging, 2006, 27(1): 78-87.
  - [11] de Vasconcellos AP, Zugno AI, Dos Santos AH, et al.  $Na^+$ ,  $K^+$ -ATPase activity is reduced in hippocampus of rats submitted to an experimental model of depression: effect of chronic lithium treatment and possible involvement in learning deficits[J]. Neurobiol Learn Mem, 2005, 84(2): 102-110.
  - [12] Choeiri C, Hewitt K, Durkin J, et al. Longitudinal evaluation of memory performance and peripheral neuropathy in the Ins2C96Y Akita mice[J]. Behav Brain Res, 2005, 157(1): 31-38.
  - [13] 黄东挺, 刘倍利. 头针丛刺治疗阿尔茨海默病 30 例[J]. 中国民间疗法, 2015, 23(3): 16-17.
  - [14] 黄东挺, 卢琰琰, 黄 洪, 等. 头针丛刺对阿尔茨海默病认知功能的影响[J]. 上海针灸杂志, 2014, 33(10): 888-889.  
(收稿日期: 2018-02-05 修回日期: 2018-05-11)
- 
- [8] McKeon A, Pittock SJ. Paraneoplastic encephalomyelopathies: pathology and mechanisms[J]. Acta Neuropathol, 2011, 122(4): 381-400.
  - [9] Lancaster E, Martinez-Hernandez E, Dalmau J. Encephalitis and antibodies to synaptic and neuronal cell surface proteins[J]. Neurology, 2011, 77(2): 179-189.
  - [10] Höftberger R, Dalmau J, Graus F. Clinical neuropathology practice guide 5-2012: updated guideline for the diagnosis of antineuronal antibodies[J]. Clin Neuropathol, 2012, 31(5): 337-341.
  - [11] Baysal-Kirac L, Tuzun E, Altindag E, et al. Are There Any Specific EEG Findings in Autoimmune Epilepsies? [J]. Clin EEG Neurosci, 2016, 47(3): 224-234.
  - [12] Newey CR, Sarwal A, Hantus S. <sup>18</sup>F-Fluoro-Deoxy-Glucose Positron Emission Tomography Scan Should Be Obtained Early in Cases of Autoimmune Encephalitis [J]. Autoimmune Dis, 2016, 20(6): 945-952.
  - [13] Fang Z, Yang Y, Chen X, et al. Advances in Autoimmune Epilepsy Associated with Antibodies, Their Potential Pathogenic Molecular Mechanisms, and Current Recommended Immunotherapies[J]. Front Immunol, 2017, 8: 395.  
(收稿日期: 2018-02-24 修回日期: 2018-05-11)

(上接第 1456 页)