

电针通过调节TREM2-DAP12信号通路改善大鼠术后认知功能的机制研究

王翔锋 李紫嫣 罗颖 蒋思敏 裴益聪 刘威

福建中医药大学附属人民医院麻醉科, 福建福州 350004

[摘要] 目的 探讨电针通过调节髓样细胞触发受体 2 (TREM2)-衔接蛋白 DAP12 (DAP12) 信号通路改善老年大鼠胫骨骨折术后认知功能的机制。方法 采用随机数表法将 18 月龄健康雄性 SPF 级大鼠 20 只分为电针组和对照组, 每组各 10 只。电针组行百会、神庭穴电针刺激, 对照组未行电针刺激。采用旷场实验评价大鼠认知功能; 采用苏木精-伊红染色法观察海马组织细胞形态; 采用 TUNEL 染色法观察海马组织细胞凋亡情况; 采用酶联免疫吸附测定 (ELISA) 法测定血浆 β 淀粉样蛋白 ($A\beta$) 1-40、白细胞介素 (IL)-1 β 、IL-6、肿瘤坏死因子 (TNF)- α 浓度; 采用 Western blot 法检测海马组织神经元特异性烯醇化酶 (NSE)、S-100 β 蛋白、TREM2、DAP12 蛋白表达。结果 认知功能: 与对照组比较, 电针组大鼠的活动时间、总路程、伸展时间均明显延长, 平均速度显著提高 ($P < 0.05$)。海马组织细胞形态和凋亡情况: 对照组 CA3 区神经细胞核固缩、胞质深染, 可见小胶质细胞吞噬神经元; 电针组 CA3 区仅部分细胞胞质深染。与对照组比较, 电针组神经元细胞凋亡数量明显减少 ($P < 0.05$)。血浆 $A\beta$ 1-40、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 浓度: 与对照组比较, 电针组大鼠血浆中 $A\beta$ 1-40、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 表达水平明显降低 ($P < 0.05$)。海马组织 NSE、S-100 β 、TREM2、DAP12 的表达水平: 与对照组比较, 电针组 NSE、S-100 β 蛋白表达水平明显下降 ($P < 0.05$), TREM2、DAP12 的表达水平明显升高 ($P < 0.05$)。结论 电针刺激百会、神庭穴可减轻老年大鼠胫骨骨折手术后海马神经元损伤和凋亡, 减少神经认知障碍, 其可能与电针激活 TREM2-DAP12 通路, 促进小胶质细胞由 M1 型向 M2 型转变, 减轻小胶质细胞炎症反应有关。

[关键词] 围手术期神经功能紊乱; 大鼠; 电针; TREM2-DAP12 信号通路; 小胶质细胞

[中图分类号] R245 [文献标识码] A [文章编号] 2095-0616 (2025) 05-0004-05

DOI:10.20116/j.issn2095-0616.2025.05.01

Research on the mechanism of electroacupuncture improving postoperative cognitive function in rats by regulating TREM2-DAP12 signal pathway

WANG Xiangfeng LI Ziyang LUO Ying JIANG Simin PEI Yicong LIU Wei

Department of Anesthesiology, the People's Hospital Affiliated to Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fujian, Fuzhou 350004, China

[Abstract] **Objective** To investigate the mechanism of electroacupuncture regulating the signal pathway of triggering receptor expressed on myeloid cells 2 (TREM2)-DNAX activating protein of 12 kDa (DAP12) to improve the postoperative cognitive function of tibial fracture in aged rats. **Methods** A total of 20 healthy male specific pathogen free (SPF) rats aged 18 months were divided into the electroacupuncture group ($n=10$) and the control group ($n=10$) according to the random number table method. The electroacupuncture group was stimulated by Baihui (GV20) and Shenting (GV24) electroacupuncture, while the control group was not stimulated by electroacupuncture. The cognitive function of rats was evaluated by open field test. Hematoxylin-eosin staining was used to observe the morphology of hippocampal cells. Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) staining was used to observe the apoptosis of hippocampus. The plasma concentrations of amyloid β -protein ($A\beta$) 1-40, interleukin (IL)-1 β , IL-6 and tumor necrosis factor (TNF)- α were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The expression of neuron-specific enolase (NSE), S-100 β protein, TREM2 and DAP12 protein in hippocampus were detected by Western blot. **Results** Cognitive function: Compared with the control group, the activity time,

[基金项目] 国家自然科学基金项目基础提升计划专项课题 (JCZX202306)。

total distance and stretching time of rats in the electroacupuncture group were all significantly prolonged, and the average speed was significantly increased ($P < 0.05$). Morphology and apoptosis of hippocampal cells: In the control group, the nuclei of neurons in cornu ammonis area 3 (CA3) were condensed and the cytoplasm was deeply stained, and microglia phagocytosis neurons could be seen. In the electroacupuncture group, only some cells in CA3 area were deeply stained. Compared with the control group, the number of neuronal apoptosis in the electroacupuncture group decreased remarkably, with statistically significant difference ($P < 0.05$). Plasma concentrations of $A\beta$ 1-40, IL-1 β , IL-6 and TNF- α : Compared with the control group, the expression levels of $A\beta$ 1-40, IL-1 β , IL-6 and TNF- α of rats in the electroacupuncture group were remarkably decreased, with statistically significant differences ($P < 0.05$). Expression levels of NSE, S-100 β , TREM2 and DAP12 in hippocampus: Compared with the control group, the expression levels of NSE and S-100 β protein in the electroacupuncture group decreased remarkably, with statistically significant differences ($P < 0.05$), while the expression levels of TREM2 and DAP12 increased remarkably, with statistically significant differences ($P < 0.05$). **Conclusion** Electroacupuncture stimulation of Baihui (GV20) and Shenting (GV24) can alleviate the injury and apoptosis of hippocampal neurons after tibial fracture surgery in aged rats, and reduce neurocognitive impairment, which may be related to electroacupuncture activating TREM2-DAP12 pathway, promoting the transformation of microglia from M1 type to M2 type, and alleviating the inflammatory reaction of microglia.

[Key words] Perioperative neurocognitive disorder; Rats; Electroacupuncture; TREM2-DAP12 signal pathway; Microglia

围手术期神经功能紊乱(perioperative neurocognitive disorder, PND)是由手术麻醉后多种因素导致的并发症,在老年患者中发生率高,可在术后早期至数月发生,并可能持续影响患者生活质量和疾病预后,甚至导致阿尔茨海默病^[1-2]。

实验研究表明,海马组织小胶质细胞的炎症是PND发病的重要原因之一^[3]。小胶质细胞的活化按其表型和功能可分为M1型和M2型,其中M1型具有神经毒性,M2型则具有一定的抗炎与神经保护作用^[4],两型小胶质细胞在一定条件下可相互转化。髓样细胞触发受体2(triggering receptor expressed on myeloid cells 2, TREM2)-衔接蛋白DAP12(DNAX activating protein of 12 kDa, DAP12)是一种特异表达于小胶质细胞上的复合体,TREM2-DAP12信号通路可能是一种关键调节机制,激活TREM2-DAP12信号通路可促进小胶质细胞由M1型向M2型转变,具有抗炎和降低吞噬功能的作用^[5-6]。

电针刺激百会、神庭穴是防治PND行之有效的方案,可以醒脑调神、贯通诸脉,具有抗炎和神经保护的作用^[7]。但目前尚未明确电针是否可以上调TREM2-DAP12表达,抑制小胶质细胞炎症反应。因此,本研究探讨电针刺激对老年大鼠PND的预防作用及其潜在机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

18月龄SPF级雄性大鼠20只,体重500~600g,购自成都达硕实验动物有限公司,实验动物生产

许可证号:SYXK(川)2022-0002。自由饮水和摄食,昼夜12h灯光照射,保持温度20~24℃,湿度50%~60%。本研究遵循动物实验原则进行操作,经实验动物伦理委员会批准。

1.2 实验仪器

旷场开场(北京众实迪科技发展有限公司,型号:ZS-KC);小动物麻醉机(上海玉研科学仪器有限公司,型号:ABF);电子针疗仪(江苏医疗用品有限公司,型号:SDZ-V型);生物显微镜(日本NiKon公司,型号:E200MV);包埋机(湖北孝感阔海医疗科技有限公司,型号:KH-BL型);垂直电泳槽(美国BIO-RAD公司,型号:POWER PAC 200);酶标仪(美国Thermo Fisher Scientific公司,型号:K3);化学发光成像仪(美国BIO-RAD公司,型号:ChemiDoc MP型)。

1.3 主要试剂

TUNEL细胞凋亡检测试剂盒(批号:C1098),大鼠 β 淀粉样蛋白(amyloid β -protein, $A\beta$)1-40酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒(批号:MM-0459R2),大鼠肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)- α ELISA试剂盒(批号:MM-0180R2),大鼠白细胞介素(interleukin, IL)-6 ELISA试剂盒(批号:MM-0190R2),大鼠IL-1 β 检测试剂盒(批号:MM-0047R2),S-100 β 试剂盒(批号:15146-1-AP),神经元特异性烯醇化酶(neuron-specific enolase, NSE)试剂盒(批号:10149-1-AP),TREM2试剂盒(批号:A02150-3),DAP12试剂盒(批号:bs-12630R)。

1.4 实验动物分组、模型制备与干预

1.4.1 实验动物分组 采用随机数表法将大鼠分为电针组和对照组,每组各 10 只。

1.4.2 动物造模 20 只大鼠均制备骨折模型,具体造模步骤如下:异氟烷麻醉后,备皮,消毒,行胫骨骨折切复术。右后爪剃毛并消毒,沿爪部正中切开,暴露胫骨并剥离骨膜,进行截骨术,然后在胫骨髓内管内插入 1 枚 0.8 mm × 17 mm 的克氏针。完成骨折手术后,冲洗伤口,用缝线缝合。无菌纱布覆盖,胶布固定。大鼠苏醒后伤口涂擦碘伏以免伤口与不清洁垫料接触而感染。待动物清醒后放回笼具。行为学检测结果与对照组比较差异显著,即为建模成功。

1.4.3 动物干预 电针组行电针刺激,根据《动物针灸穴位图谱》^[1]取百会、神庭穴位针刺,采用 15 mm × 0.26 mm 毫针,连接电子针疗仪,两电极之间形成回路,电针刺激方案:疏密波,频率 5/25 Hz,强度 0.1 ~ 0.3 mA;刺激刚好能引起局部肌肉轻微抖动,动物保持安静。术前 1 d、术前 30 min、术后连续 7 d,每日刺激 1 次,每次 30 min,共 9 次。对照组未行电针刺激。

1.5 观察指标

1.5.1 旷场实验评价认知功能 时间:麻醉前及造模后第 3、5、7 天。旷场实验:打开动物行为学分析软件,记录动物在旷场分析箱内的活动,大鼠适应环境 3 min 后,迅速被放置于实验箱的中央区域,观察 5 min 内大鼠的活动情况,记录中央格停留时间、跨格次数及站立次数等数值,实验结束后用 95% 酒精喷洒除味,清洗仪器装置。

1.5.2 血浆炎症因子及 A β 1-40 表达 行为学实验完毕后,大鼠麻醉成功后取腹主动脉血 8 ~ 10 ml, 2600 × g 离心 10 min 获得血浆,严格按照 ELISA 试剂盒说明书的方法测定 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、A β 1-40 含量。

1.5.3 观察细胞形态和细胞凋亡情况 ①苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色观察细胞形态:采血后,用急性失血法处死大鼠,灌注取全脑,分离海马组织,固定 24 h、脱水透明、浸蜡、包埋,切片(4 μ m)、脱蜡、HE 染色,在 200 倍光学显微镜下观察细胞形态。②TUNEL 染色观察细胞凋亡:将海马组织切片样本进行 TUNEL 染色。200 倍镜下计数和标记清晰的 TUNEL 阳性细胞。

1.5.4 海马组织蛋白表达 Western blot 法检测 TREM2、DAP12、NSE、S-100 β 蛋白表达:取海马组织,每 100 mg 组织加裂解液 1 ml,用超声波

细胞粉碎机匀浆后,4 $^{\circ}$ C 条件下以 16 000 r/min 离心 5 min,取上清液。使用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度。SDS-PAGE 凝胶电泳、转膜、5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h、相应一抗抗体 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜后、二抗室温孵育 1 h、ECL 发光液显影。采集图像,采用 Quantity One 软件进行分析,以 β -actin 蛋白作为内参,以目的蛋白与 β -actin 灰度值的比值表示 TREM2、DAP12、NSE、S-100 β 蛋白含量。

1.6 统计学处理

采用 SPSS 26.0 统计学软件进行数据分析。计量资料采用 Shapiro-Wilk 检验进行正态性检验,符合正态分布的用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$) 进行统计描述,行方差齐性检验,方差齐时,组间比较采用独立样本 t 检验,方差不齐时,组间比较采用秩和检验;不符合正态分布的用 $[M(P_{25}, P_{75})]$ 进行统计描述,组间比较采用秩和检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 旷场实验检测两组大鼠的行为学指标

两组大鼠静止时间比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);与对照组比较,电针组大鼠的活动时间、总路程、伸展时间均明显延长,平均速度显著提高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

表1 两组大鼠旷场实验结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	静止时间 (s)	活动时间 (s)	伸展时间 (s)	总路程 (cm)	平均速度 (cm/s)
对照组	10	480.1 \pm 16.3	102.1 \pm 26.3	32.1 \pm 15.7	410.1 \pm 106.3	0.8 \pm 0.3
电针组	10	475.3 \pm 20.2	158.1 \pm 45.2	62.3 \pm 22.5	1065.2 \pm 410.3	2.1 \pm 0.8
t 值		0.585	3.386	3.481	4.888	4.812
P 值		0.566	0.003	0.003	<0.001	<0.001

2.2 HE 染色检测两组大鼠海马组织的病理情况

对照组 CA3 区神经细胞核固缩、深染,见小胶质细胞吞噬神经元;电针组 CA3 区可见部分神经细胞胞质深染。见图 1。

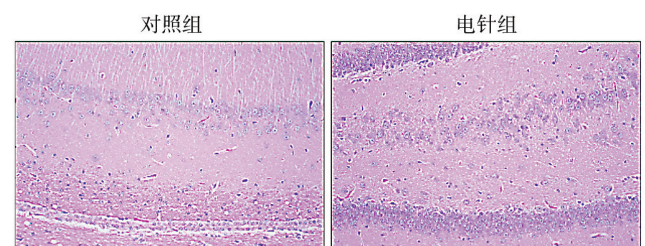


图1 两组大鼠海马组织的病理图像 (HE 染色, 200 ×)

2.3 TUNEL染色检测两组海马神经细胞凋亡情况

使用TUNEL染色检测两组大鼠海马神经细胞的凋亡情况,见图2。与对照组比较,电针组神经细胞凋亡细胞百分率明显下降,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表2。

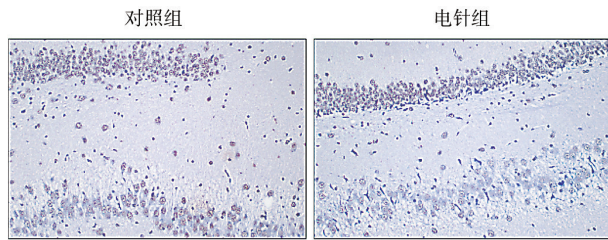


图2 两组大鼠海马组织中神经细胞的凋亡情况(TUNEL染色, 200×)

表2 两组大鼠海马组织凋亡细胞百分率比较(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	凋亡细胞百分率
对照组	10	33.8 ± 10.2
电针组	10	18.2 ± 5.8
t值		4.190
P值		0.001

2.4 ELISA检测两组大鼠血浆中Aβ1-40和炎症因子的表达水平

与对照组比较,电针组大鼠血浆中Aβ1-40、IL-1β、IL-6、TNF-α表达水平明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表3。

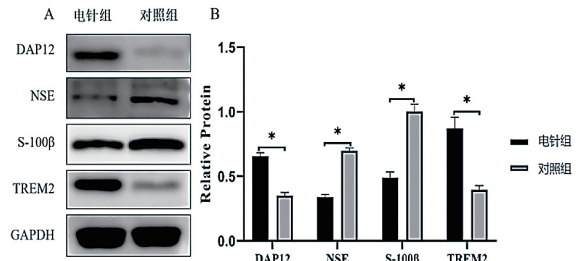
表3 两组大鼠血浆中Aβ1-40和炎症因子的表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Aβ1-40 (ng/ml)	IL-1β (pg/ml)	IL-6 (pg/ml)	TNF-α (pg/ml)
对照组	10	59.1 ± 15.3	8.6 ± 1.4	82.5 ± 11.7	68.1 ± 10.3
电针组	10	40.3 ± 8.2	6.1 ± 1.1	60.3 ± 5.5	45.2 ± 5.3
t值		3.425	4.440	5.430	6.252
P值		0.003	<0.001	<0.001	<0.001

注 Aβ: β淀粉样蛋白; IL: 白细胞介素; TNF: 肿瘤坏死因子

2.5 Western blot检测两组大鼠NSE、S-100β、TREM2、DAP12的表达水平

使用Western blot检测两组大鼠海马组织中NSE、S-100β、TREM2、DAP12的表达情况,见图3A。与对照组比较,电针组NSE、S-100β蛋白表达水平明显下降,TREM2、DAP12的表达水平明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图3B。



注 与对照组比较, * $P < 0.05$

图3 Western blot检测两组大鼠海马组织NSE、S-100β、TREM2、DAP12蛋白表达水平

3 讨论

本研究通过行为学测试,可以观察到电针组大鼠在术后的活动时间、总路程、伸展时间均明显延长,平均速度显著提高,表现出更好的认知功能。这表明电针刺激对老年大鼠PND具有显著的预防作用,其机制可能与电针刺激对海马神经元损伤的调节有关^[8-9]。此外,本研究还发现电针刺激能够降低血液和海马组织中的炎症因子IL-1β、IL-6、TNF-α及Aβ1-40水平,Aβ1-40异常聚集可能导致神经退行性变化,进而影响认知功能^[10],这表明电针刺激可能通过抑制炎症反应来减轻PND的症状^[11]。

TREM2是一种主要在小胶质细胞上表达的细胞表面受体,与多种神经退行性疾病的发生发展密切相关^[12]。TREM2的活化可以促进小胶质细胞由促炎性M1型向抗炎性M2型的转变,从而减轻炎症反应和神经元损伤^[12]。NSE和S-100β是评估认知功能变化的有效生物标志物,其水平升高与神经元损伤的程度有关^[13]。本研究结果显示,电针可能通过调节TREM2-DAP12信号通路发挥作用,电针刺激增加了TREM2和DAP12的表达,有助于抑制小胶质细胞的促炎活性,促进小胶质细胞由M1型向M2型转变,减少NSE和S-100β的释放,进而对神经认知功能产生保护作用。

有研究发现电针刺激能够减少海马组织的损伤和细胞凋亡^[3]。海马是与学习和记忆密切相关的脑区,在PND中起着核心作用^[14]。电针刺激可能通过抑制海马组织的细胞凋亡来保护认知功能^[15]。这一点通过HE染色和TUNEL染色得到了证实,电针组大鼠海马组织的细胞形态更为完整,凋亡细胞数量减少。

尽管本研究探究了电针刺激在PND预防和治疗中的潜在机制,但仍存在一定局限性。首先,本研究仅在动物模型中进行,其结果是否能够直接推广

到人类仍需进一步的临床验证。其次,电针刺激的具体参数(如频率、强度和持续时间)对治疗效果的影响需要更细致的优化。最后,电针刺激可能涉及的其他信号通路和分子机制也需进一步探讨。

综上所述,电针刺激百会、神庭穴可减轻老年大鼠胫骨骨折手术后海马神经元损伤和凋亡,减少神经认知障碍,这可能与电针激活 TREM2-DAP12 通路,促进小胶质细胞由 M1 型向 M2 型转变,减轻小胶质细胞炎症反应有关。未来的研究应进一步探讨电针刺激在不同类型手术和不同人群中的应用效果,并全面阐明其作用机制。

利益冲突:所有作者声明不存在利益冲突。

[参考文献]

- [1] 师利敏, 徐平. 髓系细胞触发受体 2 在认知功能障碍中相关机制的研究进展 [J]. 中山大学学报 (医学科学版), 2024, 45 (1): 7-12.
- [2] 张维亮, 季加富, 苏帆, 等. 围术期神经认知障碍患者远期认知功能下降的研究进展 [J]. 临床麻醉学杂志, 2023, 39 (9): 983-986.
- [3] 王翔锋, 黄锦燕, 刘威, 等. 智三针电针预刺激对围手术期神经认知障碍老年大鼠海马组织炎症反应的影响 [J]. 康复学报, 2023, 33 (4): 325-332.
- [4] 李祺, 李成龙, 戚思华. 小胶质细胞表面受体在术后认知功能障碍中的研究进展 [J]. 临床麻醉学杂志, 2022, 38 (8): 883-887.
- [5] 韩雪, 夏天娇, 刘斌文, 等. TREM2 介导小胶质细胞吞噬功能在神经退行性疾病中的作用 [J]. 中国免疫学杂志, 2022, 38 (11): 1388-1394.
- [6] Celarain N, Sánchez-Ruiz de Gordo J, Zelaya MV, et al. TREM2 upregulation correlates with 5-hydroxymethylcytosine enrichment in Alzheimer's disease hippocampus [J]. Clin Epigenetics, 2016, 37 (6): 1-10.
- [7] 冯晓东, 史景, 湾明月, 等. 电针神庭、百会对脑缺血再灌注大鼠认知功能及 Beclin-1 表达的影响 [J]. 中国康复理论与实践, 2018, 24 (1): 49-53.
- [8] 邢东, 吴志新, 董辉, 等. 电针预处理对大鼠脑缺血损伤后脑内炎症反应及 NF- κ B 的影响 [J]. 陕西医学杂志, 2017, 46 (9): 1155-1158.
- [9] Feng PP, Deng P, Liu LH, et al. Electroacupuncture alleviates postoperative cognitive dysfunction in aged rats by inhibiting hippocampal neuroinflammation activated via microglia/tlrs pathway [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2017, 2017: 6421260.
- [10] 赵非一, 张浙元, 赵英侠, 等. 电针预处理对膝关节置换术后老年患者认知功能障碍的影响: 随机对照试验 [J]. 世界针灸杂志, 2018, (4): 231-236.
- [11] 刘茜辉, 张禾, 陈奕君, 等. 血浆 A β 、A β 1-40、A β 1-42 水平及其比值对阿尔兹海默病诊断价值的研究 [J]. 国际检验医学杂志, 2023, 44 (22): 2695-2699, 2705.
- [12] Yao H, Coppola K, Schweig JE, et al. Distinct signaling pathways regulate TREM2 phagocytic and NF- κ B antagonistic activities [J]. Front Cell Neurosci, 2019, 10 (13): 457.
- [13] 张玉琴, 马君芳, 孟艳艳. 中度创伤性脑损伤患者血清神经元特异性烯醇化酶、S100- β 蛋白变化及其与认知功能障碍的相关性 [J]. 中华创伤杂志, 2017, 33 (10): 886-889.
- [14] Ma R, Yuan B, Du J, et al. Electroacupuncture alleviates nerve injury after cerebral ischemia in rats through inhibiting cell apoptosis and changing the balance of MMP-9/TIMP-1 expression [J]. Neurosci Lett, 2016, 633: 158-164.
- [15] Yang P, Chen H, Wang T, et al. Electroacupuncture attenuates chronic inflammatory pain and depression comorbidity by inhibiting hippocampal neuronal apoptosis via the PI3K/Akt signaling pathway [J]. Neurosci Lett, 2023, 812: 137411.

(收稿日期: 2024-09-06)