“化瘀通络”灸对血管性痴呆大鼠少突胶质细胞相关蛋白表达及髓鞘超微结构的影响

高晨辉[1,2]，张庆萍[1]，梅　岚[1]，张　明[1]，王维顺[1]，郑紧紧[1]，樊吟秋[3]，石海平[3]，王　频[1,2]
（[1]安徽中医药大学针灸推拿学院，合肥230038；[2]经脉脏腑相关安徽省重点实验室，合肥230038；[3]安徽中医药大学第一附属医院，合肥230012）

【摘　要】　目的：观察“化瘀通络”灸对血管性痴呆（VD）大鼠胼胝体少突胶质细胞相关蛋白表达及髓鞘超微结构的影响，探讨“化瘀通络”灸治疗VD的作用机制。**方法：**SD大鼠随机分为模型组、化瘀通络灸组、艾灸非穴位组，每组42只，并根据治疗时间分为1个疗程组（7 d，12只）、2个疗程组（14 d，12只）、4个疗程组（28 d，18只）。另取18只大鼠作为假手术组。采用改良的双侧颈总动脉结扎法制备VD大鼠模型。化瘀通络灸组取大鼠“百会”“大椎”“神庭”悬灸，每次20 min，每日1次，7 d为1个疗程。艾灸非穴位组取距其尾部2、3、5 cm处3个不对应任何穴位的部位进行悬灸，疗程同化瘀通络灸组。Morris水迷宫实验检测各组大鼠学习记忆能力；透射电镜法观察各组大鼠髓鞘超微结构，计算有髓神经轴突数量及髓鞘厚度比值（g-ratio）；Western blot法和免疫荧光染色法检测各组大鼠胼胝体区少突胶质细胞标志物2′，3′-环核苷酸-3′-磷酸二酯酶（CNPase）、少突胶质细胞转录因子2（Olig2）、髓鞘少突胶质细胞糖蛋白（MOG）蛋白表达水平和荧光强度。**结果：**与假手术组比较，模型组大鼠各时间点逃避潜伏期延长（$P<0.01$），穿越原平台次数减少（$P<0.01$），髓鞘结构稀疏、模糊，部分膨出和崩解，少突胶质细胞形态不规则，髓鞘厚度变薄，胼胝体区有髓神经轴突数量明显减少（$P<0.01$），g-ratio值增大（$P<0.01$），CNPase、Olig2、MOG荧光强度及蛋白表达水平均降低（$P<0.01$）；与模型组比较，化瘀通络灸组在干预2、4个疗程后逃避潜伏期缩短（$P<0.01$），穿越原平台次数增加（$P<0.01$），髓鞘结构较模型组得到明显修复，胼胝体区有髓神经轴突数量显著增加（$P<0.01$），g-ratio值减小（$P<0.01$），各疗程组CNPase、Olig2、MOG荧光强度及蛋白表达水平均升高（$P<0.01$，$P<0.05$），各疗程化瘀通络灸组均优于艾灸非穴位组（$P<0.01$）。**结论：**“化瘀通络”灸可能通过促进少突胶质前体细胞增殖分化为成熟少突胶质细胞，参与髓鞘再生，优化神经传导功能，从而改善VD大鼠学习记忆能力，以“化瘀通络”灸干预4个疗程作用最佳。

【关键词】　血管性痴呆；化瘀通络灸；少突胶质细胞；髓鞘再生；胼胝体

Effect of “Huayu Tongluo” moxibustion on expressions of oligodendrocyte-related proteins and myelin ultrastructure in the corpus callosum in rats with vascular dementia

GAO Chen-hui[1,2], ZHANG Qing-ping[1], MEI Lan[1], ZHANG Ming[1], WANG Wei-shun[1], ZHENG Jin-jin[1], FAN Yin-qiu[1], SHI Hai-ping[3], WANG Pin[3] ([1]College of Acupuncture-moxibustion and Tuina, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230038, China; [2]Anhui Provincial Key Laboratory of Meridian Viscera Correlation, Hefei 230038; [3]The Second Department of Acupuncture-moxibustion Rehabilitation of the First Affiliated Hospital of Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012)

【ABSTRACT】　Objective　To observe the effect of “Huayu Tongluo”（blood stasis-removing and meridian-collateral dredging）moxibustion on oligodendrocyte-related protein expression and myelin ultrastructure in the corpus callosum tissue of rats with vascular dementia（VD）, so as to explore its mechanism underlying improvement of VD.

【DOI】10.13702/j.1000-0607.20240658
引用格式：高晨辉，张庆萍，梅岚，等.“化瘀通络”灸对血管性痴呆大鼠少突胶质细胞相关蛋白表达及髓鞘超微结构的影响[J].针刺研究，2025，50(9)：1046-1054.
项目来源：国家自然科学基金项目（No.82104994）；安徽省教育厅高校科学研究项目（No.KJ2021A0559）；杨骏全国名中医传承工作室项目（No.皖中医药发展秘〔2022〕19号）；第七批全国老中医药专家学术经验继承项目（国中医药办人教函）（No.〔2021〕272号）
通信作者：王频，E-mail：wangpin1890@163.com

Methods Male SD rats were randomly divided into model group, "Huayu Tongluo" moxibustion group and non-acupoint moxibustion group, with 42 rats in each group. According to the treatment time, the rats were further divided into 1 course (7 d) group (n=12), 2 courses (14 d) group (n=12) and 4 courses (28 d) group (n=18), and the other 18 rats were used as the sham operation group. The VD model was established by using modified 2-vessel occlusion (VO) method. The rats in the "Huayu Tongluo" moxibustion group were treated with suspended moxibustion of "Baihui" (GV20), "Dazhui"(GV14) and "Shenting"(GV24) for 20 min, once a day for 7 d, 14 d or 28 d, respectively. The rats of the non-acupoint moxibustion group were treated with suspended moxibustion at the three locations 2, 3 and 5 cm away from the tail, and the course of treatment was the same as that of "Huayu Tongluo" moxibustion group. Morris water maze test was used to assess the rats' learning-memory ability. A transmission electron microscopy was used to observe the ultrastructure of myelin sheath and the number of myelinated nerve axons, and to calculate the g-ratio (axon diameter/(axon diameter + myelin sheath thickness)) of the myelin sheath thickness. Western blot and immunofluorescence staining were used to separately detect the expressions and fluorescence intensities of oligodendrocyte markers 2',3'-cyclic nucleotide-3'-phosphodiesterase (CNPase), oligodendrocyte transcription factor 2 (Olig2) and myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) in the corpus callosum of each group. **Results** Compared with the sham operation group, the model group showed prolonged escape latency (P<0.01) and reduced number of platform quadrant crossings (P<0.01) in the 1, 2 and 4 courses of treatment, significantly decreased number of myelinated nerve axons in the corpus callosum (P<0.01), increased g-ratio value of axonal myelin (P<0.01), and decreased relative fluorescence intensities and expression levels of CNPase, Olig2, and MOG proteins in the 1, 2 and 4 courses of intervention (P<0.01). Compared with the model group, the "Huayu Tongluo" moxibustion group showed shortened escape latency (P<0.01) and increased number of platform quadrant crossing after 2 and 4 courses of intervention (P<0.01), significantly increased number of myelinated nerve axons (P<0.01), decreased g-ratio value of axonal myelin, and significantly elevated relative fluorescence intensities and protein expression levels of CNPase, Olig2, and MOG in all the different courses of intervention (P<0.01, P<0.05); and the non-acupoint moxibustion group had an increase in the immunofluorescence intensities of CNPase and MOG, and the expression of CNPase protein in the 4 courses of intervention (P<0.05). Comparison between the two treatment groups showed that the effect of "Huayu Tongluo" moxibustion was significantly superior to that of non-acupoint moxibustion in lowering the g-ratio of axonal myelin (P<0.05), and in up-regulating the number of myelinated nerve axons, and the immunofluorescence intensities and protein expressions of CNPase, Olig2 and MOG in the 3 different courses of intervention (P<0.01, P<0.05). **Conclusion** "Huayu Tongluo" moxibustion can improve the learning-memory ability of VD rats, which may be related to its functions in promoting the proliferation and differentiation of oligodendrocyte precursor cells into mature oligodendrocytes, and up-regulating the protein expressions of CNPase, Olig2 and MOG in the corpus callosum. The therapeutic effect was the best in the 4 courses of intervention.

【KEYWORDS】 Vascular dementia; "Huayu Tongluo" moxibustion; Oligodendrocytes; Myelin regeneration; Corpus callosum

血管性痴呆(VD)是因中风及其他血管性脑损伤导致的获得性智能损害和认知障碍的慢性进行性疾病,主要由脑血流量显著减少引起[1-2]。研究[3]表明,脑白质的完整性对于脑缺血缺氧后的修复极为重要。少突胶质细胞及其髓鞘是脑白质的主要组成部分,脑部血流低灌注时,少突胶质细胞脱髓鞘并大量死亡,而少突胶质前体细胞(OPCs)可增殖并分化为成熟少突胶质细胞重新形成髓鞘[4]。既往研究[5]表明,电针治疗可以促进脑血流灌注不足小鼠少突胶质细胞再生,改善白质损伤后的记忆功能。"化瘀通络"灸法是在长期的临床实践中总结出的治疗脑血管病的方法,治疗VD疗效明确[6-8]。本实验通过观察"化瘀通络"灸对VD大鼠少突胶质细胞蛋白表达及髓鞘超微结构的影响,以期进一步阐释其治疗VD的可能机制,为临床治疗提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　实验动物与分组

选用3～4月龄SPF级雄性SD大鼠148只,体质量250～300 g,由济南朋悦实验动物繁育有限公司提供,生产许可证编号:SCXK(鲁)2019-0003,饲养于安徽中医药大学针灸经络研究所(室温24～26 ℃,湿度55%～60%,12 h昼夜循环光照,自由摄

食饮水)。常规饲养1周后,通过Morris水迷宫实验剔除贴壁悬浮或原地打转的大鼠。随机筛选出18只为假手术组。其余大鼠采用改良的双侧颈总动脉永久结扎(2-VO)法制备VD模型,通过Morris水迷宫实验鉴定VD模型,将造模成功的大鼠随机分为模型组、化瘀通络灸组、艾灸非穴位组,每组42只。再根据各治疗时程分为3个亚组:1疗程组(7 d,12只)、2疗程组(14 d,12只)、4疗程组(28 d,18只)。本实验的所有动物处理均符合实验动物伦理的相关要求[9],并通过安徽中医药大学实验动物伦理委员会审查,动物伦理编号:AHUCMrats-2022034。

1.2　主要试剂与仪器

山羊抗兔IgG(FITC)、封闭用羊血清(工作液)、抗荧光淬灭封片剂(安徽欣乐),2′,3′-环核苷酸-3′-磷酸二酯酶(CNPase)、少突胶质细胞转录因子2(Olig2)、髓鞘少突胶质细胞糖蛋白(MOG)、GAPDH一抗(北京博奥森),山羊抗小鼠IgG、山羊抗兔IgG(北京中杉金桥),戊巴比妥钠(美国Sigma-Aldrich),异氟烷(深圳瑞沃德)。

陈艾条(安阳九头仙艾),Morris水迷宫及图像采集分析系统(北京众实迪创),高速冷冻离心机(安徽嘉文),超薄切片机(德国徕卡),数字切片扫描仪(匈牙利3DHISTECH),生物组织包埋机(湖北亚光),电泳仪、电泳槽、转膜仪(上海天能),透射电子显微镜(日本HITACHI)。

1.3　模型制备

采用改良的2-VO法制备VD模型[10]:将大鼠仰卧位固定于手术板,使用小动物吸入式麻醉机保持其麻醉状态,剔除毛发,在大鼠颈部正中行纵向切口,用角镊钝性分离一侧颈总动脉,玻璃分针挑起颈总动脉,避免触碰神经,6-0外科缝线分别在动脉近心端及远心端永久结扎动脉,待确定结扎成功后,从中间剪断动脉,使用庆大霉素注射液浸润伤口,以防感染。4-0外科缝线缝合伤口,缝合后局部消毒。一周后再以上述方法处理另外一侧颈总动脉。假手术组按上述操作,仅分离双侧颈总动脉不做其他处理。双侧颈总动脉结扎后3 d,通过Morris水迷宫实验鉴定VD模型。以造模大鼠第4天逃避潜伏期均值较假手术组延长且差异具有统计学意义为模型复制成功[11]。共造模130只,术中术后死亡2只,不符合造模成功标准2只,最终造模成功126只。

1.4　干预方法

化瘀通络灸组:参照《实验针灸学》[12]定位"百会""大椎""神庭"并剃毛标记。治疗需在大鼠清醒状态下进行,将VD大鼠置于特制灸架上,操作者手持艾条(直径7 mm,长12 cm),置于穴位上方2～3 cm处,每穴悬灸20 min。每日治疗1次,7 d为1个疗程,各亚组根据治疗时程进行相应治疗。

艾灸非穴位组:大鼠置于灸架后,取距其尾根部2、3、5 cm处3个不对应任何穴位的部位剃毛标记,艾灸方法及疗程同化瘀通络灸组。

模型组及假手术组:只置于灸架上而不进行其他任何处理,放置时间与化瘀通络灸组相同。

1.5　观察指标及检测方法

Morris水迷宫实验检测大鼠学习记忆能力:将大鼠放入直径约1.2 m、高度约0.5 m的圆形水池,池中放置1个直径约10 cm的隐蔽平台,水温保持在(22±1)℃。将大鼠放入水池中自由游动60 s,以适应环境。随后进入训练阶段,每次将大鼠从不同象限放入水池中,并记录各组大鼠在120 s内找到平台的时间(即逃避潜伏期)。前3 d为训练期,第4天的数据用于统计分析。第5天,撤去平台,将大鼠从任选的同一象限入水点放入水中,检测其在2 min内跨越原平台的次数。分别于干预前及各亚组相应疗程结束后24 h进行上述实验。

组织取材:各亚组相应疗程干预结束后,腹腔注射3%戊巴比妥钠(0.3 mL/100 g)对大鼠进行麻醉。每组取6只大鼠固定在手术台上,暴露心脏并插入导管。首先使用0.9%氯化钠溶液进行心脏灌注,随后使用4%多聚甲醛溶液进行灌注以固定组织。取固定后的脑组织经过脱水处理、石蜡包埋,切成厚度为5 μm的切片,用于免疫荧光检测。每组另取6只大鼠,麻醉后断头取脑,在冷冻台上快速分离出胼胝体区,存放在冻存管并储存于-80 ℃冰箱中,用于Western blot检测。第4疗程大鼠干预结束后取各组剩余的6只大鼠,麻醉取脑后于冷冻台上快速分离出胼胝体区,冠状面切取并修剪成1 mm×1 mm×1 mm大小组织块,浸没于2.5%戊二醛中固定,用于透射电镜观察。

透射电镜观察大鼠胼胝体区髓鞘超微结构:取戊二醛中固定的胼胝体区组织,将标本用0.1 mmol/L磷酸缓冲液漂洗3次后,锇酸固定2 h,再用上述缓冲液洗3次后,逐级梯度乙醇、丙酮脱水,环氧丙烷过渡。用环氧树脂包埋,60 ℃烤箱聚合48 h。使用超薄切片机按冠状面方向切片,厚度60～80 nm,醋

酸铀和柠檬酸铅双重染色后透射电镜观察。使用Image-Pro Plus 6.0软件计算有髓神经轴突数量、直径及髓鞘厚度，计算g-ratio值，g-ratio值＝轴突直径÷(轴突直径＋髓鞘厚度)。

免疫荧光染色法检测大鼠胼胝体区CNPase、Olig2、MOG蛋白表达量：取每组6只大鼠4%多聚甲醛固定的胼胝体区组织，常规石蜡包埋、切片(厚度5 μm)，洗净，经高压修复后，先滴加3%过氧化氢溶液，室温避光孵育10 min，去除内源性过氧化物酶，然后滴加山羊血清封闭液室温避光孵育30 min。封闭结束后，分别滴加CNPase、Olig2、MOG一抗(均1∶200)，孵育60 min。取出切片，PBST冲洗3次。甩去切片上多余的液体，滴加免疫荧光二抗IgG(1∶400)，加盖置于37 ℃培养箱避光孵育30 min。取出切片，PBST冲洗3次。用抗荧光淬灭封片剂(含DAPI)封片。数字切片扫描仪扫描荧光切片，运用Image J软件分析计算目的蛋白的荧光强度。

Western blot法检测大鼠胼胝体区CNPase、Olig2、MOG蛋白相对表达量：取100 mg冻存胼胝体区组织，用RIPA裂解缓冲液提取总蛋白，使用BCA蛋白浓度测定试剂盒检测蛋白浓度。制备凝胶，电泳、转膜、封闭，加入CNPase(1∶5 000)、Olig2(1∶1 000)、MOG(1∶2 000)、GAPDH(1∶2 000)一抗，4 ℃孵育过夜，TBST洗膜后，加入HRP标记的对应二抗(1∶20 000)室温孵育1.2 h。滴加ECL发光液后避光静置5 min，置于成像分析仪自动成像，使用Image J软件分析蛋白条带灰度值，以目的蛋白条带灰度值与内参蛋白GAPDH条带灰度值的比值作为目的蛋白的相对表达量。

1.6　统计学处理

采用SPSS26.0进行统计学分析，所有数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。若数据符合正态分布且方差齐，多组间比较采用单因素或双因素方差分析，进一步两两比较采用LSD法。若数据不符合正态分布，则进行秩和检验。以$P\leqslant0.05$为差异有统计学意义的标准。

2　结果

2.1　各组大鼠学习记忆能力结果比较

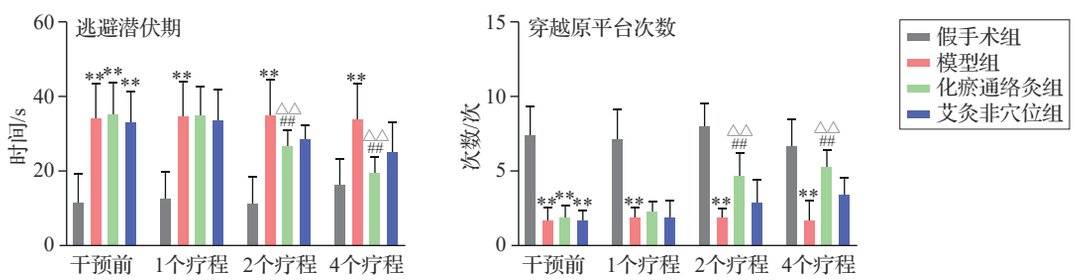
与假手术组比较，模型组大鼠干预前后各时间点逃避潜伏期延长($P<0.01$)，穿越原平台次数减少($P<0.01$)；与模型组比较，化瘀通络灸组大鼠干预2、4个疗程后逃避潜伏期缩短($P<0.01$)，穿越原平台次数增加($P<0.01$)；与艾灸非穴位组比较，化瘀通络灸组大鼠干预2、4个疗程后逃避潜伏期缩短($P<0.01$)，穿越原平台次数增加($P<0.01$)。见图1。

2.2　各组大鼠胼胝体区超微结构及有髓神经轴突数量、髓鞘厚度的比较

假手术组髓鞘结构致密，少突胶质细胞形态正常，髓鞘数量丰富；模型组和艾灸非穴位组髓鞘结构稀疏、模糊，部分膨出和崩解，少突胶质细胞形态不规则，髓鞘厚度变薄；化瘀通络灸组髓鞘结构较模型组得到明显修复，髓鞘数量和厚度增加。与假手术组比较，模型组有髓神经轴突数量减少($P<0.01$)，g-ratio值增大($P<0.01$)；与模型组比较，化瘀通络灸组有髓神经轴突数量显著增加($P<0.01$)，g-ratio值减小($P<0.01$)；与艾灸非穴位组比较，化瘀通络灸组有髓神经轴突数量显著增加($P<0.01$)，g-ratio值减小($P<0.05$)。见图2、图3。

2.3　各组大鼠胼胝体区CNPase、Olig2、MOG表达的荧光强度比较

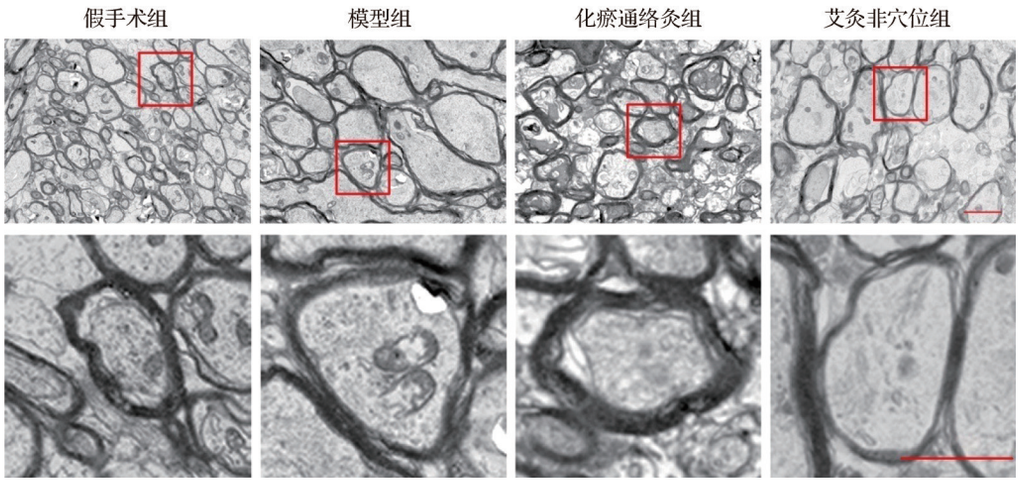
与假手术组比较，模型组各疗程胼胝体区CNPase、Olig2、MOG荧光强度降低($P<0.01$)；与模型组比较，化瘀通络灸组各疗程胼胝体区



注：与同时间点假手术组比较，$^{**}P<0.01$；与同时间点模型组比较，$^{\#\#}P<0.01$；与同时间点艾灸非穴位组比较，$^{\triangle\triangle}P<0.01$。

图1　各组大鼠不同时间点Morris水迷宫实验逃避潜伏期时间及穿越原平台次数比较($\bar{x}\pm s$，8只鼠/组)

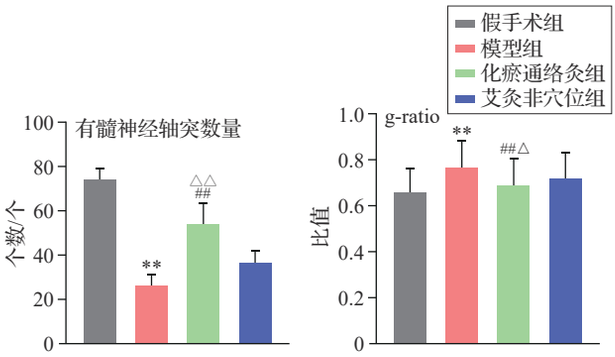
Fig. 1　Comparison of escape latency and counts of original platform crossings in Morris water maze test at different time points of rats in the 4 groups($\bar{x}\pm s$, 8 rats/group)



注：标尺＝2 μm。下排为上排方框处的放大图。

图 2　各组大鼠胼胝体髓鞘超微结构比较（透射电镜）

Fig. 2　Comparison of ultrastructure of the corpus callosum myelin sheath of rats in the 4 groups (transmission electron microscopy)



注：与假手术组比较，$^{**}P<0.01$；与模型组比较，$^{\#\#}P<0.01$；与艾灸非穴位组比较，$^{\triangle}P<0.05$，$^{\triangle\triangle}P<0.01$。

图 3　各组大鼠有髓神经轴突数量与轴突髓鞘 g-ratio 值比较（$\bar{x}\pm s$，6 只鼠/组）

Fig. 3　Comparison of myelinated nerve axon counts and g-ratio value of myelin sheath of rats in the 4 groups ($\bar{x}\pm s$, 6 rats/group)

CNPase、Olig2、MOG 荧光强度升高（$P<0.01$），艾灸非穴位组第 4 疗程胼胝体区 CNPase、MOG 荧光强度升高（$P<0.05$）；与艾灸非穴位组比较，化瘀通络灸组各疗程胼胝体区 CNPase、Olig2、MOG 荧光强度升高（$P<0.01$）。见图 4。

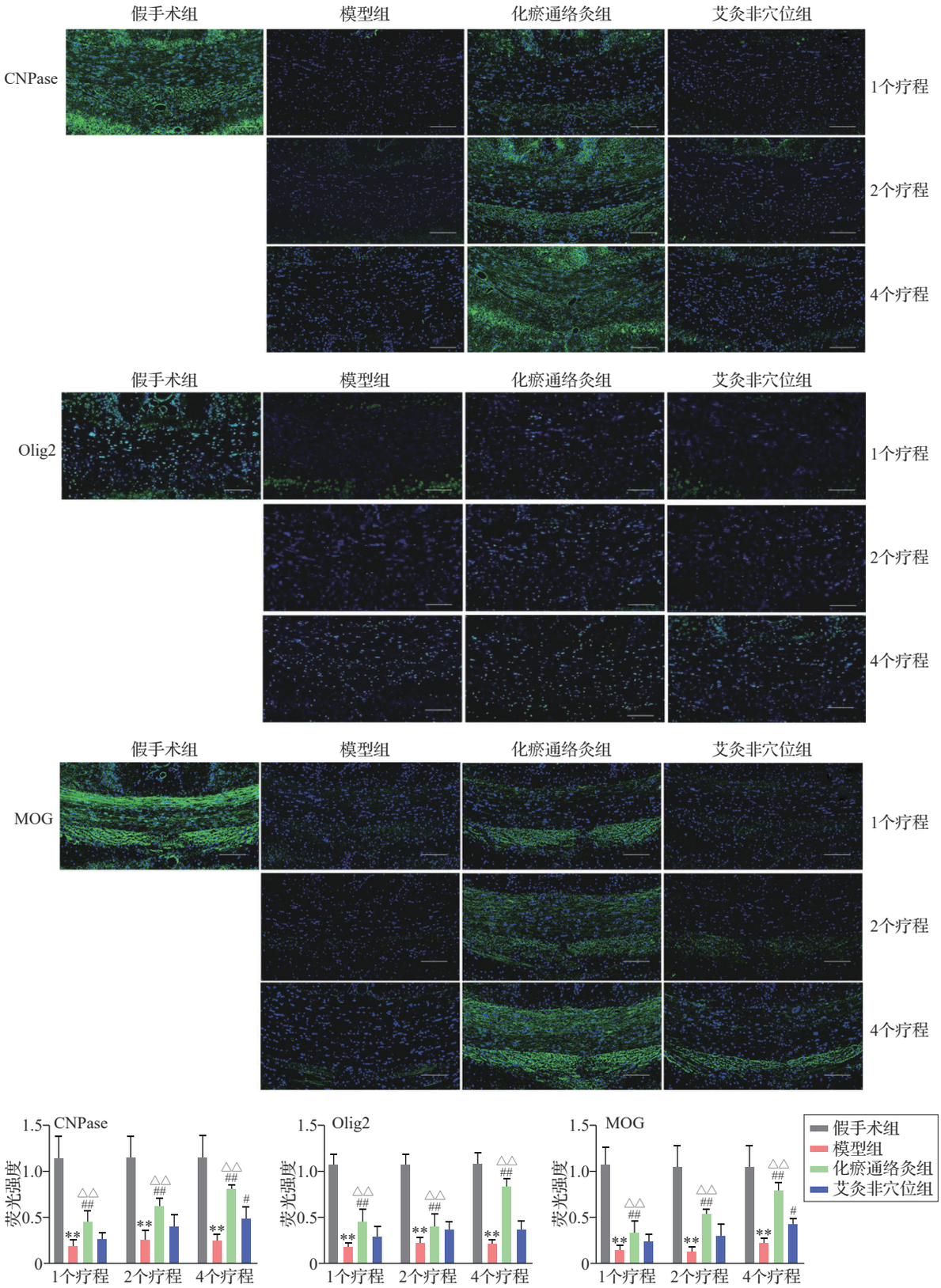
2.4　各组大鼠胼胝体区 CNPase、Olig2、MOG 蛋白表达量的比较

干预第 1、2、4 疗程后，与假手术组比较，模型组大鼠胼胝体区组织中 CNPase、Olig2、MOG 蛋白表达量均降低（$P<0.01$）；与模型组比较，化瘀通络灸组胼胝体区组织中 CNPase、Olig2、MOG 蛋白表达量升高（$P<0.05$，$P<0.01$）；与艾灸非穴位组比较，化瘀通络灸组胼胝体区组织中 CNPase、Olig2、MOG 蛋白表达量均升高（$P<0.05$）。见图 5。

3　讨论

VD 病机以肾精不足、气血亏虚为本，气滞、痰阻、瘀血为标[13]，针灸治疗可明显改善 VD 症状[14]。“化瘀通络”灸取百会、大椎、神庭三穴，压灸百会，悬灸大椎、神庭，把艾灸的温经通络、消瘀散结作用与腧穴的特异性作用结合，达到“通经络、化瘀血、填髓海、醒神志”之功[15]。

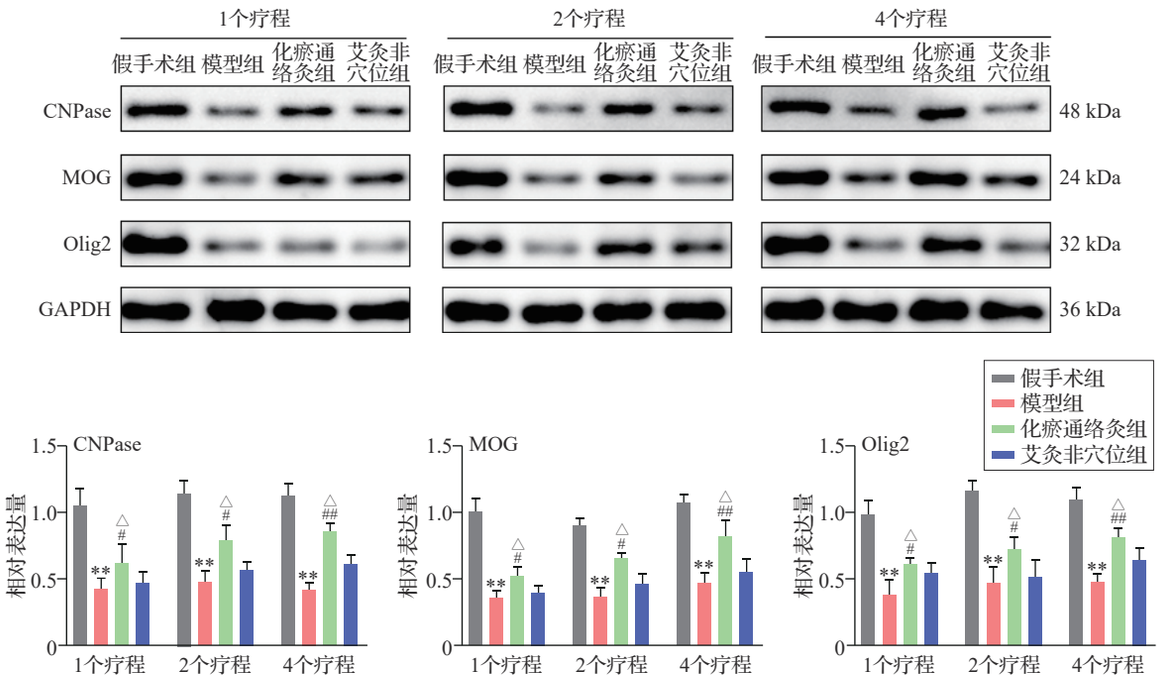
学习记忆功能障碍是 VD 的主要临床表现，本实验通过 Morris 水迷宫实验证实，“化瘀通络”灸能明显改善 VD 大鼠学习记忆能力。慢性脑血流低灌注引起的脑白质病变及继发性神经炎性反应是 VD 认知功能下降的主要因素，导致少突胶质细胞大量丢失、脱髓鞘和小胶质细胞活化[16-20]。少突胶质细胞由 OPCs 分化而来，成熟后有序地合成神经髓鞘的主要结构蛋白[21]。因此，成熟少突胶质细胞的数量、状态与髓鞘损伤直接相关。CNPase 是少突胶质细胞分化和髓鞘形成的早期标志酶，仅在少突胶质细胞分化过程中表达，与髓鞘形成和细胞生长相关[22]。MOG 是髓鞘膜和少突胶质细胞表面的主要蛋白，作为少突胶质细胞成熟和髓鞘形成的标志[23]。此外，Olig2 是神经祖细胞转化为 OPCs 的关键决定因子，可增强少突胶质细胞的分化和再髓鞘化[24]。本实验结果显示，“化瘀通络”灸显著提高了 VD 大鼠胼胝体区 CNPase、Olig2、MOG 蛋白表达，证实其在改善 VD 大鼠记忆功能和促进髓鞘再生方面的积



注：CNPase 为 2′,3′-环核苷酸-3′-磷酸二酯酶，Olig2 为少突胶质细胞转录因子 2，MOG 为髓鞘少突胶质细胞糖蛋白。标尺＝100 μm。与同时间点假手术组比较，$^{**}P<0.01$；与同时间点模型组比较，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$；与同时间点艾灸非穴位组比较，$^{\triangle\triangle}P<0.01$。

图 4　各组大鼠不同时间点胼胝体区 CNPase、Olig2 和 MOG 荧光强度比较（免疫荧光染色，$\bar{x}\pm s$，6 只鼠/组）

Fig. 4　Comparison of fluorescence intensity of CNPase, Olig2 and MOG in corpus callosum at different time points of rats in the 4 groups (immunofluorescence staining, $\bar{x}\pm s$, 6 rats/group)



注：CNPase为2′,3′-环核苷酸-3′-磷酸二酯酶，Olig2为少突胶质细胞转录因子2，MOG为髓鞘少突胶质细胞糖蛋白。与同时间点假手术组比较，$^{**}P<0.01$；与同时点模型组比较，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$；与同时点艾灸非穴位组比较，$^{\triangle}P<0.05$。

图5　各组大鼠不同时间点胼胝体区组织CNPase、Olig2和MOG蛋白表达量的比较（$\bar{x}\pm s$，6只鼠/组）

Fig. 5　Comparison of expression levels of CNPase, Olig2 and MOG in corpus callosum after intervention at different time points of rats in the 4 groups（$\bar{x}\pm s$，6 rats/group）

极作用。

“化瘀通络”灸调节少突胶质细胞和神经髓鞘相关蛋白的表达，可能参与髓鞘损伤的修复和再生。轴突髓鞘化的过程较为复杂[25]，直接观察少突胶质细胞形态及结构的研究方法受到广泛认可[26-28]。髓鞘厚度比值通常指的是髓鞘厚度与轴突直径的比值，这一比值可以反映髓鞘对神经传导速度的影响。通过计算髓鞘厚度比值，可以评估髓鞘化过程是否正常。对大多数哺乳动物而言，理想的g-ratio通常在0.6～0.7之间，这一比值范围可以优化神经传导速度和能量效率[29]。本研究显示，“化瘀通络”灸治疗后的VD大鼠胼胝体区超微结构损伤有所修复，有髓神经轴突数量增加，g-ratio值减小，显示神经功能改善。相比之下，艾灸非穴位治疗效果欠佳，进一步验证了穴位的特异性作用及足量刺激的重要性。

综上所述，“化瘀通络”灸上调了VD大鼠少突胶质细胞相关蛋白标志物的表达，并同步改善髓鞘超微结构，从而提高神经系统的功能和效率，减轻胼胝体病理损伤。本研究结果与前期研究[30-31]结果一致，进一步支持了“化瘀通络”灸通过促进少突胶质细胞的分化和成熟来改善VD大鼠髓鞘病理特征的推测。这些结果为“化瘀通络”灸在临床上的进一步应用提供了坚实的理论基础，但其潜在的神经保护和修复作用仍值得深入研究和验证。

利益冲突　所有作者声明不存在利益冲突。

参考文献

[1] PENDLEBURY S T, ROTHWELL P M, STUDY O V. Incidence and prevalence of dementia associated with transient ischaemic attack and stroke: analysis of the population-based Oxford Vascular Study [J]. Lancet Neurol, 2019, 18(3): 248-258.

[2] PARFENOV V A, OSTROUMOVA O D, OSTROUMOVA T M, et al. Vascular cognitive impairment: pathophysiological mechanisms, insights into structural basis, and perspectives in specific treatments [J]. Neuropsychiatr Dis Treat, 2019, 15: 1381-1402.

[3] MATUTE C, DOMERCQ M, PÉREZ-SAMARTÍN A, et al. Protecting white matter from stroke injury [J]. Stroke, 2013, 44(4): 1204-1211.

[4] 陈鑫，张菁. 脑卒中后少突胶质细胞再生的细胞间相互作用机制[J]. 医学研究杂志，2019，48(2)：165-168.
CHEN X, ZHANG J. Intercellular interaction mechanism of oligodendrocyte regeneration after stroke (in Chinese) [J]. Journal of Medical Research, 2019, 48(2): 165-168.

[5] AHN S M, KIM Y R, KIM H N, et al. Electroacupuncture ameliorates memory impairments by enhancing oligodendrocyte regeneration in a mouse model of prolonged cerebral hypoperfusion[J]. Sci Rep, 2016, 6: 28646.

[6] 吴伟伟，朱敏婕，姜天鑫，等. 化瘀通络灸对非痴呆型血管性认知障碍患者认知功能转归的影响[J]. 中医药临床杂志，2021, 33(10): 1965-1969.
WU W W, ZHU M J, JIANG T X, et al. Effect of Huayu Tongluo moxibustion on the outcome of cognitive function in patients with vascular cognitive impairment no dementia (in Chinese) [J]. Clinical Journal of Traditional Chinese Medicine, 2021, 33(10): 1965-1969.

[7] 张媛媛，张校军，杨骏，等. 化瘀通络灸对血管性痴呆大鼠学习记忆能力及海马BDNF/TrkB表达的影响[J]. 中国针灸，2019, 39(1): 65-71.
ZHANG Y Y, ZHANG X J, YANG J, et al. Effects of Huayu Tongluo moxibustion on learning and memory ability and the hippocampal BDNF/TrkB expressions in the rats of vascular dementia (in Chinese)[J]. Chinese Acupuncture & Moxibustion, 2019, 39(1): 65-71.

[8] 程红亮，钱发才，胡培佳，等. 化瘀通络灸治疗血管性认知障碍的临床疗效观察[J]. 针刺研究，2018, 43(8): 526-530.
CHENG H L, QIAN F C, HU P J, et al. Treatment of vascular cognitive impairment by "Huayu Tongluo" moxibustion (in Chinese)[J]. Acupuncture Research, 2018, 43(8): 526-530.

[9] 《针刺研究》编辑部.《针刺研究》实验动物福利伦理审查清单[J]. 针刺研究，2024, 49(2): 220.
Editorial Board of Acupuncture Research. List of ethical reviews of laboratory animal welfare of *Acupuncture Research* (in Chinese)[J].Acupuncture Research,2024,49(2):220.

[10] 殷宏振，樊烜婷，要文，等. 大鼠血管性痴呆2-VO造模法优化方案的研究评价[J]. 疾病监测与控制，2024, 18(1): 1-4, 11.
YIN H Z, FAN X T, YAO W, et al. Study and evaluation of optimal scheme of 2-VO modeling method for vascular dementia in rats (in Chinese)[J]. Journal of Diseases Monitor & Control, 2024, 18(1): 1-4, 11.

[11] YU J C, LIU C Z, ZHANG X Z, et al. Acupuncture improved cognitive impairment caused by multi-infarct dementia in rats[J]. Physiol Behav, 2005, 86(4): 434-441.

[12] 李忠仁. 实验针灸学[M]. 2版. 北京：中国中医药出版社，2007.
LI Z R. Experimental acupuncturology (in Chinese)[M]. 2nd edition. Beijing: China Press of Traditional Chinese Medicine, 2007.

[13] 董东梅，常诚. 健忘中医论治探讨[J]. 辽宁中医杂志，2017, 44(5): 945-946.
DONG D M, CHANG C. TCM treatment for forgetfulness (in Chinese) [J]. Liaoning Journal of Traditional Chinese Medicine, 2017, 44(5): 945-946.

[14] 李飞，王艳，姜天鑫，等. 针灸治疗血管性痴呆及对血清VEGF和AChE的影响[J]. 中国针灸，2021, 41(08): 851-854.
LI F, WANG Y, JIANG T X, et al. Acupuncture and moxibustion for vascular dementia and its effect on serum VEGF and AChE (in Chinese)[J]. Chinese Acupuncture & Moxibustion, 2021, 41(08): 851-854.

[15] 邹坤霞，雍启正，翟静静. 杨骏运用化瘀通络灸防治血管性痴呆学术思想浅析[J]. 安徽中医药大学学报，2018, 37(2): 37-39.
ZOU K X, YONG Q Z, ZHAI J J. Analysis of Yang Jun's academic thought on preventing and treating vascular dementia by applying Huayu Tongluo moxibustion (in Chinese) [J]. Journal of Anhui University of Chinese Medicine, 2018, 37 (2): 37-39.

[16] PRINS N D, SCHELTENS P. White matter hyperintensities, cognitive impairment and dementia: an update[J]. Nat Rev Neurol, 2015, 11(3): 157-165.

[17] LOVE S, SCOTT MINERS J. White matter hypoperfusion and damage in dementia: post-mortem assessment[J]. Brain Pathol, 2015, 25(1): 99-107.

[18] ZHANG L Y, PAN J J, MAMTILAHUN M, et al. Microglia exacerbate white matter injury *via* complement C3/C3aR pathway after hypoperfusion[J]. Theranostics, 2020, 10(1): 74-90.

[19] LI M X, MENG N, GUO X, et al. Dl-3-n-butylphthalide promotes remyelination and suppresses inflammation by regulating AMPK/SIRT1 and STAT3/NF-κB signaling in chronic cerebral hypoperfusion [J]. Front Aging Neurosci, 2020, 12: 137.

[20] QIN C, FAN W H, LIU Q, et al. Fingolimod protects against ischemic white matter damage by modulating microglia toward M2 polarization *via* STAT3 pathway [J]. Stroke, 2017, 48(12): 3336-3346.

[21] SEEKER L A, WILLIAMS A. Oligodendroglia heterogeneity in the human central nervous system [J]. Acta Neuro Pathol, 143(2): 143-157.

[22] FENG R L, WANG J, LUO G H, et al. Dcf1 deficiency induces hypomyelination by activating Wnt signaling[J]. Exp Neurol, 2021, 335: 113486.

[23] JAYANANTH P, MADHUMITHA R, RAMYA L. Imperative role of glycosylation in human MOG-HLA interaction: molecular insights of MOG-Ab associated demyelination[J]. J Biomol Struct Dyn, 2022, 40(15): 7027-

7037.

[24] XU J, ZHAO J X, WANG R, et al. Shh and Olig2 sequentially regulate oligodendrocyte differentiation from hiPSCs for the treatment of ischemic stroke[J]. Theranostics, 2022, 12(7): 3131-3149.

[25] EMERY B, WOOD T L. Regulators of oligodendrocyte differentiation[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2024, 16(6): a041358.

[26] 杨成，谭程方，杨祝歆，等. 电针联合细胞移植对脊髓损伤大鼠轴突再髓鞘化的作用及神经调节蛋白Nrg1的影响[J]. 针刺研究，2021，46(12)：987-995.

YANG C, TAN C F, YANG Z X, et al. Effect of electroacupuncture combined with Schwann cell transplantation on remyelination of axons and neuregulin1 expression in rats with compressed spinal injury (in Chinese) [J]. Acupuncture Research, 2021, 46(12): 987-995.

[27] 陈蔚，李恒聪，万红叶，等. 电针对膝关节骨关节炎大鼠滑膜炎性反应期自发痛及后期触诱发痛的影响[J]. 中国针灸，2022，42(12)：1385-1393.

CHEN W, LI H C, WAN H Y, et al. Effect of electroacupuncture on spontaneous pain during the synovial inflammatory response stage and allodynia at the later stage in rats with knee osteoarthritis (in Chinese) [J]. Chinese Acupuncture & Moxibustion, 2022, 42(12): 1385-1393.

[28] DJANNATIAN M, RADHA S, WEIKERT U, et al. Myelination generates aberrant ultrastructure that is resolved by microglia[J]. J Cell Biol, 2023, 222(3): e202204010.

[29] 张进禄. 神经系统超微结构[M]. 北京：中国协和医科大学出版社，2011.

ZHANG J L. Ultrastructure of the nervous system (in Chinese)[M]. Beijing: China Union Medical College Press, 2011.

[30] 王维顺，杨骏，樊吟秋，等. 化瘀通络灸对血管性痴呆大鼠髓鞘再生相关蛋白表达的影响[J]. 安徽中医药大学学报，2023，42(1)：44-49.

WANG W S, YANG J, FAN Y Q, et al. The effect of Huayu Tongluo moxibustion on the expression of myelin regeneration related proteins in vascular dementia rats (in Chinese)[J].Journal of Anhui University of Chinese Medicine, 2023, 42(1): 44-49.

[31] 孔钰，杨骏，樊吟秋，等. 基于Sonic Hedgehog信号通路探讨化瘀通络灸促血管性痴呆大鼠髓鞘再生的作用机制[J]. 针刺研究，2023，48(6)：578-584.

KONG Y, YANG J, FAN Y Q, et al. "Huayu Tongluo" moxibustion improves learning-memory ability and promotes myelin regeneration by regulating Sonic Hedgehog signaling pathway in vascular dementia rats (in Chinese) [J]. Acupuncture Research, 2023, 48(6): 578-584.

收稿日期：2024-06-30　修回日期：2024-11-20
网络首发：2025-02-21　　编辑：刘婉宁