

## 祛痰治呛方穴位敷贴脑缺血再灌注损伤后吞咽障碍大鼠的作用机制

华晓琼<sup>1</sup>, 李彦杰<sup>2</sup>, 秦合伟<sup>2</sup>, 金小琴<sup>1</sup>, 任 锐<sup>2</sup>, 张志鑫<sup>2</sup>, 朱博超<sup>1</sup>, 王煜普<sup>1</sup><https://doi.org/10.12307/2023.824>

投稿日期: 2022-08-25

采用日期: 2022-11-08

修回日期: 2023-01-04

在线日期: 2023-01-19

中图分类号:

R459.9; R318; R274.9

文章编号:

2095-4344(2023)32-05155-07

文献标识码: B

文章快速阅读: 祛痰治呛方穴位敷贴调控脑缺血再灌注损伤后吞咽障碍大鼠的吞咽功能



随机对照实验: 70只SD大鼠随机分为正常组, 缺血再灌注损伤模型组, 贴敷组, 假贴敷组。贴敷组给予祛痰治呛方穴位敷贴治疗, 假贴敷组给予无药物贴敷, 其余两组正常饲养4周。

大鼠体质量、吞咽启动反应时间及吞咽次数、脑组织含水量; 延髓吞咽中枢疑核处受体的表达。

祛痰治呛方穴位贴敷可以改善脑缺血再灌注损伤后吞咽障碍大鼠的吞咽功能, 且与吞咽中枢疑核内的神经递质谷氨酸受体、 $\gamma$ 氨基丁酸受体和c-fos蛋白等密切相关。

## 文题释义:

**疑核:** 是脑神经运动核。位于延髓被盖部的网状结构中, 为长棒状的核团, 自延髓脑桥分界处起, 下达锥体交叉平面。核发出纤维走行于舌咽神经、迷走神经和副神经之中, 支配咽、喉、软腭部横纹肌。

**吞咽:** 是一个非常复杂的反射过程, 大脑皮质的高级中枢接受外周感受器的神经冲动, 并将其传至延髓的吞咽中枢, 最后经传出神经将神经信息传达到吞咽肌群。

## 摘要

**背景:** 前期临床研究发现祛痰治呛方穴位敷贴对于改善脑卒中后吞咽障碍患者的吞咽功能有一定疗效, 但作用机制不明确。在脑干吞咽中枢, 疑核是腹侧区吞咽中枢的主要构成部分, 并且能够诱发吞咽动作的出现和吞咽时间的产生, 而疑核内谷氨酸受体、 $\gamma$ 氨基丁酸受体、c-fos蛋白等递质与吞咽密切相关。

**目的:** 观察祛痰治呛方穴位敷贴对缺血再灌注损伤大鼠疑核内神经递质谷氨酸受体、 $\gamma$ 氨基丁酸受体及c-fos蛋白表达的影响, 探究祛痰治呛方穴位敷贴治疗短暂性脑缺血再灌注大鼠吞咽障碍的机制。

**方法:** 70只SD大鼠随机分为正常组( $n=16$ ), 缺血再灌注损伤模型组( $n=18$ ), 贴敷组( $n=18$ ), 假贴敷组( $n=18$ )。模型组、贴敷组、假贴敷组采用线栓法短暂脑缺血90 min后再灌注进行造模, 造模6 h后进行神经功能评分, 选取评分为2分的大鼠进入后续实验; 造模第2天贴敷组给予祛痰治呛方穴位敷贴治疗, 假贴敷组在模型制备的基础上给予无药物贴敷, 其余两组正常饲养1个月。记录各组大鼠造模后第2, 7, 14, 30天体质量、吞咽启动反应时间及吞咽次数。治疗4周后, 测定各组大鼠的脑组织含水量, 采用免疫组化法、RT-PCR、Western blot法检测延髓吞咽中枢疑核处谷氨酸受体1N-甲基-D-天门冬氨酸受体(NMDAR1)、氨基丁酸A型受体 $\alpha 1$ (GABAA R $\alpha 1$ )和c-fos蛋白的表达。

**结果与结论:** ①与正常组相比, 模型组、贴敷组和假贴敷组大鼠体质量、1 min内吞咽次数在造模后第14, 30天时均减少( $P < 0.05$ ), 吞咽启动反应时间均延长( $P < 0.05$ ); 第30天时, 与模型组相比, 贴敷组大鼠体质量、吞咽次数增加( $P < 0.05$ ), 吞咽启动时间缩短( $P < 0.05$ ); ②治疗4周后, 与模型组相比, 贴敷组大鼠脑组织含水量减少( $P < 0.05$ ); ③与模型组相比, 贴敷组延髓疑核处氨基丁酸A型受体 $\alpha 1$ 阳性数量、mRNA和蛋白表达增加, 但仍低于正常组, 1N-甲基-D-天门冬氨酸受体和c-fos阳性数量、mRNA和蛋白表达降低, 但仍高于正常组, 差异有显著性意义( $P < 0.05$ ); ④结果表明, 祛痰治呛方穴位贴敷可以改善脑卒中后吞咽障碍大鼠的吞咽功能, 其作用机制可能与改善脑水肿程度, 调节吞咽中枢疑核内的神经递质谷氨酸受体、 $\gamma$ 氨基丁酸受体和c-fos蛋白等密切相关。

**关键词:** 吞咽障碍; 短暂性脑缺血再灌注; 疑核; 脑水肿; 氨基丁酸A型受体 $\alpha 1$ ; 1N-甲基-D-天门冬氨酸受体; c-fos

## Acupoint dressing therapy using Expectant Choking Formula for swallowing disorders in rats after cerebral ischemia-reperfusion injury

Hua Xiaoqiong<sup>1</sup>, Li Yanjie<sup>2</sup>, Qin Hewei<sup>2</sup>, Jin Xiaoqin<sup>1</sup>, Ren Kun<sup>2</sup>, Zhang Zhixin<sup>2</sup>, Zhu Bochao<sup>1</sup>, Wang Yupu<sup>1</sup>

<sup>1</sup>School of Rehabilitation Medicine, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, Henan Province, China; <sup>2</sup>Department of Rehabilitation, Henan Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, Henan Province, China

Hua Xiaoqiong, Master candidate, School of Rehabilitation Medicine, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, Henan Province, China

**Corresponding author:** Li Yanjie, Professor, Chief physician, Master's supervisor, Department of Rehabilitation, Henan Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, Henan Province, China

<sup>1</sup>河南中医药大学康复医学院, 河南省郑州市 450046; <sup>2</sup>河南省中医院康复科, 河南省郑州市 450046

第一作者: 华晓琼, 女, 1997年生, 河南省漯河市人, 汉族, 河南中医药大学在读硕士, 主要从事脑病、脊髓损伤的康复研究。

通讯作者: 李彦杰, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 河南省中医院康复科, 河南省郑州市 450046

<https://orcid.org/0000-0001-7332-9876> (华晓琼)

基金资助: 河南省科技攻关计划项目(222102310569), 项目负责人: 李彦杰; 河南省中医药科学研究专项课题(2022ZY1083), 项目负责人: 李彦杰;

河南省中医药拔尖人才培养项目(豫中医科教[2018]35号), 项目负责人: 李彦杰; 中原英才计划中原青年拔尖人才项目(豫

人才办[2021]1号), 项目负责人: 秦合伟; 河南省自然科学基金项目(212300410191), 项目负责人: 金小琴; 河南省中医药

科学研究专项课题(20-21ZY2121), 项目负责人: 任锐

引用本文: 华晓琼, 李彦杰, 秦合伟, 金小琴, 任锐, 张志鑫, 朱博超, 王煜普. 祛痰治呛方穴位敷贴脑缺血再灌注损伤后吞咽

障碍大鼠的作用机制[J]. 中国组织工程研究, 2023, 27(32):5155-5161.



## Abstract

**BACKGROUND:** Previous clinical studies have found that acupoint dressing therapy using Expectorant Choking Formula is effective in improving swallowing function in patients with post-stroke swallowing disorders, but the mechanism of action is unclear. In the brainstem swallowing center, the nucleus ambiguus is the main component of the swallowing center in the ventral region, which can induce swallowing movements and swallowing time, while glutamate receptors,  $\gamma$ -aminobutyric acid receptors, and c-fos protein in the nucleus ambiguus are closely related to swallowing.

**OBJECTIVE:** To investigate the effects of acupoint dressing therapy using Expectorant Choking Formula on the expression of glutamate receptors,  $\gamma$ -aminobutyric acid receptors, and c-fos protein in the nucleus ambiguus of rats with ischemia-reperfusion injury, and to investigate the mechanism of swallowing disorder in rats with cerebral ischemia-reperfusion treated by acupoint dressing therapy using Expectorant Choking Formula.

**METHODS:** Seventy Sprague-Dawley rats were randomly divided into normal group ( $n=16$ ), ischemia-reperfusion injury model group ( $n=18$ ), patching group ( $n=18$ ), and sham patching group ( $n=18$ ). The model group, patching group, and sham patching group were modeled by reperfusion after 90 minutes of transient cerebral ischemia using the thread-occlusion method. After 6 hours of modeling, neurological function was scored and the rats with a score of 2 were selected for subsequent experiments. The rats were treated with acupoint dressing therapy using Expectorant Choking Formula on the second day of modeling, the sham patching group was given drug-free dressing on the basis of the model preparation, and the other two groups were kept normally for 1 month. Body mass, swallowing initiation response time and the number of swallows were recorded in each group on days 2, 7, 14 and 30 after modeling. After 4 weeks of treatment, the water content in brain tissue was measured; the expression of gamma-aminobutyric acid A receptor  $\alpha 1$ , N-methyl-D-aspartate receptor 1 and c-fos protein in the nucleus ambiguus of the medullary swallowing center was detected by immunohistochemistry, RT-PCR and western blot.

**RESULTS AND CONCLUSION:** Compared with the normal group, the body mass, the number of swallows within 1 minute and swallow initiation reaction time of rats in the model, patching and sham patching groups decreased on days 14 and 30 after modeling ( $P < 0.05$ ), and the swallow initiation reaction time was prolonged ( $P < 0.05$ ); on day 30, the body mass and the number of swallows of rats increased in the patching group compared with the model group ( $P < 0.05$ ), while the swallowing initiation time was shortened ( $P < 0.05$ ). After 4 weeks of treatment, the water content of brain tissue was significantly reduced in the patching group compared with the model group ( $P < 0.05$ ). Compared with the model group, the positive expression and the mRNA and protein expression of gamma-aminobutyric acid A receptor  $\alpha 1$  in the nucleus ambiguus of the medulla oblongata were increased in the patching group but still lower than those in the normal group; the positive expression and the mRNA and protein expression of N-methyl-D-aspartate receptor 1 and c-fos were decreased in the patching group but significantly higher than those in the normal group ( $P < 0.05$ ). These findings indicate that the acupoint dressing therapy using Expectorant Choking Formula could improve the swallowing function of rats with post-stroke swallowing disorder, and its mechanism of action might be related to improving the degree of brain edema, regulating the neurotransmitters glutamate receptors, gamma-aminobutyric acid A receptors and c-fos protein levels in the nucleus ambiguus.

**Key words:** swallowing disorder; transient cerebral ischemia-reperfusion; nucleus ambiguus; brain edema; gamma-aminobutyric acid A receptor  $\alpha 1$ ; N-methyl-D-aspartate receptor 1; c-fos

**Funding:** Science and Technology Project of Henan Province, No. 222102310569 (to LYJ); Henan Special Research Project of Traditional Chinese Medicine, No. 2022ZY1083 (to LYJ); Top Talents Training Program of TCM in Henan Province, No.[2018]35 (to LYJ); Youth Top Talent Project of Central Plains Talent Program, No. [2021]1 (to QHW); Natural Science Foundation of Henan Province, No. 212300410191 (to JXQ); Special Research Project of Traditional Chinese Medicine in Henan Province, No. 20-21ZY2121 (to RK)

**How to cite this article:** HUA XQ, LI YJ, QIN HW, JIN XQ, REN K, ZHANG ZX, ZHU BC, WANG YP. Acupoint dressing therapy using Expectorant Choking Formula for swallowing disorders in rats after cerebral ischemia-reperfusion injury. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2023;27(32):5155-5161.

## 0 引言 Introduction

吞咽为食物经口摄入并经咽腔和食管传送入胃的全过程。狭义的吞咽障碍指多种原因所致口咽部及食管结构与功能异常而造成；广义的吞咽障碍概念应包含认知和精神心理等引起的行为异常导致吞咽和进食问题即摄食-吞咽障碍<sup>[1]</sup>。吞咽障碍因其较高的发病概率和病情结果的严重性，成为了一个社会大众都较为关心的问题<sup>[2]</sup>。欧美等发达国家对吞咽功能流行病学调查研究发现，吞咽障碍的患病率为11.4%~84.0%<sup>[3]</sup>。吞咽障碍的出现常导致反复的肺部感染、脱水、营养不良等多种并发症，不仅增加了误吸、肺部感染的概率，更会危及患者生命<sup>[4-6]</sup>。吞咽障碍的发病机制复杂，目前尚不完全清楚。

外敷疗法是一种以中医基础理论为指导，施于皮肤、腧穴及病变局部等处的治病方法，是中医治法的重要组成部分<sup>[7]</sup>。外敷疗法具有“简、便、验、廉”的特点，且外敷疗法为一些风险穴位和惧针的患者提供了“新大陆”，可通过皮肤渗透作用直达经络脏腑，而且中药贴敷还可增加药物与皮肤的接触时间，使药物持续作用于机体，有力地保证了治疗效果的持续稳定<sup>[8-9]</sup>。前期在临床研究表明祛痰治呛方穴位贴敷对于脑卒中后吞咽障碍患者具有较好的治疗效果，然而祛痰治呛方穴位贴敷是否能够调控吞咽中枢疑核内的神经递质以及是通过何种机制发挥改善脑水肿程度目前仍不明确。

孤束核是脑干吞咽中枢重要的一部分，为中枢神经系统基本活动的感觉核，其神经元在参加口咽部或食管的吞咽活动时，表现为典型的连续吞咽模式，对吞咽起主导作用，参

与吞咽的启动、形成和时间控制<sup>[10]</sup>，孤束核内的5-羟色胺及其受体、谷氨酸及N-甲基-D-天冬氨酸受体在调控吞咽过程中扮演着重要的角色<sup>[11]</sup>，而疑核与其周围网状结构构成脑干腹侧区的吞咽中枢，主要是诱发吞咽动作的出现和吞咽时间的产生，疑核运动神经元覆盖在神经上皮第四脑室的底部，迁移到延髓腹外侧部，最终停留在后脑网状结构处，在疑核内侧和尾侧的传输神经支配着喉和食管的横纹肌，且疑核内相关神经递质如谷氨酸、 $\gamma$ 氨基丁酸及c-fos蛋白与吞咽密切相关，谷氨酸和 $\gamma$ 氨基丁酸可通过其受体参与吞咽活动的调节，c-fos蛋白被认为是神经元活性标志物<sup>[12]</sup>，用于检测疑核中吞咽相关神经元的激活情况<sup>[13]</sup>。故推测祛痰治呛方穴位敷贴可能通过调控腹侧区吞咽中枢疑核内谷氨酸受体、 $\gamma$ 氨基丁酸受体、c-fos蛋白等递质来诱发吞咽动作的出现和吞咽时间的产生，从而发挥治疗吞咽障碍的作用。该实验探讨祛痰治呛方穴位贴敷对缺血再灌注大鼠脑水肿的影响，并明确疑核作为腹侧区吞咽中枢在调节吞咽功能中起到的作用，揭示外敷疗法调节吞咽功能在脑干水平的内在机制。

## 1 材料和方法 Materials and methods

**1.1 设计** 随机对照动物实验，组间方差齐时，采用单因素方差分析，两两比较采用LSD法；组间方差不齐时，采用Welch's ANOVA分析法，两两比较采用Dunnett's T3检验。

**1.2 时间及地点** 实验于2021年9月至2022年7月在河南省中心实验室完成。



### 1.3 材料

**1.3.1 实验动物** 健康雄性 SPF 级 SD 大鼠 70 只, 6-8 周龄, 体质量 180-220 g, 由郑州市惠济区华兴实验动物养殖场提供, 许可证号: SCXY(豫)2019-0002, 饲养于河南省中医院中心实验室(实验单位许可证编号: SYX 豫 2021-0018), 饲养条件: 室温为 22-26 °C、相对湿度为 50%-60%、通风环境良好, 在安静清洁的环境中适应性喂养 1 周, 期间大鼠自由进食、进水, 昼夜节律光照。

实验方案经河南省中医院(河南中医药大学第二附属医院)伦理委员会审查通过(批准文号: PZ-HNSZYY-2021-098)。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。实验动物在麻醉下进行所有的手术, 并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。

**1.3.2 主要试剂** 总 RNA 提取试剂盒(R1200, 索莱宝); RNA 反转录试剂盒(RR047A, Takara); TB Green Premix Ex Taq II(RR820A, Takara); 蛋白电泳凝胶试剂盒(PE008, 中晖赫彩); 化学发光检测试剂盒(PE0010, 索莱宝); 高效 RIPA 组织裂解液(R0010, 索莱宝); BCA 蛋白浓度测定试剂盒(P0010, 碧云天); Marker(10-180 kDa)(M221-01, 中晖赫彩); 4× 蛋白上样缓冲液(P1016, 索莱宝); β-actin 兔抗(10494-1-AP, Proteintech); c-fos 多克隆抗体(YT0884, IMMUNOWAY); 氨基丁酸 A 型受体 α1(gamma-aminobutyric acid(GABA)A receptor, alpha1, GABAARα1) 多克隆抗体(YT1821, IMMUNOWAY); 1N- 甲基-D-天门冬氨酸受体(N-methyl-D-aspartate receptor 1, NMDAR1) 抗体(GTX133097-S, Gene Tex)。

**1.3.3 主要仪器** 生物信号采集器(SMUP-U4, 上海嘉龙教仪厂); 微量泵(20-50 mL, 思路高); 酶标仪(美国赛默飞公司); RT-QPCR 仪(7500 Fast, 美国赛默飞公司); SDS-PAGE 凝胶电泳系统(美国伯乐公司); 化学发光凝胶成像仪(美国伯乐公司); 超净工作台(苏州冯氏实验动物设备有限公司); 基因扩增仪(美国伯乐公司); 匀浆机(QIAGEN GmbH); 恒温箱(上海智城分析仪器有限公司); 脱水机(湖北慧达仪器有限公司); HD-330 型摊片烤片机(湖北慧达仪器有限公司); 石蜡包埋机(湖北慧达仪器有限公司); 生物切片机(湖北慧达仪器有限公司); 脱色摇床(其林贝尔仪器制造有限公司); 涡旋混合器(海门麒麟医用仪器厂); 转移电泳槽(美国伯乐公司); 转膜仪(美国伯乐公司); OLYMPUS BX41 显微镜(日本奥林巴斯有限公司)。

### 1.4 实验方法

**1.4.1 实验动物分组** 大鼠编号, 采用 Excel 软件生成随机数字, 随机分为正常组( $n=16$ ), 模型组( $n=18$ ), 贴敷组( $n=18$ ), 假贴敷组( $n=18$ )。模型组、贴敷组、假贴敷组采用线栓法短暂脑缺血 90 min 后再灌注进行造模; 正常组不做处理。造模 6 h 后进行神经功能评分, 选取评分为 2 分的大鼠进入后续实验; 造模第 2 天贴敷组给予祛痰治呛方穴位敷贴治疗, 贴敷 4 h, 假贴敷组在模型制备的基础上给予无药物胶布贴敷, 贴敷 4 h, 其余两组正常饲养 1 个月。

**1.4.2 动物模型建立**<sup>[14]</sup> 造模前, 将 SD 大鼠禁食不禁水 12 h, 采用 2% 戊巴比妥钠(3 mL/kg)麻醉大鼠; 仰卧位固定于鼠板上, 脱毛膏均匀涂抹在颈中线处及周围约 1 cm, 脱毛后用碘伏消毒; 沿颈正中线做约 1 cm 纵向切口, 用止血钳钝性分离左侧胸锁乳突肌和胸骨舌骨肌的肌间隙, 可见颈动脉鞘, 鞘内包裹左侧颈总动脉、左侧颈外动脉和左侧颈内动脉以及迷走神经, 结扎颈总动脉、颈外动脉近心端, 并在颈内动脉靠近颈总动脉、颈外动脉处预留活结, 动脉夹夹闭颈内动脉, 用弯镊挑起颈总动脉, 并用血管剪在颈总动脉处剪一小口, 将线栓插入颈总动脉, 松开颈内动脉的动脉夹, 使线栓上黑色标记处递至分叉处(即线栓插入深度为 18-20 mm), 于颈内动脉上预留活结处结扎颈内动脉, 用于固定线栓, 最后缝合切口。术后给予大鼠  $8 \times 10^4$  U 庆大霉素 0.5 mL 腹腔注射后, 将其放置于干净的垫料上, 计时 90 min 后将线栓拔出, 完成手术。

**1.4.3 祛痰治呛方穴位贴敷** 祛痰治呛方药物组成: 法半夏 10 g, 胆南星 10 g, 白附子 6 g, 细辛 3 g, 石菖蒲 10 g, 三七粉 6 g, 将上述药物颗粒剂(三九医药股份有限公司提供)研磨成细粉, 配以黄酒、蜂蜜、姜汁 1 : 1 : 1 调和, 将中药贴膏制成长宽约 0.5 cm×0.5 cm, 厚约 0.1 cm 规格的药饼, 取 0.1 cm×0.1 cm 置于 3 cm×3 cm 大小的无菌敷贴贴于大鼠颈部廉泉穴<sup>[15-16]</sup>, 用透气防过敏胶带缠绕加以固定。操作: 大鼠仰卧位, 脱毛消毒后, 给予穴位贴敷, 并用胶布固定, 4 h 后取下贴膏, 1 次/d, 每周 6 次, 4 周为 1 个疗程。

### 1.5 主要观察指标

**1.5.1 神经功能缺损评分** 造模完成 6 h 后, 采取 Longa 神经功能缺损症状评分标准<sup>[17]</sup>, 进行神经功能评估, 见表 1。

表 1 | Longa 5 分制评分标准  
Table 1 | Longa 5-point rating scale

分值	行为学特征
0 分	无神经损伤症状
1 分	不能完全伸展左侧前爪(提示轻度局灶性神经功能缺损)
2 分	向非缺血侧转圈(提示中度局灶性神经功能缺损)
3 分	行走时向非缺血侧倾倒(提示严重局灶性神经功能缺损)
4 分	不能自发行走, 意识昏迷(提示意识水平低下)

**1.5.2 大鼠死亡情况、体质量变化** 造模后第 2, 7, 14, 30 天, 记录各组大鼠的死亡情况、体质量变化。在每天同一时间测量各组大鼠体质量。

**1.5.3 大鼠的吞咽功能** 造模后第 2, 7, 14, 30 天, 将大鼠用 2% 戊巴比妥钠(3 mL/kg)麻醉后, 仰卧位固定, 颈部下颌舌骨肌处用脱毛膏去毛, 碘伏消毒后, 切开一小口暴露下颌舌骨肌, 使大鼠头部抬高 45°, 用张力换能器连接生物信号器及下颌舌骨肌。经大鼠口腔插入直径 0.5 mm 的毛细软管直达舌根部, 使用微量泵以 10 mL/h 的速度注入蒸馏水 1 min, 记录大鼠 1 min 内的吞咽次数和从打开微量泵进行刺激时出现第 1 次吞咽发生的时间, 即吞咽启动反应时间。用 BL-420F 生物机能实验系统记录测量结果, 取 3 次测量结果的平均值, 即得到平均吞咽启动反应时间和平均吞咽次数。

1.5.4 脑水肿程度测定 治疗 4 周后每组大鼠取 3 个脑组织用于脑水肿程度测定。大鼠使用 2% 戊巴比妥钠 (3 mL/kg) 腹腔注射麻醉, 断颈取出大脑, 将脑组织放置于经生理盐水浸润的滤纸上 (以防止水分的蒸发), 放于培养皿中, 清除脑皮质表面残留血渍, 并用滤纸吸干脑组织表面的水分, 然后迅速放于预先称重的培养皿 (A) 内, 然后称量培养皿加脑组织质量 (B), B 减去 A 即可得到脑湿质量; 将培养皿与脑组织放置于鼓风干燥箱内恒温烘烤 1 周至恒质量, 然后将培养皿与烘干脑组织进行称质量 (C), C 减去 A 即可得到脑干质量, 计算脑水肿程度。脑水肿含量 = (脑湿质量 - 脑干质量) / 脑湿质量 × 100%。

1.5.5 免疫组化法检测大鼠疑核 NMDAR1、GABAAR $\alpha$ 1 和 c-fos 蛋白水平 造模后第 30 天, 每组取 3 只大鼠, 麻醉后用多聚甲醛灌注取脑, 并参考《大鼠立体定位图谱》取大鼠对耳线 -3 mm 至 -5 mm 延髓修块<sup>[18]</sup>, 进行脱水、包埋、脱蜡、复水, 然后灭活内源性酶, 滴加体积分数 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 室温处理 10 min; 蒸馏水浸洗 3 次, 每次 1 min。抗原修复: 将 1× 柠檬酸钠修复液倒入小白盒内, 置于微波炉内中火预热 5 min, 放切片入盒, 中火修复 5 min (煮沸), 取出室温冷却 10 min, 再中火修复 5 min, 取出待修复液自然冷却 (约 45 min), 将切片用 PBS 冲洗 3 次, 每次 1 min。封闭: 封闭液滴于切片组织上, 室温 20 min 后, 甩去多余液体, 免洗 (勿放置过久, 以免液体干涸)。一抗孵育: 用稀释液将 NMDAR1、GABAAR $\alpha$ 1 和 c-fos 蛋白一抗分别按 1 : 400、1 : 200、1 : 150 比例稀释后, 滴加到组织上; 4 °C 孵育过夜, PBS 洗涤, 加入相应稀释的二抗, 经 DAB 显色后, 进行复染、洗涤, 中性树胶封固后光镜观察并拍照, 采用 Image J 软件计算各组平均吸光度值 (即图片中黄色区域的累积吸光度值 / 选中的黄色区域的面积)。

1.5.6 RT-PCR 法检测大鼠疑核 NMDAR1、GABAAR $\alpha$ 1 和 c-fos 的 mRNA 表达量 每组取 3 只大鼠, 分离延髓组织, 放于 -80 °C 冰箱冻存, 用于 RT-PCR 和 Western blot 检测。以 GAPDH 为内参, 荧光定量 PCR 检测各组疑核 NMDAR1、GABAAR $\alpha$ 1 和 c-fos 的 mRNA 表达量。提取冷冻的大鼠延髓组织 100 mg, 加入 1 mL Trizol 研磨成粉末状, 按照制备试剂盒说明书提取大鼠脑组织中的总 RNA, 检测 RNA 的纯度和含量, 然后使用 Takara 反转录试剂盒行反转录处理后获得 cDNA, 使用 Primer 5.0 软件对引物序列进行设计, 最后采用 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup> 方法计算出 NMDAR1、GABAAR $\alpha$ 1 和 c-fos 的 mRNA 表达量。引物序列见表 2。

表 2 | 引物序列

Table 2 | Primer sequences

基因	位置	序列 (5'-3')	Gene ID	扩增长度 (bp)
GABAAR $\alpha$ 1	Forward	TGC CCA ATA AAC TCC TGC GT	29705	112
	Reverse	TGG GCA TCC ATG GGA AAG TC		
NMDAR1	Forward	TCC TCC AAA GAC ACG AGC AC	24408	97
	Reverse	GGC CCT CCT CCC TCT CAA TA		
c-fos	Forward	TTT CAA CGC GGA CTA CGA GG	314322	90
	Reverse	TCG GCT GGG GAA TGG TAG TA		
GAPDH	Forward	ACA GCA ACA GGG TGG TGG AC	24383	252
	Reverse	TTT GAG GGT GCA GCG AAC TT		

表注: GABAAR $\alpha$ 1 为氨基丁酸 A 型受体  $\alpha$ 1; NMDAR1 为 1N- 甲基 -D- 天门冬氨酸受体

1.5.7 Western blot 法检测大鼠疑核的 NMDAR1、GABAAR $\alpha$ 1 和 c-fos 蛋白表达量 取 50 mg 冷冻的大鼠延髓组织, 研磨后加裂解液提取总蛋白, BCA 法测蛋白浓度, 金属浴加热使蛋白变性, 蛋白样品经十二烷基硫酸钠 - 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 0.5 g/L 脱脂牛奶室温封闭 1 h, 分别加 NMDAR1 抗体 (1 : 1 000)、GABAAR $\alpha$ 1 抗体 (1 : 1 500)、c-fos 抗体 (1 : 1 000)、GAPDH 抗体 (1 : 2 500) 4 °C 孵育过夜, 加 1 : 2 000 稀释的 HRP 标记二抗, 室温孵育 1 h, 加入 ECL 发光液, 采用凝胶成像分析仪显影曝光, Image J 软件分析蛋白条带灰度值。

1.6 统计学分析 采用 SPSS 22.0 软件进行分析, 符合正态分布的数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。满足各组均正态分布的数据做方差齐性检验。组间方差齐时, 采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), 两两比较采用 LSD 法; 组间方差不齐时, 采用 Welch's ANOVA 分析法, 两两比较采用 Dunnett's T3 检验; 计数资料采用卡方检验; 上述检验方法均以 0.05 为检验水准,  $P < 0.05$  为差异有显著性意义。文章统计学方法已经河南省中医院统计学专家审核。

## 2 结果 Results

2.1 大鼠神经功能缺损症状评分及存活情况 根据神经功能评分, 除正常组外, 仅纳入评分为 2 分的大鼠, 符合条件的入组样本量为正常组 16 只, 模型组 16 只, 贴敷组 14 只、假贴敷组 17 只。正常组大鼠在全程实验中全部存活; 模型组大鼠在造模后第 2-7 天内死亡 3 只, 在第 14-30 天内死亡 4 只; 贴敷组大鼠在造模后第 2-7 天死亡 3 只, 在第 14-30 天内死亡 2 只; 假贴敷组大鼠在造模后第 2-7 天死亡 3 只, 在第 14-30 天内死亡 0 只。最终入选正常组大鼠 16 只, 模型组大鼠 9 只, 贴敷组大鼠 9 只, 假贴敷组大鼠 14 只。

2.2 各组大鼠体质量 见表 3。4 组大鼠的体质量在第 2 天、第 7 天无明显差异 ( $P > 0.05$ ), 在第 14 天、第 30 天时整体差异均有显著性意义 ( $P < 0.01$ )。与正常组相比, 模型组、贴敷组和假贴敷组大鼠体质量在造模后第 2 天、第 7 天无明显差异 ( $P > 0.05$ ), 第 14 天、第 30 天时模型组、贴敷组、假贴敷组大鼠体质量相比正常组均减少 ( $P < 0.05$ ); 第 30 天时, 贴敷组相较于模型组和假贴敷组大鼠体质量增加, 但仍低于正常组, 差异有显著性意义 ( $P < 0.05$ )。

表 3 | 各组大鼠不同时间段体质量比较

( $\bar{x} \pm s$ , g)

Table 3 | Comparison of body mass of rats among groups at different time periods

组别	第 2 天	第 7 天	第 14 天	第 30 天
正常组	236.56±13.31	263.25±6.63	310.00±16.33	341.00±1.63
模型组	237.22±10.57	262.78±3.99	243.22±1.20 <sup>a</sup>	243.00±1.73 <sup>a</sup>
贴敷组	238.44±3.09	261.44±10.99	247.67±1.20 <sup>a</sup>	274.33±1.58 <sup>ab</sup>
假贴敷组	237.30±6.83	261.20±2.62	243.20±2.80 <sup>a</sup>	243.60±0.89 <sup>a</sup>
F 值	0.17	0.39	148.53	7 272.38
P 值	0.916	0.761	< 0.01	< 0.01

表注: 与正常组相比, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与模型组相比, <sup>b</sup> $P < 0.05$

2.3 各组大鼠吞咽次数及吞咽启动反应时间比较 见表 4,

5. 4 组大鼠的吞咽次数及吞咽启动反应时间变化在第 2 天、

表4 | 各组大鼠不同时间段吞咽次数比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 4 | Comparison of swallowing times of rats in different time periods among groups

组别	1 min 内的吞咽次数			
	第 2 天	第 7 天	第 14 天	第 30 天
正常组	27.31±1.45	27.25±1.48	27.81±1.38	27.31±1.49
模型组	26.44±1.59	25.88±2.32	20.33±1.58 <sup>a</sup>	20.66±1.00 <sup>a</sup>
贴敷组	27.00±1.22	25.33±2.24	19.00±1.22 <sup>a</sup>	24.22±1.56 <sup>ab</sup>
假贴敷组	26.22±1.79	25.44±3.21	19.22±1.56 <sup>a</sup>	19.66±1.58 <sup>a</sup>
F 值	0.88	1.54	120.78	74.57
P 值	0.46	0.22	< 0.01	< 0.01

表注: 与正常组相比, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与模型组相比, <sup>b</sup> $P < 0.05$

表5 | 各组大鼠不同时间段吞咽启动反应时间比较 ( $\bar{x} \pm s, s$ )

Table 5 | Comparison of swallowing initiation reaction time of rats in different time periods among groups

组别	吞咽启动反应时间			
	第 2 天	第 7 天	第 14 天	第 30 天
正常组	3.45±0.30	3.56±0.21	3.58±0.20	3.54±0.16
模型组	3.55±0.24	3.57±0.24	5.05±0.19 <sup>a</sup>	4.91±0.11 <sup>a</sup>
贴敷组	3.62±0.22	3.40±0.15	4.95±0.15 <sup>a</sup>	3.80±0.12 <sup>ab</sup>
假贴敷组	3.41±0.28	3.38±0.19	4.92±0.14 <sup>a</sup>	4.90±0.12 <sup>a</sup>
F 值	0.46	1.82	212.69	316.55
P 值	0.71	0.16	< 0.01	< 0.01

表注: 与正常组相比, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与模型组相比, <sup>b</sup> $P < 0.05$

第 7 天无明显差异 ( $P > 0.05$ ), 在第 14 天、第 30 天时整体差异均有显著性意义 ( $P < 0.01$ )。与正常组相比, 模型组、贴敷组和假贴敷组大鼠 1 min 内吞咽次数及吞咽启动反应时间在造模后第 2 天、第 7 天无明显差异 ( $P > 0.05$ ), 第 14 天、第 30 天时模型组、贴敷组、假贴敷组大鼠 1 min 内吞咽次数相比正常组均减少, 吞咽启动反应时间相比正常组均延长 ( $P < 0.05$ ); 第 30 天时, 贴敷组相较于模型组和假贴敷组大鼠吞咽次数增加, 吞咽启动时间缩短, 但吞咽次数仍低于正常组, 吞咽启动时间长于正常组, 差异有显著性意义 ( $P < 0.05$ )。

2.4 各组大鼠脑水肿程度比较 见表 6。4 组的脑组织含水量整体具有明显差异 ( $P < 0.01$ )。与正常组相比, 模型组、贴敷组和假贴敷组大鼠脑组织含水量增多 ( $P < 0.05$ ), 贴敷组相较于模型组和假贴敷组大鼠脑组织含水量减少, 差异有显著性意义 ( $P < 0.05$ )。

表6 | 各组大鼠脑组织含水量比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 6 | Comparison of brain water content of rats among groups

组别	n	脑组织含水量 (%)
正常组	3	69.04±0.01
模型组	3	76.65±0.02 <sup>a</sup>
贴敷组	3	71.18±0.00 <sup>ab</sup>
假贴敷组	3	76.89±0.01 <sup>a</sup>
F 值		44.97
P 值		< 0.01

表注: 与正常组相比, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与模型组相比, <sup>b</sup> $P < 0.05$

2.5 大鼠延髓疑核 GABAAR $\alpha$ 1、NMDAR1 和 c-fos 免疫组化表达水平比较 见图 1, 2。与正常组相比, 模型组、贴敷组、假贴敷组大鼠疑核处 NMDAR1 和 c-fos 平均吸光度值均升高, GABAAR $\alpha$ 1 平均吸光度值均降低, 差异有显著性意义 ( $P < 0.05$ )。

治疗后, 贴敷组较假贴敷组和模型组疑核处 NMDAR1 和 c-fos 平均吸光度值表达均下降, 但仍高于正常组, GABAAR $\alpha$ 1 表达均升高, 但仍低于正常组, 差异有显著性意义 ( $P < 0.05$ )。2.6 各组大鼠延髓疑核 NMDAR1、GABAAR $\alpha$ 1 和 c-fos mRNA 的表达比较 见表 7。4 组的 NMDAR1、GABAAR $\alpha$ 1 和 c-fos mRNA 表达整体差异有显著性意义 ( $P < 0.01$ )。与正常组相比, 模型组、贴敷组、假贴敷组大鼠疑核处 NMDAR1 和 c-fos mRNA 表达均升高, GABAAR $\alpha$ 1 mRNA 表达均降低, 差异有显著性意义 ( $P < 0.05$ ); 治疗后, 贴敷组较假贴敷组和模型组疑核处 NMDAR1 和 c-fos mRNA 表达均下降, 但仍高于正常组, GABAAR $\alpha$ 1 的表达均升高, 但仍低于正常组, 差异有显著性意义 ( $P < 0.05$ )。

表7 | 各组大鼠疑核处 1N- 甲基 -D- 天门冬氨酸受体 (NMDAR1)、氨基丁酸 A 型受体  $\alpha$ 1(GABAAR $\alpha$ 1) 和 c-fos mRNA 的表达比较 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 7 | Comparison of N-methyl-D-aspartate receptor 1, gamma-aminobutyric acid A receptor  $\alpha$ 1, and c-fos mRNA expression in the nucleus ambiguus of rats among groups

组别	NMDAR1	GABAAR $\alpha$ 1	c-fos
正常组	1.02±0.00	1.03±0.02	1.04±0.00
模型组	1.96±0.01 <sup>a</sup>	0.43±0.01 <sup>a</sup>	1.83±0.05 <sup>a</sup>
贴敷组	1.41±0.10 <sup>ab</sup>	0.75±0.12 <sup>ab</sup>	1.51±0.07 <sup>ab</sup>
假贴敷组	1.91±0.04 <sup>a</sup>	0.43±0.01 <sup>a</sup>	1.86±0.01 <sup>a</sup>
F 值	419.68	135.90	421.40
P 值	< 0.01	< 0.01	< 0.01

表注: 与正常组相比, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与模型组相比, <sup>b</sup> $P < 0.05$

2.7 各组大鼠延髓疑核 NMDAR1、GABAAR $\alpha$ 1 和 c-fos 蛋白表达水平比较 见表 8, 图 3。4 组的 NMDAR1、GABAAR $\alpha$ 1 和 c-fos 蛋白表达水平整体差异有显著性意义 ( $P < 0.01$ )。与正常组相比, 模型组、贴敷组、假贴敷组大鼠疑核处 NMDAR1 和 c-fos 蛋白表达均升高, GABAAR $\alpha$ 1 蛋白表达均降低, 差异有显著性意义 ( $P < 0.05$ ); 治疗后, 贴敷组较假贴敷组和模型组疑核处 NMDAR1 和 c-fos 蛋白表达均下降, 但仍高于正常组, GABAAR $\alpha$ 1 的表达均升高, 但仍低于正常组, 差异有显著性意义 ( $P < 0.05$ )。

表8 | 各组大鼠疑核处 1N- 甲基 -D- 天门冬氨酸受体 (NMDAR1)、氨基丁酸 A 型受体  $\alpha$ 1(GABAAR $\alpha$ 1)、c-fos 的蛋白表达比较 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Table 8 | Comparison of N-methyl-D-aspartate receptor 1, gamma-aminobutyric acid A receptor  $\alpha$ 1, and c-fos protein expression in the nucleus ambiguus of rats among groups

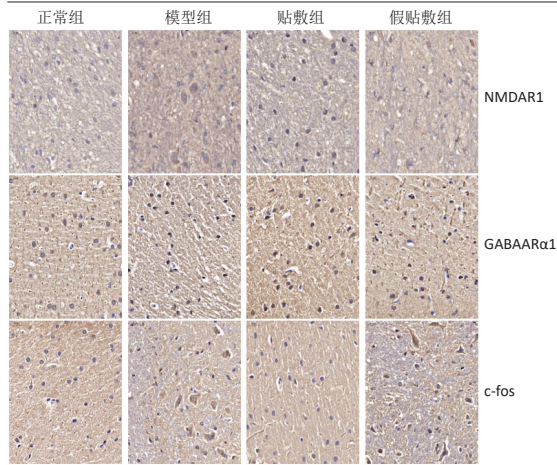
组别	NMDAR1	GABAAR $\alpha$ 1	c-fos
正常组	0.25±0.02	0.77±0.04	0.33±0.02
模型组	0.64±0.04 <sup>a</sup>	0.28±0.10 <sup>a</sup>	0.75±0.04 <sup>a</sup>
贴敷组	0.45±0.03 <sup>ab</sup>	0.58±0.11 <sup>ab</sup>	0.55±0.04 <sup>ab</sup>
假贴敷组	0.64±0.04 <sup>a</sup>	0.28±0.11 <sup>a</sup>	0.75±0.03 <sup>a</sup>
F 值	87.02	19.92	109.11
P 值	< 0.01	< 0.01	< 0.01

表注: 与正常组相比, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与模型组相比, <sup>b</sup> $P < 0.05$

### 3 讨论 Discussion

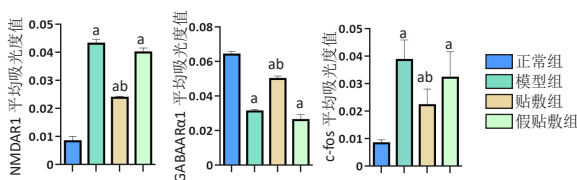
卒中后吞咽障碍是中风的一种常见证候<sup>[19-20]</sup>, 其病机与中风相似, 与痰邪亦关系密切, 《本草求真》曰: “治中风失音, 风齿痛, 喉痹咽痛, 是皆风寒内入, 结而为痰。” 故卒中后





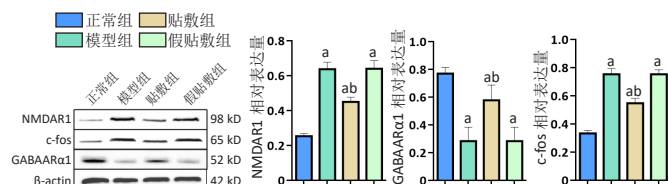
图注：蛋白表达阳性着色为棕黄色颗粒，通过着色强度和阳性细胞数在同类细胞中所占的比例相结合，来做为判断阳性标记物的标准。如图所示，与正常组相比，模型组、贴敷组、假贴敷组 NMDAR1 和 c-fos 细胞着色较明显，GABAARα1 细胞着色不明显

图 1 | 各组大鼠延髓疑核处 1N-甲基-D-天门冬氨酸受体 (NMDAR1)、氨基丁酸 A 型受体 α1(GABAARα1)、c-fos 的阳性表达 (免疫组化, ×400)  
Figure 1 | Positive expression of N-methyl-D-aspartate receptor 1, gamma-aminobutyric acid A receptor α1, and c-fos in the nucleus ambiguus of rats in each group (immunohistochemistry, ×400)



图注：与正常组相比，<sup>a</sup> $P < 0.05$ ；与模型组相比，<sup>b</sup> $P < 0.05$

图 2 | 各组大鼠疑核处 1N-甲基-D-天门冬氨酸受体 (NMDAR1)、氨基丁酸 A 型受体 α1(GABAARα1)、c-fos 的平均吸光度值比较  
Figure 2 | Comparison of the mean absorbance values of N-methyl-D-aspartate receptor 1, gamma-aminobutyric acid A receptor α1, and c-fos in the nucleus ambiguus of rats among groups



图注：与正常组相比，<sup>a</sup> $P < 0.05$ ；与模型组相比，<sup>b</sup> $P < 0.05$

图 3 | 各组大鼠延髓疑核 1N-甲基-D-天门冬氨酸受体 (NMDAR1)、氨基丁酸 A 型受体 α1(GABAARα1) 和 c-fos 蛋白表达水平比较  
Figure 3 | Comparison of N-methyl-D-aspartate receptor 1, gamma-aminobutyric acid A receptor α1, and c-fos protein expression levels in the nucleus ambiguus of rats among groups

吞咽困难辨证施治时亦当从痰论治<sup>[21]</sup>。中医学上认为中风后吞咽障碍多是由于痰瘀阻络<sup>[22]</sup>。纵观该病病因病机，卒中后吞咽障碍多因五脏六腑亏虚，痰浊、瘀血互结，上扰髓海，元神受扰，风火痰瘀阻塞脑络、舌窍、咽喉，精气不能上行濡养筋脉、器官，使咽喉之窍气机功能失约或失宣，启闭不利所致。病位本在大脑、标在舌咽部，与心肝脾肾脏腑密切相关。对于中风后吞咽障碍的治疗，在整体辨证治疗的基础上，应以化痰祛瘀、通经活络、开关启闭为法则，恢复咽喉之气机功能。

中药穴位贴敷疗法是依据中医经络学说理论，将药物研磨成粉末状，加入姜汁、蜂蜜、醋、盐、酒、水等介质，使药物粉末调和成糊状，然后制成饼状、丸状、膏状等，放置于医用无纺布上，再贴敷在体表的特定部位上，用来治疗疾病的一种疗法。穴位贴敷疗法将药物的药理作用和腧穴的经络作用相结合<sup>[23]</sup>，具有疏通经络、调整脏腑、促进药物吸收、调和气血的作用<sup>[24-25]</sup>。研究表明，小剂量的药物通过腧穴进入人体后，循经络、气血的运行，将药物直接作用于有关脏腑，产生更强的治疗效果<sup>[26-27]</sup>。穴位贴敷疗法的给药途径不经过胃肠道，不仅避免了药物对口腔和胃肠道的刺激，而且不良反应小，且中药贴敷能够增加药物与皮肤的接触时间，使药物持续作用于机体，来促进药物的吸收利用以提高药物的疗效<sup>[28-29]</sup>，因此受到国内外医疗机构的广泛关注，也是目前国际上重点开发的给药途径<sup>[30]</sup>。课题组研究团队在古今文献的基础上，结合多年的临床探索，筛选出的方剂祛痰治呛方已应用于临床取得了较好的疗效<sup>[31]</sup>。方中法半夏燥湿化痰为君药；胆南星、白附子祛风化痰，细辛、石菖蒲豁痰开窍、三七粉活血通络共为臣药；蜂蜜补中润燥，调和诸药，黄酒辛散、温经活血、引药直达病所共为佐使，诸药合用，共奏祛风化痰、活血通络、开关启闭之功。

吞咽中枢腹侧区主要由疑核及周围网状结构构成，诱发吞咽动作的出现和吞咽时间的产生<sup>[32-33]</sup>。食管部位的吞咽活动是在运动神经以及内脏神经的作用下进行，FURNESS<sup>[34]</sup>研究表明，疑核的半致密部位、致密部位及松散部位对食管的运动都有支配作用。研究发现针刺通过疑核调节多种生理活动，可调节咽部肌肉、喉部肌肉及食管肌肉<sup>[35]</sup>。谷氨酸和γ-氨基丁酸是常见的中枢神经递质，其化学突触被称为谷氨酸能突触和γ-氨基丁酸能突触<sup>[36]</sup>。谷氨酸受体和γ-氨基丁酸受体已被发现存在于吞咽反射弧<sup>[37]</sup>，同时这两类受体也在疑核中表达，支配着吞咽相关的肌肉。有学者发现，疑核中γ-氨基丁酸受体参与调节兴奋性氨基酸和乙酰胆碱的兴奋性<sup>[38]</sup>。在大鼠双侧疑核分别注射微量的谷氨酸受体拮抗剂 CNQX、APV 以及γ-氨基丁酸受体激动剂 5-氨基-3-羟基异噻唑 (muscimol) 之后，吞咽活动受到了一定程度的抑制，提示谷氨酸和γ-氨基丁酸可通过其受体参与吞咽活动的调节<sup>[39]</sup>。c-fos 的蛋白产物目前被广泛用于标记神经元活动的细胞，从而可以确认中枢神经系统中神经元对伤害性刺激的激活反应。当大鼠受到伤害性刺激时，该兴奋性信息可由神经通路上传直达中枢神经系统，中枢神经系统的目标神经元中将产生一定量 c-fos 蛋白的阳性表达。故此次实验通过对延髓腹侧区吞咽中枢疑核进行了系列研究。

卒中后脑水肿均为混合性脑水肿，缺血性卒中和出血性卒中后脑水肿的发生机制大致相同，脑出血后脑水肿又有其特殊性，其发生机制大致包括缺血缺氧、能量耗竭；炎症反应；自由基损伤；有关酶、神经递质和金属离子介导的神经毒性；血脑屏障开放、血管通透性增高等<sup>[40]</sup>。脑卒中后引起脑组织缺血、缺氧、水肿，脑细胞变性坏死，形成恶性循环，

大脑皮质束受损,引起脑神经及面部肌肉麻痹,致吞咽功能障碍<sup>[41]</sup>。研究表明,贴敷组脑水肿程度低于模型组和假贴敷组,因此吞咽功能的改善可能在于祛痰治呛方中药对缺血再灌注大鼠有明显保护作用,可以减轻脑水肿,从而改善吞咽功能障碍。

综上所述,祛痰治呛方穴位贴敷可能通过减轻脑水肿、上调 GABAAR $\alpha$ 1 的表达、下调 NMDAR1 和 c-fos 的表达来改善缺血再灌注大鼠体质量、吞咽次数、吞咽启动反应时间等吞咽相关指标,促进吞咽功能的恢复。同时在吞咽中枢的腹侧区,生长激素抑制素能神经元和一氧化氮合酶能神经元、P 物质等含量的变化与吞咽功能有一定程度的联系<sup>[11]</sup>,还有待进一步研究。

**致谢:**感谢河南省中心实验室提供实验场地和器材。

**作者贡献:**华晓琼负责实验实施、论文撰写,任银、张志鑫负责实验数据分析处理,华晓琼负责指标检测,金小琴、朱博超、王煜普负责数据和文章的校对,李彦杰、秦合伟负责实验设计。

**利益冲突:**文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

**开放获取声明:**这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

**版权转让:**文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

**出版规范:**该文章撰写遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。文章经小同行外审专家双盲外审,同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

#### 4 参考文献 References

- [1] 中国吞咽障碍康复评估与治疗专家共识组. 中国吞咽障碍评估与治疗专家共识(2017年版)第一部分 评估篇[J]. 中华物理医学与康复杂志,2017,39(12):881-892.
- [2] SURA L, MADHAVAN A, CARNABY G, et al. Dysphagia in the elderly: management and nutritional considerations. Clin Interv Aging. 2012;7: 287-298.
- [3] NEWMAN R, VILARDELL N, CLAVÉ P, et al. Effect of Bolus Viscosity on the Safety and Efficacy of Swallowing and the Kinematics of the Swallow Response in Patients with Oropharyngeal Dysphagia: White Paper by the European Society for Swallowing Disorders (ESSD). Dysphagia. 2016;31(2):232-249.
- [4] 李洪艳,朱茜,陈伟,等. 多学科管理在脑卒中吞咽障碍患者中的应用[J]. 中华物理医学与康复杂志,2021,43(3):259-261.
- [5] 陈清棠. 临床神经病学[M]. 北京:北京科学技术出版社,2000:113.
- [6] Li L, ZHANG LH, XU WP, et al. Risk assessment of ischemic stroke associated pneumonia. World J Emerg Med. 2014;5(3):209-213.
- [7] 胡玉. 针刺配合穴位贴敷治疗中风偏瘫 64 例临床观察[J]. 内蒙古中医药,2014,33(25):43-44.
- [8] 胡琳丽. 穴位贴敷联合吞咽训练在脑卒中后吞咽障碍患者中的应用效果研究[J]. 中国全科医学,2019,22(S1):176-179.
- [9] 贺艳萍,肖小芹,邓桂明,等. 中药穴位贴敷作用机理研究概况[J]. 中国中医药信息杂志,2017,24(3):134-136.
- [10] 卫小梅,窦祖林,兰月,等. 吞咽障碍干预的中枢神经通路调控机制[J]. 中华物理医学与康复杂志,2013,35(12):934-937.
- [11] 华晓琼,李彦杰,金小琴,等. 卒中后吞咽障碍的分子生物学研究进展[J]. 中国卒中杂志,2022,17(3):318-323.
- [12] YE Q, LIU C, SHI J, et al. Effect of electro-acupuncture on regulating the swallowing by activating the interneuron in ventrolateral medulla (VLM). Brain Res Bull. 2019;144:132-139.
- [13] 郭威.GAD67-GFP 基因敲入小鼠谷氨酸能、5-HT 能和 SP 能终末与三叉神经中脑核神经元联系的形态学研究[D]. 西安:第四军医大学,2008.

- [14] CHEN Z, HU Q, XIE Q, et al. Effects of Treadmill Exercise on Motor and Cognitive Function Recovery of MCAO Mice Through the Caveolin-1/ VEGF Signaling Pathway in Ischemic Penumbra. Neurochem Res. 2019; 44(4):930-946.
- [15] 孟肖蒙,刘晓亭. 中药贴敷双侧“天枢”穴对功能性便秘大鼠结肠肌间神经丛血管活性肠肽、P 物质的影响[J]. 针刺研究,2019,44(12): 906-910.
- [16] 郭义,方剑乔. 实验针灸学实验指导[M]. 北京:中国中医药出版社, 2012:46-49.
- [17] LONGA EZ, WEINSTEIN PR, CARLSON S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. Stroke. 1989;20(1):84-91.
- [18] GEORGE PAXINOS, CHARLES WATSON. 大鼠脑立体定位图谱[M]. 诸葛启钊主译. 北京:人民卫生出版社,2005:64-148.
- [19] GBD 2016 NEUROLOGY COLLABORATORS. Global, regional, and national burden of neurological disorders, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. Lancet Neurol. 2019;18(5): 459-480.
- [20] LOSURDO A, BRUNETTI V, BROCCOLINI A, et al. Dysphagia and Obstructive Sleep Apnea in Acute, First-Ever, Ischemic Stroke. J Stroke Cerebrovasc Dis. 2018;27(3):539-546.
- [21] CABIB C, NASCIMENTO W, ROFES L, et al. Neurophysiological and Biomechanical Evaluation of the Mechanisms Which Impair Safety of Swallow in Chronic Post-stroke Patients. Transl Stroke Res. 2020;11(1):16-28.
- [22] 王清任. 医林改错[M]. 北京:人民卫生出版社,2005:44-45.
- [23] 刘未艾,叶德宝. 穴位贴敷疗法透皮给药的研究进展[J]. 中医药通报,2004,3(4):59-62.
- [24] 张艳宏. 穴位贴敷疗法的理论基础及目前应用现状[J]. 甘肃中医, 2007,20(2):1-3.
- [25] 董莉莉,林婷,江月卿. 穴位贴敷联合康复护理对卒中后吞咽障碍患者吞咽功能及营养状况的影响[J]. 慢性病学杂志,2021,22(4): 575-577.
- [26] 顾冬梅. 中药穴位贴敷治疗功能性便秘对相关胃肠调节肽影响的研究[J]. 护理研究,2016,30(34):4325-4327.
- [27] 赖燕新. 中药穴位贴敷对脑卒中吞咽障碍患者康复的影响[J]. 中医中药,2015,7(3):53-54.
- [28] 赵瑞瑞,周帅. 穴位贴敷疗法的临床应用进展[J]. 国医论坛,2017, 32(1):68-70.
- [29] 于书翔,周鸿飞. 中医外治法治疗吞咽困难研究进展[J]. 临床军医杂志,2017,45(3):328-329.
- [30] 伍碧贞,刘庆,廖贤静. 穴位贴敷联合吞咽训练对脑卒中后吞咽障碍患者营养状况的影响[J]. 中国实用医药,2021,16(16):163-165.
- [31] 马静丽,李彦杰,孟毅,等. 祛痰治呛方穴位贴敷治疗卒中后吞咽障碍的疗效观察[J]. 中华中医药杂志,2021,36(7):4364-4367.
- [32] DOELTGEN SH, HUCKABEE ML. Swallowing neurorehabilitation: from the research laboratory to routine clinical application. Arch Phys Med Rehabil. 2012;93(2):207-213.
- [33] HUANG PL, WANG SJ, SUN RF, et al. Increased activation of the caudate nucleus and parahippocampal gyrus in Parkinson's disease patients with dysphagia after repetitive transcranial magnetic stimulation: a case-control study. Neural Regen Res. 2022;17(5):1051-1058.
- [34] FURNESS JB. The enteric nervous system and neurogastroenterology. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2012;9(5):286-294.
- [35] 叶秋平. 电针廉泉穴对大鼠延髓腹外侧区吞咽神经元的的影响研究[D]. 广州:广州中医药大学,2018.
- [36] GIELEN M, BARILONE N, CORRINGER PJ. The desensitization pathway of GABA receptors, one subunit at a time. Nat Commun. 2020;11(1): 5369.
- [37] ZHANG M, CLARKE K, ZHONG H, et al. Postsynaptic action of GABA in modulating sensory transmission in co-cultures of rat carotid body via GABA(A) receptors. J Physiol. 2009;587(2):329-344.
- [38] 郭威.GAD67-GFP 基因敲入小鼠谷氨酸能、5-HT 能和 SP 能终末与三叉神经中脑核神经元联系的形态学研究[D]. 西安:第四军医大学,2008.
- [39] 史俊恒. 电针廉泉、风府穴对大鼠脑干吞咽运动神经元疑核的影响[D]. 广州:广州中医药大学,2018.
- [40] 彭会珍,张振香. 水通道蛋白在急性缺血性脑卒中后脑水肿发生机制中的研究进展[J]. 重庆医学,2015,44(24):3436-3438.
- [41] 石德志,张宝珍,刘霞. 高压氧与康复综合治疗对急性脑卒中吞咽功能障碍的疗效观察[J]. 中国煤炭工业医学杂志,2010,13(9):1318-1319.

(责任编辑: MZH, ZN, ZJP)