

电针对 AD 大鼠学习记忆能力及神经元凋亡的影响

周丽莎¹, 望庐山²

(1. 江汉大学 医学院中医系, 武汉 430056; 2. 湖北中医学院 针骨学院, 武汉 430065)

摘要:目的: 探讨电针对AD模型大鼠学习记忆能力和神经元凋亡的影响. 方法: 将40只健康SD大鼠随机分为正常组、假手术组、模型组和电针组, 采用A β_{1-40} 注入大鼠双侧Meynert核建立AD模型, 电针组采用电针治疗, 治疗一个月后用水迷宫试验测定各组大鼠学习记忆能力, 然后处死大鼠检测海马及皮质的神经元凋亡百分比. 结果: 模型组出现学习记忆障碍, 呈渐进性加重, 4周时更为显著, 而且在海马区和皮质区神经元有较高的凋亡比例, 电针组有明显改善 ($P < 0.01$). 结论: Meynert核注射A β 可使大鼠发生较持久的学习记忆功能障碍及胆碱能神经元凋亡, 电针治疗可改善AD大鼠学习记忆能力, 抑制神经元凋亡.

关键词: 阿尔茨海默病; β -淀粉样蛋白; 学习记忆能力; 神经元凋亡

中图分类号: R749.16 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-0143(2009)02-0078-04

阿尔茨海默病 (Alzheimer's Disease, AD) 是一种以进行性智能衰退为主要临床特征的多因性疾病, 目前认为 β -淀粉样蛋白 (amyloid-beta protein, A β)神经毒性作用所致中枢上行胆碱能系统损伤是AD认知功能障碍的重要因素, 神经元凋亡被认为是AD发生的主要原因之一. 为此, 本实验采用流式细胞仪进一步探讨电针对AD大鼠的学习记忆能力及神经元凋亡的影响.

1 材料和方法

1.1 材料

取健康SD大鼠40只, 体质量200~250g, 由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供.

主要仪器试剂: WDT-II微电极推进器脑立体定位仪 (国营西北光化学仪器厂)、Morris水迷宫 (中国医学科学院药物研究所)、流式细胞仪、400目筛网 (国产). A β_{1-40} (美国Biosource公司), A β 孵育: A β_{1-40} 加入0.1%三氟乙酸后放入38℃水浴恒温箱孵育48h, 使其成为凝聚状态备用. PBS溶液 (上海芸萃生物科技有限公司)、PI染液 (美国Sigma公司).

1.2 方法

1.2.1 分组与治疗 将40只大鼠随机分为正常组、假手术组、模型组和电针组, 每组10只. 正常组

不进行任何处理及治疗. 假手术组注射等量生理盐水, 手术方法同模型组. 将造模成功的动物随机分为模型组, 电针组. 模型组造模成功后, 不进行任何治疗. 电针组造模成功后, 根据中国针灸学会实验针灸研究会制定的动物针灸穴位图谱^[1], 取百会、足三里、肾俞穴. 足三里与肾俞穴采用普通28号0.5寸不锈钢毫针刺入5mm深, 同侧足三里与肾俞穴接G6805-II型电针仪. 刺激参数为: 疏密波, 频率为2~4Hz, 电流强度以使大鼠后爪微颤为宜, 30min/次, 每日1次, 6d为一疗程, 每疗程后休息1d, 连续治疗4个疗程.

1.2.2 动物模型制作 各组大鼠在10%水合氯醛380mg/kg腹腔注射麻醉后, 固定于脑立体定位仪. 脑立体定位仪固定平颅头位切开皮肤及皮下组织, 用棉签蘸取少量双氧水轻拭颅骨表面, 清除泡沫能清晰显现前囟. 参照大鼠脑立体定位图谱^[2], 以前囟为原点, 向后1.4mm, 旁开3.0mm为穿刺点转穿颅, 自脑表面进针7.0mm分别至双侧Meynert基底核, 用微量注射器将聚集状态的A β_{1-40} 各1 μ L (5 μ g)在2min内缓慢注入, 留针10min, 以使A β_{1-40} 充分浸润局部组织, 注射完毕后将微量注射器在7min内缓慢抽出. 假手术组注射等量的生理盐水. 所有操作均在无菌条件下进行, 术后每只大鼠腹腔注射青霉素10000U, 缝

收稿日期: 2009-02-24

作者简介: 周丽莎 (1958-), 女, 湖北武汉人, 教授, 主任医师, 主要从事中医针灸的教学与研究.

合切口,常规饲养。

1.2.3 指标观察及检测 治疗结束后进行指标检测。

(1) 学习记忆观察. 治疗后进行 Morris 水迷宫训练, 首先进行定位航行试验, 历时 3 d, 将大鼠面向池壁分别从 4 个人水点放入水中若干次, 记录其寻找到隐藏在水面下平台的时间, 即逃避潜伏期. 如果大鼠在 120 s 内未找到平台, 需将其引至平台, 潜伏期为 120 s. 治疗结束后撤除平台进行空间探索试验, 任选一个入水点将大鼠放入水池中, 测验大鼠对原平台的记忆, 记录其逃避潜伏期、穿过原平台所在位置的次数及在原平台象限的游泳时间, 并计算其游泳时间百分比. 训练及测验期间水温在 $(26 \pm 1) ^\circ\text{C}$, 迷宫外参照物保持不变. 数据采集和处理由 Morris 水迷宫图像自动监视处理系统完成. 将各组测试成绩进行比较。

(2) 海马及皮质部位脑细胞凋亡百分比的测定. 采用 PI 单染法测定. 大鼠处死后迅速在冰

台上分别取海马及皮质部位脑组织. 将脑细胞剪为细小部分(尽量避免破坏细胞结构), 1000 r/min 离心 5 min, 弃去培养液, 用 3 mL PBS 洗涤 1 次, 离心去 PBS, 加入冰预冷的 70 %乙醇固定, 4°C 下避光放置 12 h. 然后离心弃去固定液, 加入 3 mL PBS 重悬 5 min. 再用 400 目的筛网过滤 1 次, 1000 r/min 离心 5 min, 弃去 PBS. 加入 1 mL PI 染液染色, 4°C 避光 30 min. 流式细胞仪检测其神经元凋亡百分比。

1.2.4 统计学处理 实验数据用 SPSS 13.0 软件进行统计学处理. 数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组间比较用 t 检验, 多组间比较用单因素方差分析 (ANOVA) 及 q 检验。

2 结果

2.1 水迷宫测验成绩比较

结果见表 1.

表 1 各组水迷宫测验成绩比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 40$)

组别	逃避潜伏期/s	游泳时间百分比/%	穿过平台次数/次
正常组 ($n=10$)	24.0000 \pm 9.092 1	59.626 0 \pm 5.818 4	8.3000 \pm 1.251 7
假手术组 ($n=10$)	25.3000 \pm 7.846 4	58.938 0 \pm 6.295 1	7.6000 \pm 1.075 0
模型组 ($n=10$)	68.1000 \pm 14.835 8▲★	25.049 0 \pm 5.874 9▲★	2.6000 \pm 1.577 6▲★
电针组 ($n=10$)	32.3000 \pm 7.484 1▲	48.405 0 \pm 7.409 8▲	4.9000 \pm 1.197 2▲

▲ 与正常组及假手术组比较 $P < 0.01$; ★ 与电针治疗组比较 $P < 0.01$

从表 1 可以看出, 模型组水迷宫测试成绩低于正常组 ($P < 0.01$); 电针组的水迷宫测试成绩低于模型组 ($P < 0.01$), 但与模型组相比有很大提高 ($P < 0.01$). 说明电针治疗能明显改善 AD

模型大鼠的学习记忆障碍。

2.2 海马及皮质部位神经元凋亡百分比比较

结果见表 2.

表 2 各组大鼠海马及皮质部位神经元凋亡百分比的比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 40$)

组别	海马神经元凋亡百分比/%	皮质神经元凋亡百分比/%
正常组 ($n=10$)	13.725 0 \pm 0.798 61	8.093 0 \pm 0.343 09
假手术组 ($n=10$)	14.157 0 \pm 1.157 31	9.012 0 \pm 1.731 76
模型组 ($n=10$)	36.316 0 \pm 1.279 42▲●	34.034 0 \pm 1.216 90▲●
电针组 ($n=10$)	19.548 0 \pm 0.931 3▲	18.853 0 \pm 0.903 29▲

▲ 与正常组比较 $P < 0.01$; ● 与电针治疗组比较 $P < 0.01$

从表 2 可以看出, 模型组神经元凋亡百分比高于正常组 ($P < 0.01$); 电针组神经元凋亡比例高于正常组 ($P < 0.01$), 但较模型组低 ($P < 0.01$). 这说明电针能有效抑制 $A\beta$ 对神经元的毒性, 降低神经元凋亡的作用。

神经元凋亡百分比如图 1~图 8 所示。

从图 1~图 8 可以看出, 模型组神经元凋亡比例高于正常组 ($P < 0.01$); 电针组凋亡比例高于正常组, 低于模型组 ($P < 0.01$). 说明电针治疗可保护神经元, 降低 $A\beta$ 对其毒性作用, 减少

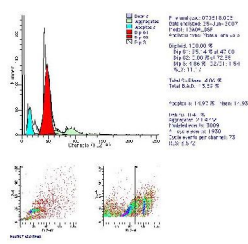


图1 正常组海马(14.97%)

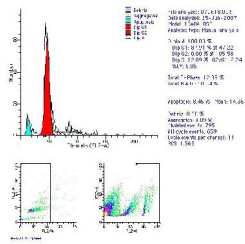


图2 正常组皮质(8.45%)

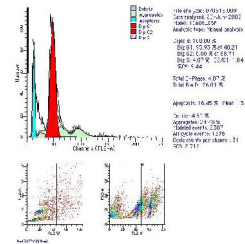


图3 假手术组海马(16.45%)

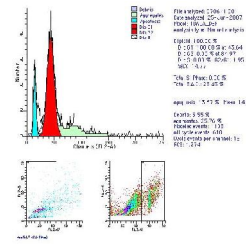


图4 假手术组皮质(13.67%)

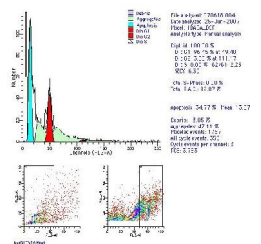


图5 模型组海马(34.77%)

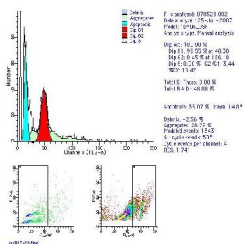


图6 模型组皮质(35.07%)

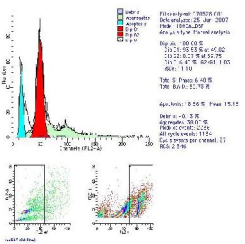


图7 电针组海马(18.56%)

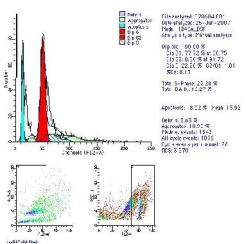


图8 电针组皮质(18.02%)

神经元凋亡。

3 讨论

(1) 选穴依据. 中医虽无AD病名, 据其临床表现可归为“痴呆”、“善忘”、“神疑”或智能减退等病症范畴. 并对其病因、病机及治疗进行过一些论述. 均认识AD的病位在脑, 辨证以肾精不足、髓海空虚为本, 痰瘀蒙蔽清窍为标, 治疗应以补肾益精为主, 开窍醒神为辅. 根据“治病求本”的原则, 治以补肾益髓、醒神开窍之法, 选取百会、足三里、肾俞三穴. 百会位于巅顶, 古称“三阳五会”, 为督脉、足太阳、手足少阳、足厥阴之会, 《灵枢-海论》记载:“脑为髓海, 其输上在于其盖”, 针刺此穴可直通脑窍, 具醒神开窍之功; 足三里为足阳明胃经合穴, “脾胃为后天之本”, 针此穴有补益后天, 扶正培元之功; 肾俞为肾脏气血输注之处, 为治疗肾虚, 脑髓不足的要穴. 此三穴合用, 故能标本兼顾, 共同改善AD的临床症状.

(2) 电针对AD大鼠学习记忆能力及脑细胞凋亡的影响. 细胞凋亡又称细胞程序性死亡, 是一种不同于细胞坏死的死亡方式, 它是指细胞在一定的生理或病理条件下, 遵循自身的程序, 自己结束其生命的过程, 最后细胞脱落离体或裂解为若干凋亡小体, 被其他细胞吞噬. 在形态学上, 细胞凋亡表现为神经细胞核染色质断裂、聚集, 进而固缩, 核膜崩解, 细胞浆凝聚、固缩并

空泡化, 被细胞膜包裹形成凋亡小体而被巨噬细胞或小胶质细胞吞噬, 没有炎症发生. 细胞凋亡过程有其复杂的分子机制, 受细胞自身基因调控. 在老年性痴呆的病理过程中, 存在着细胞凋亡这一病理机制. 近年来, 越来越多的实验证明, 老年性痴呆与细胞凋亡之间存在着密切的关系. Aβ是老年斑产生的主要物质基础, 对神经元具有细胞毒性作用, 可导致神经元的凋亡.

笔者根据中医理论选穴, 电针作用于“百会”、“肾俞”、“足三里”, 采用流式细胞仪亚“G1”峰检测法研究了Aβ所致痴呆时其对大鼠海马、皮质神经元的影响. 亚G1期细胞在整个细胞群中所占的百分数, 可以用来比较不同细胞群之间凋亡细胞的多少. 本研究发现, 无论海马还是皮质的神经细胞凋亡都增加, 海马区更明显. 与模型组相比, 电针治疗可抑制海马、海马神经元的凋亡细胞百分数 ($P < 0.01$), 同时电针组水迷宫测试成绩也明显优于模型组 ($P < 0.01$), 说明电针治疗可抑制凋亡的发生, 有助于改善痴呆大鼠学习记忆障碍, 但其机制有待进一步探讨.

参考文献:

[1] 华兴邦. 大鼠穴位图谱的研制 [J]. 实验动物与动物实验, 1991(1):1-5.
 [2] 包新民, 舒斯云. 大鼠脑立体定位图谱 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1994.

Effects of Electroacupuncture on AD Model Rats Neuronal Apoptosis and Impact on Learning and Memory Capability

ZHOU Li-sha¹, WANG Lu-shan²

(1. School of Medicine, Jiangnan University, Wuhan 430056, China;

2. Hubei College of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430065, China)

Abstract: *Objective:* To investigate the effect of electroacupuncture on AD model rats neuronal apoptosis and impact on learning and memory capability. *Methods:* Divided healthy SD rats 40 randomly into normal group, sham-operated group, model group and electroacupuncture group. Established AD model with A β -amyloid₁₋₄₀ protein microinjection into bilateral Meynert basal ganglia of rats. Treated the electroacupuncture group with electroacupuncture. After one month treatment, applied Morris water maze to investigate the learning and memory capability of rats, then killed the rats and detected the apoptosis percentage in cortex and hippocampus neurons. *Results:* The model group appeared with disturbance of learning and memory, and had a gradual increase, more significant after 4 weeks. There was higher neurons apoptosis proportion in hippocampus area and cortex area, and in the electroacupuncture group can be observed significant improvement ($P < 0.01$). *Conclusion:* With A β injection into rats Meynert nuclear can cause persistent learning and memory dysfunction and cholinergic neurons apoptosis, electro-acupuncture therapy can improve learning and memory capability in AD rats, also inhibit neuronal apoptosis.

Key words: Alzheimer's disease; β -amyloid protein; learning and memory capability; neuronal apoptosis

(责任编辑:陈 旷)