

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2025.13.013

补肾活血针刺法对 SAMP8 小鼠海马组织线粒体膜电位及 SIRT1/PGC-1 α 轴的影响

任丹, 张婷, 徐江喜, 朱宏, 李若梦[✉]

中南大学湘雅三医院, 湖南省长沙市河西岳麓区桐梓坡路 138 号, 410013

[摘要] **目的** 探讨补肾活血针刺法治疗阿尔茨海默病的可能作用机制。**方法** 雄性 SAMP8 小鼠 40 只随机分为模型组、针刺组、非穴位组、多奈哌齐组, 每组 10 只, SAMR1 小鼠 10 只作为正常组。针刺组针刺小鼠“百会”“血海”“肾俞”和“膈俞”, 其中“血海”“肾俞”和“膈俞”先刺激左侧穴位, 次日再刺激右侧, 交替进行, 每日 1 次。非穴位组取双侧肋下固定非经非穴点进行针刺, 每日 1 次。模型组及正常组小鼠进行与以上两组相同时间、程度的捉抓刺激。多奈哌齐组小鼠接受 1 mg/kg 多奈哌齐胃管灌胃治疗, 每日 1 次。各组小鼠均干预 4 周。干预结束后, 各组小鼠进行 Morris 水迷宫实验 (记录定位航行潜伏期、穿越平台象限次数) 及旷场实验 (记录运动距离); HE 及 Nissl 染色观察小鼠海马组织神经元细胞损伤情况; 检测海马组织线粒体膜电位和活性氧 (ROS) 相对倍数; Western Blot 法及 qRT-PCR 法分别检测沉默调节蛋白 1 (SIRT1)、过氧化物酶体增殖活化受体 γ 辅助活化因子 1 α (PGC-1 α) 蛋白水平及其 mRNA 表达。**结果** 与正常组比较, 模型组和非穴位组小鼠定位航行潜伏期及海马组织 ROS 相对倍数升高, 穿越平台象限次数、旷场实验运动距离、海马组织 Nissl 染色阳性细胞数量、线粒体膜电位及 SIRT1、PGC-1 α 蛋白水平和 mRNA 表达均降低 ($P < 0.01$); HE 染色示小鼠海马组织神经元排列松散, 数量减少, 且空泡变性; Nissl 染色示海马区锥体神经元不整齐, 细胞质内 Nissl 体数量较少, 染色较浅。与模型组比较, 针刺组和多奈哌齐组小鼠定位航行潜伏期及海马组织 ROS 相对倍数降低, 穿越平台象限次数、旷场实验运动距离、海马组织 Nissl 染色阳性细胞数量、线粒体膜电位及 SIRT1、PGC-1 α 蛋白水平和 mRNA 表达均升高 ($P < 0.01$), 且 HE 染色和 Nissl 染色显示海马组织病理损伤显著改善。与多奈哌齐组比较, 针刺组小鼠定位航行潜伏期缩短 ($P < 0.01$)。**结论** 补肾活血针刺法可激活海马组织 SIRT1/PGC-1 α 信号通路, 改善线粒体功能, 从而缓解神经元损伤, 是其治疗阿尔茨海默病的可能机制之一。

[关键词] 阿尔茨海默病; 针刺; 补肾活血法; 线粒体; 神经元; 活性氧; 沉默调节蛋白 1; 过氧化物酶体增殖活化受体 γ 辅助活化因子 1 α

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种进行性神经退行性疾病, 患者逐渐出现记忆丧失、认知功能损害和行为改变等症状^[1]。本病以 β -淀粉样蛋白 (A β) 沉积、神经纤维缠结以及神经元损失和大脑萎缩为主要病理特征^[2]。研究显示, 线粒体功能障碍在 AD 的发生与发展中发挥了关键作用, 特别是在线粒体的能量代谢紊乱、氧化

应激以及自噬增加等方面^[3]。因此, 改善线粒体功能可能成为治疗 AD 的一个重要策略。沉默调节蛋白 1 (SIRT1) 和过氧化物酶体增殖活化受体 γ 辅助活化因子 1 α (PGC-1 α) 通过调节线粒体生物合成和改善线粒体功能^[4], 可能在缓解线粒体功能障碍及相关神经退行性疾病中发挥重要作用。激活 SIRT1/PGC-1 α 通路能够保护线粒体功能、抑制活性氧 (ROS) 的产生, 减轻神经炎症, 进而起到改善认知功能的作用^[5]。

国家级名老中医董克礼教授基于肾虚血瘀是

基金项目: 国家自然科学基金 (81202730); 湖南省自然科学基金 (2023JJ30862, 2024JJ5544)

✉ 通讯作者: liruomeng1983@163.com

AD 的基本病机这一认识,并根据 AD 的病理特点设计了补肾活血针刺法^[6],该疗法具有补肾填精、活血通络的功效。前期研究发现,补肾活血针刺法可改善 AD 患者认知行为能力并提高简易精神状态评价量表(MMSE)得分^[7],可改善 AD 模型小鼠的学习记忆能力^[8]。蛋白组学研究显示,与 SAMP 模型小鼠相比,针刺组小鼠海马组织差异蛋白质点功能主要涉及线粒体代谢、氧化应激、A β 产生等方面^[9]。因此,本研究从线粒体膜电位和 SIRT1/PGC-1 α 信号通路角度,探究补肾活血针刺法治疗 AD 的可能作用机制,为其临床应用提供依据。本实验通过中南大学实验动物福利与伦理委员会审查(伦理审批编号 XMSB-2023-0365)。

1 材料与方法

1.1 动物

雄性 SAMP8 小鼠(快速老化模型小鼠)40 只,雄性 SAMR1 小鼠(正常老化小鼠)10 只,均为 SPF 级、6 月龄,体质量(24 $\pm$ 2)g。实验动物许可证号 SCXK(苏)2021-0013,购于常州卡文斯实验动物有限公司。小鼠饲养于常规实验室动物房,温度 24~26℃,相对湿度 50%~60%,保持通风,12 h 光照,自由摄食、饮水,所有小鼠适应性喂养 1 周。

1.2 主要试剂与仪器

PGC-1 α 抗体(货号:ab191838)、SIRT1 抗体(货号:ab12193),二抗 HRP 抗兔 IgG 抗体(货号:ab288151)、JC-1 染色试剂盒(货号:ab113850),英国 Abcam 公司;线粒体分离试剂盒(货号:C3606)、4% 多聚甲醛(货号:P0099-3L)、线粒体储存液(货号:C3609),上海碧云天生物科技有限公司;ROS 检测试剂盒(货号:E004-1-1),南京建成生物工程研究所有限公司;PierceTM BCA 蛋白检测试剂盒(货号:23225)、PierceTM SDS-PAGE 样品制备试剂盒(货号:89888)、TRIzolTM 试剂(货号:15596018CN)、SYBRTM Green I 核酸凝胶染料(货号:S7563)、PVDF 转印膜(货号:88518)、RIPA 裂解液(货号:89901),美国 Thermo Scientific 公司;iScriptTM cDNA Synthesis Kit 逆转录试剂盒(货号:1708890),美国 BIO-RAD 公司;10% 水合氯醛(货号:A500288-0250),上海生工生物工程股份有限公司;盐酸多奈哌齐(货号:H20070181),卫材(中国)药业有限公司;苏木精溶液(货号:MHS1),美国 Sigma-Aldrich 公司。

华佗牌 1.5 寸针灸针(0.30 mm $\times$ 40 mm),中国苏州医疗用品有限公司;Morris 水迷宫行为学分析系统(JLBehv-MWM 型),上海吉量生物技术有限公司;超速离心机(型号:Sorvall LYNX 4000)、Nano-Drop Ultra 紫外分光光度计(型号:ND-ULTRA-GL)、7500 实时荧光定量 PCR 系统(型号:4351105),美国 Thermo Scientific 公司;Olympus 光学显微镜(型号:CX33),日本 Olympus 公司;切片机(型号:EM TP),德国 Leica 公司;酶标仪(型号:E0225),上海碧云天生物科技有限公司。

1.3 分组及干预方法

采用随机数字表法将 40 只 SAMP8 小鼠分为模型组、针刺组、非穴位组、多奈哌齐组,每组 10 只,SAMR1 小鼠 10 只为正常组。针刺组针刺选取小鼠“百会”“血海”“肾俞”和“膈俞”,其中“血海”“肾俞”和“膈俞”先刺激左侧穴位,次日再刺激右侧,交替进行。小鼠穴位定位以及针刺深度均参照《实验动物常用穴位名称与定位》^[10]进行。进针后,补泻手法参考文献[11]标准进行,“血海”和“膈俞”施捻转泻法,施针幅度为 180°~360°,施针频率为 50~60 次/min;“肾俞”和“百会”施捻转补法,施针幅度 60°~90°,施针频率为 120~150 次/min,运针 1 min,留针 10 min。非穴位组取双侧肋下固定非经非穴点,用平补平泻捻转手法进行刺激,施针幅度 90°,施针频率为 90 次/min,运针 1 min,留针 10 min,每日 1 次针刺。多奈哌齐组小鼠予 1 mg/kg 多奈哌齐胃管灌胃治疗,每天 1 次。模型组及正常组小鼠进行与以上两组相同时间、程度的捉抓刺激。各组小鼠均干预 4 周。

1.4 观察指标及方法

1.4.1 Morris 水迷宫实验评估小鼠认知和学习能力 干预结束后次日进行水迷宫实验。将小鼠放置在有水的圆形水池(直径 120 cm,深 50 cm)中,分为四个象限,于第三象限放置直径 12 cm、高度 30 cm 的平台。实验中维持水温于(24 $\pm$ 1)℃。上述平台置于水池壁与水池中央 1/2 处且处于水面 2 cm 下。从随机象限的进入点面向池壁放入小鼠。小鼠找到平台则视为成功。将 120 s 内未找到平台的小鼠放置于平台 30 s,每天于固定时间训练小鼠,重复 4 次上述实验。在定位航行实验中,从随机象限的进入点面向池壁放入小鼠,记录小鼠找到平台的潜伏时间为定位航行潜伏期。空间探索实验中,撤除平台,将小鼠从固定点面向水池放入水中,使用电脑软件观察小鼠 60 s 内穿越平台象限次数。

1.4.2 旷场实验评估小鼠的自发活动性、焦虑水平及探索行为 水迷宫结束后次日进行旷场实验。每组小鼠被放置于一个标准旷场箱内,箱体的尺寸为 100 cm×100 cm×40 cm,底部为黑色,顶部安装摄像头用于监测小鼠活动。实验前,小鼠需在实验环境中适应至少 2 h。将小鼠轻轻放入中央区域,允许其自由探索 5 min,记录小鼠的运动距离。

1.4.3 HE 染色观察海马组织病理 行为学实验结束当日下午取材,各组小鼠麻醉下断头法处死,均取双侧海马组织。按随机数字表每组选取 3 只小鼠海马组织进行 HE 染色和 Nissl 染色,其余各指标检测均取各组 10 只小鼠海马组织进行检测。取双侧海马组织,于 4% 多聚甲醛溶液中后固定 24 h,常规石蜡包埋。5 μm 组织切片脱蜡水化后,于苏木精溶液中染色 3 min,冲洗后,伊红液染色 1 min,流水冲洗,脱水、透明并封片。光镜下观察海马组织病理变化并拍照。

1.4.4 Nissl 染色观察海马神经元病理变化 将上述海马组织切片置于纯水中 10 s,随后避光下进行焦油紫染色 1 h,去掉多余染色液,置于分色液中 5 s,浸入 95% 乙醇中 5 min;再一次置于分色液中 5 s,浸入 95% 乙醇中 5 min,重复 2 次后,浸入二甲苯两次,每次 5 min。中性树胶封片,晾干后置于显微镜下观察并拍照,观察 Nissl 染色阳性细胞数量及染色情况。

1.4.5 海马组织线粒体膜电位检测 双侧海马组织约 50 mg,采用 JC-1 染色法检测海马组织线粒体膜电位的变化。使用预冷的 PBS 冲洗海马组织,加入线粒体分离试剂,冰上静置 15 min。4 ℃ 匀浆,3000 r/min 离心(离心半径 10 cm) 10 min 取上清,12 000 r/min 离心(离心半径 8 cm) 10 min 取沉淀。向沉淀中加入线粒体储存液,重悬线粒体。取线粒体重悬液与 JC-1 染色工作液混匀,点入 96 孔板。酶标仪激发波长 488 nm,线粒体膜电位结果以红光(530 nm)/绿光(585 nm)强度来表示。本研究以正常组膜电位的表达为 100%,其他组膜电位变化以相对正常组的百分比变化(%)。

1.4.6 海马组织中 ROS 含量测定 海马组织 50 mg,采用 ROS 试剂盒检测海马组织中 ROS 含量。取线粒体重悬液与浓度为 10 μmol/L 的 2',7'-二氯荧光黄双乙酸盐(DCFH-DA)混匀,点入 96 孔板,烘箱 37 ℃ 孵育 60 min。使用荧光酶标仪,设置激发波长 488 nm,发射波长 528 nm,检测各孔荧光

强度,以空白孔调零,计算相对荧光强度。本研究 ROS 含量正常组设定为 1,其他组 ROS 含量为相对正常组的倍数变化。

1.4.7 Western Blot 法检测海马组织 PGC-1α、SIRT1 蛋白水平 采用 RIPA 裂解液于小鼠海马组织中提取总蛋白,BCA 法蛋白定量测定蛋白含量。蛋白样本随后转至 10% SDS-PAGE 电泳,而后转至 PVDF 膜。样品采用 5% 脱脂牛奶于室温下封闭 1 h,而后于 4 ℃ 下孵育相应一抗 PGC-1α(1:2000)、SIRT1(1:2000)过夜,第 2 天 37 ℃ 下孵育二抗 HRP 抗兔 IgG 抗体(1:2000) 45 min。暗室中 X 光胶片曝光、显影、定影,观察结果,并采用 Image J 2.0 软件分析条带灰度值。

1.4.8 qRT-PCR 法检测海马组织 PGC-1α、SIRT1 mRNA 表达 采用 Trizol 试剂提取海马组织中总 RNA,使用紫外分光光度计检测 RNA 纯度。取 1 μg 总 RNA,使用逆转录试剂盒进行基因组 DNA 去除和逆转录反应:37 ℃ 15 min,85 ℃ 5 s。使用 SYBR™ Green I 染料在实时荧光定量 PCR 系统进行扩增,程序设置如下:94 ℃ 预变性 3 min;35 个循环的 94 ℃ 变性 30 s,55 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 60 s;终延伸 72 ℃ 5 min,后快速冷却至 4 ℃ 保存。采用 GAPDH 做内参,通过 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算目标基因相对表达量。各基因的扩增序列见表 1。

表 1 小鼠海马组织 SIRT1、PGC-1α 引物序列

Table 1 SIRT1, PGC-1α primer sequences of hippocampal tissues of mice in each group

基因名称	引物序列 (5'→3')	产物长度 /bp
SIRT1	上游: TGATTGGCACCAGATCCTCG	19
	下游: CCACAGCGTCATATCATCCAG	21
PGC-1α	上游: AACAGAACGAACAAGGGCGA	20
	下游: TGACAACAGGCATCAGCACT	20
GAPDH	上游: AATGGATTTGGACGCATTGGT	21
	下游: TTTGCACTGGTACGTGTTGAT	21

注: SIRT1, 沉默调节蛋白 1; PGC-1α, 过氧化物酶体增殖活化受体 γ 辅助活化因子 1α; GAPDH, 甘油醛-3-磷酸脱氢酶。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 18.0 及 GraphPad 6.0 进行统计分析,计量资料均符合正态分布以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,方差齐时组间比较采用单因素方差分析,两两比较用 LSD 或 SNK 检验,方差不齐时组间比较采用秩和检验,两两比较采用 Kruskal-Wallis 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠 Morris 水迷宫实验和旷场实验结果比较

表2示,与正常组比较,模型组和非穴位组小鼠定位航行潜伏期延长,穿越平台象限次数减少,旷场实验运动距离缩短($P<0.01$)。与模型组比较,针刺组和多奈哌齐组小鼠定位航行潜伏期缩短,穿越平台象限次数和旷场实验运动距离均增加($P<0.01$)。与非穴位组比较,针刺组小鼠定位航行潜伏期缩短,穿越平台象限次数和旷场实验运动距离均增加($P<0.01$)。与多奈哌齐组比较,针刺组小鼠定位航行潜伏期缩短($P<0.01$),穿越平台象限次数和旷场实验运动距离差异无统计学意义($P>0.05$)。

表 2 各组小鼠 Morris 水迷宫实验和旷场实验结果比较
Table 2 Comparison of the results of the Morris water maze tests and the open field tests in various groups of mice

组别	鼠数	Morris 水迷宫实验		旷场实验 运动距离/m
		定位航行 潜伏期/s	穿越平台 象限次数/60 s	
正常组	10	18.35±1.37	9.40±0.65	18.54±1.61
模型组	10	32.48±2.80 ^{a)}	3.61±0.38 ^{a)}	10.17±1.08 ^{a)}
非穴位组	10	35.56±3.09 ^{a)}	3.91±0.33 ^{a)}	10.81±1.30 ^{a)}
针刺组	10	19.52±2.52 ^{b) c)}	7.72±1.03 ^{b) c)}	18.17±1.64 ^{b) c)}
多奈哌齐组	10	26.09±2.52 ^{b) d)}	6.80±0.72 ^{b)}	18.13±1.94 ^{b)}

注: a) 与正常组比较, $P<0.01$; b) 与模型组比较, $P<0.01$; c) 与非穴位组比较, $P<0.01$; d) 与针刺组比较, $P<0.01$ 。

2.2 各组小鼠海马组织 HE 染色、Nissl 染色结果比较

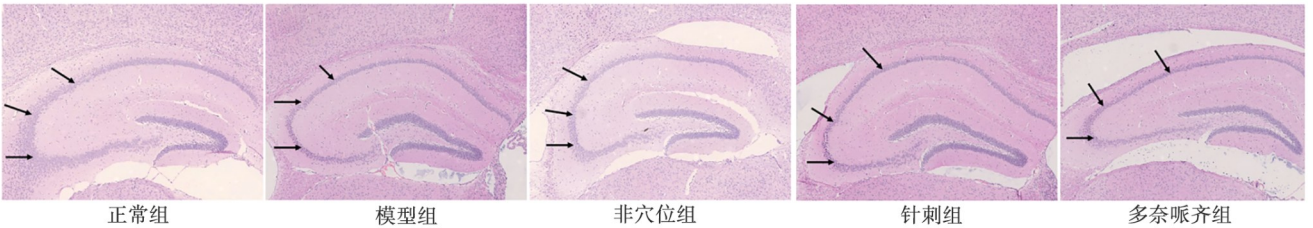
图1(HE染色)示,正常组小鼠海马区结构完整,神经元排列整齐,形态饱满且结构清晰;模型组和非穴位组小鼠海马组织神经元排列松散,数量减少,两组海马组织病理表现相似;与模型组和非穴位组比较,多奈哌齐组和针刺组小鼠海马组织神经元排列整齐,形态饱满结构清晰,神经元数量增加;多奈哌齐组和针刺组海马组织神经元形态及数量无显著差异。

图2(Nissl染色)示,正常组小鼠海马锥体神经元排列整齐,细胞质内Nissl体丰富,颜色较深。与正常组比较,模型组和非穴位组海马区锥体神经元不整齐,细胞质内Nissl体数量较少,染色较浅;针刺组和多奈哌齐组小鼠海马区神经细胞形态及排列变整齐,Nissl体数量增加,染色变深。

表3示,与正常组比较,模型组和非穴位组小鼠海马组织Nissl染色阳性细胞数量减少($P<0.01$)。与模型组比较,多奈哌齐组和针刺组小鼠Nissl染色阳性细胞数量增加($P<0.01$)。与非穴位组比较,针刺组Nissl染色阳性细胞数量增加($P<0.01$)。多奈哌齐组和针刺组Nissl染色阳性细胞数量差异无统计学意义($P>0.05$)。

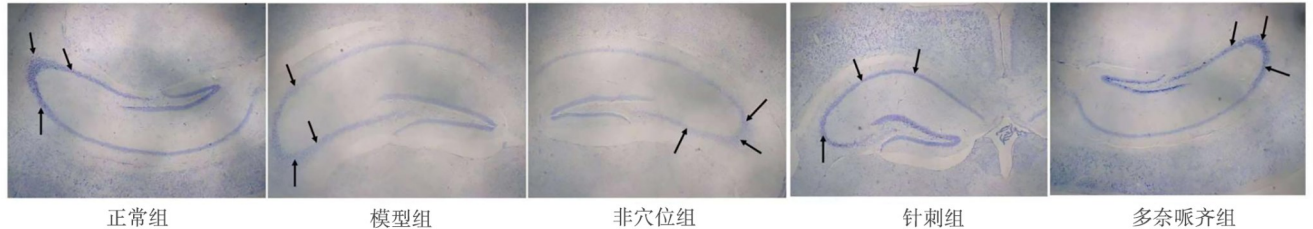
2.3 各组小鼠海马组织线粒体膜电位和 ROS 相对倍数比较

表4示,与正常组比较,模型组和非穴位组小



注: 图中箭头所指为神经元。

图1 各组小鼠海马组织HE染色图(×50)
Figure 1 HE staining of hippocampal tissues of mice in each group (×50)



注: 箭头所指为海马组织中神经元胞质内的Nissl体。

图2 各组小鼠海马组织Nissl染色图(×50)
Figure 2 Nissl staining of hippocampal tissues of mice in each group (×50)

表 3 各组小鼠海马组织 Nissl 染色阳性细胞数量比较
Table 3 Comparison of the number of Nissl-stained positive cells in hippocampal tissues of mice in each group

组别	鼠数	Nissl 染色阳性细胞/个
正常组	3	85.57±9.10
模型组	3	40.47±4.60 ^{a)}
非穴位组	3	38.63±4.20 ^{a)}
针刺组	3	80.17±8.90 ^{b) c)}
多奈哌齐组	3	72.27±8.30 ^{b)}

注：a) 与正常组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.01$ ；c) 与非穴位组比较， $P<0.01$ 。

表 4 各组小鼠海马组织细胞线粒体膜电位和 ROS 相对倍数比较
Table 4 Comparison of mitochondrial membrane potential and relative multiplicity of ROS in hippocampal tissues of mice in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	线粒体膜电位/%	ROS 相对倍数
正常组	10	100.00±10.00	1.03±0.11
模型组	10	40.50±5.30 ^{a)}	2.73±0.34 ^{a)}
非穴位组	10	44.70±3.28 ^{a)}	2.54±0.29 ^{a)}
针刺组	10	88.70±6.98 ^{b) c)}	1.49±0.20 ^{b) c)}
多奈哌齐组	10	90.40±7.46 ^{b)}	1.31±0.15 ^{b)}

注：ROS，活性氧。

a) 与正常组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.01$ ；c) 与非穴位组比较， $P<0.01$ 。

鼠海马组织细胞线粒体膜电位降低，ROS 相对倍数升高 ($P<0.01$)。与模型组比较，针刺组和多奈哌齐组小鼠海马组织中线粒体膜电位升高，ROS 相对倍数降低 ($P<0.01$)。与非穴位组比较，针刺组小鼠海马组织线粒体膜电位升高，ROS 相对倍数降低 ($P<0.01$)。多奈哌齐组和针刺组小鼠海马组织线粒体膜电位和 ROS 相对倍数差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

2.4 各组小鼠海马组织 SIRT1、PGC-1 α 蛋白水平和 mRNA 表达比较

表 5 示，与正常组比较，模型组和非穴位组小

表 5 各组小鼠海马组织 SIRT1、PGC-1 α 蛋白及 mRNA 表达比较

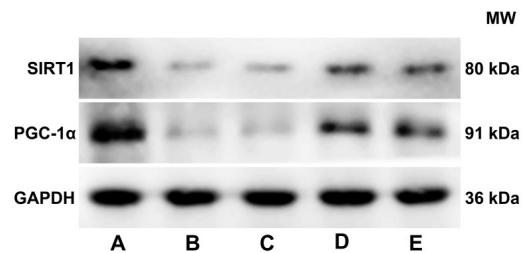
Table 5 Comparison of SIRT1, PGC-1 α protein and mRNA expression in hippocampal tissues of mice in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	蛋白水平		mRNA 表达	
		SIRT1	PGC-1 α	SIRT1	PGC-1 α
正常组	10	1.03±0.12	1.02±0.13	1.03±0.05	0.94±0.10
模型组	10	0.33±0.05 ^{a)}	0.46±0.06 ^{a)}	0.45±0.02 ^{a)}	0.37±0.06 ^{a)}
非穴位组	10	0.30±0.05 ^{a)}	0.49±0.07 ^{a)}	0.47±0.02 ^{a)}	0.43±0.04 ^{a)}
针刺组	10	0.76±0.09 ^{b) c)}	0.700±0.08 ^{b) c)}	0.87±0.04 ^{b) c)}	0.67±0.10 ^{b) c)}
多奈哌齐组	10	0.84±0.09 ^{b)}	0.79±0.08 ^{b)}	0.81±0.04 ^{b)}	0.62±0.22 ^{b)}

注：SIRT1，沉默调节蛋白 1；PGC-1 α ，过氧化物酶体增殖活化受体 γ 辅助活化因子 1 α 。

a) 与正常组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.01$ ；c) 与非穴位组比较， $P<0.01$ 。

鼠海马组织 SIRT1、PGC-1 α 蛋白水平和 mRNA 表达降低 ($P<0.01$)。与模型组比较，针刺组和多奈哌齐组海马组织 SIRT1、PGC-1 α 蛋白水平和 mRNA 表达升高 ($P<0.01$)。与非穴位组比较，针刺组小鼠海马组织 SIRT1、PGC-1 α 蛋白水平和 mRNA 表达升高 ($P<0.01$)。多奈哌齐组与针刺组 SIRT1、PGC-1 α 蛋白水平及 mRNA 表达差异无统计学意义 ($P>0.05$)。各组小鼠海马组织中 SIRT1、PGC-1 α 蛋白电泳图见图 3。



注：A，正常组；B，模型组；C，非穴位组；D，针刺组；E，多奈哌齐组；SIRT1，沉默调节蛋白 1；PGC-1 α ，过氧化物酶体增殖活化受体 γ 辅助活化因子 1 α ；GAPDH，甘油醛-3-磷酸脱氢酶。

图 3 各组小鼠海马组织中 SIRT1、PGC-1 α 蛋白电泳图

Figure 3 Electrophoresis of SIRT1 and PGC-1 α proteins in hippocampal tissues of mice in each group

3 讨论

针灸疗法对多种神经系统损伤或变性疾病都有很好的临床疗效^[12]。《素问·逆调论篇》言：“肾不生，则髓不能满”，提出髓海空虚的根源在于肾虚不生。《伤寒论·辨阳明病脉证并治》则指出“其人喜忘者，必有蓄血”，《景岳全书·痴呆证》也提到“凡心有瘀血，亦令健忘”，结合上述古籍，我们认为，肾虚则髓减脑空，神机失用，智能减退；血瘀则精气不能上荣于脑，或阻于脑络，脑失所养，两者共同作用则发为 AD。补肾活血针刺法取肾俞、百会、血海、膈俞为基本穴位。百会穴为

手足三阳经及督脉的交会穴，刺激该穴有补肾通脑、开窍增智、行气活血之功；肾俞为补肾助阳之主穴，配伍百会补肾益智效力倍增；血海为活血化瘀要穴，膈俞为八会穴之血会，两穴配合，活血通脉之功尤佳。以上诸穴配合，共奏补肾活血、益智健脑之功。临床研究显示，AD 导致的轻度认知障碍患者接受补肾活血针刺疗法后，其认知功能得到了显著改善^[13]。多奈哌齐在 AD 中的神经保护作用已得到证实^[14]，故本研究选其为阳性药物对照。本研究还设立了非穴位组作为针刺组的对照，以区分针刺的特异性效应。

本研究发现，补肾活血针刺法和多奈哌齐均有效增加 SAMP8 小鼠在旷场实验中的运动距离和 Morris 水迷宫实验穿越平台象限次数，同时降低小鼠 Morris 水迷宫实验中潜伏期，即补肾活血针刺法和多奈哌齐均能有效改善 AD 模型小鼠的认知、学习和探索能力均得到了显著改善，焦虑情绪得到缓解，且多奈哌齐组小鼠的定位平台的潜伏期明显长于针刺组小鼠，说明针刺组小鼠行为学能力优于多奈哌齐组小鼠。非穴位组和模型组小鼠行为学能力没有显著差异，提示小鼠行为学习能力的改变源于针刺所作用的特定穴位。另外，病理结果也显示，补肾活血针刺法和多奈哌齐均可改善 AD 模型小鼠海马组织病理改变，并增加尼氏体数量，缓解 AD 模型小鼠神经元损伤，与既往研究结果^[15]一致。本研究中，补肾活血针刺法和多奈哌齐在神经元保护方面未见显著差异，提示两者在对 AD 的治疗效果上没有显著差异。多奈哌齐作为治疗 AD 的一线药物，其疗效已有广泛报道，然而部分患者可能存在恶心、头痛等不良反应^[16]，补肾活血针刺法可能成为药物不耐受或需整体调理的 AD 患者的替代或补充疗法。

线粒体功能障碍是 AD 常见的病理学标志，可能通过能量代谢缺陷、氧化应激和炎症反应等途径促进 AD 的发病和进展^[17]。小胶质细胞的线粒体氧化应激与 AD 的发展有关，在 AD 患者中观察到 ROS 产生增加和线粒体膜电位的丧失，其机制多种多样，例如 A β 与小胶质细胞受体相互作用，激活导致线粒体损伤的下游通路，加重炎症和细胞毒性。此外，纤维蛋白 A β 激活小胶质细胞中的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶 (Nox)，导致线粒体 ROS 的产生增加，进一步引起神经毒性，最终小胶质细胞中 ROS 的升高导致炎症和细胞死亡途径的激活^[18]。粒体功能障碍在诱导神经炎症中都

起着至关重要的作用^[19]。本研究发现，AD 模型小鼠较正常组小鼠海马区 ROS 产生增多，膜电位降低，提示存在线粒体障碍。而补肾活血针刺法和多奈哌齐药物治疗可显著减少海马组织中 ROS 的产生，同时升高线粒体膜电位，说明补肾活血针刺法和多奈哌齐均有效改善了 AD 模型小鼠海马组织的线粒体功能障碍。既往研究结果显示，多奈哌齐对 A β 相关线粒体功能障碍表现出改善作用^[20]，支持本研究结果。另外，补肾活血针刺法改善 AD 模型小鼠海马组织线粒体功能与多奈哌齐对线粒体功能的影响未见统计学差异。

为进一步研究补肾活血针刺法改善 SAMP8 小鼠线粒体功能障碍的分子机制，本研究还检测了 SIRT1/PGC-1 α 信号通路中关键分子的蛋白和基因表达情况。SIRT1/PGC-1 α 通路在线粒体功能密切相关，在氧化应激导致肠上皮细胞损伤中，SIRT1/PGC-1 α 通路的激活导致自噬/线粒体自噬相关标记物水平升高，抑制 SIRT1 则逆转了这些作用，激活 SIRT1 显著抑制 ROS 的产生，导致线粒体膜电位增加^[21]。AD 模型小鼠中 SIRT1 及其下游 PGC-1 α 因子的表达均下调^[22]。激活腺苷酸激活蛋白激酶 (AMPK) /SIRT1/PGC-1 α 信号通路促进线粒体生物合成，从而改善 AD 模型小鼠的记忆缺陷、神经元损失和线粒体功能障碍^[23]。本研究结果显示，AD 模型小鼠海马组织内 SIRT1 及 PGC-1 α 的蛋白及 mRNA 水平显著降低，即 SIRT1/PGC-1 α 通路受到抑制。多奈哌齐或补肾活血针刺显著增加了 SIRT1 及 PGC-1 α 的蛋白及 mRNA 表达，激活 SIRT1/PGC-1 α 通路，而非穴位针刺组小鼠的 SIRT1/PGC-1 α 通路未见显著性影响。

综上，本研究结果表明，补肾活血针刺法可能通过改善海马组织线粒体功能，减轻 AD 模型小鼠神经元损伤并改善其学习认知功能，其调控的分子机制可能与激活 SIRT1/PGC-1 α 信号通路有关。本研究未进行 SIRT1/PGC-1 α 通路的功能性验证，在后续的研究中我们将深入挖掘其机制。

参考文献

- [1] JIA J, NING Y, CHEN M, et al. Biomarker changes during 20 years preceding Alzheimer's disease [J]. N Engl J Med, 2024, 390(8): 712-722.
- [2] TREJO-LOPEZ JA, YACHNIS AT, PROKOP S. Neuropathology of Alzheimer's disease [J]. Neurotherapeutics, 2022, 19(1): 173-185.

- [3] NABI SU, KHAN A, SIDDIQUI EM, et al. Mechanisms of mitochondrial malfunction in Alzheimer's disease: new therapeutic hope[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022: 4759963. doi: 10.1155/2022/4759963.
- [4] DONG W, YAN L, TAN Y, et al. Melatonin improves mitochondrial function by preventing mitochondrial fission in cadmium-induced rat proximal tubular cell injury via SIRT1-PGC-1 α pathway activation[J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2022, 242: 113879. doi: 10.1016/j.ecoenv.2022.113879.
- [5] ZHAO Y, ZHANG J, ZHENG Y, et al. NAD⁺ improves cognitive function and reduces neuroinflammation by ameliorating mitochondrial damage and decreasing ROS production in chronic cerebral hypoperfusion models through Sirt1/PGC-1 α pathway[J]. *J Neuroinflammation*, 2021, 18(1):207.
- [6] 肖岚, 董克礼. 董克礼教授运用补肾活血法治疗阿尔茨海默病经验[J]. *中华中医药杂志*, 2015, 30(2):435-437.
- [7] 朱宏, 董克礼, 吴岳, 等. 补肾活血法对阿尔茨海默病患者认知功能改善的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2010, 30(11):1493-1495.
- [8] 萨依腊西·杰恩斯努尔, 肖岚, 龙见汝, 等. 补肾活血针刺法对SAMP8小鼠学习记忆能力及海马内源性神经干细胞增殖的影响[J]. *中国中医药信息杂志*, 2018, 25(9):35-38.
- [9] 梁梅亭, 朱宏, 董克礼, 等. 补肾活血针刺法对SAMP8小鼠杏仁核蛋白质组学表达的影响[J]. *中国中医药信息杂志*, 2018, 25(3):58-63.
- [10] 中国针灸学会. 实验动物常用穴位名称与定位 第3部分: 小鼠[J]. *针刺研究*, 2021, 46(5):445-446.
- [11] 卞金玲, 张春红. 石学敏院士针刺手法量学的概念及核心[J]. *中国针灸*, 2003, 23(5):38-40.
- [12] 张利达, 高永龙, 蔡兴慧, 等. 近5年针刺保护神经作用研究概况[J]. *陕西中医学院学报*, 2017, 40(4):137-139.
- [13] 朱宏, 董克礼, 吴岳, 等. 针刺对阿尔茨海默病患者异构前列腺素的影响[J]. *中国针灸*, 2010, 30(1):18-21.
- [14] 高旭红, 赵海花, 赖红, 等. 多奈哌齐对AD大鼠海马结构神经元的保护作用[J]. *中国组织化学与细胞生物学杂志*, 2012, 21(1):33-36.
- [15] 刘欣媛, 杜艳军, 王丽, 等. 电针抗炎效应在SAMP8小鼠神经元损伤中的促保护作用[J]. *针刺研究*, 2023, 48(2):133-138.
- [16] 金艳, 李阳, 雷旭伟. 多奈哌齐治疗AD源性轻度认知功能障碍患者的临床研究[J]. *中国临床药理学杂志*, 2024, 40(18):2616-2620.
- [17] ALEXIOU A, SOURSOU G, CHATZICHRONIS S, et al. Role of GTPases in the regulation of mitochondrial dynamics in Alzheimer's disease and CNS-related disorders[J]. *Mol Neurobiol*, 2019, 56(6):4530-4538.
- [18] AGRAWAL I, JHA S. Mitochondrial dysfunction and Alzheimer's disease: role of microglia[J]. *Front Aging Neurosci*, 2020, 12:252. doi: 10.3389/fnagi.2020.00252.
- [19] LITWINIUK A, BARANOWSKA-BIK A, DOMAŃSKA A, et al. Contribution of mitochondrial dysfunction combined with NLRP3 inflammasome activation in selected neurodegenerative diseases[J]. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2021, 14(12):1221.
- [20] YE CY, LEI Y, TANG XC, et al. Donepezil attenuates A β -associated mitochondrial dysfunction and reduces mitochondrial A β accumulation in vivo and in vitro[J]. *Neuropharmacology*, 2015, 95: 29-36. doi: 10.1016/j.neuropharm.2015.02.020.
- [21] LIANG D, ZHUO Y, GUO Z, et al. SIRT1/PGC-1 pathway activation triggers autophagy/mitophagy and attenuates oxidative damage in intestinal epithelial cells[J]. *Biochimie*, 2020, 170: 10-20. doi: 10.1016/j.biochi.2019.12.001.
- [22] YIN Z, GAO D, DU K, et al. Rhein ameliorates cognitive impairment in an APP/PS1 transgenic mouse model of Alzheimer's disease by relieving oxidative stress through activating the SIRT1/PGC-1 α pathway[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022:2524832. doi: 10.1155/2022/2524832.
- [23] ZHU C, ZHANG Z, ZHU Y, et al. Study on the role of Dihuang Yinzi in regulating the AMPK/SIRT1/PGC-1 α pathway to promote mitochondrial biogenesis and improve Alzheimer's disease[J]. *J Ethnopharmacol*, 2025, 337(Pt 2):118859.

Effects of Kidney-Tonifying and Blood-Activating Acupuncture on Mitochondrial Membrane Potential and SIRT1/PGC-1 α Axis in Hippocampal Tissue of SAMP8 Mice

REN Dan, ZHANG Ting, XU Jiangxi, ZHU Hong, LI Ruomeng

Third Xiangya Hospital, Central South University, Changsha, 410013

ABSTRACT Objective To explore the potential mechanisms of kidney-tonifying and blood-activating acupuncture for Alzheimer's disease. **Methods** Male SAMP8 mice were randomly divided into a model group, acupuncture

group, non-acupoint group, and donepezil group, with 10 mice in each group, and 10 SAMR1 mice as normal group. The acupuncture group received acupuncture at Baihui (GV 20), Xuehai (SP 10), Shenshu (BL 23), and Geshu (BL 17). Xuehai (SP 10), Shenshu (BL 23), and Geshu (BL 17) were stimulated on the left side first and then on the right side alternately, once a day. The non-acupoint group received acupuncture at fixed bilateral non-meridian, non-acupoint points under the ribs, once a day. The model and normal groups underwent equivalent handling and restraint stress without acupuncture. The donepezil group received 1 mg/kg donepezil via gastric gavage daily. All groups were treated for 4 weeks. After treatment, Morris water maze tests (to record orientation sailing latency, number of traverses through the platform quadrant) and open field (to record distance travelled) were used to evaluate learning and memory abilities; hippocampal neuronal damage was analyzed via HE and Nissl staining; mitochondrial membrane potential and reactive oxygen species (ROS) were measured using assay kits; Western blot and qRT-PCR were performed to detect silencing information regulator 1 (SIRT1), peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC-1 α), and mRNA expression levels. **Results** Compared with the normal group, mice in the model group and non-acupoint group showed elevated orientation sailing latency and relative multiplicity of ROS in hippocampal tissues, and reduced number of traverses through the platform quadrant, distance of movement in the open-field experiment, number of Nissl-staining-positive cells in the hippocampal tissues, mitochondrial membrane potential, and protein levels and mRNA expression of SIRT1, PGC-1 α ($P < 0.01$); HE staining showed that the hippocampal tissues of the mice was loosely arranged, with reduced number of neurons and vacuolar degeneration; Nissl staining showed that pyramidal neurons in the hippocampal region were not neatly arranged, and the number of Nissl bodies in the cytoplasm was less and the staining was lighter. Compared with the model group, mice in the acupuncture group and donepezil group had lower orientation sailing latency and relative multiplicity of ROS in the hippocampal tissue, higher number of traverses through the platform quadrant, distance of movement in the open-field experiment, number of Nissl-stained positive cells in the hippocampal tissue, mitochondrial membrane potential, and protein levels and mRNA expression of SIRT1 and PGC-1 α ($P < 0.01$), and HE staining and Nissl staining showed significant improvement in hippocampal histopathological damage. Compared with the donepezil group, the orientation sailing latency shortened in the acupuncture group of mice ($P < 0.01$). **Conclusion** Kidney-tonifying and blood-activating acupuncture method can alleviate the SIRT1/PGC-1 α signalling pathway in the hippocampal tissue and improve the mitochondrial function, thus alleviating the neuronal damage, which is one of the possible mechanisms for its treatment of Alzheimer's disease.

Keywords Alzheimer's disease; acupuncture; kidney-tonifying and blood-activating acupuncture; mitochondria; neurons; reactive oxygen species; silencing information regulator 1; peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha

(收稿日期: 2025-01-18; 修回日期: 2025-04-28)

[编辑: 邓媛]