

“益气调血、扶本培元”针法对 SAM P10鼠痴呆状况 和大脑总胆固醇的影响

陈付艳¹ 聂 坤² 于建春² 付 于² 成海燕¹ 韩景献²

(1. 天津中医药大学 2005级硕士研究生, 天津市南开区鞍山西道 312号, 300193; 2. 天津中医药大学第一附属医院)

[摘要] 目的 观察快速老化痴呆鼠 SAM P10痴呆状况与大脑总胆固醇异常的相关性, 并探讨“益气调血、扶本培元”针法改善痴呆的机制。方法 设立正常老化鼠 SAM R1对照组, SAM P10对照组、针刺组及非穴组, 通过 Morris水迷宫测试各组小鼠学习记忆功能, Folch法和比色法测量大脑总胆固醇的含量。结果 与 SAM R1对照组相比, SAM P10对照组小鼠出现明显的学习记忆障碍, 其大脑总胆固醇含量明显增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 而针刺组可降低大脑总胆固醇含量, 改善其学习记忆能力与 SAM P10对照组比较差异亦有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 调节大脑胆固醇的稳态可能是“益气调血、扶本培元”针法改善 SAM P10鼠痴呆状况的机制之一。

[关键词] 快速老化痴呆鼠 SAM P10; 痴呆; 大脑总胆固醇含量; 针刺

Influence of Acupuncture on Dementia and Brain Total Cholesterol of SAMP10 Mice

CHEN Fu-yan¹, NIE Kun², YU Jian-chun², et al.

(1. Postgraduate student of 2005 year, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193; 2. The First Affiliated Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To observe the relationship between the brain total cholesterol and the dementia of senescence accelerated mice-prone 10 (SAMP10) and explore the mechanism of acupuncture method “reinforcing qi and regulating blood, strengthening the root and build up the strong constitution” in improving the dementia. **Methods** The Senescence-accelerated mice-resistant 1 (SAMR1) control group, SAMP10 control group, SAMP10 acupuncture group, and SAMP10 non-point group were established. The Morris water maze was used to test the learning ability and memory of mice of all groups, and the Folch and colorimetric methods were applied to observe the contents of their brain total cholesterol. **Results** Compared with the SAMR1 control group, the mice of SAMP10 control group had significant impairment in learning ability and memory and their brain total cholesterol was evidently increased, the difference was significant ($P < 0.05$). And the difference in the SAMP10 acupuncture group in decreasing the brain total cholesterol and improving the learning ability and memory was also significant in comparing with the SAMP10 control group ($P < 0.05$). **Conclusion** Regulating the stability of brain cholesterol may be one of the mechanisms of acupuncture in “reinforcing qi and regulating blood, strengthening the root and build up the strong constitution” to treat dementia.

Key Words Senescence accelerated mouse-prone 10 (SAMP10); Dementia; Brain total cholesterol; Acupuncture

阿尔茨海默病 (AD) 是一种常见的退行性神经系统疾病, 严重危害老年人的健康和生活质量。研究表明, AD的发生与胆固醇的合成、储存、运输、清除机制障碍密切相关^[1]。临床实践发现, “益气调血、扶本培元”针法治疗 AD疗效显著^[2]。揭示针刺改善老年性痴呆的可能机制, 本研究选用快速老化痴呆鼠 SAM P10为研究对象, 以正常老化鼠 SAM R1为对照, 观察小鼠学习记忆能力的差异与大脑总胆固醇含量的相关性, 以及“益气调血、扶本培元”针法对 SAM P10鼠行为学

及大脑总胆固醇含量的影响

1 材料和方法

1.1 动物及分组

所有动物由天津中医药大学第一附属医院实验动物中心提供 (津实动质 M 准字第 006号), 体重 (27±3) g。选用 7月龄快速老化痴呆鼠 (SAMP10) 60只, 雌雄各半, 随机分为 3组, 即 SAM P10对照组、SAMP10针刺组、SAMP10非穴组; 选择 7月龄正常老化非痴呆鼠 SAM R1 20只, 为 SAM R1对照组。

1.2 穴位选择和针刺方法

SAMP10针刺组采用“益气调血、扶本培元”针法, 穴位选取膻中、中脘、气海及双侧血海、足三里, 穴位定位参考“十五”规划教材《实验针灸学》^[3]中的动物穴位图谱及文献^[4]。针刺方法: 血海穴施捻转泻法 30秒, 其

基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (30630074); 教育部高等学校博士点专项科研基金 (20060063006); 天津市应用基础及前沿技术研究计划重点项目 (07JCZDJC08800); 天津市科技发展计划基金项目 (05YFGDSF02300); 教育部科学技术研究重点项目 (207006)

通讯作者: 韩景献, hanjingxian@hotmail.com, (022) 27432412

他穴位均行捻转补法 30秒。SAMP10非穴组取双侧肋下固定非经非穴点,用平补平泻捻转手法各 30秒。SAMP10对照组和 SAM R1对照组进行与以上两组相同时间程度的捉抓刺激。各组每天做相应处理 1次,第 7天暂停 1次,连续 1个月。

1.3 Morris水迷宫

针刺后各组行水迷宫测试,以评价针刺对 SAMP10小鼠学习记忆能力的影响。准备和布置的具体方法参考于建春^[4]、刘存志^[5]等的相关研究,水池直径 90cm,水池被两条假想的线平分成 4个相等的象限(I、II、III、IV)。10天水迷宫实验包括 5天隐蔽平台试验,1天空间探索试验,3天反向平台试验,1天可视平台试验。

1.3.1 隐蔽平台试验 试验时平台位置位于I象限的中央(平台中点离池壁 22.5cm),且位置保持不动,平台在水面以下 2cm左右。于每天 8:00和 14:00两个固定时间点分别在池壁上II、IV象限的中点入水各训练 1次。记录小鼠从入水至找到平台的游泳路线的长度及找到平台的时间(逃避潜伏期),然后让小鼠在平台上停留 10秒。如果 90秒内找不到平台,潜伏期记为 90秒,并将小鼠置于平台上休息 10秒,以两次潜伏期的算术均值作为当天的成绩进行统计分析。比较不同组小鼠学习获取能力。

1.3.2 空间探索试验 隐蔽平台试验结束 24小时后,撤除平台。任选一相同入水点将小鼠放入水中,记录小鼠在 90秒内的游泳路径,对小鼠在原平台象限的停留时间进行统计分析。观察受试小鼠的空间定位能力,及在空间探索过程中的变化规律。比较小鼠学习保持能力。

1.3.3 反向平台试验 操作基本同隐蔽平台试验,只是将平台位置移至对面象限的中央,比较小鼠再学习能力。

1.3.4 可视平台试验 让平台位置露出水面 2cm,并贴上黄色胶带,其余操作同隐蔽平台试验,以排除动机、视觉、感觉和运动功能变化给对其空间学习记忆产生的影响。

1.4 大脑脂类和胆固醇含量的测定

实验结束后各组动物同时行颈椎脱臼法处死,剥取大脑组织,称取大脑鲜重。参照 Folch法^[6]加入氯仿、甲醇和水,冰上超声粉碎成匀浆,混匀,离心,抽取下层有机相。重复以上步骤 3次,将 3次下层有机相混合,氮气吹干,称得脂类净重。用一定体积的 Folch溶剂将各试管中的脂类复溶成相同浓度,分别取等体积溶液挥发至干,加入冰乙酸振荡溶解,FeCl₃溶液显色 15分钟,紫外分光光度计测定 550nm 处光吸收值。计算大脑中脂类和胆固醇含量。

1.5 统计学分析

所有计量数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用 SPSS11.5统计软件进行统计处理。其中水迷宫实验数据采用多因素方差分析,其它实验数据采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 针刺对学习记忆功能的影响

表 1 2示,与 SAM R1对照组比较,在隐蔽平台试验中,SAMP10对照组逃避潜伏期明显延长,两者比较差异有统计学意义($P < 0.05$);在探索实验中,小鼠在原平台象限的停留时间明显缩短($P < 0.05$);在反向试验中,SAMP10对照组逃避潜伏期明显长于

表 1 各组小鼠隐蔽平台试验结果比较(秒, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	隐蔽平台试验				
		1天	2天	3天	4天	5天
SAM R1对照组	20	68.59±15.00	52.90±9.39	37.56±10.70	32.6±12.16	28.27±12.88
SAMP10对照组	20	83.16±13.30 [△]	68.08±18.12 [△]	54.32±25.37 [△]	63.10±10.96 [△]	65.96±15.57 [△]
SAMP10针刺组	20	77.8±17.90	56.35±10.80	53.24±18.49	33.13±7.52	27.49±12.58
SAMP10非穴组	20	79.45±8.87 [△]	77.05±9.86 [△]	67.46±18.88 [△]	55.08±6.79 [△]	51.72±8.47 [△]

与 SAM R1对照组比较,* $P < 0.05$;与 SAMP10针刺组比较,△ $P < 0.05$

表 2 各组小鼠探索、反向、可视平台试验结果比较(秒, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	探索试验	反向试验		可视平台试验	
		6天	7天	8天	9天	10天
SAM R1对照组	20	22.05±8.47	37.38±18.41	34.49±10.92	31.18±16.10	37.36±14.21
SAMP10对照组	20	9.72±1.90 [△]	67.17±13.30 [△]	61.79±15.40 [△]	59.80±34.77 [△]	43.89±12.38
SAMP10针刺组	20	18.53±3.55	35.58±19.48	40.23±22.85	30.56±17.85	42.29±15.78
SAMP10非穴组	20	12.63±1.59 [△]	60.34±23.55 [△]	48.84±15.01 [△]	59.52±27.34 [△]	57.98±15.19

与 SAM R1对照组比较,* $P < 0.05$;与 SAMP10针刺组比较,△ $P < 0.05$

SAM R1 对照组 ($P < 0.05$), 说明 SAMP10 小鼠学习获取能力、保持能力、再学习能力均较正常 SAMP1 小鼠减低。

在隐蔽平台试验、探索试验和反向试验中, SAMP10 针刺组均与 SAM R1 对照组比较差异无统计学意义, 而与 SAMP10 对照组及 SAMP10 非穴组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 说明针刺可改善 SAMP10 小鼠空间学习记忆的获取能力、保持能力及再学习能力, 而非穴刺激组则不明显。此外, 在可视平台试验中, 各组小鼠逃避潜伏期的比较差异均无统计学意义, 提示动物在感觉、视觉或运动功能方面的差异未对其空间学习记忆产生明显的影响。

2.2 针刺对脑脂类和胆固醇的影响

表 3 示, 与 SAM R1 对照组比较, SAMP10 对照组大脑脂类和总胆固醇含量均增加 ($P < 0.05$) 与 SAMP10 对照组比较, SAMP10 针刺组大脑脂类和总胆固醇含量均显著下降 ($P < 0.05$), 而非穴组无明显变化 ($P > 0.05$); 与 SAM R1 对照组比较, SAMP10 针刺组大脑脂类含量有所降低, 但差异仍有统计学意义 ($P < 0.05$), 而胆固醇含量无明显差别 ($P > 0.05$)。表明 SAMP10 对照组大脑脂类和总胆固醇含量均增加, 而针刺法能够调节大脑总胆固醇含量使其达到平衡。

表 3 各组小鼠大脑脂类和胆固醇的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	脂类含量 (%)	胆固醇含量 (mg/100g)
SAM R1 对照组	20	7.92 ± 0.24	1583.46 ± 93.75
SAMP10 对照组	20	8.40 ± 0.24 [△]	1771.47 ± 189.54 [△]
SAMP10 针刺组	20	8.15 ± 0.21*	1671.18 ± 91.52
SAMP10 非穴组	20	8.33 ± 0.24 [△]	1727.98 ± 115.76

与 SAM R1 对照组比较, * $P < 0.05$; 与 SAMP10 针刺组比较, $\Delta P < 0.05$

3 讨论

中医认为老年性痴呆的病理因素主要为肾虚、油毒、痰湿等, 而我们认为, 三焦气化失司是导致老年性痴呆的主要原因。随着机体的衰老, 三焦气化功能日趋低下, 气化失常则气血失调, 水湿失运, 痰湿壅盛, 膏脂积聚, 从而导致脂质代谢紊乱, 脂质代谢紊乱又可加剧三焦气化失常从而加重或诱发老年性痴呆^[7]。韩景献教授基于对三焦气化功能的认识, 确立了“益气调血、扶本培元”针法, 从气论治, 取穴膻中、中脘、气海、足三里、血海, 重在调三焦之气, 以调补脾胃、充实气血、助元益肾、活血化瘀、蠲化痰浊, 改善脑痴呆状况, 延缓脑衰老^[8]。

流行病学和体内外的研究表明大脑脂质代谢异常

与 AD 的发病密切相关^[10], 正常的脑功能需要稳定的胆固醇水平, 脑胆固醇代谢的异常可导致人类脑病^[1]。本研究显示, 快速老化痴呆鼠 SAMP10 大脑总胆固醇含量异常增加并与其痴呆密切相关, 提示胆固醇代谢异常可能是 SAMP10 鼠痴呆发生的共同特征。施予“益气调血、扶本培元”针法后, SAMP10 鼠脑总胆固醇含量明显降低, 表明以该针法调三焦之气的能调节 SAMP10 鼠脑胆固醇代谢, 使之趋于正常稳态。同时研究结果显示, 伴针刺的 SAMP10 痴呆小鼠空间学习记忆能力的获得和保持得到改善, 再学习能力得到增强, 趋于正常小鼠, 提示调节大脑胆固醇的稳态, 可能是“益气调血、扶本培元”针法改善 SAMP10 鼠痴呆状况的机制之一, 为研究 SAMP10 鼠脑痴呆的机理及针刺改善老年性痴呆的机制提供了新的思路。

参考文献

[1] Bjorkhem I. Crossing the barrier: oxysterols as cholesterol transporters and metabolic modulators in the brain. J Intern Med. 2006, 260(6): 493~ 508.

[2] 韩景献, 于建春, 于涛, 等. 针刺干预脑衰老的临床及基础研究. 天津中医药, 2005, 22 (5): 438~ 438.

[3] 李忠仁. 实验针灸学. 北京: 中国中医药出版社, 2003 327 ~ 329.

[4] Yu J, Liu C, Zhang X, et al. Acupuncture improved cognitive impairment caused by multi-infarct dementia in rats. Physiol Behav, 2005, 86(4): 434~ 441.

[5] Liu CZ, Yu JC, Cheng HY, et al. Spatial memory performance and hippocampal neuron number in osteoporotic SAMP6 mice. Exp Neurol, 2006, 201(2): 452~ 460.

[6] Folch J, Lees M, Stantey GH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. J Biol Chem, 1957, 226(1): 497~ 509.

[7] Han Jingxian. Acupuncture principle of Tonifying qi and regulating blood, supporting the root and fostering the source on aging and senile diseases. Chin J Integr Med, 2007, 13(3): 166~ 167.

[8] 付于, 于建春, 丁晓蓉, 等. 针刺对快速老化小鼠 SAMP10 转录调节因子 NF- κ B-1 LRG47 的影响. 中国针灸, 2006, 26(9): 651~ 654.

[9] Nicholls JG, Martin AR, Wallace BG, et al. From Neuron to Brain. 4th ed. Beijing: Science Press, 2003 310.

[10] Koldamova R, Lefterov I. Role of LXR and ABCA1 in the pathogenesis of Alzheimer's disease-implications for a new therapeutic approach. Curr Alzheimer Res, 2007, 4 (2): 171~ 178.

(收稿日期: 2007- 08- 03; 修回日期: 2007- 10- 15)

[编辑: 邓媛]