

· 针灸推拿 ·

电针对阿尔茨海默病大鼠海马区胶质细胞活化及神经元超微结构的影响

朱书秀¹ 孙国杰²

(1. 江汉大学医学院中医系, 湖北省武汉市经济技术开发区三角湖路 8 号, 430056; 2. 湖北中医学院)

[摘要] **目的** 观察电针对阿尔茨海默病(AD)大鼠海马区胶质细胞活化及神经元超微结构的影响, 探讨电针对神经元的保护作用。**方法** Meynert 核注射微量 A β -40 制备 AD 大鼠模型, 随机分成正常组、假手术组、模型组和电针组, 每组 14 只。电针组选取百会、太溪、足三里电针治疗。免疫组化法观察各组大鼠海马区胶质细胞的表达, 用透射电镜观察神经元超微结构。**结果** 模型组海马区胶质细胞活化, 数量增多, 神经细胞变性, 内质网扩张, 线粒体肿胀。经电针治疗后, 活化胶质细胞数量较模型组减少, 超微结构基本正常。**结论** 电针治疗可减少 AD 大鼠胶质细胞的活化, 对神经元具有保护作用。**[关键词]** 电针; 阿尔茨海默病; 胶质细胞; 超微结构

Effect of Electro-acupuncture on Activation of Glial Cells and Neuronic Ultrastructure in Hippocampus of Alzheimer's Rats

ZHU shuxiu¹, SUN Guojie²

(1. Medical College of Jiangnan University, Wuhan 430056; 2. HuBei college of TCM)

ABSTRACT **Objective** To observe the effect of electropuncture on activation of glial cells and neuronic ultrastructure in hippocampus of Alzheimer disease(AD) rats, and to investigate its protective effect on neuron. **Methods** AD rat model was established by microinjection of amyloid-beta protein(A β -40) into the Meynert nucleus of rats, then randomly divided into normal group, sham operation group, model group and electropuncture group, 14 rats in each. Electro-acupuncture was given at "baihui(DU 20)", "taixi(KI 3)" and "zusanli(ST 36)" in the electro-acupuncture group; activation of glial cells in hippocampus was determined by immunohistochemistry, and ultrastructure of neurons was observed under transmission electron microscopy in all group of rats. **Results** A great number of glial cells were activated in model group with increase of the number, nerve cell degeneration, endoplasmic reticulum to expand, and chondriosome to swell. After treatment of electro-acupuncture, the number of activated glial cells decreased as compared with model group, and the ultrastructure returned to almost normal. **Conclusions** Electro-acupuncture treatment can decrease the number of activated glial cells of AD rats so as to protect the neurons.

Key Words Electro-acupuncture; Alzheimer disease; Glial cells; Ultrastructure

随着近年对阿尔茨海默病(Alzheimer disease, AD)发病机制的研究, 认为脑内慢性炎症反应可能是其重要病理特征之一, 从而提出了 AD 的免疫炎症机制^[1,2]。而中枢神经系统的免疫细胞主要是胶质细胞中的小胶质细胞(microglia, Mi)和星形胶质细胞(astrocyte, As), 特别是 Mi 可能在 AD 的发病机制中起重要作用。本实验观察电针对 AD 大鼠海马区胶质细胞的活化及神经元超微结构变化的影响, 探讨电针对 AD 中枢的免疫调节和神经保护机制。

1 材料

1.1 动物

SD 大鼠 100 只, 雌雄各半, 24 月龄, 体重 350~450g, 由华中科技大学同济医学院实验动物学部提供。采用 Y 型水迷路法粗筛, 凡 15 次测试中正确次数达

12 次以上者为合格。

1.2 药物及试剂

A β -40(BoiSource 公司), 兔抗大鼠 GFAP(胶质原纤维酸性蛋白)多克隆抗体、兔抗大鼠 CD68 多克隆抗体(Sigma 公司), SABC 免疫组化试剂盒(武汉 Boster 公司)。

1.3 主要仪器

脑立体定位仪(江湾 II 型, 上海江湾医疗器械厂), BX50 光学显微镜(日本 Olympus 公司), 台式牙钻机(成都康发医疗器械有限公司), 轮转式石蜡切片机(德国 Leitz 公司生产), 微量注射器(5 μ l, 上海医用仪器厂), FEI Tecnai G2 12 透射电镜(荷兰)。

2 方法

2.1 动物造模及分组

从 100 只大鼠中筛选出 80 只正常老年大鼠, 再从 80 只中随机筛选出 28 只, 分别归入正常组和假手术

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30772837)

通讯作者: 朱书秀, zhushuxiu@yahoo.com.cn, (027) 62880890

组各 14 只。从造模成功的大鼠中随机筛选 28 只归入模型组和电针组, 每组 14 只(12 只用于免疫组化, 2 只用于超微病理) 。

Aβ-40 孵育: 用 0. 1% 三氟乙酸将 Aβ-40 稀释成 10 μg/μl, 37℃ 孵育 1 周, 使其变为聚集状态的 Aβ-40。

造模方法: 大鼠给予 10% 水合氯醛麻醉后, 按大鼠脑立体定位图谱进行定位, 在前囟点后 1. 4mm, 中线旁开 3mm, 用牙科钻钻一小孔穿颅(直径 1mm) , 垂直插入微量注射器, 使针尖自颅骨表面进针 7mm 至 Meynert 核。模型组左右侧各注射 1 μl (10 μg/μl) Aβ-40 聚集液, 假手术组注入等容积生理盐水。造模完成后第 31 天, 对大鼠再次进行 Y 字型水迷宫筛选, 凡 15 次测试中正确次数较造模前下降 1/3 者为造模成功^[3]。

2.2 各组动物处理方法

电针组: 造模完成后第 32 天开始, 取百会、太溪(双侧) 、足三里(双侧) , 用普通 28 号 0. 5 寸不锈钢毫针针刺, 百会向前以 15° 角斜刺 10mm, 足三里直刺 5mm, 太溪直刺 3mm, 接 G 6805-2 型电针治疗仪(左右太溪与左右足三里各为一对电极, 太溪接正极, 足三里接负极) , 连续波, 频率 2Hz, 强度 1mA, 留针 15min, 每天 1 次, 6 天为 1 个疗程, 疗程间隔 1 天, 共治疗 2 个疗程。

正常组、假手术组及模型组不行针刺治疗, 4 组同步饲养。

2.3 Mi 及 As 的测定

治疗结束后, 大鼠给予 10% 水合氯醛麻醉, 迅速处死取脑, 剥取海马, 置于 4% 多聚甲醛磷酸缓冲液中固定过夜, 常规石蜡包埋, 连续切片, 片厚 4 μm, 每隔 10 张取 1 张, 应用兔抗大鼠 CD68、GFAP 进行免疫组化显色, 其中滴加一抗均按 1: 100 比例稀释, 阴性对照为一抗加 PBS。具体操作步骤严格按照试剂盒说明书进行。在 400 倍视野下每张切片在海马区取相互不重叠的 8 个视野, 计数其中阳性细胞。

2.4 电镜观察

取海马新鲜组织置于 2% 戊二醛 1~3h, 1% 的磷酸盐缓冲液漂洗 3h, 1% 锇酸固定 1~2h, 环氧树脂包埋, 聚合 2 天后制作超薄切片, 片厚约 0. 5~2. 0 μm, 透射电镜下观察并摄片。

2.5 统计学方法

采用 SPSS 13. 0 统计软件进行数据分析。计量资料以($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用单因素方差分析进行多组间均数比较。

3 结果

3.1 CD68、GFAP 阳性细胞染色结果

图 1 示, 光镜下 CD68 阳性细胞呈棕黄色。正常组

及假手术组 CD68 阳性细胞散在分布, 染色较淡, 胞体小; 模型组表现为胞体肥大, 呈类圆形, 突起缩短, 染色增强, 可见阿米巴状聚集, 且数量增多。附表示, 模型组与正常组及假手术组比较, 差异有统计学意义($P < 0. 01$) ; 电针组未见典型的阿米巴状 CD68 阳性细胞, 与模型组比较, 胞体变小, 染色强度减弱, 数量减少($P < 0. 01$) 。

图 2 示, GFAP 阳性细胞呈棕黄色。附表示, 模型组与正常组及假手术组比较, 胞体增大, 突起增粗, 表达增加($P < 0. 01$) ; 电针组胞体减小, 染色减弱, 与模型组比较, 差异有统计学意义($P < 0. 01$) 。

附表 各组大鼠海马区 CD68、GFAP 阳性细胞数比较(个/视野, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	CD68	GFAP
正常组	12	6. 51±0. 95	4. 80±0. 92
假手术组	12	6. 05±0. 94	4. 51±0. 97
模型组	12	12. 11±2. 09 ^{#*}	9. 07±0. 92 ^{#*}
电针组	12	8. 20±1. 19 ^{#△}	7. 44±0. 93 ^{#△}

注: 与正常组比较, [#] $P < 0. 01$; 与假手术组比较, ^{*} $P < 0. 01$; 与模型组比较, [△] $P < 0. 01$

3.2 各组大鼠电镜观察结果

模型组海马区可见一些神经细胞变性, 胞膜皱缩, 胞体缩小, 细胞浆和细胞器密度增高, 核膜间隙增宽, 其内细胞器可见内质网扩张, 线粒体肿胀、空泡样变(图 5) ; 电针组神经元细胞核基本正常, 少数神经细胞可见线粒体轻度肿胀, 粗面内质网、核糖体等细胞器基本正常(图 6) ; 正常组和假手术组神经细胞则无上述变化, 神经细胞胞膜完整, 胞浆基质电子密度均匀, 生物膜完整, 结构清楚, 未见明显病变(图 3、图 4) 。

4 讨论

Mi 和 As 是中枢神经系统的免疫活性细胞, 国外已有研究证实, AD 患者老年斑核心及周围存在聚集成团的活化 Mi, 甚至有认为这些 Mi 分泌的 Aβ 蛋白沉积形成斑块。近年来许多研究证实, 脑内活化的 Mi 和 As 能表达大量炎性细胞因子, 如白介素 1(IL-1) 、干扰素 γ(IFN-γ) 及肿瘤坏死因子 α(TNF-α) , 通过细胞表面特异性受体在 AD 脑组织病理变化的发生、发展中发挥作用^[4-6]。该实验将 Aβ-40 注射至 Meynert 核复制 AD 模型, 此模型可迅速建立学习记忆障碍, 损毁部位明确, 模拟人类 AD 疾病的部分特征病理改变。实验中发现, 模型组海马区 Mi、As 胞体增大, 突起增粗, 表达增加。电镜下观察到神经细胞变性, 胞膜皱缩、胞体缩小, 细胞浆和细胞器密度增高, 核膜间隙增宽, 其内细胞器可见内质网扩张, 线粒体肿胀、空泡样变。

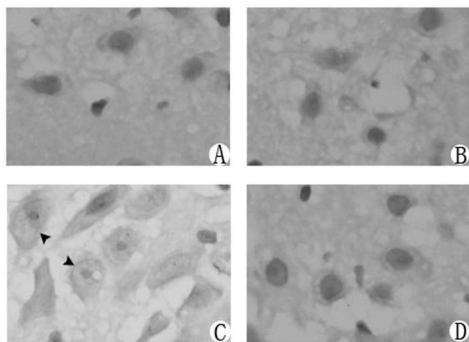


图 1 CD68 阳性细胞(×400)

A: 正常组; B: 假手术组; C: 模型组(胞体肥大, 呈类圆形, 突起缩短, 如箭头所示); D: 电针组

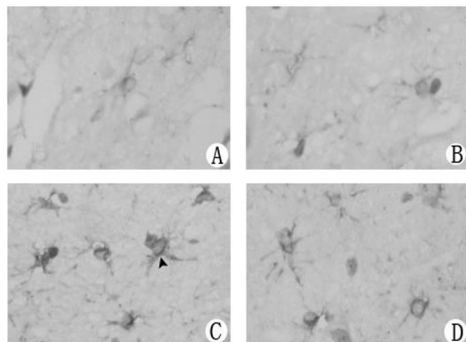


图 2 GFAP 阳性细胞(×400)

A: 正常组; B: 假手术组; C: 模型组(胞体增大, 突起增粗, 如箭头所示); D: 电针组

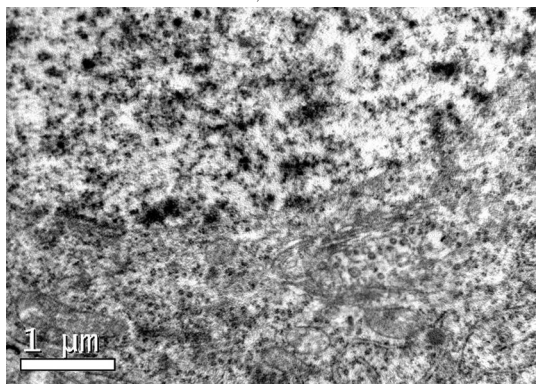


图 3 正常组

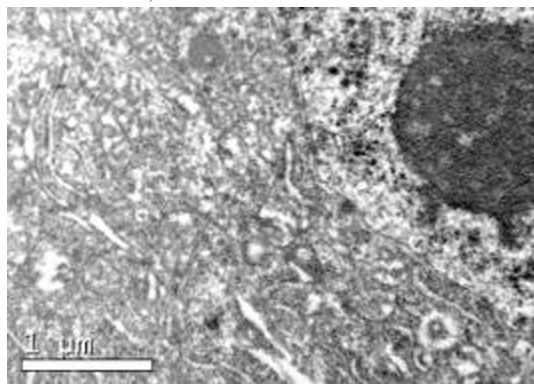


图 4 假手术组

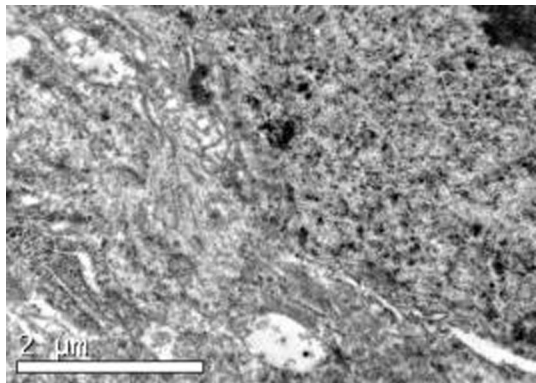


图 5 模型组

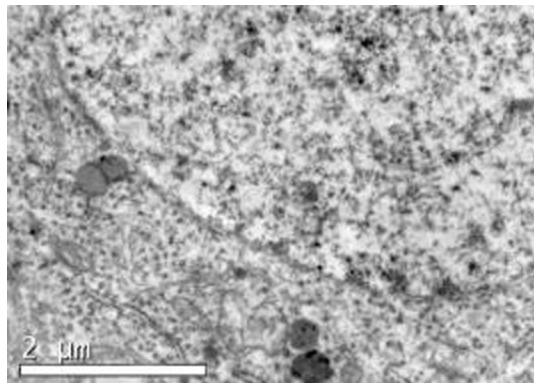


图 6 电针组

提示胶质细胞的活化可能参与了 AD 的发病机制。

目前对 AD 研究较为一致的观点为,病位在脑,其本为肾虚髓亏。据此,我们选取百会、太溪(双侧)、足三里(双侧)进行治疗。百会位居头之巅顶,属督脉,《素问·骨空论》:“病变在脑,首取督脉”;太溪为足少阴肾经俞穴、原穴,具有滋肾阴、壮元阳之功;足三里为胃腑的下合穴,有升清降浊,导痰行滞之效。三穴合用,共奏补肾、健脑之功效。在临床上,欧阳颀等^[7]以百会或四神聪、肾俞为主穴,太冲、足三里为配穴,并接用电针,与尼莫地平进行对照,结果显示,针刺具有与尼莫地平同样的改善智能状态的作用。本实验显示,电针组海马区

未见典型的阿米巴状 CD68 阳性细胞,与模型组比较,胞体变小,染色强度减弱,数量减少,GFAP 阳性细胞胞体减小,染色减弱。神经元细胞核基本正常,少数神经细胞可见线粒体轻度肿胀,粗面内质网、核糖体等细胞器基本正常。表明电针百会、太溪、足三里可阻抑 AD 模型大鼠海马区小胶质细胞、星形胶质的活化,防止神经元变性环死。

研究表明,β淀粉蛋白能引发海马区胶质细胞活化、增生,神经细胞变性、水肿。电针能抑制 β淀粉蛋白所引发的神经细胞变性、胶质细胞的增生和活化,说明电针能明显抑制中枢神经系统的免疫炎症反应,对

神经元具有保护作用,为临床治疗提供了实验依据。

参考文献

[1]Casal C, Serratos J, Tusell JM. Effects of beta-AP peptides on activation of the transcription factor NF-kappa B and in cell proliferation in glial cell cultures[J]. Neurosci Res, 2004, 48(3) :315-323.
[2]刘江红, 许贤豪. 老年性痴呆的免疫机制研究进展[J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志, 2004, 11(2) :111-114.
[3]徐叔云. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1991:661-662.
[4]Lue LF, Walker DG, Rogers J. Modeling microglial activation in Alzheimer's disease with human postmortem microglial cultures[J].

Neurobiol Aging, 2001, 22(6) :945-956.
[5]Butterfield DA, Griffin S, Munch G, et al. Amyloid beta-peptide and amyloid pathology are central to the oxidative stress and inflammatory cascades under which Alzheimer's disease brain exists[J]. J Alzheimers Dis, 2002, 4(3) :193-201.
[6]Streit WJ, Conde JR, Harrison JK. Chemokines and Alzheimer's disease[J]. Neurobiol Aging, 2001, 22(6) :909-913.
[7]欧阳颀, 李忠仁, 穆艳云, 等. 针刺治疗阿耳茨海默病临床疗效对照研究[J]. 中国针灸, 1999, 19(7) :399-401.
(收稿日期:2008-09-24; 修回日期:2008-12-25)
[编辑:叶 晨]

逍遥散治疗抑郁症 32 例

徐 寅 平

(北京市平谷区中医医院神经内科, 平谷区东顺城街 28 号, 101200)

抑郁症以显著而持久的情绪低落,活动能力减退,思维和认知功能迟缓为主要临床特征的一类心理障碍。笔者在临床上运用逍遥散治疗抑郁症 32 例,现报告如下。

1 临床资料

观察 64 例均为 2006 年 2 月~2008 年 2 月在平谷区中医院门诊就诊的患者,按就诊先后顺序分为两组。治疗组 32 例,男 12 例,女 20 例,年龄 18~62 岁,病程 26~760 天;对照组 32 例,男 14 例,女 18 例,年龄 18~60 岁,病程 30~730 天。两组患者年龄、性别、病程差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。参照《中国精神障碍分类与诊断标准》第三版(CCMD-3)^[1]制定的诊断标准。中医诊断符合 1994 年国家中医药管理局发布《中医病证诊断及疗效标准》^[2]中郁证的诊断标准,中医辨证分型标准^[3]:肝郁脾虚型:情绪抑郁,悲观厌世,表情沮丧,纳差,形体消瘦,面色微黄,脉弦细。

根据 24 项汉密顿抑郁量表(HAMD) 评分值进行划分^[4]。评分值<8 分无抑郁;评分值≥8 分但<25 分为轻度抑郁;≥25 分但<35 分为中度抑郁;≥35 分为重度抑郁。

排除患有继发抑郁症的躯体疾病,生命体征不稳定者,属于重度抑郁症患者,有严重自杀倾向者。近两周服用抗抑郁药物者。

2 治疗方法

治疗组:逍遥散:柴胡 10g, 当归 15g, 白芍 15g, 白术 10g, 茯苓 10g, 薄荷 6g, 煨姜 6g, 炙甘草 6g。每日 1 剂,分早晚两次温服,服用 6 周。对照组:服用盐酸氟西汀,每日 1 次,每次 20mg,服用 6 周。

3 结果

3.1 疗效标准

根据治疗前后 HAMD 量表评分判断疗效。HAMD 量表减分率≥75%为痊愈;减分率≥50%为显著进步;减分率≥25%为进步;减分率<25%为无效。疗效观察:分别观察两组的临床疗效;治疗前后 HAMD 平均减分率及不良反应。

3.2 两组疗效比较

治疗组 32 例,痊愈 6 例,显效 15 例,进步 8 例,无效 3 例,总有效率 90.6%;对照组 32 例,痊愈 3 例,显效 9 例,进步 13

例,无效 7 例,总有效率 78.1%。两组比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。

3.3 两组治疗前后 HAMD 平均减分率比较

治疗组 32 例,治疗前 HAMD 平均 24.6 分,治疗后平均 7.8 分,HAMD 平均减分率为 68.3%;对照组 32 例,治疗前 HAMD 平均 25.1 分,治疗后平均 10.7 分,HAMD 平均减分率为 40.6%。两组比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。

3.4 不良反应

治疗组出现轻微恶心 2 例,口干 2 例,腹泻 1 例,胃部不适 3 例。对照组出现恶心 6 例,呕吐 3 例,皮疹 1 例,腹泻 4 例,口干 6 例,头痛 5 例,头晕 7 例,尿频 1 例,失眠加重 5 例。

4 讨论

中医认为,人的精神活动与肝的疏泄功能密切相关,若肝的疏泄功能失常,则会出现抑郁等精神症状。根据“见肝之病,知肝传脾,当先实脾”的理论,提示治疗抑郁症时宜从肝论治,勿忘健脾。逍遥散治疗抑郁症也正是针对这一病机而设,方中柴胡疏肝解郁;当归、白芍养血柔肝;白术、茯苓健脾益气,以司运化;炙甘草益气补中,缓肝之急;煨姜温胃和中;薄荷助柴胡疏解郁热。全方共奏疏肝解郁,健脾和营之功效。本观察结果显示,治疗组疗效好于对照组,HAMD 平均减分率明显高于对照组。另外,治疗组不良反应程度及发生率明显低于对照组,且依从性好,费用低廉。

参考文献

[1]中医药学会精神病学分会. 中国精神障碍分类与诊断标准[S]. 3 版. 济南: 山东科学技术出版社, 2001:35.
[2]国家中医药管理局. 中医病证诊断疗效标准[S]. 1994:20.
[3]陈泽奇, 胡随瑜, 张海男, 等. 抑郁症常见中医证候标准的研究[J]. 中医杂志, 2005, 46(1) :47-49.
[4]张明园. 精神科评定量表手册[M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1993:121-132.

(收稿日期:2009-02-08)

[编辑:李 巍]