

针刺对多发性梗塞痴呆大鼠脑葡萄糖转运蛋白 1 表达的影响

杨宏波¹ 张雪竹² 韩景献² 于建春^{2*}

(1. 天津中医药大学 2008 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针灸研究所)

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(30630074); 国家自然科学基金面上项目(30772839; 30873302);

天津市应用基础及前沿技术研究计划重点项目(08JCZDJC15800); 天津市高等学校科技发展基金计划项目(20080217);

天津中医药大学第一附属医院“拓新工程”基金科研项目(院 0801)

* 通讯作者: yujianchun@eyou.com, 13920389395

[摘要] **目的** 观察“益气调血, 扶本培元”针法对多发性梗塞痴呆(MID)模型认知功能的改善作用。**方法** 采用栓子注入法制作 MID 模型, 将雄性 Wistar 大鼠随机分为正常组、假手术组、模型组、针刺组和非穴组, 每组 15 只。针刺组选取膻中、中脘、气海及双侧血海、足三里; 非穴组选取双侧肋下各 2 个固定非穴点, 每日 1 次, 治疗 6 天, 休息 1 天, 共治疗 3 周。采用 Morris 水迷宫检测造模后大鼠的学习记忆功能; 免疫组化法观察各组大鼠海马 CA¹ 区、CA³ 区、DG 区及大脑皮层葡萄糖转运蛋白 1 (GLUT1) 的表达。**结果** 模型组大鼠学习记忆能力显著下降($P < 0.05$); 而与模型组与非穴组比较, 针刺组大鼠发现平台所需时间明显缩短($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 跨越原平台次数和原平台区域的停留时间均明显增加($P < 0.05$)。模型组大鼠各脑区 GLUT1 的表达量明显高于正常组和假手术组($P < 0.05$); 除皮层外, 针刺组大鼠海马 CA¹、CA³、DG 区的 GLUT1 表达量与模型组及非穴组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** “益气调血, 扶本培元”针法能够上调 GLUT1 表达, 促进葡萄糖的跨膜转运, 从而增强血管性痴呆大鼠脑组织的葡萄糖代谢, 改善脑组织的缺血缺氧, 进而改善认知功能。

[关键词] 多发性梗塞痴呆; Morris 水迷宫; 针刺; 葡萄糖转运蛋白 1

Effect of Acupuncture on the Expression of Glucose Transporter 1 in the Brain of Multiple Infarction Dementia Rat

YANG Hongbo¹, ZHANG Xuezh², YU Jianchun², HAN Jingxian²

(1. Tianjin University of Chinese Medicine, Tianjin 300193; 2. The First Affiliated Hospital, Tianjin University of Chinese Medicine)

ABSTRACT **Objective** To observe the cognitive-improving effect of acupuncture for Yiqi Tiaoxue (replenishing qi and regulating blood) and Fuben Peiyuan (reinforcing the anti-pathogenic qi and consolidating the body resistance) on multiple infarction dementia (MID) model rat. **Methods** The embolic suspension was injected to induce multiple infarct dementia. The male Wistar rats were randomized into the normal group, sham operation group, model group, acupuncture group, and sham acupuncture group, with 15 in each. The acupuncture group was treated with acupuncture at Shanzhong (CV 17), Zhongwan (CV 12), Qihai (CV 6), Xuehai (SP 10), and Zusanli (ST 36). The sham acupuncture group was treated with acupuncture at the two non-acupoints in the bilateral hypochondrium. The treatment was once a day for 6 days in succession and 1 day for rest as interval, 3 weeks in total. The learning and memory function of model rats was tested with Morris water maze. The expression of glucose transporter 1 (GLUT-1) in the cortex and hippocampus CA¹, CA³, and DG areas was detected by immunohistochemical method. **Results** The learning and memory ability of MID rats was obviously impaired ($P < 0.05$). Compared with the model group and sham acupuncture group, the acupuncture group spent less time in finding the platform ($P < 0.05$ or $P < 0.051$), the number of jumping through the original platform and the staying time on the original platform were significantly increased ($P < 0.05$). The expression of GLUT-1 in the model group was significantly increased than that in the normal group and sham operation group ($P < 0.05$). Except in the cortex, the expression of GLUT-1 in the hippocampus CA¹, CA³, and DG areas of the acupuncture group was significantly different from that of the model group and sham acupuncture group ($P < 0.05$). **Conclusion** The acupuncture for Yiqi Tiaoxue and Fuben Peiyuan is effective to improve the cognitive function of MID rat through up-regulating the expression of GLUT-1 for promoting the transmembrane transport of glucose so as to enhance the glucose metabolism and relieve the ischemia and hypoxia of the brain tissues of vascular dementia rat.

Key Words multiple infarct dementia; morris water maze; acupuncture; glucose transporter protein 1 (GLUT-1)

血管性痴呆(vascular dementia, VD)是指因脑血管病所致的智能及认知障碍临床综合征。目前国内对VD的治疗尚缺乏公认的药物及疗法,前期研究显示,“益气调血,扶本培元”针法能够显著改善VD患者的认知能力^[1]。多发性脑梗塞痴呆(MID)是血管性痴呆的最主要类型,葡萄糖是脑唯一的能量来源,缺血缺氧造成的葡萄糖供给不足,易引起神经功能损害。因此,本研究从葡萄糖转运角度探讨“益气调血,扶本培元”针法改善MID认知功能的可能机制。

1 材料与方法

1.1 动物

Ⅱ级Wistar雄性大鼠90只,8月龄,体重(355±20)g,由中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心提供,动物许可证号:SCXK-(军)2007-004。

1.2 主要试剂及仪器

乙二胺四乙酸(EDTA)抗原修复液(pH8.0, ZLI-9067)、兔两步法检测试剂盒(PV6001)、DAB显色试剂盒(ZLI-9032),均购自北京中杉金桥生物技术有限公司;Morris水迷宫(中国医学科学院药物研究所研制),普通光学显微镜(Nikon E200)。

1.3 动物分组及造模方法

将90只大鼠编号后,使用Excel软件为每只大鼠生成1个随机数,按顺序1~15为正常组,16~30为假手术组,余为栓子造模组。栓子造模组在模型筛选后(筛选方法:于造模后的第8d,开始对各组大鼠进行隐蔽平台实验,连续训练5d,记录其学习成绩。取第5d正常组大鼠逃避潜伏期的均值为参考值,同时计算栓子造模组大鼠第5d的平均逃避潜伏期与参考值之差占该鼠的平均逃避潜伏期的比值,>20%定为痴呆鼠。剔除不符合痴呆标准5只、死亡6只及成绩排名靠前的MID大鼠4只共15只),再将痴呆鼠按上述随机方法分为模型组、针刺组和非穴组各15只。

MID模型大鼠制作:取同种大鼠股动脉采血,无菌条件下37℃自然干燥,制备200μm以下的血凝块备用。应用时每10mg血凝块加0.3ml生理盐水制成混悬液。6.5%水合氯醛按35mg/100g体重腹腔麻醉。颈正中切开皮肤,暴露颈总动脉、颈外动脉与颈内动脉。用金属动脉夹暂时夹闭颈总动脉,用4.5号头皮针逆行穿刺右颈外动脉至右颈内动脉起始处,随即用1ml注射器缓慢注入栓子盐水悬液0.3ml,推注同时开放颈总动脉夹,造成多灶性脑梗

死,然后结扎颈外动脉,缝合皮肤。假手术组以等量生理盐水代替栓子溶液,手术方法同上。

1.4 针刺方法

针刺组采用“益气调血、扶本培元”针法,根据文献[2]定位穴位,选取膻中、中脘、气海及双侧血海、足三里,除血海穴外均行捻转补法各30s,血海穴实施捻转泻法30s。非穴组选取双侧肋下各2个固定非穴点,作为对照刺激点,用平补平泻捻转手法各30s。于模型筛选后即日开始针刺,每日1次,治疗6天,休息1天,共治疗3周。模型组、假手术组和正常组进行与针刺组和非穴组相同时间、相同程度的提抓刺激。

1.5 检测方法

1.5.1 Morris水迷宫实验 选择Morris水迷宫(水池直径120cm,高50cm,平台直径10cm,高28cm)作为学习记忆能力的检测工具,水面高出平台2cm,水温22℃左右,计算机自动记录大鼠的游泳轨迹、路程,找到平台所需时间(逃避潜伏期)等。针刺结束后所有实验大鼠均进行隐蔽平台实验3d,反向实验2d,探索实验1d,可视平台实验2d,以评价针刺对各组大鼠空间记忆能力的影响。

隐蔽平台实验:将水池等分为4个象限,平台置于东北象限中间。从西北和西南两个象限中点将大鼠面向池壁放入水池。电脑将记录大鼠找到平台的时间即逃避潜伏期,至90s找不到平台,则逃避潜伏期为90s。以每日两次训练成绩的算术平均值作为这一日的成绩进行统计分析。

空间探索实验:撤除平台,将受试大鼠从东南象限放入水中,记录60s内大鼠穿越原平台的次数及平台所在象限停留的时间,并进行统计分析。

反向实验:平台移至对面象限,观察动物从入水至爬上平台的情况,并记录其时间进行统计比较。以每日两次训练成绩的算术平均值作为这一日的成绩进行统计分析。

可视平台实验:让平台露出水面2cm,其余操作同隐蔽平台实验。

1.5.2 葡萄糖转运蛋白1(GLUT1)检测 采用免疫组化法。上述各组大鼠麻醉,常规经心灌注固定,取全脑,4%中性甲醛中继续后固定24h。从视交叉至脑桥前缘冠状位切取含海马脑组织块,常规脱水、透明、浸蜡、石蜡包埋。所取脑块自前向后行冠状切片,片厚5μm,梯度乙醇脱蜡至水,3% H_2O_2 室温孵育20min灭活内源性过氧化氢酶,EDTA抗原修复

表1 各组大鼠逃避潜伏期比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	第1天	第2天	第3天	第4天	第5天	第6天	第7天
正常组	15	21.58±4.34△	19.24±5.04△	14.75±3.94△	21.04±5.08△	16.80±5.04△	10.80±3.27△	18.14±4.50
假手术组	15	20.59±3.86△	20.96±4.86△	15.10±4.13△	17.91±6.50△	15.00±4.95△	11.80±3.85△	18.98±4.65
模型组	15	32.31±6.63	30.00±6.08##	29.10±5.84##	27.5±5.95#	27.30±5.94#	25.30±5.18#	19.10±5.32
针刺组	15	24.24±5.94	22.38±5.81	18.50±4.69	19.21±4.53	17.40±5.13	13.90±3.49	19.90±3.85
非穴组	15	30.42±5.70*	28.80±5.49*##	27.50±5.74*##	28.2±5.76*#	26.10±6.18*#	23.00±4.52*#	19.50±4.38

注:第1~3天为隐蔽平台试验;第4~6天为反向试验;第7天为可视平台试验。与正常组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,△ $P<0.05$;与针刺组比较,## $P<0.05$,# $P<0.01$

20min(煮沸),自然冷却至室温,正常山羊血清封闭60min,滴加 Glut-1一抗工作液(1:500, 07-1401, Millipose),4℃过夜,生物素化二抗37℃孵育30min, DAB 镜下显色,苏木素复染、脱水、透明、封片。1×PBS 缓冲液分别代替一抗经上述步骤染色作空白对照。采用 Qcapture 图像采集系统对每组大脑组织切片各区随机选取高倍镜视野(10×40)均匀观察5个视野,应用 SimplePCI 图像分析软件计数视野阳性细胞平均光密度(AOD)以反映免疫组化染色的程度。

1.6 统计学方法

计量数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 16.0统计软件进行统计处理,其中隐蔽平台实验及反向实验获得的数据采用两因素方差分析,其他实验数据采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 Morris 水迷宫实验结果

表1示,隐蔽平台实验中,正常组和假手术组大鼠的逃避潜伏期明显低于模型组($P<0.05$);针刺组逃避潜伏期明显缩短,与正常组及假手术组无明显差别($P>0.05$),而较模型组及非穴组明显缩短($P<0.01$)。反向实验中,各组动物找到平台的时间均随训练天数的增加而缩短,但正常组、假手术组大鼠的逃避潜伏期明显短于模型组和非穴组($P<0.05$);针刺组与正常组及假手术组比较无统计学意义($P>0.05$),而与模型组和非穴组比较差异有统计学意义($P<0.05$)。可视平台实验中,各组动物找到平台时间差异无统计学意义($P>0.05$)。表2示,空间探索实验中,正常组和假手术组大鼠跨越原平台次数、原平台区域的停留时间显著高于模型组($P<0.05$ 或 $P<0.01$);针刺组此两项指标较模型组和非穴组亦明显升高($P<0.05$)。

2.2 各组大鼠不同脑区 GLUT1表达数量的比较

图1~4示, GLUT1在正常大鼠脑组织血管内皮细胞表达,胞膜着色,出现棕色染色为阳性,其阳性

染色完整地勾画出脑微血管。模型组 GLUT1表达较正常组增加;针刺组 GLUT1表达数量多于模型组;而非穴组 GLUT1表达与模型组无明显区别。

表2 各组大鼠跨越原平台次数及原平台区域停留时间比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	跨越原平台的次数(次)	原平台区域的停留时间(s)
正常组	15	3.00±0.86	20.39±6.30
假手术组	15	3.10±0.93△△	18.73±5.82△
模型组	15	1.60±0.53*	14.28±4.52*
针刺组	15	2.30±0.46△	20.76±6.05△
非穴组	15	1.40±0.40*##	16.54±5.17#

注:与正常组比较,* $P<0.05$,* $P<0.01$;与模型组比较,△ $P<0.05$,△△ $P<0.01$;与针刺组比较,## $P<0.05$

2.3 各组大鼠不同脑区 GLUT1表达的比较

表3示,正常组和假手术组大鼠各脑区 GLUT1的表达量均无明显差异($P>0.05$),模型组则明显高于正常组和假手术组($P<0.05$)。除皮层外,针刺组大鼠海马 CA1、CA3、DG 区的 GLUT1表达量与模型组及非穴组比较差异均有统计学意义($P<0.05$);非穴组大鼠各脑区 GLUT1表达与模型组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

3 讨论

VD 的中医学病因病机复杂,本研究根据“益气调血,扶本培元”的法则,取穴膻中、中脘、气海、血海、足三里,重在调三焦之气。组穴通过调节三焦气机,进而调节三焦所属脏腑的气机,既各司其气,又上下贯通,融为一体,协调共济,以保证全身气化功能的通畅条达,又配血海行血养血,共同维持其“上焦如雾、中焦如沤、下焦如渫”的生理状态,使全身气机流畅,气化守常,共奏益气调血、扶本培元之功,以恢复脑的正常智能状态。

空间学习记忆是检测空间定向、反应时间、视知觉和结构应用等能力,从而评价认知水平的一种行为模式,是一类关于场景和事件的学习记忆^[8]。海马与学习记忆密切相关,尤其表现在空间记忆方面,是

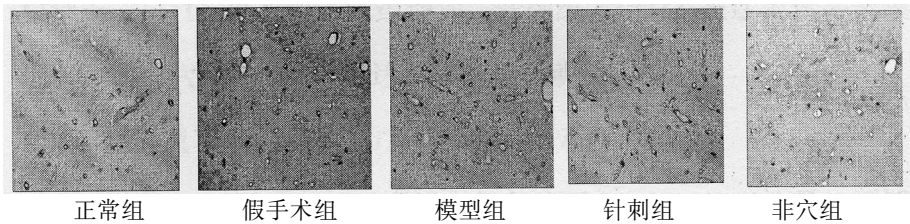


图1 各组大鼠脑组织海马 CA1区 GLUT1染色观察(×400)

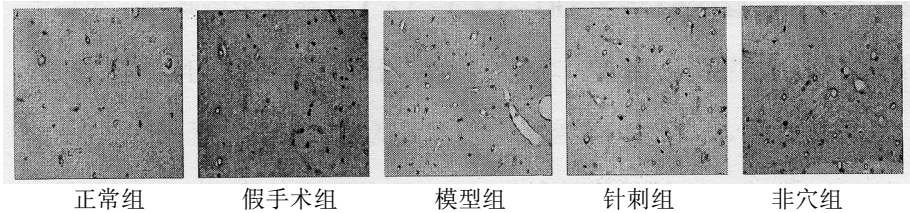


图2 各组大鼠脑组织海马 CA3区 GLUT1染色观察(×400)

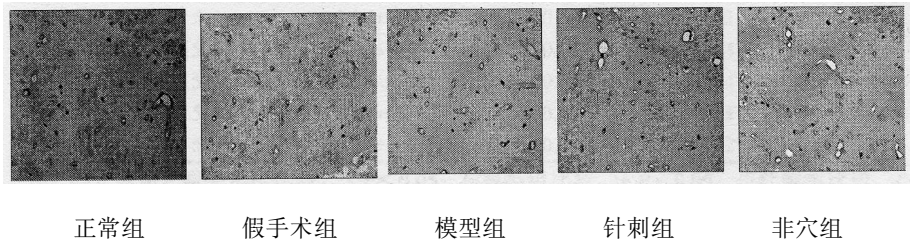


图3 各组大鼠脑组织海马 DG 区 GLUT1染色观察(×400)

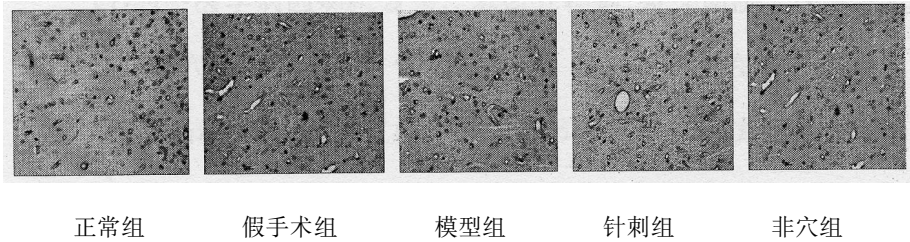


图4 各组大鼠脑组织皮层 GLUT1染色观察(×400)

表3 各组大鼠不同脑区 GLUT1表达的比较(AOD, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	CA1	CA3	DG	皮层
正常组	15	0.24±0.07	0.27±0.04	0.19±0.03	0.24±0.03
假手术组	15	0.25±0.06	0.28±0.06	0.18±0.04	0.25±0.02
模型组	15	0.38±0.02 *	0.34±0.04 *	0.30±0.04 *	0.28±0.03 *
针刺组	15	0.43±0.07△	0.38±0.03△	0.34±0.03△	0.29±0.04
非穴组	15	0.34±0.05#	0.33±0.04#	0.30±0.02#	0.28±0.03

注:与正常组、假手术组比较, * $P<0.05$;与模型组比较, △ $P<0.05$;与针刺组比较, # $P<0.05$

脑缺血选择性易损部位,其中CA1区、CA3区更易受损。Morris 水迷宫所检测的是大鼠的空间参考记忆,其储存的机制主要涉及边缘系统(如海马)以及大脑皮质有关脑区^[4],因其操作简便且检测精确等优点在研究大鼠空间学习记忆实验中被广泛应用。Morris 水迷宫由隐蔽平台实验、探索实验、反向实验、可视平台实验组成。其中,隐蔽平台实验是检测大鼠空间辨别及学习记忆的获得能力;反向实验反应动物的再学习能力;逃避潜伏期反映了动物空间记忆的

获得情况,即学习能力。探索实验是测试大鼠的空间探索策略,反应动物的参照记忆能力及空间记忆保持情况^[5]。本研究中,经 Morris 水迷宫检测,MID 大鼠存在显著的空间学习记忆障碍,具体表现在逃避潜伏期明显延长,原平台所在象限停留时间缩短,穿越原平台次数减少,空间记忆获得能力下降,学习过程延长,近期记忆减退。针刺治疗后,MID 大鼠认知功能障碍得到改善,空间记忆获得能力提高,学习过程缩短,近期记忆减退得到遏制,其发挥作用的机理

可能是针刺使皮层、海马等脑区的形态结构得到改善,保护了脑细胞,使其恢复正常的功能,从而提高MID大鼠学习记忆能力,减轻痴呆症状。

文献研究表明,VD患者大脑葡萄糖代谢率明显降低^[6-7],针刺能够改善VD患者的葡萄糖代谢水平^[8]。人的神经精神活动伴随着能量代谢,脑细胞能量的来源主要依赖于来自体循环中的葡萄糖,因此,脑内葡萄糖代谢水平能够反应脑的功能状况。正常情况下,由于有充足的氧和葡萄糖供应,氧化、磷酸化是葡萄糖转化为能量的限速步骤;而脑缺氧缺血时,葡萄糖通过血脑屏障的转运成为葡萄糖利用的限速步骤。而GLUT1是脑组织负责葡萄糖转运的主要蛋白,主要分布于血脑屏障内皮细胞、脉络膜丛以及室管膜等部位,为葡萄糖运输起易化作用。本研究中,针刺可显著改善MID大鼠认知能力,并提高海马CA1区、CA3区、DG区的GLUT1表达。

参考文献

[1] Yu J, Zhang X, Liu C, et al. Effect of acupuncture treatment on vascular dementia[J]. Neurol Res, 2006, 28(1): 97-103.

[2] 华兴邦,周浩良.大鼠穴位图谱的研制[J].实验动物与动物实验,1991,(1):1-5.

[3] Pozet B, Zhang WN, Feldon J, et al. Hippocampal lesioned rats are able to learn a spatial position using non-spatial strategies[J]. Behav Brain Res, 2002, 133(2): 279-291.

[4] 胡镜清,温泽淮,赖世隆. Morris水迷宫检测的记忆属性与方法学初探[J].广州中医药大学学报,2001,17(2): 117-119.

[5] Kucukatay V, Balkan S, Yaras N, et al. The effect of pergolide on cognitive performance of young and middle-aged rats[J]. Int J Neurosci, 2002, 112(9): 1027-1036.

[6] 李德鹏,马云川,苏玉盛,等.老年性痴呆与血管性痴呆的18F-FDGPTE显像分析[J].中风与神经疾病杂志,2001,18(4):213-214.

[7] 王瑞民,田嘉禾,贾建军,等.阿尔茨海默病与血管性痴呆的18F-FDGPTE脑显像[J].中华核医学杂志,2004,24(1):30-32.

[8] 于涛,石江伟,韩景献.针刺治疗轻中度血管性痴呆临床观察[J].辽宁中医杂志,2007,34(7):978-980.

(收稿日期:2010-08-06;修回日期:2010-11-03)

[编辑:崔京艳]

全国第六届中西医结合治疗肝病高级专修班通知

由中华中医药学会继续教育部、中医杂志社、北京东方中医药培训中心主办,河北中医肝病医院协办的“全国第六届中西医结合治疗肝病高级专修班”拟定于2011年6月17日~20日在河北中医肝病医院举办。本期高级专修班的办学宗旨是:浓缩中西医结合治疗肝病理论与实践精华,突出临床实用经验,使学员开阔视野,在短期内获得该领域内名老中医诊治经验以及最新的肝病研究治疗新动态。本次专修班将邀请国内知名肝病专家教授重点传授自己在临床工作中的治疗经验及行之有效的中医传统专方、验方,并将介绍治疗肝病中药研究进展方向等。本期专修班凡参加学习者将获得中华中医药学会北京东方中医药培训中心联合颁发的结业证书,并获国家I类教育学分证书。现将有关事项宣告如下。

1. **时间安排:**6月17日:全天报到;6月18日~19日:专家讲座及交流;6月20日:返程。

2. **培训地点:**河北省石家庄市河北中医肝病医院

3. **交通路线:**(1)石家庄火车站售票厅外停车场有河北中医肝病医院班车(每天10班次)免费接送,接站电话:0311-88786114。(2)石家庄火车站乘31路公共汽车至正定汽车站换4路公交车到河北中医肝病医院下车;或石家庄博物馆乘130路公共汽车到河北中医肝病医院站下车。(3)石家庄京石高速公路正定出口处下车至河北中医肝病医院。(4)乘机者从石家庄机场乘民航班车或出租汽车到河北中医肝病医院(该院位于机场与石家庄市中心的京石高速公路正定出口处)。

4. **收费标准:**每位学员980元(包括学费、资料费、国家级医学继续教育学分证书费、工作餐费等),旅游费及住宿费自理。

5. **注意事项:**报到时请带身份证和1寸照片2张(制作证书用)。

6. **联系地址:**河北省石家庄市京石高速公路河北中医肝病医院办公室收,邮编:050800。电话:0311-88788272,88787701,13091000293,传真:0311-88788272,Email:zygbyy@126.com,联系人:刘素敏,张涵