

补肾活血针刺法对阿尔茨海默病模型小鼠 海马脑红蛋白表达的影响

朱 宏¹ 董克礼^{1*} 吴 岳¹ 李广诚¹ 肖 岚¹ 张 婷¹ 王慧玲²

(1 中南大学湘雅三医院中医科, 湖南省长沙市桐梓坡路 118 号, 410013; 2 长沙市精神病医院)

基金项目: 湖南省中医药管理局科研基金(2009066)

*通讯作者: dongkeli666@sina.com, (0731)88618209

[摘要] 目的 探讨补肾活血针刺法对阿尔茨海默病模型快速老化小鼠 P8(SAMP8)学习记忆能力的影响及作用机制。方法 将 20 只 5 月龄雄性 SAMP8 小鼠随机分为针刺治疗组、模型对照组各 10 只, 另设 5 月龄雄性抗快速老化小鼠(SAMR1) 10 只作为正常对照组。针刺治疗组予以补肾活血针刺法干预, 选穴百会、血海、肾俞、膈俞, 采用捻转补泻手法。模型对照组及正常对照组未予特殊处理。干预 4 周后, 取各组小鼠海马组织, 采用免疫组化法检测脑红蛋白(Ngb)的表达情况。结果 模型对照组小鼠海马组织 Ngb 的表达水平较正常对照组减弱($P < 0.01$); 与模型对照组相比, 针刺治疗组小鼠海马组织 Ngb 的表达水平明显升高($P < 0.01$)。结论 补肾活血针刺干预能够明显增强 SAMP8 小鼠海马组织 Ngb 的表达, 这可能是其改善 SAMP8 小鼠学习记忆能力的潜在分子机制之一。

[关键词] 针刺; 阿尔茨海默病; 快速老化小鼠; 脑红蛋白; 补肾活血

Effect of Acupuncture for Reinforcing Kidney and Activating Blood on the Neuroglobin Expression in Hippocampus Tissue of Alzheimer's Disease Model Mice

ZHU Hong¹, DONG Keli¹, WU Yue¹, LI Guangcheng¹, XIAO Lan¹, ZHANG Ting¹, WANG Huiling²

(1. Xinyang the Third Hospital, Central South University, Changsha 410013; 2. Changsha Municipal Mental Disease Hospital)

ABSTRACT Objective To investigate the effect and mechanism of acupuncture for reinforcing kidney and activating blood on learning and remembering ability of senescence-accelerated mouse P8 (SAMP8) models of Alzheimer's disease. **Methods** Twenty 5-month-old male SAMP8 mice were randomized into two groups, acupuncture treatment group and model control group, 10 in each. Another ten 5-month-old male senescence-accelerated mouse/resistance 1 (SAMR1) were prepared as normal control group. The acupuncture treatment group was treated by acupuncture with reinforcing kidney and activating blood method, the selected points were Baihui (GV20), Xuehai (SP10), Shenshu (BL23), and Geshu (BL17), and rotating the needles for reinforcing-reducing was adopted in the manipulation. The model control group and normal control group were not given special treatment. After 4 weeks, the neuroglobin (Ngb) expression in the hippocampus tissues of mice of all groups was examined by immunohistochemical method. **Results** The Ngb expression of the model control group was weaker than that of the normal control group ($P < 0.01$). Compared with the model control group, the Ngb expression of the acupuncture treatment group was significantly increased ($P < 0.01$). **Conclusion** Acupuncture intervention can strengthen the Ngb expression in hippocampus tissue of SAMP8 mice. It's possibly one of the underlying molecular mechanisms of acupuncture in improving learning and memory abilities of SAMP8 mice.

Key Words acupuncture; Alzheimer's disease (AD); senescence-accelerated mouse; neuroglobin; reinforcing kidney and activating blood

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是最常见的神经系统退行性疾病, 占有临床痴呆病例的 60%~80%, 具有进行性、难以逆转、不能治愈等特点^[1]。氧化应激损伤在 AD 的发病中起着重要作用, 脑内氧化系统和抗氧化系统失衡是氧化应激发生的直接原因。针刺是 AD 治疗中的一个重要手段。前期研究表明, 补肾活血针刺法能够改善 AD 患者的认知功能^[2], 改善 AD 模型小鼠快速老化小鼠 P8 (senescence accelerated mouse P8, SAMP8) 的学习记忆能力^[3-4], 其作用机制可能涉及到抗氧

化应激。脑红蛋白 (neuroglobin, Ngb) 是一种内源性神经保护因子, 具有抗氧化品性, 能够作为活性氧和活性氮的清除剂来减轻 A β 的神经毒性作用^[5-6]。本研究通过观察补肾活血针刺法对 SAMP8 小鼠海马组织 Ngb 表达的影响, 为探讨其抗氧化应激作用提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

5 月龄雄性 AD 模型小鼠 SAMP8 共 20 只, 清洁级, 同龄雄性抗快速老化小鼠 (SAMR1) 共 10 只,

均购自天津中医药大学第一附属医院动物实验中心(实验动物合格证号:0001353),体重(24.0±3.5)g。

1.2 主要试剂及仪器

一抗 NGB 兔抗试剂盒(美国 Proteintech Group 公司,批号:13499-1-AP);复合二抗试剂盒(HRP-Polymer anti ms/rbIgG,迈新公司)。华佗牌针灸针(0.25mm×13mm,苏州医疗用品厂生产,批号:20090708)。

1.3 动物分组及处理

将 SAM P8 雄性小鼠 20 只按照随机数字表法分为针刺治疗组、模型对照组,每组各 10 只,另设 SAM R1 小鼠 10 只作为正常对照组。针刺治疗组采用补肾活血针刺法干预,选取百会、血海、肾俞以及膈俞,百会斜刺 3~5mm,血海、肾俞直刺 2~3mm,膈俞以 80°角斜向上刺 2~3mm,其中血海、肾俞、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《实验针灸学》^[7]。进针后,血海、膈俞施捻转泻法外,其余诸穴用捻转补法,补泻手法参考石学敏针刺手法量学标准进行^[8],留针 5min,每日 1 次,共进行 4 周;正常对照组和模型对照组未予特殊处理。上述各组小鼠均饲养于层流室,温度 18~22℃,湿度 55%~58%,饮用水及所食饲料均高温蒸汽灭菌,喂养期间可自由饮水和进食,并保持充足的光照和通风。

1.4 免疫组化

针刺干预 4 周后,取各组小鼠,用 10%水合氯醛(300mg/kg)麻醉小鼠,开胸暴露心脏,将灌注针头从心尖部插入升主动脉起始部,同时剪开右心耳,迅速灌注 4℃生理盐水,待右心耳处流出澄清液体后,再灌注 4%多聚甲醛溶液至肢体变硬,先快后慢(一半左右开始调速)。断颈取脑,分离出海马组织,标本固定于 4%多聚甲醛。24h 后将固定好的组织块经常规梯度酒精脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,连续冠状切片,切片厚度 3μm,60℃烤箱烤片 24h,备用,采用免疫组织化学(S-P)法染色。

采用 Imagepro-Plus6.0 专业彩色病理图像分析软件对切片进行图像分析,切片放大倍数表示为物镜放大倍数×相机目镜放大倍数,阳性染色为黄色或棕黄色染色。取各组小鼠海马 CA1 区组织切片,每个标本各取不相邻的 3 张切片,所有切片在同一强度、同一放大倍数下进行检测比较。每 1 张切片选取上、下、左、右、中 5 个不重叠视野,测定其中每个视野的该指标累积光密度,取其平均值作为该指标的累积光密度值(IOD 值)。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计软件对数据进行统计分析。计量数据用均数±标准差表示,采用单因素方差分析,方差齐性时,用 LSD 或 SNK 检验进行两两比较;方差不齐时,用秩和检验,组间比较用 Kruskal-Wallis 检验。

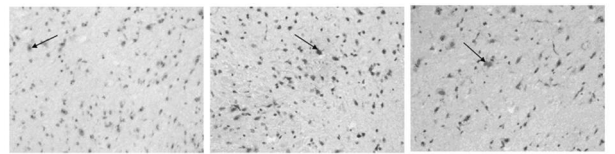
2 结果

表 1 及图 1 示,模型对照组小鼠海马组织 Ngb 的表达水平较正常对照组减弱,差异具有统计学意义($P<0.01$)。与模型对照组相比,针刺治疗组小鼠海马组织 Ngb 的表达水平明显升高,差异具有统计学意义($P<0.01$);但与正常对照组相比,针刺治疗组小鼠海马组织 Ngb 的表达水平与其仍存在着明显表达差异($P<0.01$)。

表 1 各组小鼠海马组织 Ngb IOD 值比较($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	Ngb
模型对照组	10	812.07±214.94
针刺治疗组	10	3400.69±253.28★☆
正常对照组	10	6961.62±356.28★

注:与模型对照组比较,★ $P<0.01$;与正常对照组比较,☆ $P<0.01$



模型对照组 针刺治疗组 正常对照组

图 1 各组小鼠海马组织 Ngb 蛋白表达比较(×400)

3 讨论

氧化应激假说(或称自由基假说)在 AD 的发病机制假说中一直占有重要地位,自由基生成与清除之间的失衡导致大量自由基产生,对神经元产生氧化损伤,从而诱发与 AD 相关神经病理改变^[9-11]。Ngb 是脊椎动物珠蛋白家族中的一员,直到 2000 年才首次被德国科学家 Burmester 等^[12]发现。和血红蛋白以及肌红蛋白相比,Ngb 虽然也属于珠蛋白家族,但进化上高度保守,与血红蛋白以及肌红蛋白的氨基酸序列同源性很小(低于 25%)。Ngb 以较低浓度特异性地存在于人和脊椎动物脑内,所以储氧携氧并不是其主要功能^[13]。在脊椎动物脑内,Ngb 在神经组织中广泛分布,Ngb mRNA 阳性细胞主要分布在神经元的细胞质中,其中在颞叶听区、扣带皮质、梨状皮质的阳性细胞分布较为密集,在新皮质的第 II~V 层,海马的各區(CA1~CA4)也有大量 Ngb mRNA 阳性神经元的分布;在前庭核团,杏仁中央核、杏仁内侧核、杏仁皮质核、杏仁皮质后核、

梨状内核等有中等量 Ngb mRNA 阳性神经元分布;还有少量的 Ngb mRNA 阳性细胞散在分布于丘脑、下丘脑、嗅球、小脑、脑干、脑桥网状结构及脑桥核中^[14-17]。大量实验研究证明,Ngb 可以作为一种内源性神经保护因子在阿尔茨海默病等神经系统疾病中发挥重要作用,它是脑组织内源性抗氧化体系的重要一员,增强 Ngb 在脑组织中的表达能够减轻 β 淀粉样蛋白的神经毒性作用,可以作为 AD 治疗的一个潜在靶点^[18-22]。

我们提出肾虚血瘀是 AD 发病的中医病理基础,贯穿了 AD 发展的全过程。补肾活血针刺法取穴肾俞、百会、血海、膈俞为基本穴位,其中肾俞为肾之背俞穴,有补肾助阳之功;百会穴由于处于人之头顶,在人体的最高处,手足三阳经及督脉的阳气在此交会,又名三阳五会穴,三阳指手足三阳经,五会指五脏六腑的气血皆会于此,故刺激百会有补肾通脑、开窍增智、行气活血之功;血海为血证要穴,膈俞为八会穴之血会,两者配合,活血通脉之功尤效。以上诸穴配合,共奏补肾活血之功。

在本研究中,Ngb 在模型对照组小鼠海马组织中的表达较正常对照组小鼠减弱,可能与 SAMP8 小鼠的脑内氧化应激状态提高存在着一定的关系^[23]。而补肾活血针刺法能够增强 Ngb 在 SAMP8 小鼠海马组织中的表达,其治疗作用机制可能涉及激发内源性抗氧化体系,从而发挥抗氧化应激,减轻 β 淀粉样蛋白的神经毒性作用。

参考文献

- [1] Perrin RJ, Fagan AM, Holtzman DM. Multimodal techniques for diagnosis and prognosis of Alzheimer's disease [J]. *Nature*, 2009, 461(7266): 916-922.
- [2] 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.
- [3] 朱宏,董克礼,吴岳,等. 补肾活血法对 AD 模型小鼠行为学的影响 [J]. *现代生物医学进展*, 2010, 10(16): 3007-3010.
- [4] 戴思思,董克礼,朱宏,等. “补肾活血”针刺法对老年痴呆模型 SAMP8 小鼠学习记忆能力和脑组织 AChE 活性的影响 [J]. *上海针灸杂志*, 2010, 29(1): 57-59.
- [5] Greenberg DA, Jin K, Khan AA. Neuroglobin: an endogenous neuroprotectant [J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2008, 8(1): 20-24.
- [6] Yu Z, Fan X, Lo EH, et al. Neuroprotective roles and mechanisms of neuroglobin [J]. *Neurol Res*, 2009, 31(2): 122-127.
- [7] 李忠仁. 实验针灸学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2003: 327.
- [8] 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): 287-289.

- [9] Praticò D. Evidence of oxidative stress in Alzheimer's disease brain and antioxidant therapy: lights and shadows [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2008, 1147(12): 70-78.
- [10] Querfurth HW, LaFerla FM. Alzheimer's disease [J]. *N Engl J Med*, 2010, 362(4): 329-344.
- [11] Ansari MA, Scheff SW. Oxidative stress in the progression of Alzheimer disease in the frontal cortex [J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2010, 69(2): 155-167.
- [12] Burmester T, Weich B, Reinhardt SA. A vertebrate globin expressed in the brain [J]. *Nature*, 2000, 407(6803): 520-523.
- [13] Hua S, Antao ST, Corbett A, et al. The significance of neuroglobin in the brain [J]. *Curr Med Chem*, 2010, 17(2): 160-172.
- [14] Reuss S, Saaler-Reinhardt S, Weich B, et al. Expression analysis of neuroglobin mRNA in rodent tissues [J]. *Neuroscience*, 2002, 115(3): 645-656.
- [15] 邓美玉,张成岗,李林,等. 用免疫组化方法检测脑红蛋白在大鼠中枢神经系统的分布 [J]. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 2003, 11(3): 271-274.
- [16] 邓美玉,张成岗,王航雁,等. 脑红蛋白 mRNA 在大鼠脑内的原位杂交定位 [J]. *解剖学报*, 2003, 34(1): 85-89.
- [17] 秦豪杰,张录顺,武娜,等. 脑红蛋白在人体组织细胞的定位分布及意义 [J]. *四川大学学报(医学版)*, 2008, 39(4): 609-611.
- [18] Herold S, Fago A, Weber RE, et al. Reactivity studies of the Fe(III) and Fe(II) NO forms of human neuroglobin reveal a potential role against oxidative stress [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(22): 22841-22847.
- [19] Fordel E, Thijs L, Martinet W, et al. Neuroglobin and cytoglobin overexpression protects human SH-SY5Y neuroblastoma cells against oxidative stress-induced cell death [J]. *Neurosci Lett*, 2006, 410(2): 146-151.
- [20] Li RC, Morris MW, Lee SK, et al. Neuroglobin protects PC12 cells against oxidative stress [J]. *Brain Res*, 2008, 1190(1): 159-166.
- [21] Li RC, Pouranfar F, Lee SK, et al. Neuroglobin protects PC12 cells against beta-amyloid-induced cell injury [J]. *Neurobiol Aging*, 2008, 29(12): 1815-1822.
- [22] Khan AA, Mao XO, Banwait S, et al. Neuroglobin attenuates β -amyloid neurotoxicity in vitro and transgenic Alzheimer phenotype in vivo [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(48): 19114-19119.
- [23] Alvarez-Garé A O, Vega-Naredo I, Sierra V, et al. Elevated oxidative stress in the brain of senescence-accelerated mice at 5 months of age [J]. *Biogerontology*, 2006, 7(1): 43-52.

(收稿日期: 2010-09-18; 修回日期: 2011-01-10)

[编辑: 崔京艳]