

· 论 著 ·

电针治疗对 AD 大鼠学习记忆能力及细胞周期蛋白 P53、P21 表达的影响

苏 琦¹,徐德恩²

(江苏省无锡市第二人民医院:1. 康复医学科;2. 神经内科 214002)

摘 要:目的 观察电针(EA)对阿尔茨海默病(AD)大鼠学习记忆能力及血浆中 SOD、MDA 的含量,大脑 P53、P21 表达的影响。**方法** 选取正常 SD 大鼠 36 只,随机分成假手术组、模型组和 EA 组。EA 组针刺“百会”、“太溪”、“足三里”穴治疗,通过 Morris 水迷宫检测大鼠的行为学改变、分光光度法观察大鼠血浆中 SOD 及 MDA 的水平;免疫荧光法观察大鼠大脑 P53、P21 的表达。**结果** 与模型组比较,EA 组逃避潜伏期缩短,在第三象限的活动时间延长,跨越原平台位置的次数增多,血浆 SOD 水平升高、MDA 水平降低,大脑 P53、P21 的表达减少,差异有统计学意义($P<0.01$)。**结论** EA 能够改善 A β 1-42 诱导的 AD 大鼠空间学习记忆能力,可能与提高 SOD 活性,降低 MDA 含量,下调 P53、P21 蛋白表达有关。

关键词:电针;阿尔茨海默病;学习记忆
doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.21.002 文献标识码:A 文章编号:1671-8348(2013)21-2444-05

Electro-acupuncture treatment impact as well as the mechanisms of learning and memory abilities of AD rats

Su Qi¹, Xu Deen²

(1. Department of Rehabilitation Medicine; 2. Department of Neurology, the Second People's Hospital of Wuxi City, Wuxi, Jiangsu 214002, China)

Abstract: Objective of electroacupuncture(EA) of Alzheimer's disease(AD) rat learning and memory ability and plasma SOD, MDA content in brain P53, P21 expression, **Methods** The normal 36 SD rats, were randomly divided into sham operation group, model group and EA group. EA group acupuncture “Baihui”, “Taixi”, “Zusanli” treatment, through the Morris water maze test in rats behavioral changes, spectrophotometric observation of SOD and MDA in rat plasma levels; observation of rat brain P53, P21 expression by immunofluorescence. **Results** Compared With the model group, group EA escape latency, longer in the third quadrant of the activities of the time, the number of crossing platform position increased, decreased the elevated plasma SOD level, MDA level, reduce the expression of brain P53, P21, and the difference was statistically significant ($P<0.01$). **Conclusion** electro-acupuncture treatment can improve the A β 1-42-induced AD rat spatial learning and memory ability, may be lowered P53, P21 protein expression increase SOD activity and MDA.

Key words: EA; Alzheimer's disease; learning and memory

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是以记忆、认知等智能障碍为主要临床表现的慢性大脑退行性变性疾病^[1]。AD 目前大多采用西药治疗,而长时间服用西药可引起严重毒副作用。因此,探寻有效的中医方法已成为治疗 AD 的主要趋势。许多临床报道及实验研究均已证实,针灸治疗对于防治 AD 有肯定的疗效^[2-6]。本实验采用腹腔注射 D-半乳糖联合侧脑室注射 A β 1-42 建立复合型 AD 模型,研究电针对 AD 模型大鼠的学习记忆及血浆中 SOD、MDA 的含量,大脑 P53、P21 表达的影响,旨在探讨电针治疗 AD 的作用机理。

1 材料与方

1.1 实验动物 雄性健康 SD 清洁级大鼠,体质量 200~250 g,由苏州大学实验动物中心提供,合格证号:XCYK(苏)2011-0006。经 Morris 水迷宫法筛选反应良好的 36 只大鼠进入实验程序。随机分为假手术组、模型组和电针组,每组 12 只。假手术组:腹腔注射 0.9%生理盐水(1 mL/d)7 周⁺侧脑室注射 2 μ L 无菌生理盐水;模型组:腹腔注射 5%D-半乳糖(120 mg $\cdot$ kg⁻¹ $\cdot$ d⁻¹)7 周⁺侧脑室注射 2 μ L A β 1-42, D-半乳糖注射 3 周后不进行任何治疗;电针组:腹腔注射 5%D-半乳糖(120 mg $\cdot$ kg⁻¹ $\cdot$ d⁻¹)7 周⁺侧脑室注射 2 μ L A β 1-42, D-半乳糖注射 3 周后采用电针治疗。

1.2 试剂与仪器 D-半乳糖(上海试剂二厂)、A β 1-42

(ANASPEC 公司)、超氧化物歧化酶(SOD)及丙二醛(MDA)检测试剂盒(南京建成生物工程研究所),P53、P21 免疫组化试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司),WQ-IOC 多用电子穴位测定治疗仪(北京海淀电子医疗仪器厂),华佗牌无菌针灸针(苏州医疗用品厂)。大鼠脑立体定位仪(浙江大学机械制造),Morris 水迷宫图像采集及分析系统(中国医学科学院药物研究所),高速低温超速离心机(Eppendorf 公司),冰冻切片机(德国 Leica 公司),共聚焦激光扫描显微镜(Olympus 公司)。

1.3 方法

1.3.1 AD 模型制备 大鼠给予水合氯醛腹腔麻醉后,根据包新民等的《大鼠脑立体定位图谱》选定前囟后 0.8 mm,中线旁 1.2 mm 为侧脑室注射点,以牙科钻钻开颅骨,在定位仪夹持器上固定 5 μ L 微量注射器,从颅骨表面开始垂直进针 4.0 mm。假手术组侧脑室注射无菌生理盐水 2 μ L;模型组和电针组侧脑室注射 A β 1-42 溶液 2 μ L,注射时间约 5 min,留针时间约 5 min,使注射液充分弥散后缓慢撤针,以骨蜡封堵注射点,将皮肤缝合。手术后每只大鼠腹腔注射 1 mL/4 万单位庆大霉素,保温至大鼠清醒。

1.3.2 电针方法 依据中国针灸学会实验针灸研究会制定的动物针灸穴位图谱取“百会”、“太溪”、“足三里”穴进行电针治疗,使用毫针由枕骨向额骨平刺“百会”穴约 3 mm;直刺两侧

表 1 各组大鼠定向航行实验平均逃避潜伏期的比较($\bar{x}\pm s,n=12$)

组别	逃避潜伏期(s)				
	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天
假手术组	41.09±1.24	32.29±2.06 *	24.17±0.82 *	22.16±1.24 *	13.63±0.92 *
模型组	40.19±1.12	56.24±1.45	51.54±1.23	45.15±1.34	41.69±1.26
电针组	40.44±0.84	36.55±1.60 *△	30.49±0.88 *△	27.59±3.86 *△	21.93±0.97 *△

* : $P<0.05$,与模型组比较;△ $P>0.05$,与假手术组比较。

“太溪”穴 3 mm;两侧“足三里”穴 5 mm。使用 WQ-IOC 多用电子穴位测定治疗仪治疗(两侧太溪与两侧足三里穴各为一对电极,太溪穴接正极,足三里穴接负极),连续波,频率 35 Hz,电压 2 V,以大鼠肢体轻轻抖动为适宜电刺激强度;每次治疗时间 15 min,每日治疗 1 次,1 个疗程为 7 d,疗程间隔 1 d,治疗 4 个疗程后进行水迷宫行为学测试。

1.3.3 大鼠行为学检测 采用 Morris 水迷宫测试大鼠逃避潜伏期和通过原平台次数以检测大鼠空间学习和记忆能力的变化。参照 Morris 及洪岸 的方法进行实验。(1)定位航行试验:每天上下午各训练 1 次,共训练 5 d。每天将大鼠从第 3 象限入水点面向池壁放入水中,记录大鼠找到平台需要的时间(逃避潜伏期)。(2)空间探索实验:第 5 天将平台移去,大鼠从第 1 象限入水,记录 120 s 内每只大鼠在第 3 象限的游泳时间及穿越原平台位置的次数。

1.3.4 血清 SOD 活性、MDA 含量的测定 水迷宫第 3 天,各组选取 6 只大鼠,经 4%水合氯醛麻醉后,抽腹股动脉血,以血液:抗凝剂=9:1 加 4%柠檬酸三钠抗凝,转速 3 500 r/min,离心 10 min 后,取上清液进行 SOD、MDA 的测定。

1.3.5 灌注取材 将每组剩余 6 只大鼠用 3.8%水合氯醛的腹腔麻醉,麻醉后立即开胸暴露心脏,左心室插管,剪开右心耳,快速灌注 4 ℃生理盐水至肝脏色泽变白,改灌 4%的多聚甲醛 10 mL/min,肝脏,四肢及尾均变僵硬后停灌。灌注完毕立即取出大鼠大脑,置于 4%多聚甲醛固定液固定 6 h,再移入 20%蔗糖溶液中。待组织块沉淀后,作冰冻连续切片,片厚 30 μm。-20 ℃保存备用。

1.3.6 免疫荧光双标法 (1)将切片从-20 ℃取出,复温 1 h 后,0.01 mol/L 的 PBS 洗 10 min×3 次;(2)封闭:滴加 5%胎牛血清封闭,室温孵育 2 h;(3)一抗:加入一抗混合液:Ho-echst33342(1:9 000)以及兔来源的抗体 P21(1:100),P53(1:500),室温孵育 2 h 后;4 ℃孵育 16~18 h(4)0.01 mol/L 的 PBS 洗 10 min×3 次;(5)二抗:用 FITC-标记的羊抗兔(1:200),避光,室温孵育 2 h,4 ℃孵育 16~18 h;(6)0.01 mol/L 的 PBS 洗 10 min×3 次;(7)染核:Hoechst33342(1:7 000),避光,室温孵育 0.5 h;(8)0.01 mol/L 的 PBS 洗 10 min×3 次;(9)封片:以中性甘油封片,4 ℃避光保存于湿盒中。

1.4 图像分析 采用 image pro-plus 对图片进行数据处理。用荧光显微镜检测且通过细胞计数计算 P21 及 P53 的阳性表达率。结果判断以细胞核染色阳性表达数大于或等于 10%为阳性表达。

1.5 统计学处理 计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS13.0 行统计学分析。用方差分析和 t 检验进行两组间比较,用 ANOVA 单因素方差分析进行多组间的比较,以 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 模型制备 造模前各组大鼠反应灵敏,毛发光滑,食欲

好,动作灵活。造模后大鼠体质量减轻,行动缓慢,反应迟钝,活动量少、食欲差、毛发干枯发黄,双颊明显脱毛,尾部有色素斑点沉着,喜睡。经电针治疗后,大鼠活动变得敏捷、饮食增加、毛发较前光滑。

2.2 定向航行实验 实验期间,与假手术组比较,模型组逃避潜伏期明显延长,差异有统计学意义($P<0.01$)。实验第 1 天,电针组与模型组相比,差异无统计学意义($P>0.05$)。第 2~5 天,电针组逃避潜伏期与模型组相比明显缩短,差异有统计学意义($P<0.01$)。结果见表 1。

2.3 空间探索试验 假手术组大鼠在第三象限的活动时间较长,且游泳轨迹集中在平台所在的象限。模型组大鼠在第三象限的活动时间少,穿越原平台所在位置次数明显减少,且游泳轨迹是随机分布的,差异有统计学意义($P<0.01$)。电针组与模型组比较穿越平台次数和时间明显增加,游泳轨迹集中在原平台所在象限,差异有统计学差异($P<0.05$),见表 2,图 1。

表 2 各组大鼠空间探索实验情况($n=12,\bar{x}\pm s$)

组别	穿越平台次数	第三象限活动时间(s)
假手术组	5.67±1.21	40.91±6.98
模型组	1.54±0.82 *	9.66±0.61 *
电针组	4.41±1.06 *△	20.99±2.12 *△

* $P<0.01$,与假手术组比较;△ $P<0.05$,与模型组比较。

2.4 血清 SOD、MDA 观察结果 与假手术组相比,模型组 SOD 活性显著降低,有统计学意义($P<0.01$)。与模型组相比,电针组 SOD 活性显著升高,差异有统计学意义($P<0.01$),见表 3。

表 3 各组大鼠血浆中 SOD、MDA 活力($n=6,\bar{x}\pm s$)

组别	n	SOD(U/mL)
电针组	6	247.04±28.55 *△
假手术组	6	314.66±66.92
模型组	6	171.46±39.77 *

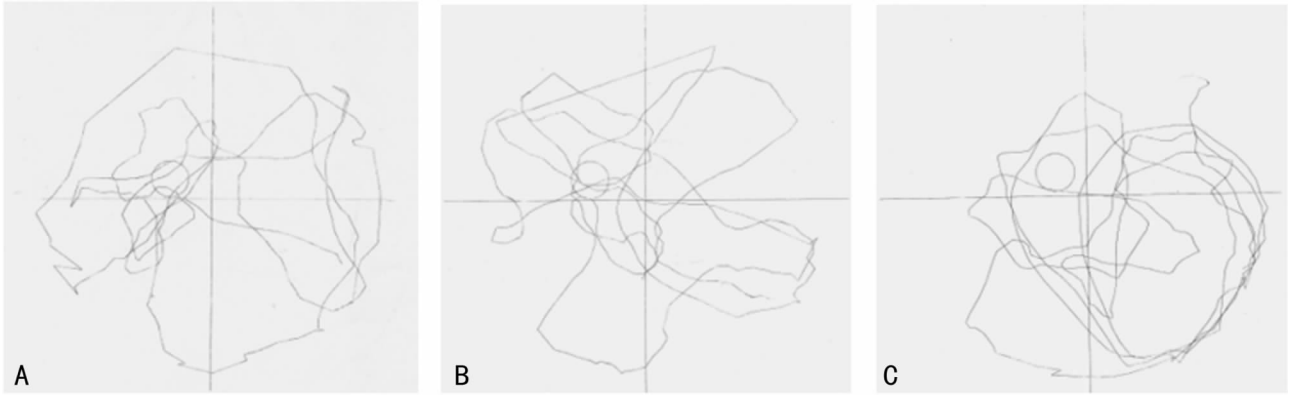
* $P<0.01$,与假手术组比较;△ $P<0.01$,与模型组比较。

2.5 P53、P21 的免疫荧光双标结果 阳性结果判断标准:荧光显微镜下见细胞核中出现绿色荧光颗粒即为阳性;胞核中无绿色荧光颗粒者为阴性,见图 2、3。各组大鼠脑组织阳性细胞数见表 4。

表 4 各组大鼠脑组织 P53、P21 表达的阳性细胞数(个/高倍镜视野, $\bar{x}\pm s$)

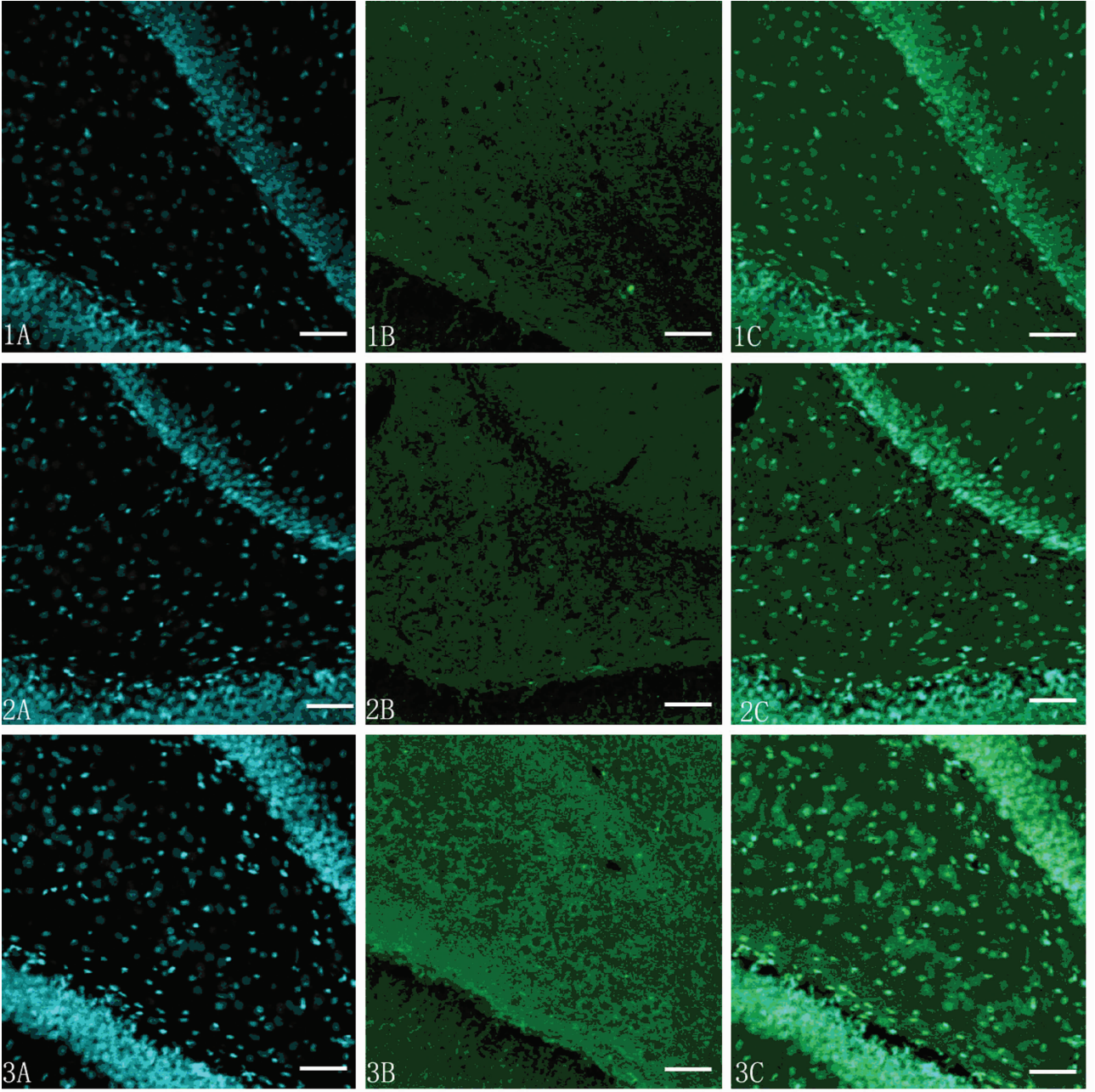
组别	n	表达 P53 的阳性细胞数	表达 P21 的阳性细胞数
假手术组	6	21.67±4.04	13.09±3.41
电针组	6	34.40±4.24 *△	25.02±3.82 *△
模型组	6	43.58±3.53 *	39.54±4.24 *

* $P<0.01$,与假手术组比较;△ $P<0.01$,与模型组比较。



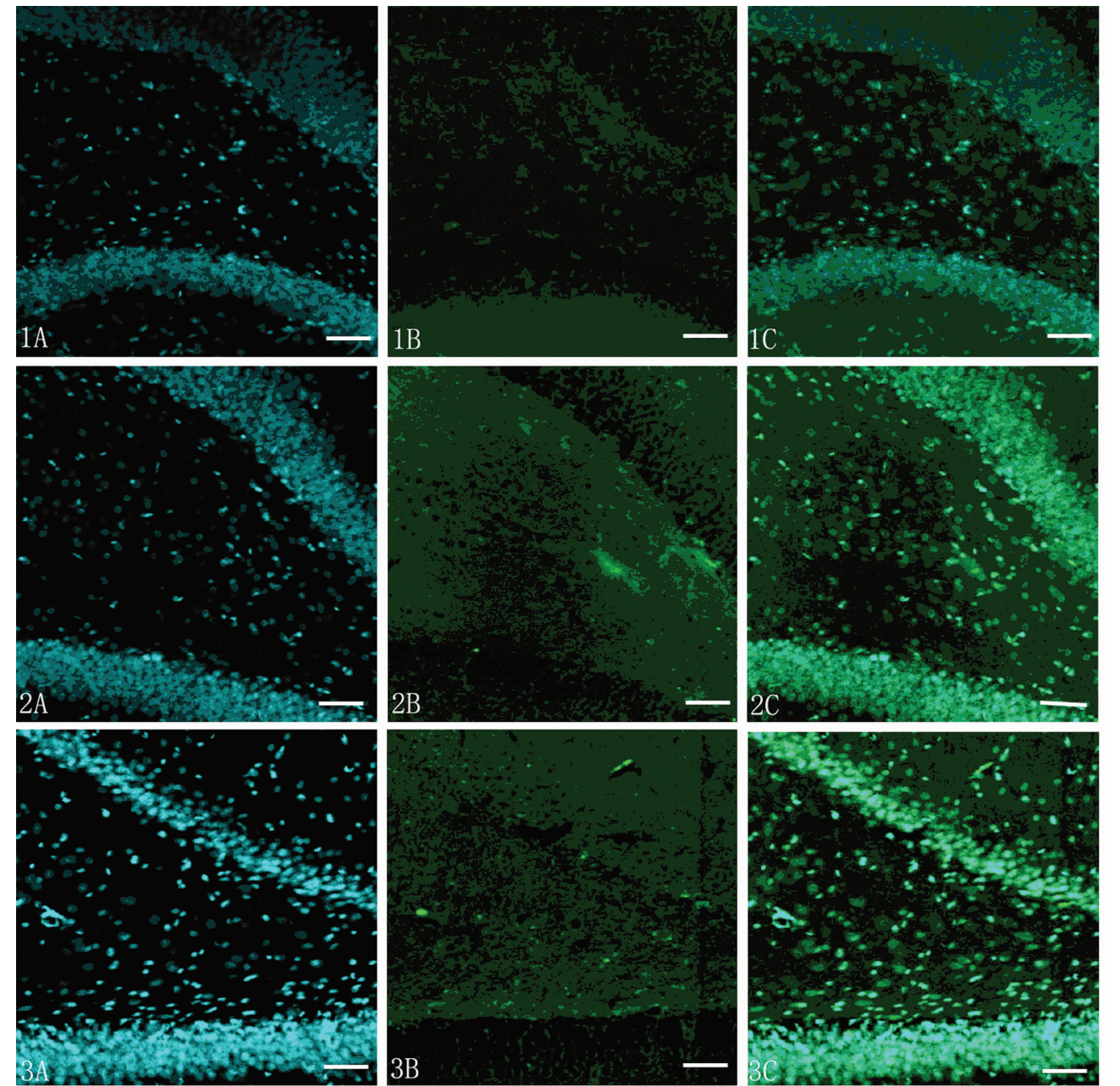
A:假手术组;B:电针组;C:模型组。

图 1 造模后各组大鼠在撤去平台后在第三象限活动的轨迹图



1A、2A、3A: Hoechst33342 染核免疫标记;1B、2B、3B: P53 的免疫标记;1C、2C、3C: A 和 B 的合并图。1A、1B、1C: 假手术组;2A、2B、2C: 电针组;3A、3B、3C: 模型组(标尺=40 μm)。

图 2 P53 的免疫荧光双标分析。



1A、2A、3A:Hoechst33342 染核免疫标记;1B、2B、3B:P21 的免疫标记;1C、2C、3C:A 和 B 的合并图。1A、1B、1C:假手术组;2A、2B、2C:模型组;3A、3B、3C:电针组(标尺=40 μm)。

图 2 P21 的免疫荧光双标分析。

3 讨 论

《医学心悟》曰:“肾主智,肾虚则智不足,善忘其前言”,《灵枢·天年篇》云:“八十岁肺气衰,魄离故言善误。”《医林改错》曰“灵机记忆在脑不在心”。中医学认为,AD 的病变在脑^[7]。AD 的病机为气虚血淤,淤血内阻,蒙蔽清窍,脑髓不足^[8]。目前常用于治疗 AD 的针灸干预措施有“毫针,电针,穴位注射,灸法”,其中电针疗效较好^[9]。本实验选取“百会”、“足三里”、“太溪”三穴。百会通过督脉入脑,可醒神开窍、健脑益智;太溪为足少阴肾经腧穴、原穴,可补肾养髓。足三里为胃经合穴,有和胃健脾,升精降浊,导痰行滞之功可补益后天、化生气血助生髓。诸穴配伍,起补肾增精、益智健脑之效^[10]。

本实验选取 Moms 水迷宫来检测大鼠的学习记忆能力变化。Morris 水迷宫结果表明模型组逃避潜伏期的时间明显长于假手术组,且随着学习时间的延长,这种趋势更加明显,表明造模成功,经电针治疗后大鼠的逃避潜伏期明显缩短,说明电

针治疗对 AD 模型大鼠学习记忆能力有显著的改善作用,提示电针对 AD 有显著的防治作用。模型组与假手术组相比,撤去平台后在第三象限的活动时间及穿越平台次数明显减少。各组大鼠游泳轨迹显示:假手术组游泳轨迹围绕平台,多次穿越平台。模型组游泳轨迹较少分布在平台象限,表明其空间定位记忆力减退。电针组大鼠的空间定位记忆能力接近假手术组,但与假手术组还有一定的差距,说明电针只能部分提高 AD 模型大鼠的学习记忆能力,不能使之痊愈。

现有的研究表明,脑组织的氧化应激反应参与了 AD 的发生和发展^[11-12]。SOD 活力可反映机体清除氧自由基的能力。MDA 是体内过氧化作用的最终产物,其含量高低间接反映机体细胞受自由基攻击的严重程度。本研究结果显示,模型组大鼠 SOD 活力降低,MDA 含量明显升高,说明模型组大鼠自由基清除能力下降,脂质过氧化水平增高。电针组 SOD 活性显著升高,MDA 含量显著降低。表明电针能够显著提高 AD 大

鼠的抗氧化能力,减轻自由基对脑组织的损伤。这可能是电针改善 AD 大鼠认知障碍的作用机制之一。

近年来,随着对细胞周期及其调控研究的深入,人们发现 AD 病理改变与细胞周期相关蛋白的异常表达有关。有研究发现,P53 为一种肿瘤抑制基因,可被 $A\beta$ 激活而诱导 AD 的细胞凋亡。P53 可能主要通过线粒体途径诱导细胞凋亡,最终凋亡蛋白酶由线粒体释放进入细胞浆而导致细胞凋亡。本研究结果显示,模型组大鼠 P53 蛋白表达的细胞数较假手术组多,提示 AD 大鼠脑细胞的 P53 蛋白可能被 β -淀粉样蛋白激活。这可能在 AD 脑细胞凋亡过程中起重要作用。电针组大鼠 P53 蛋白表达的细胞数较模型组少,说明电针可能通过抑制 P53 蛋白表达,从而减轻 AD 的细胞凋亡。

P53-P21/waf1 信号通路是衰老过程中重要的信号通路。P21 在细胞周期调节中的作用机制由 DNA 损伤发生的时期不同而改变,P21 不同区域对应于不同的靶位,其 N 端结合并抑制 Cyclin-CDK,使蛋白激酶的活性受抑制。阻止细胞从 G_1 进入 S 期。如果 DNA 的损伤发生在 S 期之前,P21 蛋白主要通过 CDK-Cyclin 结合并抑制其功能使细胞周期停滞于 G_1 期。本研究结果显示,模型组大鼠脑细胞内的 P21 蛋白表达高于假手术组,这与上述细胞衰老过程中细胞周期调控蛋白的变化一致。电针组大鼠脑组织内 P21 蛋白的表达则低于模型组。这提示电针可通过下调 P21 蛋白的表达,阻止脑细胞进入衰老程序而起延缓脑衰老的作用。电针改善 AD 大鼠的学习记忆能力,可能与抑制 P53、P21 表达,减轻脑细胞的损伤有关。

本研究表明,电针治疗 AD 有着确切的临床疗效。它的作用机制可能:(1)通过刺激人体特定的腧穴,激发经络之气,调整脏腑、经络及大脑的机能,动员机体的内在因素来达到防治 AD 的目的。同时,针刺可能改善脑部血液循环,刺激后使相应的脑区血流量增加,兴奋大脑皮层,改善脑部供血需求,促进衰退神经元的能量代谢。(2)电针通过降低 MDA 含量,抑制 MDA 的神经毒性,升高 SOD 活性,提高 AD 大鼠的抗氧化能力,减轻自由基对脑组织的损伤,从而促进学习记忆能力的恢复。(3)电针明显减少 AD 模型大鼠脑中 P53、P21 表达,减轻 AD 的脑细胞损伤。

综上所述,电针可改善复合型 AD 模型大鼠空间学习记忆能力,明显增高 SOD 活力,减低 MDA 含量,明显减少 AD 模型大鼠脑中 P53、P21 表达,具有提高抗氧化能力,减轻自由基对神

经元的损伤,抗细胞凋亡,保护神经元的作用,这可能是电针改善 $A\beta_{1-42}$ 诱导的 AD 大鼠空间学习记忆障碍的可能机制。

参考文献:

- [1] 戴思思,董克礼,朱宏.“补肾活血”针刺法对老年性痴呆模型 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.
- [2] 陈水灿.古代针灸益智临床经验节要[J].中国针灸,1997,17(5):312.
- [3] 包新民,舒斯云.大鼠脑立体定位图谱[M].北京:人民卫生出版社,1994:56-58.
- [4] 华兴邦.大鼠穴位图谱的研制[J].实验动物与动物实验,1991(1):1-5.
- [5] Morris R. Developments of a water-maze Procedure for studying spatial learning on the rat[J]. Neurosci Methods,1984,11:47-60.
- [6] 洪岸,姚志彬,顾耀铭,等.老年大鼠学习记忆减退与海马结构的突触素改变[J].解剖学报,1996,27(2):164-168.
- [7] 黄太权,刘龙民,范华昌,等.补肾益精方对血管性痴呆患者认知功能影响的临床研究[J].吉林中医药,2009,29(9):771-772.
- [8] 毛蕾,张玉莲.补肾填精中药治疗老年性痴呆[J].吉林中医药,2010,30(5):394-395.
- [9] 刘佳琳,杜元灏,黎波,等.针灸治疗老年性痴呆常用治法的循证医学评价[J].吉林中医药,2009,29(10):855-857.
- [10] 孟培燕,孙国杰,毛娟娟,等.针刺预处理对血管性痴呆大鼠学习记忆能力的影响[J].上海针灸杂志,2009,28(5):293-295.
- [11] Cenini G, Sultana R, Memo M, et al. Effects of oxidative and nitrosative stress in brain on p53 proapoptotic protein in amnesic mild cognitive impairment and Alzheimer disease[J]. Free Radic Biol Med,2008,45(1):81.
- [12] Resende R, Moreira PI, Proenca T, et al. Brain oxidative stress in a triple-transgenic mouse model of Alzheimer disease[J]. Free Radic Biol Med,2008,44(12):2051.

(收稿日期:2013-03-10 修回日期:2013-05-23)

(上接第 2443 页)

- epidermal stem cells from transit amplifying cells on the basis of differences in integrin function and expression[J]. Cell,1993,73(4):713.
- [4] Yano S, Okochi H. Long-term culture of adult murine epidermal keratinocytes[J]. Br J Dermatol,2005,153(6):1101.
 - [5] Papini S, Cecchetti D, Campani D, et al. Isolation and clonal analysis of human epidermal keratinocyte stem cells in long-term culture[J]. Stem Cells,2003,21(4):481.
 - [6] Michel M, Torok N, Godbout MJ, et al. Keratin 19 as a biochemical marker of skin stem cells in vivo and in vitro: keratin 19 expressing cells are differentially localized in function of anatomic sites, and their number varies with donor age and culture stage[J]. J Cell Sci,1996,109(Pt 5):1017.
 - [7] Blanpain C, Fuchs E. Epidermal homeostasis: a balancing act of stem cells in the skin[J]. Nat Rev Mol Cell Biol,

2009,10(3):207.

- [8] Rheinwald JG, Green H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells[J]. Cell,1975,6(3):331.
- [9] Fujimori Y, Izumi K, Feinberg SE, et al. Isolation of small-sized human epidermal progenitor/stem cells by Gravity Assisted Cell Sorting (GACS) [J]. J Dermatol Sci,2009,56(3):181.
- [10] 林才,罗旭,辛国华,等.人表皮干细胞的快速分离培养及鉴定[J].上海交通大学学报,2007,27(6):693.
- [11] Lorenz K, Rupf T, Salvetter J, et al. Enrichment of human beta 1 bri/alpha 6 bri/CD71 dim keratinocytes after culture in defined media[J]. Cells Tissues Organs,2009,189(6):382.
- [12] Kitano Y, Okada N. Separation of the epidermal sheet by dispase[J]. Br J Dermatol,1983,108(5):555.

(收稿日期:2013-01-08 修回日期:2013-03-21)