

“益气填髓”针法对阿尔茨海默症大鼠海马组织 SIRT1、PGC-1 α 的影响

夏春林 胡钰承 俞菲菲 奚兮娴 代归

云南医药健康职业学院

DOI:10.32629/fcmr.v8i2.20933

[摘要] 目的: 探讨“益气填髓”针法干预阿尔茨海默病(AD)的作用机制。方法: 选取60只6月龄SD大鼠,15只为正常对照组,余45只腹腔注射D-半乳糖生理盐水溶液联合右侧侧脑室注射淀粉样蛋白(A β 1-40)溶液制备AD模型。造模成功的大鼠随机分为空白对照组、药物组、针灸组,各15只。针灸组针刺足三里、关元、百会、太溪,留针20min,每日1次,干预4周;药物组予盐酸多奈哌齐悬浊液0.45mg/kg灌胃,每日1次,连续4周;空白对照组予等量双蒸水灌胃。干预前后采用Morris水迷宫检测大鼠学习记忆能力,免疫组化法检测海马CA1区SIRT1、PGC-1 α 蛋白表达。结果: 与正常对照组相比,空白对照组大鼠学习记忆能力显著下降,海马SIRT1、PGC-1 α 表达明显异常($P < 0.05$);针灸组与药物组均可明显改善AD大鼠学习记忆功能,上调海马SIRT1、PGC-1 α 蛋白表达($P < 0.05$),且两组间疗效及蛋白表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论: “益气填髓”针法可改善AD大鼠学习记忆能力,其机制可能与上调海马组织SIRT1、PGC-1 α 蛋白表达、保护神经元有关。

[关键词] “益气填髓”针法; 阿尔茨海默症; SIRT1; PGC-1 α

中图分类号: R245.3 文献标识码: A

The Impact of "Qi-tonifying and Marrow-filling" Acupuncture on SIRT1 and PGC-1 α in Hippocampal Tissue of Alzheimer's Disease Rats

Chunlin Xia Yucheng Hu Feifei Yu Xixian Yi Gui Dai

Yunnan Medical Health college

[Abstract] Objective: To explore the mechanism of Yiqi Tiansui acupuncture in the intervention of Alzheimer's disease (AD). Methods: A total of 60 six-month-old SD rats were enrolled, among which 15 were assigned to the normal control group. The remaining 45 rats were intraperitoneally injected with D-galactose saline solution combined with intracerebroventricular injection of amyloid β -protein 1-40 (A β 1-40) into the right lateral ventricle to establish AD models. Successfully modeled rats were randomly divided into model group, drug group and acupuncture group, with 15 rats in each group. Rats in the acupuncture group received acupuncture at Zusanli, Guanyuan, Baihui and Taixi acupoints for 20 minutes once a day for 4 consecutive weeks. The drug group was intragastrically administered donepezil hydrochloride suspension at a dose of 0.45 mg/kg once daily for 4 weeks. The model group was given equal volume of double distilled water by gavage. Morris water maze test was adopted to evaluate learning and memory abilities of rats before and after intervention. Immunohistochemistry was used to detect the protein expressions of SIRT1 and PGC-1 α in the hippocampal CA1 region. Results: Compared with the normal control group, the model group exhibited markedly impaired learning and memory abilities and abnormal expressions of hippocampal SIRT1 and PGC-1 α ($P < 0.05$). Both acupuncture and drug treatment significantly improved learning and memory functions and up-regulated the expressions of SIRT1 and PGC-1 α proteins in AD rats ($P < 0.05$). No significant differences were found in therapeutic effects and protein expression levels between the two groups ($P > 0.05$). Conclusion: Yiqi Tiansui acupuncture can improve learning and memory abilities of AD rats, and its

underlying mechanism may be related to the upregulation of SIRT1 and PGC-1 α protein expressions in hippocampus and neuronal protection.

[Key words] Qi-tonifying and marrow-filling acupuncture; Alzheimer's disease; SIRT1; PGC-1 α

引言

阿尔兹海默病(Alzheimer's disease, AD)是发生于老年和老年前期、以进行性认知功能障碍和行为损伤为特征的中枢神经系统退行性病变。临床上表现为记忆障碍、失语、失用、失认、视空间能力损害、抽象思维和计算力损害、人格和行为改变等^[1]。AD被认为是痴呆的主要因素,会伴随着痴呆的整个病程,在患者出现症状后的5-12年容易导致死亡。随着人口不断老龄化,预计到2050年,全球痴呆症患者的数量将攀升至1.315亿人^[2-3]。AD给患者带来长期的痛苦,并给家庭和社会带来巨大的负担^[4]。近几年来,研究界把氧化应激作为研究痴呆的重要因素,对氧化应激的科学研究产生了巨大的兴趣,并积极展开行动。沉默信息调节因子2同源蛋白1(SIRT1)和过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 辅激活子(PGC-1 α)是氧化应激损伤中的关键调节因子^[5]。近些年在临床和科研中针灸治疗AD的生物机制进展快速,成果显现,充分证明了针灸具备对AD的特殊疗效和特有的优势。单独针刺治疗能否调控SIRT1 / PGC-1 α 信号通路减轻细胞内凋亡途径未见报道。^[6]本课题旨在探究“益气填髓”针灸疗法对防治AD的作用途径是否与针灸干预SIRT1、PGC-1 α 的表达进而影响线粒体生成有关。

1 材料与方法

1.1 动物与分组

选取SPF级雄性SD大鼠60只(国家A级实验动物),体质量200-280 g。大鼠均按组分笼饲养,饲养条件一致,喂以大鼠标准饲料。从1-60进行编号,按照随机数字表法,分为2组(正常对照组15只、造模组45只),造模组二次分组为针灸组15只、盐酸多奈哌齐组15只、空白对照组15只。实验过程中对大鼠的处理严格遵守《关于善待实验动物的指导性意见》中有关规定。

1.2 主要试剂与仪器

D-半乳糖、A β 1-40(美国Sigam公司),兔抗SIRT1试剂盒、PGC-1 α 试剂盒、SABC试剂盒、脑立体定位仪(上海江湾医疗器械厂),Morris水迷宫视频分析系统,光学显微镜、Image-pro ExpressC图像分析系统(日本Olympus公司),石蜡切片机、G6805-2型低频电子脉冲治疗仪(德国LEICA公司)。

1.3 阿尔兹海默病模型的建立

适应性喂养一周后,将四组大鼠分别按体重注射D-半乳糖,标准为50mg/kg/d,连续给予六周,造模组予AD造模。

将A β 1-40用无菌生理盐水稀释成5%,放置在37℃恒温箱中7天形成聚集肽后放入-20℃冰箱中备用。45只(空白对照组、药物组、针灸组)大鼠以10%水合氯醛,按体重0.3ml/100g进行腹腔注射麻醉,将大鼠头部固定于立体定位仪上,剪去局部毛发,消毒后沿矢状线切开皮肤,切口长约1.5cm,将骨膜向两侧推开暴露颅骨。确定海马区注射点:前后囟3.5mm,正中旁开2.0mm,硬膜下2.7mm,用牙科钻在颅骨上打孔,钻薄颅骨而不钻透,用微

量注射器缓慢注射溶液A β 1-40溶液。术后肌肉注射青霉素10万单位每日1次,连续7天,防止感染,注意保暖。单笼饲养至大鼠完全清醒。苏醒后大鼠常出现阵颤、痉挛、惊厥和咬前肢现象,对于后者需要使用布和胶带保护前肢。

1.4 治疗方法

正常对照组给予等体积双蒸水灌胃,每只大鼠灌胃2mL/d,大鼠需称重以调整灌胃药量变化;空白对照组给予等体积双蒸水灌胃,每只大鼠灌胃2mL/d,大鼠需称重以调整灌胃药量变化;药物组给予盐酸多奈哌齐悬浊液灌胃(0.45mg/kg-1),每天进行。每天称量大鼠体重,并根据体重变化进行药品剂量调整;针灸组选取足三里、关元、百会、太溪,以针灸针快速刺入皮下,缓慢刺入肌肉,行捻转补法27转,留针20分钟后起针。以上四组治疗均一天一次,持续4周。

1.5 指标检测及方法

1.5.1 Morris水迷宫检测各组大鼠学习记忆能力。治疗前和治疗结束后分别对各组大鼠进行Morris水迷宫检测,主要依据定位航向实验和空间探索实验来检测大鼠平均逃避潜伏期、平台象限停留时间和穿台次数。具体检测方法如下:

定位航行实验:Morris水迷宫水池半径60cm,深60cm,平台直径9cm,高23cm,将平台置于水下约1-2cm,距池壁约30cm(本实验平台位于第4象限),测试前1d将每组大鼠引至平台适应10s,以第2象限为入水点自由游泳120s。之后的第1天至第4天各组大鼠分别从4个象限面壁放入水中,记录大鼠找到平台的时间(在平台停留时间超过5s定为找到平台),即逃避潜伏期。以120s为限,若未找到,将大鼠引至平台并停留10-15s,记录该鼠的逃避潜伏期为120s。每只大鼠每天4个象限取平均值作为该鼠当天的成绩。

空间探索实验:第5天将原有平台撤去,按照相同方法将大鼠从4个象限放入水中,记录大鼠内穿越原平台位置的次数及在平台象限的停留时间。

1.5.2 免疫组化法检测SIRT1和PGC-1 α 。4周治疗结束后分别对各组大鼠进行SIRT1和PGC-1 α 检测,采用免疫组化法。具体检测如下:

组织标本制备:将各组大鼠以10%水合氯醛按3ml/kg腹腔注射麻醉后,剪开胸腔,用钝头针沿心尖穿至升主动脉,剪开右心耳,灌注预冷的0.9%氯化钠溶液,至大鼠肝脏颜色变白为止,取海马于4%多聚甲醛固定液中4℃固定24h。常规乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡包埋。

取海马连续冠状切片:将兔抗SIRT1、PGC-1 α 按照1:150比例稀释,二氨基联苯胺显色,封片,镜下观察。各组取海马冠状切片各20张(其中每只随机选取2张),统计400倍视野下海马CA1相同区域内SIRT1和PGC-1 α 免疫阳性细胞数并测量平均灰度值(灰度值越小说明表达越强,灰度值越大说明表达越弱)。

2 结果

2.1 各组大鼠治疗后Morris水迷宫实验结果

从表一、表二看，在平均潜伏期时间、穿越平台次数和平台象限停留时间上，空白对照组与正常对照组同时间段比较，差异具有统计学意义($P<0.05$)，说明大鼠海马注射 $A\beta 1-40$ 对大鼠学习记忆能力的损害明显，符合阿尔海默病表现。在逃避潜伏期时间和平台象限停留时间方面，与空白对照组比较，针灸组、药物组两组均明显缩短，差异具有统计学意义($P<0.05$)；针灸组、药物组的两组相比，差异不具有统计学意义($P>0.05$)。在穿越平台次数上，与空白对照组同时间段比较，针灸组、药物组次数均增加，差异具有统计学意义($P<0.05$)；针灸组、药物组的两组相比，差异不具有统计学意义($P>0.05$)。

表一 四组大鼠定位航行实验平均逃避潜伏期比较($\bar{x}\pm s$, 单位s)

组别	第一天	第二天	第三天	第四天
正常对照组	27.76 $\pm$ 6.06	25.30 $\pm$ 5.76	24.15 $\pm$ 5.30	22.37 $\pm$ 4.71
空白对照组	42.04 $\pm$ 12.45 [*]	38.76 $\pm$ 10.43 [*]	34.26 $\pm$ 10.32 [*]	28.59 $\pm$ 8.38 [*]
针灸针	37.33 $\pm$ 8.47 [△]	34.29 $\pm$ 9.01 [△]	28.95 $\pm$ 8.64 [△]	25.06 $\pm$ 7.45 [△]
药物组	35.78 $\pm$ 7.99 [△]	35.67 $\pm$ 8.06 [△]	29.07 $\pm$ 7.65 [△]	26.56 $\pm$ 7.04 [△]

注：与正常对照组同时间段比较，^{*} $P<0.05$ ；与空白对照组同时间段比较，[△] $P<0.05$

表二 四组大鼠空间探索实验跨越平台次数和平台象限停留时间比较($\bar{x}\pm s$, 单位s)

组别	跨越平台次数	平台象限停留时间(s)
正常对照组	4.32 $\pm$ 1.02	14.64 $\pm$ 3.56
空白对照组	2.34 $\pm$ 1.23 [*]	20.74 $\pm$ 7.07 [*]
针灸针	3.04 $\pm$ 1.28 [△]	16.67 $\pm$ 6.34 [△]
药物组	3.29 $\pm$ 1.15 [△]	15.89 $\pm$ 5.74 [△]

注：在穿越平台次数上，与正常对照组同时间段比较，^{*} $P<0.05$ ；与空白对照组同时间段比较，[△] $P<0.05$ 。在平台象限停留时间上，与正常对照组同时间段比较，[△] $P<0.05$ ；与空白对照组同时间段比较，[△] $P<0.05$ 。

2.2 各组大鼠免疫组化检测SIRT1和PGC-1 α 实验结果

从实验对比可知大鼠海马CA1区SIRT1和PGC-1 α 的阳性细胞数和灰度值比较，空白对照组与正常对照组比较，阳性细胞数增加，灰度值减少，差异具有统计学意义($P<0.05$)；与空白对照组比较，针灸组、药物组的阳性细胞数增加，灰度值减少，差异具有统计学意义($P<0.05$)；针灸组、药物组的两组相比，差异不具有统计学意义($P>0.05$)。

3 讨论

中医对痴呆的病因病机认识经过上千年的凝练和总结，已经具备对其有一个比较完整、全面的概述。从最早期的朦胧状态，随着历代医学家的不断努力和潜心研究，对痴呆的了解逐步深入，具有了完备体系的认知。认为痴呆的病位在脑，基本病机为髓减脑消，神机失用。“心气”（智力减退等相关性疾病）首见于《针灸资生经》，在该书中详细阐述了智力减退相关疾病的认

识和治疗，并给出了针灸的治疗方案，其首次提出了针灸具有益智的功效。基于古代医学和现代研究者的前期探索，对AD认识不断取得进展，伴随现代生物技术的发展，研究针灸治疗AD与生物技术的关联具有了基本条件，对于探索针灸防止AD的机制具有重要意义。本次研究根据古代医家的针灸凝练、总结和现代研究者的早期临床、科研成果，以SIRT1和PGC-1 α 为基础，探求针灸治疗AD的效应机制。本研究的“益气填髓”针法取百会、关元、足三里、太溪四穴，遵循“行气开窍、益气填髓”的治疗原则，形成系统而互补的调护方案。整体治疗旨在以正补为主、兼顾通利为用，希望能减缓记忆与认知退化、改善情绪与行为表现，并延缓功能衰退进程。

近些年来针灸是老年痴呆非药物疗法中应用最为广泛的方法。黄锐研究证实电针与天麻素均能够改善AD大鼠的学习记忆能力，且电针联合天麻素的效果更为显著，提示其可能通过上调海马SIRT1和PGC-1 α 蛋白的表达，发挥对AD大鼠神经元的保护作用。本实验Morris水迷宫结果显示针灸组和药物组都能够减少AD大鼠的平均逃避潜伏期时间，增加穿台次数和提高平台象限的停留时间。免疫组化法检测SIRT1和PGC-1 α 结果显示针灸组和药物组可以上调AD大鼠海马区SIRT1和PGC-1 α 的表达（提升阳性细胞数量和降低平均灰度值），上述的实验数据结果可能表明针灸具有改善SIRT1和PGC-1 α 的效果。本次研究显示了针灸能够产生抗氧化应激作用，提高大鼠的学习记忆能力。

[基金项目]

本文系云南省教育厅科学研究基金项目支持发表，课题名称：“益气填髓”针法对AD大鼠海马组织SIRT1、PGC-1 α 的影响，课题编号：2025J2310。

[参考文献]

- [1]刘琰,李守朝.老年性痴呆的成因与对策[J].国医论坛,2007,(05):17-18.
- [2]Ritchie K,Lovestone S.The dementias[J].Lancet,2002,360(9347):1759-1766.
- [3]Sosa-Ortiz AL,Acosta-Castillo I,Prince MJ.Epidemiology of dementias and Alzheimer's disease[J].Archives of Medical Research,2012,43(8):600-608.
- [4]王清华,唐牟尼,屈秋民.吸烟、饮茶、饮酒与阿尔茨海默病的关系[J].中华神经科杂志,2004,(03):45-49.
- [5]姚婕,张红梅,阎丽萍,等.BDNF调控SIRT1/PGC-1 α 通路拮抗 $A\beta 25-35$ 诱导的神经元细胞氧化损伤[J].中国医药导报,2016,13(20):16-21.
- [6]汤双红,杜艳军,肖佳欢.针灸上调血清 $A\beta$ 内化酶对阿尔茨海默病大鼠学习记忆能力和 β 淀粉样蛋白沉积的影响[J].针刺研究,2018,43(11):692-697.

作者简介：

夏春林(1995--),女,汉族,云南曲靖人,硕士研究生,云南医药健康职业学院讲师,主治医师,研究方向：针灸防治老年病、乳腺病和妇科病。