

针药结合对阿尔茨海默病大鼠额叶皮质 BDNF、SIRT1 表达的影响

黄 锐¹,倪进忠¹,贾元威²,丁 见¹,龚 鑫¹

(1.皖南医学院 人体解剖学教研室,安徽 芜湖 241002; 2. 皖南医学院第一附属医院 弋矶山医院 临床药学部,安徽 芜湖 241001)

【摘要】目的: 观察电针结合天麻素对阿尔茨海默病(AD) 大鼠额叶皮质脑源性神经营养因子(BDNF)、沉默信息调节因子 2 同源蛋白 1(SIRT1) 的表达, 探讨针药结合治疗 AD 的可能机制。方法: SD 大鼠 60 只, 随机分为 6 组: 正常组、假手术组、模型组、电针组、天麻素组与针药结合组, 每组 10 只。采用腹腔注射 D-半乳糖与双侧海马注射 β 淀粉样蛋白 1-40(A β 1-40) 复制 AD 大鼠模型。电针组电针刺激“百会”、“大椎”、双侧“足三里”穴, 时间 30 min, 每天 1 次, 共治疗 4 周; 天麻素组腹腔注射天麻素注射液(10 mg/ kg), 每天 1 次, 共治疗 4 周; 针药结合组予以电针联合天麻素治疗, 连续 4 周。免疫组织化学染色法检测各组大鼠额叶皮质 BDNF、SIRT1 的表达。结果: 与正常组比较, 假手术组大鼠额叶皮质 BDNF、SIRT1 的表达差异无统计学意义($P>0.05$) , 模型组表达弱于正常组($P<0.05$) ; 电针组和天麻素组的表达强于模型组($P<0.05$) ; 针药结合组的表达强于电针组或天麻素组($P<0.05$) 。结论: 电针与天麻素均能上调 AD 大鼠额叶皮质 BDNF、SIRT1 的表达, 且两者结合的效果尤为显著, 这可能是针药结合抗 AD 作用机制之一。

【关键词】额叶皮质; 脑源性神经营养因子; 沉默信息调节因子 2 同源蛋白 1; 电针; 天麻素; 阿尔茨海默病

【中图分类号】R 338.2; R 245 **【文献标志码】**A

【DOI】10.3969/j.issn.1002-0217.2018.05.003

Changes of BDNF and SIRT1 expression in the frontal cortex of Alzheimer disease rats induced by electroacupuncture and gastrodin

HUANG Rui, NI Jinzhong, JIA Yuanwei, DING Jian, GONG Xin

Department of Anatomy, Wannan Medical College, Wuhu 241002, China

【Abstract】Objective: To observe the changes of brain-derived neurotrophic factor(BDNF) and SIRT1 expression in the frontal cortex of Alzheimer disease (AD) rats induced by electroacupuncture(EA) and gastrodin for investigating the potential mechanisms of combined EA with medicine in treatment of AD. **Methods:** Sixty SD rats were randomized into normal groups of normal control, sham operation, models, EA intervention, gastrodin treatment and EA+gastrodin($n = 10$ for each group) . Rat models of AD were developed by intraperitoneal injection of D-galactose and bilateral injection of A β 1-40 into the hippocampi. Rats in the EA group were stimulated at the points of Baihui, Dazhui and Zusanli for 30 min once a day for 4 consecutive weeks, and animals in the medication group were treated with gastrodin(100 mg/kg) once a day for 4 consecutive weeks. Rats in the EA+gastrodin group were managed with EA and gastrodin for 4 consecutive weeks. Then the expression of BDNF and SIRT1 in the frontal cortex of rats in each group was determined by immunohistochemical staining. **Results:** BDNF and SIRT1 expression in the frontal cortex remained no significant difference in rats in the sham operation group as compared with that in the normal controls($P>0.05$) . The expression of BDNF and SIRT1 was weaker in the model group than that in the normal control group($P<0.05$) . Rats in the EA and gastrodin treatment groups had higher expression of BDNF and SIRT1 than the model group($P<0.05$) , yet lower expression than the EA+gastrodin group($P<0.05$) . **Conclusion:** Either EA or gastrodin could increase the expression of BDNF and SIRT1 in the frontal cortex in rats of AD, yet combined use of the EA and gastrodin may produce better effects on the expression of two genes, which may be one of the mechanisms against AD by stimulation and medication.

【Key words】 frontal cortex; brain-derived neurotrophic factor; SIRT1; electroacupuncture; gastrodin; Alzheimer disease

基金项目: 安徽省自然科学基金项目(1608085QH223, 1608085QH212); 安徽省教育厅高校优秀青年人才支持计划重点项目(gxyqZD2016178, gxyqZD2016179)

收稿日期: 2017-11-09

作者简介: 黄 锐(1981-), 男, 讲师, 硕士, (电话) 0553-3932487, (电子信箱) 80366474@qq.com;

龚 鑫, 男, 副教授, 硕士, (电子信箱) 416074616@qq.com, 通信作者。

阿尔茨海默病(Alzheimer disease ,AD) 是与年龄密切相关的中枢神经系统退行性疾病,随着世界人口老龄化速度的加快,AD 已经严重威胁老年人的健康与生活质量。AD 的治疗目前尚无特效手段,而有报道表明电针对改善 AD 患者的认知功能具有明显效果^[1]。天麻素是从中药天麻的块茎中提取的主要成分,有报道^[2]天麻素可减轻 A β 蛋白对 AD 小鼠脑神经元的损害作用从而改善其学习记忆能力。沉默信息调节因子 2 同源蛋白 1(silent mating type information regulation 2 homolog 1, SIRT1) 和脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor ,BDNF) 在 AD 的治疗中密切相关,有报道^[3]表明 BDNF 可通过上调 SIRT1 的表达抑制 A β 蛋白诱导的神经元损伤。关于电针结合天麻素对 AD 大鼠额叶皮质 BDNF 与 SIRT1 的表达情况尚未见报道。本实验通过电针与天麻素联合治疗,运用免疫组织化学法观察各组大鼠额叶皮质 BDNF 与 SIRT1 的表达情况,旨在探讨针药结合治疗 AD 的部分作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物与分组 健康 SD 雄性大鼠 60 只,体质量 200~250 g,购于浙江省实验动物中心。适应饲养 1 周后将大鼠随机分为 6 组: 正常组、假手术组、模型组、电针组、天麻素组和针药结合组,每组 10 只。

1.2 主要试剂 D-半乳糖、A β 1-40 购自美国 Sigma 公司,天麻素注射液(规格 5 mL :500 mg,购自西南药业股份有限公司,兔抗 BDNF 与 SIRT1 及 SABC 试剂盒均购于北京博奥森生物技术有限公司。

1.3 模型制备 模型组、电针组、天麻素组与针药结合组大鼠均腹腔注射 D-半乳糖 120 mg/(kg · d), 1 次/天,连续 8 周。将 A β 1-40 按说明书溶于生理盐水并置于恒温箱中孵育 1 周。以上各组大鼠注射结束后,以 10%水合氯醛按 3 mL/kg 麻醉,参照包新民等著作的《大鼠脑立体定位图谱》取前囟后 3.5 mm,两侧 2.0 mm,深度为 2.8 mm,微量注射器注射 A β 1-40(5 g/L) 2 μ L,碘伏消毒,缝合皮肤,术后进行抗感染治疗 3 d。正常组大鼠不做处理,假手术组

参照模型组分别以同等剂量的生理盐水进行腹腔注射和双侧海马定位注射。

1.4 治疗方法 正常组、假手术组、模型组均不做治疗。电针组参照《大鼠穴位图谱的研制》取“百会”、“大椎”和双侧“足三里”穴,频率 2 Hz,每次 30 min,连续 4 周。天麻素组按 10 mg/kg 剂量腹腔注射天麻素注射液,1 次/天,连续 4 周。针药结合组穴位电针方法同电针组,腹腔注射天麻素注射液方法同天麻素组,连续 4 周。

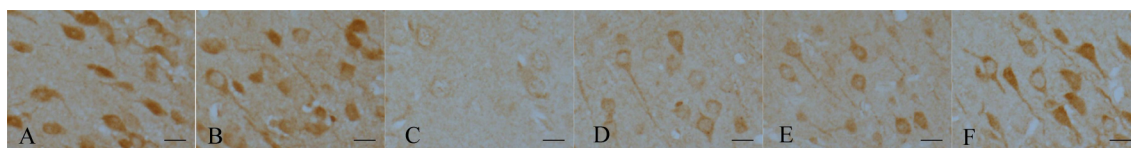
1.5 组织标本制备 各组大鼠均以 10%水合氯醛(3 mL/kg) 进行腹腔麻醉,剪开胸腔,暴露心脏。沿左心室-升主动脉快速滴注预冷 0.9%氯化钠溶液,取脑,置于 4 $^{\circ}$ C 多聚甲醛溶液中 24 h,依次经酒精脱水,二甲苯透明,石蜡包埋。

1.6 免疫组化检测 取各组大鼠额叶皮质进行冠状切片,片厚 5 μ m。按免疫组化试剂盒说明书依次各步骤,封片,镜下观察。每组取额叶皮质冠状切片各 20 张(每只大鼠随机选取 2 张) 统计 400 倍视野下额叶皮质 BDNF 与 SIRT1 阳性细胞数和平均灰度值(灰度值越大说明表达越弱,反之则越强)。

1.7 统计学处理 用 SPSS 18.0 软件进行统计分析,数值变量资料以均数 \pm 标准差表示,采用单因素方差分析,组间比较采用 LSD 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

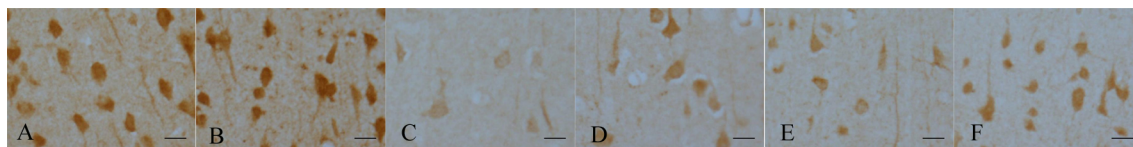
2 结果

免疫组织化学染色结果显示,各组大鼠额叶皮质均可见 BDNF 与 SIRT1 阳性细胞,呈棕黄色,主要为胞质和胞膜着色。与正常组比较,假手术组 BDNF 与 SIRT1 表达无明显变化($P > 0.05$),模型组 BDNF 与 SIRT1 呈弱阳性表达,阳性细胞数减少($P < 0.05$),着色较淡,平均灰度值增高($P < 0.05$);与模型组比较,电针组、天麻素组与针药结合组 BDNF 与 SIRT1 阳性细胞数增多($P < 0.05$),着色加深,平均灰度值降低($P < 0.05$);与电针组或天麻素组比较,针药结合组 BDNF 与 SIRT1 阳性细胞数增多($P < 0.05$),平均灰度值降低($P < 0.05$)。见图 1、2 表 1。



A. 正常组; B. 假手术组; C. 模型组; D. 电针组; E. 天麻素组; F. 针药结合组。标尺 = 30 μ m(SABC 法 $\times 400$)。

图 1 各组大鼠额叶皮质 BDNF 的表达



A.正常组; B.假手术组; C.模型组; D.电针组; E.天麻素组; F.针药结合组。标尺=30 μm(SABC 法 ×400)。

图2 各组大鼠额叶皮质 SIRT1 的表达

表1 各组大鼠额叶皮质 BDNF 与 SIRT1 的表达($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	BDNF		SIRT1	
	细胞数(个/高倍视野)	灰度值	细胞数(个/高倍视野)	灰度值
正常组	70.00±6.39	76.39±4.67	89.80±5.73	67.80±5.33
假手术组	69.50±6.06	77.27±4.46	87.20±5.75	69.60±6.11
模型组	23.30±3.71*	136.72±5.17*	23.60±3.10*	113.90±3.93*
电针组	41.90±3.67*△▲	88.34±3.78*△▲	55.30±4.22*△▲	86.70±4.47*△▲
天麻素组	39.30±4.27*△▲	89.09±3.62*△▲	53.50±3.60*△▲	88.50±4.40*△▲
针药结合组	57.70±3.65*△	82.36±5.00*△	70.80±5.85*△	77.50±4.99*△
F	152.367	255.753	261.994	118.190
P	0.000	0.000	0.000	0.000

注:与正常组或假手术组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,△ $P<0.05$;与针药结合组比较,▲ $P<0.05$ 。

3 讨论

AD 主要病理表现为 Aβ 蛋白沉积和神经纤维缠结^[4],沉积的 Aβ 蛋白可诱发氧化应激反应进一步损伤线粒体从而引起细胞功能障碍^[5]。BDNF 作为神经营养因子家族成员,可促进神经元的修复与再生,并可减少氧自由基对神经元的损伤^[6]。SIRT1 作为氧化应激损伤中的关键调节因子,在富含线粒体的组织中高表达,可增强组织细胞的抗氧化应激能力^[7]。本实验中观察到模型组大鼠额叶皮质 BDNF 与 SIRT1 的表达低于正常组或假手术组,提示可能由于 AD 大鼠脑组织的抗氧化应激能力下降,进一步造成对额叶皮质神经元的损伤。有报道^[8]表明 SIRT1 可减弱 Aβ 蛋白沉积从而改善 AD 小鼠的学习记忆功能。BDNF 可通过上调 SIRT1 的表达而抑制 Aβ 蛋白诱导的神经元损伤^[3],因此促进 BDNF 与 SIRT1 的表达可能是治疗 AD 的潜在策略之一。

电针对于 AD 的治疗具有安全无副作用的优势。王康锋等^[9]电针治疗 AD 患者总有效率达到 83.33%,明显改善 AD 患者的认知功能。有研究^[10]表明电针可减少 Aβ 蛋白的生成,改善 AD 动物模型的认知功能,可能与上调 BDNF 表达有关。电针可上调 SIRT1 蛋白的表达,改善 AD 大鼠海马神经元线粒体超微结构,促进神经元轴突生长,实现对 AD 大鼠的脑保护作用^[11]。中医学认为 AD 病理机制

为髓海失养,血瘀痰浊,阻塞脑络,“百会”和“大椎”均为督脉要穴,有醒脑开窍,去瘀血痰浊之功效,“足三里”为足阳明胃经穴,可补气血,填精益髓^[12],故本实验选取上述穴位进行电针治疗。实验中观察到电针组大鼠额叶皮质 BDNF 与 SIRT1 的表达均上调,提示电针可能通过增强脑组织的抗氧化应激能力,促进神经纤维的良性再生,发挥对神经元的损伤修复作用。

天麻素是中药天麻中含量最高的有效单体成分,具有抗老年痴呆、抗氧化应激等多种药理学效应。天麻素可抑制 Aβ 蛋白和纤维斑块的形成,进而阻止 AD 病变的发展^[13]。天麻素可通过上调 SIRT1 的表达,提高组织细胞的抗氧化应激损伤能力^[14]。本实验结果显示电针组与天麻素组额叶皮质 BDNF 与 SIRT1 的表达强于模型组,尤以针药结合组的表达最为显著,提示电针与天麻素可能通过上调 AD 大鼠额叶皮质 BDNF 与 SIRT1 的表达,增强脑组织抗氧化应激能力,从而达到对 AD 大鼠的脑保护作用。电针结合天麻素的疗效优于单用电针或天麻素治疗,具有显著的增效作用,这可能是通过提高靶细胞对药物的生物利用度等途径而产生^[15],其具体机制仍需进一步研究。

【参考文献】

[1] LEUNG AW, LAM LC, KWAN AK, et al. Electroacupuncture for

older adults with mild cognitive impairment: study protocol for a randomized controlled trial [J]. *Trials* 2015 ,16: 232.

[2] MENG L ,QIAN S. Gastrodin protects neural progenitor cells against amyloid β (1-42) -induced neurotoxicity and improves hippocampal neurogenesis in Amyloid β (1-42) -injected mice [J]. *J Mol Neurosci* 2016 ,60: 21-32.

[3] 姚婕,张红梅,阎丽萍,等. BDNF 调控 SIRT1/PGC-1 α 通路拮抗 A β 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.

[4] SELKOE D ,MANDELKOW E ,HOLTZMAN D. Deciphering Alzheimer disease[J]. *Cold Spring Harb Perspect Med* ,2012 ,2(1) : a11460.

[5] SHENG B ,GONG K ,NIU Y *et al.* Inhibition of gamma-secretase activity reduces Abeta production ,reduces oxidative stress ,increases mitochondrial activity and leads to reduced vulnerability to apoptosis: Implications for the treatment of Alzheimer's disease [J]. *Free Radic Biol Med* 2009 ,46(10) : 1362-1375.

[6] PRAKASH A ,KUMAR A. Role of nuclear receptor on regulation of BDNF and neuroinflammation in hippocampus of β -amyloid animal model of Alzheimer's disease [J]. *Neurotox Res* 2014 ,25(4) : 335-347.

[7] MORRIS KC ,LIN HW ,THOMPSON JW *et al.* Pathways for ischemic cytoprotection: Role of sirtuins in caloric restriction ,resvera-

tol ,and ischemic preconditioning [J]. *J Cereb Blood Flow Metab* 2011 ,31(4) : 1003-1019.

[8] WANG J ,HO L ,ZHAO W *et al.* Grape-derived polyphenolics prevent Abeta oligomerization and attenuate cognitive deterioration in a mouse model of Alzheimer's disease [J]. *J Neurosci* ,2008 ,28(25) : 6388-6392.

[9] 王康锋,张立娟,陈新勇.电针大椎及百会穴治疗老年性痴呆 36 例临床观察[J]. *中华中医药杂志* 2015 ,30(3) : 784-786.

[10] 董卫国,林岚,王丰,等.电针对快速老化小鼠海马线粒体呼吸链功能的影响[J].*中国针灸* 2012 ,32(8) : 726-730.

[11] 孙国杰,罗磊,杜艳军,等.针灸对 AD 模型大鼠海马神经元线粒体保护机制研究[J].*中国针灸* 2014 ,34(2) : 157-162.

[12] 黄新格,零佩东,赵利华.D-半乳糖 AD 模型与中医脑衰老证候病机关系的探讨及在针灸防治脑衰老中的应用[J].*世界中医药* 2015 ,10(12) : 1983-1986.

[13] 周楠楠,朱燃,赵雪梅,等.天麻素抑制小鼠大脑内 A β 斑块形成及其作用机制[J].*药学学报* 2016 ,51(4) : 588-594.

[14] 高健美,陆国辉,李艳茹,等.天麻素通过 SIRT1/PGC-1 α 信号通路抗叔丁基过氧化氢诱导的 HL7702 细胞氧化损伤[J].*中药药理与临床* 2014 ,30(4) : 32-35.

[15] 王耀帅,张建斌,王玲玲,等.对针药结合研究现状与发展趋势的思考[J].*中医杂志* 2012 ,53(6) : 473-475.

(上接第 415 页)

效果的因素很多,包括外部环境因素、疫苗使用因素等,其中免疫程序、免疫途径、免疫剂量等均有影响。一般研究表明^[12],初次免疫通常产生的效应较低,而多次重复后可有效激活细胞免疫,增强机体反应性。同时有研究显示低剂量卡介苗可对机体产生较好的免疫保护作用。因此,在本研究中,低剂量的卡介苗即可有效刺激机体免疫系统,而经过重复接种,再次的免疫应答被有效激活,产生级联反应,与高剂量免疫间的差异无统计学意义。

综上所述,卡介苗能下调 AD 小鼠血清中的炎症因子水平,减轻 A β 神经毒性,改善 AD 小鼠的行为活动,可在 AD 治疗中发挥作用。

【参考文献】

[1] IAA MEBANE-SIMS. 2016 Alzheimer's disease facts and figures [J]. *Alzheimers Dement* 2016 ,12(4) : 459-509.

[2] YANG J ,FANGFANG Q ,ZHIBIN Y *et al.* Neonatal BCG vaccination of mice improves neurogenesis and behavior in early life [J]. *Brain Research Bulletin* 2015(120) : 25-33.

[3] DYE C. Making wider use of the world's most widely used vaccine: Bacille Calmette-Guerin revaccination reconsidered [J]. *J R Soc Interface* 2013 ,10(87) : 365.

[4] VORHEES CV ,WILLIAMS MT. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory [J].

Nature Protocols 2006 ,1: 848-858.

[5] ZHANG Y ,ZOU J ,YANG J *et al.* 4Abeta1-15-derived monoclonal antibody reduces more abeta burdens and neuroinflammation than homologous vaccine in APP/PS1 mice [J]. *Curr Alzheimer Res* , 2015 ,12(4) : 384-397.

[6] SELKOE DJ. Alzheimer's disease: genes ,proteins ,and therapy [J]. *Physiol Rev* 2001 ,81(2) : 741-766.

[7] CUI X ,ZUO P ,ZHANG O *et al.* Chronic systemic D-galactose exposure induces memory loss ,neurodegeneration ,and oxidative damage in mice: protective effects of R-alpha-lipoic acid [J]. *Neurosci Res* 2006 ,84: 647-654.

[8] 刘友平,刘田,毕航,等.品系、性别和生物节律对小鼠旷场实验的影响[J].*西安交通大学学报(医学版)* 2014 ,35(5) : 634-638.

[9] PAN X ,GONG N ,ZHAO J ,*et al.* Powerful beneficial effects of benfotiamine on cognitive impairment and beta-amyloid deposition in amyloid precursor protein/presenilin-1 transgenic mice [J]. *Brain* 2010 ,133: 1342-1351.

[10] WILCOCK DM ,JANTZEN PT ,LI Q *et al.* Amyloid-beta vaccination ,but not nitro-nonsteroidal anti-inflammatory drug treatment , increases vascular amyloid and microhemorrhage while both reduce parenchymal amyloid [J]. *Neuroscience* 2007 ,144: 950-960.

[11] 雷洪涛,王筠,马淑骅,等. IL-1 β 、TNF- α 与阿尔茨海默病的研究进展[J].*中国老年学杂志* 2014 ,34(24) : 7115-7117.

[12] 吉海杰,王黎明,李会,等.细胞因子诱导的杀伤细胞免疫治疗肿瘤研究进展[J].*中华细胞与干细胞杂志(电子版)* 2012 ,2(4) : 295-301.