

· 基础研究 ·

电针对阿尔茨海默病大鼠额叶免疫炎性反应的调节作用

朱书秀 付艾妮 孙国杰

【摘要】目的 观察电针(EA)对阿尔茨海默病(AD)大鼠额叶小神经胶质细胞、白介素-1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的影响。**方法** 正常 24 月龄 SD 大鼠 48 只,随机分成正常组、假手术组、模型组和 EA 组,每组大鼠 12 只。在立体定位仪下向双侧 Meynert 核注射微量凝固态 A β 1-40(1 μ l, 10 μ g/ μ l)制备 AD 动物模型,选取百会、太溪、足三里穴电针治疗,频率 2 Hz,强度 1 mA,留针 15 min,每天 1 次,6 d 为 1 个疗程,疗程间隔 1 d,治疗 2 个疗程。免疫组化法观察额叶活化小神经胶质细胞、IL-1 β 、TNF- α 的表达。**结果** 模型组额叶活化小神经胶质细胞、IL-1 β 、TNF- α 的表达增加,经 EA 治疗后,EA 组活化小神经胶质细胞、IL-1 β 、TNF- α 的表达较模型组减少,且差异具有统计学意义($P < 0.01$)。**结论** EA 能阻抑 AD 模型大鼠额叶炎性反应,调整机体的免疫状态。

【关键词】 电针; 阿尔茨海默病; 小神经胶质细胞; 白介素-1 β ; 肿瘤坏死因子- α

Electroacupuncture and the immunological inflammatory reaction in the frontal lobe seen with Alzheimer's disease ZHU Shu-xiu*, FU Ai-ni, SUN Guo-jie. * College of Medical Science of Jiangnan University, Wuhan 430056, China

【Abstract】 Objective To observe the effect of electroacupuncture (EA) on microglia, interleukin-1 β , and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in the frontal lobes of rats modeling Alzheimer's disease (AD). **Methods** Forty-eight normal SD rats 24 months old were randomly divided into a normal group, a sham operated group, a model group and an EA group, with 12 rats in each group. The AD model was established by stereotaxic microinjection of agglutinated amyloid-beta protein (A β 1-40, 1 μ l, 10 μ g/ μ l) into the rats' bilateral Meynert nucleus. The effects of EA applied to the rats' "Baihui" (DU 20) "Taixi" (KI 3) and "Zusanli" (ST 36) acupoints were observed. The EA treatment was applied once a day for 6 days as a course. The next course of treatment was continued after one day's rest and the total treatment involved 2 courses. The activated microglia and the expression of IL-1 β , and TNF- α in the frontal lobe were determined by immunohistochemistry method. **Results** The number of cells exhibiting microglia, IL-1 β , or TNF- α in the frontal lobes of rats in the model group increased significantly, but after EA treatment, cells showing microglia, IL-1 β , or TNF- α decreased remarkably. There were significant differences in comparison with the model group ($P \leq 0.01$). **Conclusion** Electroacupuncture treatment can depress inflammatory reaction in the frontal lobe of AD rats and adjust the rats' immunologic state.

【Key words】 Electroacupuncture; Alzheimer's disease; Microglia; IL-1 β ; Tumor necrosis factor- α

随着近年对阿尔茨海默病(Alzheimer disease, AD)发病机制研究的进展,发现脑内慢性炎症反应可能是其重要病理特征之一,从而提出了 AD 的免疫炎症机制^[1,2]。Liu 等^[3]的研究发现,AD 患者中激活的小神经胶质细胞显著高于对照组,且凋亡的神经元数量明显增高。Ryu 等^[4]给 AD 大鼠脑内注射 β -淀粉样蛋白(β -amyloid, A β)发现,伴有以小神经胶质细胞为主的胶质细胞增生。这些研究均说明,免疫炎症反应对 AD 的发生和发展具有重要的作用。本研究旨在探

讨电针对 AD 大鼠额叶免疫炎性反应的调节作用,为电针的临床应用提供实验依据。

材料与方法

一、实验动物与材料

正常 SD 大鼠 48 只,雌、雄各半,24 月龄(老年),体重 350 ~ 450 g,由华中科技大学同济医学院实验动物学部提供。所有大鼠均经 Y 型水迷路法粗筛,测试 15 次,正确次数均达 12 次以上。随机分为正常组、假手术组、模型组和电针组,每组 12 只。实验材料包括:A β 1-40 (BioSource 公司);兔抗大鼠 CD68 多克隆抗体、兔抗大鼠白介素-1 β (interleukin-1, IL-1 β) 多克隆抗体、兔抗大鼠肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 多克隆抗体 (Sigma 公司);链霉亲和素-生

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2009.04.006

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30772837)

作者简介:430065 武汉,江汉大学医学院中医系[朱书秀(现为湖北中医学院 2006 级在读博士研究生)、付艾妮];湖北中医学院(孙国杰)

物素-过氧化物酶复合物(strept avidin-biotin complex, SABC)免疫组化试剂盒(武汉 Boster 公司);脑立体定位仪江湾 II 型(上海江湾医疗器械厂);轮转式石蜡切片机(德国 Leitz 公司生产)。

二、AD 模型制备

Aβ1-40 孵育:用 0.1% 三氟乙酸将 Aβ1-40 稀释成 10 μg/μl, 37℃ 孵育 1 周, 使其变为聚集状态的 Aβ1-40。

造模方法:大鼠给予 10% 水合氯醛(3.5 ml/Kg 体重)麻醉后, 按大鼠脑立体定位图谱进行定位, 在前囟点后方 1.4 mm、中线旁开 3 mm 处用牙科钻钻一小孔穿颅(直径 1 mm), 垂直插入微量注射器, 使针尖自颅骨表面进针 7 mm 至 Meynert 核。模型组、电针组左右侧各注射 1 μl (10 μg/μl) Aβ1-40 聚集液, 假手术组注入等容积生理盐水, 正常组不进行处理。造模完成后第 31 天, 对大鼠行 Y 字型水迷宫筛选, 凡 15 次测试中正确次数较造模前下降 1/3 者为造模成功(模型组和电针组大鼠均造模成功)^[5]。

三、处理方法

4 组大鼠均常规饲养, 正常组、假手术组和模型组不进行电针治疗, 电针组于造模完成后第 32 天开始, 取百会、太溪、足三里穴, 用普通 0.38 mm × 15 mm 不锈钢毫针刺刺, 百会穴向前以 15°角斜刺 10 mm, 足三里穴直刺 5 mm, 太溪穴直刺 3 mm, 接上海产 G6805-2 型电针治疗仪(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 2 Hz, 强度 1 mA, 每日 1 次, 每次留针 15 min, 6 d 为 1 个疗程, 疗程间隔 1 d, 共治疗 2 个疗程。

四、免疫组织化学染色

电针组治疗结束后, 大鼠给予 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉, 迅速处死取脑, 剥取皮质额叶, 置于 4% 多聚甲醛磷酸缓冲液中固定过夜, 常规石蜡包埋, 连续切片, 片厚 4 μm, 每隔 10 张取 1 张, 应用兔抗大鼠 CD68、IL-1β、TNF-α 多克隆抗体进行免疫组化显色, 其中滴加一抗均按 1:100 比例稀释, 阴性对照为一抗加 PBS。具体操作步骤严格按照试剂盒说明书进行。在 400 倍视野下每张切片取相互不重叠的 8 个视野, 计数其中阳性细胞。

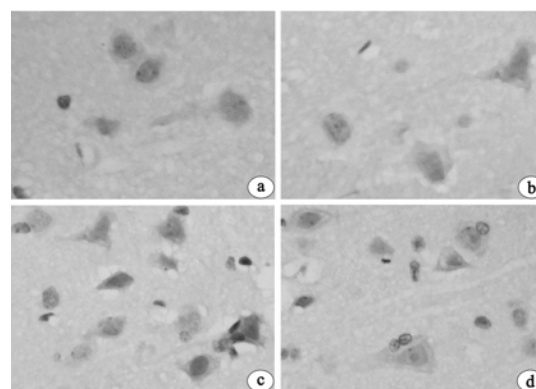
五、统计学分析

数据采用 SPSS 13.0 版统计软件进行分析, 结果以($\bar{x} \pm s$)表示, 采用单因素方差分析进行多组间均数比较、两组间比较采用 *q* 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

结 果

一、CD68 阳性细胞表达

光镜下 CD68 阳性细胞呈棕黄色(图 1)。正常组及假手术组有散在分布, 染色较淡, 胞体较小; 模型组表现为胞体肥大, 呈类圆形, 染色增强, 可见阿米巴状聚集, 且数量增多, 与正常组及假手术组比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 电针组未见典型的阿米巴状 CD68 阳性细胞, 与模型组比较, 胞体变小, 染色强度减弱, 数量减少, 差异有统计学意义($P < 0.01$), 详见表 1。



注: a 为正常组; b 为假手术组; c 为模型组; d 为电针组

图 1 4 组大鼠额叶 CD68 阳性细胞表达(免疫组化 SABC 染色, ×400)

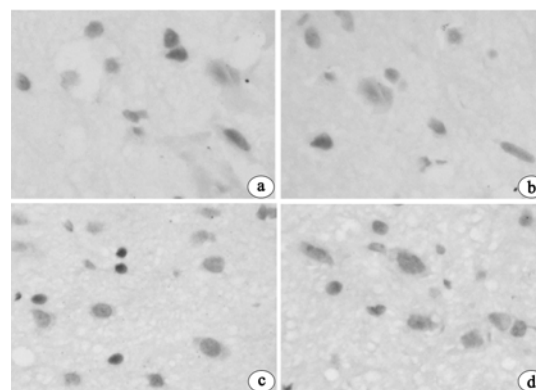
表 1 4 组大鼠额叶 CD68、IL-1β、TNF-α 阳性细胞数 (个/高倍镜视野, $\bar{x} \pm s$)

组 别	n	CD68 阳性 细胞数	IL-1β 阳性 细胞数	TNF-α 阳性 细胞数
正常组	12	9.93 ± 1.88	4.98 ± 1.18	5.16 ± 1.28
假手术组	12	9.52 ± 1.63	5.26 ± 1.29	5.35 ± 1.07
模型组	12	16.86 ± 2.09 ^a	12.19 ± 1.35 ^a	10.37 ± 1.62 ^a
电针组	12	11.55 ± 1.81 ^{bc}	7.91 ± 1.66 ^{ac}	7.65 ± 1.54 ^{ac}

注: 与正常组、假手术组比较, ^a $P < 0.01$, ^b $P < 0.05$; 与模型组比较, ^c $P < 0.01$

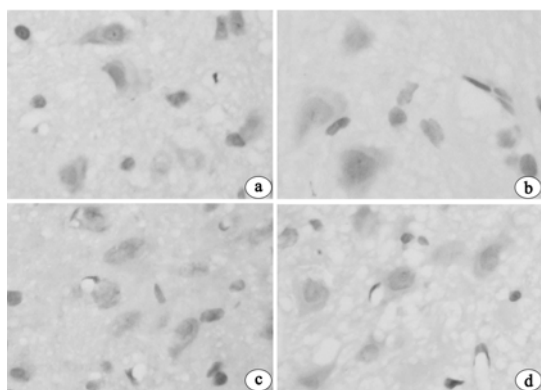
二、IL-1β、TNF-α 阳性细胞表达

正常组及假手术组仅有少量 IL-1β、TNF-α 阳性细胞表达, 细胞呈棕黄色, 为卵圆形、梭形(图 2、3)。模型组表达呈强阳性, 与正常组及假手术组比较差异有



注: a 为正常组; b 为假手术组; c 为模型组; d 为电针组

图 2 各组大鼠额叶 IL-1β 阳性细胞表达(免疫组化 SABC 染色, ×400)



注:a 为正常组;b 为假手术组;c 为模型组;d 为电针组

图3 各组大鼠额叶 TNF- α 阳性细胞表达(免疫组化 SABC 法染色, $\times 400$)

统计学意义($P < 0.05$);经电针治疗后 IL-1 β 、TNF- α 含量显著减少,与模型组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$),但仍高于正常组,且 $P < 0.01$,详见表 1。

讨 论

炎症反应在 AD 的病理改变过程中起关键性作用^[6,7],且流行病学相关研究资料证实,应用非甾体类抗炎药物可降低 AD 的发病率^[8]。在中枢神经系统内的免疫介体主要是神经胶质细胞,特别是小神经胶质细胞。在 AD 中,活化的小神经胶质细胞合成并分泌 IL-1,而 IL-1 可促进 β -淀粉样前体蛋白代谢,加重 A β 的沉积^[9,10]。弥漫性或纤维性 A β 的刺激,可使小神经胶质细胞迅速活化,产生许多前炎性介质(IL-1、IL-6、TNF- α 等)及有神经毒性潜能的物质而加剧 AD 的恶化^[11]。CD68 是小神经胶质细胞的特异性标记物^[12],实验结果显示,模型组大脑皮质 CD68 阳性细胞数目明显增多,胞体肥大,呈类圆形,表明 A β 能激活小神经胶质细胞,参与了 AD 的发生、发展。

IL-1 有 IL-1 α 和 IL-1 β 两个亚型,并有不同的基因编码,但这两个基因有 26% 同源性。在 AD 中,活化的小神经胶质细胞所表达的 IL-1 几乎能达到相同年龄对照组的 30 倍^[7],其中 IL-1 β 为 A β 发挥毒性作用时的重要调节因子。IL-1、IL-6 可通过蛋白激酶 C 途径进一步刺激小神经胶质细胞合成淀粉样蛋白前体^[13],形成恶性循环,最终导致淀粉样蛋白前体高表达。此外,有关文献报道老年斑周围存在大量 TNF- α ,AD 患者脑脊液和外周血中 TNF- α 表达量亦明显升高,说明 TNF- α 异常表达与 AD 存在密切关系^[14]。TNF- α 还可诱导小神经胶质细胞合成集落刺激因子,进一步放大炎症。本实验发现,模型组 IL-1 β 、TNF- α 阳性细胞表达显著高于正常组及假手术组,说明这些炎性因子与小神经胶质细胞互为因果,相互作用,造成炎症反应放大和毒性产物增多,导致神经元损伤、坏

死,促使 AD 发生、发展。

AD 在祖国医学中早有记载,诸症散见于呆证、文痴、善忘、狂证、郁证等。关于其病因病机,历代医家认为其发生发展与很多因素有关,目前对 AD 的理论研究较为一致的观点为:病位在脑,其本为肾虚髓亏。据此,我们选取百会、太溪、足三里穴进行治疗。百会穴位居头之巅顶,属督脉,《素问·骨空论》:“病变在脑,首取督脉”;太溪穴为足少阴肾经腧穴、原穴,具有滋肾阴、壮元阳之功;足三里穴为胃腑的下合穴,有升清降浊,导痰行滞之效。三穴合用,共奏补肾、健脑之功效。我们的实验以电针百会、太溪、足三里穴干预 AD 模型,结果发现,电针组大鼠额叶 CD68、IL-1 β 、TNF- α 表达下调,提示电针能阻抑 AD 模型大鼠免疫炎症反应,调整机体的免疫状态,从而达到防治 AD 的作用。

参 考 文 献

- [1] Casal C, Serratos J, Tusell JM. Effects of beta-AP peptides on activation of the transcription factor NF-kappa B and in cell proliferation in glial cell cultures. *Neurosci Res*, 2004, 48:315-323.
- [2] 刘江红. 老年性痴呆的免疫机制研究进展. *中国神经免疫学和神经病学杂志*, 2004, 11:111-114.
- [3] 刘冬戈,何淑蓉,张伟,等. 阿尔茨海默病神经细胞凋亡与小胶质细胞活化的关系. *中华病理学杂志*, 2004, 33:404-407.
- [4] Ryu JK, Franciosi S, Sattayaprasert P, et al. Minocycline inhibits neuronal death and glial activation induced by beta-amyloid peptide in rat hippocampus. *Glia*, 2004, 48:85-90.
- [5] 徐淑云. 药理实验方法学. 北京: 人民卫生出版社, 1991: 661-662.
- [6] Hoozemans JJ, Veerhuis R, Rozemuller JM, et al. Neuroinflammation and regeneration in the early stages of Alzheimer's disease pathology. *Int J Dev Neurosci*, 2006, 24: 157-165.
- [7] Griffin WS. Inflammation and neurodegenerative disease. *Am J Clin Nutr*, 2006, 83: 470-474.
- [8] McGeer PL, McGeer EG. NSAIDs and Alzheimer disease: epidemiological, animal model and clinical studies. *Neurobiol Aging*, 2007, 28:639-647.
- [9] Weisman D, Hakimian E, Ho GJ, et al. Interleukins, inflammation, and mechanisms of Alzheimer's disease. *Vitam Horm*, 2006, 74: 505-530.
- [10] Xiang Z, Haroutunian V, Ho L, et al. Microglia activation in the brain as inflammatory biomarker of Alzheimer's disease neuropathology and clinical dementia. *Dis Markers*, 2006, 22:95-102.
- [11] Webster SD, Park M, Fonseca MI, et al. Structural and functional evidence for microglial expression of C1qR (P), the C1q receptor that enhances phagocytosis. *J Leukoc Biol*, 2000, 67:109-116.
- [12] 袁琼兰,郭勇,王琼,等. 小胶质细胞培养、分离、纯化和鉴定的初步研究. *泸州医学院学报*, 2002, 33:369.
- [13] Mackenzie IR. Anti-inflammatory drugs and Alzheimer-type pathology in aging. *Neurology*, 2000, 54:732-734.
- [14] Shepherd CE, Thiel E, McCann H, et al. Cortical inflammation in Alzheimer disease but not dementia with Lewy bodies. *Arch Neurol*, 2000, 57: 817-822.

(修回日期:2009-01-10)

(本文编辑:阮仕衡)