

- kinase in chondrocytes. J Cell Biol, 2003, 162:139-148.
- [20] Yang L, Carlson SG, McBurney D, et al. Multiple signals induce endoplasmic reticulum stress in both primary and immortalized chondrocytes resulting in loss of differentiation, impaired cell growth, and apoptosis. J Biol Chem, 2005, 280:31156-31165.
- [21] 王春梅, 黄晓峰, 杨家骥. 细胞超微结构与超微结构病理基础. 西安:第四军医大学出版社, 2004: 39-49.
- [22] Wong BC, Boyd CA, Lanzendorf SE. Randomized controlled study of human zona pellucida dissection using the zona infrared laser optical system: evaluation of blastomere damage, embryo development, and subsequent hatching. Fertil Steril, 2003, 80: 1249-1254.
- [23] Logan ID, McKenna PG, Barnett YA. An investigation of the cytotoxic and mutagenic potential of lowintensity laser irradiation in Friend erythroleukemia cells. Mutat Res, 1995, 347: 67-71.
- [24] Applegate LA, Scaletta C, Panizzon R, et al. Induction of the putative protective protein ferritin by infrared radiation: implications in skin repair. Int J Mol Med, 2000, 5: 247-251.
- (修回日期:2007-04-21)
(本文编辑:松 明)

· 研究简报 ·

氩-氦激光穴位照射对阿尔茨海默病模型大鼠皮质和海马 Bcl-2 表达的影响

李宛青 刘华 任秀花

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种临床常见的中枢神经系统变性疾病,最早表现为海马病变所致的记忆缺损,接着是大脑皮质病变,最终导致记忆减退及语言、空间等认知功能降低^[1]。流行病学研究表明,随着人口的老齡化,AD 的发病率呈上升趋势^[2]。目前对 AD 的病因尚未明了,治疗上亦缺少疗效理想的药物,因此深入探讨 AD 的发病机制,研究有效的防治措施是医学界急需解决的一项重大课题。有学者将氩-氦激光照射用于老年脑血管病和 AD 的治疗,并取得了较好的疗效^[3]。但氩-氦激光对 AD 大鼠治疗效果的实验研究鲜有报道。本研究首次应用氩-氦激光对 AD 大鼠“百会”、“大椎”两穴进行穴位照射,观察其对皮质和海马 Bcl-2 表达的影响,以期为临床治疗 AD 提供实验依据。

材料与方法

一、药品与试剂

瑞士 Alexis 公司产鹅膏蕈氨酸(Ibotenic acid, IBO), 分析纯;美国 Sigma 公司产 Bcl-2 抗体(1:200)、生物素化羊抗兔 IgG (1:500)和链霉卵白素-过氧化物酶(streptavidin-horseradish peroxidase, SP)复合物(1:500)。

二、实验动物及分组

取健康 Sprague-Dawley 大鼠 40 只,体重 200 ~ 230 g,雌雄不拘,由河南省实验动物中心提供,合格证号为 410116。动物于清洁动物室饲养,室温为(22 ± 2)℃,湿度为 40% ~ 50%,自由摄食、饮水,每日光照 12 h。将动物随机分为假手术组、AD 模型组(模型组)、氩-氦激光非穴位照射组(激光治疗组)和氩-氦激光穴位照射组(激光穴位治疗组),每组 10 只。实验动物饲养 1 周后造模,除去造模时死亡的动物,剩余假手术组 10 只、模型组 8 只、激光治疗组 9 只以及激光穴位治疗组 8 只。

基金项目:河南省科技攻关项目(0524410024)

作者单位:450044 郑州,郑州师范高等专科学校生命科学系(李宛青);郑州大学医学院细胞生物学与医学遗传学教研室(刘华),人体解剖学教研室(任秀花)

三、AD 动物模型的建立

采用国内、外广泛采用的非遗传性 AD 动物模型制作方法建立动物模型^[4]。用 100 g/L 的水合氯醛(300 mg/kg 体重)腹腔注射麻醉大鼠后,将其固定于立体定位仪上,剪掉手术区毛发,局部消毒,于头顶正中作一 1.5 cm 长的矢状切口,钝性分离骨膜,参照大鼠脑立体定位图谱^[5],于双侧内特基底核(nucleus basalis of Meynert)处进行立体定位(坐标前后径 1.4 mm,左右径 2.4 mm,垂直径 7.4 mm),然后于双侧颅骨各对应点分别钻 1 个直径为 1 mm 的孔,用玻璃微量进样器垂直注射。注射液为溶于 0.1 mol/L 磷酸缓冲液(pH 值 7.4)的 IBO 1 μl(5 μg)。每针注射时间 5 min,留针 5 min,以保证溶液充分弥散,然后缓缓抽针,缝合手术切口,动物清醒后放回笼中常规饲养。假手术组手术方法相同,但仅注射等量生理盐水。

四、氩-氦激光照射方法

于手术后第 2 天,采用桂林产氩-氦激光多功能治疗仪对 2 个治疗组进行氩-氦激光照射,氩-氦激光波长为 632.8 nm,功率为 4.5 mW,光斑直径为 3 mm,功率密度为 56.62 mW/cm²,能量密度为 33.97 J/cm²。激光治疗组照射大鼠腹部,激光穴位治疗组照射大鼠百会穴和大椎穴。百会穴位于在顶骨正中,大椎穴位于大鼠背部正中第 7 颈椎与第 1 胸椎间^[6]。2 组均每次照射 5 min,每天照射 1 次,10 d 为 1 个疗程,共 2 个疗程,疗程间间隔 2 d。

五、检测方法

各组动物均于造模后第 23 天,用 100 g/L 的水合氯醛麻醉,开胸暴露心脏,经左心室插管,快速灌注生理盐水及 4% 多聚甲醛后迅速取脑,置于 4℃ 的生理盐水及 4% 多聚甲醛中后固定,常规脱水、石蜡包埋,用石蜡切片机取冠状切面连续切片,片厚 5 μm,隔五取一。参照免疫组织化学试剂盒说明进行 SP 法染色,阴性对照用正常羊血清代替一抗。每个样本 Bcl-2 免疫组织化学染色切片各取 5 张,于观察区域随机选取 5 个视野,在 400 倍光镜下记录皮质和海马 CA1 区 Bcl-2 阳性细胞数。

六、统计学分析

所得数据用($\bar{x} \pm s$)表示,用 SPSS 10.0 版统计软件做单因

素方差分析,均数间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

结 果

光镜下观察到,各组神经细胞形态不完全相同,主要为三角形和锥体形,阳性细胞呈棕黄色,胞浆着色明显,胞核也有部分着色,见图 1~4。假手术组、模型组皮质与海马 CA1 区 Bcl-2 阳性细胞数较少;激光治疗组皮质与海马 CA1 区 Bcl-2 阳性细胞表达略增加,与假手术组和模型组比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$);激光穴位治疗组皮质与海马 CA1 区 Bcl-2 阳性细胞表达明显增多,与假手术组和模型组比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),但与激光治疗组比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$),见表 1。

表 1 各组皮质及海马 CA1 区 Bcl-2 阳性细胞表达情况比较(个, $\bar{x} \pm s$)

组 别	n	皮质阳性细胞数	海马 CA1 区阳性细胞数
假手术组	10	25.12 ± 2.18	19.18 ± 3.10
模型组	8	28.32 ± 3.14	23.12 ± 2.14
激光治疗组	9	30.23 ± 2.23	26.14 ± 3.18
激光穴位治疗组	8	38.24 ± 2.18^{ab}	34.16 ± 3.35^{ab}

注:与假手术组比较,^a $P < 0.05$;与模型组比较,^b $P < 0.05$

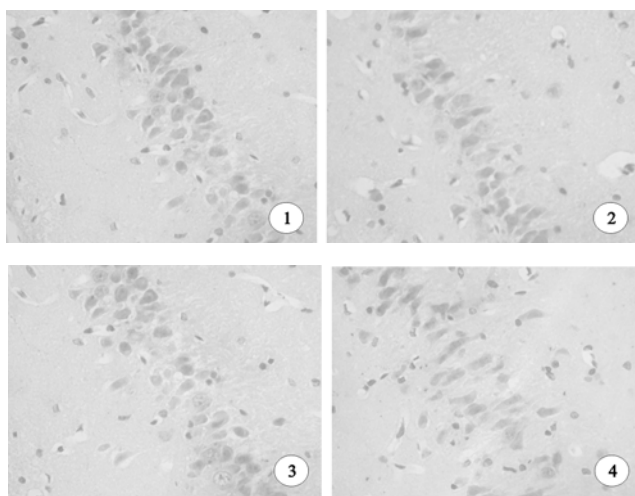


图 1 假手术组海马 CA1 区 Bcl-2 阳性细胞的表达(免疫组织化学染色, $\times 400$);图 2 模型组海马 CA1 区 Bcl-2 阳性细胞的表达(免疫组织化学染色, $\times 400$);图 3 激光治疗组海马 CA1 区 Bcl-2 阳性细胞的表达(免疫组织化学染色, $\times 400$);图 4 激光穴位治疗组海马 CA1 区 Bcl-2 阳性细胞的表达(免疫组织化学染色, $\times 400$)

讨 论

Bcl-2 基因是调节细胞凋亡的最基本成员,被认为是能特异地抑制细胞凋亡发生的“抗凋亡基因”。Castren 等^[7]发现, Bcl-2 mRNA 广泛分布于发育期和成年大鼠脑中,并在大鼠脑发育过程中发生量的变化。Bcl-2 的抗细胞凋亡机制可能包括^[8]:(1)作为一种抗氧化剂,调节细胞的氧化还原状态,从而抑制细胞凋亡的发生;(2)通过直接或间接地影响内质网中 Ca^{2+} 释放而实现抑制或调节细胞凋亡;(3) Bcl-2 家族基因之间

通过高度保守的 BH1 和 BH2 同源区形成同源或异源二聚体,相互调节活性,对细胞存亡发挥不同的效应;(4) Bcl-2 的作用也可能涉及到核孔复合物的信号转导等。另外, Bcl-2 具有多种生理活性,可以阻止或降低射线、自由基、化学药物等引起的细胞凋亡,对氧化损伤造成的细胞凋亡具有肯定的抑制作用^[9],但其机制尚不明确。

以往的研究提示,激光穴位照射可改善缺血缺氧新生鼠脑组织胆碱乙酰转移酶和脑源性神经营养因子的表达,改善其神经元受损情况,诱发 SOD 生成并提高其活力,对缺氧缺血大鼠脑组织脂质过氧化及自由基清除系统具有有益的调节作用,能够提高脑组织对缺氧缺血的耐受性^[10,11]。说明氩-氦激光穴位照射对脑损伤有一定的改善作用。本实验结果发现,激光穴位治疗组大鼠皮质及海马 CA1 区 Bcl-2 表达增强,与模型组比较差异有统计学意义;单纯的氩-氦激光治疗也能使 Bcl-2 蛋白表达略增强,但与模型组比较差异无统计学意义。因此我们推测,氩-氦激光穴位照射可能通过上调抗凋亡基因 Bcl-2 的表达来实现其抗凋亡效应,从而发挥对 AD 的治疗作用。至于模型组 bcl-2 蛋白表达略高于假手术组的原因,可能是由于手术过程中缺血缺氧刺激造成 bcl-2 的表达增加,这和文献^[12]的报道一致,其具体机制也有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 商秀丽,沈雪莉,薛一雪. AB 海马注射的 AD 大鼠模型海马 MAPK 表达变化. 解剖科学进展, 2005, 11: 222-224, 227.
- [2] 查运红,梅元武,黄敬. 老年痴呆大鼠模型的制备及其神经行为学研究. 中华物理医学与康复杂志, 2005, 27: 641-644.
- [3] 李基文. 老年性痴呆症的研究进展及治疗前景. 职业卫生与应急救援, 2003, 21: 141-143.
- [4] 安玉会,郭茂峰,孟庆瑞,等. 脑精肽对阿尔茨海默病模型大鼠的治疗作用. 郑州大学学报(医学版), 2003, 38: 884-886.
- [5] 包新民,舒斯云. 大鼠脑立体定位图谱. 北京:人民卫生出版社, 1991: 87.
- [6] 林文注. 实验针灸学. 上海:上海科学技术出版社, 1994: 286.
- [7] Castren E, Ohga Y, Berzaghi MP, et al. Bcl-2 messenger RNA is localized in neurons of the developing and adult rat brain. Neuroscience, 1994, 61: 165-177.
- [8] 叶建锋,舒斯云,包新民. 原癌基因 bcl-2 与神经组织程序化细胞死亡. 中国神经科学杂志, 1998, 14: 53-58.
- [9] Hockenbery DM, Oltvai ZN, Yin XM, et al. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. Cell, 1993, 75: 241-251.
- [10] 吴爱群,刘伟,李宛青,等. 氩-氦激光与电针穴位疗法对新生大鼠脑缺血缺氧后海马神经元存活的影响. 郑州大学学报(医学版), 2003, 38: 890-893.
- [11] 李宛青,陈雪梅,吴爱群,等. 氩-氦激光穴位照射后缺氧缺血新生大鼠脑中超氧化物歧化酶活性及丙二醛含量的变化. 中国临床康复, 2005, 9: 196-197.
- [12] 朱炬,王纪佐. 大鼠局灶性脑缺血再灌注后 Bcl-2 和 Bax 的表达. 天津医科大学学报, 2003, 9: 42-44.

(修回日期: 2007-03-30)

(本文编辑: 吴 倩)