

太冲、风府穴对帕金森病大鼠学习记忆能力及脑源性神经营养因子影响的实验研究[※]

● 黄攀攀* 马 骏 王彦春 甘水咏 李 浩 雷 涛

摘 要 目的:采用太冲、风府穴针刺治疗帕金森病模型大鼠,探讨电针对帕金森病大鼠学习记忆能力及脑源性神经营养因子表达的影响。方法:40只雄性大鼠,随机分为正常对照组、模型组、电针组、美多芭组,每组10只。采用6-OHDA毁损右侧黑质制作帕金森模型大鼠,运用太冲、风府穴电针治疗,Morris水迷宫检测大鼠学习记忆能力及免疫组化方法检测脑源性神经营养因子的表达。结果:模型组大鼠潜伏期时间较正常对照组明显延长($P < 0.01$),电针组、美多芭组与模型组比较,潜伏期时间明显缩短($P < 0.01$);模型组BDNF免疫组化阳性细胞计数较正常对照组显著减少($P < 0.01$),电针组阳性细胞计数较模型组增加($P < 0.01$)。结论:针刺太冲、风府穴可显著提高大鼠学习记忆能力,其作用机制可能与电针促进帕金森大鼠黑质脑源性神经营养因子表达有关。

关键词 太冲穴 风府穴 帕金森病 脑源性神经营养因子 学习记忆能力

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是常见的中枢神经系统退行性疾病,其基本病理改变是黑质多巴胺能神经元进行性丢失,出现肢体震颤、肌张力增高、正常的姿势平衡反射丧失、随意运动减少等临床症状,其准确病因及发病机制尚未完全明确。近年来,针灸作为一种独特的治疗方法,在改善PD临床症状方面取得了可喜的成就,已经被越来越多地运用于PD治疗中。本研究旨在进一步观察电针治疗帕金森病大鼠前后学习记忆能力的改变及脑源性神经营养因子变化,为针灸治疗帕金森病提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 实验动物及分组 健康Wistar雄性大鼠,体重 $200\text{g} \pm 20\text{g}$,由华中科技大学同济医学院实验动物学部提供。所有动物均在通风良好条件下分笼饲养,自由摄食、饮水。将动物随机分成4组:正常组、模型组、电针组及美多芭组,每组10只。

1.2 主要药物试剂及器材 6-羟多巴胺(6-OH-

DA)、阿扑吗啡(APO)、VitC为市购常用试剂,美多芭片(上海罗氏制药有限公司),SABC试剂盒(武汉博士德生物有限公司),BDNF兔抗鼠单克隆抗体(武汉博士德生物有限公司),脑立体定位仪(江湾II型,上海江湾医疗器械厂)、G6805-2型电针治疗仪、日产OLMPUS光学显微镜、HPIAS-1000多媒体彩色病理图文分析系统、Morris水迷宫(中国医学科学院研制)。

1.3 PD大鼠模型制作 10%水合氯醛($4\text{ml}/\text{kg}$)腹腔注射麻醉后,头部固定在脑立体定位仪上,以活力碘消毒手术区皮肤,于颅部正中矢状线切开头皮和筋膜,使前囟充分暴露,参照文献^[1]确定右侧中脑黑质两点注射坐标:第一点为前囟前 0.8mm ,中线右 3.0mm ,硬膜下 4.5mm ,第二点为前囟后 0.2mm ,中线右 2.6mm ,硬膜下 6.0mm ,用牙科钻颅骨钻孔(直径约 1mm),用微量注射器向每点内注射 $5\mu\text{L}$ 。具体方法:用微量注射器抽取 $5\mu\text{L}$ 6-OHDA($3\mu\text{g}/\mu\text{L}$,内含 0.2% VitC)缓慢进针,注射速度为 $0.5\mu\text{L}/\text{min}$,注射完毕,停针 10min ,按 $1.0\text{mm}/\text{min}$ 速度缓慢拔针,明胶海绵填塞颅骨孔,缝合皮肤,腹腔注射青霉素8万单位以防感染。假手术组注射等量生理盐水(内含 0.2% VitC)。

※基金项目 国家自然科学基金项目(No:30973787)

* 作者简介 黄攀攀,女,讲师,在读博士研究生。研究方向:针灸防治脑病。

● 作者单位 湖北中医药大学针灸骨伤学院(430065)

1.4 模型评价 术后2w,给造模大鼠腹腔注射 APO (0.5mg/kg),诱发大鼠旋转,以超过7转/min为成功PD模型。

电针组:造模成功后,参照华兴邦方法^[2]取双侧风府穴、太冲穴。风府穴用普通28号1寸不锈钢毫针针刺,深度8mm;太冲穴用普通28号0.5寸不锈钢毫针针刺,深度为4mm。针刺后接G6805-2型电针治疗仪(同侧太冲与风府连接一对电极),连续波,频率100Hz,强度0.5mA,治疗留针30min,每天1次,6d为1疗程,疗程间隔1天,治疗4疗程。正常组、模型组,不行针刺治疗,同步喂养。美多芭组按照0.5片/只/d标准,将美多芭片研磨成粉末后,纯净水灌胃。

1.5 学习记忆能力检测 定位航行实验:将大鼠面向池壁分四个象限放入水中,记录其在2min内寻找到平台的时间(逃避潜伏期),历时4d。空间探索实验:第5d撤除平台,将大鼠任选1个人入水点放入,记录其2min内跨越原平台位置的次数。

1.6 样本的采集 学习记忆能力检测结束后,大鼠称重,腹腔注射10%水合氯醛(10ml/kg)麻醉,剪开胸壁,暴露心脏。剪开左心室和右心耳,从左心室插入灌胃针至升主动脉腔内约0.5cm。150ml生理盐水(20℃)心脏快速灌注约15min。以4%多聚甲醛溶液300ml灌注约30min内固定。取脑,放入4%的多聚甲醛溶液中固定48h,取中脑黑质脑组织。自来水冲洗12小时,经70%、80%、95%酒精梯度脱水各12小时,正丁醇脱水6小时。取出组织,低温(60℃)浸蜡过夜,包埋、连续切片,片厚6-8μm,切片每隔3张取1张。

1.7 BDNF检测 采用免疫组化SABC法,严格按照试剂盒说明书操作。

1.8 图象采集 每组取10份标本,各随机取3个视野,显微镜下观察,采用HPIAS-1000多媒体彩色病理图文分析系统,对免疫组化BDNF阳性细胞(细胞染色呈棕色)进行计数。

1.9 统计学处理 实验结果以($\bar{x} \pm s$)表示,采用SPSS17.0软件包进行多个均数之间两两比较的q检验。

2 结果

2.1 电针对PD模型大鼠学习记忆能力的影响 为分析信息获取能力,测量了4d训练的总潜伏期和训练末2d的后潜伏期。如表1所示,模型组大鼠潜伏期较正常对照组大鼠潜伏期时间明显延长($P <$

0.01);经过治疗后,电针组、美多芭组与模型组比较,4d潜伏期和2d潜伏期时间明显缩短($P <$ 0.01)。

表1 大鼠定位航行实验4d和后2d平均潜伏期结果($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	n	4天潜伏期	2天潜伏期
正常对照组	10	49.7 ± 4.3	13.9 ± 1.6
模型组	10	107.3 ± 14.1 ^{△△}	93.5 ± 10.4 ^{△△}
电针组	10	83.5 ± 8.2 ^{△△**}	73.7 ± 8.2 ^{△△**}
美多芭组	10	87.2 ± 8.7 ^{△△**}	74.5 ± 7.6 ^{△△**}

注:与正常对照组比较,△△ $P <$ 0.01;与模型组比较,* $P <$ 0.01。

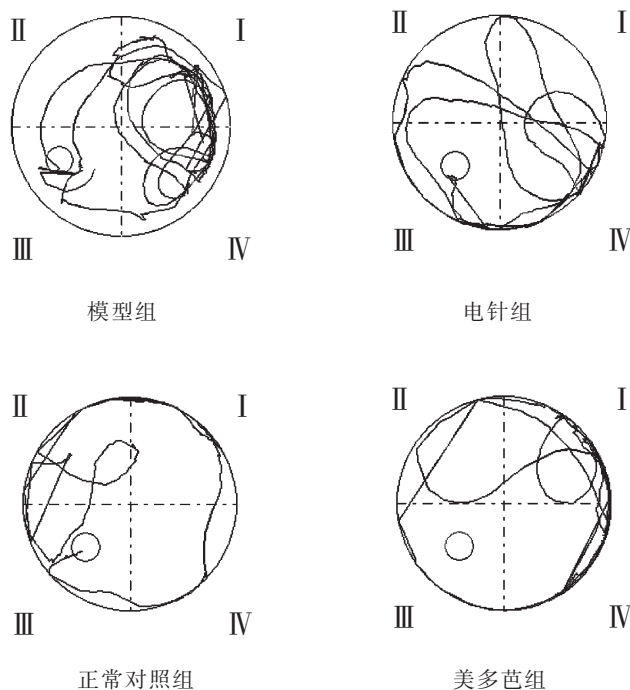


图1 各组大鼠空间探索实验游泳轨迹图

2.2 电针对PD模型大鼠BDNF的影响 模型组BDNF免疫组化阳性细胞计数较正常组显著减少, $P <$ 0.01;电针组阳性细胞计数较模型组增加, $P <$ 0.01,但电针组阳性细胞计数与美多芭组比较增加,无显著性意义。

表2 各组大鼠BDNF阳性细胞计数结果($\bar{x} \pm s, \text{个}$)

组别	n	BDNF($\bar{x} \pm s, \text{个}$)
正常对照组	10	67.59 ± 4.33
模型组	10	35.48 ± 2.67 ^{△△}
电针组	10	41.57 ± 2.87 ^{**△△}
美多芭组	10	41.36 ± 4.65

注:与正常对照组相比,△△ $P <$ 0.01,与模型组比较,* $P <$ 0.01,与美多芭组比较,▲ $P >$ 0.05。

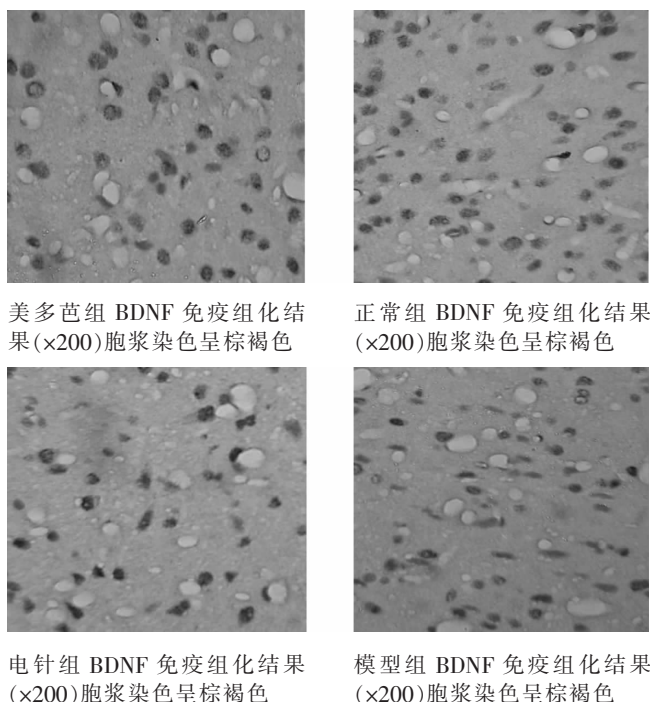


图2 各组中脑黑质 BDNF 阳性神经元的表达

3 讨论

帕金森病属中医“痉证”范畴,祖国医学认为本病是风邪作祟所致,“风气内动”是本病病机关键,主病在肝,病位在脑。通调脑络,熄风止颤、柔肝舒筋为本病的治疗原则。太冲为足厥阴肝经原穴,善治肝病病变,具有熄风止颤、柔肝舒筋之功,如《行针指要赋》云:“且如行步难移,太冲最奇”;风府位于督脉之上,为督脉、阳维脉的交会穴,亦为督脉由此入络脑的穴位,具有祛风、通调脑络之功。《行针指要赋》曰:“或针风,先向风府……”。太冲、风府两穴相配,一者治肝一者治脑,一者治其本,一者治其标,可达通调脑络,熄风止颤,柔肝舒筋之功。

脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)是近年来引起科学家们十分关注的特异蛋白质分子, BDNF 能促进中枢神经系统多巴胺能神经元的存活及分化^[3-4],并能够刺激胚胎大脑皮层多巴胺能神经元的表达。本课题组在前期研究工作中已经证实,多巴胺神经元凋亡参与了帕金森病的发生,针刺可减少帕金森病模型大鼠黑质多巴胺神经元凋亡^[5-7]。针刺对帕金森病模型大鼠 BDNF 影响如何? 本实验通过针刺太冲、风府两穴位,结果显示模型组大鼠 BDNF 较正常对照组显著减少,经过针刺风府、太冲穴治疗后,电针组 BDNF 较模型组显著增加,提示电针可提高帕金森大鼠黑质 BDNF 的表达。

目前,多项研究证实 BDNF 促进学习记忆能力的提

高可能与突触传递长时程增强有关^[8],如在学习记忆的相关脑区可见突出可塑性的形成、改变突触可塑性形成机制、诱导或增强突出可塑性可促进或易化学学习记忆等。Mertz 研究证实 BDNF 能促进突触的可塑性,改变脑内神经元的形态,增加突触终末的密度和促进树突和轴突的生长^[9];Kojima 的研究表明 BDNF 是以活性依赖的方式在突触局部快速释放,从而为 BDNF 参与突触可塑性提供了有力证据^[10]。Dragunow 证实 BDNF 和其受体 trkB 诱导海马颗粒细胞产生持久的突触长时程增强,表明它们在记忆形成中起着重要作用^[11]。本实验结果显示,电针组学习记忆能力较模型组显著提高,提示针刺可显著提高帕金森病模型大鼠学习记忆能力,推测其机制可能与针刺提高大鼠 BDNF 表达有关。

但目前针刺促进帕金森病脑内 BDNF 的表达及其生物学作用的确切机制仍不清楚,对于帕金森病中 BDNF 表达的生物学作用的进一步研究,将为其应用于临床提供重要的理论依据。

参考文献

- [1] Ungerstedt DA, Ulman J, Viola J, et al. 6-OHDA induced selective parkinsonian rat model[J]. Brain Res, 1989, 494: 285.
- [2] 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.
- [3] Zhou J, Bradford HF, Stern GM, et al. The response of human and rat fetal ventral mesencephalon in culture to the brain derived neurotrophic factor treatment[J]. Brain Res, 1994, 656: 147-156.
- [4] AlonsoVanegas MA, Fawcett JP, Causing CG, et al. Characterization of dopaminergic midbrain neurons in a DBH:BDNF transgenic mouse. J Comp Neurol, 1999, 413: 449-462.
- [5] 马骏, 王彦春, 甘水咏. 电针治疗对帕金森病大鼠多巴胺能神经元的影响[J]. 中华物理医学与康复杂志, 2006, 28(4): 230-232.
- [6] 马骏, 王彦春, 甘水咏. 电针风府穴、太冲穴对 PD 大鼠黑质神经元凋亡的影响[J]. 湖北中医杂志, 2003, 25(11): 5-6.
- [7] 马骏, 朱书秀, 王彦春等. 电针对帕金森病模型大鼠黑质多巴胺能神经元凋亡的影响[J]. 上海针灸杂志, 2005, 24(10): 36-38.
- [8] Ype E, Alcino J S. Molecular mechanisms of synaptic plasticity and memory[J]. Curr Opin Neurobiol, 1999, (9): 209-213.
- [9] Mertz K, Koscheck T, Sehillig K. Brain derived neurotrophic factor modulates dendritic morphology of cerebellar basket and stellate cells. *In vitro* study. Neuro Science, 2000, 97(2): 303-310.
- [10] Kojima M, Takei N, Numakawa T, et al. Biological characterization and optical imaging of brain-derived neurotrophic factor green fluorescent protein suggest an activity-dependent local release of brain-derived neurotrophic factor in neurites of cultured hippocampal neurons[J]. J Neurosci Res, 2001, 64(1): 1-10.
- [11] Dragunow M, Hughes P, Mason Parker SE, et al. TrkB expression in dentate granule cells is associated with a late phase of long-term potentiation[J]. Mol Brain Res, 1997, 46: 274-280.