

· 研究简报 ·

电针联合丹酚酸 B 治疗对衰老模型大鼠记忆障碍的影响

吴甜莺 张雄 郑永克 王一栋 潘静 陈艳

【摘要】目的 观察电针联合丹酚酸 B 治疗对衰老模型大鼠学习记忆障碍及海马细胞因子含量的影响,并探讨其改善记忆功能的相关机制。**方法** 采用随机数字表法将 Wistar 大鼠分成正常对照组、模型组、电针组、丹酚酸 B 组及联合治疗组。采用腹腔注射 D-半乳糖方法将模型组、电针组、丹酚酸 B 组及联合治疗组大鼠制成记忆障碍衰老动物模型。电针组大鼠于造模第 20 天时开始介入电针治疗,丹酚酸 B 组大鼠于造模第 20 天时开始按 50 mg/kg 体重给予丹酚酸 B 灌胃,联合治疗组大鼠则在给予丹酚酸 B 灌胃后辅以电针治疗。经 20 天治疗后采用 Morris 水迷宫观察各组大鼠行为学变化,采用放射免疫分析法检测各组大鼠海马部位白介素(IL)-1 β 、IL-6 和肿瘤坏死因子(TNF)- α 含量。**结果** 与正常对照组比较,模型组大鼠 Morris 水迷宫逃避潜伏期明显延长,而游泳距离百分比明显减少;与模型组比较,电针组、丹酚酸 B 组和联合治疗组逃避潜伏期均显著缩短,游泳距离百分比则明显增大。与正常对照组比较,模型组大鼠海马 IL-1 β 、TNF- α 含量明显增高,IL-6 含量明显降低;与模型组比较,电针组、丹酚酸 B 组及联合治疗组大鼠海马 IL-1 β 、TNF- α 含量均明显降低,丹酚酸 B 组和联合治疗组 IL-6 含量均显著增高。**结论** 电针和/或丹酚酸 B 治疗均对衰老模型大鼠海马 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 含量有不同程度调节作用,有助于抑制由 D-半乳糖引发的中枢神经系统免疫炎症反应,并且以电针联合丹酚酸 B 在改善大鼠学习记忆方面的作用较显著。

【关键词】 电针; 丹酚酸 B; 记忆障碍; 海马细胞因子

学习及记忆能力减退是脑衰老重要表现之一,其发生机制目前尚未明确。中药丹参中所富含的酚酸类化合物具有很强抑制脂质过氧化、清除超氧阴离子及羟基自由基作用,其中又以丹酚酸 B 活性最强,在治疗神经退行性疾病方面具有重要作用^[1-4]。近年来国内学者通过注射 D-半乳糖制作学习记忆障碍动物模型,并发现电针刺激对大鼠学习记忆障碍具有改善作用^[5-6]。基于上述背景,本研究联合采用电针及丹酚酸 B 治疗衰老模型大鼠,并观察对大鼠学习记忆功能及海马组织中白介素-1 β (interleukin 1 β , IL-1 β)、白介素-6(IL-6)及肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factors- α , TNF- α)含量的影响,从而探讨改善大鼠学习记忆功能的相关机制。现报道如下。

材料与方法

一、主要实验试剂及实验动物

丹酚酸 B 购自中国食品药品检定研究院,采用 1% 羧甲基纤维素钠蒸馏水溶液将其配成浓度为 15 mg/ml 悬浮液;D-半乳糖购自上海研域生物科技有限公司,使用时将其溶解于无菌生理盐水中,浓度为 20 mg/ml;IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 检测试剂盒为南京建成生物工程中心产品。本研究实验用雄性 Wistar 大鼠由温州医科大学实验动物中心提供,大鼠体重(180 \pm 20)g,均饲养于 12 h 光照/12 h 黑暗环境中,饲养期间大鼠自由摄食、饮水,经适应性喂养 3 d 后进行实验。

二、分组及处理

采用随机数字表法将上述 50 只 Wistar 大鼠分为正常对照组、模型组、电针组、丹酚酸 B 组及联合治疗组,每组 10 只大鼠。采用 D-半乳糖按 100 mg/kg 体重对模型组、电针组、丹酚酸 B 组及联合治疗组大鼠进行腹腔注射,持续注射 30 d;正常对照组大鼠则每天注射等量生理盐水。从制模第 20 天开始,电针组采用 32 号针灸针对其百会穴进行针刺,进针 0.3~0.5 cm,然后接通 G6805-H 型电针治疗仪(上海产),电刺激频率 3 Hz,连续波,脉宽 250~350 ms,电刺激强度以大鼠肢体轻微抖动为度(此时电流强度约为 1 mA),持续治疗 20 min,隔天治疗 1 次,共治疗 20 d。丹酚酸 B 组则同期于腹腔注射 D-半乳糖后按 50 mg/kg 体重进行丹酚酸 B 灌胃,每天灌胃 1 次,持续治疗 20 d。联合治疗组大鼠于 D-半乳糖腹腔注射和丹酚酸 B 灌胃 1 h 后进行电针治疗,D-半乳糖、丹酚酸 B 用法及用量均与模型组及丹酚酸 B 组相同,电针治疗方法与电针组相同。

三、水迷宫检测

各组大鼠于 20 d 干预结束后对其进行 Morris 水迷宫测试, Morris 水迷宫由不锈钢圆形水池(直径 100 cm,水深 50 cm)和可移动平台组成。测试前向水池内注满清水,并加入少许墨汁使水呈不透明状,水温控制在(23 \pm 2) $^{\circ}$ C,水池被分为 4 个象限,每个象限池壁上贴有不同形状标志作为参照物,将平台随机置于其中一个象限中,平台平面低于水面 2 cm。定位航行试验:连续训练 4 d,每天训练 2 次,中间间隔 8 h,每次训练分 2 个部分,分别从 2 个象限入水点将大鼠面向池壁放入水中,记录大鼠在水中寻找并爬上平台所需时间,即逃避潜伏期;如果大鼠在 60 s 内找不到平台,则将其引导至平台上并停留 30 s,此时逃避潜伏期计为 60 s。空间探索试验:待 4 d 定位航行试验结束后撤除平台,将大鼠置入原先平台所在区域对侧象限内,统计 120 s 内大鼠在原平台所在象限游泳距离占总游泳距离的百分

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2015.06.020

作者单位:325000 温州,温州医科大学定理临床学院、温州市中心医院干部健康科(吴甜莺、郑永克、王一栋、潘静、陈艳);温州医科大学附属第二医院神经内科(张雄)

通信作者:张雄,Email:zhangxiang98@gmail.com

比,同时计算大鼠在原平台所在象限游泳时间占总游泳时间的百分比。

四、海马细胞因子检测

待水迷宫测试结束后,各组大鼠经 20% 乌拉坦(约 1.5 g)麻醉后迅速断头、处死,剥离出脑组织,在冰浴中迅速分离海马组织并制备组织匀浆,经离心(3000 r/min) 15 min 后吸取上清液,采用放射免疫分析法检测各组大鼠海马样本中 IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 细胞因子含量,具体检测步骤严格参照试剂盒说明书进行。

五、统计学分析

本研究所得计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 17.0 版统计学软件包进行数据分析,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

结 果

一、各组大鼠定位航行试验结果比较

各组大鼠定位航行试验结果详见表 1,表中数据显示,各组大鼠逃避潜伏期随着游泳天数增加而缩短,提示各组大鼠在 4 d 训练期间对于平台位置均有一定学习记忆能力,但各组大鼠学习记忆能力间存在较大差异,如训练第 2 天及第 3 天时,发现模型组大鼠逃避潜伏期均较正常对照组显著延长($P < 0.05$);电针组及丹酚酸 B 组大鼠逃避潜伏期均较模型组明显缩短($P < 0.05$),联合治疗组大鼠逃避潜伏期亦显著短于电针组及丹酚酸 B 组($P < 0.05$)。

表 1 各组大鼠定位航行试验-平均逃避潜伏期比较 ($s, \bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天
正常对照组	10	38.27 \pm 11.10	10.72 \pm 3.13	8.58 \pm 2.20	7.53 \pm 1.80
模型组	10	41.31 \pm 10.27	21.83 \pm 5.80 ^a	16.45 \pm 6.15 ^a	9.73 \pm 4.55
电针组	10	33.25 \pm 8.10	16.75 \pm 8.66 ^c	9.77 \pm 4.16 ^{bc}	7.47 \pm 3.29
丹酚酸 B 组	10	34.65 \pm 9.15	12.38 \pm 6.21 ^{bc}	9.73 \pm 2.80 ^{bc}	8.65 \pm 3.25
联合治疗组	10	39.75 \pm 6.10	11.55 \pm 4.15 ^b	8.88 \pm 1.80 ^b	8.63 \pm 1.20

注:与正常对照组相同时间点比较,^a $P < 0.05$;与模型组相同时间点比较,^b $P < 0.05$;与联合治疗组相同时间点比较,^c $P < 0.05$

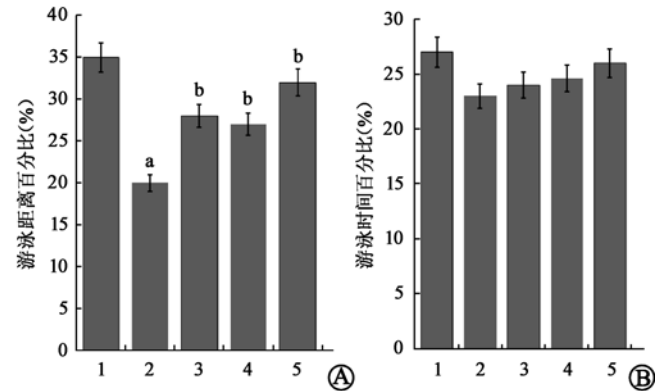
二、各组大鼠空间探索试验结果比较

正常对照组大鼠对原水下平台位置一般均有所记忆,该组大鼠会在原平台位置附近反复搜寻多次,其在原平台附近停留时间较长,表现出寻找原水下平台的目的性、针对性较强。模型组与正常对照组比较,前者穿越原平台所在象限的距离占总游泳距离百分比明显减少($P < 0.05$),同时时间百分比亦有减少趋势($P < 0.05$),表明衰老模型大鼠记忆保持能力下降。与模型组比较,电针组、丹酚酸 B 组以及联合治疗组大鼠游泳距离百分比和游泳时间百分比均显著增加($P < 0.05$),但电针组、丹酚酸 B 组以及联合治疗组游泳距离百分比及游泳时间百分比组间差异均无统计学意义($P > 0.05$)。具体情况见图 1。

三、治疗后各组大鼠海马细胞因子含量比较

与正常对照组比较,模型组大鼠海马部位 IL-1 β 、TNF- α 含量均显著增高($P < 0.05$),IL-6 含量则明显降低($P < 0.05$)。电针组、丹酚酸 B 组及联合治疗组大鼠海马部位 IL-1 β 含量均较模型组明显降低($P < 0.05$);丹酚酸 B 组和联合治疗组 IL-6

含量均较模型组明显增高($P < 0.05$);电针组、丹酚酸 B 组及联合治疗组 TNF- α 含量均较模型组明显降低($P < 0.05$)。上述结果提示电针、丹酚酸 B 对衰老模型大鼠(由 D-半乳糖诱发)海马细胞因子均有不同程度调节作用。



注:图 1A 为各组大鼠游泳距离百分比;图 1B 为各组大鼠游泳时间百分比;1 为正常对照组,2 为模型组,3 为电针组,4 为丹酚酸 B 组,5 为联合治疗组;与正常对照组比较,^a $P < 0.05$;与模型组比较,^b $P < 0.05$

图 1 各组大鼠空间探索试验结果比较

表 2 各组大鼠海马 IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 含量比较 (pg/mg, $\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	IL-1 β	IL-6	TNF- α
正常对照组	10	0.27 \pm 0.060	456.27 \pm 53.13	7.58 \pm 2.20
模型组	10	0.31 \pm 0.027 ^a	341.83 \pm 35.08 ^a	8.65 \pm 6.15 ^a
电针组	10	0.25 \pm 0.081 ^b	367.75 \pm 48.96	7.77 \pm 4.16 ^b
丹酚酸 B 组	10	0.30 \pm 0.052 ^b	412.38 \pm 46.23 ^b	7.73 \pm 2.80 ^b
联合治疗组	10	0.29 \pm 0.060 ^b	438.55 \pm 54.15 ^b	6.88 \pm 1.80 ^b

注:与正常对照组相同时间点比较,^a $P < 0.05$;与模型组相同时间点比较,^b $P < 0.05$

讨 论

相关免疫衰老假说认为,机体免疫功能与人类衰老密切相关,脑衰老可能涉及中枢神经系统内免疫活性细胞过度激活而诱发的免疫炎症反应,其病灶周围存在大量激活的小胶质细胞和星形细胞,能产生大量补体、炎症细胞因子、急性期炎症反应物等,从而导致神经细胞受损、破坏和死亡^[7]。在正常情况下,细胞因子参与神经系统发育、脑损伤修复及自身免疫过程,但在许多病理环境下,一旦细胞因子级联反应被启动,通过自分泌或与其它细胞因子相互作用产生大量细胞因子,则可影响神经系统功能,甚至导致神经系统损伤^[8-10]。

IL-1 β 和 TNF- α 是典型的促炎细胞因子,近年来研究发现中枢内这些促炎细胞因子能影响机体认知功能,并参与阿尔茨海默病以及应激认知功能受损的发病过程^[11]。本研究通过检查发现,模型组大鼠制模后其 IL-1 β 、TNF- α 含量升高,IL-6 含量下降,提示 D-半乳糖对大鼠记忆功能的损伤机制可能与上调海马组织内 IL-1 β 、TNF- α 含量而发挥神经毒性作用有关。

丹酚酸 B 为丹参的有效水溶性成分,具有保护心肌、抗纤维化、抗肿瘤等多种药理作用,还能明显抑制脑缺血再灌注导

致的线粒体损伤、神经细胞凋亡等^[12]。另有大量文献报道,电针对治疗衰老也具有一定疗效^[13]。本研究结果也显示,电针或丹酚酸 B 干预均能不同程度改善记忆障碍大鼠行为学功能,提高其学习能力,并且以电针联合丹酚酸 B 的治疗作用较显著,提示两者联用具有协同作用。为进一步探讨其作用机制,本研究通过放射免疫分析法检测各组大鼠海马细胞因子发现,电针和/或丹酚酸 B 干预均能不同程度下调衰老大鼠海马组织内 IL-1 β 、TNF- α 含量、上调 IL-6 含量,从而减少海马部位 IL-1 β 、TNF- α 神经毒性;而 IL-6 作为抗炎细胞因子,其表达增加有助于发挥神经保护作用。

综上所述,本研究结果表明,电针和/或丹酚酸 B 治疗均可抑制 D-半乳糖诱发衰老模型大鼠中枢神经系统免疫炎症反应,从而改善其学习记忆能力;并且以电针联合丹酚酸 B 治疗对 IL-6 及 TNF- α 的调节作用较显著,其疗效明显优于单纯电针或丹酚酸 B 治疗;关于电针联合丹酚酸 B 治疗记忆障碍的确切作用机制及中枢细胞因子在认知中的作用还需继续深入研究。

参 考 文 献

- [1] McCarthy RC, Kosman DJ. Activation of C6 glioblastoma cell ceruloplasmin expression by neighboring human brain endothelia-derived interleukins in an in vitro blood-brain barrier model system[J]. Cell Commun Signal, 2014, 12(1): 65.
- [2] Xu S, Zhong A, Bu X, et al. Salvianolic acid B inhibits platelets-mediated inflammatory response in vascular endothelial cells[J]. Thromb Res, 2015, 135(1): 137-145.
- [3] Huang M, Wang P, Xu S, et al. Biological activities of salvianolic acid B from *Salvia miltiorrhiza* on type 2 diabetes induced by high-fat diet and streptozotocin[J]. Pharm Biol, 2015, 23(1): 1-8.

- [4] Bi XB, Deng YB, Gan DH, et al. Salvianolic acid B promotes survival of transplanted mesenchymal stem cells in spinal cord-injured rats[J]. Acta Pharmacol Sin, 2008, 29(2): 169-176.
- [5] 张志雄,原淑娟,吴定宗. 电针对 D-半乳糖所致大鼠空间学习记忆障碍及海马齿状回 LTP 诱导的干预作用[J]. 针刺研究, 2001, 26(4): 247-252.
- [6] 原淑娟,张志雄,邱虹,等. 电针对半乳糖所致大鼠空间学习记忆障碍及突触结构改变的干预作用[J]. 江苏中医, 2001, 22(7): 39-41.
- [7] Rodríguez-Carrio J, Alperi-López M, López P, et al. TNF- α polymorphism as marker of immunosenescence for rheumatoid arthritis patients[J]. Exp Gerontol, 2015, 61(1): 123-129.
- [8] Rivera-Cervantes MC, Castañeda-Arellano R, Castro-Torres RD, et al. P38 MAPK inhibition protects against glutamate neurotoxicity and modifies NMDA and AMPA receptor subunit expression[J]. J Mol Neurosci, 2015, 55(3): 596-608.
- [9] 梁英武,王朝晖. 细胞因子在中枢神经系统中的作用[J]. 国外医学儿科学分册, 1994, 21(3): 136-139.
- [10] Mackenzie IR. Anti-inflammatory drugs and Alzheimer-type pathology in aging[J]. Neurology, 2000, 54(3): 732-734.
- [11] 徐静,万燕杰,曾因明. 中枢炎性细胞因子与认知功能损害[J]. 国外医学麻醉学与复苏分册, 2005, 24(2): 105-107.
- [12] 湛月娥,徐江平. 丹酚酸 B 药理作用的研究进展[J]. 华南国防医学杂志, 2007, 21(2): 37-39.
- [13] 李佳,刘建民,刘溪泉,等. 电针强壮穴对亚急性衰老大鼠神经免疫调节的影响[J]. 中国针灸, 2009, 28(11): 905-909.

(修回日期:2015-03-20)

(本文编辑:易 浩)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

本刊对来稿中统计学处理的有关要求

1. 统计研究设计:应交代统计研究设计的名称和主要做法。如调查设计(分为前瞻性、回顾性或横断面调查研究);实验设计(应交代具体的设计类型,如自身配对设计、成组设计、交叉设计、析因设计、正交设计等);临床试验设计(应交代属于第几期临床试验,采用了何种盲法措施等)。主要做法应围绕 4 个基本原则(随机、对照、重复、均衡)概要说明,尤其要交代如何控制重要非试验因素的干扰和影响。

2. 资料的表达与描述:用($\bar{x} \pm s$)表达近似服从正态分布的定量资料,用 $M(Q_R)$ 表达呈偏态分布的定量资料;用统计表时,要合理安排纵横标目,并将数据的含义表达清楚;用统计图时,所用统计图的类型应与资料性质相匹配,并使数轴上刻度值的标法符合数学原则;用相对数时,分母不宜小于 20,要注意区分百分率与百分比。

3. 统计分析方法的选择:对于定量资料,应根据所采用的设计类型、资料所具备的条件和分析目的,选用合适的统计分析方法,不应盲目套用 t 检验和单因素方差分析;对于定性资料,应根据所采用的设计类型、定性变量的性质和频数所具备的条件以及分析目的,选用合适的统计分析方法,不应盲目套用 χ^2 检验。对于回归分析,应结合专业知识和散点图,选用合适的回归类型,不应盲目套用简单直线回归分析,对具有重复实验数据的回归分析资料,不应简单化处理;对于多因素、多指标资料,要在一元分析的基础上,尽可能运用多元统计分析方法,以便对因素之间的交互作用和多指标之间的内在联系进行全面、合理的解释和评价。

4. 统计结果的解释和表达:当 $P < 0.05$ (或 $P < 0.01$) 时,应说明对比组之间的差异有统计学意义,而不应说对比组之间具有显著性(或非常显著性)的差别;应写明所用统计分析方法的具体名称(如:成组设计资料的 t 检验、两因素析因设计资料的方差分析、多个均数之间两两比较的 q 检验等),统计量的具体值(如 $t = 3.45$, $\chi^2 = 4.68$, $F = 6.79$ 等),应尽可能给出具体的 P 值(如 $P = 0.0238$);当涉及到总体参数(如总体均数、总体率等)时,在给出显著性检验结果的同时,再给出 95% 可信区间。