

# 观察电针“百会”、“涌泉”两穴对不同月龄 APP/PS1 双转基因小鼠海马 A $\beta$ 淀粉样沉淀及超微结构的影响

加吾拉·阿不力孜 王鑫 李芙 白杨 姚海江 莫雨平 周源 许红 毛颖秋  
高誉珊 张伟 张忠 李志刚 薛卫国

**【摘要】 目的** 观察电针“百会”、“涌泉”两穴对 5 月龄和 10 月龄淀粉样前体蛋白/早老蛋白 1 (amyloid precursor protein/presenilin-1, APP/PS1) 双转基因鼠海马  $\beta$  淀粉样蛋白 (Amyloid  $\beta$  Protein, A $\beta$ ) 沉积及超微结构的影响。**方法** 分别将 4 月龄和 9 月龄的 APP/PS1 双转基因小鼠按随机分配法分为模型组、电针组和药物组,以相同月龄同窝阴性小鼠作为对照组,4 月龄每组 12 只,9 月龄每组 11 只。电针组取“百会”、“涌泉”两穴,每次留针时间为 15 分钟,隔日 1 次,治疗 5 周;药物组予多奈哌唑片 0.92 mL/g 灌胃,取脑透射电镜片并观察。**结果** 5 月龄透射电镜结果显示:在微血管、神经元突触及神经元超微结构上对照组优于模型组。10 月龄透射电镜结果显示:模型组海马出现 A $\beta$  淀粉样沉淀——老年斑。**结论** 5 月龄小鼠行为学出现阿尔茨海默病样改变;10 月龄 APP/PS1 双转基因小鼠海马出现老年斑;电针治疗 APP/PS1 双转基因小鼠可能对海马超微结构有保护作用。

**【关键词】** 阿尔茨海默症; 淀粉样前体蛋白/早老蛋白 1; 海马; 超微结构; 电针

**【中图分类号】** R245 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2015.05.002

**Effect of electro-acupuncture intervention on hippocampus A $\beta$  stain and ultrastructure in APP/PS1 double transgenic rats** Jiawula · Abulizi, WANG Xin, LI Fu, et al. School of Acupuncture-moxibustion and Tuina, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

Corresponding author: LI Zhi-gang, E-mail: lizhigang620@126.com; XUE Wei-guo, E-mail: snowmanxue@163.com

**【Abstract】 Objective** To observe the influence of electro-acupuncture(EA) at “Baihui”(GV20) and “Yongquan”(KI1) on hippocampal A $\beta$  stain and ultrastructure in 5-month-old and 9-month-old APP/PS1 double transgenic rat. **Methods** 4-month-old and 9-month-old APP/PS1 double transgenic rats were according to the random assignment method divided into model group, EA group and drug (AChE) group and drug group with 12 rats each in 4-month-old groups and 11 rats each in 9-month-old groups, and the same months old rats with brood recessive gene were set as control group. Treatment was applied to “Baihui”(GV20) and “Yongquan”(KI1) for 15 mins, once every 2 days for 5 weeks; For the drug group,

基金项目:国家自然科学基金(81273826)

作者单位:100029 北京中医药大学针灸推拿学院[加吾拉·阿不力孜(博士研究生)、王鑫(博士研究生)、李芙(硕士研究生)、白杨(硕士研究生)、姚海江(博士研究生)、莫雨平(博士研究生)、周源(硕士研究生)、李志刚、薛卫国],基础医学院(许红、高誉珊、张忠),科研实验中心(毛颖秋、张伟)

作者简介:加吾拉·阿不力孜(1986-),2012 级在读博士研究生。研究方向:针刺手法及针刺干预中枢神经损伤的机理研究。E-mail: jack47656@hotmail.com

通讯作者:李志刚(1965-),博士,教授,博士生导师。研究方向:针刺手法及针刺干预中枢神经损伤的机理研究。E-mail: lizhigang620@126.com;薛卫国(1968-),博士,副教授,硕士生导师。研究方向:针刺治疗阿尔茨海默病的机制研究。E-mail: snowmanxue@163.com。李志刚和薛卫国并列为本文通讯作者。

0.92 mL/g of acetylcholine enzyme was given by gavage, once a day. Rat brains were taken to make transmission electric lens for observation. **Results** On transmission electron microscopy (sem) results showed that in 5-month-old rats, the capillaries, synapses and ultrastructure of neurons in the control group were better than the model group. In 10-month-old rats, there was senile plaque in the model group. Conclusion Alzheimer's disease-like behavior appeared in 5-month-old rats. Senile plaque in hippocampus appeared in 10-month-old APP/PS1 double transgenic rats. EA therapy might improve the hippocampus microstructure in APP/PS1 double transgenic rats.

**【Key words】** Alzheimer's disease; Amyloid precursor protein/presenilin-1; Hippocampus; Ultrastructure; Electro-acupuncture

阿尔茨海默症 (Alzheimer's disease, AD) 多发于老年,以近期记忆障碍为主要临床症状,老年斑、神经元纤维缠结和神经元丢失为主要病理改变的进行性神经变性疾病。 $\beta$  淀粉样蛋白 (Amyloid  $\beta$  Protein, A $\beta$ ) 被认为是导致 AD 发病的重要原因<sup>[1]</sup>。淀粉样肽瀑流学说:此项学说强调 A $\beta$  聚集在导致老年斑形成、突触减少、神经功能失调、神经元死亡以及有临床症状的痴呆上起到关键作用,聚集可形成神经毒素的原纤维,并进而组成阿尔茨海默病的病理特征之一老年斑<sup>[2]</sup>。A $\beta$  为生理条件下的正常代谢产物,不断产生又迅速被清除,但当发生遗传或环境因素变化导致如淀粉样前体蛋白 (amyloid precursor protein, APP) 和早老蛋白 1 (presenilin-1, PS1) 或者 PS2 基因突变,导致 A $\beta$  产生增加沉积形成老年斑,即可诱发 AD。课题组以有毒 A $\beta$ 1-42 在海马的表达为切入点,研究电针对有毒 A $\beta$ 1-42 在海马沉积的影响,探讨电针对脑海马宏观和微观结构的作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物及分组

SPF 级健康雄性 4 月龄和 9 月龄 APP/PS1 双转基因小鼠分别为 36 只和 33 只,随机分为模型组、药物组和电针组,4 月龄每组 12 只,9 月龄每组 11 只。相同月龄同窝阴性小鼠分别 12、11 只作为对照组。实验动物皆购自南京大学模式动物研究所,许可证编号:SYXK(苏)2010-003,4 月龄体重( $31.8 \pm 3.5$ )g;10 月龄体重( $42.7 \pm 5.5$ )g。普通小鼠饲料单笼饲养,室温 20~25℃。实验过程中两组电针组各死亡一只小鼠。

### 1.2 主要试剂与仪器

Hans-100A 型韩式电针仪(南京济生医疗有限公司),华佗牌无菌针灸针(0.18 mm × 13 mm),Olympus BX5 显微镜,日本尼康 NIS-Elements 图像分

析系统;JEM1230 型透射电镜(日本电子公司)。Abcam A $\beta$  抗体(ab10148),超敏试剂盒(兔),DAB 显色试剂盒,PBS 磷酸盐缓冲液,戊二醛溶液,鹅酸,丙酮溶液,SPI 树脂套装,硝酸铅,柠檬酸钠,醋酸双氧铀等。

### 1.3 针刺方法

电针组将小鼠以自制鼠袋固定,按照小鼠针灸穴位图谱及比较解剖学方法,取“百会”、“涌泉”两穴。穴位与针具常规消毒后,刺入 2~3 mm。在两“涌泉”穴接 HANs-100 电针仪,采用疏密波,频率为 2/100 Hz,强度 1 mA,以小鼠足趾收缩但不挣扎嘶叫为度。针刺时间为 15 分钟,隔日 1 次,治疗 5 周。对照组、模型组予相同规格鼠套束缚 15 分钟,隔天 1 次,束缚 5 周,不予其他治疗,药物组予多奈哌酮 0.92 mL/g 灌胃,鼠套束缚同对照组。

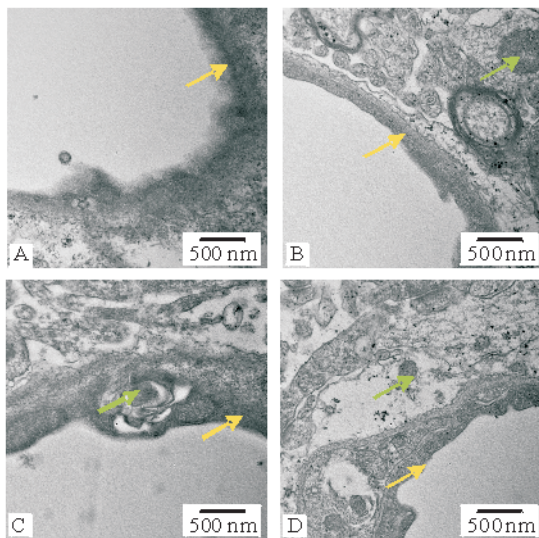
### 1.4 观察指标及检测方法

(1) 取材:两组不同月龄的实验动物经 5 周治疗至分别满 5 月龄和 10 月龄左右后取材。以 10% 水合氯醛(3 mL/kg)进行腹腔注射麻醉。透射电镜片:心脏灌注同上,取脑放入 2.5% 的戊二醛溶液固定 2 小时以上,4℃ 进行固定。(2) 磷酸缓冲液 pH:7.2 冲洗 3 次,每次 10 分钟。(3) 1% 鹅酸室温固定 2 小时。(4) 双蒸水冲洗 3 次,每次 10 分钟。(5) 梯度丙酮脱水:50%—70%—80%—90%—100%,3 次,各 10 分钟。(6) 渗透:812 环氧树脂与 100% 丙酮 1:3 渗透 30 分钟;环氧树脂与 100% 丙酮 1:1 渗透 30 分钟;环氧树脂与 100% 丙酮 3:1 渗透 30 分钟;纯 812 树脂渗透 120 分钟。(7) 纯树脂包埋(Epon812)聚合 37℃ 16 小时;45℃ 24 小时;60℃ 48 小时。(8) 修块。(9) 半博切片;甲苯胺蓝染色 2 分钟,洗净,光镜下定位观察。(10) 2% 醋酸双氧铀染色 25 分钟后,立即冲洗,待铜网干燥无水后,2% 柠檬酸铅染色 5~7 分钟及使用新鲜制备的蒸馏水冲洗干净。(11) 电镜观察;JEM-1230 型透射电镜观察拍照。

## 2 结果

### 2.1 电针对不同月龄 APP/PS1 转基因鼠海马微血管超微结构的影响

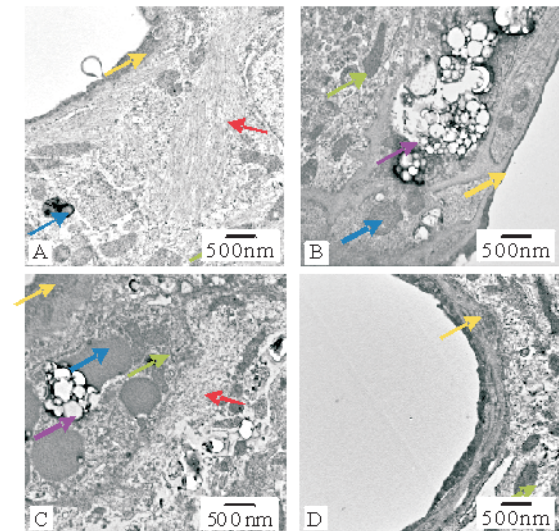
5 月龄小鼠海马微血管(放大 50000 倍):模型组血管基膜增厚,边界模糊结构不清,基膜外出现小量不规则絮状条形物,周围组织排列疏松;电针组血管基膜结构较模型组完整层次清,血管周围结构清晰,但排列不紧密,线粒体结构清晰;药物组血管壁内容物肿胀溶解,血管壁结构层次不清,周围组织排列疏松;对照组血管基膜完整,结构层次清晰,周围组织排列疏松。见图 1。



A 模型组;B 电针组;C 药物组;D 对照组  
注:黄色箭头为血管壁;绿色箭头为线粒体

图 1 5 月龄 APP/PS1 小鼠海马微血管超微结构(×50000)

10 月龄小鼠海马微血管(放大 20000 倍):模型组血管基膜边界不清或溶解,基膜外出现大片不规则絮状条形物,血管壁内容物萎缩,血管内壁轮廓不清或有赘生物,血管壁线粒体结构不清或溶解,血管周围组织结构模糊,细胞排列疏松且结构不清,有次级溶酶体出现;电针组血管基膜完整,内容物出现肿胀但结构清晰,血管壁线粒体结构清晰,可见部分线粒体嵴断裂或溶解,血管内壁出现少许赘生物结构不清,血管周围局部出现次级溶酶体且部分溶解出现脂滴,周围细胞出现溶解;药物组血管壁内容物肿胀结构不清,血管壁线粒体嵴断裂多呈空泡状,血管壁周围出现溶酶体并有溶解形成脂滴,周围还出现不规则絮状条形物;对照组血管基膜完整,线粒体结构层次清晰,血管周围神经毡结构层次清晰,细胞排列紧密有序。见图 2。



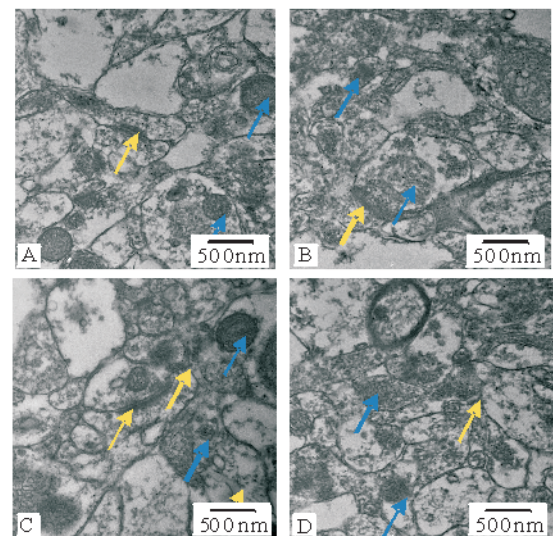
A 模型组;B 电针组;C 药物组;D 对照组

注:黄色箭头为血管壁;红色箭头为不规则絮状条形物;绿色箭头为线粒体;蓝色箭头为溶酶体;紫色箭头为溶酶体中脂滴

图 2 10 月龄 APP/PS1 小鼠海马微血管超微结构(×20000)

### 2.2 电针对不同月龄 APP/PS1 转基因鼠海马神经毡超微结构的影响

5 月龄海马神经毡结构(放大 50000 倍):模型组神经突触的部分突触前后膜及突触间隙结构模糊不清或增宽,突触小泡有所减少,突触后致密物厚度减少或消失;电针组前后膜较清晰,间隙不明显,突触小泡较模型组有所增多,突触后致密物厚度有所减小;药物组前后膜较清晰,间隙明显且间距小,突触小泡减少,突触后致密物变薄。对照组神经毡有较多神经突触,其突触前后膜及突触间隙结构清晰,突触前终末有较多的突触小泡,突触后膜致密物厚度大。见图 3。



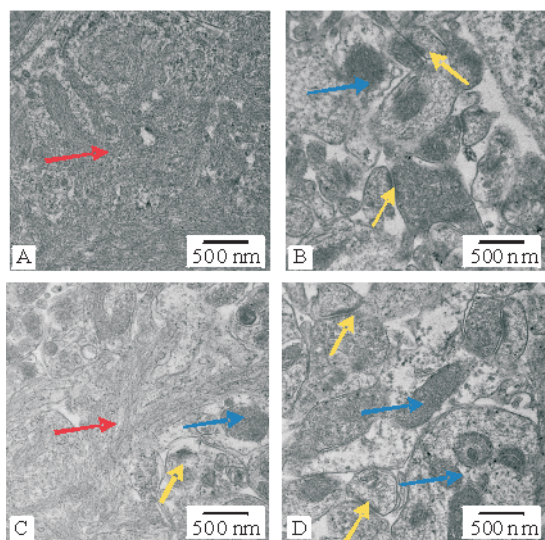
A 模型组;B 电针组;C 药物组;D 对照组

注:蓝色箭头为线粒体;黄色箭头为突触后致密物

图 3 5 月龄 APP/PS1 小鼠海马神经毡超微结构(×50000)



10 月龄海马神经毡结构(放大 50000 倍):模型组出现不规则致密絮状物,细胞内容物结构溶解紊乱不清,突触前后膜及突触间隙结构模糊不清;电针组神经毡有较多神经突触,线粒体结构清晰,其突触前后膜及突触间隙结构较清晰,突触前膜有较多的突触小泡,突触后膜致密物厚适中,细胞排列疏松不规则。药物组神经毡出现不规则致密絮状物,部分细胞内容物溶解结构不清,线粒体嵴断裂,部分呈空泡状,突触前后膜及突触间隙结构模糊不清,突触前膜突触小泡减少,突触后致密物厚度消失;对照组神经毡有较多神经突触,其突触前后膜及突触间隙结构清晰,突触前膜有较多的突触小泡,突触后膜致密物厚度大,线粒体结构完整。见图 4。



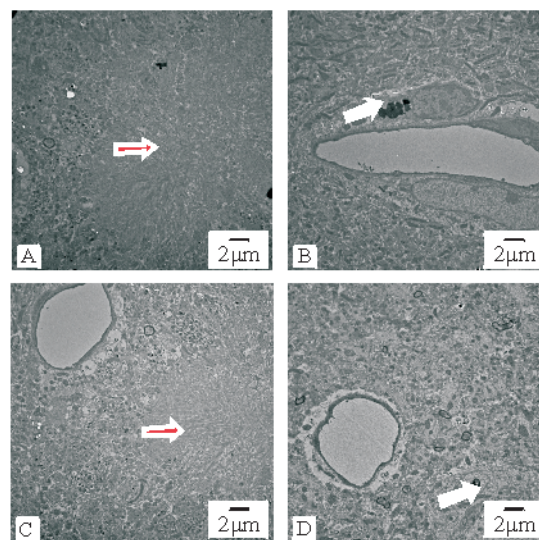
A 模型组;B 电针组;C 药物组;D 对照组

注:红色箭头为老年斑;蓝色箭头为线粒体;黄色箭头为突触后致密物质

图 4 10 月龄 APP/PS1 小鼠海马神经毡超微结构(×50000)

### 2.3 电针对 10 月龄 APP/PS1 转基因小鼠海马老年斑沉积的影响

10 月龄 APP/PS1 双转基因小鼠模型组血管(放大 5000 倍)周围出现大片不规则絮状结构,周围有少量次级溶酶体,神经毡结构不清;电针组血管基膜增厚,血管壁内容物增厚,内皮细胞线粒体呈空泡状,周围细胞出现次级溶酶体,神经毡结构层次清晰;药物组血管基膜略有增厚,周围出现大片不规则絮状结构,周围出现暗黑色颗粒,神经毡结构不清;对照组血管基膜完整,血管周围神经毡结构层次清晰,线粒体结构完整,神经毡有较多神经突触,结构清晰。见图 5。



A 模型组;B 电针组;C 药物组;D 对照组

注:红色箭头为老年斑;白色箭头为次级溶酶体

图 5 10 月龄 APP/PS1 双转基因小鼠海马超微结构(×5000)

## 3 讨论

### 3.1 电针治疗对不同月龄 APP/PS1 双转基因小鼠海马微血管超微结构的影响

脑内  $\beta$  淀粉样蛋白沉积主要是由有毒  $A\beta$  聚集形成的,本实验从 5 月龄 APP/PS1 双转基因小鼠透射电镜片结果得出模型组小鼠在脑海马微血管基膜增厚,血管壁内容物肿胀、轮廓不清等不同程度的改变,这些表现可能是由于受体在转运  $A\beta$  的过程中,有毒  $A\beta$  损伤了微血管壁的结构及功能,导致了转运受体不能正常的将  $A\beta$  从脑内转运至脑外,使  $A\beta$  经血脑屏障的向外转运减少,导致有毒  $A\beta$  在脑内浓度升高;血管基膜外的不规则絮状物可能是有毒  $A\beta$  血管周围沉积的表现,可能是老年斑形成的初始时期。10 月龄 APP/PS1 双转基因小鼠海马透射电镜片可以看出:模型组血管基膜不规则增厚,血管内壁轮廓不清,血管周围神经毡出现大片不规则絮状组织,这可能是  $A\beta$  的毒性在转运过程中损伤了微血管壁结构及功能,导致  $A\beta$  经血脑屏障向外转运受阻,血管周围出现大片不规则絮状物沉积——老年斑。

5 月龄组电针组血管基膜结构较模型组完整层次清,血管周围结构清晰,提示电针可能有保护脑海马微血管结及功能的作用;药物组血管壁内容物肿胀溶解,血管壁结构层次不清,可能是因为  $A\beta$  的毒性损伤到了脑海马微血管结构,影响到了血管功能,药物没有对脑组织结构起到保护作用;10 月龄

APP/PS1 转基因小鼠电针组可能是因为 A $\beta$  的毒性损伤到了血管结构及功能,导致血管内容物肿胀变形,血管周围局部出现次级溶酶体且部分溶解出现脂滴,可能是因为电针激活了神经自噬系统<sup>[3]</sup>,出现大量溶酶体吞噬了有毒 A $\beta$  形成脂滴,可能提高了血管自我保护能力;药物组血管壁内容物肿胀结构不清,血管壁线粒体嵴断裂多呈空泡状,可能是因为 A $\beta$  的毒性损伤到了血管结构及功能,周围还出现不规则絮状条形物,可能是老年斑前体,提示药物对海马超微结构无明显保护作用;对照组血管基膜完整,结构层次清晰,这表明 APP/PS1 同窝阴性鼠是良好的对照模型。

### 3.2 电针治疗对不同月龄 APP/PS1 双转基因小鼠海马突触超微结构的影响

电针对 AD 治疗效应的发挥可能与减轻线粒体超微结构损伤,改善线粒体功能,进而改善能量代谢和脑功能有关。线粒体是细胞的能量加工厂,通过氧化磷酸化过程为细胞生命活动提供能量<sup>[4]</sup>。电针对 AD 治疗效应的发挥可能与减轻线粒体超微结构损伤、降低 Caspase-3、Caspase-9 表达,抑制细胞凋亡线粒体途径的级联反应,减少细胞凋亡有关<sup>[5]</sup>。电针能有效调整海马神经元突触形态,使突触后致密物增厚,突触间隙宽度变窄,促进突触形态可塑性的发挥<sup>[6]</sup>。5 月龄小鼠实验透射电镜结果模型组突触前后膜及间隙不清、突触小泡减少、突触后膜致密物厚度减小;电针组前后膜较清晰,间隙不明显,突触小泡较模型组有所增多,这可能是电针治疗可以提高脑内乙酰胆碱的活性,可能提高了突触间信号传递,减缓脑痴呆样变的进程,对海马突触结构有保护和修复的作用;药物组前后膜较间隙明显减小,突触小泡有所减少,突触后致密物变薄,提示药物没有对突触超微结构保护作用;10 月龄鼠模型组血管基膜结构功能受损,导致神经毡出现大片脂褐色颗粒,破坏了线粒体结构及功能,影响了线粒体—突触能量传递,使得突触结构及功能收到破坏;电针组神经毡有较多神经突触,结构明显优于模型组,可能是因为电针治疗对突触结构起到了保护作用。药物组神经毡出现不规则致密絮状物,可能是老年斑的前体,部分细胞内容物溶

解结构不清,线粒体嵴断裂,部分呈空泡状,突触前后膜及突触间隙结构模糊不清,突触小泡减少,突触后致密物厚度消失,提示药物对海马突触结构无保护作用;对照组神经毡结构优于较模型组,提示 APP/PS1 双转基因鼠是良好的阴性模型。

APP/PS1 双转基因鼠模型是近来公认度较高的阿尔茨海默病模型<sup>[7]</sup>,其行为学改变和脑病理表现与阿尔茨海默病患者相似度高,本实验以观察不同月龄的 APP/PS1 双转基因鼠脑内有毒 A $\beta$ 1-42 沉积随月龄变化,以出现  $\beta$  淀粉样蛋白沉积为主线,研究阿尔茨海默病发展及电针对其超微结构的影响。5 月龄 APP/PS1 小鼠脑海马未见老年斑形成;10 月龄 APP/PS1 小鼠脑海马区可见大片老年斑;不同月龄 APP/PS1 双转基因小鼠电针组海马超微结构明显优于模型组和药物组,表明电针可以延缓或阻断 5 月龄和 10 月龄 APP/PS1 转基因鼠脑超微结构的 AD 样改变进程,延缓了 A $\beta$  淀粉样蛋白沉积发展成老年斑的这一过程,起到保护脑海马超微结构的作用。

### 参 考 文 献

- [1] Selkoe, D. J. . The ups and downs of Abeta[J]. Nat. Med, 2006, 12(7): 758-759.
- [2] 何颖,王超,王德才. 阿尔茨海默病的非治疗药物及新靶点研究进展[J]. 中国医药导报, 2014, 11(6): 162-166.
- [3] 武强,李露斯,范文辉,等. APP/PS1 双转基因 AD 小鼠学习记忆功能与超微结构的对照研究[J]. 重庆医学, 2007(9): 818-819.
- [4] 曾芳,何宇恒,彭静,等. 电针对 SAMP8 小鼠海马神经元线粒体超微结构的影响[J]. 上海针灸杂志, 2008, 27(5): 41-43.
- [5] 何宇恒,曾芳,余曙光,等. 电针对 SAMP8 小鼠海马神经元线粒体超微结构及相关凋亡蛋白的影响[J]. 辽宁中医杂志, 2008, 35(10): 1600-1602.
- [6] 卢圣锋,邵欣,唐勇,等. 电针促进阿尔茨海默病模型小鼠(SAMP8)海马神经元突触可塑性的神经细胞黏附机制[J]. 中国康复医学杂志, 2008, 23(12): 1057-1060.
- [7] 朱斌,陈静,秦红芳,等. APP/PS1 双转基因老年性痴呆小鼠早期病理和认知行为变化[J]. 广州中医药大学学报, 2012, 29(2): 193-196, 226.

(收稿日期:2014-12-08)

(本文编辑:黄凡)