

艾烟与香烟对载脂蛋白 E 基因敲除小鼠学习记忆功能与海马 β 淀粉样蛋白沉淀的影响

刘钧天 崔莹雪 黄玉海 黄畅 黄剑 赵百孝 韩丽 杨佳 王磊

【摘要】 目的 观察艾烟与香烟对载脂蛋白 E 基因敲除 (apolipoprotein E-deficient, ApoE^{-/-}) 小鼠学习记忆能力与海马 β 淀粉样蛋白 (β -Amyloid) 沉淀的影响。**方法** 将 13 只 8 周龄 C57BL/6 小鼠作为空白对照组, 27 只同龄 ApoE^{-/-} 小鼠随机分为 ApoE^{-/-} 模型组、艾烟组、香烟组。香烟与艾烟组小鼠分别暴露于 5 ~ 15 mg/m³ 的香烟与艾烟环境。各组小鼠每天干预 20 分钟, 每周 6 天, 共干预 12 周。于第 13 周进行行为学测试, 之后处死动物、取材, 对其脑组织海马中 A β 沉淀进行刚果红染色。**结果** 与模型组对比, 空白对照组、艾烟组、香烟组小鼠均表现出学习潜伏期缩短, 记忆潜伏期增长, 记忆错误次数减少, 差别有统计学意义 ($P < 0.05$)。模型组小鼠在视野范围内有明显的粉红色弥散样 A β 沉淀, 空白对照组明显少于模型组 ($P < 0.05$)。艾烟组与香烟组在相同海马区域 CA3 中淀粉样蛋白沉淀均有不同程度的减少, 艾烟组中 A β 沉淀较模型组显著降低 ($P < 0.05$), 较香烟组亦有减少 ($P < 0.05$)。**结论** 艾烟能够发挥 ApoE^{-/-} 小鼠的海马 CA3 区保护作用, 减少 A β 沉淀进而改善 ApoE^{-/-} 小鼠学习记忆能力。

【关键词】 艾烟; 香烟; 载脂蛋白 E 基因敲除小鼠; 淀粉样蛋白; 学习记忆

【中图分类号】 R245.81 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2015.05.004

Effects of moxa and cigarette smoke on behavioral changes and brain β amyloid deposition in apolipoprotein E-deficient mice LIU Jun-tian, CUI Ying-xue, HUANG Yu-hai, et al. College of Acumox and Tuina, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

Corresponding author: ZHAO Bai-xiao, Email: baixiao100@gmail.com

【Abstract】 Objective To investigate the influence of moxa smoke and cigarette smoke on the apolipoprotein E-deficient (ApoE^{-/-}) male mice' learning and memory ability and β amyloid deposition in brain hippocampus. **Method** 13 eight weeks old C57BL/6 mice were assigned to control group; 27 eight weeks old ApoE^{-/-} mice were randomly divided into 3 groups ($n = 9/\text{group}$): model group, moxa smoke group, cigarette smoke group. Mice in the two smoke groups were exposed to smoke, which concentration is controlled within 5 ~ 15 mg/m³; mice in model group and control group were exposed to normal air. The step-down test was conducted in the 13th week. Level of β amyloid deposition was determined by congo red staining. **Results** Compared with the model group, mice in control group, moxa smoke group and cigarette smoke group showed decreased learning latency, increased memory latency and made less mistakes in the step-down test ($P < 0.05$). Compared with the model group, β amyloid deposition of control group, moxa smoke group and cigarette smoke group was significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** Our findings suggest that moxa smoke may have effect on protecting nerve function and anti-aging by reducing the deposition of β amyloid in hippocampus.

【Key words】 Moxa smoke; Cigarette smoke; Apolipoprotein E-deficient mice; Amyloid; Step-down test

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81373730); 北京中医药大学自主课题 (0100604214, 0100605132)

作者单位: 100029 北京中医药大学针灸推拿学院 [刘钧天 (博士研究生)、黄玉海 (硕士研究生)、黄畅 (博士研究生)、黄剑 (博士研究生)、赵百孝、韩丽、杨佳 (博士研究生)、王磊 (博士研究生)]; 北京中医医院针灸科 (崔莹雪)

作者简介: 刘钧天 (1986 -), 女, 2012 级在读博士研究生。研究方向: 艾灸作用原理研究。E-mail: juntianyt@hotmail.com

通讯作者: 赵百孝 (1963 -), 博士, 教授。研究方向: 针灸作用原理与艾灸效应机制研究。E-mail: baixiao100@gmail.com

艾灸是以艾绒为施灸材料,点燃后在体表一定的部位进行烧、灼、熏,给人体以温热、药物刺激作用,以防治疾病的一种外治法。艾烟作为艾灸的重要组成部分被证明有着诸多的生物活性——抗氧化^[1-2]、广谱杀菌、抗病毒^[3-4]、抗肿瘤^[5-6]以及免疫调节^[7]等作用。课题组前期研究中发现艾烟可以提高人体自主神经活力^[8],改善 SAMP8 小鼠脑中氧化应激状态^[9],说明艾烟可从多渠道参与改善衰老模型小鼠的病理进程。

为进一步观察艾烟对阿兹海默病模型小鼠学习记忆功能以及脑中 β 淀粉样蛋白(A β)沉淀形成的影响。本实验以载脂蛋白 E 基因敲除(apolipoprotein E-deficient, ApoE^{-/-})小鼠为模型,通过对比观察艾烟暴露与香烟暴露两种不同干预方式对其学习记忆功能影响及脑组织海马中 A β 沉淀改变,探讨艾烟对脑组织衰老的干预作用,以期探索艾灸疗法延缓衰老机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

选用清洁级 8 周龄雄性载脂蛋白 E 基因敲除小鼠(ApoE^{-/-}) 27 只, C57BL/6 小鼠 13 只,体质量 30 g, 2013 年 3 月 22 日购自北京大学动物医学中心[许可证:SCXK(京)2011-0012]。ApoE^{-/-}小鼠采用高脂饲料喂养, C57BL/6 小鼠采用标准饲料喂养,自由进水;饲养环境温度(22 \pm 2) $^{\circ}$ C,相对湿度 50%~60%,保持 12 小时光照(8:00~20:00)和黑暗(20:00~次日 8:00)交替循环。

小鼠购进后,适应性饲养 1 周,干预 12 周。按随机数字表法将 ApoE^{-/-}小鼠随机分为 ApoE^{-/-}模型组、艾烟组、香烟组三组(每组 9 只),并将 13 只 C57BL/6 小鼠作为空白对照组进行对照。

1.2 主要实验材料、仪器及试剂

自制细艾条:(直径 0.5 cm \times 长 20 cm,河南南阳汉医艾绒有限公司);香烟(中南海牌,焦油含量 10 mg/支);自制带孔玻璃缸 1 m \times 1 m \times 1 m,顶层玻璃正中设一直径 5 mm 圆孔);光散射式数字粉尘测试仪(北京宾达绿创科技有限公司);小鼠跳台试验仪;刚果红染液(南京建成生物工程研究所);中性树胶封片剂;多聚甲醛,中性树胶及其它生物试剂(Sigma 公司)。

1.3 实验步骤

空白暴露:将空白对照组与 ApoE^{-/-}模型组小鼠

分别暴露于玻璃缸中 20 分钟。

艾烟干预:将调试好的粉尘测试仪置于玻璃缸中间,将艾烟组小鼠自由暴露在玻璃缸中,点燃自制细艾条,从玻璃缸上方的圆孔将点燃的一端插入,令艾烟充满玻璃缸。根据前期实验结论^[10],控制艾烟浓度为 5~15 mg/m³。用粉尘测试仪测试其浓度达到预定范围后(此过程艾条燃烧约 15 秒),将艾条取出,迅速封闭圆孔。此后每隔 3 分钟记录一次浓度数值,使浓度稳定在 10 mg/m³左右。若数值高于 15 mg/m³,可将上方玻璃盖稍微移动,令艾烟散去部分后迅速将盖子移回;若数值低于 5 mg/m³,可再将点燃的艾条由圆孔插入,以补充艾烟。20 分钟后,取出小鼠,每周干预 6 天,共干预 12 周。

香烟干预:除将艾条换成香烟,香烟浓度及干预方式与艾烟组相同。在进行香烟干预时要保证与其他组别严格隔离,避免其他组别嗅到香烟。

于第 13 周进行跳台试验。将小鼠置于被动回避反应箱(20 cm \times 20 cm \times 10 cm),适应 3 分钟,然后底部铜栅通电(AC, 40V),通电时间 5 分钟。小鼠遭受电击后,会跳上绝缘垫躲避电击;当从安全台上跳下触及电栅遭受电击即为错误反应,记录小鼠首次跳上绝缘垫所需时间即反应时间,5 分钟内跳下圆台次数(错误次数),作为学习成绩。24 小时后重复上述测试,记录小鼠首次从安全台跳至铜栅所需时间即潜伏时间,5 分钟内跳下圆台次数(错误次数),作为记忆成绩。

1.4 取材方法与标本制备

随机选取 6 只,用 10% 水合氯醛按 3 mL/kg 腹腔注射麻醉小鼠,以 4% 多聚甲醛颈动脉灌注法固定脑组织,静置 30 分钟后开颅取脑,置 4% 多聚甲醛中固定过夜,流水冲洗 30 分钟,用各级乙醇脱水,二甲苯透明,浸蜡,常规包块。转化切片机切片,制备脑冠状面切片,片厚约 6 μ m。取等间隔的组织切片采用刚果红染色^[11]:切片脱腊脱水,甲醇刚果红染液浸染 10~20 分钟,用碱性乙醇分化液分化 10 秒,蒸馏水洗 3 分钟,95% 乙醇冲 30 秒;无水乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封固。光镜下(\times 400)选取细胞数较为恒定的 CA3 区拍片,比较不同组小鼠的 A β 斑变化。

1.5 统计学方法

所有数据应用 SPSS 19.0 统计软件进行分析。跳台试验中学习潜伏期、学习错误次数、记忆潜伏

期与淀粉样蛋白阳性面积各数据呈现正态分布以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,符合方差齐性,采用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 进行各组之间比较, LSD、SNK 进行两两比较, 记忆错误次数不符合正态分布以中位数 (四分位距) 表示, 以非参数检验经行各组之间比较, 检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 各组小鼠学习成绩与记忆成绩对比

学习潜伏期中空白组反应时间最短, 模型组反应时间最长, 各组之间比较具有统计学差异 ($F = 10.574, P = 0.000 < 0.01$)。与模型组相比, 空白组 ($P = 0.000 < 0.01$)、艾烟组 ($P = 0.000 < 0.01$)、香烟组 ($P = 0.006 < 0.01$) 反应时间较短, 均有统计学差异。艾烟组与香烟组无差别。学习错误次数各组之间无统计学差别。

记忆潜伏期中艾烟组记忆时间最长, 模型组记忆时间最短。各组间比较有统计学差异 ($F = 16.227, P = 0.000 < 0.01$)。与模型组相比, 空白组 ($P = 0.000 < 0.05$)、艾烟组 ($P = 0.000 < 0.01$)、香烟组 ($P = 0.011 < 0.05$) 反应时间显著延长, 有统计学差异。艾烟组与香烟组无差别。记忆错误次数以模型组最多, 空白组与艾烟香烟组中位数均为 0 低于模型组, 并具有统计学差异 ($P < 0.05$)。说明艾烟与艾灸可降低 ApoE^{-/-} 小鼠学习记忆能力减低程度, 见表 1。

表 1 各组小鼠跳台试验结果 [$\bar{x} \pm s, M(Q_R)$]

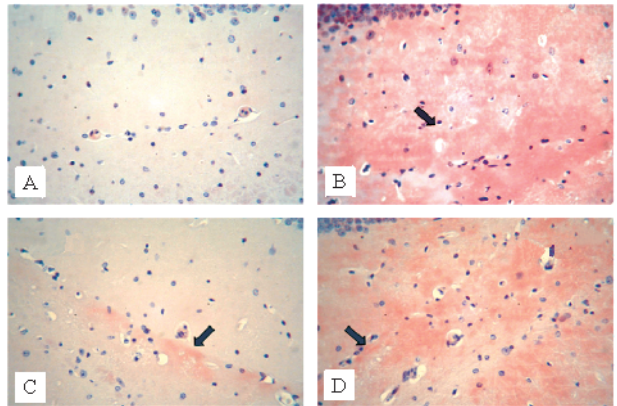
组别	学习潜伏期 ($\bar{x} \pm s$)	学习错误次数 ($\bar{x} \pm s$)	记忆潜伏期 ($\bar{x} \pm s$)	记忆错误次数 [M(Q _R)]
空白组	4.66 \pm 3.91 ^b	3.69 \pm 1.70	142.26 \pm 49.66 ^b	0(1) ^a
模型组	74.68 \pm 55.95	3.5 \pm 2.59	2.33 \pm 1.84	4(3)
艾烟组	12.37 \pm 5.31 ^b	1.89 \pm 1.05	168.64 \pm 20.88 ^b	0(1) ^a
香烟组	32.61 \pm 29.79 ^b	2 \pm 1.07	127.88 \pm 75.54 ^a	0(1) ^a

注: 与模型组比较^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ 。

2.2 各组小鼠海马 A β 沉淀

经刚果红染色的 ApoE^{-/-} 小鼠海马 CA3 区在高倍光学显微镜下观察 (图 1), 模型组小鼠在视野范围内有明显的粉红色弥散样 A β 沉淀 (如图 1 中箭头所示), 而空白组小鼠切片在同样部位未显现出淀粉样变, A β 面积以模型组最高, 空白组最低。空白组明显低于模型组 ($P = 0.00 < 0.05$) (见表 2), 说明造模成功。ApoE^{-/-} 小鼠经过 12 周艾烟与香烟治疗后, 艾烟组与香烟组在相同海马区域 CA3 中

A β 沉淀均有不同程度的减少, 艾烟组中 A β 沉淀较模型组显著降低 ($P = 0.004 < 0.05$), 较香烟组亦有减少 ($P = 0.022 < 0.05$)。说明艾烟可以减少 ApoE^{-/-} 小鼠海马 A β 沉淀。



A: 空白组; B: 模型组; C: 艾烟组; D: 香烟组

注: 箭头所示为海马中弥散的粉红色 A β 淀粉样沉淀。

图 1 各组小鼠海马 CA3 区经刚果红染色后淀粉样蛋白沉淀情况 ($\times 400$)

表 2 各组小鼠脑组织海马中淀粉样蛋白阳性面积比较 (μm^2)

组别	n	淀粉样蛋白阳性面积 (μm^2)
空白组	6	101.25 \pm 82.68 ^a
模型组	6	37661.70 \pm 12349.53
香烟组	6	35455.84 \pm 18836.45
艾烟组	6	4034.43 \pm 1992.05 ^{ab}

注: 与模型组比较^a $P < 0.01$, 与香烟组比较^b $P < 0.01$ 。

3 讨论

现代研究证明 ApoE 基因与动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS)、阿兹海默病 (Alzheimer's disease, AD) 等血管疾患及中枢神经系统 (central nervous system, CNS) 功能障碍有关。在心血管系统中, ApoE 基因缺失可导致高脂血症并逐步演化为 AS; 在 CNS 内, ApoE 由星形胶质细胞合成并分泌, 参与维护胆固醇、磷脂的动态平衡, 调节神经膜重塑时胆固醇与磷脂的动员与再分布, 从而参与调节突触可塑性的维护以及神经细胞受损时的修复^[12]。因此, 载脂蛋白 E 基因敲除 (ApoE^{-/-}) 小鼠除了应用在动脉粥样硬化症的研究中, 还作为一种新型动物模型应用于认知障碍发生机制的研究中^[13]。

在 ApoE 基因的三个亚型中 ApoE4 被证明与阿兹海默病有着最为密切的关系, 它主要通过影响脑血管系统导致诸如 A β 沉淀等神经毒素的累积^[14]。

1991 年, Namba 等人发现, 在 A β 沉积和神经原纤维中, 可以检测到 ApoE 蛋白成分, 进一步研究证实 ApoE 蛋白能够和 A β 形成前沉积样颗粒^[15]。本实验结果表明, 模型组较空白组学习记忆能力差, 其海马 A β 沉淀面积显著高于空白组, 证实了 ApoE^{-/-}小鼠可以产生类似阿茨海默病的脑部病理表现, 说明此小鼠模型应用于认知功能障碍的研究是切实可行的。产生这种病理改变的原因很可能是由于 ApoE 基因的缺失, 使得淀粉前体蛋白的分裂增加, 导致 A β 沉积异常增多^[14-16]。

艾烟与香烟虽然都是常见的可吸入烟雾, 但其安全性却相去甚远。香烟烟雾成分复杂, 其中很多化合物具有致畸、致突变的作用^[17]。流行病学调查发现, 吸烟会导致呼吸系统、心血管系统发病率的提高。不同于香烟烟雾, 本课题组在前期对艾烟安全性研究中发现临床浓度下的艾烟烟雾不会对呼吸、心血管等系统脏器产生毒性影响, 且不会引起全身过敏反应^[18], 初步证实了艾烟的安全性。

艾烟作为艾灸过程中的燃烧生成物, 其主要成分与生物活性都影响着艾灸疗效的发挥。在课题组前期利用气相色谱—质谱技术对艾燃烧生成物进行分析^[19], 结果共得到 85 种不同的化学成分, 其中大部分为芳烃、萜类和一些长链脂肪烃, 而其挥发油成分则鉴定出 26 种^[20]。艾烟作为具有独特气味的烟气, 其作用途径很可能通过嗅觉。艾烟中多种气味化合物与特异受体结合激活气味受体细胞并产生电信号, 通过特异性的嗅觉通路将嗅觉信息投射到下丘脑、边缘系统、海马等部位, 直接参与情绪与学习记忆等行为的调控^[21-22]。在艾烟生物活性研究中, 发现艾烟不仅可以降低 wistar 大鼠血清中氧化修饰低密度脂蛋白 (oxidized low density lipoprotein, ox-LDL) 和血管性假血友病因子水平, 升高低密度脂蛋白受体 (low density lipoprotein receptor, LDL-r), 从而对脂质代谢产生良性调整作用^[23]; 还可通过提高快速老化小鼠系 8 (senescence-accelerated mouse prone 8, SAM-P8) 小鼠脑中抗氧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性, 调节 Th1/Th2 细胞因子平衡^[10], 起到调节免疫和抗氧化的作用。吸烟可以引起肺癌与呼吸道损伤, 但其主要毒性物质尼古丁却被报道其具有改善 AD 小鼠学习记忆行为的作用^[24]。本次实验结果显示, 艾烟与香烟均能不同程度的改善 ApoE^{-/-}小鼠的学习记忆功能, 艾烟组海马中 A β 沉淀显著低于模型组与香烟组, 说明艾烟可

减少 ApoE^{-/-}小鼠脑中 A β 沉淀, 其作用途径可能是通过艾烟本身的活性成分经黏膜吸收与干预嗅觉系统的神经递质, 影响嗅觉传导的信号改变, 调节脂质代谢, 改善脑内 A β 沉积与清除之间的失衡, 进而抑制 A β 沉淀的累积。

实验结果再次证明了 ApoE^{-/-}小鼠可以作为阿茨海默病的动物模型。并说明艾烟的确可以降低 ApoE^{-/-}小鼠的脑内淀粉蛋白沉淀, 改善学习记忆功能进而起到延缓脑组织衰老的作用。

参 考 文 献

- [1] 许焕芳, 崔莹雪, 黄茶熙, 等. 艾燃烧生成物对快速老化模型小鼠 SAMP8 血清抗氧化酶的影响 [J]. 中国针灸, 2012, 32 (1): 53-57.
- [2] Xu H, Zhao B, Cui Y, et al. Effects of Moxa Smoke on Monoamine Neurotransmitters in SAMP8 Mice [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2013, 2013: 178067.
- [3] 何斌. 艾烟熏治疗浸渍糜烂型足癣 78 例 [J]. 中医外治杂志, 2010, 19 (5): 7-9.
- [4] 吴爱须, 李彦平, 吴爱华, 等. 外科病房空气消毒方法的比较研究 [J]. 河北医药, 2010, 32 (13): 1818-1819.
- [5] Hitosugi N, Ohno R, Hatsukari I, et al. Induction of cell death by pro-oxidant action of Moxa smoke [J]. Anticancer Res, 2002, 22 (1A): 159-163.
- [6] Hatsukari I, Hitosugi N, Ohno R, et al. Partial purification of cytotoxic substances from moxa extract [J]. Anticancer Res, 2002, 22 (5): 2777-2782.
- [7] Sakagami H, Matsumoto H, Satoh K, et al. Cytotoxicity and radical modulating activity of Moxa smoke [J]. In Vivo, 2005, 19 (2): 391-397.
- [8] Cui Y, Zhao B, Huang Y, et al. Effects of Moxa (Folium Artemisiae argyi) Smoke Exposure on Heart Rate and Heart Rate Variability in Healthy Young Adults: A Randomized, Controlled Human Study [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2013, 2013: 510318.
- [9] 孟笑男, 徐焕芳, 崔莹雪, 等. 艾燃烧生成物对快速老化模型小鼠大脑 SOD、MDA 和 GSH-Px 的影响 [J]. 环球中医药, 2011, 4 (6): 413-415.
- [10] 许焕芳, 崔莹雪, 黄茶熙, 等. 艾燃烧生成物对 SAMP8 小鼠血清 Th1/Th2 细胞因子的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2012, 27 (5): 1387-1390.
- [11] 王琳, 马晓清, 郭云娣, 等. 参银复智制剂对血管性痴呆模型大鼠海马 CA1 区的改善作用及机制 [J]. 中药药理与临床, 2014, 30 (1): 102-105.
- [12] 程春华, 杨继红. ApoE 基因与人类老年性疾病的关系及 ApoE 基因敲除小鼠在人类老年疾病研究中的应用 [J]. 中国老年学杂志, 2010, 30 (8): 1151-1153.
- [13] Kitagawa K, Matsumoto M, Hori M, et al. Neuroprotective effect of apolipoprotein E against ischemia [J]. Ann N Y Acad Sci, 2002, 977: 468-475.

- [14] Zlokovic B V. Cerebrovascular effects of apolipoprotein E: implications for Alzheimer disease[J]. JAMA Neurol, 2013, 70(4): 440-444.
- [15] Namba Y, Tomonaga M, Kawasaki H, et al. Apolipoprotein E immunoreactivity in cerebral amyloid deposits and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease and kuru plaque amyloid in Creutzfeldt-Jakob disease[J]. Brain Res, 1991, 541(1): 163-166.
- [16] Bertram L, McQueen M B, Mullin K, et al. Systematic meta-analyses of Alzheimer disease genetic association studies: the AlzGene database[J]. Nat Genet, 2007, 39(1): 17-23.
- [17] 高永, 郝恩柱, 倪艳波. 香烟和绿茶对辐射致突变效应的影响[J]. 中华放射医学与防护杂志, 2006, 26(4): 355-357.
- [18] 王磊, 哈略, 韩丽, 等. 平均临床浓度艾烟下的豚鼠全身过敏反应实验研究(英文)[J]. 中华中医药杂志, 2014, 29(5): 1477-1483.
- [19] 洪宗国, 农熠琰, 杨梅, 等. 艾叶燃烧产物化学成分的分析[J]. 中国针灸, 2009, (S1): 60-62.
- [20] 靳然, 赵百孝, 于密密, 等. 艾燃烧生成物组分固相微萃取气相色谱质谱法定性分析[J]. 北京中医药大学学报, 2011, 34(9): 632-636.
- [21] 傅杰青. 鼻子和脑子是怎样合作的? ——评价 2004 年诺贝尔生理学或医学奖[J]. 自然杂志, 2004, 26(6): 362-366.
- [22] 牛利华, 胡庆东, 徐金勇, 等. 薰衣草经嗅觉通路吸入对小鼠抑郁样行为改变及其作用机制初步探讨[J]. 环境与健康杂志, 2010, 27(10): 861-865.
- [23] 杨佳, 赵百孝, 韩丽, 等. 不同浓度艾烟长期干预对大鼠血清 vWF 及 ox-LDL 表达的影响[J]. 世界中医药, 2013, 8(8): 859-861.
- [24] Rangani R J, Upadhyaya M A, Nakhate K T, et al. Nicotine evoked improvement in learning and memory is mediated through NPY Y1 receptors in rat model of Alzheimer's disease[J]. Peptides, 2012, 33(2): 317-328.

(收稿日期: 2014-09-02)

(本文编辑: 董历华)