

化瘀通络灸法对皮质下血管性痴呆大鼠额叶皮质下白质 TNF- α 、IL-1 β 表达的影响*

张风云¹, 张庆萍^{2△}, 吴生兵³, 王明洁¹

(1. 安徽中医药大学, 安徽 合肥 230038; 2. 安徽中医药大学针灸骨伤临床学院, 安徽 合肥 230038;
3. 新安医学教育部重点实验室, 安徽 合肥 230038)

摘要: **目的** 观察化瘀通络灸法对皮质下血管性痴呆(subcortical vascular dementia, SVD)模型大鼠治疗作用及其对额叶皮质下白质炎症因子的影响。**方法** 采用 Pulsinelli 血管阻断法稍加改进复制大鼠血管性痴呆模型, 电脑随机数字表法随机分为 3 组: 艾灸组、药物组、模型组, 并设假手术组、正常组对照。艾灸组取百会、大椎、神庭穴艾灸治疗, 药物组多奈哌齐灌胃治疗。每日 1 次, 连续治疗 4 周。采用跳台仪检测治疗后学习记忆成绩; 采用免疫组化检测额叶皮质下白质肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白介素-1 β (Interleukin-1 β , IL-1 β) 阳性细胞表达。**结果** ①大鼠跳台实验的潜伏期、错误次数, 艾灸组及药物组与模型组比较差异具有统计学意义 ($P < 0.01$, $P < 0.05$), 且艾灸组明显优于药物组 ($P < 0.01$, $P < 0.05$)。②艾灸组及药物组与模型组比, 大鼠额叶皮质下白质 TNF- α 、IL-1 β 表达差异均有统计学意义。艾灸组与药物组比较 TNF- α 、IL-1 β 表达差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** 化瘀通络灸法治疗 SVD 可能是通过抑制炎症细胞因子 TNF- α 、IL-1 β 的产生, 从而改善大鼠认知功能而实现的。

关键词: 血管性痴呆; 化瘀通络灸法; 肿瘤坏死因子- α ; 白介素-1 β

中图分类号: R245.81

文献标志码: A

文章编号: 1000-2723(2017)01-0005-05

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2017.01.002

皮质下血管性痴呆 (subcortical vascular dementia, SVD) 是血管性痴呆 (vascular dementia, VD) 最主要的亚型^[1-2], 是以认知功能减退或痴呆为主要临床症状的一组疾病。其认知功能减退以空间学习能力下降、步态异常等为主要表现外, 脑深部白质尤其是侧脑室旁白质疏松是其主要影像学诊断依据^[3]。在前期的研究过程中, 我们曾报道了化瘀通络灸法对脑脊液生长抑素 (SS) 和精氨酸血管加压素 (AVP)、血中 NO 水平、血中内皮素 (ET) 及额叶超微结构的影响^[4-8], 探讨化瘀通络灸法治疗 VD 的机制。目前炎症细胞因子在 VD 发病机制中的地位日益受到重视。炎症因子在脑组织缺血再灌注后的坏死和凋亡中起重要作用。当脑组织受到缺血再灌注损伤时, 神经元、星形胶质细胞和小胶质细胞会产生具有多种生物活性的多肽

类细胞因子 TNF- α 和 IL-1 β 。本实验采用国际公认的四血管阻断法稍加改进建立模型, 观察大鼠额叶皮质下白质炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 含量, 意在探讨炎症因子与 SVD 发病的相关性。采用艾灸治疗, 观察化瘀通络灸法对 SVD 大鼠额叶皮质下白质炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 含量的影响, 进一步探讨化瘀通络灸法治疗 SVD 的作用机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及药物

特制的清艾条, $\Phi 10\text{mm} \times 100\text{mm}$, 安徽省天长市寿民灸具厂定制加工; 盐酸多奈哌齐, 10mg/片, 7 片/板 $\times$ 1 板/盒, 卫材 (中国) 药业有限公司制造 (批号 131237A); 大鼠跳台仪由上海欣曼科教设备有限公司生产; 封闭式切片机 LEICA-2135 (德国)。

* 基金项目: 国家自然科学基金 (81373744)

收稿日期: 2016-11-28

作者简介: 张风云 (1991-), 男, 安徽芜湖人, 在读硕士研究生, 研究方向: 针灸临床应用及机理研究。

△通信作者: 张庆萍, E-mail: zhangqp66@163.com

1.2 实验动物与分组

SPF 级 Wistar 成年雄性大鼠 100 只, 体质量 (100 ± 10) g, 由上海西普尔-必凯实验动物公司提供, 许可证号: SCXK(沪)2013-0016。通过跳台实验筛选反应过于灵敏或迟缓的大鼠, 剩余大鼠饲养至 (250 ± 10) g 后进行下一步实验。采用电脑随机数字表法进行分组, 随机选取 10 只为正常组, 10 只为假手术组, 其余大鼠复制 SVD 动物模型。模型复制 4d 后再次进行跳台实验筛选, 剔除视力损伤、反应仍敏感或太过迟钝的大鼠, 从中保留 30 只, 随机分为艾灸组、药物组、模型组, 每组各 10 只。

1.3 造模方法及检测

本实验采用国际公认的四血管阻断 (4-Vessel occlusion, 4-VO) 方法^[9]稍加改良制作 SVD 模型。术前 12h 禁食不禁水, 用 10% 水合氯醛 (0.3 mL/100g 体重, 腹腔注射) 麻醉大鼠后, 俯卧固定, 常规消毒, 行颈正中切口, 钝性分离, 用电凝针烧灼双侧翼小孔内的椎动脉, 行永久性闭塞, 缝合伤口, 予以庆大霉素防止感染。将大鼠仰卧固定, 腹侧颈正中切口, 逐层钝性分离, 暴露双侧颈总动脉, 用丝线进行半结扎, 缝皮, 予以庆大霉素预防感染。假手术组手术中仅暴露 4 条血管, 不进行椎动脉烧灼及双侧颈总动脉半结扎。

造模 4d 后, 采用跳台实验检测大鼠学习记忆成绩。测试前先将大鼠放入跳台仪, 待适应环境后接通电源 (36V 交流电), 大鼠会因回避电击而逐步学会跳上跳台 (跳台上停留 3min 为学会标准)。24h 后进行正式测试, 直接将大鼠放在跳台上, 然后接通电源并开始计时, 至少有双足同时接触电栅为跳下 1 次, 记录大鼠第 1 次跳下跳台的时间为潜伏期, 记录 5min 内大鼠跳下的次数为错误次数, 错误次数和潜伏期作为大鼠的记忆成绩。用 t 检验的方法, 将造模后大鼠的记忆成绩和正常组比较, 评定复制 SVD 模型的成功; 并测试治疗后的记忆成绩以评判疗效。

1.4 治疗方法

造模后第 5 天开始治疗。将艾灸组大鼠固定于自制鼠板上, 固定大鼠头部, 选取百会、大椎、神庭穴剃毛标记, 穴位的选取参照大鼠穴位图谱, 按人体穴位的定位方法并参照大鼠骨骼与体形确定。百会穴隔附子饼压灸, 制作 5mm 厚的附子饼置于百会穴上, 用点燃的清艾条压灸在附子饼上, 待大鼠百会穴皮肤

出现灼热潮红时可提起清艾条, 倾刻再压灸, 反复压灸 20min; 大椎穴、神庭穴用清艾条进行悬起灸 20min, 1 日 1 次, 治疗 4 周为 1 个疗程。

药物组采用多奈哌齐灌胃治疗。灌胃剂量根据大鼠体重按 1mg/kg 将多奈哌齐溶于 1mL 生理盐水, 1 日 1 次, 疗程与艾灸组相同。正常组、假手术组、模型组只做鼠板固定, 不做其它处理。

1.5 脑组织取材

在治疗 1 个疗程之后, 5 组大鼠在经过跳台实验测试学习记忆成绩后进行脑组织取材。将大鼠用 10% 水合氯醛 (0.3 mL/100g 体重) 腹腔麻醉后, 剪开胸腔暴露心脏, 用 200mL 温生理盐水经心脏灌注, 至肝脏颜色由鲜红转为发白, 再灌注 4% 多聚甲醛。灌注完毕后, 断头取脑, 剥离嗅球、小脑、延髓后取额叶皮质下组织块约 5mm×5mm×5mm, 放入 4% 多聚甲醛溶液保存。

1.6 免疫组化法检测

组织常规梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 浸蜡包埋, 冠状切片制成切片, 采用免疫组织化学法检测 TNF- α 、IL-1 β 的阳性表达。一抗为磷酸盐缓冲液 (PBS) 稀释的 TNF- α (1:100)、IL-1 β (1:100) 抗体。具体步骤严格按照说明书进行, 烘片、脱蜡、热修复、滴加抗体、滴加 DAB 显色液, 最后中性树脂封片。阴性对照切片不加一抗, 仅用 PBS 代替。每个标本随机取 6 张切片, 每张切片在高倍镜 (400 倍) 下随机拍摄 5 个区域, 并用图像分析系统测量阳性细胞数和阳性细胞的灰度值。其中灰度值越低, 说明其免疫组织化学染色越深, 阳性表达越强。

1.7 统计学处理

采用 SPSS22.0 统计软件包进行统计, 实验数据以均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间均数比较用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 治疗一个疗程后大鼠学习记忆成绩测试结果比较

正常组与假手术组比较无明显差异 ($P > 0.05$), 模型组、艾灸组、药物组与正常组相比较差异具有统计学意义 ($P < 0.01$, $P < 0.05$), 且此三组组间比较差异也具有统计学意义 ($P < 0.01$, $P < 0.05$)。模型组的潜伏期小于艾灸组和药物组, 错误次数大于艾灸组、药物组。此外, 艾灸组潜伏期大于药物组, 而错误次数小于药物组。模型组学习记忆成绩相比正常组较差, 艾

灸和药物的干预可使其学习记忆成绩提高,且艾灸组的效果优于药物组。见表 1。

表 1 5 组大鼠治疗后跳台实验潜伏期、错误次比较($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	n	潜伏期(秒)	错误次数(次)
正常组	10	126.80 $\pm$ 12.819	1.7 $\pm$ 0.675
假手术组	10	124.30 $\pm$ 10.698	1.8 $\pm$ 0.632
模型组	10	76.40 $\pm$ 6.635 $\Delta\Delta\Delta\Delta$	4.3 $\pm$ 0.325 $\Delta\Delta\Delta$
艾灸组	10	110.70 $\pm$ 8.284 $\Delta\Delta\Delta\Delta$	2.7 $\pm$ 0.675 $\Delta\Delta\Delta$
药物组	10	98.40 $\pm$ 9.514 $\Delta\Delta\Delta$	3.4 $\pm$ 0.726 $\Delta\Delta\Delta$

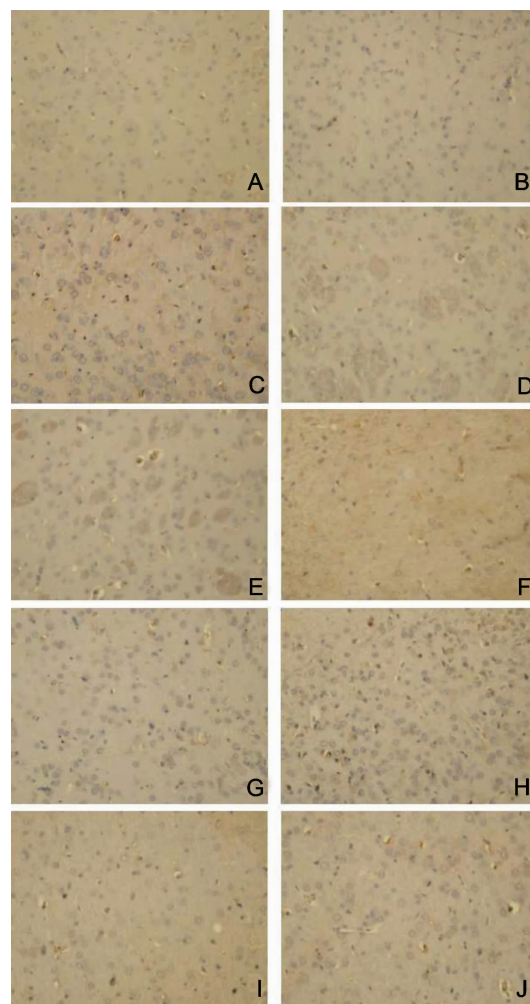
注:与正常组比较, $\Delta\Delta P<0.01$, $\Delta P<0.05$;与模型组比较, $\Delta\Delta\Delta P<0.01$, $\Delta P<0.05$;与药物组比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$;下表同

2.2 治疗一个疗程后大鼠皮质下 TNF- α 、IL-1 β 的表达水平比较

正常组与假手术组 TNF- α 、IL-1 β 的表达比较无明显差异($P>0.05$);模型组、艾灸组、药物组与正常组 TNF- α 、IL-1 β 的表达比较差异具有统计学意义($P<0.01$, $P<0.05$);模型组与艾灸组、药物组 TNF- α 、IL-1 β 的表达比较差异有统计学意义($P<0.01$, $P<0.05$),且模型组阳性表达较强;药物组与艾灸组比较皮质下 TNF- α 、IL-1 β 阳性表达更强($P<0.01$, $P<0.05$)。见表 2、表 3 和图 1。

3 讨论

与前额叶皮质相连的皮质下白质脱髓鞘改变为 SVD 的主要病理机制之一,而神经血管单元(neurovascular unit, NVU)损害是 SVD 皮质下白质脱髓鞘



A~E 为正常组、假手术组、模型组、艾灸组及药物组额叶皮质下 TNF- α ;F~J 为正常组、假手术组、模型组、艾灸组及药物组额叶皮质下 IL-1 β

图 1 各组大鼠额叶皮质下 TNF- α 、IL-1 β 的表达水平

表 2 5 组大鼠治疗后 IL-1 β 检测结果比较($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	n	面积	灰度值	平均光密度
正常组	10	11.236 $\pm$ 2.897	237.423 $\pm$ 53.829	0.330 $\pm$ 0.034
假手术组	10	12.665 $\pm$ 2.420	214.810 $\pm$ 52.532	0.339 $\pm$ 0.038
模型组	10	29.083 $\pm$ 9.737 $\Delta\Delta$	142.559 $\pm$ 18.688 $\Delta\Delta$	0.614 $\pm$ 0.084 $\Delta\Delta$
艾灸组	10	15.190 $\pm$ 3.586 $\Delta\Delta\Delta\Delta$	189.164 $\pm$ 37.144 $\Delta\Delta\Delta$	0.415 $\pm$ 0.037 $\Delta\Delta\Delta\Delta$
药物组	10	21.205 $\pm$ 5.168 $\Delta\Delta\Delta$	161.040 $\pm$ 13.755 $\Delta\Delta\Delta$	0.499 $\pm$ 0.055 $\Delta\Delta\Delta$

表 3 5 组大鼠治疗后 TNF- α 检测结果比较($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	n	面积	灰度值	平均光密度
正常组	10	11.582 $\pm$ 2.298	237.212 $\pm$ 41.8712	0.267 $\pm$ 0.036
假手术组	10	11.664 $\pm$ 3.249	233.931 $\pm$ 35.531	0.156 $\pm$ 0.040
模型组	10	28.706 $\pm$ 6.180 $\Delta\Delta$	154.792 $\pm$ 17.700 $\Delta\Delta$	0.576 $\pm$ 0.098 $\Delta\Delta$
艾灸组	10	15.196 $\pm$ 2.879 $\Delta\Delta\Delta\Delta$	198.368 $\pm$ 21.315 $\Delta\Delta\Delta\Delta$	0.365 $\pm$ 0.029 $\Delta\Delta\Delta\Delta$
药物组	10	19.796 $\pm$ 4.889 $\Delta\Delta\Delta$	172.647 $\pm$ 15.971 $\Delta\Delta\Delta$	0.484 $\pm$ 0.057 $\Delta\Delta\Delta$

改变的主要原因。神经血管单元是美国国立神经病学与卒中研究所(NINDS)首次提出的概念模型^[10]。这个概念首次将脑血管与神经细胞之间的相互作用看成一个整体进行研究。它的结构包括神经元、星型胶质细胞、血管内皮细胞、外基质周细胞及其他支持细胞如小胶质细胞等。研究表明^[11-12],小胶质细胞和星型胶质细胞是脑深部白质炎性细胞因子的主要来源,脑缺血损伤时,小胶质细胞被激活,进而通过自分泌或旁分泌产生大量生物活性因子(IL-1 β 、TNF- α 等),这些生物活性因子不仅可进一步活化小胶质细胞,而且还可以对神经组织产生作用加重炎症反应。TNF- α 、IL-1 β 等炎性细胞因子的释放,还可以导致少突胶质细胞的凋亡和髓鞘的变性。

在中枢神经系统中,IL-1作为一种神经调质,在脑内的含量较低,且以IL-1 β 为主,可参与调节突触可塑性,在学习、记忆功能中有重要作用。在VD等病理情况下,小胶质细胞产生的大量IL-1 β 可诱导血管内皮细胞表达粘附因子,促进浸润,进而释放大量的炎性介质加重炎症反应^[13]。TNF- α 在触发炎症反应过程中处于中心地位^[14],且TNF- α 可协同IL-1 β 诱导其他细胞因子的产生^[15]。脑损伤中TNF- α 的过度表达可产生一系列的损伤性生物学效应如可促进凝血,增加血管内皮细胞的通透性,诱导黏附分子、炎性因子加重组织损害,促进细胞坏死和凋亡,还可诱导氧化酶、蛋白酶的释放引起继发性脑损伤^[16]。TNF- α 可与神经元膜上的受体结合,通过直接和间接途径裂解和激活caspases家族成员,进而引起caspases级联效应,造成神经细胞凋亡^[17]。

SVD是VD的一种重要的亚型,属中医学的“痴呆”“呆病”“神志病”等范畴。人之精神记忆、思维等皆与脑有关,经云:“头者,精明之府也”,“脑为元神之府”、“脑为髓海”,皆说明了神明与脑的关系。本病的病因病机主要是髓海不足、脑络瘀阻,属本虚标实之证,进而出现记忆衰退、情志异常等症状。而艾灸具有温通气血、扶正祛邪之功效,可对本病标本兼顾,既可温经通络,亦有补益之功。化瘀通络灸法所取神庭、百会、大椎皆属督脉,“病变在脑,首取督脉”,故而取之。督脉总督一身之阳,又称“阳脉之海”,有养脑益髓、转输肾精、运行营气等功能。百会为督脉之经穴,是膀胱经与督脉的交会穴,而膀胱经通过此穴“入络脑”;大椎穴为“诸阳之会”,具有“通

调头部气血,促进脑络气血运动”之功;神庭可“醒脑调神”。选用清艾条压灸百会,悬灸神庭、大椎,此法可“化瘀血,通脑络,填髓海,醒神智”。

本实验中模型组大鼠额叶皮质下白质TNF- α 、IL-1 β 含量明显大于正常组,且模型组学习记忆成绩比正常组较差,说明模型大鼠额叶皮质下白质炎性因子TNF- α 、IL-1 β 含量变化与大鼠认知功能减退有内在联系。经艾灸治疗后SVD大鼠学习记忆成绩明显提高,TNF- α 、IL-1 β 含量减少,表明艾灸对SVD大鼠脑保护的作用可能是通过抑制SVD大鼠脑内炎症反应这一途径实现的,为临床治疗SVD提供一定的理论依据。

参考文献:

- [1] Thal DR, Ghebremedhin E, Orantes M, et al. Vascular pathology in Alzheimer's disease: correlation of cerebral amyloid angiopathy and arteriosclerosis/lipohyalinosis with cognitive decline [J]. J Neuropathol Exp Neurol, 2003, 62 (12): 1287-1301.
- [2] Chui H. Dementia due to subcortical ischemic vascular disease [J]. Clinical Cornerstone, 2001, 3(4): 40-51.
- [3] S Engelborghs, N Le Bastard, B Feyen, et al. Overdiagnosis of vascular dementia using structural brain imaging in the context of standard clinical diagnostic criteria [J]. Alzheimer's Dementia: the journal of the Alzheimer's association, 2011, 7(4): S338-S339.
- [4] 陈浩, 王频, 杨骏, 等. 艾灸对血管性痴呆患者症状及脑脊液中神经肽类物质水平的影响 [J]. 中国针灸, 2011, 31(1): 19-22.
- [5] 王频, 杨骏, 杨帆, 等. 化瘀通络灸法治疗血管性痴呆临床观察 [J]. 中国中医急症, 2009, 18(2): 172-174.
- [6] 王频, 杨骏, 柳刚, 等. 艾灸头部穴位为主对血管性痴呆患者脑脊液中生长抑素和精氨酸血管加压素水平影响的随机对照试验 [J]. 中西医结合学报, 2010, 8(7): 636-640.
- [7] 王频, 杨骏, 杨帆, 等. 艾灸头部组穴治疗血管性痴呆的临床研究 [J]. 中华中医药杂志, 2009, 24(10): 1348-1350.
- [8] 王明浩, 张庆萍, 吴生兵, 等. 化瘀通络灸法对皮质下血管性痴呆额叶超微结构的影响 [J]. 针灸临床杂志, 2015, 31(11): 59-61.
- [9] Pulsinelli WA, Brierley JB. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat [J]. Stroke, 1979, 10(3): 267-272.

- [10] Lok J, Gupta P, Guo S, et al. Cell-cell signaling in the neurovascular unit [J]. Neurochem Res, 2007, 32 (12): 2032-2045.
- [11] Benarroch EE. Oligodendrocytes: Susceptibility to injury and involvement in neurologic disease [J]. Neurology, 2009, 72 (20): 1779-1785.
- [12] Sairanen TR, Lindsberg PJ, Brenner M, et al. Differential cellular expression of tumor necrosis factor- α and Type I tumor necrosis factor receptor after transient global forebrain ischemia [J]. J Neurol Sci, 2001, 186 (1-2): 87-99.
- [13] 季杰, 王麟鹏, 刘慧林. TNF- α 、IL-1 β 与缺血性脑血管病的关系 [J]. 首都医药, 2005, 12 (10): 23-25.
- [14] 周艳丽, 滕军放, 赵莘瑜, 等. NBP 对脑 I/R 损伤大鼠脑组织中 TNF- α 、HMGB-1 mRNA 表达的影响及意义 [J]. 山东医药, 2009, 49 (30): 37-38.
- [15] Angelopoulos P, Agouridaki H, Vaiopoulos H, et al. Cytokines in Alzheimer's disease and vascular dementia [J]. International Journal of Neuroscience, 2008, 118 (12): 1659-1672.
- [16] Liu T, Clark RK, McDonnell PC, et al. Tumor necrosis factor- α expression in ischemic neurons [J]. Stroke, 1994, 25 (7): 1481-1488.
- [17] Huang Y, Erdmann N, Peng H, et al. The role of TNF related apoptosis-inducing ligand in neurodegenerative diseases [J]. Cell Mol Immunol, 2005, 2 (2): 113-122.

(编辑:徐建平)

Effect of Huayu Tongluo Moxibustion on the Expressions of Frontal Subcortical TNF- α 、IL-1 β in Subcortical Vascular Dementia (SVD) Rats

ZHANG Fengyun¹, ZHANG Qingping², WU Shengbing³, WANG Mingjie¹
(Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230038, China)

ABSTRACT: **Objective** To observe the effect of Huayu Tongluo Moxibustion on the treatment of subcortical vascular dementia (SVD) rats, and its effect on frontal subcortical inflammatory factors. **Methods** SVD rat models were established according to pulsini's 4-vessel occlusion technique. The model rats were divided into 3 groups by the random digit table, i.e., the moxibustion group, the medicine group, and the model group. The sham-operation group and normal group was also set up. In the moxibustion group rats was acupunctured at Baihui (GV20), Dazhui (GV24), and Shenting (GV14). Donepezil was given to rats in the medicine group by gastrogavage. The above two groups were treated once a day for four weeks. The learning and memory results were observed by step-down avoidance test after treatment. The expressions of frontal subcortical TNF- α , IL-1 β positive cells were detected using immunohistochemical assay. **Results** ① Statistical difference existed in the latent period, the error times of jumping experiment in the moxibustion group and the medicine group when compared with the model group ($P < 0.01$, $P < 0.05$). The moxibustion group was better than the medicine group ($P < 0.01$, $P < 0.05$). ② Expression differences of rats frontal subcortical TNF- α , IL-1 β when compared the moxibustion group, medicine group with model group have statistical meaning. Also Expression differences of TNF- α , IL-1 β when compared the moxibustion group with the medicine group have statistical meaning ($P < 0.05$). **Conclusion** Using Huayu Tongluo Moxibustion to treat SVD may be achieved by restraining the appearance of inflammatory cytokines TNF- α , IL-1 β to improve rats' cognitive function.

KEY WORDS: vascular dementia; Huayu Tongluo Moxibustion; tumor necrosis factor- α ; Interleukin-1 β

欢迎订阅, 欢迎投稿