

电针配艾灸对震颤麻痹大鼠行为学和细胞凋亡影响

赵宇辉¹ 孙忠人² 黄亮³ 李海宁¹

(1 深圳市宝安区观澜人民医院, 518110; 2 黑龙江中医药大学; 3 黑龙江中医药大学附属二院)

关键词 电针, 艾灸; 震颤麻痹; 细胞凋亡

帕金森病 (Parkinson's Disease, PD) 是一种以中脑黑质多巴胺能神经元严重缺失为主要病变, 广泛累及中枢神经系统的较为常见且症候复杂多样的慢性神经元变性疾病。目前其发病机制尚未明确, 但内、外源性神经毒素可能起到重要作用。治疗方面, 针灸治疗 PD 的有效性已为临床及实验研究所证实^[1-2], 尤其是电针或头针已被较多学者研究并证明有效^[3-7]。针刺治疗震颤麻痹是一种行之有效的办法, 近年来关于针刺治疗 PD 的机理, 比较集中于纹状体、尾核、中脑、苍白球系等脑区, 实验室研究多关注于多巴胺 (DA) 的含量变化, 临床指标多以肌电图和脑部电生理改变为主。但前者多处在动物试验阶段, 其他指标少见, 细胞凋亡几乎没有。由于对其获效机制的研究较少, 尤其在电针配艾灸舞蹈震颤区治疗方面, 目前基础研究没有, 因此, 研究关于电针配艾灸舞蹈震颤区治疗 PD 的机理和便捷疗效方面有着更良好的应用前景。我们通过临床上大量病例研究证明其安全有效, 故本研究通过对实验性 PD 大鼠的电针艾灸治疗, 观察电针配艾灸对 PD 模型大鼠行为学及黑质神经细胞凋亡的影响, 对治疗 PD 的机制进行进一步探讨, 同时提出新的更高效便捷的方法。

1 实验材料

SD 大鼠, 健康雄性, 体重 230 ~ 260g, 清洁级 (由黑龙江中医药大学动物中心提供), 6-羟基多巴胺 (6-OHDA, HBr), 购自美国 Sigma chemical Co 公司。阿朴吗啡 Apomorphine. HCl, APO, 购自美国 Sigma chemical Co 公司。TUNEL 细胞凋亡试剂盒购自美国 Sigma chemical Co 公司。

2 实验方法

2.1 实验动物分组 72 只大鼠随机分成 6 组, 每组 12 只。正常组 (12 只)、假手术组 (12 只)、模型组 (12 只)、电针组 (12 只)、药物组 (12 只)、电针配艾灸组 (12 只)。正常对照组: 常规饲养。常温常湿, 自由饮水。假手术组: 进行建立实验模型手术, 不注入 6-OHDA。手术后不作其他处理。模型组: 建立实验模

型后不作其他处理。电针组: 造模后给予电针治疗。造模后, 取右侧舞蹈震颤区 (位于运动区前 1.5cm 的平行线即是) 上点与下点用 0.25mm × 25mm 毫针刺, 连接 KWD-808 II 型全能脉冲电疗仪, 疏密波, 频率 1HZ, 电压 0.1V, 强度以大鼠摆尾为度, 每日 1 次, 时间 30min, 共治疗 20 天。左旋多巴药物组: 造模后给予 400mg/kg 的剂量左旋多巴灌胃治疗, 每日 1 次, 共治疗 20 天。电针配艾灸组: 造模后给予电针和艾灸治疗。电针方法同电针组, 同时艾灸每日 1 次, 时间 30min, 共治疗 20 天。

2.2 实验模型的建立 手术前准备, 成熟健康 SD 大鼠, 雄性, 体重 230 ~ 260g。动物在室温下笼中常规喂养, 术前不禁食。6-羟基多巴胺溶于 0.02% 的抗坏血酸液中配制成 0.2% 的溶液, -20℃ 冰箱密封避光保存备用。阿朴吗啡用双蒸水配成 0.01% 溶液备用, 以上溶液要求严格无菌。选择性右侧偏侧大鼠 PD 模型^[8-9], 制备动物用 0.3% 戊巴比妥钠 10mL/kg 腹腔注射麻醉后, 固定在立体定位仪上。在无菌条件下, 正中切开大鼠颅顶部皮肤, 剥离骨膜, 暴露前囟、人字缝。用鼠颅骨钻于手术要求部位钻一直径为 5mm 的颅骨孔。参照 Pellegrino 等^[10-12]大鼠脑立体定位图谱, 参看 Whishaw 等体重在 180 ~ 250g 范围内的大鼠使用此图谱的数学折算方法, 确定右侧黑质部位坐标位置。用微量进样器分 2 次将 6-OHDA 按下列坐标位置注入右侧黑质部建立右侧选择性大鼠 PD 模型。B 坐标系: 外耳道连线低于上门齿板上缘 5mm, 即水平 0 平面。第 1 次注射 4μL, 针尖斜面朝嘴侧, 坐标为前囟后 3.0mm, 正中右侧 2.5mm, 硬脑膜腹侧 8.6mm。第 2 次注射 3μL, 针尖斜面朝尾侧, 坐标为前囟后 2.4mm, 正中右侧 2.7mm, 硬脑膜腹侧 8.6mm。注射速度为 1μL/min, 每次注射完毕留针 10min, 然后以 1.0mm/min 速度缓慢拔针。手术完毕, 用医用明胶海绵填塞颅骨孔, 缝合切口, 放回笼中喂养。APO 诱发动物旋转行为观察造模术后 2 周, 大鼠腹腔注射 0.01% APO 10mL/kg 诱发大鼠旋转行为, 验证 6-OHDA 对中脑黑质 DA 神经元的损伤效应。注射 APO 10min 开始记录, 共记录 30min。旋转速度达到 6

转/min 视为选择性偏侧大鼠 PD 模型制备成功。

3 观察指标测定、统计分析

3.1 行为学检测 分别于治疗前及治疗后对各组大鼠进行 APO 诱发的旋转行为测试,比较治疗前后行为学的改变。

3.2 测定组织中的细胞凋亡 原位末端标记法 (TUNEL 法)检测细胞凋亡:切片滴加蛋白酶 K,消化 5min,TBS 漂洗,滴加末端标记酶置温盒内 37℃ 水浴 2h,TBS 漂洗封闭液室温孵育 30min,TBS 漂洗,DAB 显色,显微镜观察。细胞核中有棕黄色颗粒者为 TUNEL 染色阳性的凋亡细胞。美国计算机图象分析处理系统上,测定阳性细胞数目的平均光密度 (IOD/area)。

3.3 统计学方法 采用 SPSS17.0 统计软件做分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用单因素方差分析,q 检验。

4 结果

4.1 行为学检测 表 1 显示,治疗前模型组、电针组、药物组、电针配艾灸组之间 PD 大鼠旋转次数无显著性差异;治疗后电针组、药物组 PD 大鼠旋转次数明显少于模型组 ($P < 0.01$),其中电针组和药物组无明显差异 ($P > 0.05$)。治疗后电针配艾灸组 PD 大鼠旋转次数明显少于电针组、药物组 ($P < 0.01$)。

表 1 针刺对 PD 大鼠旋转次数的影响 [$\bar{x} \pm s$ 次/分]

组别(每组 12 只)	治疗前	治疗后
正常组	0	0
假手术组	0	0
模型组	7.66 ± 0.20	9.37 ± 0.10
电针组	8.49 ± 0.15	4.90 ± 0.37**
药物组	7.58 ± 0.14	3.58 ± 0.41**
电针配艾灸组	9.76 ± 0.45	1.79 ± 0.29**△△

注:与模型组比较,** $P < 0.01$,与电针组、药物组、电针配艾灸组比较,△△ $P < 0.01$ 。

表 2 针刺治疗对 PD 模型大鼠细胞凋亡平均光密度的影响($\bar{x} \pm s$)

组别(每组 12 只)	治疗前	治疗后
正常组	0.35 ± 0.07	0.35 ± 0.07
假手术组	0.41 ± 0.08	0.41 ± 0.08
模型组	0.66 ± 0.12	28.67 ± 4.48
电针组	29.06 ± 5.87	14.50 ± 3.19**
药物组	30.23 ± 7.01	15.47 ± 3.68**
电针配艾灸组	27.44 ± 6.23	7.46 ± 2.01**△△

注:与模型组比较,** $P < 0.01$;与电针组、药物组、电针配艾灸组比较,△△ $P < 0.01$ 。

4.2 纹状体多巴胺能神经元凋亡的检测 表 2 显示,治疗前模型组、电针组、药物组之间 PD 大鼠细胞凋亡无显著性差异,治疗后电针组、药物组 PD 大鼠细胞凋亡明显少于模型组 ($P < 0.01$)。其中电针组和药物组

无明显差异 ($P > 0.05$)。治疗后电针配艾灸组 PD 大鼠凋亡明显少于电针组、药物组 ($P < 0.01$)。

5 讨论

中医认为 PD 为“内风”所致,肝主风,主筋,本病的主症震颤、强直、运动减少等均为筋脉失养的表现,所以选择电针配艾灸“舞蹈震颤区”作为治疗手段,同时也填补了国内外无电针配艾灸舞蹈震颤区治疗震颤麻痹的动物实验研究^[13]。研究结果显示,模型组中脑黑质神经细胞凋亡阳性数最高,电针治疗、美多巴治疗后神经细胞凋亡阳性数明显减少^[14] ($P < 0.01$)。但是 2 个治疗组之间神经细胞凋亡阳性数无明显差异 ($P > 0.05$)。电针配艾灸对震颤麻痹大鼠的治疗作用优于电针组。本研究结果提示电针配艾灸治疗 PD 行为学变化可能是通过抑制中脑黑质神经细胞凋亡起作用的,其效应优于美多巴治疗,为临床提供了一种简、便、廉、效的治疗方法。至于其抑制中脑黑质神经细胞凋亡的具体作用途径尚有待进一步深入研究。

参考文献

- [1]陶怀玉.电针加穴位注射治疗震颤麻痹 42 例临床观察.中国针灸,1989,5:17.
- [2]罗明富.电针治疗震颤麻痹的实验研究.中国针灸,1994,5:39.
- [3]罗恩丽,赵法政,李桂芝.针刺苍白球内侧部治疗帕金森病模型大鼠 NOS 的影响.针灸临床杂志,2007,23(1):54-55.
- [4]戚秀杰,王顺.针灸治疗帕金森病临床研究进展.针灸临床杂志,2007(7):69-70.
- [5]龚誉华,迟艳茹,程为平.程为平教授针灸治疗帕金森病的临床经验.针灸临床杂志,2008,24(9):54-55.
- [6]王淑杰.高维滨头针配合电项针治疗帕金森病 30 例.针灸临床杂志,2008,24(11):16-17.
- [7]李云梅.电针结合祛风止动颗粒治疗帕金森病大鼠模型的实验研究.针灸临床杂志,2009,25(7):50-51.
- [8]Perese DA,Ulman J,Viola J,et al. A6 - hydroxydopamine - induced selective parkinsonian rat model. Brain Res,1989:494-285.
- [9]Thomas J,Wang J,Takubo H,et al. A6 - hydroxydopamine - induced selective parkinsonian rat model;further biochemical and behavioral characterization. Exp Neurol,1994,126:159.
- [10]Pellegrino LJ,Pellegrino AS,Cushman AJ. A stereotaxic atlas of the rat brain. 2 nd edition. Plenum press,1979:43.
- [11]Ziv I,Melamed E,Nardi N,et al. Dopamine induces apoptosis - like cell death in cultured chick sympathetic neurons;a possible novel patho-genetic in Parkinson's disease. Neurosci Letter,1994,170:136.
- [12]Tompkins MM,Basgall EJ,Zamrini E,et al. Apoptotic - like changes in Lewy - body - associated disorders and normal aging in substantial nigral neurons. Am J Pathol,1997,150(1):119.
- [13]张旺明,徐如祥,蔡颖谦,等. 6 - 羟基多巴胺诱导帕金森病模型鼠黑质神经细胞凋亡.中华老年医学杂志,2000,19(2):119-121.
- [14]SUN Zhong - ren,LI Xiao - ning,ZHAO Yu - hui,et. Gene control of acupuncture and moxibustion preconditioning on apoptosis in ischemic cardiac muscle of rats with re - perfusion. Journal of Harbin' Institute of Technology,2008,15(3):341.

(2010-02-04 收稿)