

针刀干预对帕金森病模型大鼠小胶质细胞及 IL-1 β 表达的影响

马薇薇¹ 郭长青¹ 芦娟¹ 杜宁宇¹ 梁靖蓉¹ 吴桐¹ 卢胜春²

(1 北京中医药大学针灸推拿学院, 北京, 100029; 2 江西省德兴市胜春医院, 江西, 334200)

摘要 目的:探讨针刀疗法治疗帕金森病(Parkinson's Disease, PD)的炎性作用机制。方法:将48只大鼠随机分为正常组、模型组、针刀组、电针组。采用立体定位技术将6-羟基多巴胺(6-DAOH)注入大鼠右侧纹状体制备PD大鼠模型。针刀组于枕下肌群和C1-2横突处进行松解干预,2次/周,连续4周;电针组选“百会”“太阳”穴,由“百会”透刺“太阳”穴进行电针干预,3次/周,连续4周。采用HE染色光镜下观察神经元细胞形态、数目及小胶质细胞数目变化,酶联免疫吸附法(ELISA)检测IL-1 β 的水平。结果:与正常组比较,模型组大鼠损毁侧多巴胺能神经元细胞数目减少,小胶质细胞数目增多,IL-1 β 水平升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);与模型组比较,针刀组和电针组大鼠损毁侧多巴胺能神经元细胞数目增多,小胶质细胞数目减少,IL-1 β 水平降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论:针刀疗法可以改善多巴胺能神经元的形态和数目,其机制可能是通过抑制小胶质细胞激活介导的炎性反应,降低炎性因子IL-1 β 的含量,从而治疗PD。

关键词 帕金森病;针刀;6-羟基多巴胺(6-DAOH);白介素-1

Effects of Acupotomy on Microglia and the Expression of IL-1 β in Parkinson's Diseases

Ma Weiwei¹, Guo Changqin¹, Lu Juan¹, Du Ningyu¹, Liang Jingrong¹, Wu Tong¹, Lu Shengchun²

(1 College of Acupuncture and Moxibustion, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China;

2 Shengchun hospital of Dexing city, Jiangxi 334200, China)

Abstract Objective: To explore the mechanism of acupotomy in Parkinson's disease (PD). **Methods:** Forty-eight rats were randomly divided into a model group, a normal group, an acupuncture group and an acupotomy group. Using the technology of Stereo-positioning to inject the 6-hydroxy dopamine (DAOH) into the right striatum of rats to build PD rats model; Rats in the acupotomy group were treated by disposable acupotomy at suboccipital muscle group and transverse process of C1-2, twice a week for continued four weeks. Electroacupuncture (EA) group were treated by acupuncture at Baihui and Taiyang, to strike Taiyang from Baihui, third a week for four weeks. HE staining method was used for observation of morphology, quantity of neurons and quantity of microglia, and Elisa method was used for testing the expression of IL-1 β . **Results:** Compared with the normal group, the quantity of the dopaminergic neurons in the damaged side of PD model group obviously decreased, while microglia increased, and the level of IL-1 β was improved with significant difference ($P < 0.05$). Compared with the model group, the quantity of the dopaminergic neurons in the damaged side of the acupotomy and EA group increased obviously, while microglia decreased, and the level of IL-1 β was alleviated with significant difference ($P < 0.05$). **Conclusion:** Acupotomy can improve the morphology and quantity of dopaminergic neurons and its mechanism may be mediated by inhibition of microglia activation of inflammatory reaction, reducing the content of inflammatory cytokines IL-1 β , thus to treat PD.

Key Words Parkinson's disease; Acupotomy; 6-hydroxy dopamine; IL-1 β

中图分类号:R245.31 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2017.05.041

帕金森病(Parkinson's Disease, PD)是老年人多发的神经系统疾病,其特征性病理学表现是中脑黑质多巴胺(DA)能神经元细胞的变性和丢失。迄今为止,其病因尚未完全明确,神经系统老化、遗传因素、内外环境因素、氧化应激反应、免疫异常、线粒体功能障碍与细胞凋亡等假说较为流行^[1],其中神经

炎性反应在PD发病过程中持续发挥作用,理由可归结如下:非甾体类抗炎药物可降低PD的患病率^[2];炎性反应信号通路MAPKs及HLA基因位点与PD患病风险存在相关性^[3-4];应用追踪剂PK11195标记活体PD大鼠脑内的小胶质细胞,并使用PET-CT扫描证实了小胶质细胞被激活^[5];PD患

基金项目:企事业单位委托科技项目(编号:535104032)——针刀治疗帕金森病机制的研究

作者简介:马薇薇(1991.06—),女,硕士研究生三年级,研究方向:针刀理论与临床研究,E-mail:244296978@qq.com

通信作者:郭长青(1959.01—),男,硕士,教授,博士研究生导师,研究方向:针刀理论与临床研究,Tel:(010)64286687,E-mail:guochanqing66@163.com

者尸检显示存在促炎性递质^[6]。故认为炎性因子水平的升高是导致 PD 的重要因素之一。临床上已有实践证明,针刀治疗 PD 具有很好的效果^[7],但相关的实验性研究较少。本实验采用立体定位技术将 6-羟基多巴胺(6-DAOH)注入大鼠右侧纹状体制备 PD 大鼠模型,观察针刀干预对小胶质细胞及白介素细胞 1(IL-1 β)表达的影响,探讨针刀治疗 PD 的炎性机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 选用 SPF 级的健康雄性 SD 大鼠共 48 只,周龄 12 周,重量为(200 $\pm$ 20) g,购买于北京维通利华公司实验动物中心,该动物许可证号为 SCXK(京)2012-0001。实验前 1 周选购大鼠,并将大鼠随机分为模型组、正常组、针刀组、电针组 4 组,于北京中医药大学 SPF 级实验室内适应性饲养 1 周,自由进食饮水。第 2 周进行实验,术前 12 h 内禁食不禁水。

1.1.2 试剂与仪器 6-羟基多巴胺(6-DAOH)和阿扑吗啡(APO)(美国 Sigma),水合氯醛(天津科密欧化学试剂中心),多聚甲醛(常德市华生医疗器械有限公司),HE 染色试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司);0.9% 氯化钠溶液(哈药集团三精制药有限公司)。汉章系列一次性针刀:规格 0.4 mm $\times$ 40 mm(北京卓越华友医疗器械有限公司);中研太和牌针灸针:规格 0.25 mm $\times$ 25 mm(北京中研太和医疗器械有限公司);韩氏电针治疗仪;5 mL 微量进样器(上海安亭微量进样器厂);脑立体定位仪(美国 Stoelting 公司),AE-160 电子天平(瑞士 MET-TLER 公司),人 IL-1 β 试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 分组与模型制备 48 只 SD 大鼠随机分为正常组、模型组、针刀组和针灸组。以 10% 的水合氯醛腹腔内注射麻醉,用剃毛机剔除颅顶部鼠毛,将动物头部固定在立体定位仪上,头部备碘伏消毒后,用手术刀片在右耳前做长 1.5 cm 的切口,处理切口面至暴露出前囟,确定前囟坐标。按照包新民^[8]的《大鼠脑立体定向图谱》定位注射靶点坐标如下:1)第 1 点为前囟前 0.7 mm,顶正中线右 3.0 mm,深度为 4.5 mm(不包括颅骨的厚度);2)第 2 点为前囟后 0.2 mm,顶正中线右 2.6 mm,深度为 6.0 mm^[3]。打开微型电钻,采用持笔式持微型电钻,电钻保持与大鼠大脑骨面垂直,并按上述坐标钻孔,将

15 μ g 的 6-OHDA 溶于 3 μ L 的生理盐水(含 0.2% 维生素 C)中,以 5 μ L 微量注射器向脑内 2 个预定靶点缓缓注入,注完后留针约 10 min。退针时,以 1 mm/min 的速度缓缓出针,并用手术弯镊取适当大小的海绵明胶填塞钻孔,用手术线缝合。腹腔注射青霉素钠 8 万 U 后将大鼠放回笼中保温修养。正常组不作任何处理。术后 4 周腹腔注 0.01% 的 APO(0.5 mL/kg),开始观察并记录大鼠旋转的启动时间、持续时间、启动后 60 min 内旋转圈数,记录大鼠注射后的行为变化,记录标准为头尾相接并向健侧恒定旋转,若大鼠旋转圈数为 7 次/min 以上,则视为造模成功。

1.2.2 干预方法 正常组、模型组正常饲养不予以治疗,共 4 周。针刀组选用汉章系列一次性使用针刀,规格 0.4 mm $\times$ 40 mm(北京卓越华友医疗器械有限公司)。治疗点及操作步骤:选取枕下肌群和 C1-2 横突点,用紫药水在进针刀部位做“ $\times$ ”型记号,进针刀时刀口线的方向与脊柱方向平行,刀体与大鼠皮毛面垂直刺入,针刺至枕骨骨面和 C1-2 横突处,当刀口接触骨面时,按刀口线方向纵行疏剥,迅速出刀并加压片刻,防止出血,治疗 2 次/周,共治疗 4 周。电针组参照文献全国针灸学会实验针灸研究会制定的“实验动物针灸穴位图谱”^[6],选取“百会”“太阳”位置,用 0.25 mm $\times$ 25 mm 毫针刺刺,沿皮由百会透刺单侧太阳,刺毕接韩氏电针治疗仪,疏密波,频率 100 Hz,强度约 2 mA,电针强度以大鼠头部微颤为宜,使动物不挣扎嘶叫保持安静为度,治疗 3 次/周,20 min/次,共治疗 4 周。

1.2.3 检测指标与方法

1.2.3.1 病理标本制备 取各组大鼠 4 只,腹腔注射 10% 的水合氯醛,麻醉后,先用生理盐水灌注胸腔内,后以提前配制好的多聚甲醛进行固定,固定好后立即断头取脑,在冰袋上迅速分离出大鼠的纹状体,并将其置于 4% 的多聚甲醛溶液中进行后固定。常规脱水,石蜡包埋,连续冠状切片,采用 HE 染色光镜下观察黑质内多巴胺能神经细胞的形态。另外取各组 8 只大鼠麻醉状态下处死后快速断头取脑,在冰面上迅速分离出右侧纹状体,用 0.32 mmol/L 含蛋白酶抑制剂的蔗糖液制作组织匀浆,15 000 r/min 离心 10 min,采用酶联免疫吸附 Elisa 法检测上清液白介素细胞-1(IL-1 β)的水平。

1.2.3.2 HE 染色检测步骤 石蜡切片脱蜡至水;用苏木精液在室温条件下染色 5 min,自来水充分冲洗 1 min;盐酸分化 30 s;水稍洗至促蓝液返蓝;置于

1%的伊红液染 2 min;梯度乙醇常规脱水,透明,封片。结果显示:胞质呈粉红色,细胞核呈蓝紫色。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 21.0 统计软件对本实验所得数据进行统计,各组数据最终结果以($\bar{x} \pm s$)表示,选用随机区组多组间方差分析检验方法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 形态学观察 光镜下观察,正常组的 DA 神经元细胞形态完整,细胞及神经纤维排列较整齐,核呈现卵圆形或椎形,且细胞核大,较为清晰,核仁较明显;模型组:DA 神经元细胞数目明显减少,部分细胞固缩且体积较正常组小,神经纤维排列散乱,细胞核形态大小不一,且偏居一侧,核仁不清晰,此外在脱失的多巴胺能神经元细胞周围,分布着大量核小、深染,呈扁圆形或三角形的小胶质细胞;电针组:神经元细胞数目增多,小胶质细胞数量减少,神经纤维排列较整齐;针刀组神经元细胞数目增多,小胶质细胞减少,较模型组改善明显。

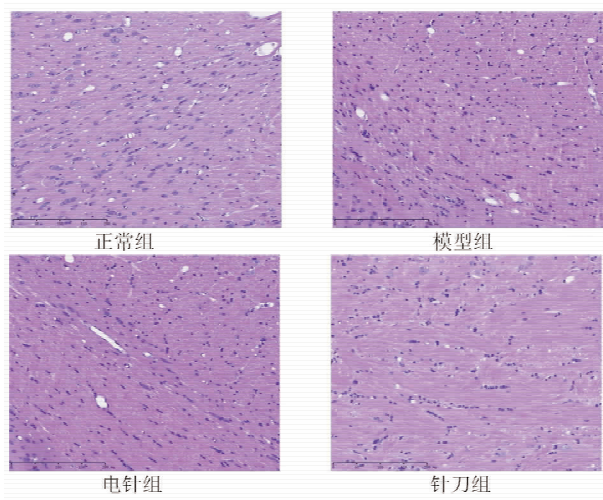


图1 各组大鼠纹状体多巴胺能神经元细胞形态学变化(HE染色,4×20倍)

表1 白介素细胞1(IL-1β)含量比较($n, \bar{x} \pm s$)

组别	只数	IL-1β 含量
正常组	8	15.85 ± 4.23
模型组	8	50.70 ± 9.96 **
针刀组	8	22.28 ± 4.94 △△
电针组	8	26.22 ± 8.64 ▲▲

注:与正常组比较, ** $P < 0.01$;与模型组比较, △ $P < 0.01$, ▲ $P < 0.01$ 。

2.2 白介素细胞1(IL-1β)含量比较 结果显示,与正常组比较,模型组大鼠纹状体内 IL-1β 水平明显升高,差异有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,针刀组、电针组大鼠纹状体内 IL-1β 水平均明显降低,差异有统计学意义($P < 0.01$),说明电针治疗

和针刀干预能有效降低大鼠纹状体内 IL-1β 的含量;针刀组大鼠纹状体内 IL-1β 的含量略低于电针组,2 组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

3 讨论

通过诸多参考文献显示,PD 模型的选择是制备大鼠 PD 模型的关键,目前常用的方法是利用物理或化学的方法损毁多巴胺能系统。建立该模型,一种是浅静脉注入甲基-苯基-四氢吡啶制备模型,通常选择 C57BL/6J 的小鼠作为造模对象;另一种采用大鼠立体定位仪将 6-OHDA 注入大鼠中脑纹状体中制备模型,一般选取大鼠作为造模对象。因小鼠个体小,取脑组织研究相对困难,而且针刀松解剥离范围较大,损伤程度亦大,针刺时不容易精准定位,所以根据实验需求,本实验选取个体大,容易精准定位的大鼠进行 6-OHDA 单侧纹状体进行模型制备,采用单侧而非双侧是根据王刚等人的研究认为单侧损毁的方法成熟、操作相对容易、死亡率较低且模型稳定性高^[9]。Ungerstedt 于 1968 年首先报道了采用 6-OHDA 制作 PD 动物模型,他提出,动物的旋转模型特点与人类 PD 发病的特点相似^[10]。研究表明注入 6-OHDA 后对纹状体黑质的损伤在 6 个月到 10 个月内无显著的改变,且不存在纹状体再生现象,证明本模型稳定性较高^[11]。

近年来的临床医家治疗 PD 主要是以头针为主,配合腹针、中药、拔罐等多种针法综合治疗在改善 PD 症状方面疗效较为肯定^[12-14]。亦有医家运用针刀疗法治疗 PD 取得良好的效果,如肖德华^[15]选取颈背部为治疗点,治疗 PD 疗效显著。周蕾^[16]等人运用头皮电针结合督脉接力针、针刀综合治疗 PD 疗效佳,安全性好。本实验以枕下肌群和 C1-2 横突点为进针刀点,是通过松解枕下肌群和刺激颈上交感神经节,改善颈部肌肉痉挛引起的脑血循环和代谢障碍。有学者从影像学证实了寰枕段和横突段容易受软组织炎性压迫等因素刺激导致血管痉挛出现眩晕、头痛、恶心、呕吐、视觉障碍等缺血症状^[17]。由于颈上神经节支配颈内动脉,而颈内动脉的分支大脑中脉是中脑血供的主要动脉,所以大脑中动脉的供血间接受颈上交感神经节影响。肖德华^[18]认为在 PD 患者中,黑质内多巴胺含量的不足与脑供血相关,因合成多巴胺的原料来源于血液,而原料的缺乏是导致黑质内多巴胺含量不足的主要原因。由此我们推测,通过刺激枕下肌群和 C1-2 横突,能改善 PD 患者寰枕段肌肉软组织损伤及颈上交感神经节压迫状态,直接或间接的影响大脑中动脉供应黑

质的血运,增加脑内多巴胺的合成原料,从而减轻 PD 的症状。

脑内 IL-1 有 IL-1 α 和 IL-1 β 2 种亚型,但以 IL-1 β 为主,可参与免疫调节、介导炎性反应等。许多外源性刺激或病理状态可以使 IL-1 β 的分泌水平明显升高。Mogi^[19] 等人经活检发现,PD 患者纹状体尾状核、壳核处的 IL-1 β 等炎性细胞因子的浓度高于大脑皮质区。杨海华^[20] 等认为中枢神经系统退变性疾病过程中细胞因子水平持续升高,会对神经元产生损伤作用,其中对神经元产生损伤作用的主要有 TNF- α 、NO、IL-1 β 、TNF- γ 。大量体外研究发现神经细胞表面都有相应受体的表达,既可以直接对表达相应受体的神经元细胞产生毒性作用,也可以通过进一步活化小胶质细胞这样一个间接的途径,产生一系列神经毒性物质。由于小胶质细胞是 IL-1 β 的主要来源,IL-1 β 可上调小胶质细胞的活性,使小胶质细胞分泌更多的前炎性细胞因子,导致炎性损害进一步加重。Griffin^[21] 等人研究认为 IL-1 β 基因的多态性可以使 AD 的发病风险增加 6 倍。小胶质细胞的激活和炎性因子白介素的释放在 PD 的发病机制和其慢性病程发展中起重要作用^[22]。所以抑制小胶质细胞的激活和炎性反应是缓解 PD 进程之一。

在本实验结果中,与正常组比较,模型组 PD 大鼠的 DA 神经元细胞数目明显减少,部分细胞固缩且体积减小,神经纤维排列较散乱,细胞核形态不一,核仁不清晰,变性的神经元细胞周围存在大量神经胶质细胞,ELisa 检测显示 IL-1 β 细胞表达上调;电针组和针刀组大鼠多巴胺能神经元细胞形态得到改善,ELisa 检测显示 IL-1 β 细胞表达下降。结果说明 6-OHDA 介导的模型大鼠中多巴胺能神经元存在着严重损害,而针刀治疗能显著提高模型大鼠黑质多巴胺能神经元数量,改善神经元细胞形态,反应出针刀干预对模型大鼠黑质多巴胺能神经元具有明显的保护作用。此外,炎性反应细胞因子 IL-1 β 的表达可能造成神经元细胞变性丢失,参与了 PD 的发病过程。模型组和针刀组小胶质细胞数目的变化提示小胶质细胞被激活也可能是 IL-1 β 的主要来源。说明针刀调节多巴胺能神经元的变性是通过抑制小胶质细胞激活介导的炎性反应,下调细胞因子 IL-1 β 的表达来减轻神经元损伤的。针刀可通过降低大鼠纹状体内 IL-1 β 的表达,减轻炎性反应对多巴胺能神经元的损伤,一定程度上阻止多巴胺能神经元变性丢失进程从而治疗 PD。

参考文献

- [1] 国华,宋军平. 帕金森病发病机制最新国内外研究进展[J]. 职业与健康,2012,28(4):490-492.
- [2] Jacobs E, Schwarzschild M. A, A. Ascherio, 等. 非甾体抗炎药的使用与帕金森病风险的关系[J]. 世界核心医学期刊文摘:神经病学分册,2006,1(5):16.
- [3] 徐评议,孙丛丛. HLA-DRB1 等位基因与散发性帕金森病易感性的相关性研究[A]. //中华医学会第十七次全国神经病学学术会议论文汇编(下)[C]. 厦门:2014.
- [4] 龚元勋. 针刺对帕金森病模型大鼠脑内 MAPKs 信号通路及炎症反应的作用研究[D]. 武汉:湖北中医药大学,2014.
- [5] 高靛,张玉虎,王丽娟. 帕金森病与神经免疫炎症研究的新进展[J]. 临床神经病学杂志,2014,27(3):234-236.
- [6] 陈清,赵杨. 炎性反应与帕金森病的研究进展[J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志,2015,22(6):434-437.
- [7] 肖德华,齐丹丹. 针刀松解法治疗帕金森病[J]. 世界针灸杂志(英文版),2012,22(2):60-63.
- [8] 包新民,舒斯云. 大鼠脑立体定位图谱[M]. 北京:人民卫生出版社,1991:19-49.
- [9] 王刚,郑静. 6-OHDA 损毁帕金森大鼠模型和 MPTP 诱导帕金森小鼠模型的比较[J]. 南京医科大学学报:自然科学版,2010,30(3):383-385.
- [10] 周厚广,陆建明,鲍远程,等. 6-羟基多巴胺帕金森大鼠模型的建立与评价[J]. 中国行为医学科学,2002,11(1):4-7.
- [11] 蒋花,王顺. 头部电针透穴对帕金森病模型大鼠细胞凋亡的作用机制研究[D]. 哈尔滨:黑龙江省中医研究院,2008.
- [12] 陈秀华,李漾,奎瑜. 腹针配合美多巴治疗帕金森氏病临床观察[J]. 中国针灸,2007,27(8):562-564.
- [13] 丁淑强. 针刺配合刺络拔罐治疗震颤麻痹 87 例疗效观察[A]. 天津国际针灸暨中医临床学术会议[C]. 天津,2000:737-737.
- [14] 张晶,刘璇,刘琛,等. 针刺配合中药治疗震颤麻痹 32 例临床观察[J]. 中国民康医学,2005,17(10):624-624.
- [15] 肖德华,齐丹丹. 针刀松解法治疗帕金森病[J]. 世界针灸杂志(英文版),2012,22(2):60-63.
- [16] 周蕾,郑水红. 针刺结合针刀治疗帕金森病的疗效对照观察[J]. 针灸临床杂志,2014,30(5):14-17.
- [17] 徐小柳,李殿宁,周建斌,等. 针刀定点松解枕下肌群治疗椎动脉型颈椎病 30 例临床观察[J]. 江苏中医药,2016,48(5):64-66.
- [18] 肖德华. 帕金森病的针刀颈部治疗及病因新释(附 5 例典型病例报告)[J]. 临床荟萃,2010,25(10):907-908,封 2.
- [19] 成晓华,刘斌,马原源,等. 咪多吡对帕金森病模型大鼠黑质炎性因子 TNF- α 、IL-1 β 、IFN- γ 表达的影响[J]. 免疫学杂志,2014,30(8):671-676.
- [20] 杨海华,徐评议,刘焯霖. 小胶质细胞与中枢神经系统变性疾病[J]. 国外医学:内科学分册,2006,33(1):36-39.
- [21] Griffin W S, Mrak R E. Interleukin-1 in the genesis and progression of and risk for development of neuronal degeneration in Alzheimer's disease[J]. Journal of Leukocyte Biology,2002,72(2):233-238.
- [22] 李淑娟. 小胶质细胞与白介素在帕金森病发病机制中作用的实验研究[D]. 长春:吉林大学,2005.