

电针对 APP/PS1 转基因小鼠海马 P-糖蛋白和间质液 β 淀粉样蛋白水平的影响

周英奕¹ 高誉珊² 李丽娜² 毛颖秋² 张磊¹ 张学婷¹ 裴亚妮¹ 薛卫国¹

(1 北京中医药大学针灸推拿学院,北京,100029; 2 北京中医药大学中医学学院,北京,100029)

摘要 目的:通过观察电针对 APP/PS1 双转基因小鼠海马 P-糖蛋白表达和脑间质液 $A\beta$ 水平的影响,探讨电针治疗阿尔茨海默病的作用机制。方法:12 只 4 月龄雄性 APP/PS1 转基因鼠,随机分为电针组和模型组;6 只 4 月龄雄性 C57BL 鼠为正常对照组。电针“百会”“涌泉”2 周后,采用脑微透析检测技术取小鼠脑间质液,ELISA 法检测小鼠间质液 $A\beta$ 水平;免疫组化法观察小鼠海马 P-糖蛋白表达情况。结果:免疫组化结果显示,与正常对照组比较,模型组 P-糖蛋白表达明显减少;与模型组比较,电针组的表达相对增加。ELISA 检测显示,与正常对照组比较,模型组的间质液 $A\beta$ 明显减少;与模型组比较,针刺组 $A\beta$ 水平明显下降。结论:电针可以降低脑间质液 $A\beta$ 水平,并可以升高海马内 P-糖蛋白的表达。

关键词 阿尔茨海默病; β 淀粉样蛋白; APP/PS1 转基因小鼠; 脑组织间质液; P-糖蛋白; 电针

Effects of Electroacupuncture at Baihui (DU 20) and Yongquan (KI 1) on P-glycoprotein and Brain Interstitial Fluid β -amyloid in APP/PS1 Transgenic Mice

Zhou Yingyi¹, Gao Yushan², Li Li'na², Mao Yingqiu², Zhang Lei¹, Zhang Xueting¹, Pei Yani¹, Xue Weiguo¹

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

2 School of Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

Abstract Objective: To observe the effect of electroacupuncture on the level of P-glycoprotein and brain interstitial fluid $A\beta$ in hippocampus in APP/PS1 transgenic mice, and to explore the mechanism of electroacupuncture in the treatment of Alzheimer's disease. **Methods:** Twelve male APP/PS1 transgenic mice were divided into electroacupuncture group and model group randomly. Six male C57BL mice were used as normal control group. The level of $A\beta$ in the interstitial fluid of mice was detected by Elisa method after two weeks of electroacupuncture at Baihui (DU 20) and Yongquan (KI 1). The expression of P-glycoprotein in hippocampus was observed by immunohistochemistry. **Results:** Immunohistochemical results showed that the expression of P-glycoprotein was significantly decreased ($P < 0.01$) in the model group when compared with the normal control group, and the expression of P-glycoprotein in the EA group was significantly increased ($P < 0.05$) compared with the model group. ELISA test showed that the level of brain interstitial fluid $A\beta$ in the model group was lower ($P < 0.01$) than the level in the control group significantly. Compared with the model group, the level of $A\beta$ in the acupuncture group was significantly decreased ($P < 0.01$). **Conclusion:** Electroacupuncture can decrease the level of brain interstitial fluid $A\beta$ and increase the expression of P-glycoprotein in hippocampus, which may explain why the EA have effects on AD.

Key Words Alzheimer's disease; β -amyloid; APP/PS1 transgenic mice; Brain interstitial fluid; P-glycoprotein; Electroacupuncture

中图分类号:R277.7 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2018.03.040

阿尔茨海默病 (Alzheimer's Disease, AD) 是一种慢性进行性疾病,是痴呆最常见的一种类型,主要临床表现为认知功能障碍、渐进性记忆障碍等神经精神症状。AD 的主要病理特征是由 β 淀粉样蛋白 (β -Amyloid, $A\beta$) 沉积导致形成的老年斑块 (Senile Plaques, SP) 堆积^[1-2]。 $A\beta$ 级联学说是目前国际较为公认的 AD 发病学说^[3],该学说认为脑中 $A\beta$ 的生

成与清除失衡导致的沉积,是形成淀粉样斑块的原因^[4]。

研究认为 $A\beta$ 在神经元外的沉积对神经元产生的损伤和破坏,是导致记忆 AD 病理改变的原因之一^[5]。目前研究的靶点是通过降低脑内 $A\beta$ 水平,减轻其神经毒性,缓解疾病进程。脑中的 $A\beta$ 主要分为可溶性和不可溶性 2 种形式。脑组织间液

基金项目:国家自然科学基金项目(81273826)

作者简介:周英奕(1992.08—),女,硕士研究生,研究方向:针刺治疗阿尔茨海默病,E-mail:zhyyatwork@163.com

通信作者:薛卫国(1968.09—),男,博士,主任医师,研究方向:针刺治疗阿尔茨海默病,E-mail:snowmanxue@126.com

(Brain Interstitial Fluid, ISF) 是一个中间过程, 可溶性 $A\beta$ 由此进入不同代谢场所从而被进一步清除, 因此观测 ISF $A\beta$ 的含量对于脑内 $A\beta$ 清除效果的评估具有重要意义^[6]。脑内 $A\beta$ 清除主要通过血-脑屏障 (Blood-brain Barrier, BBB) 途径转运, P-糖蛋白主要分布于 P-糖蛋白主要分布在脑毛细血管内皮细胞 (BCECs) 上, 研究表明其是转运 $A\beta$ 外流出脑的重要载体, 对 $A\beta$ 水平的变化产生重要影响^[7-8]。

本实验选择 APP/PS1 双转基因鼠, 采用“益肾祛浊”法^[9], 对“百会”“涌泉”两穴进行电针治疗, 观察其对间质液 $A\beta$ 水平的影响; 取样海马组织, 观察 P-糖蛋白在该区域的表达, 从而探讨电针作用在 AD 疾病上的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 4 月龄、雄性 C57 BL 鼠 6 只作为正常对照组; 4 月龄、雄性 APP/PS1 转基因鼠 12 只作为模型组和针刺干预组。动物从南京大学模式动物研究所购入。

1.1.2 试剂与仪器 人 $A\beta_{42}$ Elisa 超敏试剂盒 (美国, Life technologies 公司, KHB3544); P-糖蛋白兔单克隆抗体 (美国, Abcam, ab170904), 免疫组化超敏试剂盒 (兔) (迈新生物科技, KIT-9706); DAB 显色试剂盒 (迈新生物科技, DAB-0031); 无菌针灸针 (中研太和, 0.25 mm × 13 mm); 韩氏穴位神经刺激仪 (北京华卫产业开发公司, HANs LH202H 型)。

1.2 方法

1.2.1 分组与模型制备 4 月龄、雄性 APP/PS1 转基因鼠 12 只随机等分为 2 组: 电针观察组 (A) 和模型组 (M); 4 月龄、雄性 C57BL 鼠 6 只作为正常对照组 (C)。实验已被北京中医药大学实验动物伦理委员会通过。

1.2.2 针刺干预方法 电针观察组的小鼠取俯卧位, 使用自制鼠袋束缚, 将其放置于治疗台上, 根据大鼠针灸穴位图谱以及比较解剖学的方法选穴定位, 在头顶正中取“百会”穴, 平刺 3 ~ 5 mm; 在足底的前、中 1/3 交界处取“涌泉”穴, 平刺 5 ~ 7 mm。电针正、负极分别接左、右侧“涌泉”穴, 频率为 1/50 Hz, 采用疏密波, 强度约 0.3 Ma。以动物状态稳定、不剧烈挣扎嘶叫为度。治疗的时间为 15 min, 隔日针刺, 共 2 周。正常对照组、模型组仅不进行针刺, 其他条件均相同, 用相同的自制鼠袋束缚, 放置于治疗台上, 束缚时间为 15 min, 隔日 1 次, 共 2 周^[10]。

1.2.3 检测指标与方法

1.2.3.1 脑微透析取脑间质液 (ISF) 及 ELISA 检测

麻醉小鼠后, 进行手术, 将微透析探针放置于小鼠左侧海马 C3 区域处, 探针 (MAB 公司, 13.8.1) 膜长为 1 mm, 膜截流分子量为 10KD。夜间观察小鼠的生命状态良好, 活动正常, 于第 2 天将其送入 CMA/120 活动装置, 小鼠可在清醒状态下在装置内自由活动, 方便进行长时间的微透析取样, 小鼠在运动过程中微透析探针所连接的细管不影响其活动。探针与 CMA 微量取样系统通过细管连接, 内外压平衡 1 h 后, 开始取样脑间质液^[11]。CMA 微量取样系统采用 0.5 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的灌注速度, 灌注替代液为不含蛋白的人工脑脊液, 每隔 1 h 得到 1 管透析液样品。每只小鼠取 4 管脑组织间液, 第 1 h 样品为平衡内外压时的取样, 故舍弃。

用人 $A\beta_{42}$ Elisa 试剂盒 (美国, Life technologies 公司, 96T, KHB3544) 检测脑间质液 $A\beta_{42}$ 的含量。提前配置好标准品, 浓度分别为 100 pg/mL 、50 pg/mL 、25 pg/mL 、12.5 pg/mL 、6.25 pg/mL 、3.13 pg/mL 、1.56 pg/mL 以及 0 pg/mL (仅标准品稀释液); ELISA 检测板第一排每孔只放入浓度依次递减的标准品 25 μL 和 25 μL 稀释液覆膜封板, 其余每排各孔均加入 25 μL 待测样品和 25 μL 稀释液覆膜封板, 于室温下静置孵育 3 h。用 1X 的洗涤缓冲液洗板 4 次。每孔加入 100 μL 二抗 (空白对照的空孔除外), 覆膜封板, 于室温下静置孵育 30 min。1X 的洗涤缓冲液充分洗板 4 次。每孔加显色剂 100 μL , 轻轻混匀, 室温下避光孵育 30 min。每孔加入 100 μL 的终止液。酶标仪测吸光值, 设定检测波长为 450 nm。用 Excel 软件绘制蛋白标准品的曲线, 根据计算出来的方程式计算样品中 $A\beta_{42}$ 的浓度, 再根据样品稀释情况换算海马脑间质液中 $A\beta_{42}$ 的浓度。

1.2.3.2 脑组织取样及免疫组化 取小鼠右侧半脑, 放置于 4% 多聚甲醛的磷酸盐缓冲液 (PBS), 固定 7 d。自来水流水冲洗后修块, 用石蜡包埋, 从视交叉处开始, 于冠状轴切片, 厚度为 6 μm , 1 只小鼠切 10 ~ 15 张片。选取海马结构完整且位于水平位的切片, 进行免疫组化 ABC 法^[11]。

免疫组化法具体操作步骤: 脱蜡 (二甲苯 15 min, 2 次; 100% 无水乙醇 5 min, 2 次; 95%、90%、80%、70% 乙醇依次浸泡切片 5 min, 均 1 次); 枸橼酸盐缓冲液热修复抗原 10 min; 待恢复至室温, PBS 洗板 3 次; 50 μL 过氧化酶阻断溶液 (迈新生物科技, KIT-9706, A 液) 室温孵育 10 min; PBS 洗板 3 次; 山羊血清封闭液 (迈新生物科技, KIT-9706, B 液) 孵

育 10 min;用滤纸吸干山羊血清,加兔抗鼠 P-gp(美国,Abcam,ab170904)一抗以 1:100 稀释,4 ℃ 孵育过夜;次日,PBS 洗板 5 次,加入二抗(迈新生物科技,KIT-9706,C 液)室温孵育 10 min,PBS 洗板;再加入三抗(迈新生物科技,KIT-9706,D 液)。PBS 洗板 3 次,加入 DAB 显色 10 min;自来水充分冲洗后,苏木素复染 40 s;自来水浸泡 5 min,脱水(70%、80%、90%、95% 乙醇各 5 min 浸泡清洗,100% 无水乙醇清洗 5 min,共 2 次;100% 二甲苯 10 min,共 2 次)、树脂封片。使用 DXM1200 相机,用 Leica 系统连接并采集图像。

使用 Leica 图像采集系统,取每只小鼠的 1 张免疫组化染色后的切片,在 400 倍放大下,取小鼠海马内相同的 3 个视野拍照;采集图片后,用 Imagine Pro Plus(IPP)软件算出每张图片海马区域内 P-糖蛋白的积分光密度(IOD)总和,取每只动物所有图片 IOD 的平均数,用此数据表示 P 糖蛋白的表达情况,进行统计学分析。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 20.0 软件,对脑组织间液 A β 的 ELISA 检测结果和海马 P-糖蛋白的免疫组化检测结果进行统计学结果分析。各组数据均服从正态分布,方差齐,故采用单因素方差 ANOVA 分析法;用 LSD 方法进行两两比较,分析各组间数据。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义; $P < 0.01$ 为差异有显著统计学意义。

2 结果

2.1 ELISA 检测间质液 A β 水平 脑微透析取样各组小鼠海马脑间质液,用 ELISA 法检测其 A β 1-42 水平。经统计学分析,模型组高于正常对照组($P < 0.01$);电针组低于模型组($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 电针对于各组间质液 A β 1-42 水平的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	A β ₁₋₄₂ 水平(pg/ μ L)
正常对照组(C)	6	3.19 \pm 2.55
模型组(M)	6	71.89 \pm 7.45 **
电针观察组(EA)	6	40.20 \pm 5.99 $\Delta\Delta$

注:与正常对照组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta\Delta P < 0.01$

2.2 免疫组化法检测 P-糖蛋白 在海马相同区域内,观察 P-糖蛋白表达情况,3 组均存在 P-糖蛋白阳性表达,且均表达于微血管壁上。正常对照组阳性表达面积最大,且颜色较深;模型组阳性表达面积明显减少,颜色也明显变浅;与模型组比较,电针观察组阳性表达面积有所增加。见图 1。采用 IPP 软件对 P-糖蛋白的阳性表达 IOD 值进行半定量分析。两两比较可得,模型组海马的 P-糖蛋白 IOD 值大于

正常对照组,差异有统计学意义($P < 0.01$);电针观察组海马 P-糖蛋白 IOD 大于模型组($P < 0.05$)。见表 2。

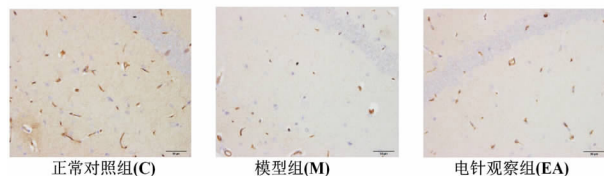


图 1 小鼠海马 P-糖蛋白表达情况(免疫组化 $\times 400$)

表 2 各组小鼠海马 P-糖蛋白积分光密度(IOD)比较

组别	只数	P-糖蛋白 IOD 值
正常对照组(C)	6	17625.25 \pm 1872.65
模型组(M)	6	6769.50 \pm 742.57 **
电针观察组(EA)	6	10832.71 \pm 626.77 Δ

注:与正常对照组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$

3 讨论

A β 血管清除理论认为脑内 A β 的清除主要是通过 BBB 转运的。A β 经血脑屏障转运入血包括两步,即分别透过脑毛细血管内皮细胞(BCECs)细胞膜的基底侧和基顶侧,且这两步都需经过特异性的转运体或受体介导^[12]。在 BBB 中,P-糖蛋白主要分布在脑毛细血管内皮细胞(BCECs)与血液循环接触的腔面上,也就是 BCECs 的基顶部^[13-14],是 A β 转运出脑的重要转运载体^[15-16]。

脑组织间液(ISF)是 A β 进入不同代谢途径的中间场所。在 AD 发病的早期阶段,脑组织中的 A β 大多存在于脑组织细胞间液(ISF),为可溶性形式,另一部分存在于脑组织中。随着 AD 疾病的进一步发展,可溶性 A β 经由血管途径的清除能力逐渐下降,逐渐在脑中聚集、变性成不溶性 A β 形式,进一步沉积于脑血管壁形成脑血管淀粉样变,这也是老年斑块形成的主要原因。且研究表明,间质液 A β 水平对 AD 的干预早期较晚期有更明显的效果^[17]。因此,选择 4 月龄的 APP/PS1 转基因鼠,排除了老年斑生成对于可溶性 A β 水平的影响,在前期观察电针对于间质液中可溶性 A β 水平的影响。近年来,越来越多的研究^[18-19]采用脑微透析技术取样,用于监测脑内 A β 水平的变化,其优势是可进行在体、实时的取样,且不干扰体内的正常生命活动^[20]。

A β 是由淀粉样前体蛋白(APP)经分泌酶切割而生成的,APP/PS1 双转基因动物模型就是转入了过度表达的人类基因 APP 和早老素 1(PS1),因此过度生成的 APP 蛋白和分泌酶(于 PS1 基因相关),使脑内 A β 的生成增加。表 1 的结果也证实了相对于

正常对照组,模型组的 A β 水平显著增加,从而证实了 APP/PS1 模型选择的正确性;A β 的清除与其转运蛋白的能力密切相关,因此通过对重要转运蛋白 P-糖蛋白水平的观察,反映了 APP/PS1 鼠清除水平较 C57BL 鼠减低,从而导致老年斑块的生成增多和出现的时间提前^[21],其神经毒性继而引发一系列病理变化。故该模型能较好地模拟 AD 发病。

中医认为 AD 的病位在脑,“血瘀痰阻”是其发病的主要病因病机。针刺“百会”“涌泉”2 穴,上下相配,远近相应,起到扶正固本、通络祛浊的作用。通过对间质液 A β 水平变化的观察,实验证明转基因模型鼠海马脑间质液 A β 42 水平大幅度增高,而电针能明显降低脑间质液 Abeta42 水平。其降低可能由于电针降低了 A β 42 生成或增加了 A β 42 的清除。电针后 P-糖蛋白水平的提高,说明经 P-糖蛋白的脑微血管壁从脑间质液向外周血液的 A β 42 清除,可能在降低脑间质液 A β 42 水平中发挥一定的作用。

参考文献

[1] Association Alzheimer. 2012 Alzheimer's disease facts and figures [J]. *Alzheimer's Dement*,2012,8(2):131-168.

[2] 步青云. 电针早期干预对 APP/PS1 小鼠脑间质液 A β 水平的影响研究[D]. 北京:北京中医药大学,2016.

[3] Karran E,Mercken M,De Strooper B. The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease;an appraisal for the development of therapeutics[J]. *Nat Rev Drug Discov*,2011,10(9):698-712.

[4] Kook SY,Hong HS,Moon M,et al. A β ₁₋₄₂-RAGE interaction disrupts tight junctions of the blood-brain barrier via Ca²⁺ + -calceinurin signaling[J]. *J Neurosci*,2012,32(26):8845-8854.

[5] Alzheimer Association. 2016 Alzheimer's disease facts and figures [J]. *Alzheimer's Dement*,2016,12(4):459-509.

[6] 周英奕,张学婷,张磊,等. 脑微透析技术在阿尔茨海默病诊治中的应用前景[J]. *中国脑血管病杂志*,2016,13(10):558-560.

[7] Vogelgesang S,Warzik RW,Casorbi I,et al. The role of P-glycoprotein in cerebral amyloid angiopathy;implications for the early pathogenesis of Alzheimer's disease[J]. *Curr Alzheimer Res*,2004,1(2):121-125.

[8] 张海威,张力. 脑脊液屏障上 P-糖蛋白的研究进展[J]. *神经药理学报*,2016,6(2):53-64.

[9] 张冕,张啟智,楼江,等. P-糖蛋白在神经退行性疾病中的作用[J]. *中国临床药理学与治疗学*,2012,17(7):835-840.

[10] 王鑫,加吾拉·阿不力孜,李芙,等. 电针对 APP/PS1 双转基因小鼠行为学及皮层 A β 1-42、LRP1 表达的影响[J]. *中华中医药杂志*,2015,30(5):1513-1518.

[11] 步青云,高堂珂,高杨,等. 电针对 5 月龄 APP/PS1 转基因小鼠海马组织及组织间液可溶性 A β 1-42 水平短时作用的影响[J]. *北京大学学报:自然科学版*,2016,17(4):481-487.

[12] 加吾拉·阿不力孜. 观察电针对 AD 模型 APP/PS1 双转基因小鼠海马 A β 的沉积及其清除途径的影响[D]. 北京:北京中医药大学,2015.

[13] Gottesman MM. Mechanisms of cancer drug resistance [J]. *Annu-Rev Med*,2002,53(1):615-627.

[14] Szakacs U,Paterson JK,Ludwig JA,et al. Targeting multidrug resistance in cancer[J]. *Nat Rev Drug Discov*,2006,5(3):219-234.

[15] Lam FC,Liu R,Lu P,et al. beta-Amyloid efflux mediated by p-glycoprotein[J]. *J Neurochem*,2001,76(4):1121-1128.

[16] Hartz AM,Miller DS,Bauer B. Restoring blood-brain barrier P-glycoprotein reduces brain amyloid-beta in a mouse model of Alzheimer's disease[J]. *Mol Pharmacol*,2010,77(5):715-723.

[17] Yan P,Bero AW,Cirrito JR,et al. Characterizing the appearance and growth of amyloid plaques in APP/PS1 mice[J]. *J Neurosci*,2009,29(34):10706-10714.

[18] Hong S,Quintero-Monzon O,Ostaszewski BL,et al. Dynamic analysis of amyloid β -protein in behaving mice reveals opposing changes in ISF versus parenchymal A β during age-related plaque formation[J]. *J Neurosci*,2011,31(44):15861-15869.

[19] Takeda S,Hashimoto T,Roe AD,et al. Brain interstitial oligomeric amyloid β increases with age and is resistant to clearance from brain in a mouse model of Alzheimer's disease[J]. *FASEB J*,2013,27(8):3239-3248.

[20] 韩慧婉,舒鸿钧,刘国诠. 微透析技术及其在应用[J]. *化学通报*,2000,63(12):52-56.

[21] Lee JE,Han PL. An update of animal models of Alzheimer disease with a reevaluation of plaque depositions[J]. *Exp Neurobiol*,2013,22(2):84-95.

(2017-09-03 收稿 责任编辑:王明)