艾灸对快速老化小鼠海马区突触可塑性相关蛋白表达的影响

林　瑶　左滢竹　哈　略　赵百孝
（北京中医药大学针灸推拿学院，北京，100029）

摘要　目的：探究艾灸对快速老化小鼠（SAMP8）海马区突触可塑性相关蛋白表达的影响。方法：将 12 只 6 个月龄雄性 SAMP8 小鼠随机分为模型组和艾灸组。另以 6 只同月龄雄性正常老化小鼠（SAMR1）作为空白组。空白组、模型组小鼠每天常规抓取并用固定器固定，不予其他处理；艾灸组小鼠采用相同抓取并固定后，用艾条灸其关元穴。各组小鼠干预时间为 20 min/d，6 d/周，共干预 6 周。6 周后取材，用 Western-blot 法检测各组小鼠海马突触素（SYN）、脑源性神经营养因子（BDNF）、酪氨酸激酶受体 B（Trk B）及磷酸化 Trk B（p-Trk B）的表达。结果：与空白组比较，模型组小鼠海马内 SYN、BDNF、p-Trk B 表达显著下降（$P<0.05$）。与模型组比较，艾灸组小鼠海马内 SYN、BDNF、p-Trk B 表达显著上升（$P<0.05$）。3 组小鼠海马 Trk B 表达水平差异无统计学意义（$P>0.05$）。结论：艾灸干预能够通过影响 SAMP8 小鼠海马区突触可塑性相关蛋白的表达起到抗衰老的作用，且该作用可能经由 BDNF/Trk B 通路实现。

关键词　阿尔茨海默病；艾灸；BDNF/Trk B 通路；快速老化小鼠；脑源性神经营养因子；突触；突触可塑性；突触素

Effects of Moxibustion on Expression of Synaptic Plasticity-related Proteins in Hippocampus of Senescence Accelerated Mouse Prone 8

Lin Yao, Zuo Yingzhu, Ha Lue, Zhao Baixiao
(*School of Acupuncture, Moxibustion and Tuina of Beijing University of Chinese Medicine, Beijing* 100029, *China*)

Abstract　**Objective**: To explore the effects of moxibustion on the expression of synaptic plasticity-related proteins in hippocampus of senescence accelerated mouse prone 8 (SAMP8). **Methods**: A total of 12 6-month-old male SAMP8 mice were randomly divided into a model group and a moxibustion group. In addition, 6 male SAMR1 mice of the same age were used as a blank group. The blank and the model group were routinely grasped daily and fixed with a fixator, and no other treatment was performed; the mice in the moxibustion group were treated the same grasping and fixation, and Guanyuan (CV4) was given moxibustion. The intervention time of each group was 20 min/day, 6 d/week, and a total of 6 weeks of intervention. After 6 weeks, the expression of synaptophysin (SYN), brain-derived neurotrophic factor (BDNF), tyrosine kinase receptor B (Trk B) and phosphorylated Trk B (p-Trk B) in hippocampus of the each group of mice were detected by Western blot. **Results**: Compared with the blank group, the expression of SYN, BDNF and p-Trk B in the hippocampus of the model group were significantly decreased ($P<0.05$). Compared with the model group, the expression of SYN, BDNF and p-Trk B in the hippocampus of the moxibustion group were significantly increased ($P<0.05$). There was no significant difference in the expression of Trk B in hippocampus between the 3 groups ($P>0.05$). **Conclusion**: Moxibustion intervention can play an anti-aging role by affecting the expression of synaptic plasticity-related proteins in the hippocampus of SAMP8 mice, and this effect may be achieved through BDNF/Trk B pathway.

Key Words　Alzheimer's disease; Moxibustion; BDNF/Trk B pathway; Senescence accelerated mouse prone 8; Brain-derived neurotrophic factor; Synapse; Synaptic plasticity; Synaptophysin

中图分类号：R245.81　　**文献标识码**：A　　**doi**：10.3969/j.issn.1673－7202.2019.05.018

阿尔茨海默病（Alzheimer's Disease，AD）是一种常见的神经系统退行性疾病，临床以进行性的记忆缺失、认知损害和人格改变为特征。AD 的发病机制并未完全明确，目前的假说有 β 淀粉样蛋白学说、胆碱能学说、能量代谢学说、氧化应激学说、胆固醇致病学说、铝中毒学说、Tau 蛋白学说等等，这些学说都部分解释了 AD 的病理过程。

也有研究表明[1-2]，AD 的发病与突触可塑性的改变有密切关系，突触丢失与突触功能的障碍甚至在 AD 早期就已经出现并与认知下降有关。突触可

基金项目：国家自然科学基金项目（81574068）
作者简介：林瑶（1993.06—），女，硕士研究生在读，研究方向：艾灸的作用机制，E-mail：502111342@qq.com
通信作者：赵百孝（1963.03—），男，博士，教授，博士研究生导师，研究方向：艾灸作用与原理，E-mail：baixiao100@vip.sina.com

塑性是突触在一定条件下,突触传递效能和形态结构发生改变的能力,因此可分为突触功能的可塑性和突触结构的可塑性。海马区的突触可塑性受到突触素(SYN)、脑源性神经营养因子(BDNF)、钙调蛋白激酶Ⅱ(CaMKⅡ)等突触可塑性相关蛋白的调节。

艾灸作为我国传统疗法之一,具有补益元气,延缓衰老的功效,《扁鹊心书》也曾记载道:"保命之法,灼艾第一……人于无病时常灸关元、气海、命门、中脘……虽未得长生,亦可保百余年寿矣"。现代动物实验研究也肯定了艾灸对于阿尔茨海默症的疗效。因此,本实验从突触可塑性角度出发,通过观察艾灸关元穴对快速老化小鼠海马区突触可塑性相关蛋白的影响探究艾灸对 AD 的治疗作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 本实验选用 6 个月龄雄性快速老化小鼠(Senescence-accelerated Mouse Prone/8, SAMP8)12 只及正常老化小鼠(Senescence-accelerated Mouse/Resistance1, SAMR1)6 只,体质量(30 ± 3)g,由中科泽晟科技有限公司提供(许可证号:SCXK(京)2014-0011)。所有小鼠均可自由进食饮水;饲养环境温度为(22 ± 2)℃,湿度为 50% ~ 60% 左右。采用人工控制室内照明,保持 12 h 光照(8:00-20:00)和黑暗(20:00-次日 8:00)交替循环。

1.1.2 药物 特制细艾条(河南南阳汉医艾绒有限公司,规格:φ0.5 cm × 20 cm)。

1.1.3 试剂与仪器 兔抗鼠 BDNF 抗体(美国 abcam 公司,货号:ab205067)、兔抗鼠 p-Trk 抗体(美国 abcam 公司,货号:ab109684)、兔抗鼠 Trk B 抗体(美国 abcam 公司,货号:ab18987)、兔抗鼠 SYN 抗体(美国 abcam 公司,货号:ab32127)、ECL 化学发光试剂盒(美国 PIERCE 公司,货号:ECL-0012)、PVDF 转印膜(美国 PALL 公司,货号:XLL092-2)、小鼠固定器(上海华岩仪器设备有限公司,规格:150 mm × 65 mm × 50 mm)、水平脱色摇床(北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司,型号 TDK-2)、台式高速冷冻离心机(上海卢湘仪离心机仪器有限公司,型号 TGL-16M)、电泳仪(北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司,型号 DG-300C)等。

1.2 方法

1.2.1 分组与模型制备 按照随机数字表法将 12 只 SAMP8 随机分为模型组和艾灸组,每组 6 只。6 只 SAMR1 作为空白组。

1.2.2 干预方法 模型组和空白组:抓取并将小鼠放入固定器中,不做其他干预,20 min/d,6 d/周;艾灸组:抓取小鼠放入固定器中,使其腹部对准固定器底部的开口,开口下方放置点燃的艾条,对准小鼠关元穴。艾灸时及时调整艾条与小鼠的距离,使艾灸的温度基本保持恒定。艾灸干预 20 min/d,6 d/周。

1.2.3 检测指标与方法 干预 6 周后,用 10% 水合氯醛(3 mL/kg)腹腔注射麻醉小鼠,断头取脑,在冰台上剥离左侧海马组织,放入冻存管中,后转移 -70 ℃冰箱保存。用 Western blot 检测小鼠海马 SYN、BDNF、Trk B、p-Trk B 的表达:取出样品,将组织样品中加入预冷的裂解液,充分研磨后 13 000 r/min,4 ℃离心 10 min。取上清液,用 BCA 法测样品蛋白浓度。上样至 SDS-PAGE 凝胶,150 V 电压电泳。将蛋白转移至 PVDF 膜上。将 PVDF 膜放入封闭液(TBST/5% 脱脂奶粉)中,室温封闭 0.5 h。加入一抗(用封闭液稀释),室温孵育 1 h 或 4 ℃杂交过夜。用 1 × TBST 漂洗 3 次,时间依次为 15 min,5 min,5 min。加入适当比例稀释的二抗,室温孵育 1 h。用 1 × TBST 漂洗 3 次,时间依次为 15 min,5 min,5 min。将 ECL 的 A 液和 B 液等体积混合,均匀地滴在 PVDF 膜上,室温孵育 1 min 后放入暗盒中显影。使用 Quantity one 软件对其进行光密度分析,以对照孔的数值/tubulin 的比值做为 1。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 20.0 统计软件对实验数据进行分析。首先依次对数据进行正态分布检验和方差齐性检验,若两者都符合,所有数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,各组组间差异采用单因素方差分析(one-way ANOVA),组间多重比较用 LSD 方法;否则采用非参数检验(Mann-Whitney U)。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

艾灸对各组小鼠海马组织 SYN、BDNF、Trk B、p-Trk B 蛋白表达的影响。见图 1。

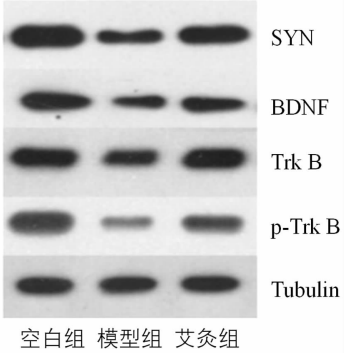

图 1 各组小鼠海马 SYN、BDNF、Trk B、p-Trk B 蛋白的表达($n = 6$)

表 1　各组小鼠海马 SYN、BDNF、Trk B 及 p-Trk B 相对表达量的比较($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	SYN 表达量	BDNF 表达量	Trk B 表达量	p-Trk B 表达量
空白组	1.50 ±0.17**	1.36 ±0.12**	1.12 ±0.35	1.39 ±0.29**
模型组	0.83 ±0.17	0.68 ±0.17	0.81 ±0.16	0.76 ±0.20
艾灸组	1.34 ±0.30**	1.12 ±0.12**	1.05 ±0.34	1.18 ±0.43*

注：与模型组比较，* $P<0.05$，** $P<0.01$

2.1　各组小鼠海马组织 SYN 的含量比较　各组小鼠海马组织 SYN 的含量由高到低依次为空白组、艾灸组、模型组。与空白比较，模型组小鼠 SYN 的含量显著下降($P=0.000$)，艾灸组 SYN 的含量有降低趋势，但差异无统计学意义($P=0.235$)，且艾灸组 SYN 的含量较模型组显著上升($P=0.001$)。提示艾灸可以升高 SAMP8 小鼠海马组织 SYN 的含量。见表 1。

2.2　各组小鼠海马组织 BDNF 的含量比较　各组小鼠海马组织 BDNF 的含量由高到低依次为空白组、艾灸组、模型组。与空白组比较，模型组小鼠 BDNF 的含量显著下降($P=0.000$)，艾灸组海马中 BDNF 的含量下降且差异有统计学意义($P=0.009$)。与模型组比较，艾灸组 BDNF 的含量较显著上升($P=0.000$)。提示艾灸可以升高 SAMP8 小鼠海马组织 BDNF 的含量。见表 1。

2.3　各组小鼠海马组织 Trk B 的含量比较　各组小鼠海马组织 Trk B 的含量由高到低依次为空白组、艾灸组、模型组。与空白组比较，模型组和艾灸组小鼠 Trk B 的含量有下降趋势，但差异无统计学意义($P>0.05$)。艾灸组与模型组比较，Trk B 含量有升高趋势但差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 1。

2.4　各组小鼠海马组织 p-Trk B 的含量比较　各组小鼠海马组织 p-Trk B 的含量由高到低依次为空白组、艾灸组、模型组。与空白组比较，模型组小鼠 p-Trk B 的含量显著下降($P=0.004$)，艾灸组 p-Trk B 的含量有降低趋势，但不明显，差异无统计学意义($P=0.275$)。艾灸组与模型组比较，p-Trk B 含量升高且差异有统计学意义($P=0.035$)。提示艾灸能够升高 SAMP8 小鼠海马组织 p-Trk B 的含量。见表 1。

3　讨论

突触素(SYN)是一种特异性存在于突触囊泡膜上的钙结合糖蛋白，是突触前终末的特异性标记物，其分布和密度可间接反映突触分布和密度，体现了突触可塑性的变化和学习记忆能力的改变，是目前研究突触可塑性最常用的指标之一[3-4]。SYN 参与了突触囊泡的运输、分泌和再循环等活动，调节神经递质的分泌，与突触结构发育和重塑关系密切。SYN 能够通过调节长时程增强(LTP)影响突触功能的可塑性，且该作用可能与 SYN 磷酸化作用影响内源性谷氨酸的释放有关[5]，SYN 也能通过调节神经元轴突和树突的分化和生长，参与突触结构的形成和维持，影响突触结构的可塑性[6-7]。有研究表明，SYN 密度在正常人的额叶、枕叶、海马 CA3 区与壳核随年龄增长逐渐下降[8]；SYN 在 AD 患者新皮质的密度与心理测量指数结果具有非常强烈的相关性，其下降程度可间接反映认知功能损伤的程度[9]；类似的研究也发现海马内 SYN 表达的减少与 AD 患者认知功能的损伤正相关[10]。

脑源性神经营养因子(BDNF)是神经营养因子大家族的一员，1982 由德国生物学 Brade 从猪脑中提取而得。在中枢神经系统，BDNF 广泛分布于海马、皮质、下丘脑、杏仁核等部位，是脑内含量最为丰富的神经营养因子。BDNF 受体为酪氨酸激酶受体 B(Trk B)。成熟型 BDNF 的功能主要通过作用于酪氨酸激酶受体 B(Trk B)实现。BDNF/Trk B 信号通路是 BDNF 发挥生物活性的关键信号通路。BDNF 激活酪氨酸受体激酶 B(Trk B)受体，导致 Trk B 磷酸化，激活 3 个主要的细胞内信号级联通路的信号转导：ras 丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)、磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)/Akt 和磷酸酶 Cγ(PLCγ)途径，从而参与对突触的可塑性的调节，影响认知功能[11]。现已证实 BDNF 能够影响突触形态结构和功能，是调节海马突触可塑性和记忆储存的关键分子[12]。BDNF 对突触结构可塑性的影响主要通过作用于树突棘实现。海马内 BDNF 的上调能够增加神经元树突长度和分支，减少神经元的丢失，改善 Aβ 诱发的神经元损伤。BDNF 对突触功能可塑性的影响主要表现在诱导和维持长时程增强(LTP)。有人认为 BDNF 是海马 LTP 的正性调节因子，且其作用通过改变与 LTP 有关的细胞骨架而实现[13]；大鼠 DG 区的 LTP 的巩固持续数小时的 BDNF/Trk B 信号。BDNF 对突触可塑性的调节可能是通过调节神经递质释放和离子通道、影响相关蛋白质合成等

实现。有学者研究了在突触前水平上 BDNF 对突触传递的作用,发现 BDNF 与 Trk 结合后能够使海马神经元丝裂原活化蛋白(MAP)依赖性突触蛋白Ⅰ磷酸化,促进谷氨酸的快速释放[14]。在一项脑源性神经营养因子(BDNF)对谷氨酸能突触可塑性影响的研究中发现,短期增加 BDNF 可提高 NAc 神经元表面 AMPA 受体 GluA1 和 GluA2 的水平,长期则表现为抑制其表达,体现了 BDNF 对 AMPA 受体的双向调节作用[15];BDNF 也能够增加培养的海马神经元中 NR1、NR2A 和 NR2B NMDA 受体亚单位的蛋白和 mRNA 水平。在蛋白质合成方面,BDNF 影响神经元或树突内 PSD-95、Homer2, GluA1, Arc and CamKII 等蛋白的转录翻译。这些蛋白质参与 LTP 的诱发和维持、突触结构的改变和重塑等,都与突触可塑性有着密切的联系。BDNF 及其受体 Trk B 的含量在脑内的变化与 AD 有着密切的关系。Ferrer 等[16]发现在重症阿尔茨海默患者的额叶皮层和海马神经元中 BDNF 和全长型 Trk B 表达水平明显减少,表明 AD 患者脑中 BDNF/Trk B 神经营养信号转导通路选择性下调;另有学者[17]发现较高的脑 BDNF 表达能够延缓认知功能的下降,并可能减少 AD 病理对认知功能的有害影响。

本实验从突触可塑性的角度阐释了艾灸治疗 AD 的可能机制。实验结果表明,相对于空白组的 SAMR1 小鼠,SAMP8 小鼠海马组织突触可塑性相关蛋白 SYN、BDNF、p-Trk B 蛋白表达均显著下降。而 SYN 又是 BDNF/Trk B 通路的下游效应分子[18],说明 SAMP8 小鼠海马内突触可塑性受到损伤,且可能与 BDNF/Trk B 通路的下调有关。本课题组前期研究发现艾灸及艾烟可能通过抑制 MAPK 通路,上调 PI3K/AKT 通路,抑制 AD 小鼠脑内炎性反应和皮质 Aβ 生成起到抗衰老的作用[19]。MAPK 和 PI3K/AKT 均为 BDNF/Trk B 的下游通路,说明 BDNF/Trk B 通路可能与艾灸治疗 AD 的机制有关,本实验的研究也证明了这一点,未来可围绕该通路继续进一步的研究。

综上所述,艾灸可以上调突触可塑性相关蛋白在海马组织中的表达起到治疗 AD 的作用,且该作用可能是通过 BDNF/Trk B 通路实现。

参考文献

[1] Balietti M, Tamagnini F, Fattoretti P, et al. Impairments of synaptic plasticity in aged animals and in animal models of Alzheimer's disease [J]. Rejuvenation Res, 2012, 15(2): 235-238.

[2] Hong S, Beja-Glasser VF, Nfonoyim BM, et al. Complement and microglia mediate early synapse loss in Alzheimer mouse models [J]. Science, 2016, 352(6286): 712-716.

[3] Calhoun ME, Jucker M, Martin LJ, et al. Comparative evaluation of synaptophysin-based methods for quantification of synapses [J]. J Neurocytol, 1996, 25(12): 821-828.

[4] Matosin N, Fernandez-Enright F, Lum JS, et al. Molecular evidence of synaptic pathology in the CA1 region in schizophrenia [J]. NPJ Schizophr, 2016, 2: 16022.

[5] Mullany PM, Lynch MA. Evidence for a role for synaptophysin in expression of long-term potentiation in rat dentate gyrus [J]. Neuroreport, 1998, 9(11): 2489-2494.

[6] Chin LS, Li L, Ferreira A, et al. Impairment of axonal development and of synaptogenesis in hippocampal neurons of synapsin I-deficient mice [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995, 92(20): 9230-9234.

[7] Ferreira A, Chin LS, Li L, et al. Distinct roles of synapsin I and synapsin II during neuronal development [J]. Mol Med, 1998, 4(1): 22-28.

[8] 许丹,胡亚卓,桂秋萍,等. 脑老化及阿尔茨海默病患者脑中突触密度改变的研究[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2004, 6(6): 374-376.

[9] Terry RD, Masliah E, Salmon DP, et al. Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment [J]. Ann Neurol, 1991, 30(4): 572-580.

[10] Sze CI, Troncoso JC, Kawas C, et al. Loss of the presynaptic vesicle protein synaptophysin in hippocampus correlates with cognitive decline in Alzheimer disease [J]. J Neuropathol Exp Neurol, 1997, 56(8): 933-944.

[11] Minichiello L. TrkB signalling pathways in LTP and learning [J]. Nat Rev Neurosci, 2009, 10(12): 850-860.

[12] Leal G, Bramham CR, Duarte CB. BDNF and Hippocampal Synaptic Plasticity [J]. Vitam Horm, 2017, 104: 153-195.

[13] Rex CS, Lin CY, Kramár EA, et al. Brain-derived neurotrophic factor promotes long-term potentiation-related cytoskeletal changes in adult hippocampus [J]. J Neurosci, 2007, 27(11): 3017-3029.

[14] Jovanovic JN, Czernik AJ, Fienberg AA, et al. Synapsins as mediators of BDNF-enhanced neurotransmitter release [J]. Nat Neurosci, 2000, 3(4): 323-329.

[15] Jeremy M. Reimers, Jessica A. Loweth, and Marina E. Wolf1 BDNF contributes to both rapid and homeostatic alterations in AMPA receptor surface expression in nucleus accumbens medium spiny neurons [J]. European Journal of Neuroscience, 2014, 39(7): 1159-1169.

[16] Isidro Ferrer, Conxita Marín, Ma J, et al. BDNF and Full-length and Truncated Trk B Expression in Alzheimer Disease. Implications in Therapeutic Strategies [J]. Journal of Neuropathology & Experimental Neurology, 1999, 58(7): 729.

[17] Buchman AS, Yu L, Boyle PA, et al. Higher brain BDNF gene expression is associated with slower cognitive decline in older adults [J]. Neurology, 2016, 86(8): 735-741.

[18] Gómez-Pinilla F, So V, Kesslak JP. Spatial learning induces neurotrophin receptor and synapsin I in the hippocampus [J]. Brain Res, 2001, 904(1): 13-19.

[19] 许焕芳. 艾燃烧生成物抗衰老效应机制及嗅觉通路作用途径研究[D]. 北京:北京中医药大学, 2012.

(2018 - 11 - 07 收稿 责任编辑:王明)