

头穴埋线对帕金森模型大鼠脑内黑质 Ca^{2+} —ATPase 活性影响的实验研究

An experimental study on the effect of catgut embedding at Scalp Point on the activity of Ca^{2+} —ATPase in substantia nigra of Parkinson model rats

王琳晶 田源 尚莉莉 王璐 李敬

WangLinjing TianYuan ShangLili LiJing

(黑龙江中医药大学附属第二医院 黑龙江哈尔滨 150001)

(Second Affiliated Hospital of Heilongjiang University of traditional Chinese medicine, Heilongjiang, Harbin 150001, China)

摘要: 目的: 观察头穴埋线疗法对帕金森模型大鼠脑内黑质 Ca^{2+} —ATPase 活性的影响作用, 探讨头穴埋线疗法保护脑组织的作用机制。方法: 将 36 只小鼠随机分为假手术组、模型组、头穴埋线组, 每组 12 只。制备大鼠帕金森模型, 头穴埋线组取百会、太阳进行埋线治疗。采用旋转行为测定评估大鼠行为学状态, 考马斯亮蓝法测定组织 Ca^{2+} —ATPase 活性, Elisa 检测纹状体组织中 DA 含量。结果: 模型组大鼠每分钟旋转圈数显著升高 ($P < 0.05$), 而头穴埋线治疗后每分钟旋转圈数显著降低 ($P < 0.05$), 提示头穴埋线疗法可改善 PD 大鼠行为学情况; 模型组大鼠的 Ca^{2+} —ATPase 活性显著降低 ($P < 0.05$), 经头穴埋线治疗后, 梗死面积显著升高 ($P < 0.05$); 模型组大鼠纹状体组织中 DA 含量显著降低 ($P < 0.05$), 而头穴埋线能显著上调纹状体组织中 DA 含量 ($P < 0.05$)。结论: 头穴埋线能抑制帕金森大鼠脑内黑质 Ca^{2+} —ATPase 活性, 进而减轻神经功能损伤。

Abstract: objective to observe the effect of catgut embedding therapy at Scalp Point on the activity of Ca^{2+} —ATPase in substantia nigra of Parkinson model rats, and to explore the mechanism of catgut embedding therapy at Scalp Point in protecting brain tissue. Methods: 36 mice were randomly divided into Sham Operation Group, model group and acupoint catgut embedding group ($N = 12$ in each group). The model of Rat Parkinson was made, and catgut-embedding therapy was applied to the scalp acupoint catgut-embedding group with Baihui and Taiyang. The activity of Ca^{2+} —ATPase was measured by Coomassie Brilliant Blue method, and the content of DA in striatum was detected by ELISA. Results: the number of turns per minute in the model group was significantly increased ($P < 0.05$), while the number of turns per minute in the scalp acupoint was significantly decreased ($P < 0.05$) after catgut embedding therapy, suggesting that catgut embedding therapy can improve the behavior of PD rats. The activity of Ca^{2+} —ATPase in the model group was significantly decreased ($P < 0.05$), the infarct size was significantly increased ($P < 0.05$), the content of DA in the striatum was significantly decreased ($P < 0.05$), however, catgut embedding in scalp acupoints significantly increased DA content in striatum ($P < 0.05$). Conclusion catgut embedding at Scalp Point can inhibit the activity of Ca^{2+} —ATPase in substantia nigra of Parkinson rats, and thus alleviate the damage of nerve function.

关键词: 埋线疗法; 帕金森; Ca^{2+} —ATPase 活性; 旋转行为

Keywords: Catgut embedding therapy; Parkinson; Ca^{2+} —ATPase activity; rotational behavior

帕金森病 (Parkinson's disease, PD) 是一种中老年人常见的神经退行性疾病, 临床主要特征为进行性运动迟缓、肌强直、静止性震颤和姿势步态异常等运动障碍和嗅觉减退、便秘、抑郁、睡眠障碍等大量非运动症状 (NMS)。本病的发病率随着年龄的增长而逐渐增高, 65 岁以上老年人群患病率为 1%—2%, 85 岁以上为 3%—5%^[1]。随着人口老龄化的开始, PD 发病率在全球出现增长的趋势, 进而带来一系列的家庭、医学及社会的问题。目前 PD 的治疗仍处于对症治疗阶段, 不论是以左旋多巴为主的药物治疗还是手术治疗均不能阻止多巴胺能神经元的持续丢失, 也不能防止 PD 患者临床症状的进行性加重, 亦会出现许多不良反应。因此在现阶段寻找一种作用持久、安全有效的治疗方法以减缓其病程进展、改善其症状尤为重要。本研究拟通过观察头穴埋线疗法对帕金森模型大鼠脑内黑质 Ca^{2+} —ATPase 活性影响, 探讨头穴埋线疗法对其治疗的作用机制。

1 材料与方法

健康雄性 SD 大鼠 36 只, 清洁级, 6—8 月龄, 体重 (200 ± 20)g, 动物分笼饲养, 适宜饲养温度 ($18-25^\circ\text{C}$) 和湿度 ($35 \pm 2\%$), 自然光线, 自由进食饮水。适应性喂养 1 周后, 待其状态良好, 适应饲养室环境后, 第 2 周即开始造模, 大鼠手术前后 12 小时禁食不禁水。

1.2 实验方法

1.2.1 PD 大鼠模型制作方法

选取 24 只 SD 大鼠制备 6-羟基多巴胺 (6-OHDA) 偏侧 PD 大鼠模型, 采用 6-羟基多巴胺 (6-OHDA) 单侧纹状体双靶点注射法复制帕金森大鼠模型。取剩余的 10 只大鼠, 作为假手术组。造模成功的标准: 旋转行为测定, 凡平均转速超过 6 转/min 作为一个成功的模型, 否则为不成功模型。

1.2.2 动物分组及给药

按体重编号, 采用随机数字表法随机分为假手术组、模型组、穴位埋线治疗组共 3 组, 每组 12 只。

假手术组: 注射方法和部位同上, 仅注射等量含 0.2% 维生素 C 的生理盐水。

模型组: 按照上述造模方法造模后, 大鼠常规饲养至相应时间点。

穴位埋线组: 大鼠于造模后第 1、8、15 天分别给予穴位埋线治疗 1 次。取穴: 百会、太阳。操作方法: 选用 7 号一次性埋线针和 4-0 蛋白线, 将蛋白线剪成 5mm 长, 百会、太阳平刺 6mm, 将蛋白线埋入穴位。

1.2.4 旋转行为测定

于术后第 6 周以 APO 0.5mg/kg 在实验大鼠背部皮下注射, 诱发的大鼠恒定向左侧 (健侧) 旋转, 一般于腹腔注射 APO 1—5 分钟内开始出现旋转, 旋转时以左侧后肢为支点原地向左转动, 先是短暂木僵、首尾相接, 向健侧旋转先慢后快, 于 10min 后开始观察 60min, 并记录大鼠每分钟平均旋转圈数。

1.2.5 取材、组织匀浆制备

各组动物观察期满后断头处死, 剥离皮肤, 剥开头骨, 取大鼠脑组织, 用生理盐水冲洗干净, 放入预冷 (4°C) 的生理盐水中漂洗, 分离并保留黑质, 置于试管内加入预冷的 0.86% 生理盐水, 其体积为组织块重量的 9 倍, 冰水浴条件下, 将试管放入水中, 用超声匀浆器制备成 10% 的匀浆液, 低温离心机离心, 制作成 2% 的匀浆液。

1.2.6 考马斯亮蓝法测定组织蛋白量方法

取浓度为 2% 的脑组织匀浆, 用 0.615g/L 蛋白标准液、考马斯亮蓝 G250 试剂, 按试剂盒要求操作, 将测定管、标准管、空白管中液体各取 0.05mL 分别加 3mL 考马斯亮蓝混匀, 静置 10min, 于波长 595nm 处, 用 1cm 光径比色皿, 然后用空白管调零, 测量出各管的吸光度, 根据公式蛋白质含量测定: 蛋白含量 (g/L) = 测定管吸光度 / 标准管吸光度 $\times$ 标准管浓度 (g/L) 求测定管蛋白的含量, 按试剂盒操作进行 Ca^{2+} —ATPase 活性测定。

1.2.7 Elisa 法检测 PD 模型大鼠纹状体组织中 DA 含量

将左侧纹状体组织称重, 剪成小块放入组织研磨器中, 加入适量 PBS, 制成匀浆, 然后置于 -20°C 过夜。经过反复冻融 2 次处理破坏细胞膜后, 将组织匀浆于 4°C 离心 5 分钟取上清。按试剂盒操作进行纹状体组织中 DA 含量测定。

1.3 统计学方法

数据均由 SPSS 21.0 统计软件进行分析。实验数据符合正态分布, 计算数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{X} \pm S$) 显示。组间比较, 采用 one-way ANOVA 分析; 两两对照, 相同方差则采取 LSD 法, 方差不齐采取 Tamhane's T2 法。P<0.05 为差异有统计学意义。■

2 结果

2.1 各组大鼠旋转行为

与假手术组相比, 模型组的每分钟平均旋转圈数显著升高 (P<0.01); 与模型组相比, 头穴埋线组的每分钟平均旋转圈数在治疗前两组无显著差异 (P>0.05), 治疗后头穴埋线组的每分钟平均旋转圈数则显著下调 (P<0.01)。结果提示, 头穴埋线疗法可改善 PD 大鼠行为学情况。

表 1 各组大鼠旋转行为比较 ($\bar{X} \pm S$, r/min)

组别	n	治疗前	治疗后
假手术组	6	0	0
模型组	6	13.17 $\pm$ 1.17	13.50 $\pm$ 1.05
头穴埋线组	6	13.33 $\pm$ 1.03	8.83 $\pm$ 0.75 ^{***}

注: 与治疗前比较: ^{**}P<0.01; 与模型组比较: ^{***}P<0.01。

2.2 各组大鼠 Ca²⁺-ATPase 活性

与假手术组相比, 模型组的 Ca²⁺-ATPase 活性显著降低 (P<0.01); 与模型组相比, 头穴埋线组的 Ca²⁺-ATPase 活性显著升高 (P<0.01)。结果提示, 头穴埋线疗法可调控 Ca²⁺-ATPase 活性, 可能是头穴埋线治疗 PD 的靶点之一。

表 2 各组大鼠 Ca²⁺-ATPase 活性比较 [$\bar{X} \pm S$, μ molPi/(mgprot $\cdot$ h)]

组别	n	Ca ²⁺ -ATPase
假手术组	6	6.06 $\pm$ 0.23
模型组	6	2.99 $\pm$ 0.17 ^{**}
头穴埋线组	6	4.33 $\pm$ 0.15 ^{***}

注: 与假手术组比较: ^{**}P<0.01; 与模型组比较: ^{*}P<0.05, ^{***}P<0.01。

2.3 各组大鼠纹状体组织中 DA 含量

与假手术组相比, 模型组的 DA 含量显著降低 (P<0.01); 与模型组相比, 头穴埋线组的 DA 含量显著下调 (P<0.01)。结果提示, 头穴埋线疗法可调控 PD 大鼠 DA 含量的表达。

表 3 各组大鼠 DA 含量比较 ($\bar{X} \pm S$, ng/mL)

组别	n	DA
假手术组	6	65.15 $\pm$ 1.04
模型组	6	45.52 $\pm$ 1.18 ^{**}
头穴埋线组	6	57.33 $\pm$ 0.77 ^{***}

注: 与假手术组比较: ^{**}P<0.01; 与模型组比较: ^{*}P<0.05, ^{***}P<0.01。

3 讨论

古代中医文献中没有“帕金森病”或“震颤麻痹”, 多将 PD 归属于“颤症”“掉”的范畴。中医对本证的记载始见于《内经》,《素问·脉要精微论》曰“夫五脏者身之强也。头者, 精明之府, 头倾视深, 精神将夺矣……肾之府, 转摇不能, 肾将惫矣; ……行将偻附, 筋将惫矣; 骨者, 髓之府, 不能久立, 行则振掉, 骨将惫矣。”这段文献描述了颤证病人的常见症状, 与帕金森氏病的临床表现一致。

穴位埋线疗法是刺灸法的一个重要组成部分, 也是一种结合多种疗法、多种效应于一体的复合性治疗方法, 是将医用蛋白线植入相应腧穴, 通过线体对腧穴的长期持续刺激作用, 提高腧穴的兴奋性和传导性, 达到良性、双向性调节的目的。相较于传统针刺疗法, 穴位埋线应用于帕金森病的治疗具有以下优点: 首先, 穴位埋线疗法克服了帕金森病患者肌张力增高时难以配合针刺治疗的缺点, 提高患者依从性; 其次, 穴位埋线疗法是用埋线针把蛋白线植入腧穴, 在线体被软化、分解和吸收的过程中, 对腧穴产生一种缓慢、柔和、持久、良性的“长效针感效应”, 从而达到“深纳而久留之, 以治顽疾”之效, 且临床疗效确切^[2-3]。朱志强^[6]运用埋线治疗血管性帕金森综合征患者 62 例, 穴位选取百会、督俞 (双)、内关 (双)、三阴交 (双), 结果显示穴位埋线治疗血管性帕金森综合征患者安全、有效。

钙稳态是帕金森病黑质多巴胺神经元凋亡发生的一个重要问

题。正常情况下, 细胞内钙稳态是由质膜 Ca²⁺转位酶和细胞内钙池系统共同操纵控制的; 细胞受损时, Ca²⁺从细胞内储存部位释放与/或通过质膜逐出抑制, 导致细胞内 Ca²⁺浓度不可控制的持续性增加, 持续高于生理水平导致维持细胞结构和功能的重大分子难以控制的破坏, 严重时可导致 Ca²⁺浓度急剧变化, 危及细胞骨架结构和线粒体功能, 最终导致细胞内成分不可逆的代谢过程。多种研究表明针刺具有调节 Ca²⁺活性的生理浓度作用, 达到扶正祛邪、以平为目的的目的。不仅如此, 在细胞的调节功能中, Ca²⁺及 CaM 作为第二信使, 在细胞损伤和凋亡中的重要作用已经得到肯定。脑组织中 Ca²⁺-ATPase 存在于脑细胞膜上, 通过水解 ATP 逆化学梯度转运离子, 是维持神经元兴奋传导、突触传导及细胞内环境的物质基础。Ca²⁺-ATPase 活性降低, Ca²⁺超载产生大量自由基, 从而影响神经功能, 进而加重 PD 患者症状。研究表明, 电针对局限性缺血再灌注大鼠的纹状体、线粒体, 可见 Ca²⁺-ATP 酶、Na⁺-K⁺-ATP 酶、Ca²⁺-Mg²⁺-ATP 酶及总体抗氧化能力均显著增加, 提示针刺可提高受损纹状体神经元的细胞能量代谢及抗氧化能力, 减轻自由基对脑组织的损伤及神经元细胞的凋亡。

课题组前期研究发现 PD 模型大鼠黑质和纹状体神经细胞减少, 氧化应激损伤加重, 而给予电针治疗后 MDA 含量和 NOS 的活性显著下降而 GSH 的含量及 GSH-Px 的活性显著升高 (P<0.01), 说明 PD 大鼠脑内抗氧化酶系统失衡, 而电针治疗能够减轻多巴胺能神经元损伤。此外, 研究发现 PD 模型大鼠纹状体 MDA 含量升高, 而 GSH、GSH-Px、SOD 的含量降低, 给予中药洋金花治疗能够增强抗氧化防御机制, 减少氧化应激, 进而保护神经元, 起到治疗 PD 的作用^[7,8]。

本研究结果显示, 模型组大鼠旋转圈数显著升高, 而头穴埋线治疗后评分降低, 提示头穴埋线疗法可改善大鼠运动学情况; 模型组大鼠 Ca²⁺-ATPase 活性上调, 而头穴埋线能显著下调 Ca²⁺-ATPase 的活性。

综上所述, 头穴埋线可抑制自噬过程, 从而对脑缺血再灌注损伤的脑组织起到神经保护作用, 为头穴埋线的临床应用提供理论依据。但头穴埋线抑制自噬发生的具体机制、自噬所产生的级联反应以及自噬程度, 仍需进一步探究。

参考文献:

- [1]Alves G, Forsaa EB, Pedersen KF, et al. Epidemiology of Parkinson's disease[J]. J Neurol.2008;255(Suppl 5):18-32.
 - [2]金泽,曹晓婷,王春英,等.穴位埋线对癫痫大鼠海马神经元细胞凋亡及氨基酸的影响[J]. 上海针灸杂志,2016,35(02):218-222.
 - [3]郭文海,李兆贤,姜珊珊,等.穴位埋线结合药饼灸治疗慢性疲劳综合征的临床观察[J]. 针灸临床杂志,2016,32(11):41-43.
 - [4]金泽,勇入琳,王春英,等.穴位埋线预处理对癫痫大鼠行为学及脑电的影响[J]. 针刺研究,2015,40(05):392-395.
 - [5]金泽,任英杰,李峰,等.针刺配合穴位埋线治疗糖尿病周围神经病 32 例[J]. 针灸临床杂志,2014,30(02):20-21.
 - [6]朱志强. 埋线治疗血管性帕金森综合征的临床观察[J]. 中国实用神经疾病杂志,2016,05:98.
 - [7]金泽,王玉琳,姜珊珊,等.洋金花对帕金森病大鼠脑纹状体组织 SOD、GSH-Px 影响的研究[J]. 中医药信息,2013,02:87-90.
 - [8]金泽. 中药洋金花对帕金森病模型大鼠脑纹状体组织 SOD、GSH-Px 影响的实验研究[A]. 中华中医药学会. 第十次中医药防治老年病学术交流会议论文集[C]. 中华中医药学会: 2012:2.
- 项目基金: 1. 头穴埋线对帕金森模型大鼠脑内黑质 Ca²⁺-ATPase 活性影响的实验研究, 黑龙江中医药管理局, 重点项目 (ZHY18-067); 2. 黑龙江中医药大学附属第二医院科研基金面上项目, 头穴埋线对帕金森模型大鼠脑内黑质 Ca²⁺-ATPase 活性影响的实验研究, YM-201703; 3. 科技局自筹经费项目, 电针调节肠道菌群-SCFAs/GPR43-NLRP3 通路改善 PD 大鼠神经炎症损伤的作用机制, 2022ZCZJNS08; 4. 黑龙江省自然科学基金联合引导项目, 电针调控 NLRP3 信号通路改善 PD 大鼠炎症损伤的作用 (编号: LH2020H091)