

针灸对阿尔茨海默病模型大鼠脑皮层区 JAK2、STAT3 的调控作用研究

刘 静¹ 杜艳军² 孙国杰² 徐派的² 张晓明²

(1.武汉市中医医院,湖北武汉 430014; 2.湖北中医药大学针灸骨伤学院,湖北武汉 430061)

摘 要 目的:通过观察针灸对阿尔茨海默病(AD)模型大鼠JAK2/STAT3信号通路的影响,探讨针灸治疗AD的作用机理。方法:将60只SD大鼠随机分为正常组、假手术组、模型组和针灸组,每组15只。模型组与针灸组大鼠采用双侧海马注入A β_{1-42} 制备AD模型,随后针灸组选用针刺加艾灸“百会”穴、双侧“肾俞”穴进行治疗,每日1次,每周5次,共治疗4周。干预结束后,免疫组化法和Western blot法分别测定大鼠脑皮层区JAK2、STAT3阳性细胞数及蛋白水平。结果:与正常组和假手术组比较,模型组大鼠脑皮层区JAK2、STAT3阳性细胞数和蛋白表达量显著增多($P<0.01$);与模型组比较,针灸组大鼠脑皮层区JAK2、STAT3阳性细胞数和蛋白表达量显著减少($P<0.01$)。结论:JAK2/STAT3信号通路参与了AD发病的病理过程,针灸治疗可能通过抑制JAK2、STAT3的活化,减少炎症因子释放,从而阻止慢性炎症反应发生发展,达到治疗AD的作用。

关键词 阿尔茨海默病; JAK2; STAT3; 针灸疗法; 大鼠; 脑皮质; 实验研究

中图分类号 R246.6 **文献标志码** A **文章编号** 1672-397X(2019)07-0086-04

基金项目 国家自然科学基金(81473786, 81873380);武汉市卫计委2017年度科研项目(WZ17B07);2018年武汉中青年医学骨干人才项目

阿尔茨海默病(Alzheimer's Disease, AD)多发生于老年和老年前期,是一种以进行性记忆力丧失、认知功能损害、行为异常和社交障碍为临床特点的神经退行性疾病。该病在老年人疾病中被列为仅次于心脑血管、肿瘤疾病之后第四位死亡杀手,随着社会人口老龄化的进程,患病数逐年上升^[1]。本病病理改变主要为神经元丢失, A β 淀粉样蛋白沉积形成老年斑和Tau蛋白异常磷酸化形成神经原纤维缠结等。老年斑周围存在的小胶质细胞活化引起慢性炎症反应是AD发病的主要病理机制之一。近期研究发现,通过干扰JAK2/STAT3信号通路可调控A β 诱导的小胶质细胞炎症反应中炎症因子释放,从而减少AD慢性炎症损伤^[2-3]。中医治疗AD的临床和科研取得了一定的成果,其中针灸治疗AD的疗效也早已被国内学术界认可^[4]。前期研究证实单纯艾灸或电针可改善AD大鼠学习记忆能力以及促进大鼠海马齿状回星形胶质细胞(AC)对脑内神经元的抗炎保护作用^[5-6],但是针灸协同治疗本病的机理研究相对较少。本课题采用A β_{1-42} 建立AD模型,以大鼠脑皮层区JAK2、STAT3的阳性细胞数和蛋白表达为切

入点,探讨针灸抑制AD模型大鼠慢性炎症反应的作用机理。

1 实验材料

1.1 实验动物 华中科技大学同济医学院实验动物中心提供的清洁级Sprague Dawley大鼠,(10 $\pm$ 2)月龄,动物许可证号:SCXK(鄂)2015-0018,雌雄不拘,体质量(370 $\pm$ 20)g。实验过程遵守国家科技部2006年发布的《关于善待实验动物的指导性意见》中的相关规定。

1.2 主要仪器、试剂 颅脑立体定位仪(国营西北光学仪器厂),Morris水迷宫(成都泰盟),牙科钻(成都康发医疗器械有限公司),石蜡切片机(广州三元科技有限公司),微量注射器(5 μ L,上海医用仪器厂),电泳仪(北京市六一仪器厂,型号:DYY-6C),超薄切片机(瑞典BROMMA公司,型号:LKB-V),电子显微镜(日本日立公司,型号:H-600),美容艾条(直径0.6cm,南阳汉医艾绒有限公司),无菌针灸针(苏州针灸用品有限公司),A β_{1-42} (美国Sigma公司),兔抗JAK2抗体(美国CST公司,货号:3230),兔抗STAT3抗体(美国CST公司,货号:4904),

SDS-PAGE凝胶制备试剂盒(武汉拓捷生物科技有限公司),免疫组化通用试剂盒(武汉拓捷生物科技有限公司)。

2 实验方法

2.1 分组与造模 所有大鼠正常饮食饮水,适应性喂养1周后进行Morris水迷宫检测,剔除不合格大鼠(先天性痴呆或游泳姿势不良等),再用随机数字生成器抽取不同的数字将合格大鼠60只随机分为正常组、假手术组、模型组和针灸组,每组15只。

配制A β ₁₋₄₂方法:A β ₁₋₄₂单体(0.1mg)放入50 μ L二甲亚砜溶液中混匀溶解,离心机离心后,加入0.01mol/L PBS缓冲液(磷酸盐缓冲液)50 μ L中稀释,配制成1 μ g/ μ L的溶液,37℃水浴箱孵育1周,使其变成寡聚状态而具有神经毒性,-20℃分装保存。

造模方法:参照O'HARE E等^[7]方法,模型组和针灸组大鼠称重后配备10%水合氯醛(300mg/kg)腹腔注射麻醉,参考大鼠脑立体定位图谱^[8]定位,用牙科钻在大鼠头骨前囟后3.3mm,中线左右各旁开1.5mm处各钻一直径为1mm的小孔,微量注射器垂直头骨插入脑组织,要求针尖自颅骨表面缓慢进针至海马区,深度为3.5mm,双侧分别以1 μ L/min的速度注射5 μ L A β ₁₋₄₂,5min内注完,注射完后继续留针5min,随即以1.0mm/min的速度缓慢出针,防止拔针时药物溢出,牙托粉封固颅骨孔,缝合头皮,青霉素粉局部外敷,术后3d每日肌注青霉素预防感染。造模完成后第7日所有造模大鼠进行Morris水迷宫测试,剔除不合格者,并遵照随机原则补齐动物。评价标准:凡15次测试中正确次数较造模前下降1/3及以上的视为造模成功^[9]。

2.2 干预方法 正常组:正常饮食喂水,不采取任何治疗和处理。模型组:正常饮食喂水,造模成功后不采取任何治疗。假手术组:颅内注射等量的生理盐水,其余处理方法同模型组。治疗组:根据《实验针灸学》^[10]提供的大鼠穴位定位方法定位大鼠“百会”(顶骨正中,两耳连线中点)、“肾俞”(第2腰椎棘突下两旁)穴,在穴区周围约1.5~2cm直径区域备皮,用记号笔标记穴位,自造模成功后第1天开始用0.30mm $\times$ 25mm针灸针行穴位针刺,百会穴向后斜刺4mm,双侧肾俞穴直刺5mm,留针时间15min;留针同时在穴位处使用自制艾条进行温和灸,持续15min。针灸治疗每日1次,每周5次,共治疗4周。

2.3 标本采集 干预结束后,各组大鼠用10%水合氯醛足量麻醉。每组10只大鼠灌注固定后迅速断头取脑放入4%多聚甲酸中固定48h,用于免疫组化检测;另外5只大鼠断头取脑,除去嗅球、延髓和小脑,分离海马结构,取出完整的海马组织放入预冷冻存管中并迅速放置液氮中冷冻,后转至-80℃冰箱冻存,用于western blot检测。

2.4 指标检测

2.4.1 免疫组化检测大鼠脑皮层区JAK2、STAT3阳性细胞数 将固定48h的脑组织取出,用手术刀片在冠状面前后小心修整脑组织,以接近海马结构为宜。将标本放入脱水框中,做好标签,自来水冲洗约5h。将冲水后的脑标本放置于生物组织自动脱水机中脱水,透明,浸蜡,组织包埋,切片,切片厚度4 μ m,每隔5张取1张切片。每个蜡块各取相对应海马区域的脑片3张进行JAK2、STAT3抗体免疫组化检测,采用SP二步法,EDTA(pH9.0)高压抗原修复,一抗4℃过夜,二抗30min室温孵育,显微镜下控制显色,苏木精复染,封片。光学显微镜下观察,阳性表达为棕黄色颗粒,每张图片随机选取3个视野(200倍),用Image-Plus6.0图像分析系统分析阳性区累计光密度值,求均值。

2.4.2 Western blot法检测大鼠脑皮层区JAK2、STAT3蛋白表达 取各组大鼠海马组织标本,冰上按10 μ L/mg的比例加入预冷TBS缓冲液[1mol/L Tris-HCl(pH=7.5)10mL,NaCl 8.8g,加蒸馏水至1000mL]洗涤2~3次,最后1次尽量吸干残留液,去除血污。加入适当体积的细胞总蛋白提取试剂,冰浴彻底匀浆;将匀浆液转移至1.5mL离心管中,振荡混匀15s,使细胞完全悬浮并分散开;冰浴30min,期间用移液器反复吹打,确保细胞完全裂解;匀浆后于4℃离心机中12000r/min,离心半径39.27cm,离心5min,收集上清,即为总蛋白溶液;使用BCA蛋白质浓度测定试剂盒测定样品蛋白浓度,根据蛋白浓度进行SDS-PAGE电泳及转膜(聚偏二氟乙烯膜),转膜条件:300mA恒流转膜,转膜时间根据目的蛋白分子量大小调整;转膜后进行抗体孵育,将转好的膜加入封闭液室温封闭1h,稀释一抗4℃过夜,用TBST洗3次,每次5min,用TBST将二抗稀释10000倍,室温孵育30min,用TBST在室温下摇床上洗4次,每次5min;结束后行化学发光检测,滴加新鲜配制的ECL混合溶液到膜的蛋白面,暗室中曝光,根据不同光强度调整曝光条件,显影、定影;最后将胶片进行扫描存档,AlphaEaseFC软件处理系统分析目标带光密度值。

2.5 统计学方法 所有数据用($\bar{x} \pm s$)表示,使用SPSS 19.0统计软件进行统计分析,组间比较均采用 t 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 各组大鼠脑皮层区JAK2和STAT3阳性细胞数比较 结果见表1。提示A β 沉积通过JAK/STAT炎症信号通路诱发小胶质细胞炎症反应,而针灸抑制JAK/STAT炎症信号活化,减少慢性炎症反应中炎症介质的表达,在AD的A β 毒性作用机制中发挥重要作用。

表1 各组大鼠脑皮层区JAK2和STAT3阳性细胞数比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数(只)	JAK2	STAT3
正常组	10	10.60 $\pm$ 2.06	12.20 $\pm$ 1.04
假手术组	10	13.2 $\pm$ 1.07	13.80 $\pm$ 2.04
模型组	10	25.3 $\pm$ 1.22 ^{#Δ}	30.60 $\pm$ 2.07 ^{#Δ}
针灸组	10	16.4 $\pm$ 1.16 [*]	16.80 $\pm$ 2.10 [*]

注: #与正常组比较, $P < 0.01$; Δ 与假手术组比较, $P < 0.01$; *与模型组比较, $P < 0.01$ 。

3.2 各组大鼠脑皮层区JAK2、STAT3蛋白表达比较 如图1所示,以marker所显示的条带作为参照,分别确定JAK2、STAT3蛋白位置,AlphaEaseFC软件处理系统分析目标带的光密度值,并分别与 β -Actin比较,具体数据比较见表2,提示针灸治疗能够减少炎症因子的释放是通过抑制JAK2/STAT3信号通路实现的。

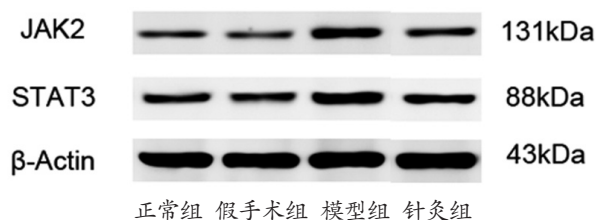


图1 western blot法检测各组大鼠脑皮层区JAK2、STAT3蛋白表达($n=5$)

表2 各组大鼠脑皮层区JAK、STAT3光密度比值比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数(只)	JAK2	STAT3
正常组	10	0.25 $\pm$ 0.03	0.36 $\pm$ 0.06
假手术组	10	0.23 $\pm$ 0.08	0.33 $\pm$ 0.04
模型组	10	0.58 $\pm$ 0.07 ^{#Δ}	0.60 $\pm$ 0.05 ^{#Δ}
治疗组	10	0.29 $\pm$ 0.04 [*]	0.42 $\pm$ 0.10 [*]

注: #与正常组比较, $P < 0.01$; Δ 与假手术组比较, $P < 0.01$; *与模型组比较, $P < 0.01$ 。

4 讨论

AD可归属于中医学“呆证”范畴,是以呆傻愚笨为主要临床表现的神志病,多因禀赋不足、痰浊阻窍、肝肾亏虚等引起。本病病位在脑,涉及五脏,与

肾、脾、心、肝相关,病机为髓海不足、脉络空虚、诸窍失养、痰瘀内停、郁久化热酿毒,属本虚标实,以虚为主,虚实夹杂。近年来临床治疗AD的报道以西医治疗为主,一些非药物治疗的研究也呈现逐步上升趋势,尤其是针灸疗法,在缓解患者临床症状中具有一定的作用^[11]。研究表明,针灸能提高细胞抗氧化能力,改善AD患者脑组织的电生理活动,改善发病过程中各种异常的生化指标和异常的血液流变,提高大脑学习能力、记忆力、判断和认知力等综合智力水平,从而延缓衰老等^[12-13]。本研究采用针灸协同治疗,选取百会穴、肾俞穴。百会穴隶属于督脉,位于巅顶,脑病独取督脉,可调节情志、醒神开窍。肾俞穴是肾精之气转输汇集于背腰部之处,位于膀胱经,为肾之背俞穴,可补益肾精、生髓健脑。研究证实,两穴合用有补肾调督、调神益智之功效^[14]。

JAK-STAT信号通路广泛存在于多种细胞中,主要参与细胞的增殖、分化、凋亡和免疫调节等,是多种细胞因子、生长因子在细胞内传递信号的共同途径。JAK/STAT通路的激活可促进各种疾病的发生和发展,包括多种实体肿瘤、淋巴瘤、白血病及炎症性疾病等。JAK有四种亚型,即JAK1、JAK2、JAK3和TYK2,STAT有7种亚型,即STAT1、STAT2、STAT3、STAT4、STAT5A、STAT5B和STAT6。研究发现,JAK2、STAT3主要在脑组织表达,与帕金森病、阿尔兹海默症等神经退行性疾病的发生发展密切相关^[15-16]。实验发现,STAT3参与了A β 引起的小胶质细胞的慢性激活和炎症因子的释放,而在A β 药物诱导AD模型中STAT3被激活和表达增高,进一步说明STAT3可能与AD慢性炎症损伤密切相关^[17]。另有研究发现STAT3的表达水平在AD患者尸检脑组织中表达较高^[18]。HUANG等^[19]研究证实,用选择性JAK抑制剂AG490后可阻断STAT3活化,从而使激活的小胶质细胞释放出的炎症因子水平显著降低。因此,通过调控JAK2/STAT3信号通路可影响神经元、胶质细胞、血管内皮细胞等的凋亡、增殖、分化,由此起到保护神经元,减轻炎症反应,促进神经功能重塑,使脑组织的损伤得以修复等作用^[20]。

本研究结果表明,经针灸治疗后AD模型大鼠脑皮层区JAK2、STAT3的阳性细胞数显著减少,蛋白含量明显降低,说明针灸可使JAK2、STAT3表达水平降低,从而抑制JAK2/STAT3信号通路,减轻由A β 寡聚体介导的炎症反应,减少炎症因子的释放,达到治疗AD的目的。但其作用的具体靶点,如对该通路中其他下游蛋白和基因表达等方面的影响,仍需要做进一步研究探讨。

参考文献

- [1] 李国徽,陈凌,麦凤香,等.阿尔茨海默病病因病机研究进展[J].中国老年学杂志,2015,35(20):5955.
- [2] COUPER K N, BLOUNT D G, RILEY E M. IL-10: the master regulator of immunity to infection[J]. J Immunol, 2008, 180(9): 5771.
- [3] PARIS D, BEAULIEU-ABDELAHAD D, ABDULLAH L, et al. Anti-inflammatory activity of anatabine via inhibition of STAT3 phosphorylation[J]. Eur J Pharmacol, 2013, 698(1-3): 145.
- [4] 刘源香,李金玲,杨继国.针灸治疗老年性痴呆的研究概况[J].四川中医,2017,35(8):218.
- [5] 陶一鸣,杜艳军,田青,等.电针对阿尔茨海默病大鼠齿状回星形胶质细胞和白细胞介素-10表达及其共定位的影响[J].中国老年学杂志,2019,39(4):874.
- [6] 刘静,杜艳军,孙国杰.艾灸预刺激对AD模型大鼠学习记忆能力的影响[J].时珍国医国药,2014,25(6):1510.
- [7] O'HARE E, WELDON D T, MANTYH P W, et al. Delayed behavioral effects following intrahippocampal injection of aggregated A beta(1-42)[J]. Brain Res, 1999, 815(1): 1.
- [8] George Paxinos. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates (Compact Third Edition) [M]. San Diego: Academic Press, 2005: 8.
- [9] 王颖,孔立红,李威,等.不同频率电针对阿尔茨海默病大鼠学习记忆能力效应及部分作用机制探讨[J].中国针灸,2017,37(6):629.
- [10] 李忠仁.实验针灸学[M].北京:中国中医药出版社,2003:327.
- [11] 罗琴琴,杜艳军.针灸治疗阿尔茨海默病临床研究进展[J].辽宁中医杂志,2014,41(3):594.
- [12] 刘俊涛,矫增金.针灸治疗老年性痴呆研究进展[J].光明中医,2017,32(24):3650.
- [13] 焦爱兰,高秉谔,金明卜.针灸治疗老年期痴呆临床实验研究进展[J].中国医药学报,2002,17(7):433.
- [14] 罗磊,孙国杰,杜艳军.“益肾调督”针灸法对阿尔茨海默病大鼠海马神经元线粒体动力学相关蛋白的影响[J].针刺研究,2015,40(4):270.
- [15] JIAO J, XUE B, ZHANG L, et al. Triptolide inhibits amyloid- β 1-42-induced TNF- α and IL-1 β production in cultured rat microglia[J]. Journal of Neuroimmunology, 2008, 205(1-2): 32.
- [16] ZHONG Z, WEN Z, DARNELL J E Jr. Stat3 and Stat4: Members of the family of signal transducers and activators of transcription[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91(11): 4806.
- [17] 郭秀美,张启芳,官志忠. STAT3在A β 寡聚体诱导的小胶质细胞炎症反应中的作用[J]. 中风与神经疾病杂志, 2016, 33(11): 964.
- [18] LA FLAMME A C, MACDONALD A S, PEARCE E J. Role of IL-6 in directing the initial immune response to schistosome eggs[J]. J Immunol, 2000, 164(5): 2419.
- [19] HUANG C F, MA R, SUN S G, et al. JAK2-STAT3 signaling pathway mediates thrombin-induced proinflammatory actions of microglia in vitro[J]. J Neuroimmunol, 2008, 204(1-2): 118.
- [20] 谢惠芳,徐如祥,魏继鹏,等.大鼠脑缺血再灌注损伤后磷酸化JAK2、STAT3蛋白表达及细胞凋亡[J].南方医科大学学报,2007,27(2):208.

第一作者:刘静(1983—),女,医学硕士,主治医师,研究方向为针灸防治脑病。

通讯作者:杜艳军,博士,教授,博士研究生导师。dyjhbtcm2013@163.com

收稿日期:2019-02-01

编辑:吴宁

文末参考文献著录规则之页码的标注

根据国家标准GB/T 7714—2015《信息与文献 参考文献著录规则》的规定,本刊关于参考文献页码的著录做重要修订如下:(1)专著或期刊中析出文献的页码或引文页码,应采用阿拉伯数字著录,引自序言或扉页题词的页码,可按实际情况著录(例:钱学森.创建系统学[M].2版.太原:山西科学技术出版社,2001:序2.);(2)阅读型参考文献的页码著录文章的起始页,引文参考文献的页码著录引用信息所在页。阅读型参考文献指著者为撰写或编辑论著而阅读过的信息资源;引文参考文献指著者为撰写或编辑论著而引用的信息资源。例如:将谈勇等发表在本刊2015年第1期第1—4页的文章《夏桂成国医大师调治复发性流产经验探赜》作为阅读型参考文献引用时,页码著录为“1”;作为引文文献引用“夏老提出心-肾-子宫轴功能失常是流产病机关键”这一观点或原文时,著录这些引用信息的所在页“3”。更多有关本刊参考文献著录规则见本刊网站(www.jstcm.cn)首页下载专区。