

·基础研究·

电针百会穴对APP/PS1双转基因痴呆模型小鼠18F-FDG PET/CT成像及学习记忆的影响*

卓沛元¹ 柳维林¹ 吴洁² 张颖铮² 李琰³ 金昊³ 林如辉¹ 黄佳¹ 陶静¹ 陈立典^{1,4}

摘要

目的:观察电针百会穴对APP/PS1双转基因小鼠葡萄糖代谢水平以及学习记忆的影响,探讨电针治疗阿尔茨海默病的作用机制。

方法:将30只雌性12月龄APP/PS1双转基因小鼠随机分为模型组、百会组和非穴组,每组10只,另取10只同窝阴性野生小鼠为野生组。百会组电针百会穴,非穴组电针非穴,每次30min,每天1次,每周5天,共治疗4周,野生组和模型组不干预。采用正电子发射断层扫描技术(PET)观察各组小鼠大脑18F-FDG摄取率的水平;Morris水迷宫实验观察小鼠学习记忆。

结果:与模型组相比,百会组小鼠逃避潜伏期缩短($P < 0.05$),跨越平台次数增加($P < 0.01$);非穴组小鼠逃避潜伏期与模型组相比无显著性差异($P > 0.05$);百会组小鼠18F-FDG摄取率高于野生组、模型组以及非穴组。

结论:电针百会穴可改善APP/PS1双转基因小鼠的学习记忆功能,其作用机制可能是通过改善小鼠脑内葡萄糖代谢从而发挥神经保护作用。

关键词 电针;百会穴;18F-脱氧葡萄糖;脑葡萄糖代谢;APP/PS1

中图分类号:R245, R749.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2016)-10-1050-05

Effects of electroacupuncture at Baihui (DU20) acupoint on 18F-FDG PET/CT image and learning and memory in APP/PS1 double-transgenic mice/ZHUO Peiyuan, LIU Weilin, WU Jie, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2016, 31(10): 1050—1054

Abstract

Objective: To explore effects of electroacupuncture at Baihui (DU20) acupoint on glucose metabolic level and the ability of learning and memory and its underlying mechanism in the brain of APP/PS1 double-transgenic mice.

Method: Thirty female APP/PS1 double transgenic mice were randomly divided into model group, DU20 group and non-acupoint group, with 10 mice for each group. And another 10 age-matched wild type mice were experimented as wild group. The DU20 group received electroacupuncture at Baihui (DU20) and the non-acupoint group (APP/PS1+NA) received electroacupuncture at non-acupoint for 4 weeks (four course of 5 days EA). Glucose metabolic level of brain was tested by using positron emission tomography scans (PET scans). Learning and memory ability was tested by Morris water maze (MWM).

Result: Compared with the model group, electroacupuncture at Baihui (DU20) acupoint could ameliorate the learning and memory ability of APP/PS1 double-transgenic mice ($P < 0.05$), whereas the times that the mice crossed the location of the platform were increase ($P < 0.01$). There was no significant difference between the model group and non-acupoint group ($P > 0.05$). The level of uptake rate of glucose in DU20 group was higher

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2016.10.001

*基金项目:国家自然科学基金项目(81403450)

1 福建中医药大学康复医学院,福州,350122; 2 福建省康复技术重点实验室; 3 福建省康复产业研究院; 4 通讯作者
作者简介:卓沛元,男,硕士研究生; 收稿日期:2016-05-17

than that in the wild group, model group and non-acupoint group.

Conclusion: Electroacupuncture at DU20 acupoint could improve learning and memory ability in APP/PS1 double-transgenic mice, and the underlying mechanism may be related to the increase of glucose metabolism.

Author's address College of Rehabilitation Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, 350122

Key word electroacupuncture; Baihui (DU20); 18F-fluoro-deoxy-glucose; cerebral glucose metabolism; APP/PS1

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种多发生在老年,起病隐匿的神经系统退行性疾病,以近期记忆力障碍、社会行为能力下降、人格衰退和其他认知功能损伤为主要临床表现^[1]。目前AD已成为继心脏病、肿瘤、脑卒中后第4位死因^[2]。截止2010年,全世界有3560万AD患者,每年新发病例约770万例,预计在2050年全球每85人就有1人受到AD的影响^[3-4]。我国AD发病率约为1%,65岁以上发病率在3%—5%,并呈逐年递增趋势。全球每年用于治疗AD的费用超过6000亿美元,随着社会人口的老龄化和人口寿命的延长,AD的患病率不断增加,由此带来的巨大社会负担已成为一个重要的公共卫生问题。电针对改善AD患者的学习记忆功能障碍及临床症状的改善均具有明显作用^[5],并且能改善痴呆模型鼠的学习记忆功能。

葡萄糖代谢异常在AD的发病机制中起着关键的作用^[6]。最新研究发现一定脑区的葡萄糖代谢率异常是AD的一个早期特征性变化,主要表现为因代偿性功能增加,而增强葡萄糖代谢,但随着病情的进一步严重,这些代谢活跃的脑区将逐渐缩小,最后消失,大脑功能减退,尤其在AD晚期,出现葡萄糖代谢率和能量明显下降。有研究表明,与年龄匹配的对照组相比,AD患者全脑葡萄糖代谢率降低30%—70%并呈双侧性^[7]。

目前研究表明,电针百会穴能改善认知功能障碍,然而其机制仍不清楚^[8-13]。本研究通过PET/CT影像学技术,观察电针百会穴对APP/PS1转基因痴呆模型小鼠葡萄糖代谢情况以及学习记忆的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

南京大学模式动物研究所提供APP/PS1双转基因小鼠30只[B6C3- Tg(APPswe, PSEN1dE9)85Dbo/ MmJNju],同窝阴性野生小鼠10只,于福建

中医药大学实验动物中心SPF级实验室喂养。采用随机数字表法将30只12月龄的APP/PS1双转基因小鼠随机分成模型组(APP/PS1)、百会组(DU20)、非穴组(APP/PS1+NA),每组均为10只,另外10只同窝阴性野生小鼠为野生组(WT)。实验经福建中医药大学动物管理制度和使用委员会批准而进行,实验过程均严格按照国际动物保护以及使用指南的规定进行。

1.2 主要材料和仪器

VeCTor+ PET/SPECT/CT三合一成像系统(荷兰Milabs公司),Morris水迷宫(中国医学科学院药物研究所)。

1.3 干预措施

参考《实验针灸学》^[14]取电针组小鼠百会穴,于顶骨正中,使用华佗牌30号0.5寸毫针(直径0.32mm),进针深度约2—3mm,G6805电针仪,电压峰值2V,疏密波,频率1Hz,每次30min,每天1次,每周5天,共治疗4周^[12]。非穴组取左腋下非经非穴点,具体定位为左髂后上棘上2mm,脊柱旁开3mm,该点避开督脉及肋部穴位,针刺时间、疗程与电针组相同。野生组和模型组置于普通笼中饲养,予同等条件抓取,不给予任何治疗。

1.4 Morris水迷宫

水迷宫为一圆桶形水池,直径120cm,深50cm,水深30cm,水温恒温26℃左右,池壁上4个等距离点分水池为4个象限,池壁外标4个入水点,在第三象限放置平台。平台直径6cm,高28cm,没于水面下2cm,水池周围参照物保持不变。各组小鼠于干预结束前5天行Morris水迷宫检测,连续4天进行定位航行实验,观察逃避潜伏期,第5天进行空间探索实验,观察规定时间内小鼠穿越平台的次数。具体实验方案^[15]:①定位航行实验:将受试小鼠按顺时针方向依次由第一象限、第二象限、第三象限、第四象限入水点面向池壁放入水中。记录90s内寻找平台

的时间(逃避潜伏期)。如果小鼠在90s内找到平台,并停留3s以上,记录90s内实际逃避潜伏期;如果在90s内未找到平台,该小鼠的逃避潜伏期记录为90s,由实验者将其引上平台,学习10s后从下一个象限继续定位航行实验。历时4天,每天4次。②空间探索实验:定位航行实验全部结束后,次日进行空间探索实验。撤去平台,从第一象限原入水点将小鼠面向池壁放入水中,记录90s内小鼠穿越原平台相应位置的次数。水迷宫监测全过程,通过安装在水迷宫上方的摄像机传入电脑并记录和储存,再运用行为轨迹跟踪系统软件进行分析和数据处理。

1.5 PET/CT实验方法

干预结束后24h行PET/CT检测,在扫描前12h对小鼠(24只,每组各6只,28—32g)禁食,以减少或避免因血糖浓度因素对18F-FDG在小鼠脑内代谢分布的影响。小鼠尾静脉检测血糖,血糖正常范围(7.0—10.1mmol/L)。小鼠尾静脉注射示踪剂(18F-FDG注射剂量约为18.5MBq);注射示踪剂后,小鼠放置鼠笼内,任其自然自由活动40min,40min后把小鼠放于麻醉诱导盒内进行气体麻醉(由5%异氟烷与100%氧气构成,约5min)。

PET/CT扫描:小鼠尾静脉注射18F-FDG显影剂约40min后开始采集18F-FDG头部显像图像,小鼠置于荷兰Milabs VeCTor+ PET/SPECT/CT三合一成像系统上,扫描视野包含小鼠整个脑部及颈部,采用3D模式采集图像,滤波反投影法重建小鼠轴面、矢状面、冠状面断层图像进行分析,通过PMOD软件(PMOD Technologies, Zurich, Switzerland)进行PET-CT图像融合,并通过Guassian smooth 3D(0.8mmFWHM)的过滤功能和调整图像色阶等获得信噪比高的图像。同类图像均取轴面、矢状面、冠状面坐标完全相同的截面进行比较,由PMOD软件分析小鼠18F-FDG各脑区每克脑组织的摄取率。

1.6 统计学分析

采用SPSS 20.0进行数据统计分析,所有数据均满足方差齐性($P > 0.05$),以均数 $\pm$ 标准差表示,计量资料采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 学习记忆功能

2.1.1 定位航行实验:随着训练时间的增加,各组小鼠逃避潜伏期都有缩短趋势,与野生组相比,模型组小鼠逃避潜伏期明显延长($P < 0.01$);与模型组相比,百会组小鼠逃避潜伏期明显缩短($P < 0.01$),而非穴组小鼠逃避潜伏期与模型组相比无显著性差异($P > 0.05$),见表1。

2.1.2 空间探索实验:与野生组相比,模型组小鼠跨越平台次数明显减少($P < 0.01$);与模型组相比,百会组小鼠跨越平台次数则明显增多($P < 0.01$),而非穴组小鼠跨越平台次数与模型组相比无显著性差异($P > 0.05$),见表1。

2.2 葡萄糖代谢情况

2.2.1 各组小鼠PET/CT影像:基于PET/CT融合图像,采用相同色标,由高到低依次显示高、中、低18F-FDG摄取率的颜色。各组小鼠显示百会组18F-FDG平均活性高于野生组、模型组和非穴组,见图1。

2.2.2 18F-FDG各脑区每克脑组织的摄取率:与模型组相比,野生组小鼠海马(左侧)和扣带回有显著性差异($P < 0.01$),而海马(右侧)、皮质、纹状体(左侧)以及纹状体(右侧)无差异($P > 0.05$);百会组小鼠各脑区与模型组有显著性差异($P < 0.01$);非穴组小鼠各脑区与模型组小鼠相比均无显著性差异($P > 0.05$),与百会组小鼠相比有显著性差异($P < 0.05$),见表2。

3 讨论

中医学关于AD的论述见于“痴呆”、“呆病”、

表1 各组小鼠逃避潜伏期及跨越平台次数比较

($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	逃避潜伏期(s)				跨越平台次数
		第1天	第2天	第3天	第4天	
野生组	10	61.53 $\pm$ 8.06	53.06 $\pm$ 7.19	35.13 $\pm$ 5.12	26.90 $\pm$ 2.69	3.55 $\pm$ 0.46
模型组	10	78.98 $\pm$ 4.55 ^①	72.78 $\pm$ 9.83 ^①	63.66 $\pm$ 7.67 ^①	58.63 $\pm$ 11.80 ^①	0.75 $\pm$ 0.15 ^①
百会组	10	69.11 $\pm$ 9.04 ^③	64.80 $\pm$ 3.37 ^②	51.61 $\pm$ 6.87 ^③	40.20 $\pm$ 5.03 ^③	3.08 $\pm$ 0.31 ^③
非穴组	10	73.53 $\pm$ 6.95 ^④	71.03 $\pm$ 6.82 ^④	59.65 $\pm$ 4.83 ^④	51.84 $\pm$ 6.59 ^④	1.24 $\pm$ 0.23 ^④

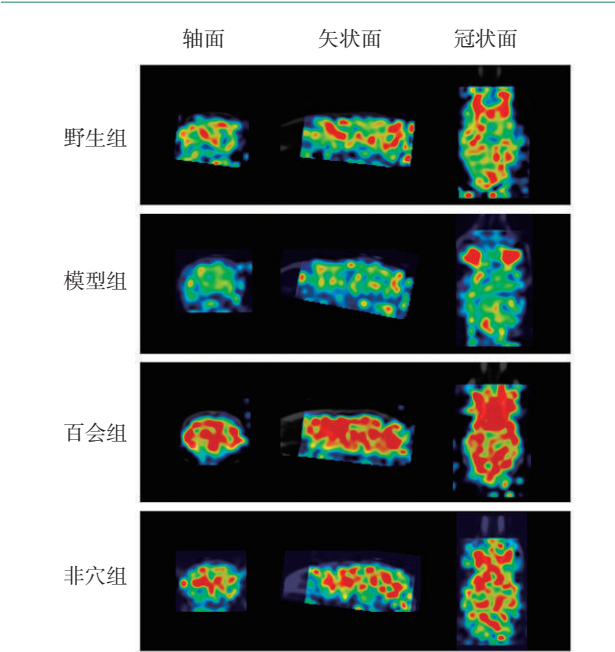
与野生组相比:① $P < 0.01$;与模型组相比:② $P < 0.05$;③ $P < 0.01$;④ $P > 0.05$

表2 18F-FDG小鼠各脑区每克组织的摄取率结果($\bar{x}\pm s, \%ID/g$)

部位	野生组	模型组	百会组	非穴组
海马(左侧)	4.98±1.17 ^②	2.92±1.22	8.20±1.67 ^②	4.15±0.67 ^③
海马(右侧)	4.30±1.32 ^③	2.83±0.92	8.40±2.70 ^①	3.95±0.95 ^③
皮质	3.65±1.53 ^③	2.60±0.91	8.02±2.26 ^②	4.10±1.52 ^③
扣带回	5.63±1.32 ^②	3.23±1.13	8.75±2.02 ^②	4.28±0.92 ^③
纹状体(右侧)	4.83±1.22 ^③	4.02±1.10	10.23±3.39 ^①	5.20±1.48 ^③
纹状体(左侧)	4.92±0.88 ^③	3.43±1.14	8.43±1.79 ^②	4.95±1.19 ^③
平均值	4.69±1.29 ^③	3.32±1.16	8.88±2.19 ^②	4.53±1.26 ^③

与模型组相比:① $P<0.05$;② $P<0.01$;与百会组相比:③ $P<0.05$

图1 各组小鼠PET/CT影像



“善忘”、“文痴”、“神呆”等病证,但与现代医学的老年性痴呆皆不能完全等同。

针刺可以改善脑内神经元的能量代谢^[16]。有研究发现电针头穴能解除血管的痉挛状态,扩张脑内小动脉,促进新血管的生成,增加缺血性脑组织的血液灌注^[17],血流的恢复使缺血组织获得了血氧供给。线粒体通过氧化磷酸化生成大量能量,供应细胞内各种化学反应,是能量的加工厂,脑缺血后线粒体的功能发生故障,ATP生成减少^[18],而针刺可以通过改善线粒体的膜电位、呼吸功能从而改善线粒体的功能,或通过刺激胆碱能神经和一氧化氮合酶,提高能量代谢^[19-20]。有研究发现,电针可以明显提高大鼠海马的循环血流量,通过微循环的改善进而增加能量供应,以改善葡萄糖代谢,促进神经功能的恢

复^[21]。同时,电针可以激活丘脑、海马、扣带回皮质、额叶内侧皮质、额内侧回等脑区,补偿或协助受损的神经网络的重建^[22-24]。此外有研究认为,通过对特定脑区葡萄糖代谢的观察,针刺百会同非穴相比较具有更好的治疗效果,证明了穴位的功用存在着特异性^[25-26]。

PET是一种基于放射性核素显像的功能成像技术,目前已被广泛应用于认知功能等脑功能研究^[27]。PET原理是将人体代谢所需要的物质(如:葡萄糖)标记上短寿命的放射性核素,制成显像剂注入到体内后进行扫描成像。18氟-脱氧葡萄糖(18F-fluoro-deoxy-glucose, 18F-FDG)是目前运用最广泛的放射性核素标记化合物。18F-FDG能够从分子水平研究脑组织的血流、代谢、受体分布及功能变化,从而反映脑组织的生物化学过程和功能情况^[28],对临床诊断痴呆患者可用MRI排除脑出血灶、梗死灶、软化灶等损害,但PET显像呈现双侧或单侧顶叶或颞顶叶代谢减低,即可确定为AD,同时AD早期中颞叶氧代谢降低,可早于局部血流降低,AD时代谢减低的原因与病变区葡萄糖磷酸化、葡萄糖转运和氧利用均有关,并且下降程度与患者认知能力损害程度呈正相关^[29-30]。Bailly M等^[31]发现AD、轻度认识障碍患者的后扣带回和楔前叶呈现低代谢状态。Huang YC等^[32]发现阿尔茨海默型痴呆患者颞中回、额中回、额上回、额下回、后扣带回等脑区的葡萄糖代谢较低。PET/CT未来将是研究脑功能及诊断、鉴别神经退行性疾病的有效手段之一^[33-35]。

本研究中采用Morris水迷宫实验观察APP/PS1小鼠学习记忆能力,同时,我们选取了与学习记忆相关的脑区,包括皮质、海马和扣带回等观察APP/PS1小鼠脑葡萄糖代谢水平,发现与野生鼠相比,模型组小鼠逃避潜伏期明显增加,跨越平台次数减少,18F-FDG摄取率减少;与模型组相比,电针百会穴可以减少小鼠的逃避潜伏期,增加跨越平台次数,促进小鼠脑18F-FDG摄取,而非穴组与模型组没有显著性差异。这些结果说明电针百会穴改善APP/PS1小鼠学习记忆功能,可能与脑葡萄糖代谢有关。

综上所述,电针百会穴可以改善APP/PS1小鼠的学习记忆,其作用机制可能与脑葡萄糖代谢有关,但电针多靶点作用,其确切机制仍有待进一步研究。

参考文献

- [1] Chouraki V, Seshadri S. Genetics of Alzheimer's disease[J]. *Adv Genet*, 2014, (87):245—294.
- [2] Alves L, Correia AS, Miguel R, et al. Alzheimer's disease: a clinical practice-oriented review[J]. *Front Neurol*, 2012, (3): 63.
- [3] Wimo A. The art of cost of illness[J]. *J Alzheimers Dis*, 2010, 19(2):617—619.
- [4] Sosa-Ortiz AL, Acosta-Castillo I, Prince MJ. Epidemiology of dementias and Alzheimer's disease[J]. *Arch Med Res*, 2012, 43(8):600—608.
- [5] Zhou J, Peng W, Li W, et al. Acupuncture for patients with Alzheimer's disease: a systematic review protocol[J]. *BMJ Open*, 2014, 4(8):e005896.
- [6] Chen Z, Zhong C. Decoding Alzheimer's disease from perturbed cerebral glucose metabolism: implications for diagnostic and therapeutic strategies[J]. *Prog Neurobiol*, 2013, (108): 21—43.
- [7] Silverman DH, Small GW, Chang CY, et al. Positron emission tomography in evaluation of dementia: Regional brain metabolism and long-term outcome[J]. *JAMA*, 2001, 286(17): 2120—2127.
- [8] Cheng H, Yu J, Jiang Z, et al. Acupuncture improves cognitive deficits and regulates the brain cell proliferation of SAMP8 mice[J]. *Neurosci Lett*, 2008, 432(2):111—116.
- [9] 朱书秀,孙国杰.电针对阿尔茨海默病模型大鼠学习记忆能力及海马区胶质细胞的影响[J].*中国针灸*,2009,29(2):133—136.
- [10] 彭静,罗亮,徐丽,等.电针治疗30例阿尔茨海默病的疗效评定[J].*针灸临床杂志*,2015,(05):39—41.
- [11] 王康锋,张立娟,陈新勇.电针大椎及百会穴治疗老年性痴呆36例临床观察[J].*中华中医药杂志*,2015,(03):784—786.
- [12] Wang F, Zhong H, Li X, et al. Electroacupuncture attenuates reference memory impairment associated with astrocytic NDRG2 suppression in APP/PS1 transgenic mice[J]. *Mol Neurobiol*, 2014, 50(2):305—313.
- [13] Lin R, Chen J, Li X, et al. Electroacupuncture at the Baihui acupoint alleviates cognitive impairment and exerts neuroprotective effects by modulating the expression and processing of brain-derived neurotrophic factor in APP/PS1 transgenic mice[J]. *Mol Med Rep*, 2016, 13(2):1611—1617.
- [14] 李忠仁.实验针灸学[M].北京:中国中医药出版社,2003:325—329.
- [15] Vorhees CV, Williams MT. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory[J]. *Nat Protoc*, 2006, 1(2):848—858.
- [16] 迟相林,李振光,郭兆荣,等.针刺治疗急性缺血性脑卒中的机制研究进展[J].*针刺研究*,2007,(04):285—288.
- [17] 鲍春龄,东红升.头穴针刺对脑出血大鼠脑组织能量代谢的影响[J].*针刺研究*,2008,33(2):93—97.
- [18] 董卫国,林岚,王丰,等.电针对SAMP8小鼠海马线粒体呼吸链功能的影响[J].*中国针灸*,2012,32(8):726—730.
- [19] Graham SH, Chen J. Programmed cell death in cerebral ischemia[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2001, 21(2):99—109.
- [20] Lin RT, Chen CY, Tzeng CY, et al. Electroacupuncture improves glucose tolerance through cholinergic nerve and nitric oxide synthase effects in rats[J]. *Neurosci Lett*, 2011, 494(2):114—118.
- [21] 卢岩,王世军.电针对局灶性脑缺血大鼠脑葡萄糖代谢的影响[J].*辽宁中医杂志*,2011,(05):995—999.
- [22] 张虹,陈炜炜,宋文忠,等.电针对创伤后应激障碍患者脑葡萄糖代谢的影响[J].*中华中医药杂志*,2010,(11):1882—1884.
- [23] 左芳,石现,田嘉禾.电针对脑梗塞患者脑葡萄糖代谢的影响[J].*中华中医药学刊*,2008,(4):742—743.
- [24] An YS, Moon SK, Min IK, et al. Changes in regional cerebral blood flow and glucose metabolism following electroacupuncture at LI 4 and LI 11 in normal volunteers[J]. *J Altern Complement Med*, 2009, 15(10):1075—1081.
- [25] Liu H, Shen X, Tang H, et al. Using microPET imaging in quantitative verification of the acupuncture effect in ischemia stroke treatment[J]. *Sci Rep*, 2013, (3):1070.
- [26] 林如辉,俞坤强,李晓洁,等.电针改善局灶性脑缺血大鼠学习记忆障碍的脑影像结构和超微结构研究[J].*康复学报*,2015,(1): 34—37,43.
- [27] Sperling RA, Dickerson BC, Pihlajamaki M, et al. Functional alterations in memory networks in early Alzheimer's disease[J]. *Neuromolecular Med*, 2010, 12(1):27—43.
- [28] Perani D, Schillaci O, Padovani A, et al. A survey of FDG- and amyloid-PET imaging in dementia and GRADE analysis[J]. *Biomed Res Int*, 2014, (2014):785039.
- [29] Mosconi L, Pupi A, De Leon MJ. Brain glucose hypometabolism and oxidative stress in preclinical Alzheimer's disease[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2008, (1147):180—195.
- [30] Kim EJ, Cho SS, Jeong Y, et al. Glucose metabolism in early onset versus late onset Alzheimer's disease: an SPM analysis of 120 patients[J]. *Brain*, 2005, 128(Pt 8):1790—1801.
- [31] Bailly M, Destrieux C, Hommet C, et al. Precuneus and Cingulate Cortex Atrophy and Hypometabolism in Patients with Alzheimer's Disease and Mild Cognitive Impairment: MRI and (18)F-FDG PET Quantitative Analysis Using Free-Surfer[J]. *Biomed Res Int*, 2015, (2015):583931.
- [32] Huang YC, Yen PS, Wu ST, et al. Brain Metabolism of Less-Educated Patients With Alzheimer Dementia Studied by Positron Emission Tomography[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2015, 94(30):e1252.
- [33] Zhu L, Ploessl K, Kung HF. PET/SPECT imaging agents for neurodegenerative diseases[J]. *Chem Soc Rev*, 2014, 43 (19):6683—6691.
- [34] Adlard PA, Tran BA, Finkelstein DI, et al. A review of β -amyloid neuroimaging in Alzheimer's disease[J]. *Front Neurosci*, 2014, (8):327.
- [35] Vandenberghe R, Adamczuk K, Dupont P, et al. Amyloid PET in clinical practice: Its place in the multidimensional space of Alzheimer's disease[J]. *Neuroimage Clin*, 2013, (2): 497—511.