

嗅三针对SAMP8小鼠海马磷酸化PI3K/Akt蛋白表达和突触可塑性的影响*

王 渊¹ 王 强¹ 樊恩召¹ 任 博¹ 郭 婷¹ 刘智斌¹ 刘国强^{2,3}

摘要

目的:观察嗅三针对SAMP8小鼠海马磷酸化PI3K、Akt蛋白表达和海马突触可塑性损伤的影响,探讨嗅三针治疗阿尔茨海默病(AD)模型小鼠的作用机制。

方法:将40只SAMP8小鼠随机分为模型组(Model)、嗅三针组(XSZ)、嗅神经切断嗅三针组(XSZ+XSJ)和盐酸多奈哌齐组(Donepezil),每组10只,10只SAMR1小鼠作为正常组(Control)。XSZ组和XSZ+XSJ组采用电针刺激印堂穴和双侧迎香穴,Donepezil组采用盐酸多奈哌齐灌胃,Control组和Model组不干预。采用Morris水迷宫实验评价小鼠学习记忆能力,新物体识别实验评价小鼠新物体识别能力,Western Blot和免疫组化检测小鼠海马区p-PI3K和p-Akt蛋白表达,透射电镜观测小鼠海马突触超微结构。

结果:与Model组比较,XSZ和Donepezil干预均可以明显降低SAMP8小鼠4d平均逃避潜伏期,增加其靶象限停留时间、穿越平台次数和新物体偏爱指数,明显升高其海马p-PI3K和p-Akt蛋白表达($P<0.05$),改善其海马神经元突触结构;XSZ+XSJ对于SAMP8小鼠学习记忆能力、新物体识别能力指标及p-PI3K、p-Akt蛋白表达无显著影响($P>0.05$),对其突触结构损伤无明显改善;对于上述指标的影响,XSZ组与Donepezil组比较无显著差异($P>0.05$)。

结论:嗅三针可能基于嗅觉通路完整性,调节海马PI3K/Akt磷酸化表达,修复海马突触形态结构损伤,改善海马突触可塑性,从而发挥提高SAMP8小鼠学习记忆能力的效应。

关键词 嗅三针;阿尔茨海默病;p-PI3K;p-Akt;突触可塑性

中图分类号:R245,R743,R49 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2021)-02-0135-08

Effects of olfactory three needle on expression of phosphorylated PI3K/Akt protein and synaptic plasticity in the hippocampus of SAMP8 mice/WANG Yuan,WANG Qiang,FAN Enzhao,et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine,2021,36(2): 135—142

Abstract

Objective:To explore mechanism of olfactory three needle therapy on AD model mice by observing its effects on expression of phosphorylated PI3K and Akt protein and damage of synaptic plasticity in the hippocampus of SAMP8 mice.

Method:Forty SAMP8 mice were randomly divided into the model group, the olfactory three needle group (XSZ),the olfactory three needle group with olfactory nerve transected(XSZ+XSJ)and the donepezil HCL group (Donepezil),with 10 mice in each group,and 10 SAMR1 mice as the control group. The XSZ group and the XSZ+XSJ group were stimulated by electroacupuncture at Yintang(EX-HN3)and bilateral Yingxiang(LI20)points, the Donepezil group was given intragastric administration of donepezil HCL,no intervention were given to the

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2021.02.002

*基金项目:国家自然科学基金项目(82074552,81503667);陕西省科技厅自然科学基金基础研究计划项目(2018JM7041);陕西中医药大学经脉-脏腑相关研究创新团队项目(2019-YL09)

1 陕西中医药大学针灸推拿学院,陕西省针药结合重点实验室/咸阳市神经生物学(针灸)重点实验室,咸阳,712046; 2 陕西省中医医院; 3 通讯作者

第一作者简介:王渊,男,副教授,副主任医师; 收稿日期:2020-03-18

control group and the model group. Morris water maze test was used to evaluate the learning and memory ability, new object recognition experiment was used to evaluate the new object recognition ability. Western blot and immunohistochemistry were used to detect the expression of p-PI3K and p-Akt proteins in hippocampus of mice, and transmission electron microscopy was used to observe synaptic ultrastructure in hippocampus of mice.

Result: Compared with the model group, XSZ and Donepezil intervention could significantly reduce the 4-day average escape latency, increase the target quadrant residence time, platform crossing times and new object preference index, increase the expression of p-PI3K and p-Akt in the hippocampus of SAMP8 mice ($P < 0.05$), and improve the hippocampus synaptic structure of SAMP8 mice; the XSZ+XSJ group had no significant changes on learning and memory ability, new object recognition ability and p-PI3K, p-Akt protein expression ($P > 0.05$), and had no significant improvement on the damage to synaptic structure of SAMP8 mice. There was no significant difference between the XSZ group and the Donepezil group for the above indexes ($P > 0.05$).

Conclusion: Olfactory three needle might regulate the expression of phosphorylated PI3K/Akt, repair the damage of synaptic morphology and structure, and improve the plasticity of synapses based on the integrity of olfactory pathway, thus exerting the effect of improving learning and memory ability of SAMP8 mice.

Author's address College of Acupuncture Moxibustion and Tuina, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang, 712046

Key word olfactory three needle; Alzheimer's disease; p-PI3K; p-Akt; synaptic plasticity

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种以进行性失智症为主要临床表现的神经退行性疾病,预计到2050年全世界AD患者将达1.315亿^[1-2]。 β -淀粉样蛋白(β -amyloid, A β)沉积和海马神经元突触可塑性的损伤直接参与了AD早期的发病过程,是AD发病机制中的关键环节,而磷脂酰肌醇-3-激酶/丝/苏氨酸激酶(phosphatidylinositol-3-kinases/serine threonine kinase, PI3K/Akt)信号通路在AD的发生、发展乃至治疗中起着重要的作用,对突触可塑性和记忆的巩固十分重要,且介导A β 生成^[3-5]。因此,如何调节PI3K/Akt信号通路,改善突触可塑性可能成为防治AD的重要策略。

目前,临床上尚无有效药物可以终止或逆转其发病进程,对其早期诊治意义重大。鉴于AD难治性,我们多年一直将针刺干预AD作为主要研究方向^[6-8],发现嗅三针疗法可明显改善轻度AD患者认知功能^[9],并在前期机制研究中发现该疗法干预可以减轻AD模型海马A β 沉积^[10],但有关针刺调节海马突触可塑性及相关信号通路间的效应链研究尚少见报道。鉴于此,本研究以SAMP8小鼠为AD模型,拟观察嗅三针通过调控PI3K/Akt信号通路对SAMP8小鼠学习记忆能力和海马神经元突触可塑性的影响,为阐明针刺效应机制开辟新的切入点。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

SPF级雄性快速老化模型(senescence-accelerated mouse prone 8, SAMP8)小鼠和抗快速老化模型(senescence-accelerated mouse resistance 1, SAMR1)小鼠(中国人民解放军军事科学院实验动物中心,许可证号:SCXK(京)2017-0023),实验前小鼠适应性喂养1周,动物饲养环境:温控($22 \pm 2^\circ\text{C}$)、湿度(55%)、光照(12h)。所有操作均遵循陕西中医药大学实验动物使用相关伦理要求。

动物分组:健康7月龄雄性SAMR1小鼠作为Control组;健康7月龄雄性SAMP8小鼠随机被分为Model组、XSZ组、XSZ+XSJ组和Donepezil组。根据旷场实验结果,排除不合格3只SAMP8小鼠,以上每组动物10只,体质量($18 \pm 2\text{g}$)。

1.2 主要药品与试剂

盐酸多奈哌齐(卫材(中国)药业有限公司,规格:5mg/片),磷酸化PI3K蛋白抗体(Abcam,美国),磷酸化Akt蛋白抗体(Abcam,美国),PBS缓冲液(Abcam,美国),兔抗羊二抗-HRP(Abcam,美国),免疫组化试剂盒(北京百奥莱博科技有限公司),多聚甲醛(北京中镜科仪技术有限公司),戊二醛(北京中镜科仪技术有限公司),饿酸(北京中镜科仪技术有限公司),柠檬酸铅(北京中镜科仪技术有限公

司),醋酸双氧铀(北京中镜科仪技术有限公司)。

1.3 主要仪器和材料

XR-XM101型Morris水迷宫(上海新软信息科技有限公司),XR-XZ301型旷场视频分析系统(上海新软信息科技有限公司),新物体识别箱(上海软隆科技发展有限公司),HANS-200A型韩氏穴位神经刺激仪(南京济生医疗科技有限公司),TECNA1-10型透射电镜(荷兰PHILIPS公司),凝胶成像分析系统(美国BIO-RAD公司),紫外可见分光光度计(美国MILTONROY公司),Image-proplus 6.0图像分析系统(美国MEDIA CYBERNETICS公司),华佗牌无菌针灸针(苏州医疗用品有限公司)。

1.4 旷场实验剔除不合格SAMP8小鼠

入组前进行一次旷场实验,剔除自主活动差异大的小鼠。旷场实验视频分析系统主要包括采集箱、视频采集装置和软件系统。旷场采集箱为4个50cm×50cm×50cm大小的黑色无盖木质箱子连在一起。将小鼠分别以不同顺序面壁轻放于箱底,记录其于箱内中心区域在5min测试时长内的活动时间和路程,以此作为评价其自主活动状态的标准,测试完毕后将箱底粪便等排泄物清除^[11]。

1.5 干预方法

Control组和Model组小鼠,正常饲养,每日均给予同种程度抓取,不做任何干预;XSZ组小鼠,采用无菌针灸针(0.25mm×13mm),选择迎香穴(双侧),位于小鼠鼻孔外侧上端、有毛与无毛交界处^[12],向内上方刺入2mm,印堂穴,位于小鼠两眼眶上缘中点连线与正中中线交点^[12],向鼻根部刺入2mm,连接电针仪(HANS-200A型韩氏穴位神经刺激仪,疏密波,1mA强度,2/15Hz频率),印堂穴接正极,单侧迎香穴接负极,电针刺激10min,另一侧迎香穴换接负极,再给予10min电针刺激;XSZ+XSJ组小鼠,用脑立体定位仪固定麻醉后的小鼠,将其颅顶正中皮肤切开,于鼻额缝-眼眶上内侧缘-矢状静脉窦之间分别钻1个小孔,暴露嗅球,锐性切断嗅神经并缝合切开部位^[13],对小鼠进行嗅三针电针刺激,方法同XSZ组;Donepezil组小鼠,以3mg/kg/d剂量标准的盐酸多奈哌齐,对小鼠进行灌胃。

疗程:对于各组小鼠,每日干预1次,5d为1个疗程,间歇2d,共观察4个疗程。

1.6 Morris水迷宫实验评价小鼠学习记忆能力

定位航行实验:①将平台放置于Morris水迷宫水池的第4象限,与池壁间距30cm、水面间距2cm,在测试过程中保持此平台位置固定不变;②对各组小鼠进行适应性训练,将其于正式测试前1d引至平台,适应时间为10s,从第2象限固定投放点将其放入水中自由游泳,时间为120s;③适应性训练结束后,正式测试时间为4d,每天于下午2点,将各组小鼠分别于各象限固定投放点面壁轮流放入4个象限(象限投放顺序不同),记录其在水中开始游泳至找到平台的时间,以在平台停留时间>5s评定为小鼠找到平台的标准,此为逃避潜伏期;④若小鼠在120s内未找到平台,将其引至平台,停留时间为15s,对该小鼠的逃避潜伏期进行记录,时间为120s;⑤对于每只小鼠当天成绩,以其每天在4个象限的平均值进行计量。

空间探索实验:①1—4d测试结束后,于第5天撤去放置于第4象限的平台;②将各组小鼠分别于各象限固定投放点面壁轮流放入4个象限(象限投放顺序不同),记录小鼠在120s内穿越第4象限原平台位置的次数以及在停留于第4象限内的时间。

1.7 新物体识别实验评价小鼠新物体识别能力

采用以下步骤评价小鼠学习记忆能力:①将小鼠于固定时间放入新物体辨别活动箱3min,不做任何干预,待其自由活动结束后放回其饲养笼中,此为适应期;②将2个大小、形态、规格一样的物体(A1、A2)对称性放置于活动箱中,A1与A2间距为25cm,距活动箱壁距离均为10cm,将小鼠于固定时间从距箱中A1、A2等距处放入3min,不做任何干预,记录小鼠对A1、A2两个测试物自由探索时间,此为训练期;③5min后,采用与物体A大小、形态、规格完全不一样的物体B替换A2,记录小鼠对熟悉测试物A1和新测试物B的自由探索时间,此为测试期。以上测试观测周期为3天。

新物体偏爱指数计算公式为:

$$PI = \frac{t_B}{t_{A1} + t_B} \times 100\%$$

PI:偏爱指数, t_B :探索物体B的时间, t_{A1} :探索物体A的时间

1.8 免疫蛋白印迹(Western Blot)法检测小鼠海马

区 p-PI3K 和 p-Akt 蛋白表达

检测步骤:①干预结束后,将小鼠麻醉,断头取脑后分离海马组织,将部分样本放入EP管并投入液氮,取出后存放于-80℃冰箱中;②采用剂量分别为1ml和10 μ l的苯甲基磺酰氟裂解缓冲液和储存液对海马样本100mg进行裂解,再对其进行充分研磨、离心和吸上清液;③采用BCA蛋白定量试剂盒测定样本蛋白浓度,从发生变性后的样本蛋白中取50 μ g,进行电泳、PVDF转膜及封闭2h;④加入浓度均为1:1000的p-PI3K或p-Akt,4℃孵育过夜;⑤加入浓度为1:5000的由HRP标记的二抗,于常温条件下孵育1h;⑥将PVDF膜置于图像扫描仪并曝光p-PI3K或p-Akt目标蛋白,图像分析处理采用Image-proplus 6.0图像分析系统。

1.9 免疫组化法检测小鼠海马区 p-PI3K 和 p-Akt 蛋白表达

检测步骤:①干预结束后,将小鼠麻醉,断头取脑后分离海马组织,将部分样本包埋于蜡块,对其进行冠状切片,厚度为5 μ m;②对切片行脱蜡、水化和抗原修复处理;③采用SABC法对处理后的样本切片进行染色,并脱水、透明、封片;④取6个视野作为镜检观测范围,制定图像观测规格($\times 400$),阳性细胞标志为棕褐色胞浆,以阳性细胞数平均值为观测结果。

1.10 透射电镜观测小鼠海马突触超微结构

①干预结束后,将小鼠麻醉,断头取脑后分离海马组织,将部分样本置于多聚甲醛(10g/L)和戊二醛

(20g/L)固定液中进行固定;②采用浓度为0.1mol/L的PBS缓冲液对固定后的海马样本进行冲洗,共计3次,时间为10min/次;③采用浓度为10g/L的饿酸对海马样本进行固定,时间为1h;④采用浓度为0.1mol/L的PBS缓冲液对海马样本进行再次冲洗,时间及次数同前;⑤依次采用不同体积分数的丙酮对海马样本进行脱水,时间为20min;⑥将样本制作成超薄切片,采用浓度为20g/L的柠檬酸铅和醋酸双氧铀对切片进行双重染色,并采用透射电镜观测海马突触结构。

1.11 统计学分析

采用SPSS 19.0进行统计学处理,数据以均数 $\pm$ 标准差表示,采用单因素方差分析进行组间比较,采用LSD检验进行组间两两比较,评定差异有显著性意义的标准以 $P<0.05$ 表示。

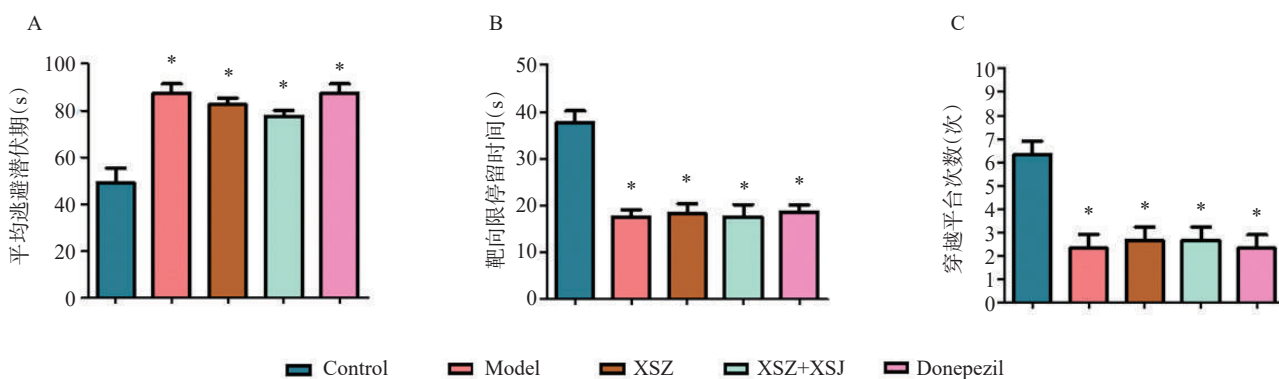
2 结果

2.1 各组小鼠行为学检测结果

2.1.1 干预前行为学基线值评估:如图1,图3所示,在首次给予小鼠电针和药物干预前,对Model组、XSZ组、XSZ+XSJ组、Donepezil组小鼠平均逃避潜伏期、靶象限停留时间、穿越平台次数和新物体偏爱指数等行为学指标的基线值进行了检测,各组相互比较后无显著性差异,表明各项行为学指标在干预前条件均衡,实验中获得检测值结果可信。

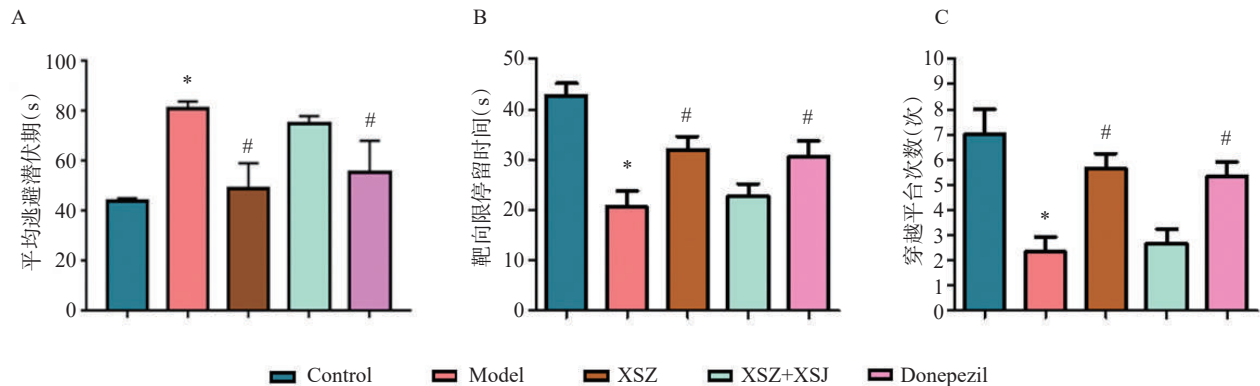
2.1.2 Morris水迷宫检测结果:如图1所示,治疗前,与Control组相比,AD小鼠4d平均逃避潜伏期

图1 治疗前各组小鼠的水迷宫测试结果



A为各组小鼠平均逃避潜伏期的比较;B为空间探索实验中各组小鼠靶象限停留时间的比较;C为空间探索实验中各组小鼠穿越平台次数的比较。与Control组比较,* $P<0.05$,n=10

图2 治疗后各组小鼠的水迷宫测试结果



A为各组小鼠平均逃避潜伏期的比较;B为空间探索实验中各组小鼠靶象限停留时间的比较;C为空间探索实验中各组小鼠穿越平台次数的比较。与Control组比较,* $P<0.05$;与Model组比较,# $P<0.05$, $n=10$

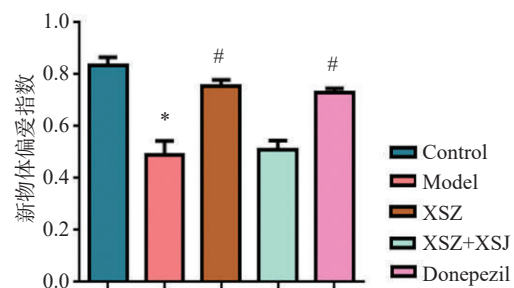
(4个象限4天的平均值)明显升高($P<0.05$),靶象限停留时间和穿越平台次数明显减少($P<0.05$)。如图2所示,治疗后,与Model组相比,XSZ和Donepezil均可减少小鼠4d平均逃避潜伏期($P<0.05$),增加小鼠靶象限停留时间和穿越平台次数($P<0.05$),XSZ+XSJ组对三个指标无明显影响($P>0.05$);XSZ组与Donepezil组三个指标比较,无显著性差异($P>0.05$)。

2.1.3 新物体识别检测结果:见图3。治疗前,与Control组相比,AD小鼠新物体偏爱指数明显降低($P<0.05$)。见图4,治疗后,与Model组相比,XSZ和Donepezil均可升高小鼠新物体偏爱指数($P<0.05$),XSZ+XSJ组指数无明显变化($P>0.05$);XSZ组与Donepezil组指数比较,无显著性差异($P>0.05$)。

2.2 各组小鼠海马p-PI3K和p-Akt蛋白表达结果

2.2.1 Western Blot检测结果:如图5、图6所示,与

图4 治疗后各组小鼠的新物体偏爱指数



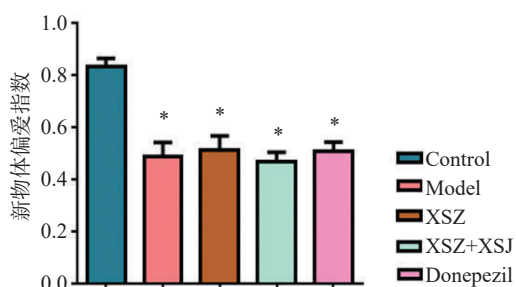
与Control组比较,* $P<0.05$;与Model组比较,# $P<0.05$, $n=10$

Control组相比,Model组小鼠海马p-PI3K和p-Akt蛋白表达显著下调($P<0.01$);与Model组相比,XSZ和Donepezil均可明显升高小鼠海马p-PI3K和p-Akt蛋白表达($P<0.05$),XSZ+XSJ组表达无明显变化($P>0.05$);XSZ组与Donepezil组表达比较,无显著性差异($P>0.05$)。

2.2.2 免疫组化法检测结果:如图7、图8,各组小鼠海马内均可见深棕色阳性表达。如表1所示,与Control组相比,Model组小鼠海马p-PI3K和p-Akt阳性细胞计数明显减少($P<0.01$);与Model组相比,XSZ和Donepezil均可明显增加小鼠海马p-PI3K和p-Akt阳性细胞计数($P<0.05$),XSZ+XSJ组阳性细胞计数亦有增加,但无显著性差异($P>0.05$);XSZ组与Donepezil组阳性细胞计数比较,无显著性差异($P>0.05$)。

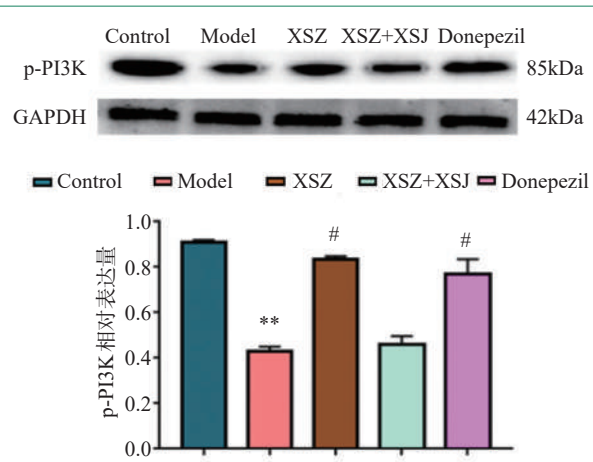
2.3 各组小鼠海马突触超微结构观测结果

图3 治疗前各组小鼠的新物体偏爱指数



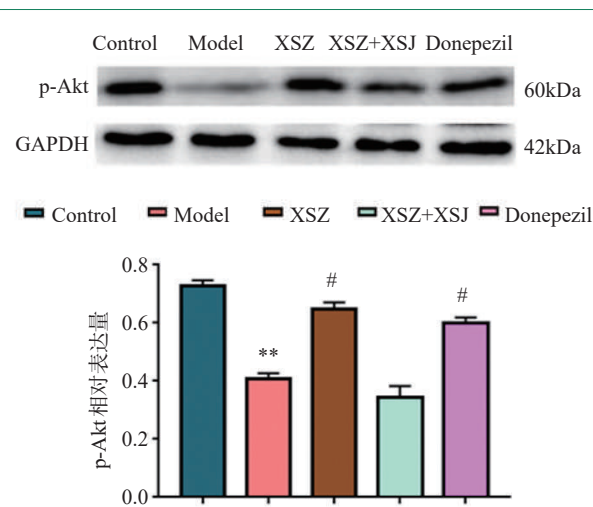
与Control组比较,* $P<0.05$, $n=10$

图5 蛋白印迹法检测各组小鼠p-PI3K蛋白的表达水平



与Control组比较, ** $P<0.01$;与Model组比较, # $P<0.05$, $n=10$

图6 蛋白印迹法检测各组小鼠p-Akt蛋白的表达水平



与Control组比较, ** $P<0.01$;与Model组比较, # $P<0.05$, $n=10$

如图9所示,各组小鼠海马组织突触超微结构观察结果显示:Control组:海马组织突触膜结构完整,突触界面及双层膜结构均清晰可见,突触前、后膜间界限及突触间隙清晰,位于突触前膜内的囊泡

表1 各组小鼠海马p-PI3K、p-Akt阳性细胞数 ($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	p-PI3K	p-Akt
Control	10	81.25±4.67	75.12±5.28
Model	10	40.13±5.32 ^①	38.75±4.53 ^①
XSZ	10	68.71±3.59 ^②	61.52±5.37 ^②
XSZ+XSJ	10	43.56±3.84 ^①	40.33±4.98 ^①
Donepezil	10	70.42±6.03 ^②	59.42±5.83 ^②

注:与Control组比较:① $P<0.01$;与Model组比较:② $P<0.05$

丰富且呈密集状分布。

Model组:海马组织突触膜出现溶解现象,结构不完整,突触界面融合消失,突触前、后膜间界限及突触间隙大多模糊不清,位于突触前膜内的囊泡明显减少且呈不均状分布。

XSZ组和Donepezil组:与Model组比较,海马组织突触膜溶解现象有所减少,结构有所改善趋于完整,突触界面较为清晰,突触前、后膜间界限及突触间隙均有不同程度的改善并趋向清晰,位于突触前膜内的囊泡逐渐增加且趋向密集状分布。

XSZ+XSJ组:与Model组比较,无明显改善。

3 讨论

AD作为全球性医学问题,已成为医学界关注的焦点,我国即将启动“中国脑计划”,对于推动人类对老年失智症、帕金森症等脑疾病的诊断治疗具有重要意义^[14]。本实验采用SAMP8小鼠作为AD动物模型,研究表明,此品系快速老化小鼠在学习记忆能力衰退、A β 沉积、海马突触可塑性损伤等脑内神经病理变化方面与临床AD患者脑内病理变化具有相似性,7月龄小鼠是一种可模拟AD早期的、理想而可靠的动物模型^[15-16]。

嗅三针疗法是我们多年来用于治疗AD的特色针法,由双侧迎香穴和印堂穴组成,我们在前期针对此疗法治疗早期AD做了相关效应机制研究^[17-18],但对海马突触可塑性和相关信号通路的影响以及相

图7 免疫组化法检测各组小鼠海马p-PI3K蛋白的表达水平

($\times 400$)

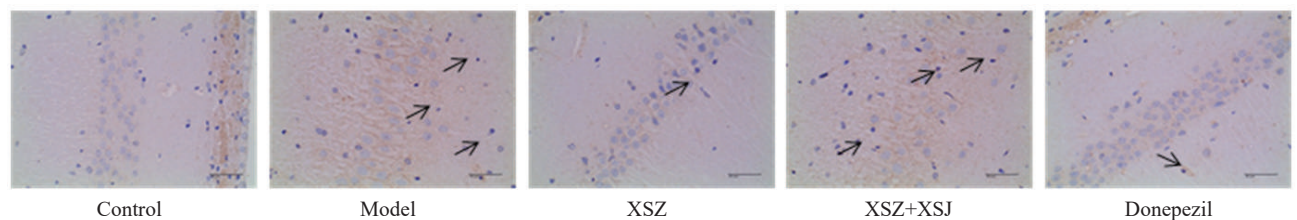


图8 免疫组化法检测各组小鼠海马p-Akt蛋白的表达水平

(×400)

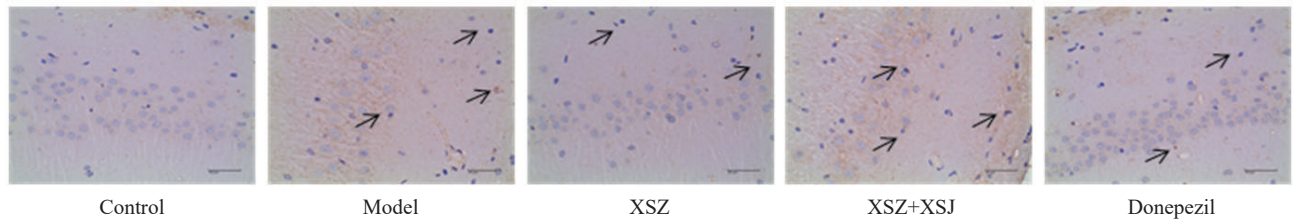
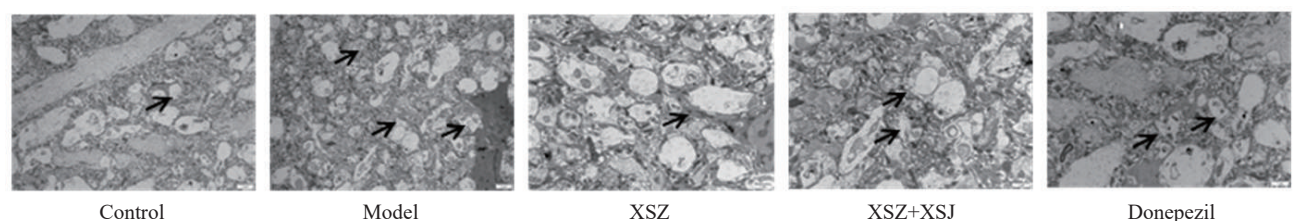


图9 各组小鼠海马组织的突触超微结构图

(透射电镜,×8000)



应的机制尚待完善。鉴于此,本研究拟用嗅三针干预SAMP8小鼠,通过行为学方法检测小鼠学习记忆和新物体识别能力,Western Blot和免疫组化检测PI3K/Akt通路蛋白表达,透射电镜观察海马突触超微结构,探索嗅三针对AD模型小鼠认知能力、海马突触可塑性和相关信号通路的影响及机制,为临床治疗AD提供新思路。

本实验结果显示,SAMP8小鼠海马组织中p-PI3K和p-Akt蛋白表达量较Control组明显下降,提示AD模型可能影响PI3K/Akt通路蛋白的表达,Morris水迷宫和新物体识别实验结果表明SAMP8小鼠学习记忆和新物体识别能力明显下降,海马突触超微结构观测结果表明SAMP8小鼠海马组织突触膜出现溶解现象,结构不完整,突触界面融合消失,突触前、后膜间界限及突触间隙大多模糊不清,位于突触前膜内的囊泡明显减少且呈不均状分布,提示PI3K/Akt信号通路的下调和海马突触可塑性损伤可以导致认知水平的下降。神经突触可塑性损伤是AD学习记忆功能衰退的重要神经生物学基础,突触是细胞与细胞之间信息传递的连接点,传递脑中化学和电信号,对学习记忆至关重要^[19-20];有研究发现,PI3K/Akt信号通路与AD的发生及发展有着密切的联系,PI3K在生长因子受体等胞外信号活化后,激活下游蛋白激酶AKT,活化的AKT可以磷

酸化凋亡基因,促进凋亡基因失活,从而抑制神经元凋亡以及促进神经元的存活,当PI3K/Akt信号通路被上调时,AKT激酶会发生磷酸化,AKT的活性被激活,从这个方向起到抑制Aβ淀粉沉淀生成、改善突触可塑性、阻止细胞凋亡的作用,此通路不但在细胞的迁移、增殖、分化与凋亡中发挥重要的调控作用,而且在调节神经、神经元网络、神经元突触棘和突触的形成和在成人大脑中的学习和记忆的功能中发挥重要作用^[21-22]。也有研究发现,PI3K/Akt复合体参与AD的发生,Aβ促使PI3K/Akt复合体活化并促使PI3K/Akt转位到树突棘末端的突触,从而引起树突棘塌陷,在AD中,PI3K的高表达与Tau蛋白的多度磷酸化共定位,AKT表达水平增高,过度沉积的Aβ淀粉样蛋白引起PI3K/Akt通路的过度激活,导致神经突触丢失和认知损伤^[23-24]。因此,调节PI3K/Akt信号通路、改善突触可塑性损伤是AD治疗首要靶点。

本实验结果进一步显示,XSZ组小鼠海马组织中p-PI3K和p-Akt蛋白表达量较Model组显著增加;XSZ组小鼠海马组织突触结构趋于完成、减少膜溶解现象,使突触界面、突触前、后膜间界限及间隙呈现不同程度的改善并趋向清晰,使突触前膜内的囊泡逐渐增加且趋向密集状分布;同时XSZ组小鼠的学习记忆和新物体识别能力较Model组小鼠改

善;本实验将 Donepezil 组作为阳性对照组,Donepezil 作为第二代高选择性乙酰胆碱酯酶阻滞剂,广泛主要用于治疗 AD 认知功能轻度障碍,临床疗效确切,安全性较高^[25],结果表明,嗅三针和盐酸多奈哌齐干预结果的对比无显著性差异,因此,嗅三针和盐酸多奈哌齐干预结果相当是具有实际意义的;在嗅神经切断后,嗅三针对上述三方面干预效应均未显现,提示嗅三针可能基于嗅觉通路的完整性,通过调节 PI3K/Akt 通路蛋白表达量和修复海马突触可塑性损伤从而发挥改善认知功能的作用。而目前已经有研究显示电针治疗可激活 PI3K/Akt 通路,徐少群等^[26]研究发现电针可通过激活海马区 PI3K/Akt 信号通路表达进而抑制 AD 小鼠学习记忆能力减弱。亦有研究显示电针治疗可改善海马突触可塑性,卢圣锋等^[27]研究发现电针能有效调整海马神经元突触形态,使 PSD 增厚,突触间隙宽度变窄,促进突触形态可塑性的发挥;高珊等^[28]研究发现电针能修复突触形态结构损伤。因此,综合前期和本次实验结果,同时融合别人的研究,我们推断嗅三针对 AD 小鼠认知功能的改善作用可能是通过激活 PI3K/Akt 信号通路和修复海马突触可塑性损伤来实现的。

综上,本研究结果提示,嗅三针可能基于嗅觉通路的完整性,调节海马 PI3K/Akt 磷酸化表达,修复海马突触形态结构损伤,改善海马突触可塑性,从而发挥提高 SAMP8 小鼠学习记忆能力的效应。本研究观察了嗅三针和盐酸多奈哌齐对 7 月龄 SAMP8 小鼠的干预效应,那么,对于月龄更大的 SAMP8 小鼠,干预效应会有何差异? 因此,我们后续可以不同月龄 SAMP8 小鼠作为干预对象,比较不同干预方式之间的效应差异,同时也将为印证中医“治未病”中的“既病防变”理念及为临床嗅三针干预时机的选择提供理论依据。

参考文献

- [1] Haines JL. Alzheimer disease: perspectives from epidemiology and genetics[J]. J Law Med Ethics, 2018, 46(3): 694—698.
- [2] 周源源. 阿尔茨海默病的流行病学、发病危险因素、治疗及早期筛查研究进展[J]. 内科, 2019, 14(6): 690—692.
- [3] Zang G, Fang L, Chen L, et al. Ameliorative effect of nicergoline on cognitive function through the PI3K/AKT signaling pathway in mouse models of Alzheimer's disease[J]. Mol Med Rep, 2018, 17(5): 7293—7300.
- [4] Hu Y, Chen W, Wu L, et al. TGF- β 1 restores hippocampal synaptic plasticity and memory in Alzheimer model via the PI3K/Akt/Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. J Mol Neurosci, 2019, 67(1): 142—149.
- [5] Jiang G, Wang C, Zhang J, et al. Mediation of insulin growth factor-1 in Alzheimer's disease and the mechanism of PRNP genetic expression and the PI3K/Akt signaling pathway[J]. Exp Ther Med, 2017, 13(6): 2763—2766.
- [6] Wang Y, Wang Q, Ren B, et al. "Olfactory three-needle" enhances spatial learning and memory ability in SAMP8 mice[J]. Behavioural Neurology, DOI: 10.1155/2020/2893289.
- [7] Yuan Wang, Qiang Wang, Jie Li, et al. Glutamine improves oxidative stress through the Wnt-3 α / β -catenin signaling pathway in Alzheimer's disease in vitro and in vivo[J]. Bio Med Research International, 2019, 2019: 4690280.
- [8] 刘智斌, 牛文民, 杨晓航, 等. “嗅三针”对阿尔茨海默病大鼠海马 Bcl-2 和 Bax 表达的干预效应[J]. 针刺研究, 2011, 36(1): 7—11.
- [9] 李书晓, 刘智斌, 姜孝德, 等. 嗅三针改善老年性痴呆患者学习记忆功能的临床研究[J]. 陕西中医药大学学报, 2012, 35(2): 51—52.
- [10] 王渊, 刘智斌, 牛文民, 等. 嗅三针对阿尔茨海默病小鼠认知功能和海马 A β 、磷酸化 JNK、ERK1/2、Tau 蛋白表达的影响[J]. 南京中医药大学学报, 2018, 34(4): 376—380.
- [11] Calabrese EJ. An assessment of anxiolytic drug screening tests: hormetic dose responses predominate[J]. Crit Rev Toxicol, 2008, 38(6): 489—542.
- [12] 李忠仁. 实验针灸学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2003: 327—329.
- [13] 羨慕, 魏永祥, 韩德民, 等. 嗅神经切断对小鼠嗅感觉神经元的影响[J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2005, 40(9): 671—674.
- [14] 谭雪, 高莉, 任佳, 等. 突触可塑性对阿尔茨海默病影响的研究进展[J]. 中国医药导报, 2019, 16(9): 52—55.
- [15] Farr SA, Roesler E, Niehoff ML, et al. Metformin improves learning and memory in the SAMP8 mouse model of Alzheimer's disease[J]. J Alzheimers Dis, 2019, 68(4): 1699—1710.
- [16] Ma J, Wang J, Lv C, et al. The role of hippocampal structural synaptic plasticity in repetitive transcranial magnetic stimulation to improve cognitive function in male SAMP-8 mice[J]. Cell Physiol Biochem, 2017, 41(1): 137—144.
- [17] 樊恩召, 刘智斌, 王强, 等. “嗅三针”治疗阿尔茨海默病优势之我见[J]. 辽宁中医杂志, 2019, 46(10): 2156—2158.
- [18] 王渊, 刘智斌, 牛文民, 等. 嗅三针对阿尔茨海默病小鼠学习

(下转第 148 页)