

文章编号: 1005-0957 (2023) 08-0854-10

• 动物实验 •

电针对阿尔茨海默病不同病理阶段自噬状态影响差异性研究

杨晓坤, 高誉珊, 栗晨璐, 陈浩天, 郭孟玮, 谭韵湘, 张洋, 薛卫国
(北京中医药大学, 北京 100029)

【摘要】 目的 观察电针对 APP/PS1 双转基因小鼠老年斑出现前后不同病理阶段自噬状态影响的差异性, 从自噬角度探讨电针干预阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 的作用机制。**方法** 4 月龄和 8 月龄 APP/PS1 双转基因雄性小鼠各 20 只, 随机分为模型组 (4 月龄和 8 月龄模型组) 和电针组 (4 月龄和 8 月龄电针组), 每组 10 只; 以同月龄同性别 C57BL/6 野生型小鼠为正常组 (4 月龄和 8 月龄正常组) 各 10 只。电针组取双侧涌泉穴直刺后接电针仪, 百会穴平刺后单向滞针再留针, 共 20 min。干预隔日 1 次, 共 6 周。采用 Morris 水迷宫实验评价小鼠空间学习记忆能力; 通过免疫组化技术观察小鼠海马淀粉样斑块沉积情况; 用免疫荧光技术观察小鼠海马 LC3 和 β -淀粉样蛋白 (β -amyloid, A β) 表达情况; 用酶联免疫吸附法检测小鼠海马 A β 表达水平; 用 Western blot 法检测小鼠海马自噬相关蛋白 LC3 和 p62 相对表达量。**结果** Morris 水迷宫结果显示, 6 月龄和 10 月龄模型组小鼠平均逃避潜伏期均较同月龄正常组增加 ($P < 0.01$), 平台象限停留时间均减短 ($P < 0.01$); 与 6 月龄和 10 月龄模型组相比, 同月龄电针组小鼠平均逃避潜伏期均减少 ($P < 0.05$), 平台象限停留时间均延长 ($P < 0.01$)。免疫组化结果显示, 6 月龄模型组海马区域可见少量老年斑, 10 月龄模型组海马区域可见大量老年斑。免疫荧光技术结果显示, LC3 和 A β 阳性表达主要位于海马神经元核周, LC3 阳性还表达在细胞突起中。酶联免疫吸附法检测结果显示, 同月龄模型组海马 A β 水平均高于正常组 ($P < 0.01$); 同月龄电针组海马 A β 水平均低于同月龄模型组 ($P < 0.01$); 6 月龄模型组海马 A β 水平明显低于 10 月龄模型组 ($P < 0.01$)。Western blot 法检测结果显示, 与同月龄正常组比较, 6 月龄模型组 LC3 II / I 比值和 p62 表达均降低 ($P < 0.01$); 与同月龄模型组比较, 电针组 LC3 II / I 比值增加 ($P < 0.01$), p62 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与同月龄正常组比较, 10 月龄模型组 LC3 II / I 比值和 p62 表达均增加 ($P < 0.01$, $P < 0.05$); 与同月龄模型组比较, 电针组 LC3 II / I 比值和 p62 表达均降低 ($P < 0.01$, $P < 0.05$)。**结论** 6 月龄和 10 月龄 APP/PS1 转基因鼠老年斑出现前后不同病理阶段的自噬状态不同。电针可提高 6 月龄 APP/PS1 双转基因鼠海马自噬功能, 调节 10 月龄双转基因鼠自噬功能紊乱状态, 电针改善不同病理阶段 APP/PS1 双转基因小鼠的学习记忆能力, 降低海马 A β 水平的机制存在差异性。

【关键词】 针刺疗法; 电针; 阿尔茨海默病; APP/PS1 双转基因小鼠; 自噬

【中图分类号】 R2-03 **【文献标志码】** A

DOI: 10.13460/j.issn.1005-0957.2023.08.0854

Study of the effect differences of electroacupuncture on autophagy state in different pathological stages of Alzheimer's disease YANG Xiaokun, GAO Yushan, LI Chenlu, CHEN Haotian, GUO Mengwei, TAN Yunxiang, ZHANG Yang, XUE Weiguo. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

[Abstract] Objective To observe the effect differences of electroacupuncture (EA) on the autophagy state in APP/PS1 double transgenic mice in different pathological stages, before and after the occurrence of senile plaques, and to explore the mechanism of EA treatment of Alzheimer's disease (AD) from the perspective of autophagy. **Method** Four-month-old and 8-month-old APP/PS1 double transgenic male mice, 20 in each age group, were randomized into

基金项目: 北京市自然科学基金资助项目面上项目 (7202117)

作者简介: 杨晓坤 (1995—), 女, 2020 级硕士生, Email: yangxiaokunbucm@163.com

通信作者: 薛卫国 (1968—), 男, 主任医师, 教授, 博士, 硕士生导师, Email: snowmanxue@163.com

model groups (4-month-old model group and 8-month-old model group) and EA groups (4-month-old EA group and 8-month-old EA group), with 10 mice in each group. Wild-type C57BL/6 mice of the same ages and gender were taken as control groups (4-month-old and 8-month-old normal groups), with 10 mice in each group. The EA groups received EA at bilateral Yongquan (KI1) and Baihui (GV20) was horizontally punctured with the needle twirled till stuck and then retained for 20 min. The intervention was performed once every other day for 6 weeks. Morris water maze test was used to evaluate the spatial learning and memory abilities of the mice; immunohistochemistry was taken to observe the deposition of amyloid plaques in the hippocampus of mice; the immunofluorescence technique was employed to detect the expression of LC3 and β -amyloid ($A\beta$) in the hippocampus of mice; the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to determine the expression level of $A\beta$ in the hippocampus of mice; Western blot (WB) was used to detect the relative expression levels of autophagy-related proteins LC3 and p62 in the hippocampus. **Result** Morris water maze results showed that compared with the normal groups, the 6-month-old and 10-month-old model groups had a longer average escape latency ($P<0.01$) and shorter platform dwelling time ($P<0.01$); compared with the 6-month-old and 10-month-old model groups, mice in the same age EA groups had a reduced average escape latency ($P<0.05$) and extended platform dwelling time ($P<0.01$). The immunohistochemistry results showed a small amount of senile plaques in the hippocampus of 6-month-old model mice and a large amount of senile plaques in the hippocampus of 10-month-old model mice. The immunofluorescence results revealed that LC3 and $A\beta$ were mainly expressed around the nucleus of hippocampal neurons, and LC3 was also found in axons. ELISA showed that the hippocampal $A\beta$ level in the model mice was higher than that in the same age normal groups ($P<0.01$); the hippocampal $A\beta$ level in the EA groups was lower than that in the same age model groups ($P<0.01$); the hippocampal $A\beta$ level was significantly lower in the 6-month-old model mice than in the 10-month-old model group ($P<0.01$). The WB results demonstrated that LC3 II/I and the expression of p62 decreased in the 6-month-old model group compared with the same age normal group ($P<0.01$); compared with the same age model groups, the EA groups had higher LC3 II/I ($P<0.01$), while the expression of p62 showed no significant difference ($P>0.05$). Compared with the same age normal group, the 10-month-old model group had increased LC3 II/I and p62 expression ($P<0.01$, $P<0.05$); compared with the same age model groups, the EA groups showed decreased LC3II/I and p62 expression ($P<0.01$, $P<0.05$). **Conclusion** Before and after the appearance of senile plaques, the autophagy status differs depending on the different pathological stages in APP/PS1 transgenic mice. EA can enhance the hippocampal autophagy function in 6-month-old APP/PS1 double transgenic mice and regulate autophagy dysfunction in 10-month-old double transgenic mice. Further, the mechanism of EA varies in improving the learning and memory abilities and reducing the hippocampal $A\beta$ level in APP/PS1 double transgenic mice in different pathological stages.

[Key words] Acupuncture therapy; Electroacupuncture; Alzheimer disease; APP/PSI double transgenic mice; Autophagy

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种以渐进性认知功能衰退为主要临床表现的神经系统退行性疾病。其特征性病理改变主要是 β -淀粉样蛋白(β -amyloid, $A\beta$)聚集形成的老年斑和 Tau 蛋白过度磷酸化形成的细胞内神经原纤维缠结^[1]。

$A\beta$ 级联假说认为脑内 $A\beta$ 聚集是 AD 形成和发展的关键因素,AD 的主要病理过程是由于 $A\beta$ 的生成和清除失衡^[2-3]。AD 发病机制具有多样性,单一 $A\beta$ 级联假说并

不能完美解释 AD 发病机制。近年自噬功能紊乱学说已成为 AD 发病机制及治疗靶点研究的热点^[4-6]。细胞内包括 $A\beta$ 在内的错误聚集的蛋白质通过自噬-溶酶体系统降解。自噬的动态过程分为自噬启动、自噬体形成、自噬体溶酶体融合和蛋白降解^[7]。自噬在 $A\beta$ 代谢中具有二重性^[8],自噬-溶酶体途径可以降解 $A\beta$;当自噬功能低下时,会使细胞内 $A\beta$ 不能被有效降解;尤其当自噬体与溶酶体融合及降解受阻时, $A\beta$ 不但不能被有效

降解,反而会因自噬泡的堆积而剧增。

PP/PS1 双转基因小鼠具有脑内 $A\beta$ 水平升高、聚集、沉积和自噬功能紊乱两种病理特征。老年斑是 AD 的主要病理特征,研究^[9-10]表明 AD 早期 4~5 月龄该小鼠脑内可溶性 $A\beta$ 水平开始升高,但未出现老年斑,行为学未出现异常;病理期 6~8 月龄脑内可溶性 $A\beta$ 大量聚集、沉积形成老年斑,行为学开始出现异常。故以脑内老年斑出现与否和行为学是否异常将 AD 区分为不同病理阶段。

AD 不同病理阶段存在不同的自噬功能紊乱机制^[11]。自噬启动时,LC3 I 转化为 LC3 II 并定位于自噬体膜上,随自噬体降解而减少,LC3 II / I 比值提示自噬体的数量及堆积程度^[12];自噬流是否通畅是自噬底物是否最终被降解的评价指标。当通畅时,自噬特异性底物 p62 会随自噬的进行被不断降解,p62 表达提示自噬流是否顺畅^[13-14]。从自噬流角度,以 LC3 II / I 比值和 p62 共同评价自噬状态的高低。研究^[15-17]显示,针刺对自噬启动、自噬体与自噬溶酶体融合和自噬溶酶体降解都可能存在影响。有研究^[18]表明,针刺可降低 10 月龄 SAMP8 小鼠 LC3 II / I 比值;也有研究^[19]发现,针刺可提高 6 月龄双转基因鼠海马 LC3 II / I 比值。针刺调节 AD 小鼠自噬相关蛋白 LC3 II / I 比值的不同是否与其自噬状态不同有关。因此,本研究提出针刺是否对 AD 不同病理阶段自噬状态的调控具有差异性的假说。

本实验以 4 月龄和 8 月龄 APP/PS1 双转基因小鼠为动物模型,电针百会和涌泉穴,观察电针对 AD 不同病理阶段自噬相关蛋白 LC3 和 p62 的影响,探讨电针对 AD 不同病理阶段自噬状态的调控及其调控机制是否具有差异性。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

4 月龄和 8 月龄 APP/PS1 双转基因雄性小鼠各 20 只,购于北京华阜康生物科技股份有限公司(No. 110324211101570363, No. 110324211105773138),动物生产许可证为 SCXK(京)2019-0008,体质量分别为 (20 ± 6) g 和 (26 ± 6) g;同月龄同性别 C57BL/6 野生型小鼠各 10 只,购于北京斯贝福生物科技有限公司,动物生产许可证为 SCXK(京)2019-0010,体质量分别为 (24 ± 4) g 和 (28 ± 4) g。以随机数字表法将其分为模型组和电针组,即 4 月龄模型组和电针组,8 月龄

模型组和电针组,每组 10 只;以同月龄同性别 C57BL/6 野生型小鼠为正常组,即 4 月龄正常组和 8 月龄正常组。上述小鼠饲养于北京中医药大学动物中心,室温 $20 \sim 22$ °C,湿度 40%~60%,自然光照,自由进食和进水。本实验经北京中医药大学实验动物伦理委员会批准(动物伦理批准号 BUCM-4-2021052406-2041)。

1.2 主要仪器与试剂

一次性针灸针(北京中研太和医药公司,规格 $0.25 \text{ mm} \times 13 \text{ mm}$), LH202H 型韩氏电针仪(北京华卫产业开发公司),冰冻切片机(德国, Leica), 酶标仪、电泳仪、垂直电泳槽、转膜仪、曝光机(美国, Bio-Rad), ImageJ 图像分析处理系统(美国 NIH)。

兔源 LC3 抗体(proteintech 14600-1-AP), 兔源 p62 抗体(proteintech, 18420-1-AP), 鼠源 GAPDH 抗体(proteintech, 60004-1), 山羊抗鼠(proteintech, 60004-1), 山羊抗兔(proteintech, SA00001-2); 鼠源 $A\beta$ 一抗(Covance-SIG-39320), 即用型免疫组化超敏 S-P 试剂盒(鼠)(迈新, KIT-9701), DAB 显色试剂盒(迈新, DAB-0031), 兔源 LC3 荧光一抗(abcam, ab192890), 鼠源 $A\beta$ 荧光一抗(Covance-SIG-39320), 鼠源辣根过氧化物标记生物素(北京中杉金桥, ZB-2305), 羊源辣根过氧化物标记生物素(proteintech, SA00001-2), 羊抗鼠荧光二抗(美国, Abcam, ab150115), 羊抗兔荧光二抗(美国, Abcam, ab150077), 荧光封片剂(含 DAPI)(中杉金桥, ZLI-9557); $A\beta$ 42 酶联免疫吸附法试剂盒(美国, invitrogen, KHB3544), BCA 蛋白定量试剂盒(北京普利莱有限公司)。

1.3 干预方法

将电针组小鼠以自制鼠袋固定于操作台上,按照小鼠针灸穴位图谱及比较解剖学方法,在顶骨正中取百会穴,在两足底前、中 1/3 交界处取双侧涌泉穴。穴位常规消毒,百会用毫针向前平刺 2~3 mm 后单向滞针并留针;双侧涌泉直刺后接电针仪,疏密波,频率 1/50 Hz,电流强度 1.0 mA,以针柄震颤且动物保持安静不挣扎嘶叫为度,干预持续 20 min。正常组和模型组小鼠以相同方法和时间束缚 20 min。隔日 1 次,连续 6 周。

1.4 Morris 水迷宫实验

干预结束后进行 5 d Morris 水迷宫实验,检测各组小鼠空间学习记忆能力。水迷宫水池等距离划分 4 个象限,定位航行平台置于第 4 象限内。水池倒入温

水并用脱脂奶粉混匀,水温 22~23 ℃,隐藏平台,由图像采集系统记录小鼠游泳情况及运动轨迹。实验前 1 d 进行适应性训练。实验前 4 d 进行定位航行实验,将小鼠依次从第 2、3、1 象限面朝池壁放入水池并开始计时,记录小鼠找到平台的时间,即逃避潜伏期。若小鼠 60 s 内未找到平台,引导小鼠至平台上并停留 15 s,记录小鼠找到平台时间为 60 s。以第 2 象限放入水池的逃避潜伏期作为检测指标。实验第 5 天进行空间探索实验,撤掉平台,从第 2 象限将小鼠面朝池壁放入,记录小鼠 60 s 内平台象限停留时间。

1.5 取材方法

4 月龄和 8 月龄 APP/PS1 双转鼠随机每组选取 4 只,以 2%戊巴比妥钠[按 50 mg/(kg·bw)剂量]腹腔注射深度麻醉,4%多聚甲醛心脏灌注固定后取出全脑,4%多聚甲醛溶液固定 72 h,梯度蔗糖脱水、修块、包埋, -80 ℃保存,用于免疫组化和免疫荧光实验。4 月龄和 8 月龄每组剩余 6 只小鼠深度麻醉,冰盒上断头取脑,剥离海马及脑皮质放入 EP 管中, -80 ℃保存,用于 Western blot 及酶联免疫吸附法检测。

1.6 观察指标

1.6.1 免疫组化技术观察海马淀粉样斑块沉积情况

视交叉后冠状位连续冰冻切片,片厚 10 μm。第 1 天,冰冻切片复温 30 min; PBS 洗,枸橼酸盐缓冲液热修复 15 min; PBS 洗,山羊血清封闭 10 min;甩掉封闭液,加入 Aβ一抗,4 ℃孵育过夜。次日, PBS 洗,二抗(试剂 2)孵育 10 min; PBS 洗,试剂 3 孵育 10 min; PBS 洗, DAB 显色 10 min 镜下观察情况;自来水冲洗;脱水,透明,封片。显微镜下观察表达情况并拍照。

1.6.2 免疫荧光技术观察海马及皮质内 LC3 及 Aβ的表达部位

第 1 天,除一抗(Aβ和 LC3 等体积混匀)外,其余步骤同上。次日, PBS 洗,荧光二抗(鼠源二抗和兔源二抗等体积混匀)避光孵育 1 h; PBS 洗; DAPI 封片,荧光显微镜下观察阳性表达情况并拍照。

1.6.3 Western blot 检测小鼠海马 LC3 与 p62 蛋白的相对表达量

称取小鼠左侧海马组织于试管中,加 RIPA 裂解液和 PMSF(RIPA:PMSF = 100:1),超声仪研磨匀浆,

4 ℃, 12 000 r/min,离心 20 min,取上清液,BCA 法测定蛋白浓度。每孔上样量 20 μg,分离电泳、转膜、快速封闭 20 min, TBST 洗,裁膜,一抗(LC3 为 1:6 000, p62 为 1:4 000, GAPDH 为 1:100 000)4 ℃孵育过夜; TBST 洗,二抗(羊抗兔为 1:5 000,羊抗鼠为 1:5 000)孵育 1 h, TBST 洗;滴加 ECL 发光液显色,曝光显影。ImageJ 软件分析各条带灰度值,以 GAPDH 的灰度值为基线计算各目标条带相对表达量。

1.6.4 酶联免疫吸附法检测小鼠海马 Aβ浓度

取 6 月龄和 10 月龄每组右侧海马于 EP 管中,按说明书加入 PBS 裂解液,冰上匀浆;以 16 000 r/min 速度和 4 ℃环境,离心 20 min 后取上清液。据预实验结果,以正常组不稀释、模型组稀释 20 倍、电针组稀释 10 倍为最佳稀释倍数,按所需加入上清液标准稀释液。按照说明书流程连续稀释标准品;检测板加入 50 μL 标准品,显色空白孔留空;除空白孔外,每孔加 50 μL 检测抗体溶液并覆盖平板,4 ℃过夜;洗板 4 次,加 100 μL 二抗(显色空白孔除外),膜封板,室温孵育 30 min;洗板 4 次,加 100 μL 稳定色原,混匀后溶液变蓝,覆盖平板,避光孵育 30 min;加 100 μL 终止液。操作过程严格按照说明书中步骤。用酶标仪在 450 nm 波长下测定吸光度值,绘制蛋白标准品的曲线,根据方程式计算 Aβ42 的浓度。

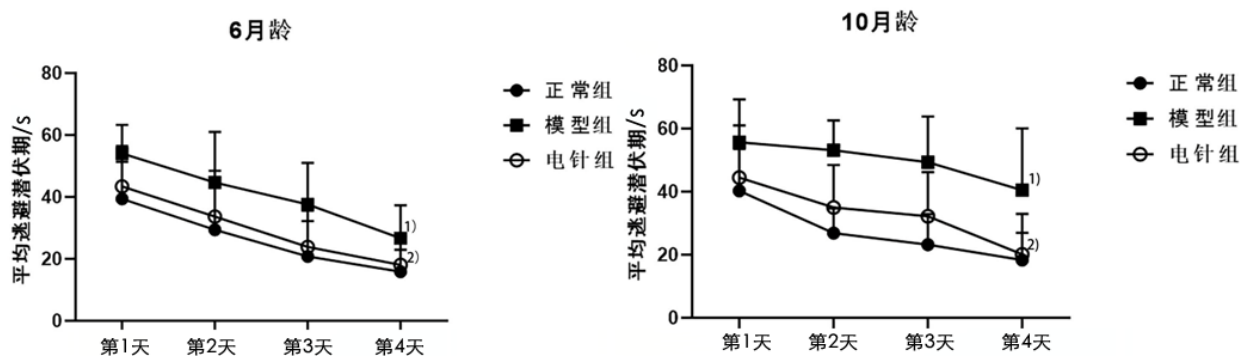
1.7 统计学分析

采用 SPSS20.0 统计软件统计分析。当计量资料符合正态分布时,采用均数±标准差表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD 检验;重复测量数据采用重复测量方差分析,组间比较采用单因素方差分析;若出现计量资料为非正态分布,数据比较则采用非参数检验。以 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组不同月龄小鼠 Morris 水迷宫结果比较

与同月龄正常组比较,6 月龄和 10 月龄模型组小鼠 Morris 水迷宫定位航行实验逃避潜伏期均增加($P<0.01$);与同月龄模型组比较,6 月龄和 10 月龄电针组小鼠逃避潜伏期均减少($P<0.01$)。详见图 1。

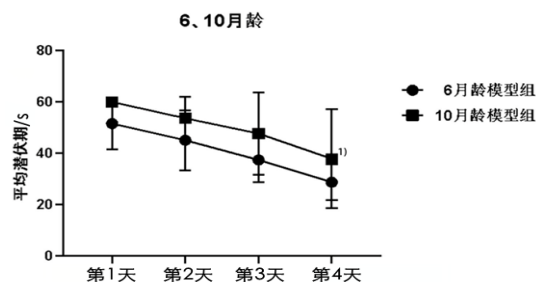


注:与同月龄正常组比较 ¹⁾ $P < 0.01$; 同月龄与模型组比较 ²⁾ $P < 0.01$ 。

图1 各组不同月龄小鼠 Morris 水迷宫定位航行实验逃避潜伏期比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

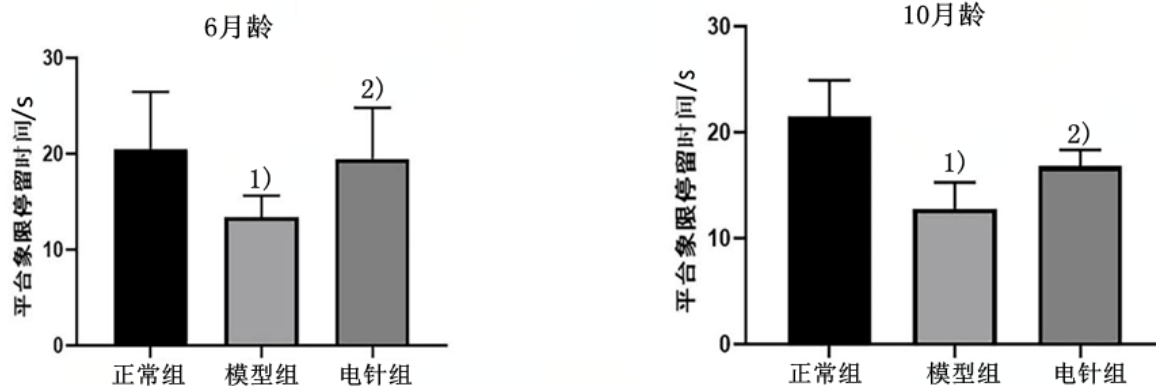
与 6 月龄模型组小鼠比较, 10 月龄模型组小鼠平均逃避潜伏期延长, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。详见图 2。

正常组比较, 同月龄模型组 Morris 水迷宫空间探索实验平台象限停留时间均减少 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 同月龄电针组平台象限停留时间均延长 ($P < 0.01$)。详见图 3。



注:与 6 月龄模型组比较 ¹⁾ $P < 0.01$ 。

图2 6月龄和 10月龄模型组小鼠 Morris 水迷宫定位航行实验逃避潜伏期比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)



注:与同月龄正常组比较 ¹⁾ $P < 0.01$; 与同月龄模型组比较 ²⁾ $P < 0.01$ 。

图3 6月龄和 10月龄模型组小鼠 Morris 水迷宫空间探索实验平台象限停留时间比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

2.2 各月龄小鼠淀粉样斑块沉积情况比较

6 月龄和 10 月龄模型组海马均可见褐色团块状淀粉样斑块沉积 (如图 4 箭头所指), 10 月龄模型组褐色团块状淀粉样斑块沉积 (老年斑) 明显更多且密集; 经电针治疗后, 6 月龄和 10 月龄电针组小鼠海马区褐色团块状淀粉样斑块沉积均有所减少。详见图 4。

2.3 各组小鼠 LC3 和 A β 免疫荧光表达情况比较

DAPI 细胞核标记为蓝色, LC3 标记为绿色荧光, 主要表达在海马 CA1 区核周 (细胞质) 与轴突中; A β 标记

为红色荧光, 主要聚集在海马 CA1 区的核周 (细胞质), 如图 5 虚箭头所指; 橘黄色区域为共表达区域, 如图 5 实箭头所示, 二者存在共表达情况。详见图 5。

2.4 各组小鼠海马酶联免疫吸附法检测 A β 浓度比较

与正常组比较, 同月龄模型组脑内 A β 浓度均升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 同月龄电针组脑内 A β 浓度均降低 ($P < 0.01$); 6 月龄模型组小鼠脑内 A β 浓度明显低于 10 月龄模型组 ($P < 0.01$)。详见表 1。

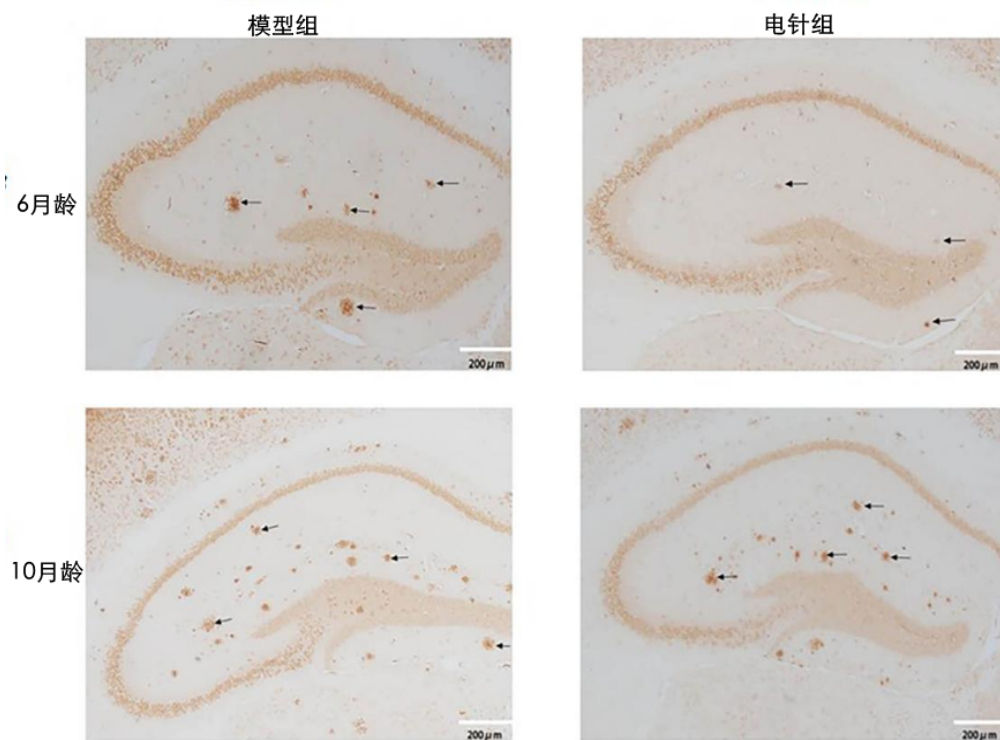
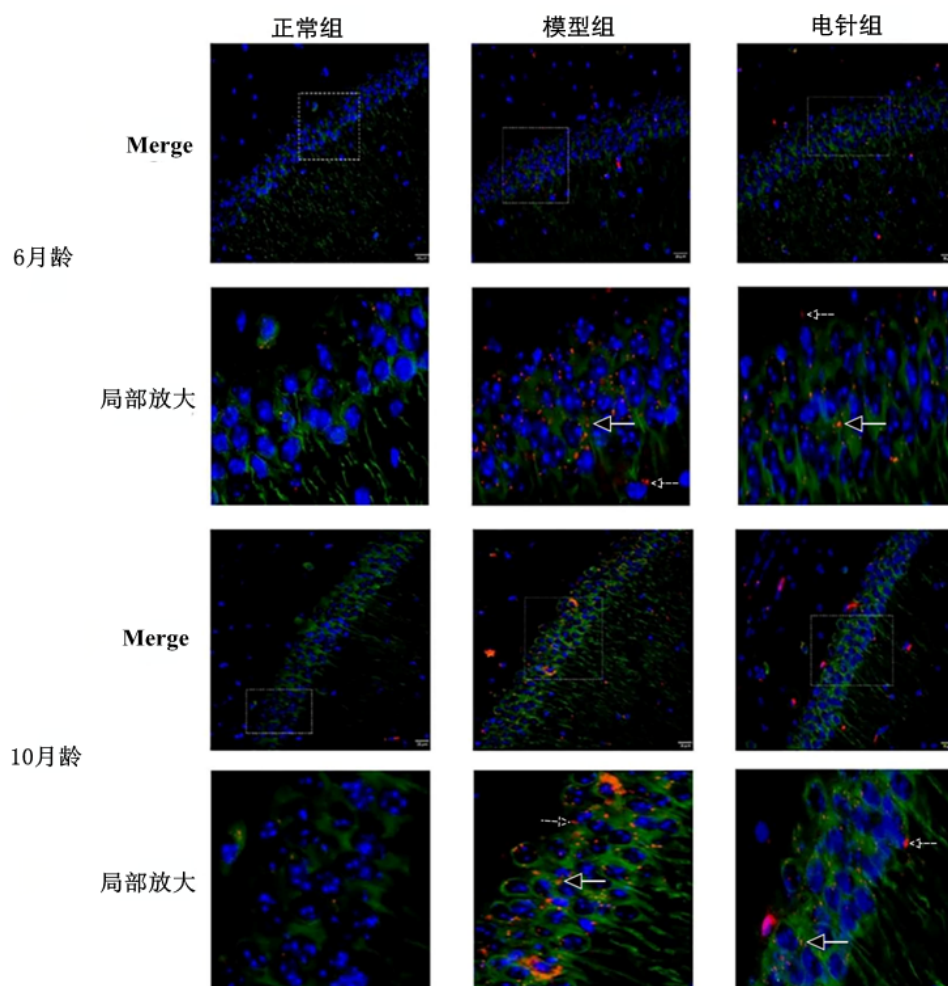


图 4 6 月龄和 10 月龄小鼠淀粉样斑块沉积情况比较(×40)



注:LC3 为绿色荧光标记, Aβ为红色荧光标记, DAPI 细胞核为蓝色荧光标记, LC3 与 Aβ共表达为橘黄色荧光标记。

图 5 6 月龄和 10 月龄各组小鼠海马 CA1 区 LC3 和 Aβ表达情况比较(×400)

表1 各组小鼠海马ELISA检测A β 浓度比较($\bar{x} \pm s$)

单位: $\text{pg} \cdot \text{g}^{-1}$			
月龄	组别	<i>n</i>	A β 浓度
6月龄	正常组	5	0.05 ± 0.03
	模型组	5	$25.15 \pm 1.82^{1)}$
	电针组	5	$4.30 \pm 2.95^{2)}$
10月龄	正常组	5	0.04 ± 0.03
	模型组	5	$76.66 \pm 2.71^{1)3)}$
	电针组	5	$11.00 \pm 3.82^{2)}$

注:与同月龄正常组比较 $^{1)}P<0.01$;与同月龄模型组比较 $^{2)}P<0.01$;与6月龄模型组比较 $^{3)}P<0.01$ 。

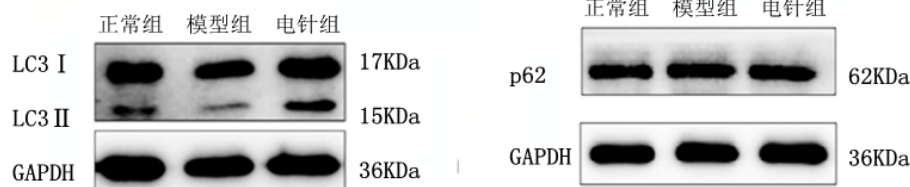


图6 6月龄各组小鼠海马LC3 II/I比值和p62表达情况比较

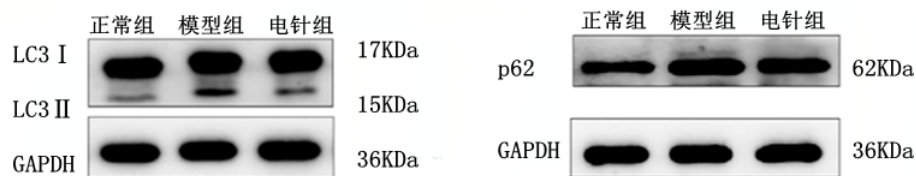


图7 10月龄各组小鼠海马LC3 II/I比值和p62表达情况比较

表2 各组小鼠海马LC3 II/I和p62/GA比值表达情况

($\bar{x} \pm s$)				
月龄	组别	<i>n</i>	LC3 II/I 比值	p62/GA 比值
6月龄	正常组	6	0.35 ± 0.07	0.79 ± 0.05
	模型组	6	$0.25 \pm 0.03^{1)}$	$0.69 \pm 0.05^{1)}$
	电针组	6	$0.41 \pm 0.07^{3)}$	0.69 ± 0.03
10月龄	正常组	6	0.33 ± 0.05	0.72 ± 0.07
	模型组	6	$0.44 \pm 0.06^{1)5)}$	$0.85 \pm 0.09^{2)5)}$
	电针组	6	$0.37 \pm 0.04^{3)}$	$0.72 \pm 0.12^{4)}$

注:与同月龄正常组比较 $^{1)}P<0.01$, $^{2)}P<0.05$;与同月龄模型组比较 $^{3)}P<0.01$, $^{4)}P<0.05$;与6月龄模型组比较 $^{5)}P<0.01$ 。

3 讨论

β -淀粉样蛋白(A β)大量聚集、沉积形成的老年斑是阿尔兹海默病(AD)主要病理特征。A β 级联假说是目前最为公认的AD发病机制,细胞内可溶性A β 寡聚体具

2.5 各组小鼠海马自噬相关蛋白Western blot检测结果比较

与同月龄正常组比较,6月龄模型组LC3 II/I比值和p62表达降低($P<0.01$),10月龄模型组LC3 II/I比值和p62表达升高($P<0.01$, $P<0.05$)。与同月龄模型组比较,6月龄电针组LC3 II/I比值增加($P<0.01$),p62表达降低但差异无统计学意义($P>0.05$),10月龄电针组LC3 II/I比值和p62表达均降低($P<0.01$, $P<0.05$)。与6月龄模型组比较,10月龄模型组LC3 II/I表达量增高($P<0.01$),p62表达量明显增加($P<0.01$)。详见图6、图7和表2。

有神经毒性,会造成突触功能障碍、神经元丢失等一系列级联反应,导致严重的记忆损坏^[20]。自噬功能紊乱被认为是细胞内A β 产生、聚集的主要原因;当自噬功能出现障碍时,会对A β 的聚集创造条件^[21]。通常认为,AD不同病理阶段的自噬状态不同。研究^[22-23]发现AD早期患者脑内自噬启动相关蛋白表达量下降,提示自噬水平处于低下状态;随病情发展,AD患者及APP/PS1转基因小鼠脑内存在自噬体转运及降解功能障碍,神经元及突起中大量自噬泡堆积,自噬-溶酶体途径功能紊乱是AD疾病进程晚期的重要病理机制。

APP/PS1双转基因小鼠是国际公认的影响A β 水平及其机制研究的动物模型;随月龄增加,脑内大量A β 不断地聚集、沉积形成老年斑,并伴随突触丢失和神经元变性等是研究AD较好模型^[24]。同时该模型小鼠脑内存在细胞内自噬功能紊乱,营养不良性神经突起内有大量自噬泡堆积,神经元核周存在大量自噬溶酶体,也是研究AD自噬功能紊乱的理想模型。本研究发现此模

型小鼠 6 月龄和 10 月龄的病理特征及自噬状态存在明显区别。本实验使用的 6E10 A β 抗体只能识别人来源的 APP 片段, 故在免疫组化实验中 APP/PS1 双转基因小鼠脑内可见其阳性表达; 而正常组 C57BL/6 小鼠中无人来源的 APP 片段, 故正常组小鼠脑中无阳性表达。与正常组比较, 6 月龄 APP/PS1 双转基因模型小鼠空间学习记忆能力下降, 脑内可溶性 A β 浓度升高, 海马可见少量老年斑, 自噬相关蛋白 LC3 II / I 比值和 p62 水平均偏低, 说明其自噬功能低下, 与此研究大致相同^[12]。10 月龄模型小鼠空间学习记忆能力下降更为明显, 脑内 A β 水平越来越高且已形成大量老年斑, LC3 II / I 比值和 p62 水平均偏高, 说明模型小鼠自噬功能紊乱, 自噬泡出现堆积, 自噬流处于不通畅状态。

众多研究^[25-27]表明, 针刺能够改善 APP/PS1 双转基因小鼠空间学习记忆能力, 降低脑内 A β 水平。本课题组前期研究也显示^[28-29], 针刺百会和涌泉穴可以有效降低脑内 A β 水平, 同时发现了针刺对自噬状态的影响。针刺治疗 AD 可能具有双向调节作用, 对 AD 老年斑形成前后不同病理阶段的不同自噬状态都会产生一定的良性调节作用。以往的相关研究大多数是以单个月龄 AD 模型小鼠为实验对象, 观察针刺对该月龄模型鼠自噬水平的影响。由于 AD 是一种起病隐匿的进行性发展的神经系统退行性疾病, 故本研究基于 A β 级联假说和自噬功能紊乱假说, 以 AD 病理早期 4 月龄和病理期 8 月龄 APP/PS1 双转基因鼠为动物模型, 观察电针百会和涌泉穴干预 4 月龄和 8 月龄双转基因小鼠 6 周对 Morris 空间学习记忆能力、脑内可溶性 A β 水平及自噬状态的影响, 探讨 AD 不同病理阶段的自噬状态以及电针对其自噬状态的调控及其调控机制是否具有差异性, 以阐释电针改善 AD 不同病理阶段学习记忆能力机制的不同。

本次实验水迷宫结果显示, 6 月龄和 10 月龄电针组逃避潜伏期和平台象限停留时间均优于模型组, 提示电针可以改善老年斑形成前后不同病理阶段 AD 模型鼠的学习记忆能力。但由于其 AD 病理状态不同, 电针改善学习记忆能力的机制可能不同。酶联免疫吸附法检测结果显示, 6 月龄和 10 月龄电针组脑内可溶性 A β 浓度均低于模型组, 提示两组电针干预都可以降低其脑内 A β 水平。Western blot 检测结果显示, 与同月龄模型组 LC3 II / I 比值降低不同, 6 月龄电针

组 LC3 II / I 比值升高, p62 表达无明显变化, 说明电针能够促进 6 月龄双转基因鼠自噬体的形成, 增强自噬状态, 此结果与以往针刺增强 AD 自噬状态的研究结果相仿^[19, 30-31]; 而与同月龄模型组 LC3 II / I 比值升高及 p62 表达升高不同, 10 月龄电针组 LC3 II / I 比值和 p62 表达均降低, 说明电针能够减少 10 月龄双转基因鼠自噬体的异常堆积, 调节自噬功能紊乱, 使自噬流畅通, 此结果与以往针刺抑制 AD 自噬状态的研究结果相仿^[15, 28]。本实验结果使以往 AD 针刺研究中所出现的对自噬状态调节的不同结果得到较好的解释。由于 AD 不同病理阶段脑内 A β 水平及自噬状态不同, 针刺对 AD 自噬状态有良性调节作用。6 月龄双转基因鼠脑内 A β 水平刚开始升高, 自噬状态不足, 电针可增强 6 月龄双转基因鼠海马自噬功能, 提升对 A β 的清除能力; 10 月龄模型鼠脑内自噬体出现异常堆积, 自噬流不通畅, 脑内 A β 大量生成, 电针可调节 10 月龄双转基因鼠自噬功能紊乱状态, 降低脑内 A β 水平。因此, 通过实验, 本研究可认为 AD 不同病理阶段的自噬状态不同, 电针降低其脑内 A β 水平, 增强其学习记忆能力的机制存在差异性。

由于 A β 的种类多样性及其复杂性, 再加上自噬流状态评估的整体性, 本实验仅通过可溶性 A β 1-42 的酶联免疫吸附法检测 A β 水平。以 LC3 和 p62 的 Western blot 检测自噬流, 存在一定的局限性。对于 6 月龄 APP/PS1 双转基因鼠脑内自噬水平是否低下, 还需要运用多种自噬检测方法进行研究。电针干预自噬的生物学机制尚待进一步探讨。

参考文献

- [1] GALLARDO G, HOLTZMAN D M. Amyloid-beta and Tau at the crossroads of Alzheimer's disease[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1184:187-203.
- [2] TARASOFF-CONWAY J M, CARARE R O, OSORIO R S, *et al*. Clearance systems in the brain-implications for Alzheimer disease[J]. *Nat Rev Neurol*, 2015, 11 (8) : 457-470.
- [3] 张赫, 郑焱. β 淀粉样蛋白级联假说相关的阿尔茨海默病发病机制及防治策略研究进展[J]. *中国医学科学院学报*, 2019, 41 (5) : 702-708.
- [4] COLACURCIO D J, NIXON R A. Disorders of lysosomal acidification: the emerging role of v-ATPase in aging and neurodegenerative disease[J]. *Ageing Res Rev*,

- 2016, 32:75–88.
- [5] LEE J H, NIXON R A. Autolysosomal acidification failure as a primary driver of Alzheimer disease pathogenesis[J]. *Autophagy*, 2022, 23:1–2.
- [6] TAMMINENI P, YE X, FENG T, *et al.* Impaired retrograde transport of axonal autophagosomes contributes to autophagic stress in Alzheimer’s disease neurons[J]. *Elife*, 2017, 2177:6.
- [7] LI Q, LIU Y, SUN M. Autophagy and Alzheimer’s disease[J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2017, 37(3):377–388.
- [8] NILSSON P, SAIDO T C. Dual roles for autophagy: degradation and secretion of Alzheimer’s disease abeta peptide[J]. *Bioessays*, 2014, 36(6):570–578.
- [9] ZHANG Y, WANG P. Age-related increase of insulin-degrading enzyme is inversely correlated with cognitive function in APPswe/PS1dE9 mice[J]. *Med Sci Monit*, 2018, 24:2446–2455.
- [10] FU L, SUN Y, GUO Y, *et al.* Progressive spatial memory impairment, brain amyloid deposition and changes in serum amyloid levels as a function of age in APPswe/PS1dE9 mice[J]. *Current Alzheimer Research*, 2018, 15(11):1053–1061.
- [11] BORDI M, BERG M J, MOHAN P S, *et al.* Autophagy flux in CA1 neurons of Alzheimer hippocampus: increased induction overburdens failing lysosomes to propel neuritic dystrophy[J]. *Autophagy*, 2016, 12(12):2467–2483.
- [12] KLIONSKY DJ, ABDEL-AZIZ AK, ABDELFAH S, *et al.* Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition)[J]. *Autophagy*, 2021, 17(1):1–382.
- [13] LIU W J, YE L, HUANG W F, *et al.* P62 links the autophagy pathway and the ubiquitin-proteasome system upon ubiquitinated protein degradation[J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2016, 21:29.
- [14] MA S, ATTARWALA I Y, XIE X Q. SQSTM1/p62: a potential target for neurodegenerative disease[J]. *ACS Chem Neurosci*, 2019, 10(5):2094–2114.
- [15] ZHENG X, LIN W, JIANG Y, *et al.* Electroacupuncture ameliorates beta-amyloid pathology and cognitive impairment in Alzheimer disease via a novel mechanism involving activation of TFEB (transcription factor EB)[J]. *Autophagy*, 2021, 17(11):3833–3847.
- [16] GUO H D, ZHU J, TIAN J X, *et al.* Electroacupuncture improves memory and protects neurons by regulation of the autophagy pathway in a rat model of Alzheimer’s disease[J]. *Acupunct Med*, 2016, 34(6):449–456.
- [17] LIU W, SHANG G, YANG S, *et al.* Electroacupuncture protects against ischemic stroke by reducing autophagosome formation and inhibiting autophagy through the mTORC1-ULK1 complex-Beclin1 pathway[J]. *Int J Mol Med*, 2016, 37(2):309–318.
- [18] 李赵龙, 王旭, 任路. 基于“肾脑相济”理论的电针疗法对 SAMP8 小鼠海马内线粒体自噬相关蛋白 LC3-II 及 Bnip3 表达的影响[J]. *辽宁中医杂志*, 2019, 46(2):407–409.
- [19] 裴亚妮, 杨光, 张磊, 等. 电针“百会”“涌泉”对 4 月龄 APP/PS1 双转基因小鼠海马 LC3 和 A β 影响的研究[J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2019, 21(2):307–312.
- [20] REISS A B, ARAIN H A, STECKER M M, *et al.* Amyloid toxicity in Alzheimer’s disease[J]. *Rev Neurosci*, 2018, 29(6):613–627.
- [21] LEE J H, YANG D S, GOULBOURNE C N, *et al.* Faulty autolysosome acidification in Alzheimer’s disease mouse models induces autophagic build-up of Abeta in neurons, yielding senile plaques[J]. *Nat Neurosci*, 2022, 25(6):688–701.
- [22] TAMMINENI P, CAI Q. Defective retrograde transport impairs autophagic clearance in Alzheimer disease neurons[J]. *Autophagy*, 2017, 13(5):982–984.
- [23] PICKFORD F, MASLIAH E, BRITSCHGI M, *et al.* The autophagy-related protein beclin 1 shows reduced expression in early Alzheimer disease and regulates amyloid beta accumulation in mice[J]. *J Clin Invest*, 2008, 118(6):2190–2199.
- [24] MALM T, KOISTINAHO J, KANNINEN K. Utilization of APPswe/PS1dE9 transgenic mice in research of Alzheimer’s disease: focus on gene therapy and cell-based therapy applications[J]. *Int J Alzheimers Dis*, 2011, 2011:517160.
- [25] SUN R Q, WANG Z D, ZHAO J, *et al.* Improvement of

- electroacupuncture on APP/PS1 transgenic mice in behavioral probably due to reducing deposition of Abeta in hippocampus[J]. *Anat Rec (Hoboken)*, 2021, 304(11): 2521-2530.
- [26] YANG Q, ZHU S, XU J, *et al.* Effect of the electroacupuncture on senile plaques and its formation in APP⁺/PS1⁺ double transgenic mice[J]. *Genes Dis*, 2019, 6(3): 282-289.
- [27] 邵淑君, 李华岳, 郭继红, 等. 督脉电针对 APP/PS1 双转基因痴呆小鼠行为学 and 海马区 A β 沉积的影响[J]. 中华中医药学刊, 2020, 38(1): 101-104.
- [28] 高杨, 李丽娜, 毛颖秋, 等. 电针对 APP/PS1 双转基因小鼠学习记忆能力及 LC3 II、p62 表达水平的影响[J]. 长春中医药大学学报, 2017, 33(4): 523-526.
- [29] 薛卫国, 张忠, 许红, 等. 电针对 APP 转基因鼠神经元自噬途径的影响[J]. 针刺研究, 2014, 39(4): 272-277.
- [30] 孔莹, 高伟, 林春盛, 等. 针刺百会穴对阿尔茨海默病模型大鼠自噬相关蛋白 Beclin-1 和 LC3-II 的影响[J]. 中医药导报, 2020, 26(5): 31-34.
- [31] 张利达, 韩为, 朱才丰, 等. 艾灸督脉调控 PI3K/Akt/mTOR 信号通路增强 APP/PS1 双转基因 AD 小鼠自噬水平的研究[J]. 中国针灸, 2019, 39(12): 1313-1319.

收稿日期 2022-12-10