

化瘀通络灸对血管性痴呆大鼠髓鞘再生相关蛋白表达的影响

王维顺¹, 杨 骏², 樊吟秋², 王 萍², 查必祥², 孔 钰¹, 张雅婷¹

(1. 安徽中医药大学研究生院, 安徽 合肥 230012;

2. 安徽中医药大学第一附属医院, 安徽 合肥 230031)

[摘要]目的 观察化瘀通络灸对血管性痴呆(vascular dementia, VD)大鼠胼胝体髓鞘相关蛋白表达的影响,为艾灸治疗 VD 提供依据。方法 Wistar 大鼠经 Morris 水迷宫筛选后随机分为假手术组、模型组、艾灸组、西药组,每组 12 只。采用双侧颈总动脉永久结扎法制备 VD 大鼠模型。假手术组和模型组不作其他任何处理;艾灸组取“百会”“大椎”“神庭”悬灸 20 min,每日 1 次;西药组用氯马斯汀(H₁受体拮抗剂)溶液灌胃,每日 2 次。以上 4 组干预 7 d 为 1 个疗程,共 3 个疗程。采用 Morris 水迷宫检测干预前后大鼠学习记忆能力;免疫荧光染色和 Western blot 法检测大鼠胼胝体区髓鞘相关糖蛋白(myelin associated glycoprotein, MAG)、髓鞘碱性蛋白(myelin basic protein, MBP)表达水平。结果 与假手术组比较,模型组大鼠逃避潜伏期延长($P<0.05$);与模型组比较,艾灸组、西药组逃避潜伏期均显著缩短($P<0.05$)。与假手术组比较,模型组胼胝体区 MAG、MBP 平均荧光强度显著降低($P<0.05$);与模型组比较,艾灸组 MAG、MBP 平均荧光强度显著增强($P<0.05$);与西药组比较,艾灸组 MAG 平均荧光强度显著增强($P<0.05$),MBP 平均荧光强度差异无统计学意义($P>0.05$)。与假手术组比较,模型组胼胝体区 MAG、MBP 表达水平下降($P<0.05$);与模型组比较,艾灸组 MAG、MBP 表达水平增加($P<0.05$);与西药组比较,艾灸组 MAG 表达水平增加($P<0.05$),MBP 表达水平差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 化瘀通络灸可改善 VD 大鼠的学习记忆能力,促进 VD 大鼠髓鞘相关蛋白 MAG、MBP 的合成,促使髓鞘再生。

[关键词]血管性痴呆;髓鞘再生;髓鞘相关糖蛋白;胼胝体;髓鞘碱性蛋白

[中图分类号]R743 **[DOI]**10.3969/j.issn.2095-7246.2023.01.012

血管性痴呆(vascular dementia, VD)是指由缺血性、出血性卒中或血管性脑损伤疾病所产生的认知障碍综合征,其临床表现以记忆、行为和认知功能缺损为主^[1]。VD 是仅次于阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)的常见痴呆类型^[2],约占所有痴呆病例的 15%~20%^[3]。VD 目前尚无有效的治疗手段,而艾灸可改善 VD 认知障碍,促进脑内神经新生和 VD 后神经干细胞(neural stem cells, NSCs)的增殖、迁移、分化^[4]。研究^[5]表明,VD 的病理特征除灰质损伤外,还包括白质损伤和髓鞘缺失。但既往研究主要着眼于脑灰质及构成灰质主体

的神经细胞,针灸对 VD 后脑白质功能的影响鲜有报道。实际上除了大脑灰质会发生缺血、低氧损伤外,大脑白质亦对缺血、低氧敏感,因此脑白质的脱髓鞘病变被认为是 VD 的发病机制之一^[6]。

化瘀通络灸是治疗脑血管病的有效方法,前期的临床研究和基础实验^[7-8]均证实了化瘀通络灸治疗 VD 的疗效。本实验观察化瘀通络灸对 VD 大鼠髓鞘再生相关蛋白表达的影响,探讨化瘀通络灸治疗 VD 的可能作用机制。

1 材料

1.1 动物 选用 SPF 级健康成年雄性 Wistar 大鼠 60 只,由济南朋悦实验动物繁育有限公司[生产许可证号:SCXK(鲁)2019-0003]提供,体质量(250±20)g。统一饲养于安徽中医药大学针灸经络研究所普通级动物房。饲养条件:恒温(25±1)℃,湿度(50±10)%。实验获得安徽中医药大学实验动物伦理委员会批准,伦理审批号:AHUCM-rats-2022034。

1.2 试剂 氯马斯汀(批号 C129211)、阿拉丁;髓鞘碱性蛋白(myelin basic protein, MBP)一抗(批号

基金项目:国家自然科学基金项目(82104994);杨骏全国名中医传承工作室(皖中医药发展秘[2022]19号);国家中医药管理局专科病循证能力提升项目(2019X22X2J001)

作者简介:王维顺(1995-),男,硕士研究生

通信作者:杨骏(1958-),男,教授,主任医师, yangjunacup@

bs-0258R)、髓鞘相关糖蛋白(myelin associated glycoprotein, MAG)一抗(批号 bs-0380R);北京 Bioss 公司;Alexa Fluor 488 标记山羊抗兔 IgG(H+L)(批号 A0423);上海碧云天生物技术有限公司;羊抗兔 HRP 标记二抗(批号 L3012);美国 SAB 公司。

1.3 仪器 Morris 水迷宫:北京众实迪科技发展有限公司;RM2016 病理切片机:德国 Leica;全自动数字扫描仪:匈牙利 3DHISTECH 公司;垂直电泳仪:美国 Bio-Rad 公司。

2 方法

2.1 模型复制与分组 将大鼠饲养 1 周后,使用 Morris 水迷宫实验筛选原地旋转、漂浮不动和特别灵敏的大鼠,将余下 55 只纳入实验。采用随机数字表法将 12 只大鼠随机选为假手术组,其余大鼠用于复制 VD 模型。采用双侧颈总动脉永久结扎法复制 VD 大鼠模型^[9]。术前大鼠禁水、禁食 8 h,3%戊巴比妥钠(30 mg/kg)腹腔注射麻醉,浅反射消失后,将大鼠固定在特制鼠板上,无菌操作,在大鼠颈部正中作纵向切口,用镊子钝性分离一侧颈总动脉,避免触碰神经,动脉夹夹闭右侧颈总动脉 10 min,松开 10 min,夹闭、松开反复操作 3 次,用 4-0 号外科缝线分别在动脉近心端及远心端永久结扎,从中间剪断动脉,缝合伤口,分开放回笼中饲养。1 周后再以相同方法处理左侧颈总动脉。假手术组按上述操作,分离颈总动脉后不作其他处理。模型复制 3 d 后,用水迷宫对大鼠进行模型鉴定。将假手术组大鼠定位航行实验第 4 天逃避潜伏期的平均值作为参考值,再将模型复制后的每只大鼠第 4 天的平均逃避潜伏期减去参考值,所得差值与该鼠的平均逃避潜伏期相除得一比值,若比值超过 20%,则表明模型复制成功^[10]。筛选模型成功的 VD 大鼠 36 只,随机分为艾灸组、西药组、模型组,每组 12 只。

2.2 各组干预方法 艾灸组大鼠参照《实验动物常用穴位名称与定位》^[11]选取“大椎”“百会”“神庭”穴进行艾灸,将大鼠固定于自制的灸架上,点燃清艾条(5 mm×12 cm,江苏康美制药有限公司),于相应穴位上 1~2 cm 处进行悬灸,每天 20 min,7 d 为 1 个疗程,共干预 3 个疗程。西药组大鼠用氯马斯汀(H_1 受体拮抗剂)与蒸馏水配置灌胃溶液,按 10 mL/kg 灌胃,每日 2 次,7 d 为 1 个疗程,共干预 3 个疗程。仅将假手术组和模型组大鼠放于灸架上,不作其他任何处理,干预时间同艾灸组。

2.3 观察指标及方法

2.3.1 定位航行实验 Morris 水迷宫为大鼠通用

型泳池,避光,控制水温为 $(23\pm 2)^{\circ}\text{C}$ 。沿水池周长等距分布,水池区域被划分为 4 个象限,透明圆形平台放在第 3 象限中间位置水下 2 cm。将大鼠分别从 4 个象限放入水中,其逃避潜伏期为 2 min 内找到平台的时间。2 min 内仍未找到平台的大鼠,将此次入水逃避潜伏期记录为 2 min,然后将大鼠引导到平台上,停留 30 s。连续训练 4 d,确保大鼠每天实验时间相同,每次入水时位置相同。

2.3.2 免疫荧光染色法检测大鼠胼胝体区 MAG、MBP 阳性细胞表达水平 治疗结束 24 h 内,每组各取 6 只大鼠灌注 4%多聚甲醛后取脑,将大脑组织用石蜡包埋后切片。切片使用 0.01 mmol/L PBS 漂洗,羊血清封闭,加入一抗 MAG、MBP(1:200),4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,二抗使用 Alexa Fluor 488 标记山羊抗兔 IgG(H+L)(1:500),DAPI 复染细胞核。阴性对照采用 PBS 代替一抗,其余步骤不变。用全自动数字扫描仪扫描整个脑片区域,重点观察胼胝体区 MAG、MBP 的表达水平。

2.3.3 Western blot 法检测大鼠胼胝体区 MAG、MBP 表达水平 取剩余 6 只大鼠断头后取脑,冰上提取胼胝体,一80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。裂解液提取组织总蛋白后,经上样、电泳、转膜等过程,分别加入一抗 MBP(1:1 000)、MAG(1:1 000),4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育摇床过夜。加入羊抗兔 HRP 标记二抗(1:5 000),再使用 ECL 化学发光液显影,放入成像系统中扫描,使用 Image J 软件读取灰度值。

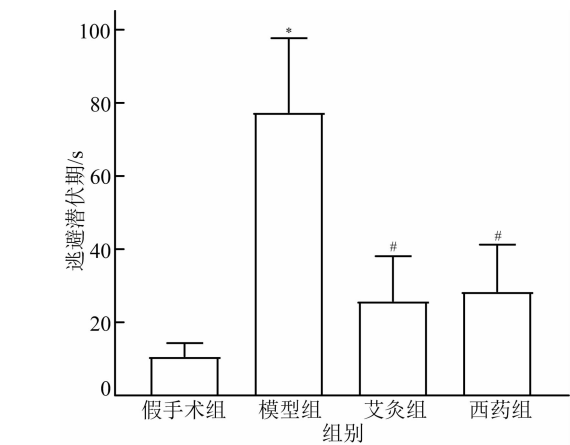
2.4 统计学方法 采用 SPSS 24.0 软件对实验数据进行分析。连续型变量以“均数±标准差($\bar{x}\pm s$)”表示。数据呈正态分布时采用 t 检验,数据呈偏态分布时采用 Mann-Whitney U 检验。数据符合正态分布时多组均数比较采用单因素方差分析,均数多重比较采用 LSD 检验(方差齐时)或 Dunnett's T_3 检验(方差不齐时);不符合正态分布时采用 Kruskal-Wallis H 检验,组间多重比较采用 Mann-Whitney U 检验。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠 Morris 水迷宫逃避潜伏期比较 模型复制 3 d 后,用水迷宫对大鼠进行模型鉴定,假手术组大鼠($n=12$)逃避潜伏期为 $(11.06\pm 3.23)\text{s}$,VD 模型大鼠($n=36$)逃避潜伏期为 $(66.58\pm 31.76)\text{s}$,两组大鼠逃避潜伏期比较,差异有统计学意义($P<0.05$),说明 VD 大鼠模型制备成功。

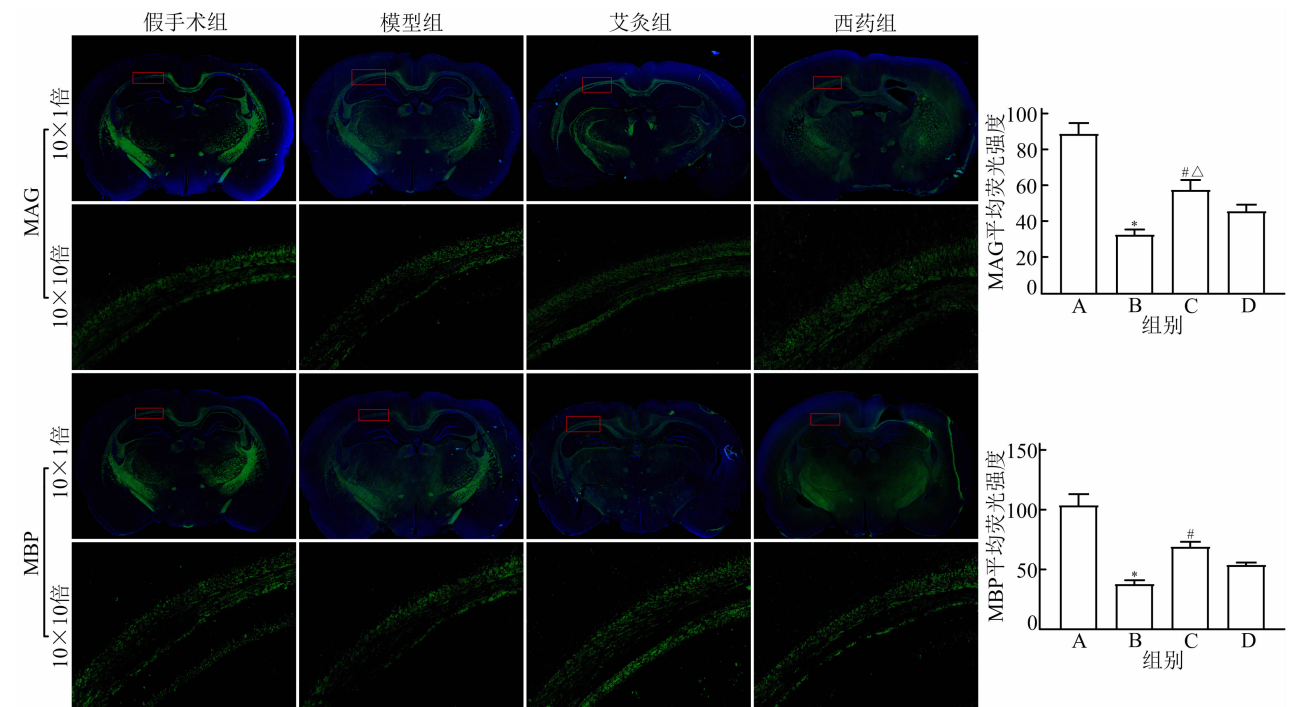
与假手术组比较,干预后模型组逃避潜伏期延长($P<0.05$);与模型组比较,艾灸组、西药组逃避

潜伏期均显著缩短($P<0.05$)。见图 1。



注:与假手术组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,# $P<0.05$

图 1 各组大鼠逃避潜伏期比较($\bar{x}\pm s,n=12$)



注:A.假手术组;B.模型组;C.艾灸组;D.西药组;与假手术组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,# $P<0.05$;与西药组比较,△ $P<0.05$

图 2 各组大鼠胼胝体区 MAG、MBP 阳性细胞表达水平比较(免疫荧光染色, $\bar{x}\pm s,n=6$)

4 讨论

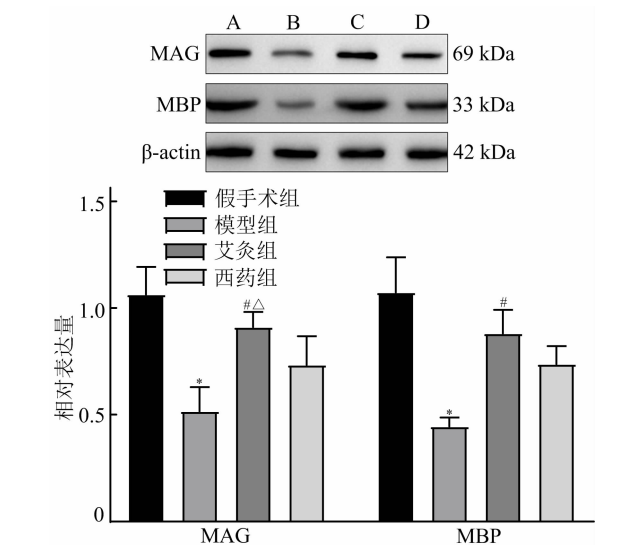
VD 属于中医学“呆病”范畴,年老肾精不足,气血亏虚,血脉瘀滞,脑络瘀阻,日久可导致脑失所养、髓脑空虚,发为本病,故血瘀与 VD 密切相关。化瘀通络灸取督脉百会、大椎、神庭穴,发挥艾灸温阳通脉、活血散结的作用,以充养脑髓、安神宁志。研究^[12]表明,针刺“百会”等督脉穴不仅可以改善学习记忆能力,而且能促进脑缺血大鼠脑白质髓鞘再生。本实验通过 Morris 水迷宫观察发现,艾灸干预后 VD 大鼠的逃避潜伏期比治疗前显著减少,说明化

3.2 各组大鼠胼胝体区 MAG、MBP 阳性细胞表达水平比较 胼胝体区 MAG、MBP 染色为丝状。与假手术组比较,模型组胼胝体区 MAG、MBP 平均荧光强度均降低($P<0.05$);与模型组比较,艾灸组 MAG、MBP 平均荧光强度增强($P<0.05$);与西药组比较,艾灸组 MAG 平均荧光强度增强($P<0.05$),MBP 平均荧光强度差异无统计学意义($P>0.05$)。见图 2。

3.3 各组大鼠胼胝体区 MAG、MBP 表达水平比较 与假手术组比较,模型组胼胝体区 MAG、MBP 表达水平下降($P<0.05$);与模型组比较,艾灸组 MAG、MBP 表达水平增加($P<0.05$);与西药组比较,艾灸组 MAG 表达水平增加($P<0.05$),MBP 表达水平组间差异无统计学意义($P>0.05$)。见图 3。

瘀通络灸能改善 VD 大鼠学习记忆能力。这与课题组前期报道^[13]的化瘀通络灸能够明显改善 VD 大鼠学习记忆能力的研究结果一致。

脑白质由许多髓鞘化的轴突组成,其基础代谢率高,因此即使是轻微缺血也会造成脑白质损伤。胼胝体是大脑最大的白质带,是 VD 的主要损伤部位,故选用胼胝体作为 VD 白质损伤的观察对象。髓鞘是白质中必不可少的成分,由成熟少突胶质细胞发出的细胞突起包裹神经细胞轴突形成。髓鞘的完整性对脑白质功能的恢复至关重要,因此髓鞘脱



注:A.假手术组;B.模型组;C.艾灸组;D.西药组;与假手术组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,# $P<0.05$;与西药组比较, $\Delta P<0.05$

图 3 各组大鼠胼胝体区 MAG、MBP 表达水平比较($\bar{x}\pm s,n=6$)

失也会引起以认知障碍为主的一系列临床综合征^[14]。当提供营养支持时,脑白质中的髓鞘被激活,发生增殖,并迁移到损伤部位,使髓鞘重新包裹轴突,这个过程称为“髓鞘再生”^[15]。同时实验研究^[16]证明,氯马斯汀(H_1 受体拮抗剂)具有增强少突胶质细胞分化和促进髓鞘再生的作用,因此本研究选择氯马斯汀作为阳性对照药。

MAG 是构成髓鞘的重要成分之一,其表达在髓鞘的最内层,直接与轴突表面相邻,具有稳定轴-髓鞘方面的作用、维持髓鞘结构的完整性等^[17]。有研究^[18]报道,脱髓鞘会导致 MAG 损失,MAG 可能是髓鞘形成所必需的物质。MBP 位于髓鞘浆液表面,是髓鞘的特异性标志物,可启动髓鞘的合成,稳定髓鞘的结构^[19]。同时既往实验^[20]表明,大脑缺血损伤后,髓鞘相关蛋白 MAG、MBP 含量明显降低。因此,髓鞘相关蛋白 MAG、MBP 表达水平的高低可反映髓鞘再生情况和中枢神经系统功能恢复程度。

本研究结果表明,与假手术组比较,模型组大鼠髓鞘相关蛋白 MAG、MBP 表达水平均显著降低($P<0.05$);与模型组比较,艾灸组髓鞘相关蛋白 MAG、MBP 表达水平均显著升高($P<0.05$)。结果提示化瘀通络灸能够促进髓鞘相关蛋白 MAG、MBP 的合成,促进髓鞘再生。与西药组比较,艾灸组 MAG 表达水平升高($P<0.05$),说明艾灸组的疗效优于西药组;艾灸组 MBP 表达趋势略优于西药组,但差异无统计学意义($P>0.05$),究其原因可

能与样本量不足有关。由此推断,艾灸能够加快大鼠脑白质髓鞘损伤的修复,从而证实化瘀通络灸可以促进髓鞘再生,对促进髓鞘再生起到积极作用。

综上,化瘀通络灸能促进 VD 大鼠髓鞘相关蛋白 MAG、MBP 的合成,促使髓鞘再生,从而改善 VD 大鼠的学习记忆能力。

参考文献:

[1] SMITH ERIC E. Clinical presentations and epidemiology of vascular dementia[J]. Clinical Science, 2017, 131 (11):1059-1068.

[2] IADECOLA C, DUERING M, HACHINSKI V, et al. Vascular cognitive impairment and dementia; JACC scientific expert panel[J]. J Am Coll Cardiol, 2019, 73 (25):3326-3344.

[3] WOLTERS F J, IKRAM M A. Epidemiology of vascular dementia[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2019, 39 (8):1542-1549.

[4] FAN Y Q, YANG J, CUI J C, et al. Moxibustion therapy improving delayed memory deficits via promoting neurogenesis and angiogenesis of hippocampus in a vascular dementia rat model[J]. Journal of Acupuncture and Tuina Science, 2019, 17(6):383-394.

[5] WANG X X, ZHANG B, XIA R, et al. Inflammation, apoptosis and autophagy as critical players in vascular dementia[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2020, 24(18): 9601-9614.

[6] HASE Y, HORSBURGH K, IHARA M, et al. White matter degeneration in vascular and other ageing-related dementias[J]. J Neurochem, 2018, 144(5):617-633.

[7] 张媛媛, 张校军, 杨骏, 等. 化瘀通络灸对血管性痴呆大鼠学习记忆能力及海马 BDNF/TrkB 表达的影响[J]. 中国针灸, 2019, 39(1):65-71.

[8] 汪林英, 肖洪波, 张庆萍, 等. 化瘀通络灸结合针刺治疗脑卒中后轻度认知障碍的临床疗效观察[J]. 安徽中医药大学学报, 2021, 40(5):40-44.

[9] TUO Q Z, ZOU J J, LEI P. Rodent models of vascular cognitive impairment[J]. J Mol Neurosci, 2021, 71(5): 1-12.

[10] YU J C, LIU C Z, ZHANG X Z, et al. Acupuncture improved cognitive impairment caused by multi-infarct dementia in rats[J]. Physiol Behav, 2005, 86(4):434-441.

[11] 中国针灸学会. 实验动物常用穴位名称与定位第 2 部分:大鼠[J]. 针刺研究, 2021, 46(4):351-352.

[12] 董文青, 缪化春, 吴锋, 等. 电针对脑缺血大鼠胼胝体髓鞘相关蛋白表达的影响[J]. 针刺研究, 2021, 46(9): 721-727.

[13] 桂利, 李悦, 樊吟秋, 等. 化瘀通络灸对血管性痴呆大鼠

- 学习记忆能力影响研究[J]. 辽宁中医药大学学报, 2019, 21(2): 111-114.
- [14] SAGGU R, SCHUMACHER T, GERICH F, et al. Astroglial NF- κ B contributes to white matter damage and cognitive impairment in a mouse model of vascular dementia[J]. *Acta Neuropathol Commun*, 2016, 4(1): 76.
- [15] CRAWFORD A H, CHAMBERS C, FRANKLIN R J. Remyelination: the true regeneration of the central nervous system[J]. *J Comp Pathol*, 2013, 149(2/3): 242-254.
- [16] GREEN A J, GELFAND J M, CREE B A, et al. Clemastine fumarate as a remyelinating therapy for multiple sclerosis (ReBUILD): a randomised, controlled, double-blind, crossover trial [J]. *Lancet*, 2017, 390(10111): 2481-2489.
- [17] VALLAT J M, MAGY L, CIRON J, et al. Therapeutic options and management of polyneuropathy associated with anti-MAG antibodies[J]. *Expert Rev Neurother*, 2016, 16(9): 1111-1119.
- [18] RAHMANZADEH R, SAHRAIAN M A, RAHMANZADE R, et al. Demyelination with preferential MAG loss: a complex message from MS paraffin blocks [J]. *J Neurol Sci*, 2018, 385: 126-130.
- [19] ZHAO H, GAO X Y, LIU Z H, et al. Effects of the transcription factor Olig1 on the differentiation and remyelination of oligodendrocyte precursor cells after focal cerebral ischemia in rats [J]. *Mol Med Rep*, 2019, 20(5): 4603-4611.
- [20] ZHENG J Y, ZHANG T, HAN S, et al. Activin a improves the neurological outcome after ischemic stroke in mice by promoting oligodendroglial ACVR1B-mediated white matter remyelination [J/OL]. *Exp Neurol*, 2021, 337: 113574 [2022-09-16]. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2020.113574>.

(收稿日期: 2022-09-17)

Effects of Blood Stasis-Removing and Collateral-Dredging Moxibustion on Expression of Myelin Regeneration-Related Proteins in Rats with Vascular Dementia

WANG Weishun¹, YANG Jun², FAN Yinqiu², WANG Ping², ZHA Bixiang², KONG Yu¹, ZHANG Yating¹

(1. Graduate School of Anhui University of Chinese Medicine, Anhui Hefei 230012, China; 2. The First Affiliated Hospital of Anhui University of Chinese Medicine, Anhui Hefei 230031, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of blood stasis-removing and collateral-dredging moxibustion on the expression of myelin-associated glycoprotein (MAG) and myelin basic protein (MBP) in the corpus callosum of rats with vascular dementia (VD), and to provide a basis for treating VD with moxibustion. **Methods** Wistar rats selected by the Morris water maze test were randomly divided into sham group, model group, moxibustion group, and Western medicine group, with 12 rats in each group. A rat VD model was prepared by permanent ligation of bilateral common carotid arteries. The sham and model groups had no additional treatment. The moxibustion group received suspended moxibustion at the "Baihui", "Dazhui", and "Shenting" points for 20 min, once a day. The Western medicine group was given clemastine (H_1 -receptor antagonist) solution by gavage twice a day. With seven days as a course of treatment, the treatments lasted for three courses. The Morris water maze test was used to detect the learning and memory ability of rats before and after intervention. The expression of MAG and MBP in the corpus callosum of rats was measured by immunofluorescence assay and Western blot. **Results** Compared with that in the sham group, escape latency was significantly prolonged in the model group ($P < 0.05$). The moxibustion group and Western medicine group had significantly shortened escape latencies than the model group ($P < 0.05$). The mean fluorescence intensities of MAG and MBP in the corpus callosum were significantly decreased in the model group compared with the sham group ($P < 0.05$). Compared with the model group, the moxibustion group showed significantly increased mean fluorescence intensities of MAG and MBP ($P < 0.05$). Compared with the Western medicine group, the moxibustion group showed a significantly increased mean fluorescence intensity of MAG ($P < 0.05$), with no significant difference in the mean fluorescence intensity of MBP ($P > 0.05$). The expression of MAG and MBP in the corpus callosum was