

## · 针灸经络 ·

# 艾灸督脉组穴对血管性痴呆大鼠学习记忆能力和 RAGE、LRP-1 表达的影响

王婧吉<sup>1,3</sup>, 吴生兵<sup>2</sup>, 王 堃<sup>2</sup>, 杨 超<sup>3</sup>, 程红亮<sup>1</sup>

(1. 安徽中医药大学第二附属医院, 安徽 合肥 230061; 2. 安徽中医药大学科研实验中心, 安徽 合肥 230038; 3. 安徽中医药大学研究生院, 安徽 合肥 230012)

**[摘要]**目的 观察艾灸督脉组穴对血管性痴呆(vascular dementia, VD)大鼠脑微血管内皮细胞(brain microvascular endothelial cells, BMECs)晚期糖基化终产物受体(receptor for advanced glycation end products, RAGE)和低密度脂蛋白受体相关蛋白-1(LDL-receptor related protein-1, LRP-1)表达的影响,探讨艾灸督脉组穴治疗 VD 的作用机制。**方法** 采用 Morris 水迷宫筛选后,将 SD 大鼠随机分为正常组、模型组、艾灸组,每组 12 只。采用颈总动脉结扎反复缺血再灌注法复制模型,艾灸组取“百会”“大椎”“风府”温和灸 30 min,每日 1 次,7 次为 1 个疗程,共治疗 4 个疗程。采用 Morris 水迷宫法对大鼠进行行为学检测,采用免疫组织化学法检测皮质和海马组织中 RAGE 和 LRP-1 表达水平,并分析行为学检测结果与 RAGE 和 LRP-1 之间的相关性。**结果** 各时间点模型组逃避潜伏期均较正常组明显延长( $P < 0.05$ ),艾灸组逃避潜伏期均较模型组明显缩短( $P < 0.05$ );模型组大鼠穿越平台次数明显少于正常组( $P < 0.05$ ),艾灸组大鼠穿越平台次数明显多于模型组( $P < 0.05$ )。与正常组比较,模型组大鼠海马和皮质中 RAGE 表达增多,LRP-1 表达减少,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ );与模型组比较,艾灸组大鼠海马和皮质中 RAGE 表达减少、LRP-1 表达增多,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。大鼠穿越平台次数与海马和皮质内 RAGE 存在显著负相关关系,与海马和皮质内 LRP-1 存在显著正相关关系。**结论** 艾灸督脉组穴可明显改善 VD 大鼠的学习记忆能力,其机制可能与下调大鼠 BMECs 的 RAGE 表达和上调 LRP-1 表达有关。

**[关键词]** 艾灸;血管性痴呆;学习记忆能力;脑微血管内皮细胞;晚期糖基化终产物受体;低密度脂蛋白受体相关蛋白-1

**[中图分类号]** R743 **[DOI]** 10.3969/j.issn.2095-7246.2019.05.013

血管性痴呆(vascular dementia, VD)是指因脑血管病变造成脑组织血流运行障碍,引起记忆、认知和行为改变的脑区低灌注性血管疾病,是一种慢性进行性疾病,表现为严重的认知功能障碍综合征<sup>[1]</sup>。目前 VD 被认为是唯一可以防治的痴呆类型,但发病机制尚不十分明确<sup>[2]</sup>。有研究认为 VD 和阿尔兹海默病(Alzheimer's disease, AD)有着共同的脑血管内皮损伤机制以及有神经毒性的  $\beta$ -淀粉样蛋白(amyloid  $\beta$ -protein, A $\beta$ )在脑血管和脑实质中积蓄<sup>[3]</sup>。A $\beta$ 跨血脑屏障的转运主要通过存在于脑微血管内皮细胞(brain microvascular endothelial cells, BMECs)膜上晚期糖基化终产物受体(receptor for advanced glycation endproducts, RAGE)和低密度脂蛋白受体相关蛋白-1(low density lipopro-

tein-receptor related protein-1, LRP-1)受体系统完成,其中 LRP-1 介导 A $\beta$  转运出脑,而 RAGE 介导 A $\beta$  转运入脑<sup>[4]</sup>。既往学者研究发现,艾灸可改善和延缓 VD 患者临床症状,调控与学习记忆相关神经肽物质,促进血管新生,调节神经营养因子表达<sup>[5-7]</sup>。本研究观察艾灸督脉组穴对 VD 大鼠 BMECs 的 RAGE 和 LRP-1 表达的影响,探讨艾灸督脉组穴治疗 VD 的作用机制。

## 1 材料

1.1 实验动物与分组 SPF 级健康雄性 SD 大鼠,由安徽医科大学实验动物中心提供,生产许可证号:SCXK(皖)2011-002。室温为 20~25℃,相对湿度为 40%~75%,昼夜明暗交替。适应性饲养 1 周后,进行 Morris 水迷宫筛选实验,训练过程中对反应过于敏感或迟钝的大鼠予以剔除。选择性格活泼及水迷宫实验数据相近者 36 只,采用随机数字表法将其分为正常组、模型组和艾灸组各 12 只。实验手术中死亡大鼠未列入实验分析对象。实验过程中对动物的处置遵循中华人民共和国科学技术部 2006

**基金项目:**安徽省自然科学基金项目(1608085QH220)

**作者简介:**王婧吉(1985-),女,硕士研究生,主治医师

**通信作者:**吴生兵(1977-),男,硕士,副研究员,391542360@

年颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》。

1.2 主要试剂及仪器 清艾条(规格:8 mm×15 mm);南阳艾灸厂;LRP-1 抗体:美国 Santa Cruz;RAGE 抗体:英国 Abcam;通用型二步法检测试剂盒、DAB 显色剂、PBS、EDTA 修复液:北京中杉;苏木素:珠海贝索;Morris 水迷宫:安徽省淮北正华生物仪器设备有限公司;切片机(Leica 2135):德国;显微镜(Nikon 80i):日本。

## 2 方法

2.1 模型复制方法与模型评价 模型组和艾灸组大鼠采用颈总动脉结扎反复缺血再灌注法复制模型(经典的 VD 模型制备方法),10%水合氯醛(3 mL/kg)腹腔注射麻醉,仰卧固定,无菌操作,颈正中切口,分离双侧颈总动脉,并套以 4 号丝线备用,拉紧丝线扣,阻断血流 20 min,同时尾部放血 0.3 mL,热凝止血,松开丝线扣,恢复血流 10 min,再次阻断血流 20 min,如此重复 3 次,第 3 次血流在灌注后 30 min,如呼吸、心跳正常,即可缝合皮肤。在模型复制完成后第 4 天进行行为学评分,以鉴定模型复制是否成功。若模型复制后大鼠逃避潜伏期较模型复制前显著延长( $P<0.05$ ),则表明模型复制成功。

2.2 治疗方法 模型复制成功后,将艾灸组大鼠固定于鼠板上,并固定头部,根据《实验针灸学》<sup>[8]</sup>取“百会”“风府”“大椎”,采用清艾条悬于穴位上方约 2 cm,每次每穴灸 30 min,每日 1 次,共治疗 4 周。正常组和模型组:与艾灸组平行,只做鼠板上固定,不做其他任何处理。

2.3 行为学检测方法 治疗结束后,用 Morris 水迷宫法对 3 组大鼠进行行为学检测。池壁标明的 4 个等距入水点将水池等分为 4 个象限,在任一象限中央(与池壁、圆心距离相等)放置目标平台,平台低于水平面 1 cm。保持实验室温度在 24~25 ℃,水温在 22 ℃左右。

定位航行实验:治疗结束后第 1 天练习站台,第 2~5 天将平台置于第 1 象限,从池壁 4 个起始点的任一点将大鼠面向池壁放入水池,记录其在 2 min 内找到并爬上平台的时间及逃避潜伏期,如大鼠在 2 min 内未发现平台,则用工具将其引导至平台上,停留 10 s 后,放回笼中,其逃避潜伏期按 120 s 计算。

空间探索实验:治疗结束后第 6 天,在定位航行实验结束后撤除平台,在各个象限相同入水点将大鼠放入池中,记录大鼠在 120 s 内穿越目标象限平台的次数。

2.4 免疫组织化学法测定大鼠皮质和海马

RAGE、LRP-1 表达水平 Morris 水迷宫测试完毕后,大鼠禁食 12 h,每组动物麻醉后经左心室行主动脉插管,多聚甲醛固定,断头取脑。脑组织制成 4~6 μm 的石蜡切片备用。切片梯度脱水,PBS 洗 3 次后进行微波修复;冷却至室温后,PBS 洗 3 次,血清室温封闭 20 min;加一抗(1:100),4 ℃孵育过夜;PBS 洗 3 次,滴加通用型两步法二抗,室温孵育 30 min;PBS 洗 3 次后 DAB 显色,光镜下观察显色情况;苏木素轻度复染核 3~5 min,自来水浸泡冲洗,盐酸-乙醇分色,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树脂胶封片。每张切片任选 5 个视野,以细胞胞浆或胞质、胞核中出现黄色或棕褐色颗粒为阳性反应。分别测定皮质和海马组织中神经细胞及微血管上 RAGE、LRP-1 表达水平。

2.5 统计学方法 数据采用 SPSS 17.0 统计学软件进行处理。连续型变量以“均数±标准差( $\bar{x}\pm s$ )”表示。符合正态分布、方差齐时采用单因素方差分析,均数多重比较采用 LSD 法;方差不齐时采用秩和检验;Graphpad 相关性分析用于分析海马和皮质的 RAGE、LRP-1 表达与穿越平台次数之间的相关性。以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 3 结果

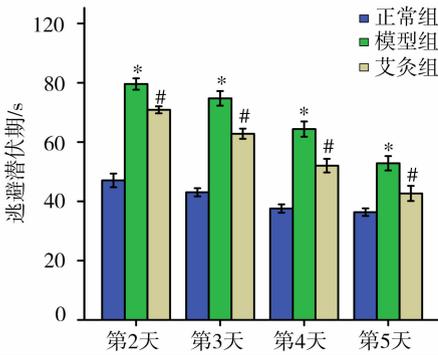
3.1 3 组大鼠逃避潜伏期及穿越平台次数比较 各时间点模型组逃避潜伏期均较正常组明显延长( $P<0.05$ ),艾灸组逃避潜伏期均较模型组明显缩短( $P<0.05$ )。见图 1。模型组大鼠穿越平台次数明显少于正常组( $P<0.05$ ),艾灸组大鼠穿越平台次数明显多于模型组( $P<0.05$ )。见图 2。

3.2 3 组大鼠海马和皮质组织中 RAGE、LRP-1 表达水平比较 与正常组比较,模型组大鼠海马和皮质中 RAGE 表达增多,LRP-1 表达减少,差异均有统计学意义( $P<0.05$ );与模型组比较,艾灸组大鼠海马和皮质中 RAGE 表达减少,LRP-1 表达增多,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。见图 3、图 4、图 5。

3.3 RAGE、LRP-1 表达与穿越平台次数相关性分析 结果显示,大鼠穿越平台次数与海马和皮质内 RAGE 存在显著负相关关系(海马: $r=-0.81$ , $P<0.05$ ;皮质: $r=-0.72$ , $P<0.05$ )。大鼠穿越平台次数与海马和皮质内 LRP-1 存在显著正相关关系(海马: $r=0.79$ , $P<0.05$ ;皮质: $r=0.72$ , $P<0.05$ )。

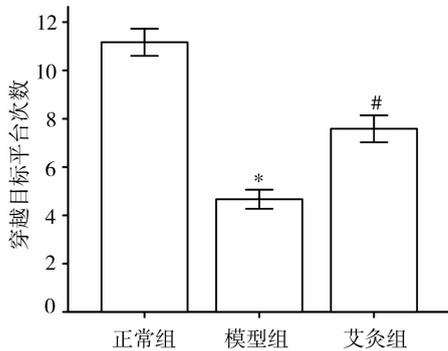
## 4 讨论

血管性危险因素是导致 VD 的主要因素。流行病学研究表明,高血压、心脏病、糖尿病和高脂血症



注:与正常组比较,\* P<0.05;与模型组比较,# P<0.05

图1 3组大鼠逃避潜伏期比较(x̄ ± s, n=12)



注:与正常组比较,\* P<0.05,与模型组比较,# P<0.05

图2 3组大鼠穿越目标平台次数比较(x̄ ± s, n=12)

等血管危险因素均可能引发VD<sup>[9]</sup>。Hardy J等<sup>[10]</sup>研究发现,脑低血流灌注、血管壁退化、神经血管炎症反应等因素可导致脑微环境异常,血脑屏障功能失调,从而影响Aβ的跨膜转运。因此,Aβ不仅存在于AD患者脑内,而且与VD也关系密切。

BMECs是指参与实现血脑屏障选择性屏障功能的血管内皮细胞,并参与血管神经单元的组成<sup>[11-12]</sup>。多项研究表明,Aβ的跨血脑屏障转运与BMECs膜上RAGE和LRP-1受体密切相关,RAGE表达的增多和LRP-1表达减少均会导致Aβ在脑内的沉积<sup>[13-15]</sup>。国内也有学者围绕调节RAGE和LRP-1表达开展治疗AD的机制研究。如周忠光等<sup>[16]</sup>研究发现,“益肾调督”针灸可通过下调AD小鼠海马RAGE表达,减少脑组织中Aβ含量,提高其学习记忆能力。胡华等<sup>[17]</sup>观察发现,复方丹参片可促进LRP-1的表达、抑制RAGE表达,从而对APP/PS1小鼠脑内神经细胞起到保护作用。基于RAGE和LRP-1表达与BMECs的分泌功能密切相关,也有学者开展血管因素引起的认知功能障碍研究。乔晋等<sup>[18]</sup>研究发现,自发性高血压大鼠RAGE mRNA及其蛋白表达水平异常增高,提示Aβ代谢异常可能参与高血压认知损害的发生。

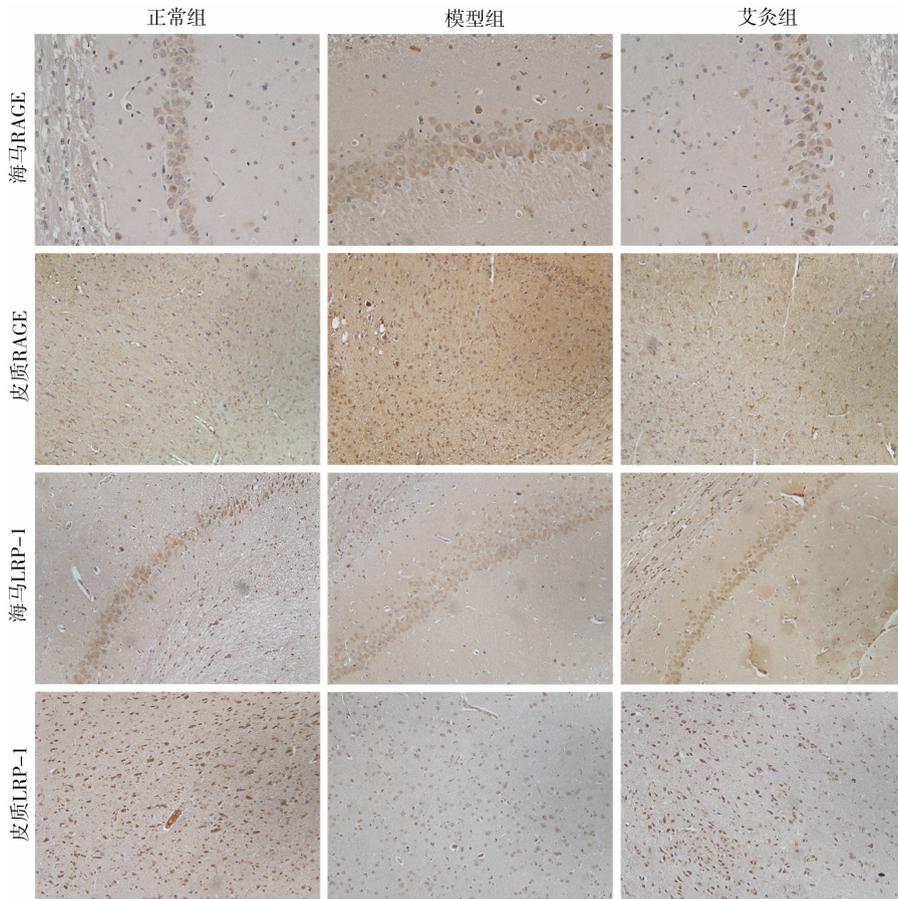
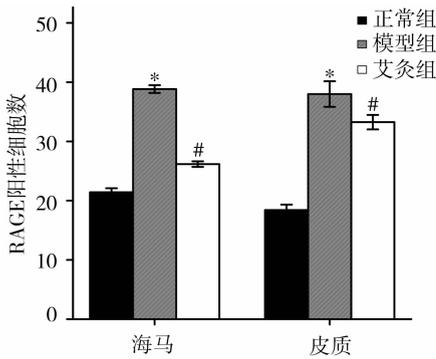


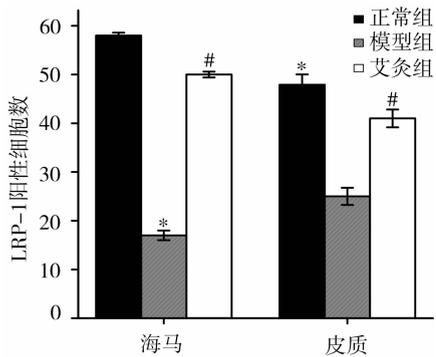
图3 各组大鼠海马和皮质RAGE、LRP-1表达水平比较(免疫组织化学染色,10×40倍)



注:正常组比较,\* $P<0.05$ ,与模型组比较,# $P<0.05$

图4 各组大鼠海马和皮质中 RAGE

表达水平比较( $\bar{x} \pm s, n=12$ )



注:与正常组比较,\* $P<0.05$ ,与模型组比较,# $P<0.05$

图5 各组大鼠海马和皮质中 LRP-1

表达比较( $\bar{x} \pm s, n=12$ )

么晓轶等<sup>[19]</sup>研究发现,脑缺血再灌注后缺血脑组织糖基化终产物及其受体的表达升高。综上所述,RAGE 和 LRP-1 的水平能够直接影响脑内 A $\beta$  的含量,从而影响认知功能。

VD 属于“痴呆”范畴,古代医家从经络腧穴方面对本病积累了丰富全面的认识,历代中医文献中均有“头为诸阳之会”,督脉“入属于脑”“入络脑”“入脑”等记载,认为督脉为阳脉之海,是十二经脉之纲领及动力,与脑有着密切联系。本研究选取的穴位为百会、大椎、风府。百会为督脉经穴,是膀胱经与督脉的交会穴,膀胱经通过此穴“入络脑”;大椎穴为“诸阳之会”,具有“通调头部气血”之功;风府可“醒脑调神”,三穴共奏化痰通络、填髓益智之功。

本研究发现,艾灸督脉组穴治疗后大鼠皮质和海马 RAGE 表达水平较模型组明显降低,而 LRP-1 表达水平则显著升高,且大鼠学习记忆能力也有所改善,说明艾灸可能通过调节 RAGE 和 LRP-1 的平衡状态起到改善 VD 认知功能的作用。该研究结果与临床研究结果具有一致性,为临床应用艾灸疗法参与治疗血管性认知功能提供了理论依据。

参考文献:

[1] 贾建平. 神经病学[M]. 北京:人民卫生出版社,2013;

209.  
 [2] 王拥军. 血管神经病学[M]. 北京:科学出版社,2015:115.  
 [3] HORSTMAN L L, JY W, BIDOT C J, et al. Potential roles of cell-derived microparticles in ischemic brain disease[J]. *Neurol Res*, 2009, 31(8):799-806.  
 [4] UENO M, NAKAGAWA T, WU B, et al. Transporters in the brain endothelial barrier [J]. *Current Medicinal Chemistry*, 2010, 17(12):1125-1138.  
 [5] 陈浩,王频,杨骏,等. 艾灸对血管性痴呆患者症状及脑脊液中神经肽类物质水平的影响[J]. *中国针灸*, 2011, 31(1):19-21.  
 [6] 何道有. 艾灸头部组穴对 VD 模型大鼠认知功能及神经-血管共生影响的研究[D]. 合肥:安徽中医药大学, 2016.  
 [7] 王莹,蔡圣朝,宋小鸽,等. 艾灸对血管性痴呆大鼠海马神经营养因子及 Notch 信号通路表达的影响[J]. *针刺研究*, 2017, 42(5):377-383.  
 [8] 李忠仁. 实验针灸学[M]. 北京:中国中医药出版社, 2003.  
 [9] 高风超,陈翔,田新英,等. 血管性痴呆危险因素及发病机制的研究进展[J]. *医学综述*, 2014, 20(6):1068-1071.  
 [10] HARDY J, SELKOE D J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics [J]. *Science*, 2002, 297(5580):353-356.  
 [11] HIROOKA T, KAJI T. The cytotoxicity of methymercury in human microvascular endothelial cells and pericytes in culture [J]. *Biol Pharm Bull*, 2012, 35(8):1201-1205.  
 [12] RONALDSON P T, DAVIS T P. Blood-brain barrier integrity and glial support: mechanisms that can be targeted for novel therapeutic approaches in stroke [J]. *Curr Pharm Des*, 2012, 18(25):3624-3644.  
 [13] GALASKO D, BELL J, MANCUSO J Y, et al. Clinical trial of an inhibitor of RAGE-A $\beta$  interactions in Alzheimer disease [J]. *Neurology*, 2014, 82(17):1536-1542.  
 [14] KANEKIYO T, CIRRITO J R, LIU C C, et al. Neuronal clearance of amyloid- $\beta$  by endocytic receptor LRP1 [J]. *J Neurosci*, 2013, 33(49):19276-19283.  
 [15] 刘洋. 基于“毒损脑络”病机理论的阿尔茨海默病机制研究[D]. 北京:北京中医药大学, 2013.  
 [16] 周忠光,费洪新,张晓杰,等. “益肾调督”针灸对阿尔茨海默病小鼠海马 RAGE 和 NF- $\kappa$ Bp65 影响[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2016, 18(9):5-8.  
 [17] 胡华,李彩云,周德生,等. 复方丹参片对阿尔茨海默病模型小鼠 LRP-1/RAGE 表达的影响[J]. *中国中医药*

科技,2016,23(6):662-665.

- [18] 乔晋,王新阳,陆文慧,等. 海马 RAGE 和 BACE 异常表达与 SHR 认知功能损害相关性研究[J]. 陕西医学杂志,2016,45(7):788-791.

- [19] 么晓轶,李颖. 大鼠脑缺血再灌注后糖基化终产物及其受体 RAGE、分泌型 RAGE 的表达[J]. 神经解剖学,2013,29(4):399-404.

(收稿日期:2018-11-14;编辑:曹健)

## Effect of Moxibustion at Paired Acupoints of the Governor Vessel on Learning-Memory Ability and Expression of Receptor for Advanced Glycation End Products and LDL Receptor-Related Protein-1 in Rats with Vascular Dementia

WANG Jing-ji<sup>1</sup>, WU Sheng-bing<sup>2</sup>, WANG Kun<sup>2</sup>, YANG Chao<sup>3</sup>, CHENG Hong-liang<sup>1</sup>

(1. The Second Affiliated Hospital of Anhui University of Chinese Medicine, Anhui Hefei 230061, China; 2. Experimental Research Center, Anhui University of Chinese Medicine, Anhui Hefei 230038, China; 3. Graduate School of Anhui university of Chinese Medicine, Anhui Hefei 230012, China)

**[Abstract] Objective** To investigate the effect of moxibustion at paired acupoints of the governor vessel on the expression of receptor for advanced glycation end products (RAGE) and LDL receptor-related protein-1 (LRP-1) in brain microvascular endothelial cells (BMECs) in rats with vascular dementia, as well as the mechanism of moxibustion at paired acupoints of the governor vessel in the treatment of vascular dementia.

**Methods** After screening by the Morris water maze test, Sprague-Dawley rats were randomly divided into normal group, model group, and moxibustion group, with 12 rats in each group. A model of vascular dementia was established by common carotid artery ligation to induce recurrent ischemia/reperfusion. The rats in the moxibustion group were given mild-warm moxibustion at Baihui, Dazhui, and Fengfu acupoints for 30 minutes per day; each course of treatment was 7 days, and the rats were treated for 4 courses. The Morris water maze test was used for behavioral analysis, and immunohistochemistry was used to measure the expression of RAGE and LRP-1 in the cortex and the hippocampus. The correlation between behavioral test results and RAGE/LRP-1 was also analyzed. **Results** At each time point, the model group had a significantly longer escape latency than the normal group ( $P < 0.05$ ), and the moxibustion group had a significantly shorter escape latency than the model group ( $P < 0.05$ ); the model group had a significantly lower number of platform crossings than the normal group ( $P < 0.05$ ), and the moxibustion group had a significantly higher number of platform crossings than the model group ( $P < 0.05$ ). Compared with the normal group, the model group had a significant increase in the expression of RAGE and a significant reduction in the expression of LRP-1 in the cortex and the hippocampus ( $P < 0.05$ ); compared with the model group, the moxibustion group had a significant reduction in the expression of RAGE and a significant increase in the expression of LRP-1 in the cortex and the hippocampus ( $P < 0.05$ ). The number of platform crossings was negatively correlated with RAGE in the cortex and the hippocampus and was positively correlated with LRP-1 in the cortex and the hippocampus. **Conclusion** Moxibustion at paired acupoints of the governor vessel can significantly improve learning-memory ability in rats with vascular dementia, possibly by down-regulating the expression of RAGE and upregulating the expression of LRP-1 in BMECs.

**[Key words]** Moxibustion; Vascular dementia; Brain microvascular endothelial cell; Receptor for advanced glycation end products; LDL receptor-related protein-1