

doi:10.3969/j.issn.1674-4616.2020.06.006

• 实验研究 •

基于“肠脑轴”理论探讨针刺对帕金森病模型大鼠 脑内炎症反应的影响*

郑之俊 肖伟 梁发俊 章显宝 王震[△]

安徽中医药大学第二附属医院脑病六科,合肥 230061

摘要 目的 观察针刺对帕金森病模型大鼠黑质区肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、c-Jun 氨基端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)、 γ 干扰素(interferon- γ , IFN- γ)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)水平的影响,探讨针刺治疗帕金森病(Parkinson's disease, PD)的作用机制。**方法** 将 40 只雄性 SD 大鼠随机分为针刺组、模型组、假手术组、正常组,每组 10 只。针刺组和模型组大鼠经颈背部注射鱼藤酮,造模 14 d。假手术组大鼠予以相同剂量的二甲基亚砷(dimethyl sulfoxide, DMSO)和 0.9% NaCl 注射液的混合液。针刺组大鼠选取双侧“天枢”、双侧“上巨虚”及“大肠俞”进行针刺治疗,1 次/d,20 min/次,连续治疗 14 d。其余各组不进行治疗。比较各组大鼠黑质区酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase, TH)、TNF- α 、IFN- γ 、IL-1 β 和磷酸化的 JNK 蛋白(p-c-jun)表达情况。**结果** 与正常组、假手术组比较,模型组 TH 蛋白表达明显减少,p-c-jun、TNF- α 、IFN- γ 、IL-1 β 蛋白表达明显增加($P < 0.05$)。与模型组比较,针刺组 TH 蛋白表达明显增加,p-c-jun、TNF- α 、IFN- γ 、IL-1 β 蛋白表达明显减少($P < 0.05$)。**结论** 针刺可以下调 PD 模型大鼠黑质区 JNK 表达,降低炎症因子 TNF- α 、IFN- γ 、IL-1 β 水平,对 PD 有一定的调节作用。

关键词 针刺;帕金森病;肠脑轴;炎症反应

中图分类号 R245 **文献标识码** A

Study on the Effect of Acupuncture on Inflammatory Reaction in the Brain of Parkinson's Disease Model Rats Based on the Theory of "Gut-Brain Axis"

ZHENG Zhijun, XIAO Wei, LIANG Fajun, ZHANG Xianbao, WANG Zhen

Department of Encephalopathy, the Second Affiliated Hospital of Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230061, China

Abstract Objective To observe the effect of acupuncture on the levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), c-Jun N-terminal kinase(JNK), interferon- γ (IFN- γ), interleukin-1 β (IL-1 β) in substantia nigra of Parkinson's disease model rats, and to explore the mechanism of acupuncture in the treatment of Parkinson's disease(PD). **Methods** Forty male SD rats were randomly divided into acupuncture group, model group, sham operation group and normal group, with 10 rats in each group. The rats in the acupuncture group and model group were injected with rotenone into the back of neck for 14 days. The rats in the sham-operated group were given a mixture of the same dose of dimethyl sulfoxide(DMSO) and 0.9% NaCl injection. The rats in the acupuncture group were intervened with acupuncture at bilateral "Tianshu"(ST25), bilateral "Shangjuxu"(ST37) and "Dachangshu"(BL25), 20 min per treatment, once a day for consecutive 4 weeks, while the other groups were not treated. The expression of tyrosine hydroxylase(TH), TNF- α , IFN- γ , IL-1 β and phosphorylated JNK protein(p-c-jun) in substantia nigra of rats were

* 安徽中医药大学 2018 年度校级科研项目

[△] 通信作者, Corresponding author, E-mail: 1574985610@qq.com

compared in each group. **Results** Compared with the normal group and sham operation group, the expressions of TH protein in the model group were significantly decreased, and the expressions of p-c-jun, TNF- α , IFN- γ and IL-1 β protein were significantly increased ($P < 0.05$). Compared with the model group, the TH protein in the acupuncture group were significantly increased, and the expression of p-c-jun, TNF- α , IFN- γ and IL-1 β protein were significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** Acupuncture could downregulate the expression of JNK in substantia nigra of rats with PD, reduce the levels of the inflammatory factors TNF- α , IFN- γ and IL-1 β , which has a certain regulatory effect on PD.

Key words acupuncture; Parkinson's disease; gut-brain axis; inflammatory reaction

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是一种与衰老密切相关的中枢神经系统退行性疾病,导致该病的因素较多,如遗传因素、环境因素、线粒体功能障碍、氧化应激^[1]、兴奋性氨基酸作用等,具体发病机制尚未完全明了。其基本病理变化为黑质致密区多巴胺能神经元及其他含色素的神经元大量变性丢失、残留的神经细胞内嗜酸性包涵体即路易小体的形成,伴有纹状体多巴胺含量显著减少,主要表现为运动迟缓、静止性震颤、肌张力增高等^[2]。目前对于 PD 多首选药物治疗,也有以神经核毁损术为代表的症状性治疗,但均不能取得满意远期疗效。本课题组基于“肠脑轴”理论选取相应穴位针刺治疗 PD 模型大鼠,观察其对中脑黑质 TH 蛋白及相关炎症介质表达的影响,旨在探讨针刺对 PD 治疗作用及其相应作用机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级 SD 健康成年雄性大鼠 40 只,体重 220~300 g,由安徽医科大学实验动物中心提供,合格证号 SCXK(皖)2017-001,于安徽中医药大学新安医学重点实验室动物房喂养。将大鼠随机分为针刺组、模型组、假手术组、正常组,每组 10 只。

1.2 主要试剂与仪器

鱼藤酮(Sigma 公司)、DMSO(国药集团化学试剂有限公司)、10%水合氯醛(1 g 水合氯醛倒入 9 g 蒸馏水中配置)、兔抗鼠 TH 单克隆抗体(武汉博士德生物工程技术有限公司,BA1051)、HRP 标记羊抗兔二抗(武汉博士德生物工程技术有限公司,BA1054)、 β -actin 抗体(Zs-bio 公司,18AV0311)、ECL 底物液(Thermo 公司, SF249607)、丙烯酰胺(Amresco 公司,Exp201609)、甲叉双丙烯酰胺(Amresco 公司, Amresc00172)、RIPA 裂解液(Beyotime 公司,051018180717)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(碧云天生物技术有限公司, P0010)、PVDF 膜(Milipore 公司, R8CA8257E)、一次性无菌针灸

针(苏州医疗用品厂有限公司, 0.30 mm \times 13 mm)。

电泳仪(北京六一仪器厂, DYY-7C)、垂直电泳槽(北京六一仪器厂, DYCZ-24DN)、电转仪(北京六一仪器厂, DYCZ-40)。

1.3 造模方法

参照文献[3]采用鱼藤酮颈背部皮下注射法制备鱼藤酮帕金森病大鼠模型,模型组和针刺组大鼠皮下注射鱼藤酮溶液(1 mg/kg),假手术组皮下注射 1 mg/kg 0.9%氯化钠注射液和 DMSO 混合液(0.9%氯化钠注射液:DMSO=1:7),1 次/d,连续注射 14 d,正常组不进行特殊干预。

造模成功标准参照文献[4]进行判定:造模后大鼠出现典型的毛色变黄变脏,运动迟缓,弓背姿势,反应迟钝,并出现肌强直伴震颤,症状呈进行性加重等表现,即为造模成功。

1.4 干预方法

针刺组取穴为双侧“上巨虚”穴、双侧“天枢”穴及“大肠俞”穴,“上巨虚”取膝关节后外侧,在腓骨头下约 10 mm 处;“天枢”取大鼠的肚脐眼旁 5 mm 处;“大肠俞”取大鼠腰部第 4 腰椎棘突下旁开 5 mm。造模成功后,将大鼠四肢固定于自制鼠板上,固定器固定大鼠头部,在其清醒状态下,常规消毒针刺部位后,针刺组大鼠采用 0.3 mm \times 13 mm 一次性无菌针灸斜刺 3 mm。每日上午进行针刺治疗,20 min/次,1 次/d,7 d 为一个疗程,一个疗程结束后休息 1 d,共治疗 2 个疗程。其余各组大鼠自由进食及饮水,抓取、固定时间同针刺组。

1.5 检测指标及方法

各组大鼠均进行行为学爬杆实验^[5],准备一根长 60 cm、直径 3 cm 的圆柱形木杆,外缠医用胶布以保证足够摩擦力。各组实验大鼠安静环境适应 15 min 后,实验人员手持大鼠尾巴,将大鼠头朝下倒立放于木杆顶端,记录大鼠从木杆顶端爬至木杆杆底时间。大鼠不能抓紧木杆,直接掉落,记为 2.0 分;大鼠滑行后掉落,记为 1.5 分;大鼠于木杆上间歇停顿数次爬

至木杆杆底,尚可抱紧,记为 1 分;大鼠呈螺旋状一步一步向下爬行,兼有后肢滑行,记为 0.5 分;大鼠四肢并用,一次性从木杆顶端爬至木杆杆底,记为 0 分。

比较各组大鼠黑质区 TH、p-c-jun、TNF- α 、IFN- γ 、IL-1 β 蛋白表达,采用 Western blot 法进行检测。各组大鼠经相应处理结束后,用 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉,迅速断头处理,取出大脑,冰面上迅速分离黑质,于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。将脑组织放于预冷的玻璃匀浆器中,加入裂解液冰浴匀浆,匀浆液于 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下,15 000 r/min 离心 14 min 后吸取上清液。根据蛋白分子量配置成 12% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳;转膜,转膜条件为 IL-1 β 200 mA,50 min;TNF- α 、IFN- γ 200 mA,60 min;TH、p-c-Jun,200 mA,90 min;封闭,用封闭液稀释对应的一抗,将 PVDF 膜浸泡于一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 溶液中孵育过夜。IL-1 β 、p-c-Jun、TH 采用 1:200 的比例稀释,TNF- α 、IFN- γ 采用 1:800 的比例稀释;二抗,用封闭液稀释后,用相应的 HRP 标记二抗按 1:40 000 的比例稀释。将 PVDF 膜浸泡于稀释后的二抗孵育液中,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 的温度下摇床孵育 2 h;显色曝光,放置在 X 线胶片中压片,之后依次放入显影液和定影液中显影、定影。采用 Image J 软件对蛋白条带进行分析,以目标条带的吸光度值与 β -actin 条带吸光度值之比为 TH、p-c-Jun、TNF- α 、IFN- γ 、IL-1 β 蛋白的相对表达量。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 20.0 统计软件进行数据处理,计量资

料以均数士标准差($\bar{x} \pm s$)表示,先对各组实验结果行单因素方差分析,差异有统计学意义后,再以 SNK-q 检验进行两两比较;以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 行为学情况比较

针刺组、模型组大鼠在注射鱼藤酮后出现四肢肌张力增高、震颤,毛色干枯稀疏、变黄变脏及拒捕行为减弱等表现,并逐渐加重。正常组及假手术组大鼠饮食如常,喜活动,善打斗,皮毛光滑。

正常组和假手术组大鼠均能够一次性顺利、从木杆顶端爬到木杆底。模型组、针刺组大鼠在注射鱼藤酮 7 天后,表现为抱杆不稳,甚则坠落,14 天后更明显。针刺组大鼠治疗后 7 天后,虽然爬杆实验仍表现为抱杆不稳,但针刺组大鼠自发性活动增多,较治疗前改善;针刺治疗 14 天后,针刺组大鼠虽容易滑落,但能够抱杆,较前进一步改善。

2.2 大鼠黑质区蛋白相对表达量比较

与正常组及假手术组比较,模型组大鼠 TH 蛋白表达明显减少,p-c-jun、TNF- α 、IFN- γ 、IL-1 β 蛋白表达明显增加($P < 0.05$)。与模型组比较,针刺组大鼠 TH 蛋白表达明显增加,p-c-jun、TNF- α 、IFN- γ 、IL-1 β 蛋白表达明显减少($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 各组大鼠黑质区蛋白相对表达量比较($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	TH	p-c-jun	TNF- α	IFN- γ	IL-1 β
正常组	0.412 \pm 0.028	0.076 \pm 0.019	0.038 \pm 0.031	0.232 \pm 0.031	0.117 \pm 0.046
假手术组	0.437 \pm 0.030	0.088 \pm 0.0213	0.066 \pm 0.034	0.253 \pm 0.036	0.165 \pm 0.039
模型组	0.194 \pm 0.033 ^{*Δ}	0.132 \pm 0.363 ^{*Δ}	0.118 \pm 0.043 ^{*Δ}	0.436 \pm 0.0542 ^{*Δ}	0.451 \pm 0.078 ^{*Δ}
针刺组	0.235 \pm 0.031 [▲]	0.097 \pm 0.031 [▲]	0.077 \pm 0.035 [▲]	0.378 \pm 0.041 [▲]	0.369 \pm 0.048 [▲]

与正常组比较^{*} $P < 0.05$,与假手术组比较 ^{Δ} $P < 0.05$,与模型组比较[▲] $P < 0.05$

3 讨论

根据本病临床表现,可将其归类于“颤证”、“痉证”等范畴。《灵枢·经脉》记载“胃足阳明之脉,起于鼻之交頄中……循发际,至额颅”,《灵枢·动输》记载“胃气上注于肺……入络脑”,张仲景在《伤寒论》中多次提出阳明腑实证致神志变化;由此可见,胃肠与脑在经脉循行上密切相关,胃肠功能异常可导致神志疾病的发生。中医学认为,脑神与胃肠功能密切相关,这与现代医学中“肠脑轴”观念不谋而合^[6]。

“肠脑轴”为大脑与肠道之间功能整合的双向信息交流系统,涉及神经通路、免疫和内分泌机制^[7]。唐莉莉^[8]、马盈盈^[9]等基于“肠脑轴”学说采用相应中医药手段治疗 PD 患者,发现以肠道为靶点治疗 PD,可减轻患者临床症状,改善肠道菌群,调节血液中脑肠肽水平。因此,本研究选取针刺大肠经募穴天枢、大肠经下合穴上巨虚、大肠经背俞穴大肠俞治疗 PD 模型大鼠,旨在基于“肠脑轴”理论,通过改善胃肠功能来治疗神经系统疾病。

PD 的典型病理特征为黑质致密区多巴胺能神经

元及其他含色素的神经元大量变性丢失、残留的神经元胞质内出现嗜酸性包涵体。越来越多研究^[10-11]表明,神经炎症介导的神经毒性在 PD 的发生发展过程中发挥重要作用;通过降低炎症因子水平,可以对 PD 起到一定的治疗作用。有学者^[12-13]认为,p-c-Jun 是 JNK 信号通路的活性底物,与炎症反应关系密切,并与 PD 发病密切相关。TH 是多巴胺合成的限速酶,能够有效预防 PD 等神经退行性疾病的发生,TH 表达减少可导致多巴胺的损伤,从而导致 PD 的发生^[14]。

本研究结果发现,与正常组及假手术组比较,模型组大鼠 TH 蛋白表达明显减少,p-c-jun、TNF- α 、IFN- γ 、IL-1 β 蛋白表达明显增加;表明帕金森病大鼠造模成功后,大鼠黑质区 TH 蛋白表达上调,p-c-jun、TNF- α 、IFN- γ 、IL-1 β 蛋白表达下调。与模型组比较,针刺组大鼠 TH 蛋白表达明显增加,p-c-jun、TNF- α 、IFN- γ 、IL-1 β 蛋白表达明显减少;表明针刺治疗可能通过降低 p-c-jun 水平,减少炎症介质 TNF- α 、IFN- γ 、IL-1 β 的表达,增加帕金森大鼠黑质区 TH 蛋白含量,从而改善鱼藤酮对 PD 大鼠神经元造成的损伤。与王述菊等^[15]的研究结果相一致,表明针刺可能通过调节 PD 模型大鼠体内 MAPK/JNK 信号通路,降低 p-c-jun 在黑质区的表达,减少 PD 模型大鼠炎症因子 IFN- γ 、TNF- α 、IL-1 β 的表达,从而对 PD 的发生发展可起到一定的治疗作用。

综上所述,针刺可下调 PD 模型大鼠黑质区 JNK 表达,降低炎症因子 TNF- α 、IFN- γ 、IL-1 β 水平,对 PD 有一定的调节作用。

参 考 文 献

[1] Hald A,Lotharius J. Oxidative stress and inflammation in Parkinson's disease:is there a causal link? [J]. *Exp Neurol*,2005,193(2):279-290.
[2] 贾建平,陈生弟. 神经病学[M]. 8 版. 北京:人民卫生出版社,2018:328-329.

[3] 冯媛,梁直厚,王涛,等. 鱼藤酮帕金森病大鼠模型建立的研究[J]. *卒中与神经疾病*,2004,11(6):374-377.
[4] 常宇涛,罗晓光,任艳. 鱼藤酮损伤大鼠黑质致行为学及黑质多巴胺能神经元损伤[J]. *解剖科学进展*,2011,17(1):60-62.
[5] 田新红,徐玉英,郝莉. 丹参酮 II A 对帕金森病大鼠多巴胺能神经元的作用[J]. *解剖学杂志*,2018,41(3):303-306.
[6] 倪光夏,宋扬扬. 基于“脑肠轴”理论探讨“醒神调肠”针刺法治疗帕金森病[J]. *中国针灸*,2020,40(3):315-317.
[7] 何屹,余刚,郑鹏,等. 肠脑轴与帕金森病发病机制研究进展[J]. *中国全科医学*,2018,21(9):1020-1023.
[8] 唐莉莉. 基于脑肠轴理论探讨温肾养肝方调节肠道菌群治疗帕金森病的临床观察和实验研究[D]. 南京:南京中医药大学,2020.
[9] 马盈盈. 基于“脑肠轴”学说的养阴润肠法治疗肝肾阴虚型帕金森病的疗效研究[D]. 合肥:安徽中医药大学,2018.
[10] 肖潇雨,裴媛. 独活香豆素对 Lactacystin 诱导的帕金森病模型细胞炎症因子 IL-1 β 、TNF- α 的影响[J]. *时珍国医国药*,2019,30(9):2108-2111.
[11] 庄文欣,陈超,马一闻,等. 香椿子多酚通过抑制 p38 MAPK 信号通路减轻帕金森病大鼠的神经炎症反应[J]. *细胞与分子免疫学杂志*,2019,35(9):794-799.
[12] Wang W, Ma C, Mao Z, et al. JNK inhibition as a potential strategy in treating Parkinson's disease [J]. *Drug News Perspect*,2004,17(10):646-654.
[13] Huang Q, Du X, He X, et al. JNK-mediated activation of ATF2 contributes to dopaminergic neurodegeneration in the MPTP mouse model of Parkinson's disease [J]. *Exp Neurol*,2016,277(1):296-304.
[14] 张智敏,白洁. 酪胺酸羟化酶和帕金森病相关研究进展 [J]. *中国老年学杂志*,2016,36(9):2280-2282.
[15] 王述菊,马骏,王彦春,等. 电针对帕金森病模型大鼠黑质区 c-Jun 氨基末端激酶和 TNF- α 、IFN- γ 、IL-1 β 蛋白表达的影响[J]. *中华中医药学刊*,2017,35(1):43-46.

(收稿日期:2020-09-30)