

# 电针对 SAMP8 小鼠海马 NCAM 和 NF-κB 表达的影响

卢圣锋 唐勇 尹海燕 郭玲玲 彭晓华 余曙光

**【摘要】** 目的 研究电针对阿尔茨海默病(AD)模型小鼠海马神经细胞黏附分子(NCAM)和核转录因子 κB(NF-κB)的影响,从神经细胞黏附角度探讨电针治疗 AD 的作用机制。 方法 快速老化模型小鼠(SAMP8)24 只采用随机数字表法分为模型组、模型+针刺组(简称模针组),每组 12 只;抗快速老化模型小鼠(SAMR1)12 只为空白组,每日一次电针模针组小鼠“百会”、“涌泉”穴,连续治疗 21 d。应用免疫组织化学染色、原位杂交方法检测各组小鼠海马组织 NCAM、NF-κB 蛋白及 mRNA 的表达。 结果 与模型组比较,模针组小鼠 NCAM (0.231±0.007)、NF-κB 蛋白 (0.367±0.012)及 mRNA(0.528±0.016,0.308±0.001)阳性表达明显增强,差异有统计学意义(P<0.05)。 结论 电针可通过提高 NF-κB 的表达,诱导 NCAM 的合成,促进神经细胞黏附。

**【关键词】** 电针; 阿尔茨海默病; 海马; 神经细胞黏附分子; 核转录因子 κB

**【中图分类号】** R749.16 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-8925(2009)03-0266-04

## Effect of electro-acupuncture on the expression of NCAM and NF-κB in SAMP8 mouse hippocampus

LU Sheng-feng, TANG Yong, YIN Hai-yan, GUO Ling-ling, PENG Xiao-hua, YU Shu-guang. College of Acupuncture and Tuina, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China

Corresponding author: YU Shu-guang, Email: ysg2858@yahoo.com.cn

**【Abstract】 Objective** To investigate the effect of electro-acupuncture (EA) therapy on the synaptic plasticity of hippocampal neurons in senescence-accelerated mouse (SAMP8) by examining the changes in neural cell adhesion molecule (NCAM) and nuclear factor-κB (NF-κB) expression, and explore the mechanism behind the therapeutic effect of EA on Alzheimer’s disease (AD) in view of neural cell adhesion. **Methods** Twenty-four SAMP8 mice as the animal model of AD were randomized equally into the model group and EA treatment group, with 12 senescence-accelerated resistant mice (SAMR1) mice as the blank control group. EA on Baihui (Du20) and Yongquan (Kid1) was administered once daily for 21 consecutive days in mice in the EA group. The expressions of NCAM and NF-κB mRNA and proteins in the hippocampal neurons were detected by immunohistochemistry and in situ hybridization. **Results** Compared with the model group, the mice in EA group showed significantly increased expression of NCAM and NF-κB mRNA and proteins (P<0.05). **Conclusion** EA can increase the expression of NCAM and NF-κB in mouse hippocampal neurons. EA can promote the cell adhesion and synapse plasticity of the neurons possibly by upregulating NF-κB expression to induce increased NCAM production.

**【Key words】** Electro-acupuncture therapy; Alzheimers’ disease; Hippocampus; Neural cell adhesion molecule; Nuclear factor kappa B

DOI:10.3760/cma.j.issn.1671-8925.2009.03.015

基金项目:国家自然科学基金(30472235,90709032);四川省教育厅资助项目(2003C008)

作者单位:610075 成都,成都中医药大学针灸推拿学院(卢圣锋、唐勇、尹海燕、彭晓华、余曙光);255000 山东省淄博市中心医院腰腿疼科(郭玲玲)

通信作者:余曙光,Email: ysg2858@yahoo.com.cn

研究表明,电针对老年痴呆模型鼠学习记忆的影响可能是通过促进海马神经元突触可塑性发挥来实现的<sup>[1]</sup>。而神经细胞黏附分子(neural cell adhesion molecule, NCAM)、核转录因子 κB(nuclear factor Kappa B, NF-κB)与突触可塑性及学习记忆关系密切。本研究拟观察电针对老年痴呆模型小鼠海马 NCAM、NF-κB 及 mRNA 表达的影响,以期探讨电

针影响海马神经元突触可塑性发挥从而改善老年痴呆模型学习记忆能力的机制。

## 材料与方 法

### 一、动物与分组

快速老化模型小鼠 (SAMP8)24 只, 雄性, 8 月龄, 体质量(20±2) g; 抗快速老化模型小鼠(SAMR1) 12 只, 雄性, 8 月龄, 体质量(20±2) g, 均由天津中医药大学第一附属医院老年脑病研究室动物中心提供, 合格证号:W-J 津实动质 M 准字第 006 号。小鼠在实验前适应性驯养 1 周后, 将 SAMP8 小鼠采用随机数字表法分为模型组、模型+针刺组(简称模针组), 每组 12 只; SAMR1 小鼠 12 只作为空白组。每组 6 只用于 NCAM 蛋白及 mRNA 监测, 6 只用于 NF-κB 蛋白及 mRNA 监测。

### 二、主要仪器与试剂

G6805-1 型电针仪 (青岛鑫升实业有限公司)、BX50 光学显微镜 (日本 Olympus 公司)、Leica 图像分析系统、兔抗鼠 NCAM 多克隆抗体 (美国 Chemicon 公司)、兔抗鼠 NF-κB 多克隆抗体 (美国 Neomarker 公司)、NCAM 和 NF-κB mRNA 原位杂交试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司)。

### 三、治疗方法

选取模针组小鼠“百会”、“涌泉”(参照中国针灸学会实验针灸分会制定的《动物针灸穴位图谱》)两穴, “百会”向前斜刺 3~5 mm, ; “涌泉”直刺 2~3 mm, 双侧交替进行。进针后, 不进行手法刺激, 连接 G6805 电针仪, 施以疏密波, 频率 2~100 Hz, 电压 2~4 V, 强度逐渐加大到小鼠下肢轻微抖动为度, 留针 20 min, 每日 1 次, 7 d 为一疗程, 每一疗程间隔 1 d, 共 3 个疗程, 计 21 d。模型组、空白组不施针, 每天以同样的方式、时间和程度进行抓取、固定。

### 四、检测指标

电针治疗结束后 5 d, 小鼠麻醉、开胸、灌注后, 取海马组织, 固定、脱水、石蜡包埋、切片, 进行免疫组化染色和原位杂交法检测 NCAM、NF-κB 蛋白及 mRNA 表达。具体操作参照试剂盒说明书进行。采用 Leica 图像分析系统对染色结果进行分析。

### 五、统计学分析

数据用均数±标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示, 运用 SPSS12.0 统计软件处理, 组间比较数据方差齐时进行单因素方差分析(one way ANOVA), 方差不齐时用 Games Howell 分析,  $P\leq 0.05$  示差异有统计学意义。

## 结 果

一、各组小鼠海马组织中 NCAM 蛋白及其 mRNA 的表达

具体结果见表 1, 3 组小鼠海马组织中 NCAM 及其 mRNA 的表达不同, 差异有统计学意义 ( $P<0.05$ )。模针组 NCAM 蛋白表达明显高于模型组, 差异有统计学意义( $P<0.05$ ), 与空白组比较差异无统计学意义( $P>0.05$ ); 模针组 NCAM mRNA 表达亦高于模型组, 但仍低于空白组, 差异均有统计学意义 ( $P<0.05$ )。

表 1 各组小鼠海马区 NCAM 蛋白及其 mRNA 表达比较( $\bar{x}\pm s$ )

Tab.1 The expression of NCAM and NCAM mRNA in each group(Mean±SD)

组别	例数	NCAM	NCAM mRNA
空白组	6	0.235±0.006 <sup>b</sup>	0.468±0.015
模型组	6	0.138±0.005	0.383±0.017 <sup>a</sup>
模针组	6	0.231±0.007 <sup>b</sup>	0.528±0.016 <sup>ab</sup>
F值		81.709	20.862
P值		0.000	0.000

与空白组比较, <sup>a</sup> $P<0.05$ ; 与模型组比较, <sup>b</sup> $P<0.05$

二、各组小鼠海马组织中 NF-κB 蛋白及其 mRNA 的表达

具体结果见表 2, 3 组小鼠海马组织中 NF-κB 蛋白及其 mRNA 的表达不同, 差异有统计学意义 ( $P<0.05$ )。模型组 NF-κB 蛋白、NF-κB mRNA 表达明显低于空白组和模针组, 差异有统计学意义 ( $P<0.05$ ), 模针组与空白组比较差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。

表 2 各组小鼠海马区 NF-κB 蛋白及其 mRNA 表达比较

Tab.2 The expression of NF-κB and NF-κB mRNA in each group(Mean±SD)

组别	例数	NF-κB	NF-κB mRNA
空白组	6	0.410±0.014 <sup>a</sup>	0.315±0.013 <sup>a</sup>
模型组	6	0.310±0.011	0.213±0.013
模针组	6	0.367±0.012 <sup>a</sup>	0.308±0.001 <sup>a</sup>
F值		16.014	27.036
P值		0.000	0.000

与模型组比较, <sup>a</sup> $P<0.05$

## 讨 论

快速老化模型小鼠是以发育成熟后快速老化为特征的小鼠模型, 包括快速老化的 P 系(SAMP)和抗快速老化的 R 系(SAMR)两大系。其中 SAMP8 是以

中枢学习记忆功能随增龄进行性快速衰退为特征的一种痴呆快速自然发病的老年模型,表现出明显的学习记忆功能减退<sup>[2]</sup>。而 SAMR1 是抗快速老化小鼠,常作为空白组与 SAMP8 进行比较<sup>[3]</sup>。本课题组在神经可塑性研究中先后使用了损伤的阿尔茨海默病(AD)模型<sup>[4,5]</sup>、D-半乳糖腹腔注射和 A $\beta_{1-40}$  海马注射联合诱导 AD 模型<sup>[6]</sup>,其结果和本实验同期结果一致<sup>[7]</sup>,都证明了电针能够有效的改善学习记忆功能。但与此次使用的 SAMP8 模型相比,其造模复杂、致死率高、时间周期长,且模型成功率不够稳定。

NCAM 广泛分布于神经系统,主要由神经元表达,能调节神经细胞间相互作用,介导细胞的粘附和识别,并可能促进突触的形成,在正常神经元轴突的生长、神经纤维的成束、突触的塑型等过程中起重要作用。国外研究发现,水迷宫训练 24 h 后,NCAM 和 PSA-NCAM 在海马区突触表达增加<sup>[8]</sup>,提示 NCAM 作为学习调节分子参与了海马重塑、空间记忆形成的关键过程。国内研究也显示,行为训练促进大鼠空间学习记忆能力恢复的作用机制可能与海马 NCAM 的增多相关<sup>[9,10]</sup>。因而,在突触可塑性中,NCAM 起了非常重要的调节作用,参与了学习记忆过程中海马突触可塑性变化,是突触可塑性的一个标志<sup>[9]</sup>。其参与可塑性主要有两个机制:其一,NCAM 通过介导细胞骨架动力改变,从而参与活动依赖的突触重建;其二,对胞内信号系统的影响,即胞内信号的改变可反馈到突触后膜,通过 NCAM 调控细胞与细胞的粘附,以迅速地改变突触的结构和交通。本实验显示,模针组 NCAM 蛋白及 mRNA 的阳性信号表达较模型组差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。同期 Morris 水迷宫研究显示电针治疗在改善 SAMP8 学习记忆能力的同时,还能增强其海马区 NCAM 表达<sup>[7]</sup>。NCAM 在记忆形成和巩固中有着重要作用,NCAM 可以改变突触前后膜的间距及突触前后膜互相对应面积的大小,从而影响到突触间隙中谷氨酸的浓度及突触后膜谷氨酸受体的密度、间隔和组分;而其唾液酸化可诱导神经细胞的生长和收缩,从而决定突触的形成和丢失<sup>[11]</sup>。

NF- $\kappa$ B 在正常情况下和其抑制酶 I $\kappa$ B 是以一种复合物的形式无活性的静息于细胞质中,其激活在很大程度上是由它的特异性抑制蛋白 I $\kappa$ B 调节的,在 I $\kappa$ B 激酶(I $\kappa$ K)作用下,I $\kappa$ B 氨基末端丝氨酸或酪氨酸残基被磷酸化,导致 I $\kappa$ B 蛋白降解,使 NF- $\kappa$ B 迅速从复合物中游离出来,移位到细胞核与相应的位点结合,激活靶基因,调控靶基因转录<sup>[12-14]</sup>。一般这些基因都是在细胞损伤和神经可塑性方面起

重要作用。

NF- $\kappa$ B 位于突触末端,距离神经元胞体相对较远,但神经元胞体受到损伤时突触内的 NF- $\kappa$ B 亦能被激活,证明 NF- $\kappa$ B 具有调节突触功能以及保护神经元的功能。实验研究表明,在突触信号的传导和转录调节机制中,NF- $\kappa$ B 对于长时程可塑性是必需的<sup>[13,15,16]</sup>,缺乏 NF- $\kappa$ B 的模型显示海马基底突触传递受损,同时长时程可塑性的晚期时相受抑制。本实验采用免疫组织化学染色及原位杂交方法对海马组织切片 NF- $\kappa$ B 蛋白、mRNA 的表达进行检测、分析,结果都显示模针组较模型组表达增强。NF- $\kappa$ B 作为一个核转录因子,其活性程度可能直接影响到新蛋白的合成,有研究报道其能调控 NCAM 的表达,同时其在记忆的存储过程也是必需的<sup>[17]</sup>。

一氧化氮(NO)能激活 NF- $\kappa$ B,同时能提高神经元 NCAM mRNA 和 NCAM 蛋白的表达水平<sup>[17]</sup>。NCAM 和 NF- $\kappa$ B 都可存在于突触后密度区,使突触和胞核之间的直接交通成为可能,NF- $\kappa$ B 被激活后,从胞质内异位于细胞核内,作用 NCAM 的基因调控区,进而诱导 NCAM 的高度表达,进而影响突触的形态及其功能变化<sup>[14,17]</sup>。另有报道 NCAM 的表达也能激活 NF- $\kappa$ B 的活性<sup>[18]</sup>。另外,笔者在前期的研究也显示电针能增加老年痴呆模型鼠海马神经元的突触数密度、面密度<sup>[1]</sup>,促使海马内 NO 高表达<sup>[5]</sup>。

总结本次实验,同时结合他人研究成果<sup>[19,20]</sup>,笔者推测:针灸通过促进海马神经元突触可塑性的发挥,促进老年痴呆等神经变性疾病的神经康复的机制是通过激活海马区 NO 合酶(nNOS),合成 NO,从而激活上调 NF- $\kappa$ B 的表达,诱导 NCAM 的合成与表达,促进海马神经细胞粘附,促进神经元突触形态可塑性的发挥,加强神经元间的连接,增强学习记忆信息的传递,最终提高 AD 模型学习记忆能力。

## 参 考 文 献

- [1] 余曙光,罗松,韩婷,等.电针对老年痴呆大鼠海马神经元突触可塑性的影响研究[J].中华神经医学杂志,2006,5(4):369-371.
- [2] 罗焕敏,翁文.老年痴呆动物模的制作与选择[J].中华老年多器官疾病杂志,2007,6(1):12-16.
- [3] 张月峰,于建春,李谈,等.“益气调血,扶本培元”针法对快速老化小鼠 SAMP8 海马和颞叶皮质神经元数量及形态的影响[J].上海针灸杂志,2005,24(9):40-43.
- [4] 刘雨星,梁繁荣,余曙光,等.电针对穹隆—海马伞损伤老年痴呆大鼠学习记忆行为影响的实验研究[J].中国康复医学杂志,2004,19(3):188-190.
- [5] 余曙光,刘雨星,唐勇,等.电针提高老年痴呆大鼠学习记忆能力的 NO-cGMP 信号通路机制[J].中国老年学杂志,2004,24(7):626-628.



- [6] 曾芳, 赵纪岚, 周奇志, 等. 电针对老年性痴呆模型大鼠海马线粒体酶活性的影响[J]. 中国老年学杂志, 2006, 26(1): 68-70.
- [7] 彭静, 曾芳, 何宇恒, 等. 电针对 SAMP8 小鼠海马线粒体作用的研究[J]. 针刺研究, 2007, 32(6): 364-367.
- [8] Venero C, Herrero AI, Touyarot K, et al. Hippocampal up-regulation of NCAM expression and polysialylation plays a key role on spatial memory[J]. Eur J Neurosci, 2006, 23(6): 1585-1595.
- [9] 杨华, 李玲, 潘惠娟. 行为训练对双侧海马梗死大鼠学习记忆与 NCAM 的影响 [J]. 中华神经外科疾病研究杂志, 2006, 5 (2): 135-138.
- [10] 邵欣, 曾芳, 余曙光. 神经细胞粘附分子与老年痴呆突触可塑性研究进展[J]. 四川生理科学杂志, 2006, 28(3): 118-122.
- [11] 胡前胜, 董胜璋, 陈学敏. 神经细胞粘附分子与学习记忆[J]. 卫生毒理学杂志, 2003, 17(2): 119-121.
- [12] O Mabony A, Raber J, Montano M. NF-kappa B/Rel regulates inhibitory and excitatory neuronal function and synaptic plasticity [J]. Mol Cell Biol, 2006, 26(19): 7283-7298.
- [13] Sylvie Memet. NF-κB functions in the nervous system: From development to disease[J]. biochemical pharmacology, 2006, 72: 1180-1195.
- [14] Matthew SH, Sankar G. Shared Principles in NF-κB Signaling[J]. Cell, 2008, 132: 344-362.
- [15] Kaltschmidt B, Widera D, Kaltschmidt C. Signaling via NF-kappa B in the nervous system[J]. Biochim Biophys Acta, 2005, 1745(5): 287-299.
- [16] Meffert MK, Baltimore D. Physiological functions for brain NF-kappaB[J]. Trends Neurosci, 2005, 28(1): 37-43.
- [17] Mariano B, Ramiro F, Mariano B, et al. Activation of Hippocampal Nuclear Factor-kB by Retrieval Is Required for Memory Reconsolidation[J]. The Journal of Neuroscience, 2007, 27(49): 13436-13445.
- [18] Dorte KD, Gro KP, Vladimir B, et al. NCAM-Induced Intracellular Signaling Revisited[J]. J Neurosci Res, 2008, 86: 727-743.
- [19] Markram K, Gerardy-schahn R, Sandi C, et al. Selective learning and memory impairments in mice deficient for polysialylated NCAM in adulthood[J]. Neuroscience, 2007, 144: 788-796.
- [20] Benfenati F. Synaptic plasticity and the neurobiology of learning and memory[J]. Acta Biomed, 2007, 78(suppl 1): 58-66.

(收稿日期: 2008-10-15)

(本文编辑: 王志娟)

(上接 261 页)

缓解, 这也进一步验证了本实验中选用 30 μmol/L 和 100 μmol/L KA 观察姜黄素的作用比较合适。

在钴染色实验中发现, 15 μmol/L 姜黄素预孵育可以使 30 μmol/L 和 100 μmol/L KA 刺激下的海马神经元中钴染色阳性细胞比例明显下降, 表明钙通透的 AMPA/KA 受体表达受到抑制, 这和钙成像的实验结果相符合。

本实验初步表明, 姜黄素对大鼠海马神经元钙通透的 AMPA/KA 受体具有调控作用, 影响海马神经元兴奋性调节, 这很可能是姜黄素抗癫痫作用新的直接证据。值得深入思考的是姜黄素调控钙通透的 AMPA/KA 受体, 缓解 KA 导致的细胞内钙浓度升高的同时也发挥了神经元保护作用, 这可以在一定程度解释姜黄素抑制痫性发作的作用。

## 参 考 文 献

- [1] Shin HJ, Lee JY, Son E, et al. Curcumin attenuates the kainic acid-induced hippocampal cell death in the mice[J]. Neurosci Lett, 2007, 416(1): 49-54.
- [2] Sumanont Y, Murakami Y, Tohda M, et al. Prevention of kainic acid-induced changes in nitric oxide level and neuronal cell damage in the rat hippocampus by manganese complexes of curcumin and diacetylcurcumin [J]. Life Sci, 2006, 78 (16): 1884-1891.
- [3] Sng JC, Taniura H, Yoneda Y. Histone modifications in kainate-induced status epilepticus[J]. Eur J Neurosci, 2006, 23(5): 1269-1282.
- [4] Malva JO, Vieira AP, Ambrósio CF, et al. Cobalt staining of hippocampal neurons mediated by non-desensitizing activation of AMPA but not kainate receptors[J]. NeuroReport, 2003, 14(6): 847-850.
- [5] Matteucci A, Frank C, Domenici MR, et al. Curcumin treatment protects rat retinal neurons against excitotoxicity: effect on N-methyl-D: -aspartate-induced intracellular Ca(2+) increase[J]. Exp Brain Res, 2005, 167(4): 641-648.

(收稿日期: 2008-08-08)

(本文编辑: 刘凯)