

· 基础研究 ·

穴位埋线对复合衰老过程大鼠海马 ATP、ROS 及自噬蛋白的影响

周美玲¹ 张宏¹ 袁玉梅² 覃文洛¹ 林浩嘉¹ 胡晓婷¹ 陈琦¹ 赵文亮¹ 李依媚¹

摘要 目的 观察慢性应激促衰作用,探讨穴位埋线的抗衰老和神经保护机制。**方法** 将 8 周龄 SD 雄性大鼠按体重随机分为对照组、模型一组、模型二组、穴位埋线组、假埋线组,每组 6 只。对照组腹腔注射生理盐水[5 mL/(kg·d)],模型一组腹腔注射 D-半乳糖[150 mg/(kg·d)],模型二组、穴位埋线组、假埋线组在腹腔注射 D-半乳糖的基础上加慢性应激,穴位埋线组给予百会、足三里、合谷、太冲穴位埋线,假埋线组给予假埋线,共处理 8 周。观察大鼠日常饮食活动等一般状态,采用 β -半乳糖苷酶染色法观察海马神经元老化情况,Nissl 染色观察海马组织病理结构,三磷酸腺苷(ATP)染色检测海马 ATP 产生量,活性氧物质(ROS)染色测定海马 ROS 含量,Western Blot 检测海马组织蛋白 p62、LC3 II/LC3 I 表达。**结果** 与对照组比较,模型组海马区神经元衰老严重,细胞萎缩明显,尤以齿状核海马齿状核(DG)区显著,ATP、ROS 表达降低($P < 0.01$, $P < 0.05$),p62、LC3 II/LC3 I 表达升高($P < 0.01$),其中模型二组较模型一组细胞萎缩更严重。与模型二组比较,穴位埋线组海马老化改善,DG 区细胞形态规则,核质分离,尚可辨认胞膜结构。与两个模型组比较,穴位埋线组 ROS 表达升高($P < 0.01$),p62、LC3 II/LC3 I 表达降低($P < 0.01$)。与穴位埋线组比较,假埋线组 ROS 蛋白表达降低($P < 0.01$),LC3 II/LC3 I 表达升高($P < 0.01$)。**结论** 慢性应激可促进衰老进程,穴位埋线可通过增加 ATP 生成,轻度提升 ROS,促进自噬小体降解等机制来延缓衰老,发挥神经保护作用。

关键词 衰老; 应激; 穴位埋线; 三磷酸腺苷; 活性氧物质; 自噬

Effect of Catgut Embedding at Acupoints on ATP, ROS and Autophagy Protein in Hippocampus of Aging Rats

ZHOU Mei-ling¹, ZHANG Hong¹, YUAN Yu-mei², QIN Wen-luo¹, LIN Hao-jia¹, HU Xiao-ting¹, CHEN Qi¹, ZHAO Wen-liang¹, and LI Yi-mei¹ ¹ Clinical Medical College of Acupuncture and Rehabilitation, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou (510405); ² Rehabilitation Department, Shenzhen Bao'an TCM Hospital Group, Guangdong(518133)

ABSTRACT Objective To observe the effects of chronic stress on senility, and to explore the anti-aging and neuroprotective mechanism of catgut embedding at acupoints. **Methods** Eight-week-old male SD rats were randomly divided into 5 groups according to body weight, i.e., the control group, model group 1, model group 2, acupoint catgut embedding group and sham catgut embedding group, 6 rats in each group. The animals in the control group were injected intraperitoneally with normal saline (5 mL · kg⁻¹ · d⁻¹). The model group 1 was given intraperitoneal injection of D-galactose (150 mg · kg⁻¹ · d⁻¹). The model group 2, acupoint catgut embedding group and sham catgut embedding group were treated with chronic stress on the basis of D-galactose injection, and the acupoint catgut embedding group was given acupoint catgut embedding at Baihui (GV 20), Zusanli (ST 36), Hegu (LI 4) and Taichong (LR 3). The rats in sham catgut embedding group was treated with sham catgut embedding, all rats were treated for 8 weeks. The general state of dietary activity in rats was observed, beta-galactosidase staining was used to observe aging of hippocampal neurons, Nissl staining was used to observe the pathological struc-

基金项目:广东省高水平大学建设项目(No. AFD018161Z0204)

作者单位:1. 广州中医药大学针灸康复临床医学院(广州 510405); 2. 深圳市宝安中医院(集团)康复科(广东 518133)

通讯作者:张宏, Tel: 020-36588233, E-mail: zhanghong@gzucm.edu.cn

DOI: 10.7661/j.cjim.20190709.023

ture of hippocampus, adenosine triphosphate (ATP) staining was used to detect the production of ATP, reactive oxygen species (ROS) staining was used to determine the content of ROS in hippocampus, and Western Blot was used to detect the expression of p62 and LC3 II/LC3 I in hippocampus. **Results** Compared with the control group, hippocampal neurons in the model group aged severely and atrophied significantly, especially in the dentate gyrus (DG) area of the dentate nucleus, the expressions of ATP and ROS decreased ($P < 0.01$, $P < 0.05$), expressions of p62 and LC3 II/LC3 I increased ($P < 0.01$), cell atrophy and aging in model group 2 were more severe than in model group 1. Compared with the model group 2, neurons in hippocampus DG area of the acupoint catgut embedding group manifested as less aging, regular morphology, nuclear-cytoplasmic separation, and identifiable membrane structure. Compared with the model groups, ROS expression was increased ($P < 0.01$), p65 and LC3 II/LC3 I were decreased in the acupoint catgut embedding group ($P < 0.01$). Compared with the acupoint catgut embedding group, expression of ROS was decreased ($P < 0.01$), LC3 II/LC3 I was increased in the sham catgut embedding group ($P < 0.01$). **Conclusion** Chronic stress can promote the aging process, acupoint catgut embedding can delay aging and play a neuroprotective role by increasing ATP production, slightly increasing reactive oxygen species, promoting autophagy body degradation.

KEYWORDS aging; stress; acupoint catgut embed; ATP; ROS; autophagy

中国人口老龄化近年有日益增长趋势,衰老及相关疾病如阿尔兹海默病^[1]、帕金森病^[2]、神经退行性疾病^[3]研究也成为热点。衰老是一种亚临床病理过程,表现为器官组织细胞功能、适应能力和抵抗能力减退。神经元作为耗氧量大的细胞,对衰老过程中的代谢变化尤其敏感,既往研究发现衰老过程有进行性神经元丢失、蛋白堆积^[2]等表现。针灸对防老保健有一定疗效^[4,5],但其具体作用机制尚未明确,因此设计相关实验,以探讨针灸埋线对衰老的干预作用。

材料与方 法

1 实验动物 SPF 级雄性 SD 大鼠,8 周龄,体重 180~220 g,购于广州中医药大学实验动物中心,许可证号:SCXK(粤)2013-0001,动物编号 No.44005800006732。动物饲养房间温度 22~24℃,每 12 h 昼夜交替(开灯 7:00am,熄灯 7:00pm),保持自由饮食和饮水,实验在广州中医药大学临床药理所完成。本实验操作过程严格遵照动物伦理标准和国际惯例,照顾动物福利,并已通过广州中医药大学动物实验伦理委员会的伦理审查(No.20181113040)。

2 主要仪器及试剂 冰冻切片机,型号:Cryotome E,美国 Thermo 公司;正置显微镜,型号:Nikon Eclipse CI,日本 Nikon 公司;成像系统,型号:Nikon DS-U3,日本 Nikon 公司;荧光显微镜,型号:Nikon Eclipse TiU,日本 Nikon 公司。DHE 染液(美国 Sigma 公司,批号:D7008);DAB 显色剂(丹麦 DAKO 公司,批号:K5007);尼氏(Nissl)染色液(上海碧云天

公司,批号:C0117);细胞衰老 β -半乳糖苷酶染色试剂盒(上海碧云天公司,批号:C0602);化学发光 HRP 底物(美国 Millipore 公司,批号:WBKLS0500);BCA 蛋白定量试剂盒(武汉谷歌生物公司,批号:G2026);兔抗 GAPDH 抗体(北京博奥森公司,批号:bs-2188R);兔抗 LC3B 抗体(英国 Abcam 公司,批号:ab192890,使用浓度 1:2 000);兔抗 p62 抗体(英国 Abcam 公司,批号:ab109012,使用浓度 1:10 000);山羊抗兔 IgG (HRP,英国 Abcam 公司,批号:ab205718,使用浓度 1:10 000);D-半乳糖(美国 Sigma 公司,批号:G5388);可吸收外科缝线 3-0 铬制:上海浦东金环医疗用品有限公司;三磷酸腺苷二钠盐,武汉谷歌生物公司。

3 动物分组、模型制备及干预方法 按照体重从大到小排序,采用 SPSS 17.0 软件分组,将动物随机分为 5 组:对照组,模型一组(D-半乳糖腹腔注射组),模型二组(D-半乳糖腹腔注射+慢性应激组),穴位埋线组,假埋线组,每组 6 只。自由饮食饮水适应性喂养 1 周后开始造模,对照组给予 8 周生理盐水腹腔注射 [5 mL/(kg·d)];模型一组给予 8 周腹腔注射 D-半乳糖 [150 mg/(kg·d)];模型二组在 D-半乳糖注射基础上,于第 3 周给予慢性应激,共应激 6 周;穴位埋线组照模型二组的处理的同时,于第 1 周开始穴位埋线,每周 1 次,共埋线 8 周。假埋线组在模型二组基础上给予每周 1 次假埋线,共假埋线 8 周。

于造模第 3 周开始给予慢性应激,具体方法参照 Willner P 等^[6-9]方法并加以改进,包括冰泳(4℃,5 min)、噪音刺激 10 h、禁食 24 h、禁水 24 h、陌生气

味 24 h、束缚 1~1.5 h、潮湿 17 h(每笼倒入 200 mL 清水,使垫料湿透)、倾斜 12 h、昼夜颠倒 24 h(白天避光、夜间光照)、持续光照 36 h、空水瓶放置(禁水后)等。每天随机安排 1~2 种刺激,同一种刺激不能连续 2 天出现,共应激 6 周。

穴位定位参照《实验针灸学》^[10],选取合谷(双)、太冲(双)、百会、足三里(双)作为埋线处方,合谷(双)、太冲(双)一组,百会、足三里(双)为另一组,两组交替埋线,每周 1 次,共埋线 8 次。穴位埋线和假埋线的具体操作方法参照参考文献[11],大鼠清醒状态下,将大鼠固定在固定器上并暴露埋线部位,将可吸收外科缝合线 3-0 铬制剪成约 0.5 cm 数小段,用镊子传入 6 号注射针中,留一半长度于针头外。于穴位部位给予消毒后,将装有缝合线的针头刺入穴位,待手下有空虚感即可出针,缝合线留在穴位即提示操作成功。假埋线组针头内不放置缝合线,其余操作与埋线组相同。

4 检测指标及方法 干预结束后以水合氯醛腹腔注射麻醉后取材,其中每组随机取 3 只大鼠灌注生理盐水、多聚甲醛,取全脑,切片切至海马位置,每个脑组织取 3 张切片,厚度为 20 μm ,予 Nissl 染色;另 3 只大鼠麻醉脱颈后立即取脑,每只脑平均分成两半,左侧脑立即放入液氮里冻存,检测时每只脑切至海马取 9 张切片,厚度为 20 μm ,其中 3 张行 β -半乳糖苷酶染色,3 张行 ATP 染色,余 3 张行 ROS 染色;右侧脑组织分离出海马组织,置于液氮-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存以备后期行 Western Blot 检测。以下各组组化、荧光染色及蛋白免疫印记实验中所有检测至少取 3 只动物组织,且每只动物海马至少取 3 张切片,每张切片随机选取 5 个视野。

4.1 海马组织老化观察 采用 β -半乳糖苷酶染色法,染色步骤分为:工作液配制,染色液 C 930 μL ,染色液 A 10 μL ,染色液 B 10 μL ,X-Gal 溶液 50 μL ,依次加入,混匀即为工作液;固定,取一张没经过固定的新鲜冰冻切片自然晾干, β -半乳糖苷酶固定液固定 15 min,倾去固定液,蒸馏水洗 3 遍; β -半乳糖苷酶染色,甩干片子上的水,将工作液滴于组织上,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 16~18 h,倾去工作液,蒸馏充分水洗 3 次;甘油明胶封片剂封片,结果判读中衰老细胞呈蓝色。

4.2 海马组织形态学观察 采用 Nissl 染色,样品处理:石蜡包埋、切片,厚度 20 μm ,依次置于以下试剂中:二甲苯 10 min,3 次,无水乙醇 5 min,90%乙醇 2 min,70%乙醇 2 min,蒸馏水 2 min。将处理好

的切片放入 Nissl 染色液染色 10 min,温度为 50 $^{\circ}\text{C}$,蒸馏水洗 2 次(每次数秒),95%乙醇洗涤约 5 s,70%乙醇洗涤 2 次。脱水、透明、封片:95%乙醇脱水 2 min,新鲜 95%乙醇脱水 2 min,二甲苯透明 5 min,新鲜二甲苯透明 5 min,中性树胶封片,显微镜下观察,细胞呈现斑驳的蓝紫色染色。

4.3 ATP 表达检测 运用 ATP 染色法,ATP 染色孵育液配比:0.125% 三磷酸腺苷二钠盐 + 0.1 mol/L 三羟甲基氨基甲烷 + 0.1 mol/L 硫酸镁 + 2% 硝酸铅,依次混匀,用氢氧化钠调 pH 至 7.2,用前过滤,并于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱预热。染色:将切片放于孵育液中,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min,蒸馏水洗 2 min,硫化铵处理 1 min,流水冲洗 5 min,镜检拍照:于显微镜下观察,放大倍数为 250 倍,每张片随机选取 5 个视野观察,其中 ATP 酶活性处呈棕黑色为 ATP 阳性细胞。

4.4 ROS 表达测定 采用 ROS 染色:新鲜组织冰冻切片复温,组化在组织周围笔画圈防治液体流走,用 PBS 稀释好的 DHE 在避光条件下 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min。染核:玻片置于 PBS(pH 7.4)中在脱色摇床上避光晃动洗涤 3 次,每次 5 min。切片稍甩干后滴加 DAPI 染液室温避光染核 10 min。封片:玻片置于 PBS(pH 7.4)避光晃动洗涤 3 次,每次 5 min。切片稍甩干后用抗荧光淬灭封片剂封片。镜检拍照:切片于荧光显微镜下观察并采集图像,放大倍数为 20 倍,每张片随机选取 5 个视野观察。

4.5 Western Blot 检测自噬相关蛋白 LC3 II/LC3 I、p62 的表达 (1)组织块称重,利用液氮、研钵粉碎组织块;加入 RIPA 缓冲液(每克组织 3 mL),PMSF(10 mg/mL,每克组织 30 μL),利用 Polytron 进一步匀浆(25 000 $\times g$ 离心 1 min)维持 4 $^{\circ}\text{C}$,加入 PMSF(10 mg/mL,每克组织 30 μL),冰上孵育 30 min;移入离心管 4 $^{\circ}\text{C}$ 约 20 000 $\times g$ 离心 15 min,上清液为细胞裂解液,-20 $^{\circ}\text{C}$ 分装保存;进行 BCA 蛋白定量法测定蛋白质浓度。(2)取相同质量的细胞裂解液(体积 \times 蛋白质浓度),并加等体积的 2 \times 电泳加样缓冲液沸水浴中 3 min。(3)配胶上样,先配分离胶,用双蒸水压平,静置约 10 min,待其形成一水平线时,除去多余水分,加浓缩胶,拔梳子,上样,左右两侧两个孔加 1 \times Loading Buffer,左边加 Marker 3~5 μL ,其余孔加样 8 μL ,保证总蛋白量为 20~25 μL 。(4)电泳,加入电泳液,液体高度以浸没胶为主,浓缩胶 20 mA,分离胶 35 mA,待到看到 Buffer 蓝色染料跑至胶底部即可。(5)电转,采用 PVDF 膜,在电泳结束前 20 min 准备,按照胶的尺寸取相应大小的膜,置于

甲醛中活化 5 min,其余海绵滤纸预先浸于电转液中,小心把胶取下,按照“黑—海绵—滤纸—胶—膜—滤纸—海绵—红”顺序加电转三明治,加入电转液,冰浴下转膜。(6)封闭,采用 7%脱脂奶粉封闭 60 min, TBST 洗膜 3 次,每次 10 min。(7)孵一抗:参照一抗说明书,将稀释好的抗体滴至目的蛋白相应条带位置,4℃过夜。(8)孵二抗:洗膜,参照二抗说明书,稀释好的抗体加到膜上,摇动孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次,每次 10 min。(9)显色,按照显影定影试剂盒说明书,配制显影液,避光显色。

5 统计学方法 用 Excel 表录入数据,使用 SPSS 17.0 软件进行统计。计量资料若符合正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间均值比较,采用单因素方差分析,组间均值两两比较采用 Bonferoni 法;若不符合正态分布,进行秩和检验,多组间比较采用 Kruskal-Wallis 检验,组间两两比较采用 Mann-Whitney 检验,检验水准 $\alpha=0.05$, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

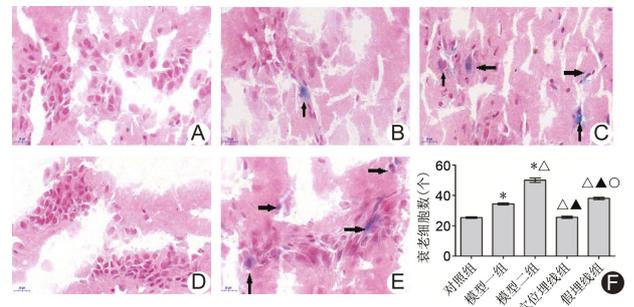
结 果

1 一般情况 所有大鼠在造模前毛发光洁,活泼好动,反应灵敏,眼睛光亮红润,耳廓充盈润泽。造模后,模型一组大鼠较对照组体重减轻,毛色素乱,反应略迟钝,饮食减少,眼神晦涩,耳廓略苍白。模型二组较模型一组饮食量减少,毛发干枯发黄,耳廓苍白且常有伤口,易激惹,抓握时便溏尿频,后期蜷缩在角落。埋线组较模型组毛发整洁,精神状态尚可,行动较灵活,眼睛耳廓较红润。假埋线组经过处理后与模型二组状态相近。模型二组在冰泳刺激时,有 2 只大鼠死亡,予同时造模的备用鼠补充入组。

2 各组海马神经元老化结果(图 1) 对照组神经元排列整齐,未见明显衰老细胞;与对照组比较,模型一组、模型二组可见散在分布的衰老细胞 ($P<0.01$);与模型一组比较,模型二组、假埋线组衰老细胞广泛存在,数量明显增加,穴位埋线组衰老细胞数减少 ($P<0.01$);穴位埋线组较模型二组衰老细胞数明显减少 ($P<0.01$),几乎未见衰老细胞;假埋线组可见散在分布的衰老细胞,与穴位埋线组比较,假埋线组衰老细胞数增加 ($P<0.05$)。

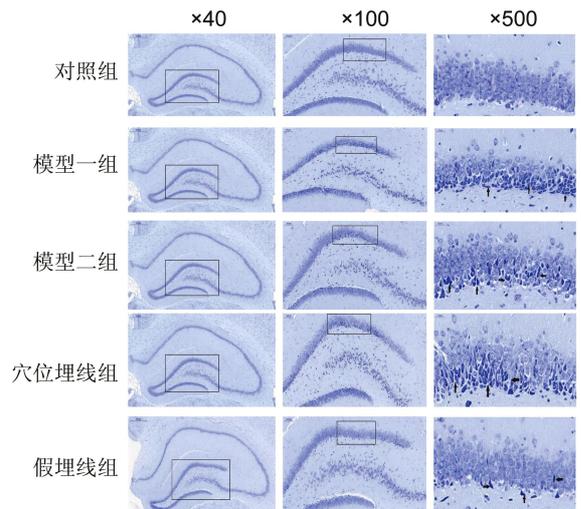
3 各组海马神经元形态比较(图 2) 对照组神经元细胞数正常,胞体圆润,胞核清晰,胞浆淡染,轴丘 Nissl 体分布均匀;模型一组神经细胞层变薄,细胞数相对减少,在海马齿状核(dentate gyrus, DG)出现椭圆形、梭形深染细胞;模型二组海马 DG 区深染细胞进一步皱缩,呈柱形和颗粒形,细胞正常形态不见;穴

位埋线组海马 DG 区细胞较模型二组形态规则,核质分离,尚可辨认胞膜结构;假埋线组 DG 区可见散在深染变形神经元。



注:A-E 为各组 β-半乳糖苷酶染色图(×500);A 为对照组;B 为模型一组;C 为模型二组;D 为穴位埋线组;E 为假埋线组;箭头所示蓝染为衰老细胞;F 为各组大鼠海马衰老细胞数比较;与对照组比较,* $P<0.01$;与模型一组比较,△ $P<0.01$;与模型二组比较,▲ $P<0.01$;与穴位埋线组比较,○ $P<0.01$

图 1 各组大鼠海马神经元老化比较



注:箭头所示为海马齿状核区变性细胞

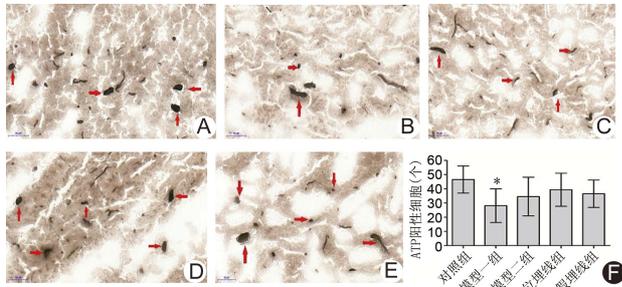
图 2 各组大鼠海马神经元形态比较 (Nissl)

4 各组大鼠海马 ATP 表达比较(图 3) 对照组 ATP 表达较多,ATP 阳性细胞呈广泛密集分布;与对照组比较,模型一组 ATP 阳性细胞减少 ($P<0.05$);与两个模型组比较,穴位埋线组 ATP 阳性细胞有升高趋势。

5 各组大鼠海马 ROS 表达比较(图 4) 与对照组比较,模型一组、模型二组大鼠海马 ROS 表达降低 ($P<0.01$)。与模型一组比较,模型二组、穴位埋线组、假埋线组 ROS 表达升高 ($P<0.01$)。与模型二组比较,穴位埋线组及假埋线组 ROS 表达升高 ($P<0.01$)。与穴位埋线组比较,假埋线组 ROS 表达降低 ($P<0.01$)。

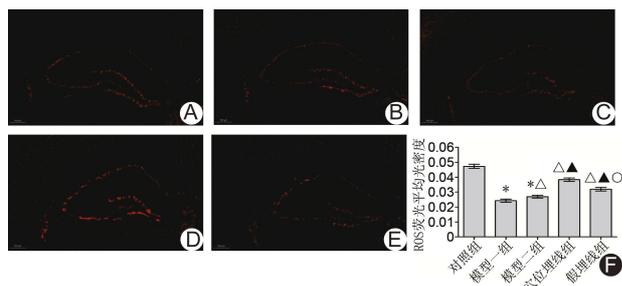
6 各组大鼠海马自噬相关蛋白 p62、LC3II/LC3I 表

达比较(图 5) 与对照组比较,模型一组、模型二组 p62、LC3 II/LC3 I 表达升高 ($P<0.01$)。与模型一组及模型二组比较,穴位埋线组、假埋线组 p62、LC3 II/LC3 I 表达均降低 ($P<0.01$)。与穴位埋线组比较,假埋线组 LC3 II/LC3 I 蛋白表达升高 ($P<0.01$)。



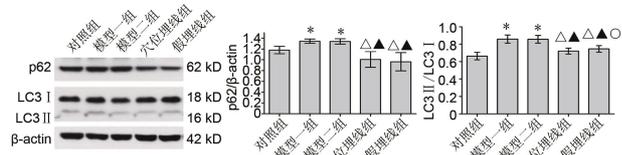
注:A-E 为 ATP 染色图($\times 250$);A 为对照组;B 为模型一组;C 为模型二组;D 为穴位埋线组;E 为假埋线组;箭头所示棕黑色为 ATP 阳性细胞;F 为各组大鼠海马 ATP 阳性细胞数比较;与对照组比较,* $P<0.05$

图 3 各组大鼠海马 ATP 表达比较



注:A-E 为 ROS 染色图($\times 20$);A 为对照组;B 为模型一组;C 为模型二组;D 为穴位埋线组;E 为假埋线组;F 为各组大鼠海马 ROS 荧光光密度比较;与对照组比较,* $P<0.01$;与模型一组比较, $\Delta P<0.01$;与模型二组比较, $\blacktriangle P<0.01$;与穴位埋线组比较, $\circ P<0.01$

图 4 各组大鼠海马 ROS 表达比较



注:与对照组比较,* $P<0.01$;与模型一组比较, $\Delta P<0.01$;与模型二组比较, $\blacktriangle P<0.01$;与穴位埋线组比较, $\circ P<0.01$

图 5 各组大鼠海马自噬相关蛋白 p62、LC3 II/LC3 I 表达比较

讨论

机体衰老表现为各器官功能不同程度的减退,其中以脑老化最为显著。有研究表明,慢性应激可加速

衰老进程^[11],本课题组前期的研究也分别从下丘脑—垂体—肾上腺轴(HPA 轴)^[9]及海马自噬^[12]证实了这一点。长期慢性应激可持续激活 HPA 轴并生成过量的糖皮质激素(glucocorticoid,GC)^[13,14],海马因其分布有丰富的糖皮质激素受体(glucocorticoid receptor,GR),为主要靶器官,相关症状出现较早且显著。这一点也能从细胞形态上看出,模型组大鼠海马 DG 区神经元呈现深染、皱缩等衰老变化,慢性应激可加重神经元老化,穴位埋线可改善细胞形态,提示穴位埋线或可通过维持神经元相对正常形态来延缓衰老。

目前越来越多的研究将衰老与线粒体联系起来,研究发现衰老机体中有线粒体的功能减退和损伤线粒体堆积的现象^[15]。本实验主要通过检测与线粒体功能相关的能量生成、自由基产生和清除相关指标,为进一步的实验提供依据。

衰老过程中常伴随能量生成的减退^[16],一些物质的堆积也易产生毒性而造成细胞损伤乃至凋亡,ATP、ROS 正是这类物质,与两者密切相关的细胞器线粒体老化也被认为是衰老的重要标志。脑因其活跃的代谢特点,对 ATP 变化尤其敏感。衰老过程中细胞能量不足时,可影响到高能耗过程如物质跨膜转运^[17]、针对外界变化的分子应答、信号转导^[18]、核碱基损伤的修复^[19]、蛋白的转录和翻译^[20]、损伤结构清除等^[21],最终引起细胞功能障碍导致衰老。在本实验中,衰老模型组海马区 ATP 明显减少,穴位埋线可减缓这种下降趋势,以维持细胞代谢所需相对足够的能量。

ROS 是代谢过程中产生化学性质活跃的一类物质^[22],生理情况下少量的 ROS 对于机体是必须且有益的^[23],研究发现衰老组织中有过量的 ROS 和其氧化产物及抗氧化机制的失效。既往较多研究均从 ROS 过度升高,损伤细胞危及生存角度出发,有研究发现在遇到外界环境变化时,细胞内 ROS 轻度提升以抵抗外界伤害性刺激^[24-27]。在本实验中观察到衰老模型中 ROS 含量较对照组不升反降,穴位埋线组 ROS 量较模型组有一定提升,或许为 ROS 在衰老及应激的双向作用的体现。

衰老过程中除了有分子生成变化外,也涉及损伤成分的清除,近些年研究发现衰老及衰老相关的病理与自噬低水平相关^[28]。p62 是一种自噬受体,介导自噬底物的识别和运输作用^[29-31]。p62 数量越多不一定代表自噬越强^[32],本实验中,与对照组比较,模型组 LC3 II、p62 蛋白表达升高;与模型组比较,穴位埋线组 LC3 II/LC3 I、p62 蛋白表达降低,或与衰老过程中自噬流受阻,自噬小体及其上的蛋白累积有关。

针灸在防老抗衰方面有一定效果,其中穴位埋线兼具针具的刺激效应和针刺渗血作用,以及羊肠线在穴位内长久的刺激作用。依据中医学衰老气血亏少、髓海不足的特点,选取合谷、太冲、百会、足三里穴位为埋线组方。合谷、太冲为四关穴,可调和气血。足三里是足阳明胃经合穴,为强壮补虚之要穴。百会位于头顶,针之可升阳举陷、调神安神。针灸可从多个方面影响线粒体功能,通过抑制 A β -结合性乙醇脱氢酶蛋白(A β -binding alcohol dehydrogenase, ABAD)的过度表达,提高细胞色素氧化酶 IV (cytochrome oxidase IV, COX IV)、琥珀酸脱氢酶(succinate dehydrogenase, SDH)、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)活性来改善线粒体的能量代谢^[33,34];提高海马线粒体呼吸链酶复合物活性和 ATP 浓度来改善线粒体功能^[35];还可适度提高自噬能力,减少细胞凋亡^[36]。针刺或艾灸合谷、太冲、足三里可提高老年痴呆模型大鼠的学习记忆与抗疲劳能力,改善海马细胞形态结构,以延缓衰老进程^[37,38]。电针百会、足三里可提高大鼠海马 CA1 区长时程增强(long term potentiation, LTP)^[39];针药合用可调节大鼠海马 IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 含量,抑制 D-半乳糖引发的中枢神经系统免疫炎症反应,以协同改善学习记忆能力^[40]。

综上,慢性应激可促进海马区神经元老化,针刺穴位埋线可缓解衰老相关症状,保护神经元,或与改善细胞能量供应,轻度提升 ROS,促进自噬小体的降解以保证自噬流的通畅有关。

由于本实验动物数量尚少,仅可反应出一些趋势,尚需后续更多的实验以补充。此外,针对 ROS 在衰老和应激的双向效应中,ROS 浓度有益范围的界定以及参与到其中的分子通路的尚不确定,在自噬流中下游中——对自噬小体的运输、与溶酶体融合并被降解过程的监测和评价还需要今后更大量的实验进行探索和验证。

利益冲突:所有作者声明,除本文基金资助外,论文投稿未从任何组织获得任何财务支持或其他支持,无其他可能影响投稿的关系或活动。

参 考 文 献

- [1] Martín-Maestro P, Gargini R, García E, et al. Slower dynamics and aged mitochondria in sporadic Alzheimer's disease [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2017; 9302761.
- [2] Chandra G, Shenoi RA, Anand R, et al. Reinforcing mitochondrial functions in aging brain: An insight into Parkinson's disease therapeutics [J]. *J Chem Neuroanat*, 2019, 95: 29-42.
- [3] 郑晨曦, 张建平, 姚伟伟, 等. 线粒体自噬与神经退行性疾病 [J]. *中华神经外科疾病研究杂志*, 2015, 14(3): 286-288.
- [4] 周杰, 胡丙成. 穴位埋线疗法抗衰老 42 例临床观察 [J]. *黑龙江中医药*, 2017, 46(2): 56-57.
- [5] 周双琳. 足阳明经埋线治疗面部皮肤老化的临床及实验研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2014.
- [6] Willner P. Animal models as simulations of depression [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 1991, 12(4): 131-136.
- [7] Strekalova T, Couch Y, Kholod N, et al. Update in the methodology of the chronic stress paradigm: internal control matters [J]. *Behav Brain Funct*, 2011, 79(2): 360-369.
- [8] 边心会, 张宏. 穴位埋线对衰老模型大鼠慢性应激下海马神经元结构的影响 [J]. *针刺研究*, 2014, 39(1): 35-39.
- [9] 范春. 穴位埋线对复合衰老模型大鼠 HPA 轴的调节作用 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2011.
- [10] 李忠仁主编. 实验针灸学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2003: 103.
- [11] 范春, 钱虹, 黄瑞聪, 等. 穴位埋线对多重慢性应激下衰老模型大鼠海马糖皮质激素受体 mRNA 表达的调节 [J]. *新中医*, 2013, 45(4): 159-162.
- [12] 袁玉梅, 范春, 张宏, 等. 穴位埋线对慢性应激复合衰老模型大鼠海马自噬的影响 [J]. *辽宁中医杂志*, 2018, 45(2): 401-404.
- [13] 连晓媛, 张均田. 慢性应激、糖皮质类固醇与脑衰老 [J]. *中国药理学通报*, 1998, 14(4): 9-12.
- [14] 赵刚, 蔡定芳. 应激、糖皮质激素和海马老化 [J]. *国外医学(老年医学分册)*, 2002, 23(3): 125-128.
- [15] Moreira OC, Estébanez B, Martínez-Florez S, et al. Mitochondrial function and mitophagy in the elderly: effects of exercise [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 8(16): 1-13.
- [16] Roberts SB, Rosenberg I. Nutrition and aging: changes in the regulation of energy metabolism with aging [J]. *Physiol Rev*, 2006, 86(2): 651-667.
- [17] Pei Li, Ganhua X, Pei L, et al. Light-driven ATP transmembrane transport controlled by DNA nanomachines [J]. *J Am Chem Soc*, 2018, 140(47): 16048-16052.
- [18] Cui X, Xie Z. Protein interaction and Na/K-ATPase-mediated signal transduction [J]. *Molécules*, 2017, 22(6): E990.
- [19] Mori MP, de Souza-Pinto NC. Role of mitochondrial

- dysfunction in the pathophysiology of DNA repair disorders[J]. *Cell Biol Int*, 2018, 42(6): 643–650.
- [20] Pontes MH, Sevostyanova A, Groisman EA. When too much ATP is bad for protein synthesis [J]. *J Mol Biol*, 2015, 427(16): 2586–2594.
- [21] Li FJ, Xu ZS, Soo AD, et al. ATP-driven and AMPK-independent autophagy in an early branching eukaryotic parasite [J]. *Autophagy*, 2017, 13(4): 715–729.
- [22] Lenaz G. Mitochondria and reactive oxygen species. Which role in physiology and pathology? [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2012, 942: 93–136.
- [23] Barja G. Oxygen radicals, a failure or a success of evolution? [J]. *Free Radic Res Commun*, 1993, 18(2): 63–70.
- [24] 孙立娟, 张勇, 刘健康. 运动与衰老: 线粒体功能和氧化还原的调控[J]. *生理科学进展*, 2014, 45(5): 321–326.
- [25] Srivastava S. The mitochondrial basis of aging and age-related disorders [J]. *Genes*, 2017, 8(12): 1–23.
- [26] Doonan R, McElwee JJ, Matthijssens F, et al. Against the oxidative damage theory of aging: Superoxide dismutases protect against oxidative stress but have little or no effect on life span in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Genes Dev*, 2008, 22(23): 3236–3241.
- [27] Mesquita A, Weinberger M, Silva A, et al. Caloric restriction or catalase inactivation extends yeast chronological lifespan by inducing H₂O₂ and superoxide dismutase activity [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2010, 107(34): 15123–15128.
- [28] Rubinsztein DC, Marino G, Kroemer G. Autophagy and aging [J]. *Cell*, 2011, 146(5): 682–695.
- [29] Kirkin V, Lamark T, Johansen T, et al. NBR1 cooperates with p62 in selective autophagy of ubiquitinated targets [J]. *Autophagy*, 2009, 5(5): 732–733.
- [30] Lee JY, Nagano Y, Taylor JP, et al. Disease-causing mutations in parkin impair mitochondrial ubiquitination, aggregation, and HDAC6-dependent mitophagy [J]. *J Cell Biol*, 2010, 189(4): 671–679.
- [31] Narendra D, Kane LA, Hauser DN, et al. p62/SQSTM1 is required for parkin-induced mitochondrial clustering but not mitophagy; VDAC1 is dispensable for both [J]. *Autophagy*, 2010, 6(8): 1090–1106.
- [32] Kuma A, Komatsu M, Mizushima N. Autophagy-monitoring and autophagy-deficient mice [J]. *Autophagy*, 2017, 13(10): 1619–1628.
- [33] 罗磊, 孙国杰, 杜艳军. 针灸对 AD 模型大鼠海马神经元线粒体能量代谢相关蛋白的影响 [J]. *中国针灸*, 2013, 33(10): 913–918.
- [34] Tian WQ, Peng YG, Cui SY, et al. Effects of electroacupuncture of different intensities on energy metabolism of mitochondria of brain cells in rats with cerebral ischemia-reperfusion injury [J]. *Chin J Integr Med*, 2015, 21(8): 618–623.
- [35] 董卫国, 林岚, 王丰, 等. 电针对 SAMP8 小鼠海马线粒体呼吸链功能的影响 [J]. *中国针灸*, 2012, 32(8): 726–730.
- [36] 杜琳, 谭成富, 王超, 等. 电针、艾灸预处理对心肌缺血大鼠心肌细胞凋亡和自噬的影响 [J]. *针刺研究*, 2019, 44(1): 31–36.
- [37] 李东红, 段灿灿, 郝石磊, 等. 针刺合谷、太冲对老年痴呆模型大鼠行为学及氧自由基的影响 [J]. *北京中医药*, 2010, 29(4): 310–311.
- [38] 谭杏. 艾灸对 D-半乳糖致衰老大鼠抗氧化作用的实验研究 [D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2014.
- [39] 徐颖, 张志雄, 王星禹, 等. 电针对衰老模型大鼠学习记忆及海马 CA1 区 LTP 的影响 [J]. *中国老年学杂志*, 2008, 28(8): 1568–1570.
- [40] 沈蓉, 徐颖, 张志雄, 等. 电针结合银杏酮酯对记忆障碍大鼠学习记忆及海马细胞因子的影响 [J]. *针刺研究*, 2009, 34(5): 329–333.

(收稿: 2018-10-11 在线: 2019-08-09)

责任编辑: 赵芳芳