# 针刺疗法对老年痴呆小鼠脑内 p53 蛋白表达的影响

刘金凤[1] 张 莹[1] 孙金平[1] 徐思思[1] 张雪竹[2]

**摘要** **目的** 观察益气调血,扶本培元针刺法对老年痴呆小鼠脑内 p53 蛋白表达的影响。**方法** 选取 SAMP8 小鼠,分为 SAMP8 对照组、针刺组、非穴组,并设同源 SAMR1 对照组。针刺组采用益气调血,扶本培元针法,针刺膻中、中脘、气海、血海(双)、足三里(双);非穴组取双侧胁下两个固定非经非穴点。采用 Western blot 法测定小鼠皮质和海马内 p53 蛋白表达;HE 染色法观察各组小鼠海马 CA1 区、颞叶、枕叶神经元细胞病理形态;免疫组化法测定皮质 p53 阳性细胞表达情况。**结果** SAMP8 皮质内 p53 蛋白呈较高表达的状态,针刺治疗后明显下调,与 SAMP8 对照组差异明显($P<0.05$),与 SAMR1 对照组比较,差异无统计学意义($P>0.05$);非穴刺激对 p53 蛋白表达无显著影响。海马组织内,各组 p53 蛋白表达差异均无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 益气调血,扶本培元针刺法能下调小鼠脑内 p53 蛋白表达,改善脑细胞病理形态,从而提高老年痴呆小鼠的学习记忆能力,改善其认知功能,且具有腧穴特异性。

**关键词** 针刺;老年痴呆;益气调血;扶本培元针刺法;p53 蛋白

Effect of Acupuncture on the p53 Protein Expression of Mice with Alzheimer's Disease

LIU Jin-feng[1], ZHANG Ying[1], SUN Jin-ping[1], XU Si-si[1], and ZHANG Xue-zhu[2] *1 Graduate School of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin (300193), China;2 Department of Acupuncture, First Affiliated Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin (300193), China*

ABSTRACT **Objective** To observe the effect of acupuncture method for benefiting qi, regulating blood, supplementing the root, and cultivating the essence (BQRBSRCE) on the p53 protein expression of mice with Alzheimer's disease (AD). **Methods** SAMP8 mice were divided into the control group, the acupuncture group, and the non-acupoint group. The homologous SAMR1 control group was set up. Mice in the acupuncture group used acupuncture method for BQRBSRCE by needling at Tanzhong (RN17), Zhongwan (RN12), Qihai (RN6), and bilateral Xuehai (SP10), and bilateral Zusanli (ST36). Two fixed non-acupoints from bilateral ribs were needled in the non-acupoint group. The p53 protein expression in the cortex and hippocampus of mice was determined using Western blot. The pathological changes of neurons in the hippocampal $CA_1$ region, the temporal lobe, and the occipital lobe were observed using HE staining. The expression of cortical p53-positive cells was detected by immunohistochemical assay. **Results** The p53 protein was highly expressed in the cortex of SAMP8, which was significantly down-regulated after acupuncture, showing statistical difference when compared with the SAMP8 control group ($P<0.05$), but with no statistical difference when compared with the SAMR1 control group ($P>0.05$). Needling at non-acupoints had no obvious effect on the p53 protein expression. There was no statistical difference in the p53 protein expression of the hippocampus ($P>0.05$). **Conclusion** Acupuncture method for BQRBSRCE could down-regulate the p53 protein expression in the brain of mice, improve the pathological state of brain cells, thus enhancing learning and memory capabilities of AD mice, improving their cognitive functions, with specificity of acupoints.

KEYWORDS acupuncture; Alzheimer's disease; acupuncture method for benefiting qi, regulating blood, supplementing the root, and cultivating the essence; p53 protein

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81202739);教育部博士点课题(No. 20111210120004);天津市教委课题(No.20080217)

作者单位:1.天津中医药大学研究生院(天津 300193);2.天津中医药大学第一附属医院针灸科(天津 300193)

通讯作者:张雪竹,Tel:13652024902, E-mail:zhangxuezhu1999@126.com

DOI: 10.7661/CJIM.2013.10.1367

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种中枢神经系统原发性退行性病变,起病隐袭,呈进行性发展。随着我国人口老龄化日益严重,AD 越来越成为一个严重的社会问题。流行病学数据显示,AD 在年龄大于 65 岁的人群中发病率为 8% ~10%,并且在此后每增长 5 岁,该病的发生率将增加 1 倍[1]。目前 AD 的发病原因未明,发病机制复杂,尚无特效药物治疗。临床实践表明,针灸能较好地改善 AD 患者的认知功能,且无明显不良反应[2]。因此,本实验从 p53 蛋白在脑中表达量的角度探讨益气调血,扶本培元针法改善认识功能的可能机制。

## 材料与方法

1　动物及分组　选取健康雄性 8 月龄 SAMP8 小鼠[3]24 只,随机分为 SAMP8 对照组,针刺组,非穴组。并选取 8 月龄同源小鼠 8 只为 SAMR1 对照组,均为雄性,由天津中医药大学第一附属医院实验动物中心提供,动物合格证号:津实动质 M 准字第 006 号,清洁级。

2　针具　选用 0.35 mm ×40 mm 针灸针(华佗牌,中国苏州医疗用品厂有限公司),针具由天津中医药大学第一附属医院针灸研究所提供。

3　主要试剂及仪器　兔抗鼠 p53 多克隆抗体(Santa, DB002 -01 -01AB)、actin 兔单克隆抗体(Santa, 5125S),兔两步法检测试剂盒(PV6001,北京中杉金桥生物技术有限公司)、BCA 蛋白定量试剂盒(上海生工生物工程有限公司, SK3021 -500assays)、Marker(20 ~120kD, Fermentas Life Sciences)、DAB 显色试剂盒(ZLI-9032,北京中杉金桥生物技术有限公司);PVDF 膜(0.45 μm, Millipore)、光学显微镜( BX40F4,日本, Olympus)、台式冷冻离心机( Universal 16R,德国, Hettich Zentrifugen)、酶标仪(ELX800,美国, Bio-tek Inst)、凝胶成像系统(ChemiDox XRS,美国, Bio-Rad 公司)。

4　穴位选择及针刺方法　针刺采用益气调血,扶本培元针法[4]。取穴为膻中、中脘、气海、血海(双)、足三里(双),穴位定位根据文献[5]。针刺方法:膻中、中脘、气海和足三里分别施捻转补法 30 s,血海施捻转泻法 30 s。非穴组取双胁下两个固定非穴位点,行平补平泻手法 105 s。均每天针刺 1 次,持续 7 天,休息 1 次后再持续针刺 7 天。SAMR1 对照组和 SAMP8 对照组进行与针刺组及非穴组相同时间和程度的捉抓刺激。治疗后将各组小鼠行颈椎脱臼法处死,并迅速取脑,一部分用作 Western blot 法测定 p53 蛋白表达,另一部分置于多聚甲醛中固定,脱水,从视交叉至脑桥前缘冠状位切取含海马脑组织块,备用。

5　观察项目及检测方法

5.1　p53 蛋白表达　采用 Western blot 法测定。使用干净剪刀将皮质及海马组织迅速剪碎,冰浴下裂解超声提取总蛋白,设定超声功率为 300 W,每次超声 4 s,间隔 10 s。充分裂解后,提取液于 4 ℃离心 30 min(12 000 r/min),分离上清液,采用 BCA 蛋白定量试剂盒测定总蛋白浓度。用 5 ×上样缓冲液调整蛋白浓度至 10 μg/μL, 100 ℃煮沸 10 min,备用。

将蛋白样品进行变性的 5%、10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳,每孔上样量为 100 μg,根据预染蛋白 Marker 的电泳情况,适时停止电泳。然后半干法电转移至 PVDF 膜上。膜以 5% 脱脂奶液室温封闭 2 h 后,与兔抗 p53(1∶200)多克隆抗体 4 ℃孵育过夜,漂洗后,与辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG(1∶1 000)室温孵育 2 h,漂洗后与化学发光显色剂显色,拍照,凝胶图像分析系统分析光密度值。每个样品重复测量 3 次,取均值分析。实验以 β-actin(1∶1 000)作为内参照物。

5.2　各组小鼠皮质及海马 CA1 区病理形态及皮质 p53 阳性细胞表达量的检测　将蜡块自海马齿状回开始,连续冠状切片,片厚 4 μm。展片后贴附于载玻片上,晾干后于 60 ℃烘烤备用。常规 HE 染色,光镜下观察各组病理形态。

免疫组化法测定皮质 p53 阳性细胞表达:石蜡切片常规脱蜡至水,0.01 mol/L 枸橼酸盐缓冲液(pH 6.0)抗原修复 10 min(高压煮沸),自然冷却至室温,3% $H_2O_2$ 室温孵育 20 min 灭活内源性过氧化氢酶,滴加 p53 一抗工作液(1∶80),4 ℃过夜,生物素化二抗 37 ℃孵育 30 min,DAB 镜下显色,苏木素复染、脱水、透明、封片。1 ×PBS 缓冲液代替一抗经上述步骤染色作空白对照。采用 Qcapture 图像采集系统于高倍镜视野(10 ×40)随机选取 5 个视野进行观察,应用 Simple PCI 图像分析软件计数每个视野中阳性细胞平均光密度(AOD),取均值进行分析,此系统将白色灰度值设定为 255,将黑色灰度值设定为 0,故灰度值越高,表达越弱。

6　统计学方法　所有数据采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析。每组样本测得数据均行正态分布及方差齐性检验,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析。$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 结　果

1　各组小鼠皮质及海马 p53 蛋白表达水平比较

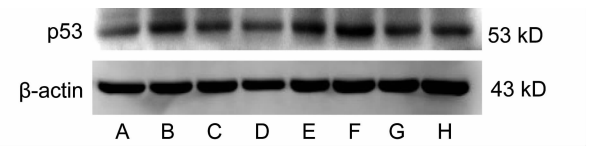
（表 1，图 1） 与 SAMR1 对照组比较，SAMP8 对照组皮质中 p53 蛋白表达上调，差异有统计学意义（$P<0.01$）；针刺治疗后，针刺组皮质中 p53 蛋白表达明显下调，与 SAMP8 对照组比较差异有统计学意义（$P<0.01$）；非穴位刺激对 SAMP8 小鼠皮质 p53 表达与针刺组比较差异明显（$P<0.01$）。在海马中 p53 的表达可见，各组均呈较低表达的状态，与针刺组比较，SAMP8 对照组和非穴组海马中 p53 蛋白表达稍上调，但差异无统计学意义（$P>0.05$）。

**表 1** 各组小鼠皮质及海马 p53 表达水平比较 （$\bar{x}\pm s$）

| 组别 | $n$ | p53 表达水平 | |
|---|---|---|---|
| | | 皮质 | 海马 |
| SAMR1 对照 | 8 | 0.08 ±0.01 | 0.14 ±0.03 |
| SAMP8 对照 | 8 | 0.16 ±0.03 * | 0.18 ±0.09 |
| 针刺 | 8 | 0.09 ±0.02 △ | 0.15 ±0.09 |
| 非穴 | 8 | 0.15 ±0.02 ▲ | 0.17 ±0.02 |

注：与 SAMR1 对照组比较，*$P<0.01$；与 SAMP8 对照组比较，△$P<0.01$；与针刺组比较，▲$P<0.01$

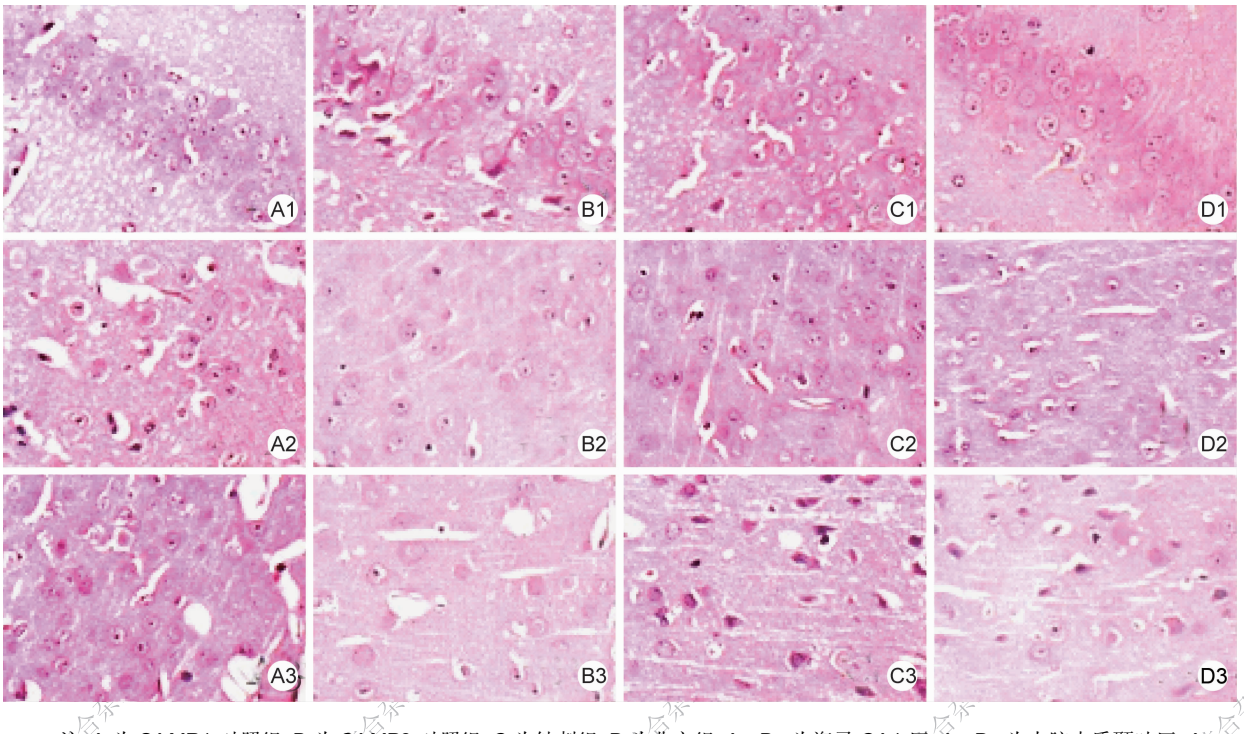
2 各组小鼠海马及皮质 HE 染色细胞形态结果（图 2） SAMR1 对照组海马 CA1 区锥体细胞排列紧密，细胞边缘清晰，胞浆染色均匀，核圆而大，核仁、核膜清晰，可见清晰、嗜酸性核仁，个别凋亡细胞，胶质细胞无增生。SAMP8 对照组锥体细胞排列稀疏，大量神经元细胞轮廓消失，细胞核变小，核仁消失，可见凋亡空泡。胞浆浓缩且深染，结构不清，成核固缩表现，胶质细胞增生形成多处结节。针刺组海马部位水肿明显减轻，神经元轻度变性，核固缩减轻，胶质细胞轻度增生。非穴组和 SAMP8 对照组差别不明显。皮质颞叶和枕可见，SAMR1 对照组和针刺组椎体细胞排列紧密整齐，细胞边缘清晰，胞浆染色均匀，核仁核膜清晰可见，SAMP8 对照组和非穴组椎体细胞散在，排列稀疏，核仁变性不明显。




注：A 为 SAMR1 对照组皮质；B 为 SAMP8 对照组皮质；C 为针刺组皮质；D 为非穴组皮质；E 为 SAMR1 对照组海马；F 为 SAMP8 对照组海马；G 为针刺组海马；H 为非穴组海马

**图 1** 各组小鼠皮质及海马 p53 电泳图

3 各组小鼠皮质 p53 阳性表达比较（表 2，图 3） p53 阳性细胞镜下免疫反应产物呈棕黄色，主要表达于细胞核，胞浆有少量表达。与 SAMR1 对照组比较，SAMP8 对照组小鼠皮质内见大量棕黄色颗粒，且核仁深染，p53 表达量上调（$P<0.05$），SAMR1 对照组皮质内见少量 p53 阳性细胞，呈弱表达状态；针刺组皮质内 p53 阳性细胞散在存在，较 SAMP8 对照组的阳




注：A 为 SAMR1 对照组；B 为 SAMP8 对照组；C 为针刺组；D 为非穴组；$A_1$-$D_1$ 为海马 CA1 区；$A_2$-$D_2$ 为大脑皮质颞叶区；$A_3$-$D_3$ 为大脑皮质枕叶区

**图 2** 各组小鼠海马 CA1 区、大脑皮质颞叶区及枕叶区形态学结果 （HE 染色，×400）

表 2　各组小鼠皮质 p53 阳性表达比较　($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | $n$ | p53 灰度值 |
|---|---|---|
| SAMR1 对照 | 45 | 152.36 ± 18.13 |
| SAMP8 对照 | 45 | 134.29 ± 13.67 * |
| 针刺 | 45 | 144.54 ± 13.53 △ |
| 非穴 | 45 | 132.78 ± 14.37 ▲ |

注：与 SAMR1 对照组比较，* $P < 0.05$；与 SAMP8 对照组比较，△ $P < 0.05$；与针刺组比较，▲ $P < 0.05$

性表达明显下调($P < 0.05$)；非穴组皮质 p53 阳性表达与 SAMP8 对照组比较，差异无统计学意义($P > 0.05$)。

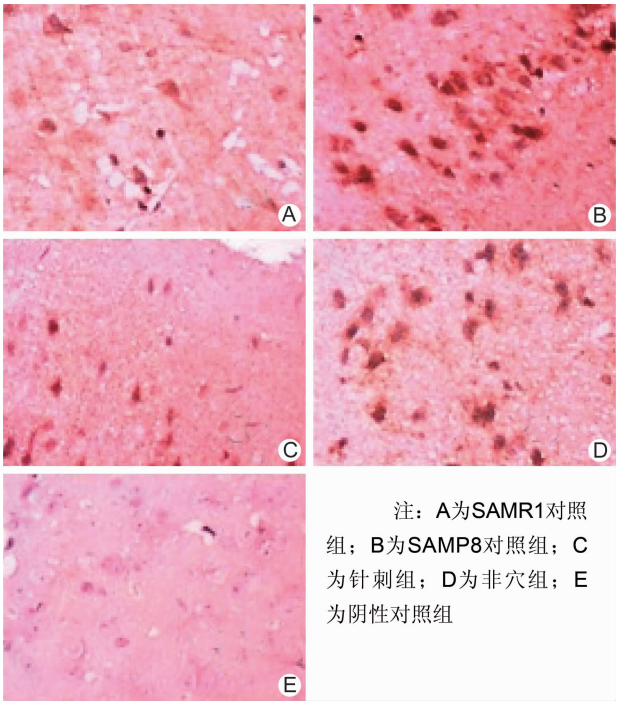



图 3　各组小鼠皮质 p53 阳性表达结果
(免疫组化染色，×400)

## 讨　论

中医学虽无 AD 病名，但对痴呆的论述却源远流长，散见于“善忘”、“呆病”、“文痴”、“痴呆”、“癫疾”、“郁证”等疾病的论述中。韩景献教授认为三焦气化失司是痴呆发生的关键[6]。若三焦气化失常，气血津液升降出入的通道不畅，清阳不升、浊阴不降，气血津液衰败，痰瘀浊毒滋生，元神受损，则发为痴呆。益气调血、扶本培元针法基于中医学整体观念和对三焦气化功能的深刻认识，穴取膻中、中脘、气海、血海、足三里，以疏调三焦、行气活血、蠲化痰浊，疏补一身之气[7]，使全身气机流畅，气化守常，共奏益气调血、扶本培元之功，恢复脑的正常智能状态。

AD 的发病与机体的衰老进程有关[8]。抑癌基因诱导的细胞衰老可能普遍存在，在诸多参与细胞衰老的抑癌基因中，p53 在细胞衰老的发生和维持中起着枢纽作用[9-11]。此外，最新研究表明，细胞周期调控紊乱是 AD 的早期事件，先于老年斑和神经元纤维缠结出现[12-14]。p53 可通过磷酸化或乙酰化等翻译后修饰调节自身功能[15]，修饰后的 p53 形成有生物学活性的四聚体，与靶基因的 p53 反应元件结合，控制着下游靶基因的表达，从而引起细胞生长阻滞、凋亡[16]。p53 还是平衡有氧呼吸和糖酵解的一种重要物质[17]，从而影响线粒体能量的产生[18]。研究表明此基因表达量的升高会导致凋亡的发生，过度的凋亡就会导致衰老的发生和加速[19]。Western blot 结果显示，与 SAMR1 对照组比较，SAMP8 对照组皮质中 p53 蛋白表达上调；针刺治疗后，针刺组较 SAMP8 对照组皮质中 p53 蛋白表达下调；海马中 p53 的表达可见，SAMR1 对照组较其他各组呈较低表达的状态，各组间比较，差异均无统计学意义。

本实验发现 SAMP8 对照组海马 CA1 区锥体细胞排列稀疏，大量神经元细胞轮廓消失，细胞核变性明显，可见凋亡空泡。胞浆浓缩且深染，结构不清，成核固缩表现。提示此区细胞随衰老出现的神经变性反应和神经元丢失很可能是其学习记忆损伤的重要病理基础之一。针刺组较 SAMP8 对照组水肿明显减轻，神经元轻度变性，核固缩减轻，胶质细胞轻度增生。非穴组改变不明显。皮质颞叶和枕叶可见，SAMR1 对照组和针刺组椎体细胞排列紧密整齐，细胞边缘清晰，胞浆染色均匀，核仁核膜清晰可见，SAMP8 对照组和非穴组椎体细胞散在，排列稀疏，核仁变性不明显。脑内存在一些神经传导的旁路，针刺可引起神经冲动，经外周神经传导至中枢神经(脑)，再经平时很少起步用的旁路刺激大脑皮层，从而引起坏死边缘区突触数目和结构的改变，使突触后膜致密物质厚度增加，这可能与某些酶及其底物蛋白的磷酸化过程引起其分子构型的改变有关[20]。结合前期神经元特染及免疫组织化学研究结果[21]，笔者认为，益气调血 扶本培元针法能减轻 8 月龄 SAMP8 各脑区细胞变性反应和细胞丢失，这很可能是针刺改善其学习记忆功能的重要病理学基础。

在免疫组化染色的结果中发现，p53 的阳性染色位于细胞核上，在细胞核上呈棕黄色或褐色颗粒，伴有少量的胞浆表达。p53 在核和细胞质之间的转位能通过几种方式被调控，包括后转译调控和四聚体化[22]，m 蛋白与野生型 p53 相互作用能改变 p53 定位。有研究表明，p53 自身进入线粒体并释放细胞色素

C[23]，直接介导 bax 导致线粒体膜通透性改变和凋亡，诱发细胞老化进程[24]。SAMP8 对照组皮质中有大量棕黄色深染的 p53 阳性细胞，针刺组散在 p53 阳性细胞，非穴组和 SAMP8 对照组差别不明显，表明针刺能有效抑制大脑皮质内神经元细胞的凋亡。海马中 p53 阳性表达则不明显，有待于进一步研究探讨。

## 参 考 文 献


[1] Kar S, Slowikowski SP, Westaway D, et al. Interactions between β-amyloid and central cholinergic neurons: implications for Alzheimer's disease [J]. Psychiatry Neurosci, 2004, 29(6): 427 -441.

[2] 成海燕，于建春，彭应梅，等. 针灸治疗阿尔茨海默病研究进展[J]. 辽宁中医杂志, 2008, 35(4): 630 -633.

[3] 褚芹，于建春，潘建明，等. 快速老化模型小鼠 SAMP8 行为学的增龄性变化[J]. 现代生物医学进展, 2008, 8(10): 1801 -1804.

[4] 于建春，韩鹦赢，成海燕，等. "益气调血，扶本培元"针法腧穴配伍思想探微[J]. 中国针灸, 2011, 31(9): 814 -816.

[5] 华兴帮. 大鼠穴位图谱的研制[J]. 实验动物与动物实验, 1991, (1): 1 -5.

[6] 韩景献. 三焦气化失常—衰老相关论[J]. 中医杂志, 2008, 49(3): 200 -202.

[7] 于建春，于涛，张雪竹，等. 益气调血，扶本培元针法治疗老年期痴呆的临床应用和作用机制[J]. 天津科技, 2009, 2: 15 -16.

[8] Hsu AL, Murphy CT, Kenyon C. Regulation of aging and age-related disease by DAF-16 and heat-shock factor [J]. Science, 2003, 300 (5622): 1142 -1145.

[9] Hasty P, Vijg J. Accelerating aging by mouse reverse genetics: a rational approach to understanding longevity [J]. Aging Cell, 2004, 3(2): 55 -65.

[10] Ben-Porath I, Weinberg RA. The signals and pathways activating cellular senescence [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2005, 37(5): 961 -976.

[11] Rodier F, Campisi J, Bhaumik D. Two faces of p53: aging and tumor suppression [J]. Nucleic Acids Res, 2007 [Epub ahead of print].

[12] Yang Y, Varvel NH, Lamb BT, et al. Ectopic cell cycle events link human Alzheimer's disease and amyloid precursor protein transgenic mouse models [J]. J Neurosci, 2006, 26(3): 775 -784.

[13] Neve RL, McPhie DL. Dysfunction of amyloid precursor protein signaling in neurons leads to DNA synthesis and apoptosis [J]. Biochim Biophys Acta, 2007, 1772(4): 430 -437.

[14] Nagy Z. The dysregulation of the cell cycle and the diagnosis of Alzheimer's disease [J]. Biochim Biophys Acta, 2007, 1772(4): 402 -408.

[15] Wang Q, Yang Y, Wang L, et al. Acidic domain is indispensable for MDM2 to negatively regulate the acetylation of p53 [J]. Biochem Biophys Res Communications, 2008, 374(3): 437 -441.

[16] Colman MS, Afshari CA, Barrett JC. Regulation of p53 stability and activity in response to genotoxic stess [J]. Mutat Res, 2000, 462(2 -3): 179 -188.

[17] Leung PS, Aronson WJ. Exercise alters the IGF axis *in vivo* and increases p53 protein in prostate tumor cells *in vitro* [J]. J Appl Physiol, 2004, 96(2): 450 -454.

[18] Wenzhe Ma, Ho Joong Sung, Joon Y, et al. A pivotal role for p53: balancing aerobic respiration and glycolysis [J]. J Bioenerg Biomembr, 2007, 39(3): 243 -246.

[19] Chen QM, Liu J, Mc. Merrett JB. Apoptosis or senescence like growth arrest: influence of cell cycle position, p53, p21 and bax in $H_2O_2$ response of normal human fibroblasts [J]. Biochem J, 2000, 347(2): 543 -551.

[20] 宋玉娟，张力，徐会深，等. 电针治疗阿尔茨海默病的实验研究[J]. 中医药学报, 2005, (3): 39 -40.

[21] 张月峰. 针刺对 SAMP8 大脑神经元丢失干预作用的实验研究[D]. 天津：天津中医药大学, 2005.

[22] Fabbro M, Henderson BR. Regulation of tumor suppressors by nuclear cytoplasmic shuttling [J]. Exp Cell Res, 2003, 282(2): 59 -69.

[23] Chipuk JE, Kuwana T, Bouchier-Hayes L, et al. Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis [J]. Science, 2004, 303(5660): 1010 -1014.

[24] Finkel T, Serrano M, Blasco MA. The common biology of cancer and ageing [J]. Nature, 2007, 448(7155): 767 -774.


（收稿：2012 -12 -15 修回：2013 -07 -05）

中国中西医结合杂志