

· 基础研究 ·

电针对慢性脑缺血大鼠学习记忆功能及海马组织头蛋白 mRNA 表达的影响

魏居瑞 刘喆 刘佩 夏玮 何方 吴杰 陈萍 骆碧君 谈胜国 郭朝平

【摘要】目的 观察电针(EA)对慢性脑缺血大鼠学习记忆功能和海马组织头蛋白(Noggin)mRNA 表达的影响。**方法** 选取雄性 Sprague-Dawley(SD)大鼠 120 只,采用改良永久性结扎双侧颈总动脉法制作慢性脑缺血模型。将造模成功的 104 只大鼠按随机数字表法分为模型组和电针组,每组大鼠 52 只,每组再根据取材的时间点分为造模成功后第 1、2、4、6 周 4 个亚组,每个时间点取 13 只大鼠。电针组采用电针治疗,模型组仅常规饲养。2 组大鼠均于取材前 5 d 行 Morris 水迷宫检测,并在对应的时间点(造模成功后第 1、2、4、6 周)按随机数字表法各亚组抽取 6 只大鼠。采用逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)方法半定量检测大鼠海马中 Noggin mRNA 的表达情况。**结果** 造模成功后第 2、4、6 周,电针组的逃避潜伏期分别为(23.8 ± 4.16)s、(23.7 ± 7.28)s、(22.26 ± 4.90)s,与模型组同时时间点的(32.21 ± 7.91)s、(32.91 ± 11.68)s、(30.11 ± 5.76)s 比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。造模成功后第 2、4、6 周,电针组的各时间点第一象限内游泳时间与模型组同时时间点比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。电针组造模后各时间点的 Noggin mRNA 水平均高于模型组同时时间点($P < 0.05$);造模后第 6 周,电针组 Noggin mRNA 的表达显著低于组内各时间点($P < 0.05$)。**结论** 电针可改善慢性脑缺血大鼠空间学习能力和记忆能力,提高慢性脑缺血大鼠海马 Noggin mRNA 的表达。

【关键词】 电针; 海马; 学习记忆

Effects of electro-acupuncture on learning and memory and the expression of Noggin mRNA in the hippocampus of rats with chronic cerebral ischemia Wei Jurui*, Liu Zhe, Liu Pei, Xia Wei, He Fang, Wu Jie, Chen Ping, Luo Bijun, Tan Shengguo, Wu Zhaoping. * Department of Comprehensive Rehabilitation, People's Hospital of Linan City, Linan 311300, China

Corresponding author: Liu Zhe, Email: srsliu@163.com

【Abstract】Objective To observe the effects of electro-acupuncture (EA) on learning, memory and the expression of Noggin mRNA in the hippocampus after cerebral ischemia. **Methods** One hundred and four male Sprague-Dawley (SD) rats were subjected to a modified form of permanent bilateral carotid artery ligation to produce a model of chronic cerebral ischemia. They were then randomly divided into a model group and an EA group, with 52 rats in each group. Each group was then subdivided into 1, 2, 4 and 6 weeks subgroups, with 13 rats in each subgroup. The EA group received EA administered to the Baihui (DU20) and Dazhui (BU14) acu-points; the model group received regular feeding only. The Morris water maze test was administered in both groups at 5 days before the rats were sacrificed. At the 1, 2, 4 and 6 week time points, 6 rats were selected from each subgroup randomly and the expression of Noggin mRNA in the hippocampus was detected using RT-PCR techniques. **Results** The Morris water maze test showed significantly lower escape latency in the EA group at 2, 4 and 6 weeks. Swimming time in the first quadrant was also significantly different at all time points. The average level of Noggin mRNA in the EA group was significantly higher than that in the model group at all of the time points. After 6 weeks, the average level of Noggin mRNA in the EA group was significantly lower than that at the other time points within the EA group. **Conclusion** EA can improve spatial learning and memory and elevate the expression of Noggin mRNA in the hippocampus in cases of chronic cerebral ischemia.

【Key words】 Electro-acupuncture; Hippocampus; Learning; Memory

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2014.03.001

基金项目:浙江省自然科学基金项目(Y205389),浙江省自然科学基金项目(Y2101356)

作者单位:311300 临安,浙江省临安市人民医院综合康复科(魏居瑞、何方、吴杰、陈萍、骆碧君、谈胜国、郭朝平);浙江中医药大学第三临床医学院(刘喆);浙江省海宁市第三人民医院针灸科(刘佩);郑州市中医院针灸科(夏玮)

通信作者:刘喆,Email: srsliu@163.com

慢性全脑缺血缺氧可引起记忆、认知障碍缺损,从而导致各种认知功能缺陷疾病的发生^[1]。海马是目前公认的与学习、记忆等高级神经功能活动密切相关的重要脑区,而缺血对海马的损伤是痴呆的主要病理基础。研究证实,成体大脑产生的神经干细胞(nerve stem cell, NSC)具有多向分化功能,且头蛋白(Noggin)在成体神经发生的微环境中发挥重要的作用^[1]。研究证实,电针可改善脑缺血引起的认知功能障碍,而课题组以往的研究发现,电针还可促进局灶性脑缺血后内源性神经干细胞的增殖^[2]。本研究旨在观察电针对慢性脑缺血大鼠学习记忆及海马 Noggin mRNA 表达的影响。

材料与方法

一、动物模型的制作及分组

选用 3 月龄无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级、健康、雄性 Sprague-Dawley (SD)大鼠 120 只,均购自中科院上海实验动物中心,饲养于浙江中医药大学实验动物中心,平均体重(230 ± 20)g。造模前,采用 Fric 等^[3]的方法行 Morris 水迷宫测试并记录所有大鼠的逃避潜伏期,然后在李巍等^[4]方法的基础上永久性结扎双侧颈总动脉加尾端放血制作慢性灌注不足的模型(制作过程中对该方法加以改进)。SD 大鼠 3% 戊巴比妥钠(40 mg/kg 体重)腹腔注射麻醉,然后取仰卧位固定于手术台上,充分暴露颈部,行正中切口约 1 cm,分离双侧颈总动脉后缝合结扎,然后将大鼠尾置于 50 °C 水中约 30 s 后,立即在距大鼠尾端约 0.7 cm 处剪尾放血,放血量为大鼠总血量的 10% (体重的 7.4%),按压止血并碘伏消毒,缝合切口后在采用碘伏消毒,并涂抹适量青霉素抗感染,然后将大鼠置于 37 °C 环境中,待其完全苏醒后再进行 1 次 Morris 水迷宫测试。

造模过程中因麻醉,刺激迷走神经,结扎等原因导致死亡 4 只,造模后第一天死亡 3 只, Morris 水迷宫检测死亡 4 只,剩余大鼠 109 只。通过造模前、后 Morris 水迷宫检测比较,以造模后大鼠逃避潜伏期明显延长为造模成功标准,剔除造模后逃避潜伏期无明显变化的 5 只大鼠,最终造模成功的大鼠为 104 只(86.67%)。造模成功后,2 组大鼠均常规饲养。将最终入选大鼠 104 只按随机数字表法分为模型组和电针组,每组 52 只,每组再根据取材的时间点分为造模成功后第 1、2、4、6 周 4 个亚组,每个时间点取 13 只大鼠。

二、治疗方法

电针组于造模成功后第一天开始电针治疗,固定大鼠头顶部,参照《实验针灸学》^[5]中大鼠穴位定位方法取百会穴和大椎穴,百会穴沿头顶正中线向后斜平

刺 0.2 cm,大椎穴直刺 0.5 mm。输出电流 1 mA,频率 15 Hz 连续波,时间 20 min。每日 1 次,连续治疗 7 d 后休息 2 d。模型组仅常规饲养,不给予电针治疗。

三、Morris 水迷宫神经行为学检测

各亚组大鼠均于处死前 5 d 行 Morris 水迷宫检测,连续 4 d 测试逃避潜伏期,每日 4 次,第 5 天进行定位航行实验(观察逃避潜伏期和游泳路径)和空间探索实验(观察规定时间内大鼠在池中的游泳路径即搜索策略)。水迷宫检测全过程通过安装在迷宫上方的摄像机传入电脑并记录和储存,再运用行为轨迹跟踪系统软件进行分析和数据处理。

四、逆转录-聚合酶链式反应半定量检测神经诱导因子 Noggin mRNA 的表达

每个亚组在对应的时间点(造模成功后第 1、2、4、6 周)按随机数字表法抽取 6 只大鼠(每个亚组剩余 7 只大鼠纳入另一项研究),然后采用逆转录-聚合酶链式反应(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)方法半定量检测 2 组大鼠海马中 Noggin mRNA 的表达情况。

预先将实验室温度控制在 18 °C,大鼠经 3% 戊巴比妥钠(40 mg/kg 体重)腹腔注射麻醉后在冰台上断头取脑,分离脑组织,取海马组织放入 2 ml 的微型离心(Eppendorf)管中,12 000 r/min,离心 5 min,然后置于 -80 °C 冰箱中储存。RT-PCR 检测神经诱导因子 Noggin mRNA 的含量,具体操作方法:①总 mRNA 提取按上海申能博彩生物有限公司提供 Trizole RNA 抽提试剂说明书进行。逆转录步骤根据逆转录试剂盒说明书进行。整个操作过程处于严格去蛋白和 RNA 条件下。Noggin 上游引物 5'-AGC ACC CAG CGA CAA CCT-3';Noggin 下游引物 5'-GCC ACA TCT GTA ACT TCC TCC T-3',扩增序列长度为 341 bp, Tm 值为 61.94 °C;β-actin 上游引物 5'-TGT ATG CCT CTG GTC GTA CCA C-3';β-actin 下游引物 5'-ACA GAG TAC TTG CGC TCA GGA-3',扩增序列长度为 460 bp, Tm 值为 58.00 ~ 60.07 °C。Noggin 反应条件:预变性 95 °C 5 min;变性 94 °C 30 s,退火 54.5 °C 40 s,延伸 72 °C 30 s,30 个循环,最后延伸 8 min,4 °C 保存至电泳。β-actin 反应条件:预变性 95 °C 5 min;变性 94 °C 30 s,退火 54.7 °C 40 s,延伸 72 °C 30 s,共 30 个循环,最后延伸 8 min,4 °C 保存至电泳。②产物分析:将扩增产物 10 μl 加入 2 μl 溴酚兰显色剂,在含溴化乙锭(0.15 μg/ml)的 1.6% 琼脂糖凝胶中电泳,电压 75 V,时间 45 min,使用 1 × Tris-硼酸缓冲液。电泳产物经紫外透射反射分析仪分析,比较各组条带的平均密度值,并以 β-actin 的平均密度值校正,以两者比值表示 mRNA 相对表达量。

五、统计学分析

采用 SPSS 11.5 版统计软件进行数据分析。数据以($\bar{x} \pm s$)表示,进行单因素方差分析(One-Way ANOVA),组间两两比较,方差齐性时用 LSD 检验,方差不齐时用 Dunnett-t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、Morris 水迷宫神经行为学检测

1. 定位航行实验:造模成功后第 2、4、6 周,电针组的逃避潜伏期分别为(23.8 ± 4.16)s、(23.7 ± 7.28)s、(22.26 ± 4.90)s,与模型组同时时间点的(32.21 ± 7.91)s、(32.91 ± 11.68)s、(30.11 ± 5.76)s 比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$),详见表 1 和图 1。

2. 空间探索实验:造模成功后第 2、4、6 周,电针组的第一象限内游泳时间分别为(31.96 ± 9.51)s、(34.43 ± 6.03)s、(36.51 ± 7.36)s,与模型组同时时间点的(19.82 ± 5.16)s、(22.65 ± 4.01)s、(27.79 ± 4.63)s 比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$),详见表 1。

表 1 2 组大鼠各时间点逃避潜伏期及第一象限内游泳时间比较(s, $\bar{x} \pm s$)

组别	只数	逃避潜伏期	第一象限内游泳时间
模型组	52		
造模后第 1 周	13	25.07 ± 6.44	15.62 ± 6.28
造模后第 2 周	13	32.21 ± 7.91	19.82 ± 5.16
造模后第 4 周	13	32.91 ± 11.68	22.65 ± 4.01
造模后第 6 周	13	30.11 ± 5.76	27.79 ± 4.63
电针组	52		
造模后第 1 周	13	27.52 ± 8.03	26.2 ± 7.91
造模后第 2 周	13	23.8 ± 4.16 ^a	31.96 ± 9.51 ^a
造模后第 4 周	13	23.7 ± 7.28 ^a	34.43 ± 6.03 ^a
造模后第 6 周	13	22.26 ± 4.90 ^a	36.51 ± 7.36 ^a

注:与模型组同时时间点比较,^a $P < 0.05$

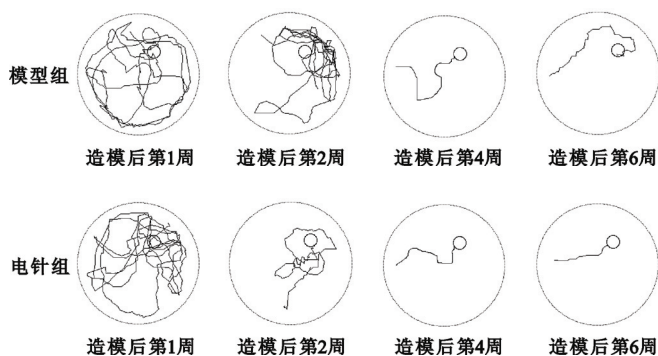


图 1 2 组大鼠 Morris 水迷宫实验大鼠运动轨迹图片

二、电针对海马组织 Noggin mRNA 表达的影响
不同时间点,2 组大鼠海马中的 Noggin mRNA 均

有表达,并且表达在造模初期较高(造模后第 1、2 周),随着时间的延长(造模后第 4、6 周),各组的 Noggin mRNA 表达逐渐减少,而电针组各时间点的 Noggin mRNA 水平均高于模型组同时时间点($P < 0.05$);造模后第 6 周,电针组 Noggin mRNA 的表达显著低于组内各时间点($P < 0.05$),详见表 2 和图 2。

表 2 2 组大鼠各时间点海马 Noggin mRNA 的表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	造模后第 1 周	造模后第 2 周	造模后第 4 周	造模后第 6 周
模型组	6	0.75 ± 0.06	0.70 ± 0.03	0.69 ± 0.08	0.62 ± 0.1 ^d
电针组	6	0.85 ± 0.03 ^{ab}	0.87 ± 0.04 ^{ab}	0.84 ± 0.06 ^{ab}	0.74 ± 0.07 ^a

注:与模型组同时时间点比较,^a $P < 0.05$;与组内造模后第 6 周比较,^b $P < 0.05$

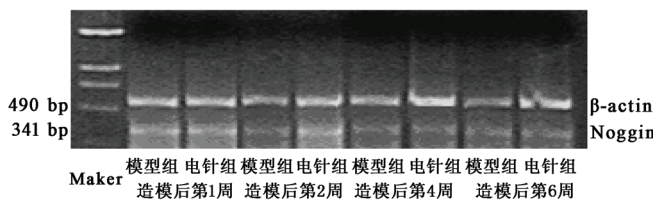


图 2 2 组大鼠海马 Noggin mRNA 电泳图

讨 论

海马在记忆过程中起重要作用,包括空间学习、对环境中物体的方位进行定位以及将不连续的信息连接起来,是外显记忆神经通路的重要组成成分,海马损伤会出现严重的记忆障碍^[6]。同时,海马直接参与了信息的贮存和回忆,是认知功能障碍研究中涉及最多的脑区之一,也是缺血性损伤最敏感的脑区,海马损伤可引起学习、记忆能力下降^[7-8]。海马 CA1 区神经元的迟发性死亡可能是缺血性脑血管病导致痴呆的主要原因^[9]。

发育学研究表明,不同发育阶段,Noggin 作为神经发育阶段的重要的胚胎蛋白,对不同脑区神经干细胞的增殖与分化有重要的调控作用^[10-12]。Noggin 基因对成年大鼠海马神经发生的调控也为一正性作用,这与 Noggin 对室下区干细胞的调控是一致的^[13]。运用反义寡核苷酸封闭内源性 Noggin 基因后,大鼠海马齿回 5-溴脱氧尿嘧啶核苷免疫阳性细胞数明显降低,并伴有星形胶质细胞的大量增生,提示内源性 Noggin 基因的转录抑制可降低海马齿回神经前体细胞的增殖,从而在空间记忆的形成和保留过程中起重要作用^[14]。Noggin 可促进海马神经干细胞的增殖,而 Noggin 作为在胚胎发育期的重要分子与拮抗骨形成蛋白-4,髓蛋白等组成复杂的信号网络,持续表达于生后乃至成年,对神经系统的发育、分化及可塑性具有重要的调控作用。

本研究在永久性结扎双侧颈总动脉加上尾端放血方法的基础上加以改进制作慢性灌注不足模型,可有效地模拟椎基底动脉狭窄、颈动脉粥样硬化斑块形成或各种慢性心脑血管疾患所致脑供血不足而引起的认知功能缺陷性疾病。研究发现,针灸治疗因慢性脑缺血引起的认知功能障碍的疗效确切,其可通过改善颅内血流动力学状态及血流变的高粘、高凝,清除氧自由基,阻断脂质过氧化反应,保护神经元结构和细胞器结构完整,同时针灸还可提高大脑皮层兴奋性,改善脑血流,增加脑血氧供应,以及调节神经递质特别是增加脑内乙酰胆碱的含量^[15-16]。课题组前期的研究发现,造模初期,模型组与电针组大鼠海马齿状回颗粒下层有大量神经细胞增殖,但是随着缺血时间的延长海马神经细胞数大量减少,相应的大鼠学习记忆能力减弱^[17];而本研究发现,Noggin mRNA 的表达与海马神经细胞的增殖趋势相似,Noggin mRNA 在造模后第 1、2 周表达最多,同时间点的电针组与模型组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),且随着造模后时间的延长呈递减趋势。本研究结果提示,电针可通过调节 Noggin 的表达调控海马神经细胞的增殖,这也间接证实了海马在学习记忆过程中的主导作用。本研究中,电针组的学习记忆能力和海马组织形态均优于模型组同时间点,提示电针可通过保护海马神经细胞来改善学习记忆能力和海马组织 Noggin 的表达。

电针改善缺血性脑损伤的主要作用机制之一可能是通过多种途径激发海马神经细胞自身参与脑神经结构和功能的自身修复来实现的^[2-3]。在将来的研究中,课题组将分析电针对海马神经干细胞的增殖、分化作用,以期更客观、深入地揭示电针对缺血性脑病的作用机制。

参 考 文 献

[1] Ming GL, Song H. Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system[J]. Annu Rev Neurosci,2005,28(1):223-250.
 [2] 刘喆,赖新生. 电针对局灶性脑缺血大鼠神经干细胞巢蛋白表达

的影响. 中华物理医学与康复杂志[J],2005,10(27):591-594.
 [3] Frick KM, Baxter MG, Markowska AL, et al. Age-related spatial reference and working memory deficits assessed in the water maze[J]. Neurobiol Aging,1995,16(2):149-160.
 [4] 李巍,张世仪,赵惠敏,等. 小鼠缺血性学习记忆障碍模型的建立[J]. 基础医学与临床,1995,15(6):46.
 [5] 李忠仁. 实验针灸学[M]. 北京:中国中医药出版社,2003:327.
 [6] 万选才,杨天祝,徐承焘. 现代神经生物学[M]. 北京:北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社,1999:537.
 [7] 张雪朝,贺志光,吕明庄,等. 血管性痴呆大鼠记忆障碍与海马 Bcl22 蛋白表达的研究[J]. 中国病理生理,2002,18(10):1294-1295.
 [8] 叶建新,崔晓萍,林航,等. 海马锥体细胞的变化对血管性痴呆大鼠学习记忆能力的影响[J]. 精神疾病和精神卫生,2008,3(10):187-189.
 [9] 赵建新,田元祥,李国明,等. 脑缺血再灌注拟血管性痴呆小鼠皮层及海马细胞病理形态学动态观察[J]. 中风与神经疾病,2000,17(4):200-202.
 [10] Waschek JA. Noggin on heaven's door: a factor that promotes the selective production of serotonergic neurons from murine embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells[J]. J Neurochem,2012,122(1):1-3.
 [11] Mira H, Andreu Z, Suh H, et al. Signaling through BMPR-IA regulates quiescence and long-term activity of neural stem cells in the adult hippocampus[J]. Cell Stem Cell,2010,7(1):78-89.
 [12] Krause C, Guzman A, Knaus P. Noggin[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2011,43(4):478-481.
 [13] 王勇,陆长青,王凡. 神经干细胞增殖分化调控因素的研究进展[J]. 四川解剖学杂志,2004,12(4):299-301.
 [14] Fan X, Xu H, Cai W, et al. Spatial and temporal patterns of expression of Noggin and BMP4 in embryonic and postnatal rat hippocampus[J]. Brain Res Dev Brain Res,2003,146(12):51-58.
 [15] 彭唯娜,赵宏,刘志顺,等. 电针治疗血管性痴呆的系统评价[J]. 中国针灸,2004,24(5):297-232.
 [16] 赵惠,孙忠人,孙远征,等. 原络配穴为主治疗血管性痴呆疗效观察[J]. 中国针灸,2004,24(8):525-527.
 [17] 魏居瑞,刘喆,刘佩,等. 电针对慢性脑缺血大鼠学习记忆及海马神经组织形态学影响[J]. 中华物理医学与康复杂志,2011,33(8):36-39.

(修回日期:2014-01-17)

(本文编辑:阮仕衡)

· 外刊文献题录 ·

脑损伤后认知康复最新文献题录(一)

[1] Tajiri N, Acosta SA, Shahaduzzaman M, et al. Intravenous transplants of human adipose-derived stem cell protect the brain from traumatic brain injury-induced neurodegeneration and motor and cognitive impairments; cell graft biodistribution and soluble factors in young and aged rats. J Neurosci,2014,34(1):313-326.
 [2] Gould KR, Ponsford JL, Spitz G. Association between cognitive impairments and anxiety disorders following traumatic brain

injury. J Clin Exp Neuropsychol,2014,36(1):1-14.
 [3] Bird J, Parente R. Recognition of nonverbal communication of emotion after traumatic brain injury. Neuro Rehabilitation, 2014,34(1):39-43.
 [4] Zonfrillo MR, Durbin DR, Winston FK, et al. Residual cognitive disability after completion of inpatient rehabilitation among injured children. J Pediatr,2014,164(1):130-135.