

·基础研究·

电针对血管性痴呆大鼠海马脑源性神经营养因子 mRNA 表达及学习记忆的影响*

刘 佩¹ 刘 喆^{2,5} 魏居瑞³ 夏 玮⁴

摘要

目的:通过观察电针后血管性痴呆(VD)大鼠不同时相海马脑源性神经营养因子(BDNF) mRNA 表达的变化规律,探讨电针改善VD大鼠学习记忆的可能机制。

方法:通过结扎大鼠双侧颈总动脉,制成VD模型,分为1周组,2周组,4周组和6周组,其中每一组又分为电针组和模型组,用RT-PCR法检测各组BDNF mRNA 表达的变化规律,观察电针的影响,并通过Morris水迷宫来观察各组神经行为学的改变。

结果:经统计分析发现同时相电针组与模型组相比,电针组海马BDNF mRNA随着时间的延长表达升高($P < 0.05$),而且与模型组相比,电针组大鼠的学习记忆能力比模型组好($P < 0.01, P < 0.05$)。

结论:电针能够促进海马BDNF mRNA的表达,可能是针灸治疗治疗VD,改善VD大鼠症状的可能机制之一。

关键词 血管性痴呆;电针;脑源性神经营养因子;学习记忆

中图分类号:R743,R493 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2013)-09-0822-04

Effects of electro-acupuncture on the expression of brain derived neurotrophic factor mRNA and learning and memory in rats with vascular dementia/LIU Pei,LIU Zhe,WEI Jurui,et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2013, 28(9): 822—825

Abstract

Objective: To observe the pattern of expression of brain derived neurotrophic factor(BDNF) mRNA in hippocampus in different time phase after electro-acupuncture(EA) treatment in rats with vascular dementia(VD) and to explore the possible mechanism of EA improving the abilities of learning and memory in VD rats.

Method: The rats model of VD induced by 2-VO were randomly divided into 1week and, 2, 4, 6weeks model group, each group was subdivided into model group and EA group. The changing pattern of BDNF mRNA expression in each group were tested by RT-PCR, and the changes of learning and memory abilities of VD rats in each group were observed by Morris water maze.

Result: Compared with model group in the same time phase, the expressions of BDNF mRNA of EA groups improved and increased with the time prolonging compare with model group($P < 0.05$), the learning and memory abilities of EA group were better than that of model group($P < 0.01$ or $P < 0.05$).

Conclusion: EA can prompt the expression of BDNF mRNA in hippocampus, this may be one of the mechanisms of EA improving the symptoms of VD.

Author's address Dept. of Acupuncture, Haining Hospital of People's Hospital of Zhejiang Province,314408

Key word vascular dementia; electro-acupuncture; brain-derived neurotrophic factor; learning and memory

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2013.09.007

*基金项目:浙江省自然科学基金项目(Y205389);浙江省中医药科研基金(2006C009)

1 浙江省人民医院海宁医院针灸科,浙江省海宁市长安镇修川路5号,314408; 2 浙江省中医药大学第三临床医学院; 3 浙江省临安市人民医院综合康复科; 4 郑州市中医院针灸科; 5 通讯作者

作者简介:刘佩,女,住院医师; 收稿日期:2012-11-03

血管性痴呆(vascular dementia, VD) 是发生在脑血管病基础上的以记忆、认知功能缺损为主的获得性智能的持续性损害,越来越成为影响中老年人健康和生存质量的常见病、多发病,并且随着我国人口老龄化的不断发展,将给社会和家庭带来沉重负担。

脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF) 是神经生长因子家族的成员之一,1982年由Barde等从猪脑中成功分离出来。研究人员发现,BDNF不但可以促进神经细胞增殖或延长其存活时间^[1],从而可预防脑缺血时的神经元死亡,改善预后;而且BDNF能增强海马神经元兴奋性^[2],促进突触的可塑性,改变脑内神经元的形态,增加突触终末的密度和促进树突和轴突的生长^[3];BDNF还参与了学习的可塑性机制和长时程增强效应^[4-5],对学习记忆功能起重要作用。本实验通过永久性结扎双侧颈总动脉(2-VO)制作出VD模型,给予电针治疗后取出海马组织,用RT-PCR方法检测海马BDNF含量,探讨电针治疗VD,改善VD学习记忆的机制,为针灸治疗VD提供治疗依据。

1 材料与方法

1.1 动物分组

SPF级SD健康成年大鼠120只,体重230—280g,月龄3—6个月,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。动物造模后根据随机数字表将实验动物分为1周组,2周组,4周组,6周组,每组动物根据随机数字表再分为电针组和模型组。

1.2 VD动物模型的制作

大鼠称重后,用3%戊巴比妥钠(40mg/kg体重)腹腔注射麻醉,麻醉后将大鼠仰卧固定于手术台上,固定时充分暴露颈部,行正中切口,切口约1cm,分离双侧颈总动脉,4号缝合线结扎,然后将大鼠尾置于50℃水中约30s后,立即在距大鼠尾端约0.7cm处剪尾放血,放血量为大鼠总血量的10%(占体重的7.4%),按压止血PV碘消毒,缝合切口并用PV碘消毒,并撒适量的青霉素-钠抗感染,再将大鼠置于37℃环境中待其完全苏醒后分组并予以处理。

1.3 处理方法

电针组在造模后第一天开始不同时间的治疗,穴位参照《实验针灸学》^[6]中大鼠穴位定位方法取“百会”穴(顶骨正中处)和“大椎”穴(第七颈椎背侧凹陷略下处),选取“百会、大椎”用0.5寸针灸针针刺穴位,“百会”穴刺法:从“百会”穴沿头顶正中线向后平刺0.5—1cm;“大椎”穴刺法:从“大椎”穴沿颈背部正中线向前平刺0.5—1cm。将韩氏穴位神经刺激仪由粘皮肤电极的输出线更换为鳄鱼头夹子的输出线后连接两穴位针灸针,调节刺激参数:输出电流1mA左右,一般大鼠头部会出现轻微抖动,频率15Hz连续波,时间20min。每天1次,治疗7次后休息2d。模型组采取和电针组同样的抓取方式但不给予电针治疗。

未进行BrdU标记的大鼠(每组6只)分别于不同时间处死,用3%戊巴比妥钠(40mg/kg体重)腹腔注射麻醉,待大鼠完全麻醉后断头处死,并于冰台上取出海马组织保存于-80℃。其余进行免疫组化的大鼠用其他方法操作处死,以备进行免疫组化。

1.4 指标检测

1.4.1 神经行为学观察:Morris水迷宫检查:定位航行实验:逃避潜伏期和游泳路径(搜索策略)。空间探索实验:观察规定时间内大鼠在池中的游泳路径(搜索策略)。每组动物于缺血后不同的时点开始连续进行4d的训练测试,每天4次;第5天去除平台,进行1min的空间探索测试。上述内容通过与安装在迷宫上方的摄像机相联的PC机Windows平台上观察并记录、储存,并运用行为轨迹跟踪系统软件(MTApp)进行分析和数据处理。

1.4.2 RT-PCR法半定量检测VD大鼠海马BDNF mRNA的含量:采用半定量RT-PCR方法。用Trizol试剂盒提取RNA,逆转录成cDNA产物,保存于-4℃备用。PCR上、下游引物通过网站(www.genome.wi.mit.edu)提供的引物设计程序(primer 3.0)设计。

BDNF上游引物:5'-CAG TAT TAG CGA GTG GGT CA -3',

下游引物:5'-CCG AAC ATA CGA TTG GGT-3',产物223bp;

β -actin上游引物:5'-TGT ATG CCT CTG GTC GTA CCA C,

下游引物:5'-ACA GAG TAC TTG CGC TCA GGA-3'。

PCR 扩增:BDNF 反应条件:95℃预变性 3 min, 94℃变性 30s, 53.5℃退火 40s, 72℃延伸 30s, 循环 28 次, 72℃延伸 8min, 4℃保存至电泳。β-肌动蛋白反应条件:95℃预变性 5min;变性 94℃30s,退火 54.7℃40s,延伸 72℃30s, 30 个循环。最后延伸 8min,4℃保存至电泳。

将扩增产物 10μl 加入 2μl 溴酚蓝显色剂,在含 EB(0.15 μg/ml)的 1.6%琼脂糖凝胶中电泳,电压 75V,时间 45min,使用 1×TBE 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-肌动蛋白的平均密度值校正,以两者比值表示 mRNA 相对表达量。

1.5 统计学分析

采用 SPSS11.5 统计软件分析。统计数据按照均数±标准差形式描述,进行单因素方差分析,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。

2 结果

Morris 水迷宫神经行为学检测结果见表 1。RT-PCR 半定量检测缺血后不同时相 BDNF mRNA 相对含量见表 2。

同时相电针组和模型组相比较,电针组 BDNF mRNA 的相对含量均高于模型组,1 周组之间的差异无显著性意义,2 周、4 周、6 周组电针组,差异有显著性(*P* < 0.05)。见图 1。

表 1 不同时相电针干预后的各组平均逃避潜伏期和第一象限的时间 ($\bar{x}\pm s, s$)

组别	鼠数	1 周	2 周	4 周	6 周
平均逃避潜伏期					
电针组	6	27.52 ± 8.03	32.21 ± 7.91	32.91 ± 11.68	30.11 ± 5.76
模型组	6	25.07 ± 6.44	23.8 ± 4.16 ^①	23.7 ± 7.28 ^②	22.26 ± 4.90 ^①
第一象限的时间					
电针组	6	15.62 ± 6.28	19.82 ± 5.16	32.91 ± 11.68	30.11 ± 5.76
模型组	6	26.2 ± 7.91 ^①	31.96 ± 9.51 ^①	34.43 ± 6.03 ^①	36.51 ± 7.36 ^{①②}

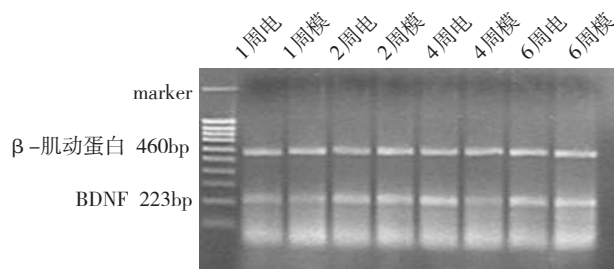
①同时相电针组和模型组相比较 *P* < 0.05;②同时相电针组和模型组相比较 *P* < 0.01

表 2 大鼠缺血不同时 BDNFmRNA 相对含量 ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	1 周	2 周	4 周	6 周
电针组	6	0.86 ± 0.08	0.92 ± 0.03 ^①	0.94 ± 0.05 ^①	0.85 ± 0.02 ^{①②③}
模型组	6	0.76 ± 0.07	0.86 ± 0.03	0.84 ± 0.02	0.82 ± 0.02

①同时相电针组和模型组相比较 *P* < 0.05;②与 2 周电针组相比较 *P* < 0.05;③与 4 周电针组相比较 *P* < 0.05

图 1 RT-PCR 法分析大鼠海马 BDNF、β-actin 蛋白电泳图



3 讨论

血管性痴呆是由脑血管因素导致脑组织损害引起的痴呆综合征,包括缺血性脑卒中、急或慢性缺血性等脑血管病变引起的痴呆。血管性痴呆与脑缺血、缺氧的关系很密切,而决定神经元命运的不仅是缺氧而是涉及许多复杂的机制。近年来研究发现短暂脑缺血后早期 BDNF 的表达是上调的,阳性细胞表达主要集中在缺血周围区的神经元、神经胶质细胞且 BDNF 的表达有时间依赖性。提示 BDNF 的表达增加对促进缺血周围区的损伤修复有重要作用^[7-8]。而且,电针能够提高神经生长因子及 BDNF 在缺血灶周围脑皮质中的表达,对脑缺血损伤具有一定的保护作用^[9-10]。

目前,大量的实验研究证明^[11]:①改变突触可塑性形成机制,可影响学习与记忆;②在学习记忆的相关脑区可见突触可塑性的形成;③在特定环境中,诱导或增强突触可塑性,同样可促进或易化学习与记忆。赵晖等^[12]的研究表明提高突触可塑性可以改善 VD 大鼠的学习记忆能力。突触可塑性需要局部蛋白的合成,在海马神经元培养系中,BDNF 可刺激树突中的一些蛋白合成,未用 BDNF 处理的神经元中无此作用^[13]。已知前脑胆碱能神经元的退变以及皮质和海马乙酰胆碱的减少是老年性认知功能障碍的重要原因,陈明等^[14]的实验研究提示,增强大鼠海马胆碱能神经元的乙酰转移酶对 VD 大鼠的记忆损害有一定程度的保护作用。BDNF 能支持胆碱能细胞的生存和上调这些细胞胆碱乙酰转移酶的表达。French 等^[13]发现 BDNF 能加强大鼠海马突触体乙酰胆碱的释放,从而对认知功能有保护作用。BDNF 能够调节突触传递易化 LTP,而且 LTP 首先在海马发现,这是突触传递可塑性的证据,并已成为研究学习

记忆过程的突触模式。Dragunow证实BDNF和其受体TrkB诱导海马颗粒细胞产生持久的长时程抑制,表明它们在记忆形成中起着重要作用^[16]。

长久以来针灸对其治疗VD的作用机制尚待研究。本实验从BDNF入手探讨电针治疗VD,改善VD大鼠的学习记忆能力的可能机制。发现经过电针治疗后大鼠的学习记忆能力有所提高,与同时相模型组相比大鼠的逃避潜伏期(空间学习能力),2周电针组好于2周模型组($P < 0.05$),4周电针组明显好于4周模型组($P < 0.01$),6周电针组好于6周模型组($P < 0.05$);与同时相模型组相比,各组大鼠在第一象限的时间(空间记忆能力),电针组都高于模型组($P < 0.05$)。由此可见,随着时间的延长电针能够有效的改善VD大鼠的学习记忆能力。同时从RT-PCR的结果我们也可以发现同样的规律,与同时相模型组相比,电针组海马BDNF mRNA的表达都升高($P < 0.05$),说明电针可以提高海马BDNF mRNA的含量。提示电针改善VD大鼠的学习记忆能力是通过促进海马BDNF mRNA的表达来实现的,可能是针灸治疗VD的机制之一。

参考文献

- [1] Pringle AK, Sundstrom LE, Wilde GJ, et al. Brain-derived neurotrophic factor, but not neurotrophin-3, prevents ischaemia-induced neuronal cell death in organotypic rat hippocampal slice cultures[J]. *Neurosci Lett*, 1996,211:203—206.
- [2] 李冠华,庞立伟,周建平,等.PTD-BDNF对海马神经性突触活动的作用[J].*中国新药杂志*,2008,17(6):468—471.
- [3] Mertz K, Koscheck T, Schilling K. Brain derived neurotrophic factor modulates dendritic morphology of cerebellar basket and stellate cells[J]. *Aninviron study. Neur Science*,2000,97 (2):303—310.
- [4] Figurov A, Pozzo Miller LD, Olafsson P, et al. Regulation of synaptic responses to high frequency stimulation and LTP by neurotrophins in the hippocampus[J]. *Nature*,1996,381(6584):706—709.
- [5] GooneyM, Lynch MA. Long-term potentiation in the dentate gyrus of the rat hippocampus is accompanied by brain-derived neurotrophic factor-induced activation of TrkB[J]. *J Neurochem*,2001,77(5): 1198—1207.
- [6] 李忠仁. 实验针灸学[M].北京:中国中医药出版社,2003.327.
- [7] 徐冰,田园萍. 脑源性神经营养因子在脑缺血损伤修复反应中的作用[J]. *中国医报*,2007,4(3):23—25.
- [8] 徐晓晓,周江堡.BDNF对新生鼠缺血缺氧性脑损伤的保护作用的研究[J].*重庆医科大学学报*,2010,35(11):1642—1645.
- [9] 陈英辉,黄显奋. 电针对MCAO大鼠皮层神经营养因子表达的影响[J].*中风与神经疾病杂志*,2000,17:139—141.
- [10] 郭宗君,王鲁民.电针刺激神经干对脑缺血再灌注后不同时期皮层BDNF mRNA表达的影响[J].*中华物理医学与康复杂志*,2004,26(10):585—588.
- [11] 许世彤,区莫琦.突触功能的习得性长时程增强——记忆的可能神经基础[J]. *广东生理学通报*,1998,5(1):1—2.
- [12] 赵晖,王少烽,张秋霞,等.丰富环境干预对慢性低灌注血管性痴呆大鼠学习记忆及突触蛋白和微管相关蛋白的影响[J].*中国康复医学杂志*,2012,(8):687—691.
- [13] Aakalu G, Smith WB, Nguyen N, et al. Dynamic visualization of local protein synthesis in hippocampal neurons[J]. *Neuron*,2001,30(2):489—502.
- [14] 陈明,宋焱峰,侯一平,等. 植物雌激素对去卵巢血管性痴呆大鼠认知功能和海马胆碱乙酰转移酶表达的影响[J].*中国康复医学杂志*,2011,(4):351—356.
- [15] French SJ, Humby T, Horner CH, et al. Hippocampal neurotrophin and Trk receptor mRNA levels are altered by local administration of nicotine, carbachol and pilocarpin[J]. *Molecular Brain Res*,1999,67:124—136.
- [16] Dragunow M, Hughes P, Mason-Parker SE, et al. TrkB expression in dentate granule cells is associated with a late phase of long-term potentiation[J]. *Mol Brain Res*, 1997,46:274—280.