

电针对脑缺血再灌注大鼠学习记忆功能及海马组织Nogo-A/NgR表达的影响*

陈吉祥¹ 林浴坤¹ 吴羽楠¹ 周一平¹ 林如辉² 陶 静¹ 陈立典^{3,4}

摘要

目的:观察电针对脑缺血再灌注大鼠学习记忆功能及海马组织Nogo-A/NgR表达的影响,探讨电针治疗脑卒中后认知功能障碍的作用机制。

方法:将45只雄性SD大鼠随机分为假手术组、模型组和电针组,每组均15只。模型组和电针组参照Longa线栓法建立大鼠局灶性脑缺血再灌注模型。电针组针刺“百会穴”和“神庭穴”,共干预7天;假手术组和模型组在同等条件下饲养和抓取。利用Morris水迷宫实验评估大鼠的学习记忆功能;TTC染色法观察脑梗死体积;免疫印迹法检测脑梗死侧海马组织Nogo-A及其受体NgR的表达。

结果:与模型组相比,电针组大鼠逃避潜伏期和找到平台所经过的路程缩短,跨越平台次数增加($P<0.05$);电针组大鼠脑梗死体积减小($P<0.05$);电针组大鼠海马区Nogo-A及其受体NgR的表达量降低($P<0.05$)。

结论:电针可改善脑缺血再灌注大鼠的学习记忆功能,其作用机制可能与抑制脑梗死侧海马组织中Nogo-A及其受体NgR的表达有关。

关键词 电针;脑缺血;学习记忆;Nogo-A;NgR

中图分类号:R245;R743.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2015)-03-0219-05

Effects of electroacupuncture on learning and memory and the expression of Nogo-A and NgR in rats with focal cerebral ischemia-reperfusion/CHEN Jixiang,LIN Yukun,WU Yunan,et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2015, 30(3): 219—223

Abstract

Objective: To investigate the effects of electroacupuncture on learning and memory and Nogo-A/NgR expression in hippocampus of rats with focal cerebral ischemia-reperfusion.

Method: Forty-five male adult SD rats were randomly divided into the sham operation control group (SC group), the ischemia model group (IC group) and the electroacupuncture group (EA group), $n=15$ for each group. The focal cerebral ischemia-reperfusion model was setup by suture method in IC and EA groups. The rats of EA group received electroacupuncture treatment at Shenting (DU24) and Baihui (DU20) for 7 days. Learning and memory ability was tested by Morris water maze. The cerebral infarct volume was assessed using TTC staining and Western blot was performed to evaluate the expression of Nogo-A and NgR in hippocampus of the cerebral ischemia side.

Result: The latency and route distance for rats to reach the hidden platform were markedly decreased in EA group compared with that in IC group in the Morris water maze test, whereas the times that rats crossed the location of the platform were significantly increased ($P<0.05$ versus IC group). TTC staining showed that electroacupuncture treatment profoundly reduced cerebral infarct volumes compared with that of IC group ($P<$

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2015.03.003

*基金项目:福建省康复技术协同创新中心资助项目(X2012004-协同)

1 福建中医药大学康复医学院,福州,350108; 2 福建省康复技术协同创新中心; 3 福建中医药大学; 4 通讯作者

作者简介:陈吉祥,男,硕士研究生; 收稿日期:2014-10-15

0.05)。Furthermore, the expression of Nogo-A and NgR in the hippocampus of the cerebral ischemia side was significantly downregulated in EA group ($P<0.05$, versus IC group)。

Conclusion: Learning and memory of rats with focal cerebral ischemia-reperfusion could be improved with electroacupuncture treatment. The mechanism might be based on the inhibition of the expression of Nogo-A and NgR.

Author's address Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, 35012

Key word electroacupuncture; cerebral ischemia; learning and memory; Nogo-A; NgR

认知功能障碍是脑卒中后常见的功能障碍,随着脑卒中患者的死亡率降低、生存时间延长以及人口的老齡化,认知功能障碍成为阻碍脑卒中患者重新回归社会的主要因素之一^[1]。研究表明,神经生长抑制因子Nogo-A及其受体NgR与认知功能关系密切,采用特异性抗体或者基因敲除技术抑制Nogo-A及其受体NgR的表达,可以促进轴突生长、增强突触传递效率从而改善认知功能^[2-3]。本研究观察电针对脑缺血再灌注大鼠学习记忆功能及海马组织Nogo-A和NgR的影响,探讨电针治疗脑卒中后认知功能障碍的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

45只雄性健康成年无特殊病原体(SPF)级SD大鼠,由上海斯莱克实验动物责任有限公司提供[生产许可证码:SCXK(沪)2012-0002],平均体重(230 ± 20)g,饲养于福建中医药大学实验动物中心SPF环境中,实验前适应性饲养1周。实验过程严格按照国际动物保护和使用指南的规定进行。

1.2 主要实验试剂及仪器

TTC(2,3,5-氯化三苯基四氮唑):sigma;Nogo-A及NgR抗体:Santa Cruz; β -actin抗体及相应二抗:Cell Signaling Technology;Morris水迷宫:中国医学科学院药物研究所;Bio-Image分析系统:Bio-Rad。

1.3 动物分组和模型制备

将大鼠随机分成假手术组、模型组和电针组,每组15只,3组大鼠在体重、鼠龄等一般情况方面无显著性差异($P>0.05$),具有可比性。

模型组和电针组参照Longo等^[4]报道的方法建立大鼠局灶性脑缺血再灌注模型。具体方法:术前所有实验动物禁食12h,大鼠称重后,用10%水合氯

醛(3ml/kg)腹腔麻醉,仰卧位固定、消毒、备皮,切开颈部正中皮肤,充分暴露并钝性分离左侧颈总动脉、颈外动脉及颈内动脉。在颈内、外动脉分叉处结扎颈外动脉,在近心端结扎颈总动脉。用动脉夹夹闭颈内动脉,然后在颈总动脉结扎处远端约3mm处剪一小口,将备好的线栓经切口导入约18—22mm,撤去颈内动脉血管夹,缓慢推动栓线至大脑前动脉近端。固定栓线,缝合伤口,待缺血2h后回抽栓线至颈总动脉分叉处,形成缺血再灌注模型。假手术组只分离动脉,不结扎、插线。

手术结束后,动物放置于恒温(24℃)环境下苏醒,苏醒后予正常喂养。模型制备成功的判断标准:大鼠麻醉清醒后行神经行为学评分,0分:无神经功能缺失症状;1分:提尾倒悬时不能完全伸展右侧前爪;2分:行走时向偏瘫侧转圈(向右侧转圈);3分:行走时向右侧倾倒;4分:不能自发行走,意识丧失。评分1—3分的大鼠可用于研究。剔除死亡和造模不成功的大鼠,最终各组大鼠为假手术组(15只)、模型组(13只)和电针组(14只)。干预前模型组和电针组的神经行为学评分分别为:模型组(2.43 ± 0.56)、电针组(2.46 ± 0.49),差异无显著性意义($P>0.05$),具有可比性。

1.4 干预方法

电针组采用捆绑固定法固定大鼠,参考《实验针灸学》^[5]取大鼠神庭和百会穴,使用华佗牌30号0.5寸毫针,斜刺0.2—0.3cm,应用G6805电针仪,电压峰值6V,以针体轻轻抖动为度,疏密波,频率1—20Hz。每次30min,每天1次,共治疗7d。手术后第2天开始治疗,直至动物被处死。假手术组及模型组以同样方法固定30min,但不进行电针刺激。

1.5 Morris水迷宫实验

各组大鼠均于处死前5d行Morris水迷宫检测,连续4d进行定位航行实验,观察逃避潜伏期和游泳

路径,每天4次,第5天进行空间探索实验,观察规定时间内大鼠穿越平台的次数。具体实验包括:定位航行实验——将受试大鼠按顺时针方向依次由第一象限、第二象限、第三象限、第四象限入水点顺序面向池壁放入水中。记录90s内寻找平台的时间(逃避潜伏期)。如果大鼠在90s内找到平台,并停留3s以上,记录90s中内实际逃避潜伏期;如果在90s内未找到平台,由实验者将其引上平台并停留10s,逃避潜伏期记录为90s。历时4d,每天4次。②空间探索实验——定位航行实验全部结束后,次日进行空间探索实验。撤去平台,然后选第一象限与定位航行实验相同的入水点将大鼠面向池壁放入水中,分别记录90s内大鼠穿越原平台相应位置的次数。水迷宫监测全过程,通过安装在水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。

1.6 TTC染色

每组取5只大鼠经左心室灌注生理盐水,随后迅速断头取脑,放入-20℃冰箱中冷冻20min,去除嗅部、小脑及低位脑干,在视交叉处前后等分间隔2mm连续作6个脑冠状切片;将脑冠状切片放入提前预热的37℃、2% TTC溶液中,恒温水浴锅避光染色30min;染色完成后,梗死部分被染成白色,未梗死区域被染成红色;将脑片浸泡于4%多聚甲醛溶液中固定2h。脑组织固定后,用高分辨率数码相机拍照,使用Motic Med 6.0系统软件测量每片脑组织脑梗死体积(梗死体积=每个脑片梗死面积×2mm),每个脑组织梗死的总体积由连续切割的6片脑组织的梗死体积相加所得。最后计算出梗死总体积/整个大脑体积百分比,以此结果做统计分析。

1.7 蛋白免疫印迹法

取大鼠缺血侧海马组织,每100mg脑组织中加入1mL的细胞裂解液和10μl PMSF储存液,研磨均匀后静置30min,取上清,4℃离心,13000r/min,5min,吸取上清,BCA测定蛋白浓度。加入上样缓

冲液加热变性后,SDS-PAGE电泳,转移至PVDF膜上。用5%脱脂奶粉室温封闭2h,分别加入抗Nogo-A(1:200)、NgR(1:200)和β-actin(1:5000)抗体孵育,4℃过夜,加入相应二抗(1:5000)室温60min。避光配置显色液并覆盖PVDF膜,反应1min后运行Bio-Image分析系统显影成像及Image-Pro Plus软件对扫描图像的目的条带进行灰度值分析。以β-actin为内参,按公式计算目的蛋白相对含量:目的蛋白相对含量=目的蛋白灰度值/β-actin灰度值。

1.8 统计学分析

应用SPSS18.0软件进行统计学处理,所得数据均以均数±标准差表示。计量资料采用单因素方差分析。 $P<0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 电针改善脑缺血再灌注大鼠学习记忆能力

造模成功后第3天开始定位航行实验,连续4天,结果发现与假手术组相比,模型组大鼠平均逃避潜伏期和找到平台所经过的路程均延长,差异具有显著性意义($P<0.05$)。与模型组相比,电针组大鼠平均逃避潜伏期和找到平台所经过的路程则缩短,差异具有显著性意义($P<0.05$),结果见表1—2。造模成功后第7天进行空间探索实验,结果发现模型组大鼠跨越平台次数与假手术相比降低,而电针组大鼠跨越平台次数比模型组增加,差异均有显著性意义($P<0.05$),结果见表3。

2.2 电针减少脑缺血再灌注大鼠脑梗死体积

如图1所示,假手术组正常脑组织染色为红色,模型组和电针组脑组织均可见不同程度梗死灶苍白组织。结果如表4所示,与模型组比较,电针组大鼠脑梗死体积明显减少,差异有显著性意义($P<0.01$)。

2.3 电针抑制缺血侧海马组织Nogo-A及其受体NgR的表达

通过蛋白免疫印迹法(Western blot)检测梗死

表1 各组大鼠的逃避潜伏期

($\bar{x}\pm s, s$)

组别	动物数	第1天	第2天	第3天	第4天
假手术组	15	43.85±9.35	30.17±12.13	17.60±5.53	16.61±3.44
模型组	13	72.80±15.78 ^①	57.92±14.16 ^①	52.91±11.13 ^①	50.30±8.32 ^①
电针组	14	57.94±7.36 ^②	37.44±13.11 ^②	33.78±14.03 ^②	27.04±12.72 ^②

与假手术组相比① $P<0.05$;与模型组相比② $P<0.05$

侧海马组织中Nogo-A及其受体NgR的表达。结果发现,与假手术组相比,模型组大鼠Nogo-A及其受体NgR的表达升高,差异具有显著性意义($P<$

0.05);与模型组相比,电针组大鼠梗死侧海马组织Nogo-A及其受体NgR的表达下降,差异具有显著性意义($P<0.05$),结果见表5和图2。

表2 各组大鼠寻找平台所经过的路程

 $(\bar{x}\pm s, \text{cm})$

组别	动物数	第1天	第2天	第3天	第4天
假手术组	15	544.98±94.72	429.81±130.03	258.45±64.59	220.87±47.35
模型组	13	1019.67±148.54 ^①	977.12±187.93 ^①	856.90±175.38 ^①	610.92±80.92 ^①
电针组	14	814.80±158.99 ^②	613.77±161.22 ^②	549.63±209.36 ^②	462.07±196.89 ^②

与假手术组相比^① $P<0.05$;与模型组相比^② $P<0.05$

表3 各组大鼠空间探索实验中跨越平台次数 $(\bar{x}\pm s, \text{次})$

组别	动物数	跨越平台次数(次)
假手术组	15	3.92±1.48
模型组	13	0.96±0.66 ^①
电针组	14	2.75±1.13 ^②

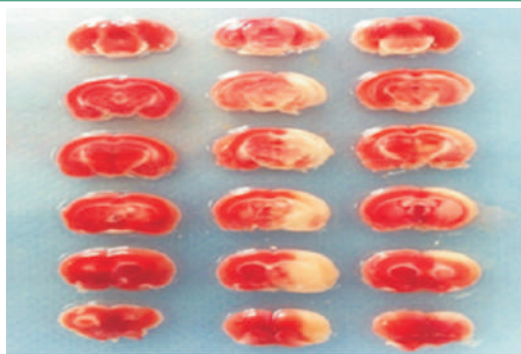
与假手术组相比^① $P<0.05$;与模型组相比^② $P<0.05$

表5 各组大鼠缺血侧海马组织Nogo-A及其受体NgR的相对表达量 $(\bar{x}\pm s)$

组别	动物数	Nogo-A	NgR
假手术组	10	0.43±0.16	0.35±0.17
模型组	8	0.72±0.23 ^①	0.59±0.15 ^①
电针组	9	0.48±0.19 ^②	0.40±0.11 ^③

与假手术组相比^① $P<0.01$;与模型组相比^② $P<0.05$,^③ $P<0.01$

图1 各组脑组织冠状面TTC染色



假手术组 模型组 电针组

图2 Western blot法检测各组大鼠缺血侧海马组织Nogo-A及其受体NgR的表达情况



3 讨论

认知功能障碍是脑卒中后常见的功能障碍,有

表4 各组大鼠脑梗死体积占全脑体积的百分比 $(\bar{x}\pm s)$

组别	动物数	脑梗死体积百分比(%)
假手术组	5	0±0
模型组	5	35.75±3.19
电针组	5	21.27±2.72 ^①

注:与模型组相比^① $P<0.01$

研究表明脑卒中后认知功能障碍的发病率为48%—78%^[6-7],而Jaillard A等^[8]研究认为高达91.5%的脑卒中患者存在某种程度的认知障碍,阻碍患者的康复和重返社会。

临床研究表明,电针可以改善脑卒中后认知功能障碍^[9-10]。神庭穴为督脉、足太阳、阳明之会,《铜人腧穴针灸图经》记载:“治癫疾风痫,戴目上不识人”。百会穴为督脉、足太阳之会,《太平圣惠方·明堂》记载:百会“主头目弦痛,心神恍惚”。神庭、百会穴皆属于督脉,两穴常合用而起到开窍醒神,补肾养精的作用。本研究中,利用Morris水迷宫实验发现,与模型组相比,电针组大鼠逃避潜伏期和找到平台所经过的路程明显缩短,跨越平台次数明显增加;TTC染色法发现电针减少脑缺血再灌注大鼠脑梗死体积。证明电针百会和神庭穴可促进神经功能的恢复,改善脑缺血再灌注大鼠学习记忆能力。这与其他研究^[11]及我团队之前研究^[12]结果相一致,表明电针可以改善认知功能障碍。

然而,电针改善脑卒中后认知功能障碍的确切机制并不清楚。有研究指出,电针分别通过促进神经干细胞的增殖,促进神经营养因子的合成以及调控神经递质等等途径改善认知障碍^[13-15]。这些研究大多侧重于探讨电针对中枢神经损伤修复中发挥正性调节作用方面的影响,而对发挥重要负性调节作用的方面却涉及很少。Nogo-A及其受体NgR所介导抑制性信号通路,在中枢神经损伤中发挥重要负性调节作用^[16]。成人中枢神经损伤后的再生能力非

常有限,重要原因是由于中枢神经损伤后存在抑制因素,影响神经系统的重塑,而Nogo-A是目前发现的最强烈、最重要的一种抑制物质^[17]。Nogo-A通过与受体NgR结合,继而激活Rho因子,使其从无活性的Rho-GDP转变成有活性的Rho-GTP,后者进而激活ROCK,通过影响肌动-肌球蛋白系统导致生长锥塌陷,抑制中枢神经再生^[16]。研究表明,减少Nogo-A及其受体NgR的表达,可促进认知功能的恢复^[2,18-19]。在本研究中,与假手术组相比,模型组大鼠梗死侧海马组织Nogo-A及其受体NgR的表达均有上升;与模型组相比,电针组大鼠梗死侧海马组织Nogo-A及其受体NgR的表达均有下降。本研究表明电针在一定程度上可以抑制脑缺血再灌注大鼠脑梗死侧海马组织Nogo-A及其受体NgR的表达,对中枢神经损伤中发挥重要负性调节作用的方面也有一定调节作用。这可能是电针改善脑缺血再灌注大鼠学习、记忆功能的机制之一。

综上,电针可改善脑缺血再灌注大鼠的学习记忆功能,其作用机制可能与抑制神经生长抑制因子Nogo-A及其受体NgR的表达有关。然而,由于脑卒中后认知功能障碍的机制复杂,电针有多靶点综合作用,其确切机制还需要进一步深入研究。

参考文献

- [1] Leys D, Henon H, Mackowiak-Cordoliani MA, et al. Post-stroke dementia[J]. *Lancet Neurol*,2005,4(11):752—759.
- [2] Tong J, Liu W, Wang X, et al. Inhibition of Nogo-66 receptor 1 enhances recovery of cognitive function after traumatic brain injury in mice[J]. *J Neurotrauma*,2013,30(4):247—258.
- [3] Delekate A, Zagrebelsky M, Kramer S, et al. NogoA restricts synaptic plasticity in the adult hippocampus on a fast time scale[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*,2011,108(6):2569—2574.
- [4] Purdy PD, Devous MD Sr, White CL 3rd, et al. Reversible middle cerebral artery embolization in dogs without intracranial surgery[J]. *Stroke*,1989,20(10):1368—1376.
- [5] 李忠仁.实验针灸学[M].北京:中国中医药出版社,2003.
- [6] Lesniak M, Bak T, Czepiel W, et al. Frequency and prognostic value of cognitive disorders in stroke patients[J]. *Dement Geriatr Cogn Disord*,2008,26(4):356—363.
- [7] Nys GM, van Zandvoort MJ, de Kort PL, et al. The prognostic value of domain-specific cognitive abilities in acute first-ever stroke[J]. *Neurology*,2005,64(5):821—827.
- [8] Jaillard A, Naegele B, Trabucco-Miguel S, et al. Hidden dysfunctioning in subacute stroke[J]. *Stroke*,2009,40(7):2473—2479.
- [9] Chen XJ, Chen LF, Chen Q, et al. Effect of three-line puncture on the Governor Vessel and Bladder Meridian on head on cognitive function of vascular dementia patients[J]. *Zhongguo Zhen Jiu*,2012,32(4):289—292.
- [10] Chou P, Chu H, Lin JG. Effects of electroacupuncture treatment on impaired cognition and quality of life in Taiwanese stroke patients[J]. *J Altern Complement Med*,2009,15(10):1067—1073.
- [11] 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的影响[J]. *中华物理医学与康复杂志*,2011,33(8):575—578.
- [12] Feng X, Yang S, Liu J, et al. Electroacupuncture ameliorates cognitive impairment through inhibition of NF-kappaB-mediated neuronal cell apoptosis in cerebral ischemia-reperfusion injured rats[J]. *Mol Med Rep*,2013,7(5):1516—1522.
- [13] 叶飞,余晶晶,邓晓玲,等.电针刺激对脑梗死大鼠内源性神经干细胞及神经功能恢复的影响[J]. *中华物理医学与康复杂志*,2012,34(11):801—805.
- [14] 刘佩,刘喆,魏居瑞,等.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[J]. *中国康复医学杂志*,2013,28(9):822—825.
- [15] Chuang CM, Hsieh CL, Li TC, et al. Acupuncture stimulation at Baihui acupoint reduced cerebral infarct and increased dopamine levels in chronic cerebral hypoperfusion and ischemia-reperfusion injured sprague-dawley rats[J]. *Am J Chin Med*,2007,35(5):779—791.
- [16] Schwab ME. Functions of Nogo proteins and their receptors in the nervous system[J]. *Nat Rev Neurosci*,2010,11(12):799—811.
- [17] Goldberg JL, Barres BA. Nogo in nerve regeneration[J]. *Nature*,2000,403(6768):369—370.
- [18] Gillani RL, Tsai SY, Wallace DG, et al. Cognitive recovery in the aged rat after stroke and anti-Nogo-A immunotherapy[J]. *Behav Brain Res*,2010,208(2):415—424.
- [19] Tews B, Schonig K, Arzt ME, et al. Synthetic microRNA-mediated downregulation of Nogo-A in transgenic rats reveals its role as regulator of synaptic plasticity and cognitive function[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*,2013,110(16):6583—6588.