

电针对局灶性脑缺血再灌注模型大鼠学习记忆作用的氧化应激机制*

林浴坤¹ 林如辉² 陈斌³ 俞坤强⁴ 陶静^{1,5}

摘要

目的:通过氧化应激探讨电针神庭、百会对局灶性脑缺血再灌注大鼠学习记忆的影响,阐明其治疗脑缺血后认知功能障碍的可能机制。

方法:雄性SD大鼠72只,随机分为假手术组、模型组、电针组、非穴组,每组18只大鼠。以大脑中动脉闭塞(MCAO)法建立大鼠局灶性脑缺血再灌注模型。电针组、非穴组行电针干预7天。各组在造模后3d开始采用Morris水迷宫检测学习记忆能力,免疫组化、免疫蛋白印迹和RT-PCR检测caspase-3表达,用化学比色法检测SOD、MDA和GSH-PX。

结果:与其他组相比,电针神庭、百会穴可明显改善MCAO大鼠的神经功能缺损症状;改善MCAO大鼠学习记忆能力;降低皮质caspase-3表达;增强SOD、GSH-PX的活性,降低MDA的含量。

结论:电针通过抑制氧化应激、控制神经细胞凋亡,来实现改善局灶性脑缺血再灌注大鼠学习记忆能力,保护神经细胞的损伤。

关键词 脑缺血;电针;学习记忆;氧化应激;凋亡

中图分类号:R743.3,R245 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2015)-08-0755-06

The possible mechanism of electroacupuncture ameliorating learning and memory ability in rats with focal cerebral ischemia/reperfusion via inhibiting oxidative stress/LIN Yukun, LIN Ruhui, CHEN Bin, et al// Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2015, 30(8): 755—760

Abstract

Objective: To investigate the effect of electroacupuncture (EA) ameliorating learning and memory ability in rats with focal cerebral ischemia/reperfusion(I/R) via inhibiting oxidative stress and to clarify the possible mechanism of EA in treatment of cognitive impairment after cerebral ischemia.

Method: Seventy-two male adult SD rats were randomly divided into the sham operation control group (SC group), the ischemia model group (MCAO group), the electroacupuncture group (EA group) and electroacupuncture non-point group (non-point group). Each group had 18 rats. Middle cerebral artery occlusion (MCAO) was performed to establish the focal cerebral I/R injury model. The EA group and non-point group received EA for 7d. All rats were tested by Morris water maze to investigate learning and memory ability. Immunohistochemistry, Western blot and RT-PCR were used to test the expression of caspase-3, and using chemical assay to detect SOD, MDA and GSH-PX.

Result: Compared with other groups, EA at Shenting (DU24) and Baihui (DU 20) acupoints alleviated neurological deficits significantly and promoted learning and memory ability; reduced caspase-3 expression; enhanced activities of SOD, GSH-PX, reduced the content of MDA.

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2015.08.001

*基金项目:协同创新中西医结合基础研究实验专项(3021-985010006)(X2012004-协同);国家自然科学基金资助项目(81373778)

1 福建中医药大学康复医学院,福州,350122; 2 福建中西医结合研究院; 3 国家中医药管理局中医康复研究中心; 4 福建康复技术创新中心; 5 通讯作者

作者简介:林浴坤,男,硕士研究生; 收稿日期:2014-08-06

Conclusion:Electroacupuncture can ameliorate learning and memory ability of cerebral I/R injured rats and protect nerve cell damage. Its mechanism may be related to inhibiting oxidative stress and modulating the expression of apoptosis-related gene.

Author's address College of Rehabilitation Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, 350122

Key word cerebral ischemia; electroacupuncture; learning and memory; oxidative stress; apoptosis

认知功能障碍是脑缺血损伤后患者常见的功能障碍,发生率高达65%^[1]。认知功能障碍对患者日常生活活动能力以及运动功能的恢复产生极大影响,是制约脑卒中患者全面康复的重要因素。因此早期发现并及时干预认知障碍对患者身心功能的全面恢复有着特别重要的意义。研究表明,大脑缺血-再灌注损伤的主要机制是活性氧自由基损害,探索有效的抗氧化损伤的保护措施将对于防治缺血再灌注损伤具有重要的意义^[2]。电针疗法是传统治疗行之有效的方法之一,可通过多途径、多靶点、多环节起作用。大量临床和基础研究证明电针治疗对脑缺血再灌注损伤取得了比较满意的效果^[3-6],本课题组前期研究也表明电针神庭、百会穴可改善认知功能障碍^[7]。本研究选用大鼠大脑中动脉缺血再灌注模型,旨在从活性氧自由基、凋亡方面探讨电针神庭、百会穴对改善脑缺血再灌注大鼠学习记忆作用的可能机制,为针灸临床提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

所有试验均遵照国际动物保护和使用的规定实施。72只健康成年无特殊病原体(SPF)级SD大鼠,体重(250±20)g,由上海斯莱克实验动物责任有限公司[生产许可证码:SCXK(沪)2012-0002]。大鼠分笼饲养,每笼养5只,适应性喂养1周后,用随机数字表法将大鼠编号,并分为假手术(n=18)、模型组(n=18)、电针组(n=18)、非穴组(n=18)。

1.2 主要实验试剂

苏木素染色液:碧云天公司生产;Trizol:Invitrogen;cDNA逆转录试剂盒及PCR Master Mix:Fermentas;caspase-3 mRNA上下游引物:上海生工公司合成;caspase-3和 β -actin抗体:Cell Signaling Technology;SOD、MDA和GSH-PX试剂盒:南京建成生物工程研究所。

1.3 动物模型制备

术前所有实验动物禁食12h。大鼠称重后,参考Zea Longa方法,行左侧MCAO手术,制备急性脑梗死动物模型。具体方法为所有大鼠均选择左侧大脑中动脉(MCA)区作为梗死侧,10%水合氯醛(3ml/kg)腹腔麻醉成功后,仰卧位,正中切开颈部皮肤,充分暴露并钝性分离左侧颈总动脉(common carotid artery, CCA)、颈外动脉(external carotid artery, ECA)及颈内动脉(internal carotid artery, ICA)。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,经颈内动脉至左侧大脑中动脉起始部阻断血流(有少许阻力为止),从而造成局灶性脑缺血。颈部伤口常规缝合。2h后缓慢退出尼龙线。试验过程和动物苏醒期间注意保暖。假手术组只分离动脉,不结扎、插线。

动物苏醒后观察其体态及行为,按Zea Longa评分标准评价动物的行为变化以判断MCAO模型是否成功。0分:无神经功能缺损体征;1分:不能完全伸展对侧前爪;2分:向偏瘫侧转圈(向右侧转圈);3分:行走时向偏瘫侧倾倒;4分:不能自发行走,意识丧失;评分为1—3分纳入实验动物,0分、4分予以剔除。

1.4 干预措施

电针组参考《常用动物腧穴图谱》取大鼠神庭和百会穴,非穴组取在神庭和百会穴旁开0.5寸处,两组均应用电针刺激,疏密波,频率1—20Hz,电压3—5V,以针体轻轻抖动为度。每次30min,每天同一时间治疗1次。手术后第2天开始治疗,直至动物被处死。模型组、假手术组置于普通笼中饲养,只给予同等条件抓取,不给予任何治疗。

1.5 水迷宫实验

采用Morris水迷宫实验装置及动态图像采集分析系统,具体操作方法参照文献^[8-9]。本研究主要用

水迷宫监测MCAO大鼠定位航行试验和空间探索试验。定位航行试验历时4d,预先使大鼠自由游泳2min使其适应环境和人的抓握等相关操作,实验分别从水池4个象限内将大鼠面向池壁放入水中,测其在90s内寻找到平台所需的时间(逃避潜伏期),由计算机记录各种参数。如果大鼠90s内未找到平台,需将其牵引到平台,停留10s,这时潜伏期记为90s。空间探索试验:在第7天撤除平台,探索大鼠在90s内穿过平台的次数,评价大鼠记住平台的能力,由计算机记录各种参数。

1.6 取材及检测

1.6.1 免疫组化法^[10]:各组大鼠在行为测试完毕后行心脏灌注术,采用腹腔注射10%水合氯醛(3ml/kg)麻醉成功后,每组取6只大鼠经左心室依次灌注生理盐水和4%多聚甲醛溶液,随后迅速断头取脑,取脑后置入4%多聚甲醛内4℃固定24—48h。常规脱水,石蜡包埋,冠状切片,片厚5 μ m。取石蜡切片进行常规的脱蜡入水,在0.01M枸橼酸钠(pH6.0)中热抗原修复10min;3% H₂O₂室温孵育10min,以消除内源性过氧化物酶的活性;PBS冲洗,5min 3次,10%正常山羊血清封闭,室温孵育30min;倾去血清,勿洗,滴加caspase-3一抗工作液(1:800),置于湿盒中4℃过夜;PBS冲洗,5min 3次,滴加适量生物素标记二抗工作液,37℃孵育10min;PBS冲洗,5min 3次,滴加辣根过氧化物酶标记链霉卵白素工作液,37℃孵育10min;PBS冲洗,5min 3次,DAB显色剂显色,自来水充分冲洗;苏木素复染,PBS返蓝,梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片观察。

1.6.2 RT-PCR:提取左侧脑组织的RNA;按照试剂盒说明书操作,将总RNA反转录为cDNA;PCR反应:按照PCR mastermix 试剂盒说明书进行扩增。引物序列: caspase-3: 上游5'-TCA GAG CGT AAG GAA AGG AGA GG-3',下游5'-GGA CAT CAT CCA CAC AGA CCA GT-3'; β -actin: 上游5'-ACT GGC ATT GTG ATG GAC TC-3',下游5'-CAG CAC TGT GTT GGC ATA GA-3'。扩增体系20 μ l,其中cDNA模板1 μ l,上下游引物各0.4 μ l, Mix 10 μ l,加水8.2 μ l。反应条件:95℃预变性3min,95℃变性30s,58℃退火30s,72℃延伸30s,共35个循环。取PCR产物5 μ l,1.5%琼脂糖凝胶电泳,EB染

色鉴定,凝胶成像。计算图像软件分析电泳条带。

1.6.3 蛋白免疫印迹法(Western blot):每100mg脑组织中加入1ml的细胞裂解液和10 μ l PMSF 储存液提取蛋白质。BCA测定蛋白浓度,加入上样缓冲液加热变性后,经12% SDS-PAGE(十二烷基硫酸胺-聚丙烯酰胺)电泳,转移至PVDF膜上。室温封闭2h,Caspase-3(1:1000)和 β -actin(1:5000)一抗4℃孵育过夜,洗膜后加入辣根过氧化物标记的二抗37℃振荡孵育1h。并用Bio-Image 分析系统(Bio-Rad, Hercules,USA)显影成像及Image-Pro Plus 软件对扫描图像的目的条带进行灰度分析。

1.6.4 脑组织SOD、MDA和GSH-PX的测定:在各组大鼠中随机选取6只,取得大脑半球皮质组织,与预冷的生理盐水一起倒入匀浆管中进行匀浆,生理盐水的体积总量是组织块质量的9倍,充分研碎,使组织匀浆化,然后倒入试管中,即制备好了10%的组织匀浆。将制备好的10%组织匀浆用离心机3600r/min离心15min,留上清,按照试剂盒说明书用酶标仪测定脑组织中脑组织超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)的含量。

1.7 统计学分析

采用SPSS18.0统计软件进行分析,数据以均数 \pm 标准差表示,采用ANOVA分析数据,两两比较采用LSD法, $P<0.05$ 为具有显著性差异。

2 结果

2.1 电针改善MCAO大鼠的神经功能缺损评分

为验证模型是否成功及电针干预治疗是否有效,用神经行为学评分进行评定。脑缺血再灌注2h后(未经电针干预),模型组、电针组及非穴组在评分的差异无显著性($P>0.05$)。经干预后,电针组的神经缺损评分与模型组相比差异有显著性($P<0.05$),电针组与非穴组对比差异有显著性($P<0.05$),模型组及非穴组在评分的差异无显著性($P>0.05$)。由此提示电针对脑缺血大鼠的神经缺损症状有明显改善作用,见表1。

2.2 电针促进MCAO大鼠学习记忆能力

运用水迷宫评价电针治疗局灶性脑缺血后大鼠的认知功能障碍的疗效,所得的数据:在定向航行试

验中(表2),电针治疗可以明显降低平均逃避潜伏期,与非穴组、模型组相比均差异显著($P<0.05$),而非穴组与模型组相比较差异无显著性($P>0.05$)。在空间探索试验中(表3),电针组大鼠穿过平台次数(1.78 ± 0.32),与模型组(0.84 ± 0.28)、非穴组(0.92 ± 0.31)相比差异显著($P<0.05$);而非穴组与模型组相比较差异无显著性($P>0.05$)。

2.3 电针改善MCAO大鼠神经细胞凋亡

采用免疫组化检测脑组织中凋亡因子caspase-3的表达。免疫组化数据表明模型组大鼠中caspase-3的含量(88.22 ± 15.38)明显较假手术组(35.48 ± 8.45)的表达多,差异有显著性意义($P<0.01$)。电针组中caspase-3的表达(59.84 ± 9.99)比模型组少,差异显著($P<0.05$)。而非穴组(82.45 ± 14)与模型组相比无显著差异($P>0.05$)。采用PCR、Western blot检测脑组织中凋亡因子caspase-3的表达。结果表明:模型组大鼠中caspase-3的含量(0.79 ± 0.04)明显较假手术组(0.41 ± 0.08)的表达多,差异有显著性意义($P<0.01$)。电针组中caspase-3的表达(0.67 ± 0.05)比模型组少,差异显著($P<0.05$)。而非穴组(0.75 ± 0.06)与模型组相比无显著差异($P>$

0.05)。如图1—2所示。

2.4 电针改善MCAO大鼠脑组织氧化应激作用

为验证电针对MCAO大鼠脑组织氧化应激作用,我们检测了大鼠脑组织中SOD、MDA和GSH-PX的含量。研究结果显示:与假手术组相比较,模型组MDA含量显著增加,两者差异显著($P<0.01$);电针组可明显降低MDA的含量,与模型组相比较有统计意义($P<0.05$);而非穴组中MDA含量与模型组相比较没有显著性差异($P>0.05$)。与假手术组相比较,模型组SOD、GSH-PX含量显著较少,两者差异显著($P<0.01$);电针组可明显增加SOD、GSH-PX的含量,与模型组相比较有显著性意义($P<0.05$);而非穴组中SOD、GSH-PX含量与模型组相比较没有显著性差异($P>0.05$)。见表4。

表1 神经功能缺损评分 ($\bar{x}\pm s$)

组别	缺血再灌注后2h	缺血再灌注后7h
假手术组	0	0
模型组	2.37±0.65	1.95±0.67
电针组	2.37±0.71 ^①	1.23±0.42 ^②
非穴组	2.37±0.68 ^③	1.89±0.59 ^④

①与模型组相比: $P>0.05$,② $P<0.05$;与电针组相比:③ $P>0.05$,④ $P<0.05$

表2 各组大鼠逃避潜伏期时间测试 ($\bar{x}\pm s, s$)

组别	鼠数	第3天	第4天	第5天	第6天
假手术组	7	45.54±6.12	31.89±5.64	22.58±4.34	18.34±5.03
模型组	7	79.43±8.32 ^①	77.12±10.13 ^①	68.47±9.23 ^①	65.43±8.67 ^①
电针组	7	65.42±5.83 ^②	50.34±6.23 ^②	39.95±7.46 ^②	32.32±6.81 ^②
非穴组	7	78.13±8.32 ^{③④}	74.12±10.13 ^{③④}	64.47±9.23 ^{③④}	61.43±8.67 ^③

①与假手术组相比: $P<0.05$;与模型组相比:② $P<0.05$;③ $P>0.05$;与电针组相比④ $P<0.05$

表3 各组大鼠穿过平台次数 ($\bar{x}\pm s$)

组别	假手术组	模型组	电针组	非穴组
次数	3.50±0.42	0.84±0.28 ^①	1.78±0.32 ^②	0.92±0.31 ^③

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

表4 电针对脑缺血大鼠脑组织中GSH-Px、MDA及SOD的影响 ($\bar{x}\pm s$)

组别	GSH-Px (U/mg.prot)	MDA (nmol/mg.prot)	SOD (U/mg.prot)
假手术组	20.48±2.45	8.85±0.86	45.49±3.45
模型组	18.22±3.38 ^①	16.51±1.10 ^①	36.23±3.38 ^①
电针组	19.84±2.99 ^②	11.35±0.89 ^②	39.32±2.99 ^②
非穴组	18.45±3.00 ^③	15.51±1.00 ^③	37.31±2.63 ^③

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

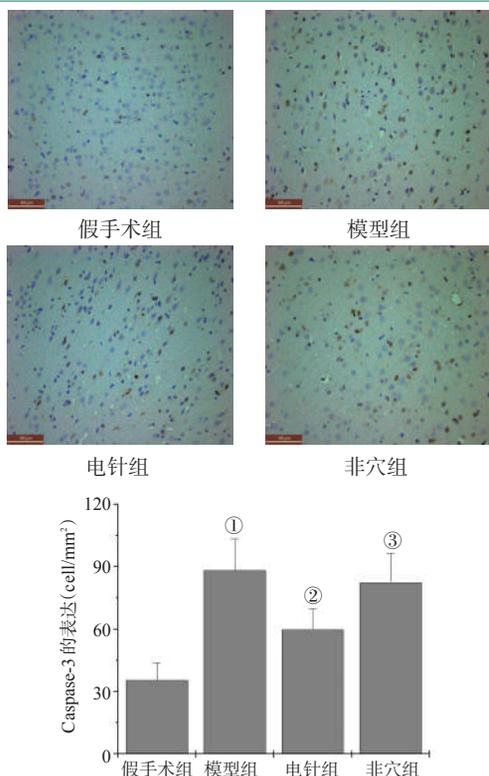
3 讨论

针灸作为中国传统医学的核心组成部分,因其

无副作用,成为治疗多种慢性疾病有效方法。大量的研究表明针刺在脑卒中和认知功能障碍方面取得良好的临床疗效^[1]。神庭、百会穴隶属督脉上的穴位,督脉为阳脉是诸阳之会,两穴通常合用具有开窍醒神,补肾养精的作用,针刺二穴是对人类健康,精神和记忆功能有益。本研究表明电针神庭、百会可明显改善MCAO大鼠的神经行为学评分,水迷宫实验也表明电针此二穴也可促进MCAO大鼠的学习记忆能力。证实电针神庭、百会可改善MCAO大鼠的学习记忆功能。

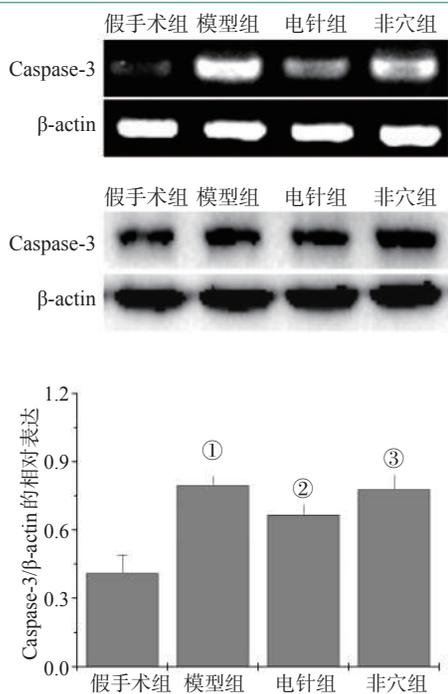
氧化应激损伤在缺血性脑损害中起关键作用,是造成脑缺血/再灌注不可逆损伤的主要因素,线粒体通常被认为是在缺血/再灌注时活性氧簇(reac-

图1 免疫组化检测皮质 caspase-3 的表达



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

图2 RT-PCR和Western blot检测皮质 caspase-3 的表达



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

active oxygen species, ROS)产生的主要场所,当大脑缺血缺氧会刺激线粒体氧自由基的大量生成^[12],进一步破坏线粒体的功能,导致线粒体中细胞色素C的释放到胞质中,诱导并启动 caspase 级联凋亡途径的活化物而促进细胞凋亡^[13],而凋亡是脑缺血后引起的细胞死亡主要因素^[14]。Caspase-3 是凋亡信号传导中的关键效应分子^[15],是细胞凋亡信号途径中最关键的效应酶,处于凋亡级联反应通路的核心位置,发挥非常重要的作用,凋亡的最后实施是通过 caspase-3 的激活而实现。本研究结果显示,模型组与非穴组大鼠缺血侧脑组织处于激活状态的 caspase-3 表达量均较假手术组大鼠有显著的增加,电针组明显降低 MCAO 大鼠活性的 caspase-3 的表达量。提示电针可通过调整活性的 caspase-3 表达量从而对抗脑缺血-再灌注后引起的神经凋亡。

正常生理情况下,脑组织内活性氧自由基的含量很少,由内源性抗氧化剂,如 SOD 和 GSH-PX 控制^[16]。然而,当脑缺血时脑组织内大量产生 ROS,超过内源性抗氧化剂清除能力,氧自由基便攻击生物膜多不饱和脂肪酸,引发脂质过氧化反应并形成大量脂质过氧化物 MDA^[17],过度消耗脑组织中抗氧化剂 SOD、GSH-PX,使缺血脑组织中 SOD、GSH-PX 活性下降,MDA 含量升高。因此,脑组织中 SOD、GSH-PX 活性及 MDA 含量的变化可间接反映机体清除氧自由基的能力和细胞受自由基攻击的严重程度。本研究结果表明与假手术相比,造模后大鼠脑组织中 SOD、GSH-PX 的活性明显降低,MDA 的含量显著上升。与模型组相比,电针可提高大鼠中 SOD、GSH-PX 的活性,降低 MDA 的含量。而非穴组中 SOD、GSH-PX 的活性及 MDA 的含量与模型组相比无显著差异。证实电针可降低脑缺血-再灌注后发生氧化应激反应从而保护神经细胞受到损伤。

综上所述,电针神庭、百会可改善局灶性脑缺血大鼠学习记忆能力及保护神经细胞的作用,其作用机制可能是通过抑制脑缺血/再灌注后氧化应激反应,并降低凋亡相关因子 caspase-3 的表达。而活性氧自由基是脑缺血/再灌注后神经细胞损伤的重要原因之一,还有多种致病机制未被人们所发现,有待进一步探索。

参考文献

- [1] Donovan NJ, Kendall DL, Heaton SC, et al. Conceptualizing functional cognition in stroke[J]. *Neurorehabil Neural Repair*,2008,22(2):122—135.
- [2] Eghwudjakpor PO, Allison AB. Oxidative stress following traumatic brain injury: enhancement of endogenous antioxidant defense systems and the promise of improved outcome [J]. *Niger J Med*,2010,19(1):14—21.
- [3] Zhang H, Zhao L, Yang S, et al. Clinical observation on effect of scalp electroacupuncture for mild cognitive impairment[J]. *J Tradit Chin Med*,2013,33(1):46—50.
- [4] Zhou L, Zhang YL, Cao HJ, et al. Treating vascular mild cognitive impairment by acupuncture: a systematic review of randomized controlled trials[J]. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi*,2013,33(12):1626—1630.
- [5] Zhao L, Zhang FW, Zhang H, et al. [Mild cognitive impairment disease treated with electroacupuncture: a multi-center randomized controlled trial] [J]. *Zhongguo Zhen Jiu*,2012,32(9):779—784.
- [6] Li X, Guo F, Zhang Q, et al. Electroacupuncture decreases cognitive impairment and promotes neurogenesis in the APP/PS1 transgenic mice[J]. *BMC Complement Altern Med*,2014, 14:37.
- [7] 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.
- [8] Pouzet B, Zhang WN, Feldon J, et al. Hippocampal lesioned rats are able to learn a spatial position using non-spatial strategies[J]. *Behav Brain Res*,2002,133(2):279—291.
- [9] Veng LM, Granholm AC, Rose GM. Age-related sex differences in spatial learning and basal forebrain cholinergic neurons in F344 rats[J]. *Physiol Behav*,2003,80(1):27—36.
- [10] 陈斌,陶静,黄佳,等.从Notch通路探讨电针促进局灶性脑缺血再灌注大鼠海马神经干细胞增殖的作用机制[J].*中国康复医学杂志*,2014,29(5):399—404.
- [11] Cho BB, Toledo-Pereyra LH. Caspase-independent programmed cell death following ischemic stroke[J]. *J Invest Surg*,2008,21(3):141—147.
- [12] Zhao L, Zhang H, Zheng Z, et al. Electroacupuncture on the head points for improving gnosis in patients with vascular dementia[J]. *J Tradit Chin Med*,2009,29(1):29—34.
- [13] Broughton BR, Reutens DC, Sobey CG. Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia[J]. *Stroke*,2009,40(5):e331—e339.
- [14] ZHANG Suwan, LI Sumei. Mitochondria-induced oxidative stress and diabetic nephropathy [J]. *Journal of International Pathology and Clinical Medicine*,2011,31(6):535—538.
- [15] Niizuma K, Yoshioka H, Chen H, et al. Mitochondrial and apoptotic neuronal death signaling pathways in cerebral ischemia[J]. *Biochim Biophys Acta*,2010,1802(1):92—99.
- [16] Loh KP, Huang SH, De Silva R, et al. Oxidative stress: apoptosis in neuronal injury[J]. *Curr Alzheimer Res*,2006,3(4):327—337.
- [17] Manzanero S, Santro T, Arumugam TV. Neuronal oxidative stress in acute ischemic stroke: sources and contribution to cell injury[J]. *Neurochem Int*,2013,62(5):712—718.