

# 电针对脑缺血再灌注大鼠学习记忆能力及MMP-2、MMP-9蛋白表达的影响\*

俞坤强<sup>1,3</sup> 林如辉<sup>2,3</sup> 陶 静<sup>1,3</sup> 林浴坤<sup>1,3</sup> 陈立典<sup>3,4,5,6</sup>

## 摘要

**目的:**探讨电针神庭、百会穴对局灶性脑缺血大鼠学习记忆的影响,及其可能的机制。

**方法:**雄性SD大鼠45只,随机分为假手术组、模型组、电针组,每组15只大鼠。模型组、电针组均采用线栓法制备局灶性脑缺血损伤大鼠模型。电针组电针神庭、百会穴7d。各组在造模后第3天开始采用Morris水迷宫检测学习记忆能力;2,3,5-氯化三苯基四氮唑染色法检测大鼠脑梗死的体积;Western blotting法检测大鼠左侧海马基质金属蛋白酶-2(MMP-2)、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)蛋白的表达。

**结果:**同模型组相比,电针组大鼠学习记忆能力改善( $P<0.05$ ),脑梗死体积明显减少( $P<0.01$ ),海马组织中MMP-2、MMP-9蛋白表达降低( $P<0.05$ )。

**结论:**电针能改善局灶性脑缺血再灌注大鼠学习记忆能力,其机制可能与抑制MMP-2、MMP-9蛋白表达相关。

**关键词** 脑缺血;电针;学习记忆;基质金属蛋白酶-2;基质金属蛋白酶-9

**中图分类号:**R743.3;R245 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2015)-11-1095-05

Effects of electroacupuncture on learning-memory abilities and MMP-2, MMP-9 expressions in rats after cerebral ischemia/reperfusion/YU Kunqiang, LIN Ruhui, TAO Jing, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2015, 30(11): 1095—1099

## Abstract

**Objective:** To explore the effect of electroacupuncture at Shenting (BL24) and Baihui (DU20) on learning and memory abilities in rats after cerebral ischemia/reperfusion (I/R) injury and its possible mechanism.

**Method:** Forty-five male SD rats were randomly divided into sham group ( $n=15$ ), ischemia group ( $n=15$ ) and electroacupuncture group ( $n=15$ ). The latter 2 groups were modeled as focal cerebral ischemia/reperfusion (I/R) injury, and electroacupuncture group received electroacupuncture at Shenting (BL24) and Baihui (DU20) for 7 days. Learning and memory abilities were tested by Morris water maze, cerebral infarction volume was measured by TTC staining and image analysis, and protein expressions of MMP-2 and MMP-9 were detected with Western blotting.

**Result:** Compared with ischemia group, learning and memory abilities improved ( $P<0.05$ ), cerebral infarction volume reduced ( $P<0.01$ ), and expressions of MMP-2 and MMP-9 in hippocampus decreased ( $P<0.05$ ) in electroacupuncture group.

**Conclusion:** Electroacupuncture can improve learning and memory abilities from cerebral ischemia/reperfusion injury in rats, which may be related with the inhibition of expressions of MMP-2 and MMP-9 in hippocampus.

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2015.11.002

\*基金项目:科技部国际科技合作项目(2011DFG33240);福建省自然科学基金项目(2015J01335);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,福建福州,350122; 2 福建中医药大学中西医结合研究院; 3 福建中医药大学; 4 福建康复重点实验室; 5 国家中医药管理局中医康复研究中心; 6 通讯作者

作者简介:俞坤强,男,在读硕士研究生; 收稿日期:2015-05-25

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

**Key word** cerebral ischemia; electroacupuncture; learning and memory; matrix metalloproteinase-2; matrix metalloproteinase-9

脑卒中是一种严重的神经系统疾病<sup>[1]</sup>,也是世界上导致死亡的第二大疾病<sup>[2]</sup>,而认知功能障碍作为脑卒中后常见的一种功能障碍,其发病率高达64%<sup>[2]</sup>,常出现学习记忆等领域的受损,且脑卒中伴有认知障碍的患者,容易发展成痴呆<sup>[3]</sup>。因此,早期诊断并及时干预对脑卒中后认知障碍的患者身心功能的全面恢复以及预防痴呆有着特别重要的意义。课题组前期研究表明,电针神庭、百会穴可以改善缺血性脑卒中后认知功能障碍<sup>[4-7]</sup>,但机制仍未完全阐明。基质金属蛋白酶-2(matrix metalloproteinase-2, MMP-2)、MMP-9参与了脑缺血后脑损伤的过程<sup>[8-9]</sup>,与脑缺血后的神经元的发生、突触的可塑性以及神经细胞的死亡、凋亡密切相关<sup>[10]</sup>,而减少细胞的凋亡,改善脑缺血再灌注后大鼠的学习记忆障碍<sup>[11]</sup>。本实验采用线栓法制备大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)局灶性脑缺血再灌注大鼠模型,观察电针神庭、百会穴对MCAO大鼠学习记忆,脑梗死体积,以及海马区MMP-2、MMP-9蛋白表达的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

45只清洁级健康雄性SD大鼠,体重(260±20)g,由福建中医药大学实验动物中心提供(许可证号:SYXK(闽)2005-004)。大鼠分笼饲养,每笼5只;适应性喂养1周后,用随机数字表法将大鼠编号,并分为假手术组(n=15)、模型组(n=15)、电针组(n=15)。实验过程均严格按照国际动物保护和使用指南的规定进行。

### 1.2 试剂与仪器

2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC):美国Sigma-Aldrich公司。MMP-2、MMP-9一抗:Cell Signaling Technology公司。 $\beta$ -actin一抗、辣根过氧化物酶二抗:Cell Signaling Technology公司。Morris水迷宫:中国医学科学院药物研究所。Image-lab图像分析系统:Bio-Rad Laboratories公司。

### 1.3 模型制备

术前所有实验动物禁食12h。参照改良Longa方法<sup>[12]</sup>,制备左侧大脑中动脉闭塞模型。大鼠称重后10%水合氯醛0.3ml/100g腹腔注射麻醉。常规去毛消毒,分离颈总动脉,向上分离出颈内动脉和颈外动脉主干及分支。结扎颈总动脉近心端及分叉处颈外动脉,微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,将备好的栓线插入颈内动脉,撤去颈内动脉血管夹,缓慢推动栓线至大脑前动脉近端(有少许阻力为止),插入长度18.0—22.0mm。固定栓线,常规缝合伤口。2h后将栓线退回至颈总动脉分叉处,形成缺血再灌注模型。假手术组大鼠只进行动脉分离的操作,不进行结扎和插线。整个实验过程中注意动物保暖。

动物苏醒后按Longa评分判断模型是否成功: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;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1—3分者纳入实验。

### 1.4 干预方法

电针组参考《实验针灸学》取大鼠神庭和百会穴,使用华佗牌30号0.5寸毫针,接G6805电针仪,电压峰值6V,以针体轻轻抖动为度,疏密波,频率为1/20Hz。每次治疗时间为30min,每天同一时间治疗1次,共7d。于手术后第2天开始治疗,直至动物被处死。假手术组置于普通笼中饲养,予同等条件抓取。模型组造模后回笼饲养,予同等条件抓取。

### 1.5 Morris水迷宫测试

于术后3d进行,Morris水迷宫是一个直径为200cm、高度为50cm的圆形水池,水深30cm;水温(25±2)℃;池壁4个等距离点将水池分为4个象限,任选一象限在其中央放置平台,逃逸平台直径为6cm,低于水面1—2cm,四周的池壁表面光滑整洁,光线四周对称,水池周围参照物从实验开始到结束位置保持不变。

#### 1.5.1 定位航行实验(place navigation):定位航行实

验共历时4d。实验开始前,将大鼠放置于水池中自由游泳2min,以适应环境和人的抓握等相关操作。而后将大鼠按顺时针方向依次由第1象限、第2象限、第3象限、第4象限入水点顺序面向池壁放入水中。若大鼠在限定的时间内(90s)找到平台,并且在平台上停留的时间达到3s以上,此时认为大鼠找到平台,此时由计算机记录时间,即为逃避潜伏期(escape latency)。如果大鼠在限定的时间内未找到隐匿于水中的平台,则将大鼠拖曳至平台上,让其在平台上停留10s,此时记录潜伏期计为90s。

**1.5.2 空间探索实验(spatial probe):**术后第7天,撤去平台后,任意选取一入水点将大鼠面向池壁放入水中,观察并记录在限定的时间内(90s),大鼠穿过放置原平台区域的次数。

## 1.6 取材及检测

**1.6.1 TTC染色:**选用TTC染色法检测各组大鼠脑梗死的体积。在大鼠断头取脑后,将取得的脑组织迅速置于-20℃冰箱冷冻15min,至脑组织变硬,而后将大脑从大脑半球额极到枕极做连续的冠状位切片,每片厚度约2mm,切成6片。后将脑片放入1% TTC磷酸缓冲液(pH=7.4)后,置于37℃恒温箱10—15min,并用毛笔不时翻动脑片,以使脑片均匀接触到染色液,整个过程注意避光。TTC因与正常组织中的脱氢酶反应而呈现红色,而由于缺血组织内脱氢酶活性下降,故不能与TTC反应,使脑梗死组织呈苍白色。利用Image-Pro Plus 6.0分析软件对脑梗死面积以及大脑面积进行计算,然后得出脑梗死体积百分比<sup>[13]</sup>=(梗死面积和×2mm)/(全脑面积和×2mm)。

**1.6.2 Western blotting:**取左侧海马组织置液氮罐中速冻,-80℃冰箱保存。取海马组织100mg,加裂解缓冲液1ml和苯甲基磺酰氟(phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF)10μl,充分研磨后离心,取上清。BCA蛋白浓度测定法测定蛋白浓度。样品蛋白变性后,取样品蛋白50μg,12% SDS-PAGE电泳,转移到PVDF膜,封闭液封闭2h,分别用MMP-2、MMP-9(1:500)、β-actin一抗(1:1000)孵育,4℃过夜,用辣根过氧化物标记的二抗(1:5000)室温孵育1h。将PVDF膜放图像扫描仪上,避光配置显色液并覆盖PVDF膜,Image-lab图像分析系统分析。

## 1.7 统计学分析

采用SPSS18.0统计软件进行分析,数据以均数±标准差表示,多组计量资料,则进行单因素方差分析,方差齐者用LSD法,方差不齐则用Games-Howell法。

## 2 结果

### 2.1 行为学观察

电针组大鼠平均逃避潜伏期明显短于模型组( $P<0.001$ );而穿越平台次数明显多于模型组( $P<0.05$ ),见表1。

### 2.2 脑梗死体积

同模型组相比较,电针组的脑梗死体积占全脑体积的百分比小于模型组,两组差异有显著性意义( $P<0.01$ ),见图1。

### 2.3 蛋白印迹

与模型组相比较,假手术组( $P<0.01$ )和电针组( $P<0.05$ )海马区MMP-2、MMP-9蛋白的表达明显较少,差异有显著性意义,见图2。

表1 各组大鼠行为学结果比较 ( $\bar{x}\pm s$ )

| 组别       | 例数 | 平均逃避潜伏期(s)                | 穿越平台次数                   |
|----------|----|---------------------------|--------------------------|
| 假手术组     | 7  | 32.398±3.514              | 3.000±0.707              |
| 模型组      | 7  | 75.276±5.105 <sup>①</sup> | 1.000±0.707 <sup>②</sup> |
| 电针组      | 7  | 48.960±3.620 <sup>③</sup> | 2.200±0.837 <sup>④</sup> |
| <i>F</i> |    | 136.154                   | 8.914                    |
| <i>P</i> |    | 0.000                     | 0.004                    |

与假手术组相比较:① $P<0.001$ ,② $P<0.01$ ;

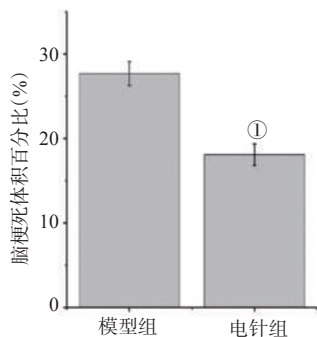
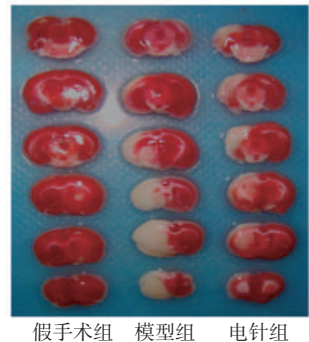
与模型组相比较:③ $P<0.001$ ,④ $P<0.05$

## 3 讨论

认知障碍属中医“神”异常的范畴,脑为“元神之府”,对神明有着重要的调控作用,而“督脉者,起于下极之俞,并于脊里,上至风府,入属于脑”,与脑的功能密切相关,历代医家素有“病变在脑,首取督脉”之说<sup>[12]</sup>。神庭、百会穴,皆为督脉上的在脑部的腧穴,且为督脉与足太阳之交会穴,具有开窍、醒神之功,故可以治疗脑卒中后的认知障碍<sup>[4-7]</sup>。

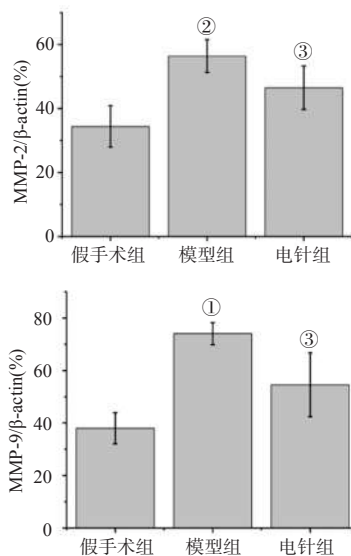
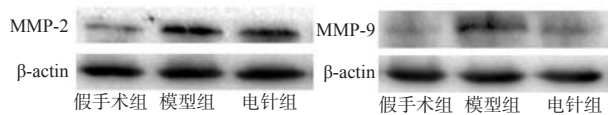
认知障碍是一个多领域的受损的疾病<sup>[14-15]</sup>,而学习记忆作为其中重要的一个方面,与海马密切相关。海马作为学习记忆的关键部位,也是脑缺血的敏感区域<sup>[16-17]</sup>,当组织缺血时,则会引起海马本身及其周围神经细胞的死亡或者凋亡,导致学习记忆下

图1 各组大鼠脑梗死体积比较



①与模型组相比较  $P < 0.01$

图2 各组大鼠海马MMP-2、MMP-9蛋白表达水平



与假手术组相比较,① $P < 0.001$ ,② $P < 0.01$ ;  
③与模型组相比较  $P < 0.05$

降<sup>[18]</sup>。

本研究通过采用水迷宫实验,观察MCAO大鼠的逃避潜伏期和穿越平台次数针刺后的变化,说明电针神庭、百会穴可以改善MCAO大鼠的学习记忆能力。且通过TTC染色,我们也观察到电针神庭、百会穴可以减少MCAO大鼠的脑梗死体积,从而改善了脑缺血再灌注所带来的脑损伤。

MMP-2、MMP-9是基质金属蛋白酶中重要的胶原酶,研究表明,MMP-2、MMP-9可以通过降解细胞外间质,参与炎症反应、破坏血脑屏障完整性、扩大脑梗死体积等脑缺血再灌注损伤的病理过程<sup>[19-21]</sup>,从而和学习记忆障碍相关。研究表明,MMP-2、MMP-9也参与了脑缺血再灌注后的轴突生长和再生,以及髓鞘形成等神经发生的过程,与神经元的凋亡密切相关<sup>[22-23]</sup>。MMP-2参与了早期神经元损伤和延迟修复机制,MMP-9则被认为与增加扩散病灶体积和神经功能下降有关<sup>[24]</sup>,而突触的强度的变化,以及神经元的结构和功能的完整性,则被认为是学习记忆的形态学基础<sup>[25-26]</sup>。因此,鉴于MMP-2、MMP-9参与脑缺血后的炎症反应、血脑屏障完整性以及神经元凋亡、再生等与学习记忆密切相关的病理生理过程,我们推测MMP-2、MMP-9在脑缺血再灌注后的学习记忆功能的恢复中起着重要作用。本实验中,电针组MMP-2、MMP-9蛋白表达减少与大鼠学习记忆能力的变化一致,提示电针改善MCAO大鼠的认知功能,可能是通过调节MMP-2、MMP-9蛋白的表达来实现的。

综上所述,电针神庭、百会穴能够改善脑缺血大鼠学习记忆能力,其作用机制可能与电针治疗能够抑制脑缺血再灌注大鼠海马MMP-2、MMP-9蛋白的表达,从而改善脑缺血再灌注后的脑损伤有关。

## 参考文献

- [1] Mukherjee D, Patil CG. Epidemiology and the global burden of stroke[J]. World Neurosurgery,2011,76(6):S85—S90.
- [2] Kuklina EV, Tong X, George MG, et al. Epidemiology and prevention of stroke: a worldwide perspective[J]. Expert Review of Neurotherapeutics,2012,12(2):199—208.
- [3] Dacosta-Aguayo R, Grana M, Fernandez-Andujar M, et al. Structural integrity of the contralesional hemisphere predicts cognitive impairment in ischemic stroke at three months[J].

- Plos One,2014,9:e861191.
- [4] 林浴坤,陶静,陈斌. 电针对局灶性脑缺血再灌注损伤大鼠学习记忆功能的影响[J]. 中国康复理论与实践,2014,(9):831—834.
  - [5] Feng X, Yang S, Liu J, et al. Electroacupuncture ameliorates cognitive impairment through inhibition of NF-kappa B-mediated neuronal cell apoptosis in cerebral ischemia-reperfusion injured rats[J]. *Molecular Medicine Reports*,2013,7(5):1516—1522.
  - [6] Yang S, Ye H, Huang J, et al. The synergistic effect of acupuncture and computer-based cognitive training on post-stroke cognitive dysfunction: a study protocol for a randomized controlled trial of 2×2 factorial design[J]. *Bmc Complementary and Alternative Medicine*,2014,14:290.
  - [7] 吴羽楠,张蕴,林如辉. 电针对脑缺血再灌注大鼠学习记忆能力及RhoA蛋白表达的影响[J]. 中国康复理论与实践,2015,(01):17—21.
  - [8] Alam M, Shuaib A. Complexity in differentiating the expression of truncated or matured forms of MMP-2 and MMP-9 through zymography in rat brain tissues after acute ischaemic stroke[J]. *Journal of Neuroscience Methods*,2013,216(1):22—27.
  - [9] Hernandez-Guillamon M, Martinez-Saez E, Delgado P, et al. MMP-2/MMP-9 plasma level and brain expression in cerebral amyloid angiopathy-associated hemorrhagic stroke[J]. *Brain Pathology*,2012,22(2):133—141.
  - [10] Chen W, Hartman R, Ayer R, et al. Matrix metalloproteinases inhibition provides neuroprotection against hypoxia-ischemia in the developing brain[J]. *Journal of Neurochemistry*,2009,111(3):726—736.
  - [11] Li M, Peng J, Wang M, et al. Passive movement improves the learning and memory function of rats with cerebral infarction by inhibiting neuron cell apoptosis[J]. *Molecular Neurobiology*,2014,49(1):216—221.
  - [12] Tao J, Chen B, Gao Y, et al. Electroacupuncture enhances hippocampal NSCs proliferation in cerebral ischemia-reperfusion injured rats via activation of notch signaling pathway[J]. *International Journal of Neuroscience*,2014,124(3):204—212.
  - [13] 江一静,杨珊珊,陶静. 巨刺法对大鼠脑缺血再灌注损伤的神经保护机制[J]. 中国康复医学杂志,2014,(07):605—609.
  - [14] Leung MC, Yip KK, Ho YS, et al. Mechanisms underlying the effect of acupuncture on cognitive improvement: a systematic review of animal studies[J]. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*,2014,9(4):492—507.
  - [15] Kim HA, Miller AA, Drummond GR, et al. Vascular cognitive impairment and Alzheimer's disease: role of cerebral hypoperfusion and oxidative stress[J]. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*,2012,385(10):953—959.
  - [16] Dolek N, Saylisoy S, Ozbabalik D, et al. Comparison of hippocampal volume measured using magnetic resonance imaging in Alzheimer's disease, vascular dementia, mild cognitive impairment and pseudodementia[J]. *Journal of International Medical Research*,2012,40(2):717—725.
  - [17] 朱献,张琳,吴小乔. 脑缺血大鼠海马CA1、CA3区及齿状回钙神经素的表达与学习记忆损伤的关系[J]. 实用医学杂志,2012,(03):377—380.
  - [18] Cao XZ, Ma H, Wang JK, et al. Postoperative cognitive deficits and neuroinflammation in the hippocampus triggered by surgical trauma are exacerbated in aged rats[J]. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*,2010,34(8):1426—1432.
  - [19] Leonardo CC, Eakin AK, Ajmo JM, et al. Delayed administration of a matrix metalloproteinase inhibitor limits progressive brain injury after hypoxia-ischemia in the neonatal rat[J]. *Journal of Neuroinflammation*,2008,5:34.
  - [20] 刘丹,王亚春,孙洪英. MMP-2、MMP-9基因多态性与缺血性脑卒中临床分型及预后[J]. 中国实用神经疾病杂志,2011,(07):3—5.
  - [21] 祝美珍,苏春寿,吴志敏. 清热化痰Ⅱ号方对大鼠脑缺血再灌注损伤MMP-2及MMP-9表达的影响[J]. 中华中医药杂志,2014,(02):582—585.
  - [22] Manso H, Krug T, Sobral J, et al. Variants of the matrix metalloproteinase-2 but not the matrix metalloproteinase-9 genes significantly influence functional outcome after stroke[J]. *Bmc Medical Genetics*,2010,11:40.
  - [23] Wei W, Zhang W, Huang Y, et al. The therapeutic effect of DL-3-n-butylphthalide in rats with chronic cerebral hypoperfusion through downregulation of amyloid precursor protein and matrix metalloproteinase-2[J]. *Journal of International Medical Research*,2012,40(3):967—975.
  - [24] Batra A, Latour LL, Ruetzler CA, et al. Increased plasma and tissue MMP levels are associated with BCSFB and BBB disruption evident on post-contrast FLAIR after experimental stroke[J]. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*,2010,30(6):1188—1199.
  - [25] Kasai H, Fukuda M, Watanabe S, et al. Structural dynamics of dendritic spines in memory and cognition[J]. *Trends in Neurosciences*,2010,33(3):121—129.
  - [26] Gazzaniga. 认知神经科学:关于心智的生物学[M]. 北京:中国轻工业出版社,2011:310—312.