

电针对脑缺血再灌注大鼠学习记忆行为及海马区 $\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体的影响*

李春燕¹ 彭洪卫¹ 李晓洁¹ 林如辉² 陶 静¹ 陈立典^{3,4}

摘要

目的:探讨电针对脑缺血再灌注大鼠学习记忆行为及海马区 $\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体($\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor, $\alpha 7$ nAChR)的影响。

方法:将45只雄性SD大鼠按随机数字表法分为假手术组、模型组和电针组,每组均15只。模型组和电针组均参照Longo改良线栓法制备大鼠局灶性脑缺血再灌注模型。电针组电针神庭、百会穴,共7d,每次30min。采用Morris水迷宫实验观察大鼠的学习记忆功能;HE染色法观察大鼠海马神经元细胞结构变化;免疫组织化学染色法观测大鼠海马区 $\alpha 7$ nAChR免疫阳性细胞的表达;Western blot法检测大鼠海马区 $\alpha 7$ nAChR蛋白的表达。

结果:各组大鼠游泳速度未见显著性差异($P>0.05$);模型组与假手术组相比大鼠逃避潜伏期明显延长($P<0.01$),跨越平台次数明显减少($P<0.01$);电针组与模型组相比大鼠逃避潜伏期明显缩短($P<0.01$),跨越平台次数明显增加($P<0.01$)。与假手术组相比,模型组海马区CA1区 $\alpha 7$ nAChR免疫阳性细胞表达及整个海马区 $\alpha 7$ nAChR蛋白的表达降低($P<0.01$),海马神经元细胞损伤加重;与模型组相比,电针上调海马区CA1区 $\alpha 7$ nAChR免疫阳性细胞表达及整个海马区 $\alpha 7$ nAChR蛋白的表达($P<0.01$),同时降低海马神经元细胞的损伤。

结论:电针能改善脑缺血再灌注损伤大鼠的学习记忆能力,保护神经元细胞,其机制可能与上调海马区 $\alpha 7$ nAChR表达有关。

关键词 电针;脑缺血;学习记忆; $\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体

中图分类号:R743.3, R245.3 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2016)-02-0167-05

Effects of electroacupuncture on learning and memory ability and the expression of $\alpha 7$ nAChR in rats with cerebral ischemia reperfusion injury/LI Chunyan, PENG Hongwei, LI Xiaojie, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2016,31(2): 167—171

Abstract

Objective: To explore the effects of electroacupuncture on learning and memory ability and the expression of $\alpha 7$ nAChR in rats with focal cerebral ischemia reperfusion injury.

Method: Forty-five male SD rats were randomly divided into sham group ($n=15$), model group ($n=15$) and electroacupuncture group ($n=15$). The latter 2 groups were performed with middle cerebral artery occlusion for 2h and reperfusion. The electroacupuncture group received electroacupuncture treatment at Shenting (DU24) and Baihui (DU20) for 30min, once a day for 7 days. Learning and memory of the rats was tested by Morris water maze. The morphological changes of hippocampus neurons were observed by HE staining. The expression level of $\alpha 7$ nAChR was determined with immunohistochemical staining and Western blot.

Result: There were no significant differences in the swimming speed among the control, model group and electroacupuncture group ($P>0.05$). The rats in the model group demonstrated longer latency time to reach the hid-

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2016.02.008

*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 福建中医药大学中西医结合研究院; 3 福建中医药大学; 4 通讯作者

作者简介:李春燕,女,硕士研究生; 收稿日期:2015-07-22

den platform($P<0.01$) and passed the platform position fewer times in the water maze tests($P<0.01$) than the control group. In the electroacupuncture group, the rats significantly shorten the latency time($P<0.01$) and increased the frequency of passing the platform($P<0.01$) compared with the model group. And compared with the model group, electroacupuncture reduced pathological damage of neurons, increased $\alpha 7$ nAChR immune positive cells in the CA1 and the expression of $\alpha 7$ nAChR in hippocampus ($P<0.01$).

Conclusion: Electroacupuncture was helpful for improving learning and memory ability in rats of cerebral ischemia/reperfusion injury, which may associate with increasing the expression of $\alpha 7$ nAChR in hippocampus.

Author's address College of Rehabilitation Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, 350108

Key word electroacupuncture; cerebral ischemia; learning and memory; $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor

脑卒中后患者多伴有不同程度的功能障碍,认知功能障碍是脑卒中后常见的功能障碍之一,是包括患者记忆、执行、注意、推理等高级脑功能的综合性障碍,在很大程度上影响脑卒中患者运动功能的恢复,阻碍其日常生活活动能力的提高^[1-2]。电针能够有效改善卒中后认知功能障碍^[3-4],对卒中后患者的康复具有重要意义,但其治疗机制尚不明确。 $\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体($\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor, $\alpha 7$ nAChR)与认知功能密切相关^[5],作为研究改善认知功能障碍的新靶点,为电针治疗卒中后认知功能障碍的机制研究提供新的思路。本研究采用线栓法制备局灶性脑缺血再灌注损伤大鼠模型,观察电针对局灶性脑缺血大鼠学习记忆能力、海马神经元细胞结构及 $\alpha 7$ nAChR表达的影响,探讨其可能的治疗机制,为电针的临床研究提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

SPF级雄性SD大鼠45只,体重(250 ± 30)g,10—12周龄,购自上海斯莱克实验动物责任有限公司,许可证号:SCXK(沪)2012-0002。于实验前1周适应性饲养于福建中医药大学实验动物中心。饲养条件:温度(22 ± 2)℃,湿度(55 ± 15)%,12h明暗交替,自由进食与饮水。所有大鼠采用随机数字表法分为假手术组、模型组及电针组($n=15$)。整个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 主要实验试剂及仪器

$\alpha 7$ nAChR抗体(Abcam, Cambridge, UK);SP DAB试剂盒(福州迈新生物工程有限公司);GAPDH抗体及相应二抗(CST, Boston, MA, USA);

Morris水迷宫装置(中国医学科学院药物研究所);Bio-Image分析系统(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA);G6805电针仪(上海华谊仪器制造厂生产)。

1.3 模型制备

模型组、电针组参考Longa^[6]改良线栓法制备左侧大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型。具体方法:大鼠术前12h禁食,不禁水。用10%水合氯醛(3ml/kg)腹腔注射麻醉大鼠,仰卧位固定于手术台上,常规去毛消毒,取颈前正中切口,分离左侧颈总动脉、颈外动脉及颈内动脉。在近心端结扎颈总动脉及颈外动脉,于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插入约(20 ± 2)mm,轻微遇阻即止。固定栓线并缝合伤口,待缺血2h后缓慢退出栓线至颈总动脉分叉处,实现再灌注。动物于室温(25℃)下苏醒,正常饮食。假手术组只分离动脉,但不结扎、插线。

1.4 神经行为学评分

动物清醒后,采用Longa法进行神经功能评分,判断模型是否成功。即0分:无神经功能缺失症状;1分:不能完全伸展患侧(右侧)前爪;2分:行走时向患侧(右侧)转圈;3分:行走时向患侧(右侧)倾倒;4分:不能自发行走,意识丧失。评分1—3分的大鼠纳入实验,剔除死亡和造模不成功的大鼠。最终纳入实验大鼠27只,每组各9只,其中每组各取3只用于形态学检测,各取6只用于蛋白定量检测。干预前模型组和电针组的神经行为学评分为:模型组(2.07 ± 0.80)分、电针组(2.13 ± 0.74)分,差异无显著性意义($P>0.05$),具有可比性。

1.5 干预方法

电针组参考《实验针灸学》取大鼠神庭和百会穴,选用30号0.5寸华佗牌无菌毫针,斜刺0.2—0.3cm,接G6805电针仪,疏密波,频率2/10Hz,电压3—5V,以针体轻轻抖动为度。每次30min,每天1次,共7d。于手术后第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,予以同等条件抓取,但不进行电针刺激。

1.6 Morris水迷宫实验

参照前期研究^[7-8],其具体方法如下:Morris水迷宫为一直径120cm、高50cm的圆形水池,水深30cm,水温(26±2)℃,加入奶粉使水显乳白色。水池等分为4个象限,池壁外标4个入水点,圆形逃逸平台直径6cm,高28cm,没于水下2cm,置于某一象限中央。水池周围参照物保持不变。Morris水迷宫具体包括定位航行实验和空间探索实验两个部分。

定位航行试验:于手术后第3天,将受试大鼠依次从水池4个象限面向池壁放入水中,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,则将其牵引上平台,停留10s,潜伏期记为90s。历时4d。

空间探索试验:于术后第7天撤除平台,取原平台对侧象限为入水点将受试大鼠放入水中,观察并记录大鼠在90s内穿过原平台所在位置的次数。

1.7 取材及检测

1.7.1 HE染色:麻醉下开胸,暴露心脏,生理盐水300ml经左心室快速冲洗,4%多聚甲醛400ml灌流固定。取脑后置于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5μm。二甲苯脱蜡、梯度酒精脱水,苏木素及伊红染色,中性树脂封片。光镜下(200×)观察大鼠大脑海马组织细胞形态学变化。

1.7.2 免疫组织化学染色:按上述方法取材、包埋、切片,二甲苯脱蜡、梯度酒精脱水,采用微波炉法将脑片置于10×TRIS-EDTA溶液(pH9.0)中煮沸7min进行抗原修复。采用免疫组化SP染色,严格按照试剂盒说明书操作。α7nAChR一抗工作液浓度为1:100,4℃过夜,加入相应二抗,DAB显色,复染,脱水,透明,封片。在光镜下α7nAChR阳性颗粒呈棕褐色,主要表达于神经元细胞膜、细胞质中。

1.7.3 蛋白免疫印迹法(Western blot):取大鼠左侧

海马组织,-80℃冰箱保存,每100mg脑组织中加入1ml的细胞裂解液和PMSF储存液10μl,充分研磨后离心,取上清,BCA法测定蛋白浓度。样品蛋白变性后,取50μg样品蛋白,10% SDS-PAGE电泳,转移至PVDF膜上。室温封闭2h,分别用α7nAChR(1:10000)和GAPDH(1:8000)一抗孵育,4℃过夜,加入相应二抗(1:5000)室温1h。将PVDF膜置于图像扫描仪上,避光配置显色液并覆盖PVDF膜,反应1min,Image-lab图像分析系统并分析处理。以目的条带灰度值占GAPDH条带灰度值的百分比反映目的蛋白的表达水平。

1.8 统计学分析

采用SPSS 18.0统计学软件进行分析,所得数据均以均数±标准差表示,组间比较采用单因素方差分析,两两之间比较采用LSD-t检验。

2 结果

2.1 Morris水迷宫测试结果

各组大鼠游泳速度未见显著性差异($P > 0.05$),说明在水迷宫测试中MCAO模型对其游泳运动功能无影响。随着训练时间的延长,各组大鼠的逃避潜伏期均呈逐渐缩短的趋势。从术后第3天起,模型组与假手术组相比大鼠逃避潜伏期明显延长,电针组与模型组相比大鼠逃避潜伏期明显缩短,差异均有显著性意义($P < 0.01$)。术后第7天,模型组与假手术相比大鼠跨越平台次数减少,而电针组与模型组相比大鼠跨越平台次数增加,差异均有显著性意义($P < 0.01$)。见表1—2。

2.2 HE染色结果

假手术组海马区神经元细胞形态完整、排列整齐紧密,核膜核仁清晰。模型组神经元细胞排列疏松,细胞核固缩深染,核仁消失,形成空泡状结构。电针组较模型组神经元细胞结构较完整,坏死神经元细胞数量减少,胞核固缩深染现象减轻。见图1。

2.3 海马α7nAChR免疫组化染色结果

假手术组海马CA1区α7nAChR染色阳性细胞数量多,形态规则,体积大,着色深。模型组海马α7nAChR染色阳性细胞数量少,排列欠规则且分布稀疏,体积略小,着色浅。电针组与模型组相比,海马α7nAChR染色阳性细胞数量增多,形态较规则且

分布致密,着色加深。见图2。

2.4 Western blot检测α7nAChR蛋白表达结果
与假手术组相比,模型组海马α7nAChR蛋白表

达减少($P < 0.01$),电针组与模型组相比α7nAChR蛋白表达增加($P < 0.01$),差异均有显著性意义。见表3,图3。

表1 各组大鼠游泳速度					
(x±s,cm/s,n=9)					
组别	第3天	第4天	第5天	第6天	第7天
假手术组	11.32±2.06	12.18±1.80	11.93±2.77	13.69±1.90	12.68±2.46
模型组	12.41±3.29	12.39±3.58	11.56±2.95	12.92±2.90	13.98±3.14
电针组	12.90±2.13	12.87±3.04	12.19±2.43	11.82±2.80	13.26±2.18

表2 各组大鼠逃避潜伏期及穿越平台次数					
(x±s,s,n=9)					
组别	逃避潜伏期				穿越平台次数
	第3天	第4天	第5天	第6天	
假手术组	41.24±6.00	33.42±6.80	22.05±7.35	17.25±4.18	3.22±0.67
模型组	78.82±6.01 ^①	72.78±3.15 ^①	68.54±10.76 ^①	52.70±10.80 ^①	1.14±0.69 ^①
电针组	56.94±10.47 ^②	48.19±8.99 ^②	40.24±12.09 ^②	29.74±6.92 ^②	2.25±0.70 ^②

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

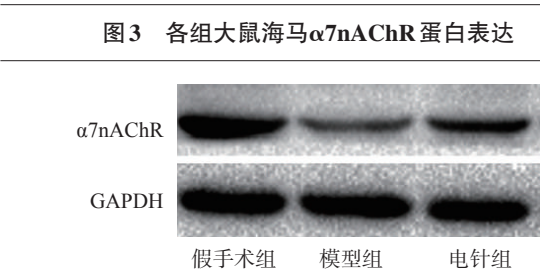
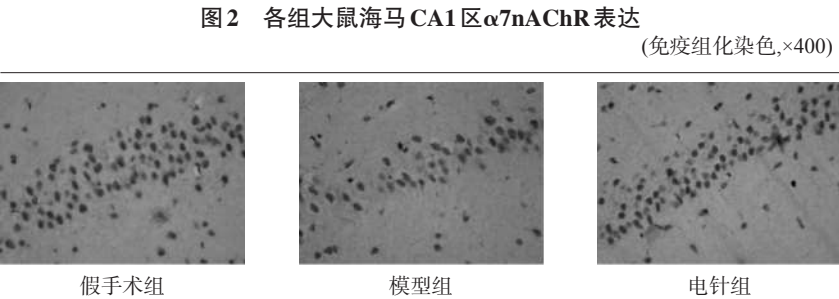
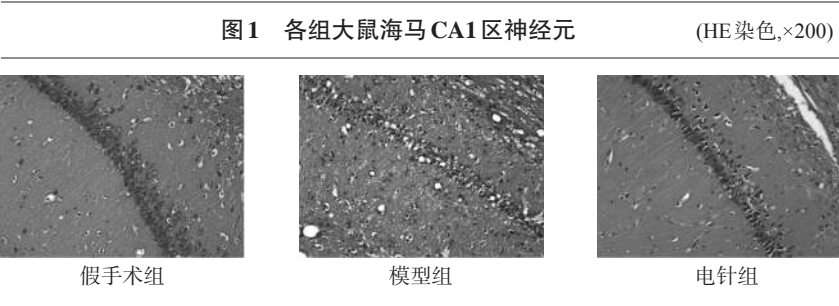


表3 各组大鼠海马α7nAChR蛋白表达量		
组别	例数	表达量(x±s)
假手术组	6	0.85±0.07
模型组	6	0.41±0.04 ^①
电针组	6	0.61±0.06 ^②

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

3 讨论

卒中后认知功能障碍属于祖国医学的“善忘”、“痴证”、“愚痴”、“痴呆”、“呆病”、“文痴”等范畴,主要为“中风痴呆症”。针刺作为传统医学的重要组成部分,在卒中后治疗中运用得非常广泛。近年来在认知功能的研究也越来越多,其中电针在临床上运用得最为广泛,并且在改善脑卒中后认知功能障碍中取得了较好疗效。百会位居巅顶,是三阳五会的穴位。神庭为督脉、足太阳、阳明之会。此二穴同属督脉穴,主治痴呆、中风、健忘、癫狂痫等神志病,同时在临床中也运用广泛。故本研究选取神庭、百会二穴观察电针对MCAO大鼠学习、记忆的影响。

本研究发现,在Morris水迷宫测试中,各组大鼠游泳速度未见显著性差异,说明MCAO模型造成的肢体功能障碍并未影响大鼠在水迷宫中的运动功能,该研究也和其他研究一致^[9]。同时,模型组与假手术组相比大鼠逃避潜伏期明显延长,跨越平台次数明显减少,而电针组与模型组相比大鼠逃避潜伏期明显缩短,跨越平台次数明显增加。说明电针能够有效改善脑缺血再灌注大鼠的学习记忆能力。这也与其他研究^[9]及团队的前期研究^[4,10]结果一致。

$\alpha 7$ nAChR是烟碱型乙酰胆碱受体的亚型,主要位于海马、丘脑、前额叶皮质和皮质下基底核等区,由5个相同的 $\alpha 7$ 亚单位构成,属于配体门控离子通道,具有快速脱敏和高钙通透性的特点^[11]。 $\alpha 7$ nAChR在突触前膜、突触后膜及突触周围均有分布,其主要介导快速的突触信号传递、相关神经递质释放以及突触重塑^[12]。 $\alpha 7$ nAChR与认知功能的多个方面密切相关,包括学习、记忆及注意等^[5]。研究发现,在多种认知功能障碍的相关疾病中,包括阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)、精神分裂症、注意缺陷多动障碍(attention deficit hyperactivity disorder, ADHD)及脑损伤等,都存在 $\alpha 7$ nAChR表达及功能的下调^[13-15]。同时使用烟碱或其他 $\alpha 7$ nAChR激动剂可增强认知和记忆功能,而使用 $\alpha 7$ nAChR拮抗剂则会影响记忆功能^[16-18]。海马区是大脑参与学习、记忆过程的重要结构。前期研究证实“益智醒脑”电针法可以上调AD模型海马CA3区 $\alpha 7$ nAChR的表达^[19],同时电针预刺激百会穴,能有效减轻脑缺血再灌注损伤,增加缺血半暗带区 $\alpha 7$ nAChR的表达^[20]。本研究选用MCAO模型,发现电针同样能够上调脑缺血再灌注大鼠海马CA1区 $\alpha 7$ nAChR免疫阳性细胞表达及整个海马 $\alpha 7$ nAChR蛋白表达,同时降低神经元细胞损伤,这可能是电针改善脑缺血再灌注大鼠学习、记忆能力的机制之一。

综上,电针神庭、百会能够有效改善脑缺血再灌注大鼠的学习记忆能力,其作用机制可能与上调脑缺血再灌注大鼠海马区 $\alpha 7$ nAChR表达及保护神经元细胞有关。但电针上调 $\alpha 7$ nAChR表达的机制尚不完全明确,有待进一步从分子生物学角度去探讨其更深层面的机制。

参考文献

- [1] Aggarwal NT, Tripathi M, Dodge HH, et al. Trends in Alzheimer's disease and dementia in the Asian-Pacific region [J]. *Int J Alzheimers Dis*, 2012, (2012):171327.
- [2] Lindeboom J, Weinstein H. Neuropsychology of cognitive ageing, minimal cognitive impairment, Alzheimer's disease, and vascular cognitive impairment[J]. *Eur J Pharmacol*, 2004, 490(1-3):83-86.
- [3] Liu F, Li ZM, Jiang YJ, et al. A meta-analysis of acupuncture use in the treatment of cognitive impairment after stroke [J]. *J Altern Complement Med*, 2014, 20(7):535-544.
- [4] Feng X, Yang S, Liu J, et al. Electroacupuncture ameliorates cognitive impairment through inhibition of NF- κ B-mediated neuronal cell apoptosis in cerebral ischemia-reperfusion injured rats[J]. *Mol Med Rep*, 2013, 7(5):1516-1522.
- [5] Levin ED. $\alpha 7$ -nicotinic receptors and cognition[J]. *Curr Drug Targets*, 2012, 13(5):602-606.
- [6] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. *Stroke*, 1989, 20(1):84-91.
- [7] Jing XH, Chen SL, Shi H, et al. Electroacupuncture restores learning and memory impairment induced by both diabetes mellitus and cerebral ischemia in rats[J]. *Neurosci Lett*, 2008, 443(3):193-198.
- [8] Li F, Yan CQ, Lin LT, et al. Acupuncture attenuates cognitive deficits and increases pyramidal neuron number in hippocampal CA1 area of vascular dementia rats[J]. *BMC Complement Altern Med*, 2015, (15):133.
- [9] Han X, Zhao X, Lu M, et al. Electroacupuncture Ameliorates Learning and Memory via Activation of the CREB Signaling Pathway in the Hippocampus to Attenuate Apoptosis after Cerebral Hypoperfusion[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013, (2013):156489.
- [10] 陈吉祥,林浴坤,吴羽楠,等.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[J].*中国康复医学杂志*, 2015, 30(3):219-223.
- [11] Lendvai B, Kassai F, Szajli A, et al. $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors and their role in cognition[J]. *Brain Res Bull*, 2013, 93(4):86-96.
- [12] Wallace TL, Porter RH. Targeting the nicotinic $\alpha 7$ acetylcholine receptor to enhance cognition in disease[J]. *Biochem Pharmacol*, 2011, 82(8):891-903.
- [13] Thomsen MS, Hansen HH, Timmerman DB, et al. Cognitive improvement by activation of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors: from animal models to human pathophysiology[J]. *Curr Pharm Des*, 2010, 16(3):323-343.
- [14] Freedman R. $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptor agonists for cognitive enhancement in schizophrenia[J]. *Annu Rev Med*, 2014, 65(1):245-261.
- [15] Fan H, Gu R, Wei D. The $\alpha 7$ nAChR selective agonists as drug candidates for Alzheimer's disease[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2015, (827):353-365.
- [16] Lykhmus O, Voytenko L, Koval L, et al. $\alpha 7$ Nicotinic acetylcholine receptor-specific antibody induces inflammation and amyloid $\beta 42$ accumulation in the mouse brain to impair memory[J]. *PLoS One*, 2015, 10(3):e0122706.
- [17] Andriambeloson E, Huyard B, Poiraud E, et al. Methyllycaconitine- and scopolamine-induced cognitive dysfunction: differential reversal effect by cognition-enhancing drugs[J]. *Pharmacol Res Perspect*, 2014, 2(4):e00048.
- [18] Boess FG, De Vry J, Erb C, et al. The novel $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor agonist N-[(3R)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-yl]-7-[2-(methoxy)phenyl]-1-benzofuran-2-carboxamide improves working and recognition memory in rodents [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2007, 321(2):716-725.
- [19] 车鹏,田建英,张学岚,等.电针法对AD大鼠空间记忆行为及其海马区 $\alpha 7$ nAChR的影响[J].*山东医药*, 2010, 50(51):25-26.
- [20] Wang Q, Wang F, Li X, et al. Electroacupuncture pretreatment attenuates cerebral ischemic injury through $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor-mediated inhibition of high-mobility group box 1 release in rats[J]. *J Neuroinflammation*, 2012, (9):24.