

电针神庭、百会对大脑中动脉闭塞大鼠学习记忆的影响及机制研究*

李晓洁¹ 俞坤强¹ 赵从快¹ 彭洪卫¹ 李春燕¹ 卓沛元¹ 林如辉² 陶 静¹ 陈立典^{1,3}

摘要

目的:研究磷酸化的环磷腺苷效应元件结合蛋白(p-cAMP-response element binding protein,p-CREB)、脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)在大鼠脑缺血再灌注中的表达,探讨电针神庭、百会对脑缺血再灌注大鼠学习记忆功能的影响及其可能机制。

方法:36只雄性SD大鼠,随机分为假手术组、模型组和电针组,每组分配12只。采用大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion,MCAO)法建立局灶性脑缺血再灌注大鼠模型。电针组电针神庭、百会穴干预7d。各组采用Morris水迷宫实验评估大鼠的学习记忆功能;TTC染色观察缺血梗死体积;免疫组化染色检测海马CA1区p-CREB,BDNF的表达。

结果:与假手术组比较,模型组鼠到达水下平台的潜伏期长些($P<0.01$),通过平台的次数少些($P<0.01$)。电针组与模型组比较潜伏期显著短些($P<0.05$),通过平台的次数显著多些($P<0.01$)。与假手术组比较,模型组的p-CREB阳性细胞明显减少而BDNF光密度明显增加。与模型组比较,电针组的p-CREB阳性细胞明显增加($P<0.01$)而BDNF光密度也增加($P<0.05$),梗死的体积则小些。

结论:电针神庭、百会可改善脑缺血再灌注大鼠的学习记忆功能,其作用机制可能与上调缺血侧海马CA1区p-CREB,BDNF的表达有关。

关键词 电针;脑缺血;学习记忆;磷酸化的环磷腺苷效应元件结合蛋白;脑源性神经营养因子

中图分类号:R743.3, R245 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2017)-08-0869-05

The effects and mechanisms of electroacupuncture at Shenting and Baihui acupoints on learning and memory in MCAO rats/LI Xiaojie, YU Kunqiang, ZHAO Congkuai, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2017, 32(8): 869—873

Abstract

Objective: To investigate p-cAMP-response element binding protein(p-CREB), brain-derived neurotrophic factor (BDNF) expressions in rats after focal cerebral ischemia-reperfusion of rats, and electroacupuncture at Shenting and Baihui acupoints.

Method: SD rats (n=36) were randomly divided into sham operation control group (Sham group), model group (I/R group) and electroacupuncture group (I/R+EA group). Each group had 12 rats. Middle cerebral artery occlusion (MCAO) was used to set up the focal cerebral I/R injury for I/R rats. The rats in I/R+EA group received electroacupuncture treatment at Shenting (DU24) and Baihui (DU20) for 7 days. Morris water maze was used to investigate learning and memory ability daily. TTC staining was used to assess the cerebral infarct volume. Immunohistochemistry was performed to test the expressions of p-CREB and BDNF in the hippocampus CA1 zone of the cerebral ischemia ($P<0.01$) ($P<0.01$) side.

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2017.08.003

*基金项目: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)

1 福建中医药大学康复医学院,福州,350122; 2 福建中医药大学中西医结合研究院; 3 通讯作者

作者简介:李晓洁,女,硕士研究生; 收稿日期:2015-10-27

Result: The rats in the model group demonstrated longer latency to reach the hidden platform($P<0.01$) and passed the platform position fewer in the water maze test($P<0.01$) than the sham group. In the electroacupuncture group, the rats significantly shorten the latency ($P<0.05$) and increased the times of passing the platform ($P<0.01$) compared with the model group. Compared with the sham group, the number of positive cells of p-CREB in model group was significantly reduced ($P<0.01$), the mean optical density of BDNF was significantly higher ($P<0.01$); Compared with the model group, the number of positive cells of p-CREB in electroacupuncture group was significantly increased ($P<0.01$), the mean optical density of BDNF was higher ($P<0.05$), the infarct volume was decreased ($P<0.01$).

Conclusion: Electroacupuncture can ameliorate learning and memory ability of cerebral ischemia-reperfusion rats. The mechanism may be related to increase the expressions of p-CREB and BDNF in hippocampus CA1 zone.

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

Key word electroacupuncture; cerebral ischemia; learning and memory; p-cAMP-response element binding protein; brain-derived neurotrophic factor

脑缺血后可导致不同程度的认知障碍,其发病率很高,对患者日常的运动功能及生活活动能力会产生巨大的影响,因此及时治疗对患者提高生存质量有重要意义。团队前期研究显示电针神庭、百会穴能在一定程度上改善脑卒中后认知功能障碍,但机制尚未完全阐明^[1-4]。有研究认为磷酸化的环腺苷效应元件结合蛋白(p-cAMP-response element binding protein, p-CREB)能增加下游基因脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)的表达,从而促进新的突触连接形成,获得长期的信息储存,增加记忆长时相^[5-6]。本研究观察电针对脑缺血再灌注大鼠学习记忆功能及缺血侧海马CA1区p-CREB和BDNF表达的影响,为电针治疗脑卒中后认知功能障碍提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

36只健康成年无特殊病原体SPF级SD大鼠,体质量(280 ± 20)g,由福建中医药大学实验动物中心提供,其许可证号为:SYXK(闽)2005-004。大鼠分笼饲养,每笼5—6只;适应性喂养1周后,采用随机数字表法将大鼠编号,并分成假手术组($n=12$)、模型组($n=12$)和电针组($n=12$),共3组。

1.2 主要实验试剂及仪器

试剂:TTC(2,3,5-氯化三苯基四氮唑):sigma;p-CREB一抗:Cell Signaling Technology;BDNF一

抗:Abcam;免疫组化试剂盒:迈新公司;苏木素染色液:碧云天公司。

仪器:华佗牌电子针疗仪:苏州医疗用品厂有限公司提供。Morris水迷宫:中国医学科学院药物研究所提供;倒置显微镜:徕卡公司提供。

1.3 动物模型制备

术前所有动物均禁食12h。大鼠称重后,参照Zea Longa方法^[7],行左侧大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)手术,制备脑缺血再灌注动物模型。具体方法: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、颈内动脉和颈外动脉。在颈内、外动脉分叉处结扎颈外动脉,并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,直至线栓至大脑前动脉近端。固定线栓,缝合伤口,1.5h后缓慢退出至颈总动脉分叉处,形成缺血再灌注模型。假手术组只分离血管,不结扎、插线。

动物苏醒后观察其体态及行为,按Zea Longa法行神经行为学评分^[7]:0分:无神经功能缺损症状;1分:提尾时不能完全伸展对侧前爪;2分:行走时向对侧转圈(向右侧转圈);3分:行走时向对侧倾倒;4分:不能自发行走,意识丧失;评分为1—3分纳入实验,干预前模型和电针两组的神经行为学评分分别为:模型组(2.08 ± 0.67)、电针组(2.17 ± 0.83),差异无

显著性意义($P > 0.05$),具有可比性。

1.4 干预方法

电针组参考《实验针灸学》^[8]取大鼠神庭和百会穴,采用疏密波,频率2/10Hz,电流1—3mA,以针体轻轻抖动为度。每次30min,每天同一时间治疗1次,共7d。造模后第1天开始治疗,直至动物被处死。假手术组、模型组置于普通笼中饲养,只给予同等条件抓取,未给予任何治疗。

1.5 Morris水迷宫

各组大鼠在实验干预第3天进行。具体操作方法参照文献^[1,9-10]。本实验主要包括定位航行实验和空间探索实验两个部分。①定位航行实验:将大鼠依次由第一象限,第二象限,第三象限,第四象限顺序面向池壁放入水中,测其在90s内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90s内大鼠未找到平台,则需将其引导到平台,学习10s,此时潜伏期记为90s。②空间探索实验:即在干预第7天,撤去平台,取平台对角线入水点将大鼠放入水中,观察并记录90s内大鼠穿过平台所需的次数。

1.6 TTC染色

各组大鼠在水迷宫后行10%水合氯醛(3ml/kg)腹腔麻醉,每组取6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,去除嗅球、小脑及低位脑干后,做6个脑冠状切片,并放入2%TTC溶液中,用锡箔纸盖住后,放入37℃恒温水浴锅30min;每隔5min翻动脑片1次,使其均匀染色。染色完成后,梗死区域被染成白色,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。随后用高分辨率数码相机拍照,并用Motic Med 6.0系统软件测量每片梗死体积(梗死体积=每个脑片梗死面积 $\times$ 2mm)。最后计算出梗死总体积/整个大脑体积百分比,作为结果统计分析。

1.7 免疫组化染色

各组大鼠在水迷宫后行10%水合氯醛(3ml/kg)腹腔麻醉,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,置入4%多聚甲醛内4℃固定24—48h。常规二甲苯脱蜡、梯度酒精脱水,热修复抗原,PBS冲洗封闭,滴加p-CREB一抗工作液(1:800),BDNF一抗工作液(1:2000),4℃孵育过夜,加二抗、三抗(链霉菌抗生素

蛋白-过氧化物酶)、DAB显色,大量自来水冲洗。苏木素复染、盐酸分色,PBS返蓝,中性树胶封片观察。

1.8 统计学分析

应用SPSS 20.0软件进行统计学处理。水迷宫数据采用重复测量方差分析;TTC染色采用两样本 t 检验;免疫组化染色采用单因素方差分析;数据均以均数 $\pm$ 标准差表示。

2 结果

2.1 电针改善MCAO大鼠学习记忆能力

定位航行试验:随着训练时间的延长,各组大鼠逃避潜伏期呈逐渐缩短趋势。与假手术组相比,模型组大鼠在术后第3,4,5,6天平均逃避潜伏期明显延长($P < 0.01$)。与模型组相比,电针组大鼠在干预后第3,4,5,6天平均逃避潜伏期缩短($P < 0.05$),见表1。

空间探索试验:干预后第7天,相比于假手术组,模型组大鼠穿越平台次数明显减少($P < 0.01$),而相比于模型组,电针组穿越平台次数明显增加($P < 0.01$),见表2。

2.2 电针减少MCAO大鼠缺血梗死体积

假手术组脑组织染色为红色,模型组和电针组脑组织均可见不同程度白色梗死灶。与模型组比较,电针组大鼠缺血梗死体积明显减少,差异具有显著性意义($P < 0.01$)。见图1,表3。

2.3 电针增强MCAO大鼠缺血侧海马CA1区p-CREB,BDNF的表达

采用免疫组化检测海马CA1区p-CREB、BDNF

表1 各组大鼠的逃避潜伏期 ($\bar{x} \pm s, s$)

组别	例数	第3天	第4天	第5天	第6天
假手术组	8	45.04 $\pm$ 8.82	21.63 $\pm$ 9.62	15.13 $\pm$ 4.44	12.82 $\pm$ 4.79
模型组	8	83.69 $\pm$ 5.04 ^①	70.68 $\pm$ 2.90 ^①	61.08 $\pm$ 6.44 ^①	53.27 $\pm$ 6.56 ^①
电针组	8	74.84 $\pm$ 7.74 ^②	63.25 $\pm$ 6.95 ^②	54.10 $\pm$ 4.65 ^②	38.19 $\pm$ 7.64 ^②
F		60.326	112.342	177.762	80.640
P		0.000	0.000	0.000	0.000

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

表2 各组大鼠的穿越平台次数 ($\bar{x} \pm s, s$)

组别	例数	穿越平台次数
假手术组	8	6.88 $\pm$ 0.83
模型组	8	2.00 $\pm$ 0.76 ^①
电针组	8	3.25 $\pm$ 0.89 ^②
F		74.930
P		0.000

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

图1 各组脑组织冠状面TTC染色



表3 各组大鼠缺血梗死体积占全脑体积的百分比 ($\bar{x}\pm s, \%$)

组别	例数	梗死体积百分比
假手术组	6	0±0
模型组	6	27.96±2.87
电针组	6	21.06±3.63 ^①

与模型组相比:① $P < 0.01$

的表达。免疫组化数据表明模型组大鼠p-CREB的阳性细胞数明显较假手术组少,差异有显著性意义($P < 0.01$)。电针组p-CREB的阳性细胞数明显比模型组多,差异有显著性意义($P < 0.01$)。见图2,表4。模型组大鼠BDNF的平均光密度值明显较假手术组高,差异有显著性意义($P < 0.01$)。电针组BDNF的平均光密度值比模型组高,差异有显著性意义($P < 0.05$)。见图3,表4。

图2 各组大鼠缺血侧海马CA1区p-CREB表达 (免疫组化染色,×400)

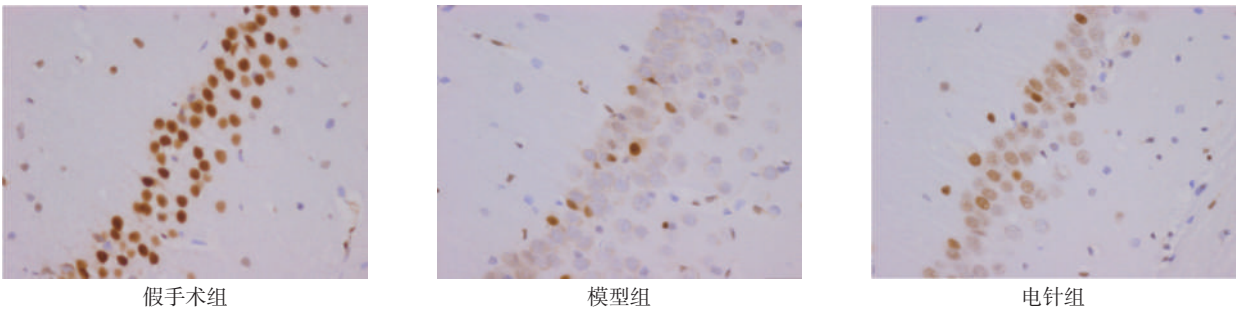


图3 各组大鼠缺血侧海马CA1区BDNF表达 (免疫组化染色,×400)

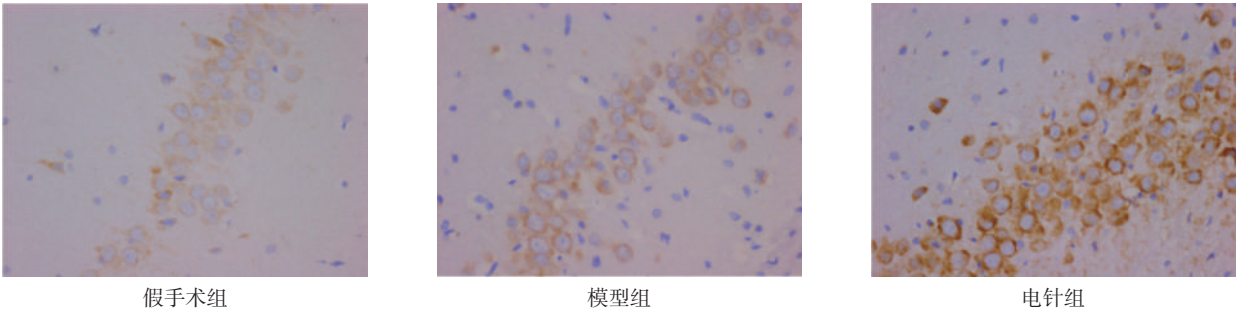


表4 各组大鼠缺血侧海马CA1区p-CREB和BDNF的表达 ($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	p-CREB(n)	BDNF
假手术组	6	60.50±7.40	0.23±0.01
模型组	6	11.00±1.79 ^①	0.26±0.01 ^①
电针组	6	27.50±5.24 ^②	0.36±0.05 ^②
F		133.893	29.432
P		0.000	0.000

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

3 讨论

针灸被作为传统疗法治疗各种疾病在一些东方国家已有几千年的历史^[11]。许多研究表明针刺在认知功能障碍方面有着良好的临床疗效^[12-13]。神庭、百会穴隶属于督脉,两穴合用常起到醒神开窍的作用。

本研究中,Morris水迷宫实验表明,与模型组相比,电针组大鼠逃避潜伏期缩短,穿越平台次数明显

增加;TTC染色显示电针可以明显减少脑缺血再灌注大鼠的缺血梗死体积。以上研究表明电针神庭和百会穴可促进神经功能的恢复,提高脑缺血再灌注大鼠的学习记忆能力,这与其他研究^[14-15]及团队之前的研究结果^[4,16]相一致,表明电针在一定程度上可以改善认知功能障碍。

环磷腺苷效应元件结合蛋白(cAMP responsive element binding protein, CREB)是DNA结合转录因子家族的成员,其133位丝氨酸残基(Ser133)的磷酸化对转录活性起着重要作用,并参与了学习记忆及突触可塑性等多种生理过程^[17-18]。

BDNF是神经营养素家族中的一员^[19-20],其不仅可以调控神经元的存活、神经细胞的增殖与成熟,还能促进学习记忆及突触的可塑性^[18,21-22]。有研究表明磷酸化的CREB能通过调节关键的靶基因如BDNF等实现维持成熟的神经元,促进损伤后的神经元再生,以及促进突触可塑性,从而形成长期记忆^[5-6,23]。在本实验中,在大鼠海马CA1区,电针组p-CREB和BDNF表达均高于模型组。本研究表明刺激MCAO大鼠海马CREB的转录活性从而调节下游基因BDNF可能是电针发挥神经保护及促进学习记忆作用的机制之一。

综上所述,电针神庭、百会穴能够改善MCAO大鼠的学习记忆能力,其作用机制可能与上调p-CREB和BDNF的表达有关,但电针作用于p-CREB和BDNF是否还有其他途径的协同作用还有待进一步研究。

参考文献

- [1] 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.
- [2] 林浴坤,林如辉,陈斌,等.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[J].*中国康复医学杂志*,2015,30(8):755—760.
- [3] 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.
- [4] 吴羽楠,张蕴,林如辉,等.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*,2015,21(01):17—21.
- [5] Ullian EM, Sapperstein SK, Christopherson KS, et al. Control of synapse number by glia[J]. *Science*, 2001, 291(5504):657—661.
- [6] Hinoi E, Balcar VJ, Kuramoto N, et al. Nuclear transcription factors in the hippocampus[J]. *Prog Neurobiol*, 2002, 68(2):145—165.
- [7] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. *Stroke*, 1989, 20(1):84—91.
- [8] 李忠仁.实验针灸学[M].北京:中国中医药出版社,2003.325—329.
- [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] 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.
- [11] Wu JN. A short history of acupuncture[J]. *J Altern Complement Med*, 1996, 2(1):19—21.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] Jin R, Jin ZG, Cai H. Influence of electroacupuncture plus jasminoidia intervention on expression of OX-42 and nuclear factor-kappa B in hippocampus and amygdale in cerebral ischemia plus diabetes rats[J]. *Zhen Ci Yan Jiu*, 2014, 39(4):305—312.
- [15] Zhang X, Wu B, Nie K, et al. Effects of acupuncture on declined cerebral blood flow, impaired mitochondrial respiratory function and oxidative stress in multi-infarct dementia rats[J]. *Neurochem Int*, 2014, (65):23—29.
- [16] 冯晓东,刘娇,陈立典.电针对局灶性脑缺血大鼠学习记忆能力的影响及其机制[J].*中国康复理论与实践*,2013,19(03):227—230.
- [17] Kandel ER. The molecular biology of memory: cAMP, PKA, CRE, CREB-1, CREB-2, and CPEB[J]. *Mol Brain*, 2012, (5):14.
- [18] Xia Z, Storm DR. Role of signal transduction crosstalk between adenylyl cyclase and MAP kinase in hippocampus-dependent memory[J]. *Learn Mem*, 2012, 19(9):369—374.
- [19] Huang L, Applegate PM, Gatling JW, et al. A systematic review of neuroprotective strategies after cardiac arrest: from bench to bedside (part II- comprehensive protection) [J]. *Med Gas Res*, 2014, (4):10.
- [20] Berretta A, Tzeng YC, Clarkson AN. Post-stroke recovery: the role of activity-dependent release of brain-derived neurotrophic factor[J]. *Expert Rev Neurother*, 2014, 14(11):1335—1344.
- [21] Leal G, Comprido D, Duarte CB. BDNF-induced local protein synthesis and synaptic plasticity[J]. *Neuropharmacology*, 2014, (76):639—656.
- [22] Shih PC, Yang YR, Wang RY. Effects of exercise intensity on spatial memory performance and hippocampal synaptic plasticity in transient brain ischemic rats[J]. *PLoS One*, 2013, 8(10):e78163.
- [23] Chaldakov GN, Tonchev AB, Aloe L. NGF and BDNF: from nerves to adipose tissue, from neurokines to metabokines[J]. *Riv Psichiatr*, 2009, 44(2):79—87.