

·基础研究·

重复经颅磁刺激对卒中后大鼠的学习记忆功能和海马区胰岛素样生长因子-1表达的影响*

张志强¹ 张莉² 张跃奇^{3,4}

摘要

目的:研究重复经颅磁刺激(rTMS)对卒中后大鼠的学习记忆功能和海马区胰岛素样生长因子1(IGF-1)表达的影响。

方法:取成年健康雄性Wistar大鼠18只,采用线栓法建立永久性大脑中动脉闭塞大鼠模型,采用低频rTMS对实验组大鼠进行干预治疗,应用免疫荧光技术检测大鼠海马区IGF-1表达变化,应用Morris水迷宫检测大鼠空间学习记忆水平。

结果:IGF-1的表达方面,海马区的平均光密度值PMCAO组显著低于PMCAO+rTMS组和sham组($P<0.01$),PMCAO+rTMS组和sham组相比平均光密度值无显著性差异。空间学习记忆方面,在1—5天定位航行实验中,PMCAO+rTMS组和sham组大鼠的上台潜伏期显著缩短,而PMCAO组上台潜伏期的缩短趋势不如前两组显著($P<0.05$),在第6天空间探索实验中PMCAO+rTMS组和sham组大鼠的第一次找到平台位置的时间少于PMCAO组($P<0.05$),并且在60s内穿台次数多于PMCAO组($P<0.01$)。

结论:低频rTMS治疗对于卒中后大鼠在学习和记忆功能的康复具有一定的临床意义,低频rTMS治疗能够在一定程度上维持大脑IGF-1的水平。

关键词 卒中后认知障碍;重复经颅磁刺激;胰岛素样生长因子-1;海马区

中图分类号:R743.3;R493 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2018)-09-1024-05

Effects of repetitive transcranial magnetic stimulation on the learning and memory ability and the expression of IGF-1 in hippocampus region of rats after stroke/ZHANG Zhiqiang, ZHANG Li, ZHANG Yueqi// Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2018, 33(9): 1024—1028

Abstract

Objective:To study the effect of repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) learning and memory ability and the expression of IGF-1 in hippocampus region of rats after stroke.

Method:Permanent middle cerebral artery occlusion (PMCAO) models were made with 18 healthy adult wistar rats. rTMS was used to intervene the PMCAO models. Immunofluorescence technique was adopted to measure the expressive change of the IGF-1 in Hippocampus. Morris water maze was used to test the learning and memory ability.

Result:Compared with PMCAO group, PMCAO+rTMS and sham groups have significant lower IOD/area of IGF-1($P<0.01$). There is no significant difference between PMCAO+rTMS group and sham group in IOD/area of IGF-1. In the first five days of Morris water maze test, the latency of PMCAO+rTMS and sham groups significantly reduced, whereas that of the PMCAO group was not so notably($P<0.05$). In the sixth day of the water maze test, compared with PMCAO group, rats in PMCAO+rTMS and sham groups used fewer

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2018.09.004

*基金项目:“十二五”兵团医药卫生重点领域科技攻关项目(2012BA023)

1 石河子大学医学院第一附属医院康复医学科,石河子,新疆维吾尔自治区,832000; 2 石河子大学医学院第一附属医院中医二科;

3 新疆医科大学第五附属医院临床心理科; 4 通讯作者

作者简介:张志强,男,主治医师; 收稿日期:2017-09-09

time to find the platform position in the first time ($P<0.05$) and crossed the platform more times within 60s ($P<0.01$).

Conclusion: Low frequency rTMS treatment is clinically meaningful for the rehabilitation of PMCAO rats in learning and memory ability and can to some extent help to keep the level of IGF-1.

Author's address Dept. of Physical Rehabilitation, the First Affiliated Hospital of the Medical College, Shihezi University, Shihezi, Xinjiang, 832000

Key word post-stroke cognitive impairment; repetitive transcranial magnetic stimulation; insulin-like growth factors-1; hippocampus

我国脑卒中的发病率逐年上升^[1],随着医疗水平的提高,虽然死亡率逐渐下降,但致残率居高不下。卒中后认知障碍(post-stroke cognitive impairment, PSCI)严重影响患者的生存质量^[2]。随着血管性认知功能障碍(vascular cognitive impairment, VCI)研究的深入,学者认为脑内胰岛素样生长因子-1(insulin-like growth factors-1, IGF-1)对认知功能、学习和记忆水平具有一定的保护作用^[3-4]。IGF-1参与调控海马神经发生及异常神经网络形成,影响海马神经元兴奋性^[5-6]。治疗方面,研究表明重复经颅磁刺激(repetitive transcranial magnetic stimulation, rTMS)作为一种引起大脑神经元超极化或去极化的非侵入性刺激治疗手段,可以调节神经元或大脑皮质的兴奋性^[7],近年来广泛的应用于部分神经和精神疾病的基础研究和临床治疗^[8-9]。研究显示,rTMS能增强阿尔兹海默病患者的语义理解能力^[10],改善记忆水平^[11],在认知功能的康复方面可能有积极作用^[12]。动物实验方面,有研究表明低频rTMS可以减轻血管性痴呆大鼠的认知功能^[13]。虽然研究较多,但对于认知和学习记忆功能下降的机制仍未达成共识。

因此,本研究将采用动物模型的方法,研究rTMS对卒中后大鼠的学习记忆功能和海马区IGF-1表达的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物

18只6周龄,SPF级,雄性Wistar大鼠(体重 $210\text{g}\pm 20\text{g}$),由新疆医科大学实验动物中心提供(许可证号:SCXK(新)2003-0001),所有动物经一般体检均无异常。饲养于严格12—12h光控时间、调温 $20\text{—}23\text{°C}$ 、调湿50%—60%的动物房。实验动物使

用中尽量减少动物遭受不必要的痛苦,实验动物的操作和处理过程遵守石河子大学关于利用实验动物开展研究的规定。

1.2 方法

1.2.1 实验分组:所有大鼠随机分为3组,分别为:脑卒中无治疗组(PMCAO,6只)、脑卒中治疗组(PMCAO+rTMS,6只)和假手术对照组(sham,6只)。

1.2.2 永久性大脑中动脉闭塞(permanent middle cerebral artery occlusion, PMCAO)大鼠模型建立:采用国际成熟的线栓法^[14]建立动物模型。具体过程为将直径约0.2mm的尼龙线于75%医用酒精中浸泡消毒,之后放入肝素化的生理盐水中浸泡备用。采用0.1%水合氯醛腹腔注射麻醉,暴露并分离左侧颈外动脉,结扎烙断其远端并烙断其分支小动脉。动脉夹暂时夹闭左侧颈总及颈内动脉,在左侧颈外与颈总动脉交界处剪一小口,将尼龙线顺势插入,然后结扎并松开动脉夹,再将尼龙线继续插入直至大脑前动脉处(大约插入距颈总动脉分叉处18—19mm),阻断大脑中动脉的血液供应。之后用青霉素冲洗伤口,并缝合皮肤,注意清洁无菌操作。假手术对照组过程基本相同,只是线栓只插入距颈总动脉分叉处3mm。完成后将大鼠置于通风良好的笼中,直到大鼠意识恢复后,放回原笼内饲养。

1.2.3 大鼠模型的评价:采用国际常用的大鼠肢体运动五分制评价标准^[15],具体为0分:无偏瘫肢体功能缺失;1分:轻度局灶性神经功能缺失;2分:中度局灶性神经功能缺失;3分:重度局灶性神经功能缺失;4分:无法自主行走。分数在1—3分之间的大鼠入组。

1.2.4 低频rTMS干预:大鼠造模结束2周后开始使用配有直径为9cm圆形线圈的高聚焦磁刺激器(MES-10,美国)对rTMS组大鼠进行连续14天的低

频干预。参考国内外相关研究^[16-18],干预操作和刺激参数具体设置如下:

大鼠固定:给予干预前将大鼠提前5min固定于自制的大鼠固定器上,以让大鼠适应环境;

线圈放置:使圆形线圈中心处于大鼠矢状缝中点,平行于顶骨并距离头皮5mm处固定安置;

干预强度:将干预强度设置为能成功诱发麻醉大鼠后肢腓肠肌动作电位的平均强度,即0.4 Tesla^[16-17]。

干预频率:每天固定时间进行400个脉冲频率1Hz、强度0.4Tesla、宽度70 μ s的单脉冲刺激,每20个为1串,串间间隔10s。

1.2.5 Morris水迷宫检测大鼠空间学习记忆水平:低频rTMS干预结束后,对三组大鼠进行Morris水迷宫空间学习记忆水平检测^[19]。具体为前5天进行定位航行实验,记录60s内大鼠运行轨迹和上台潜伏期等指标;第6天进行空间探索实验,记录60s内大鼠运行轨迹和穿平台次数等指标。

1.2.6 免疫荧光法检测海马区IGF-1的表达:免疫荧光标本的制备:Morris水迷宫实验结束后,对3组大鼠进行心脏灌注取脑。采用0.1%水合氯醛腹腔注射麻醉,暴露心脏后取灌注针从心尖部进针,进入左心室至主动脉起始端,剪开右心耳,快速灌注冰生理盐水(4 $^{\circ}$ C,250ml),至右心耳切口处流出液变清澈,肝脏苍白,随后灌入4 $^{\circ}$ C的4%的多聚甲醛溶液250ml,总灌注时间控制在1.5h左右。然后取出脑组织,置于4 $^{\circ}$ C的4%多聚甲醛溶液浸泡24h。脱水、透明、浸蜡、石蜡包埋,蜡块预冷后行冠状连续切片,片厚3 μ m。

海马CA1区IGF-1的表达研究:将选取的石蜡

切片脱蜡、脱二甲苯、清除内源性过氧化物酶活性、抗原修复后,分别滴加兔抗大鼠IGF-1(Abcam公司,美国)。所有切片同时进行免疫荧光染色。切片加一抗后,放入湿盒内,4 $^{\circ}$ C过夜。第2天将切片于37 $^{\circ}$ C复温、PBS振洗3次(5min/次)后,滴加荧光二抗,避光37 $^{\circ}$ C孵育45min。然后用PBS避光振洗3次(5min/次),滴加PI,避光孵育4min。最后用PBS避光振洗3次(5min/次),100g/L的甘油封片。在激光扫描共聚焦免疫荧光显微镜下进行观察并采图10个视野。通过Image-Pro Plus 6.0图像分析软件,对每个视野下阳性表达区域的累积光密度(integrated optical density, IOD)和面积(area)进行测量,可得到平均光密度值(mean density=IOD/area)。最后求得10个视野平均光密度值的算术平均数。

1.3 统计学分析

采用SPSS 19.0统计软件对数据进行分析,数据用均数 \pm 标准差表示,各组动物之间的均数采用最小显著差异法检验,组间相关性分析使用Spearman相关分析。所有统计学检测都是双尾检验,显著性水平设定为0.05,各种检测都不做特殊校正。

2 结果

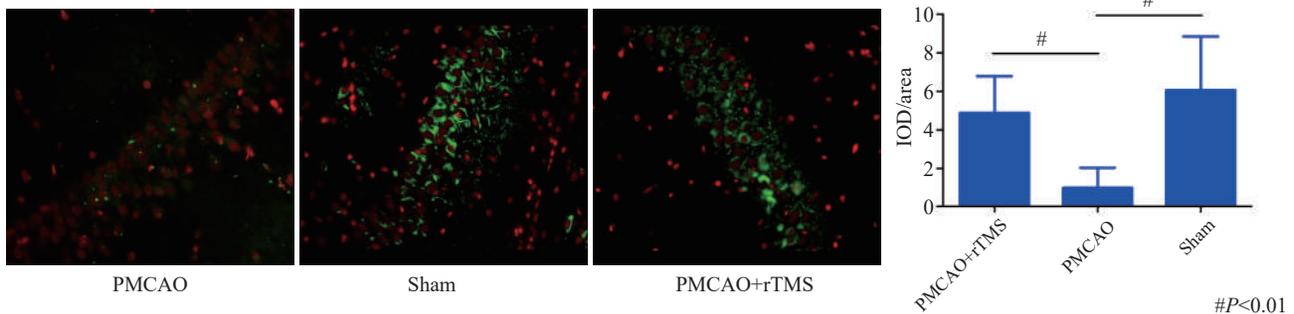
2.1 IGF-1在海马区的表达情况

本研究测量了PMCAO组、PMCAO+rTMS组和sham组的IGF-1在海马区的表达情况。由图1所示,IGF-1蛋白主要定位于细胞浆中,在海马区的平均光密度值PMCAO组显著低于PMCAO+rTMS组和sham组($P<0.01$)。而PMCAO+rTMS组和sham组相比平均光密度值无显著性差异。

2.2 Morris水迷宫实验检测各组记忆学习水平

图1 IGF-1在各组大鼠海马区的表达

(免疫荧光染色, $\times 400$)



在Morris水迷宫实验中,如图2和图3所示,随着第1天到第5天的定位航行实验学习,第3天 sham组大鼠的上台潜伏期较PMCAO+rTMS组和PMCAO组显著缩短($P<0.01$),第4天和第5天PMCAO+rTMS组和sham组大鼠的上台潜伏期显著缩短,而PMCAO组上台潜伏期的缩短趋势不如前两

组显著($P<0.05$),说明PTSD大鼠学习能力下降。如图2和图4所示,在第6天的水迷宫空间探索实验中,PMCAO+rTMS组和sham组大鼠的第一次找到平台位置的时间和穿台次数均高于PMCAO组,有显著性差异($P<0.05$ 、 $P<0.01$)。

图2 Morris水迷宫航行轨迹

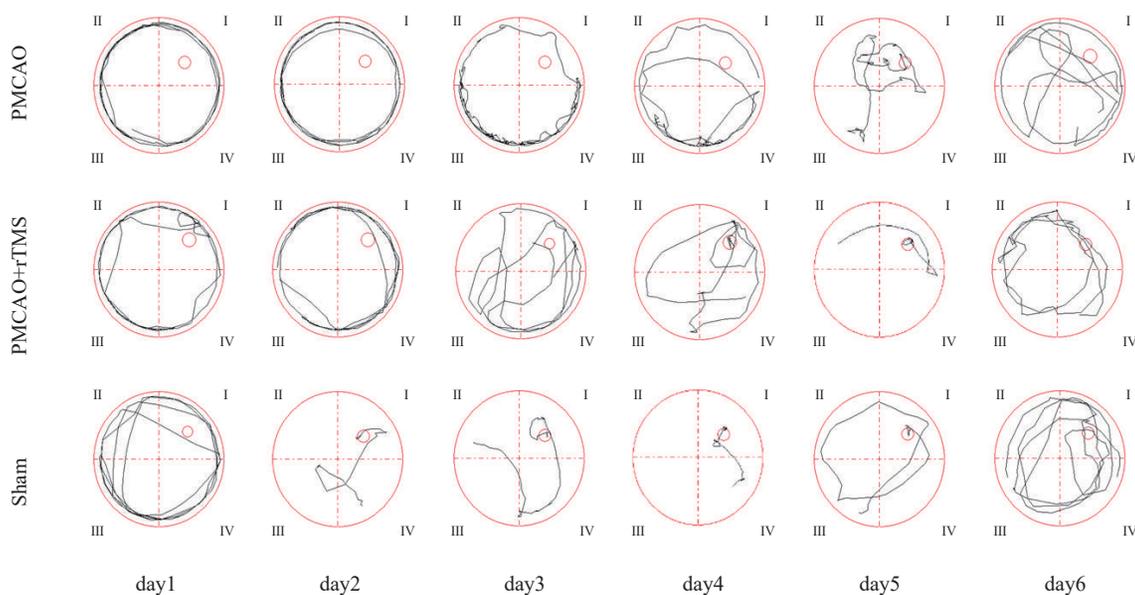
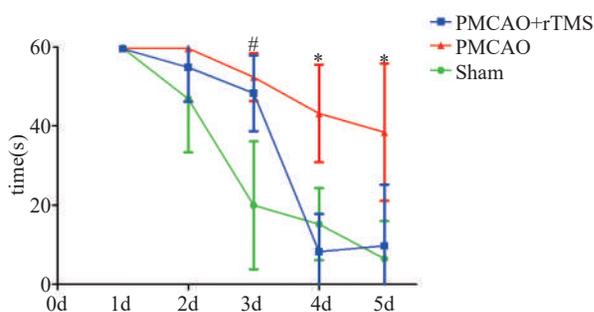


图3 Morris水迷宫定位航行实验

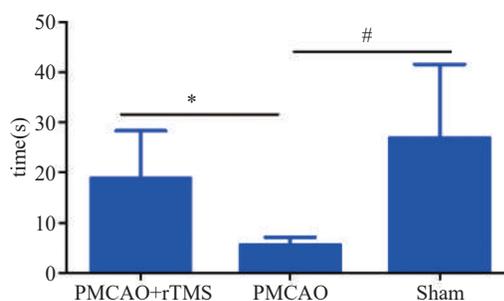


* $P<0.05$;# $P<0.01$

3 讨论

IGF-1在大脑内广泛分布,与胰岛素在分子结构、受体和功能上重叠,两者具有很高的同源性,在细胞增殖、凋亡以及肿瘤的发生中发挥重要作用^[20-22]。研究发现,IGF-1具有促进大脑的合成代谢,促进突触形成和促进大脑髓鞘形成等作用。而

图4 Morris水迷宫空间探索实验



* $P<0.05$;# $P<0.01$

IGF-1水平下降,可能促进认知功能障碍的发展^[23]。对卒中后出现认知功能改变的患者进行研究发现,在外周血和脑组织中IGF-1表达均有显著改变。本研究通过免疫荧光技术发现,大脑海马区IGF-1的表达在永久性大脑中动脉闭塞大鼠模型中显著降低,这可能参与了认知和记忆下降这一病理过程,可

能是脑卒中患者在认知水平和记忆能力方面减退的病理机制之一。Hu等^[24]通过实验发现脑缺血损伤后,IGF-1的表达在急性期24h是升高的,随着时间的延长,IGF-1水平也随之降低。我们的共识是IGF-1可能参与了卒中后认知功能改变的发生、发展和预后的病理过程,且IGF-1对患者认知和记忆功能的康复具有重要作用。

rTMS近年来广泛被国内外学者应用于脑血管病在认知和学习记忆功能改变的研究中,并取得了一定的进展。有研究发现,1Hz的低频rTMS对卒中后失语患者具有一定疗效,能显著改善患者的非言语性记忆能力,改善认知功能^[25-26]。有研究认为,rTMS对认知的积极作用可能与大脑皮质兴奋性和神经元活性的改变有关^[27-29]。在本实验中,我们采用Morris水迷宫实验测试各组的上台潜伏期及穿平台次数,并记录了其运行轨迹。发现PMCAO+rTMS组和sham组大鼠的上台潜伏期显著缩短,而PMCAO组上台潜伏期的缩短趋势不如前两组显著,同样的,PMCAO+rTMS组和sham组大鼠的穿平台次数也明显多于PMCAO组,这说明低频rTMS治疗能够改善梗死后血管性认知障碍大鼠的空间学习和记忆水平。结合大脑海马区IGF-1水平的变化情况,本研究认为低频rTMS治疗能够维持大脑IGF-1的水平,通过某种机制使IGF-1水平与正常水平接近,从而在一定程度上改善了脑卒中患者的认知和记忆功能。

总之,本研究认为低频rTMS治疗对于卒中后患者在学习记忆功能的康复中具有一定的临床意义,低频rTMS治疗能够在一定程度上维持大脑IGF-1的水平,为预防和减缓患者的认知和记忆功能降低、改善其生存质量提供了一条有益思路,但仍需更多的基础及临床实验数据支持。

参考文献

[1] 谢琨,汪学红,章娟,等.脑卒中患者对脑卒中相关知识的认知及其健康教育的需求情况[J].中华物理医学与康复杂志,2014,36(2):136-139.
[2] 方向华,王淳秀,梅利平,等.脑卒中流行病学研究进展[J].中华流行病学杂志,2011,32(9):847-853.
[3] Anacker C, Cattaneo A, Luoni A, et al. Glucocorticoid-related molecular signaling pathways regulating hippocampal neurogenesis[J]. Neuropsychopharmacology, 2013, 38(5): 872-883.

[4] Borsini A, Zunszain PA, Thuret S, et al. The role of inflammatory cytokines as key modulators of neurogenesis[J]. Trends in Neurosciences, 2015, 38(3): 145-157.
[5] Muller AP, Gnoatto J, Moreira JD, et al. Exercise increases insulin signaling in the hippocampus: physiological effects and pharmacological impact of intracerebroventricular insulin administration in mice[J]. Hippocampus, 2011, 21(10): 1082-1092.
[6] Haas CB, Kalinine E, Zimmer ER, et al. Brain insulin administration triggers distinct cognitive and neurotrophic responses in young and aged rats[J]. Molecular Neurobiology, 2016, 53(9): 5807-5817.
[7] Luber B, Lisanby SH. Enhancement of human cognitive performance using transcranial magnetic stimulation (TMS) [J]. Neuroimage, 2014, 85: 961-970.
[8] Lefaucheur JP, André-Obadia N, Antal A, et al. Evidence-based guidelines on the therapeutic use of repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) [J]. Clinical Neurophysiology, 2014, 125(11): 2150-2206.
[9] Ferreri F, Vecchio F, Voller L, et al. Sensorimotor cortex excitability and connectivity in Alzheimer's disease: A TMS-EEG Co-registration study[J]. Human Brain Mapping, 2016, 37(6): 2083-2096.
[10] 阎澍好,宋为群.经颅磁刺激在阿尔茨海默病和轻度认知障碍中的临床研究和应用进展[J].中国康复医学杂志,2015,(1):69-72.
[11] Tatti E, Rossi S, Innocenti I, et al. Non-invasive brain stimulation of the aging brain: State of the art and future perspectives[J]. Ageing Research Reviews, 2016, 29: 66-89.
[12] Shukla AW, Shuster JJ, Chung JW, et al. Repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) therapy in Parkinson disease: a meta-analysis[J]. PM&R, 2016, 8(4): 356-366.
[13] Wang F, Geng X, Tao HY, et al. The restoration after repetitive transcranial magnetic stimulation treatment on cognitive ability of vascular dementia rats and its impacts on synaptic plasticity in hippocampal CA1 area[J]. Journal of Molecular Neuroscience, 2010, 41(1): 145-155.
[14] 肖伟,罗艺.小鼠局灶性脑缺血再灌注后IL-33及其受体的时程表达[J].中风与神经疾病杂志,2017,34(3):202-207.
[15] Jiang Y, Sun L, Xuan X, et al. Impacts of N-Butylphthalide on expression of growth factors in rats with focal cerebral ischemia[J]. Bosnian Journal of Basic Medical Sciences, 2016, 16(2): 102.
[16] Luft AR, Kaelin-Lang A, Hauser TK, et al. Transcranial magnetic stimulation in the rat[J]. Experimental Brain Research, 2001, 140(1): 112-121.
[17] Gersner R, Kravetz E, Feil J, et al. Long-term effects of repetitive transcranial magnetic stimulation on markers for neuroplasticity: differential outcomes in anesthetized and awake animals[J]. Journal of Neuroscience, 2011, 31(20): 7521-7526.
[18] 白冰,赵琳,张朝辉.重复经颅磁刺激对抑郁大鼠学习记忆及海马CA3区超微结构的影响[J].中华物理医学与康复杂志,2014,36(007):503-507.
[19] 路芳,莫林宏,王奕.探索学习环境对脑梗死模型大鼠神经

(下转第1049页)