

·基础研究·

电针对血管性痴呆大鼠记忆力及海马BDNF、PSD-95蛋白表达的影响*

梁慧英¹ 廖琳¹ 游国清¹ 林阳阳² 燕铁斌² 董军涛²

摘要

目的:观察电针对血管性痴呆(VD)大鼠记忆力的影响,以及其对大鼠海马组织脑源性神经生长因子(BDNF)与突触后致密蛋白-95(PSD-95)蛋白表达的影响,探讨电针治疗血管性痴呆的可能分子机制。

方法:将Wistar大鼠随机分为假手术组、模型组和电针组,每组8只。假手术组暴露双侧颈总动脉,但不结扎;模型组和电针组采用双侧颈总动脉永久性结扎法建立VD大鼠模型。治疗过程中3组大鼠均采用柔软型大鼠固定器固定。电针组选取百会、足三里穴,接通电流,每天1次,每次留针30min,连续治疗14天;模型组与假手术组只给予固定。治疗前后采用新事物识别实验对3组大鼠进行记忆力的检测。治疗结束后采用免疫印迹法检测大鼠海马组织BDNF与PSD-95的蛋白质表达情况,采用Image J图像分析系统对蛋白表达水平进行分析。

结果:经过14天的治疗后,电针组大鼠对新物体的探索指数高于治疗前($P<0.05$),高于模型组大鼠($P<0.05$)。电针组大鼠海马组织的BDNF、PSD-95的蛋白质表达均高于模型组,差异有显著性意义($P<0.05$)。

结论:电针血管性痴呆模型大鼠的百会穴、足三里穴能有效改善血管性痴呆大鼠的记忆能力,提高大鼠海马组织中PSD-95、BDNF蛋白的表达,电针对记忆力的改善可能与PSD-95、BDNF表达增加相关,有可能是通过影响BDNF-GluA1-PSD95信号传导通路而发挥效用。

关键词 电针;血管性痴呆;记忆力;BDNF;PSD-95

中图分类号:R245, R338.64 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2019)-08-0902-05

Effects of electroacupuncture on the impaired memory and protein expression of BDNF and PSD-95 in the hippocampus in vascular dementia rats/LIANG Huiying, LIAO Lin, YOU Guoqing, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2019, 34(8): 902—906

Abstract

Objective: To observe the effect of electroacupuncture(EA) on the impaired memory and protein expression of BDNF and PSD-95 in the hippocampus in vascular dementia(VD) rats, so as to find out the underlying molecular mechanisms of EA in treating VD.

Method: Twenty-four Wistar rats were randomly divided into sham-operation group, model group, and EA group (8 in each group). The study adopted the VD rat model with permanent bilateral common carotid artery occlusion for the model group and the EA group, while exposure and no occlusion of the bilateral common carotid were carried on the rats in the sham-operating group. All the rats were kept in an immobilization apparatus while receiving treatments. EA was applied onto “Baihui” (GV20) and “Zusanli” (ST36) in EA group for 30min, once a day for 14 days. And the sham-operation group and the model group were only immobilized. New object recognition test was adopted to test rats’ memory before and after treatment, and recognition indexes were recorded. After 14 days treatment, the protein expression of BDNF and PSD-95 was detected by West-

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2019.08.005

*基金项目:广东省中医药局科研项目(20161263);中山市科技计划项目(2016B1034)

1 中山市人民医院,广东省中山市,528400; 2 中山大学孙逸仙纪念医院康复医学科

作者简介:梁慧英,女,博士,副主任医师;收稿日期:2018-04-25

ern blotting.

Result: Recognition indexes were higher in the EA group than the model group ($P<0.05$), after treatment and higher than before treatment in the EA group ($P<0.05$). BDNF and PSD-95 expressed more in the EA group than the model group with obvious significance ($P<0.05$).

Conclusions: Electro-acupuncture applied onto “Baihui” (GV20) and “Zusanli” (ST36) could improve impaired memory caused by vascular dementia in rats, and increase the expression of PSD-95 and BDNF, indicating that the memory improvement might be related to the increasing production of PSD-95 and BDNF, and it might be achieved via the BDNF-GluA1-PSD95 signal transduction pathway.

Author's address Zhongshan City People's Hospital, Guangdong, Zhongshan, 528400

Key word electro-acupuncture; vascular dementia; memory; BDNF; PSD-95

目前研究显示,针刺治疗可有效增强血管性痴呆(vascular dementia, VD)患者的学习记忆能力^[1-3]。前期研究显示电针百会穴、足三里穴,血管性痴呆模型大鼠在新事物识别试验中探索指数(recognition index, RI)、识别指数(discrimination index, DI)具有相当程度的升高,提示电针可以有效改善大鼠的记忆能力^[4];同时,发现电针大鼠海马组织的群峰电位升高,长时程增强(long-term potentiation, LTP)易化^[5]。国外研究结果显示,含 GluR1 亚单位的 α -氨基-3-羟基-5-甲基-4-异恶唑丙酸(α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid, AMPA)受体(GluA1)相关信号传导通路可调节 LTP 的表达^[6-7],并影响记忆力^[8],其中 GluA1 的上游蛋白脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)及下游结合蛋白突触后致密物(post-synaptic density, PSD)95 蛋白发挥着至关重要的作用。本研究旨在探索电针对 VD 大鼠海马组织中 BDNF、PSD-95 蛋白表达的影响,初步探讨电针治疗血管性痴呆的可能分子机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

选用广东省医学实验动物中心提供的健康 Wistar 大鼠 32 只,雄性,体重 $240\pm 20\text{g}$,SPF 级,实验动物质量合格证明编号:44008500004013,饲养于中山大学实验动物中心屏障环境中,动物实验设施使用证明编号:0042618。动物经适应性喂养 1 周后,按随机数字表法分为 3 组,即假手术组、模型组、电针组,每组 8 只。

1.2 主要试剂与仪器

兔来源 BDNF、GluA1、PSD-95 单克隆抗体、鼠来源 GAPDH 单克隆抗体、羊抗兔 IgG、兔抗鼠 IgG (Abcam, 美国),化学发光显影液(Millipore, 美国),电泳仪、电转化仪、凝胶成像系统(Bio-Rad, 美国),上海产 G 型电针治疗仪,柔软型大鼠固定器(原上草医疗科技有限公司)。

1.3 血管性痴呆大鼠模型的制作

模型组、电针组采用双侧颈总动脉永久性结扎法造模^[9]。大鼠术前 12h 禁食,不禁水,用 10% 水合氯醛(0.35g/kg 体重)腹腔注射麻醉大鼠,仰卧位固定于手术台上,碘酒消毒,取颈前正中切口,分离暴露左、右两侧颈总动脉,以“0”号线结扎双侧颈总动脉的近端及远端阻断双侧颈总动脉的血流,最后逐层缝合伤口。术后大鼠在屏障环境中继续饲养、观察。假手术组麻醉及手术过程同上,但不阻断颈总动脉。

1.4 治疗方法

造模完成后第 7 天开始(行为学检测完成后),将大鼠放入柔软型大鼠固定器,电针组参照《大鼠穴位图谱的研制》^[10]中穴位定位方法选取百会穴及足三里穴进针,选用 28 号 1 寸华佗牌无菌毫针,于头部百会穴(顶骨正中)向前斜刺 2mm,足三里穴(膝关节后外侧,在腓骨小头下方 5mm 处)直刺 7mm,连接电针治疗仪,选用 2Hz 连续波,强度以大鼠能耐受为度(大约为 2mA)。每天 1 次,每次 30min,连续治疗 14d。假手术组与模型组均同时以柔软型大鼠固定器固定 30min,每天 1 次,连续 14d。

1.5 新事物识别试验(New Object Recognition Test, NORT)

治疗开始当天及治疗结束当天分别对大鼠进行

NORT以检测大鼠的记忆能力。

实验设备为一个80cm×80cm×80cm黑色不反光有机材料制作的盒子,敞箱放置在一个固定日光灯光源下方。试验前先将动物置于盒子中10min以适应新环境。训练阶段将2个完全相同的物体分别放于盒子2个相对的角落里,将动物放于盒子中5min,观察其探索活动(将鼻子靠近物体的距离<2cm或直接用鼻子触到物体为探索1次)。测试阶段将训练阶段的一个物体换成另一种形状的物体,将动物置于盒子中5min。实验结束后分别记录大鼠探索新物体和熟悉物体时间。测试阶段大鼠对新出现的物体探索时间TN与总探索时间(TF+TN)的比值为探索指数(TN/(TF+TN))^[1]。

1.6 蛋白检测

治疗结束后以10%水合氯醛足量麻醉大鼠并放血处死,迅速取脑,分离海马,加入含1%PMSF的裂解液,超声匀浆裂解,离心,取上清。采用BCA法测定蛋白浓度,取总量20μg的蛋白,在10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺中电泳,将蛋白转移至PVDF膜上,将膜在4℃ 5%牛血清中封闭过夜,一抗抗体4℃孵育过夜,吐温-三羟甲基氨基甲烷缓冲盐溶液(TBS-T)洗3次,二抗室温孵育1h。应用底物化学发光显示反应产物,Bio-Rad显影仪显影。采用Image J图像分析系统对蛋白表达水平进行分析。

1.7 统计学分析

采用SPSS16.0统计软件包进行统计学处理,所有数据均用均数±标准差表示。各组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),每两组间比较用LSD检验,以 $P<0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 各组大鼠对新事物的探索指数比较

大鼠对新出现的物体探索时间TN与总探索时间(TF+TN)的比值为探索指数(TN/(TF+TN))。研究结果显示治疗前模型组和电针组大鼠对新物体的探索指数较假手术组显著降低(0.535 ± 0.099 vs 0.748 ± 0.113 , 0.511 ± 0.106 vs 0.748 ± 0.113),差异有显著性意义($P<0.05$),提示模型组和电针组大鼠经过造模后记忆力下降,表明造模成功。

经过14d的治疗后,电针组大鼠对新物体的探

索指数与治疗前比较明显升高(0.667 ± 0.097 vs 0.511 ± 0.106),差异有显著性意义($P<0.05$);与模型组大鼠比较,数值升高(0.667 ± 0.097 vs 0.522 ± 0.089),差异有显著性意义($P<0.05$),提示电针组大鼠的记忆力较模型组大鼠记忆力好。

2.2 各组大鼠海马组织GluA1蛋白的灰度比值

模型组GluA1的表达水平(0.398 ± 0.072)较假手术组(1.644 ± 0.317)明显降低,差异有显著性意义($F=58.945$, $P<0.05$)。电针组GluA1的表达水平(1.034 ± 0.109)明显高于模型组(0.398 ± 0.072),组间差异有显著性意义($F=95.501$, $P<0.05$)。

2.3 比较各组大鼠海马组织BDNF蛋白的灰度比值

模型组BDNF的表达水平较假手术组明显降低(0.423 ± 0.065 vs 0.655 ± 0.082),差异有显著性意义($P<0.05$)。电针组BDNF的表达水平明显高于模型组(0.994 ± 0.082 vs 0.423 ± 0.065),组间差异有显著性意义($P<0.05$)。电针组BDNF的表达水平高于假手术组(0.994 ± 0.082 vs 0.655 ± 0.082),差异有显著性意义($P<0.05$)。

2.4 各组大鼠海马组织PSD-95蛋白的灰度比值

模型组PSD-95的表达水平较假手术组明显降低(0.205 ± 0.087 vs 1.252 ± 0.104),差异有显著性意义($P<0.05$)。电针组PSD-95的表达水平明显高于模型组(1.466 ± 0.206 vs 0.205 ± 0.087),组间差异有显著性意义($P<0.05$)。

3 讨论

VD是由各种脑血管疾病(如脑梗死、脑出血、

表1 大鼠对新事物的探索指数比较

组别	动物数	治疗前	治疗后
假手术组	8	0.748 ± 0.113	0.785 ± 0.106
模型组	8	$0.535\pm0.099^{\text{①}}$	0.522 ± 0.089
电针组	8	$0.511\pm0.106^{\text{①}}$	$0.667\pm0.097^{\text{②③}}$

注:①治疗前与假手术组比较 $P<0.05$ 。②治疗后与治疗前比较 $P<0.05$;③与模型组比较 $P<0.05$ 。

图1 各组大鼠海马GluA1蛋白的灰度比值

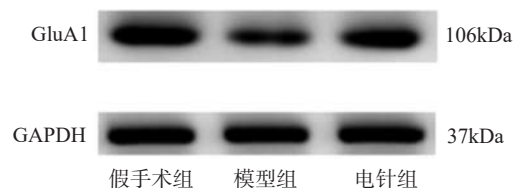


图2 各组大鼠海马BDNF蛋白的灰度比值

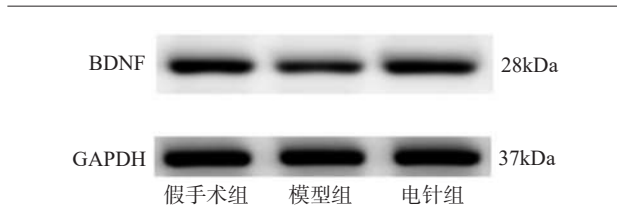
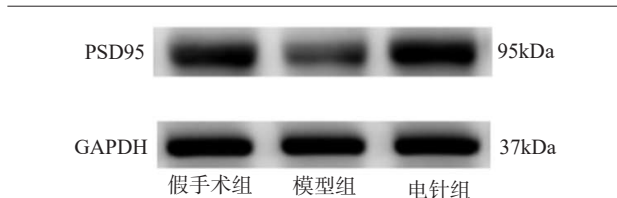


图3 各组大鼠海马PSD-95蛋白的灰度比值



脑低灌注等)引起的脑功能障碍而产生的获得性智能损害综合征,可危害老年人生活。现今我国血管性痴呆的发病率达1.1—3.0%^[12],不仅给患者带来巨大的痛苦,同时也给家庭和社会带来沉重的经济负担。研究认为血管性痴呆是可以防治的痴呆症,如早期治疗具有可逆性^[13]。

血管性痴呆属于中医学健忘、善忘、痴证、痴呆、呆病等范畴,《医方集解》说道“人之精与志,皆藏于肾,肾精不足则肾气衰,不能上通于心,故迷惑善忘也”,《辨证录·呆病》指出“肝郁则木克土,而痰不能化,胃衰则土不制水,而痰不能消,于是痰积于胸中,盘踞于心外,使神明不清而成呆病”,《医林改错》提到了“凡有瘀血皆令人善忘”。由此可见,肾精不足、脑髓空虚、痰瘀阻窍是痴呆(认知障碍)的基本病因病机。百会穴,位于督脉上,入脑络,可安神定志;足三里穴是足阳明胃经的合穴,“养先后天之气”。临床常以百会穴、足三里穴为主穴治针刺治疗血管性痴呆。临床研究显示针刺可有效治疗血管性痴呆^[1-3]。实验研究显示电针可有效改善血管性痴呆模型大鼠的记忆能力^[14-16]。但其分子机制尚不清楚。

BDNF-GluA1-PSD95 信号传导通路在海马兴奋性突触传递中起关键作用^[6-7]。GluA1 在突触后膜表面自由滑动,在致密区移出、移入,但不能产生突触传递。而 PSD-95 位于突触活性区突触后膜下方与胞浆相连^[17],其主要作用是捕获 GluA1,并与之结合形成复合物,将 GluA1 锚定在突触后致密区;同时,抑制侧向扩散或细胞内摄取作用,使得 GluA1 牢

牢的锚定在突触后致密区。由此,突触后膜上 GluA1 的表达增加,可增强 GluA1 介导的突触应答、易化 LTP,并进而改善记忆力^[18-22]。与此同时, BDNF 可刺激 GluA1 蛋白的表达增加,增强 GluA1 与 PSD-95 的相互作用,诱导 GluA1 移动、插入到突触后膜上^[23-25],增强突触传递效率。

前期研究结果显示^[26],电针可增加大鼠海马组织中 GluA1 的蛋白表达,然而 GluA1 蛋白表达的升高并不能使突触传递增强。本研究拟进一步探讨电针对大鼠海马组织中 PSD-95 和 BDNF 蛋白表达的影响。

本研究以电针刺激血管性痴呆模型大鼠的百会穴及足三里穴,观察模型大鼠记忆力的变化,以及海马组织中 PSD95 及 BDNF 蛋白的表达。采用新事物识别实验检测大鼠的记忆能力,通过比较电针组治疗前后及电针组与模型组的探索指数差别,评估电针的治疗效果,结果显示电针刺激血管性痴呆模型大鼠的百会穴、足三里穴 14 天后,治疗组大鼠对新物体的探索指数显著升高,差异有显著性意义。研究结果提示电针能有效改善血管性痴呆大鼠的记忆能力。

采用免疫印迹法检测 PSD-95 蛋白的表达情况,结果显示模型组大鼠 PSD-95 的表达水平较假手术组明显降低(0.205 ± 0.087 vs 1.252 ± 0.104 , $P < 0.05$);研究结果与李青云等^[27]、Zhu 等^[28]、Gandhi 等^[29]的研究结果一致,提示大鼠记忆力的下降可能与 PSD-95 表达下降相关。电针 VD 模型大鼠的百会、足三里穴后,电针组 PSD-95 的表达水平明显高于模型组(1.466 ± 0.206 vs 0.205 ± 0.027 , $P < 0.05$);本研究结果与李斐斐等^[30]研究结果一致,电针 SAMP8 小鼠可改善学习记忆,同时增加海马组织中 PSD-95 的蛋白表达,提示电针改善记忆力的同时提高海马组织中 PSD-95 的蛋白表达。

本研究采用免疫印迹法检测 BDNF 蛋白的表达情况,结果显示模型组大鼠 BDNF 的表达水平较假手术组明显降低(0.423 ± 0.065 vs 0.655 ± 0.082 , $P < 0.05$),提示大鼠记忆力的下降可能与 BDNF 表达下降相关。电针治疗后,电针组大鼠海马组织 BDNF 的蛋白表达较模型组显著升高(0.994 ± 0.082 vs 0.423 ± 0.065 , $P < 0.05$),提示电针可有效提高血管性痴呆模型大鼠海马组织的 BDNF 蛋白表达。张业贵

等^[31]发现电针VD模型大鼠后,大鼠大脑皮质BDNF阳性细胞表达增加;刘佩等^[15]研究结果显示电针后大鼠海马组织中BDNF mRNA表达上调,并且随治疗时间延长,表达升高;本研究的结果与文献报告的结果相一致,显示电针可有效上调血管性痴呆模型大鼠海马组织中BDNF的表达,提示电针改善大鼠记忆能力可能与BDNF表达上调相关。

综上所述,电针血管性痴呆模型大鼠的百会穴、足三里穴可有效改善大鼠记忆力,提高大鼠海马组织中PSD-95、BDNF蛋白的表达,电针对记忆力的改善可能与PSD-95、BDNF表达增加相关,有可能是通过影响BDNF-GluA1-PSD95信号传导通路而发挥效用。下一步我们将采用免疫荧光、免疫共沉淀等技术进一步探讨电针改善血管性痴呆认知功能的分子机制。

参考文献

- [1] Huang Fan, Kuang Wei-chuan, Zhou Fei-xiong, et al. Therapeutic efficacy observation on acupuncture treatment for vascular cognitive disorder following a cerebral infarction[J]. J Acupunct Tuina Sci, 2012, 10(1): 29—33.
- [2] 何宇峰,李建婷,赵明华,等. 调神通督针法联合中西医结合卒中单元治疗血管性痴呆随机平行对照研究[J]. 实用中医内科杂志, 2016, 30(8):84—86.
- [3] 刘白云,张广涛,刘卫国. 针刺督脉为主治疗血管性痴呆的临床观察[J]. 湖北中医杂志, 2018, 40(5):45—47.
- [4] 梁慧英,林阳阳,燕铁斌,等. 电针对血管性痴呆模型大鼠记忆能力的影响[J]. 中国康复医学杂志, 2015, 30(6):527—531
- [5] He X, Yan T, Chen R, et al. Acute effects of electro-acupuncture (EA) on hippocampal long term potentiation (LTP) of perforant path-dentate gyrus granule cells synapse related to memory[J]. Acupunct Electrother Res, 2012, 37 (2—3): 89—101.
- [6] Selcher JC, Xu W, Hansong JE, et al. Glutamate receptor subunit GluA1 is necessary for long term potentiation and synapse unsilencing, but not long-term depression in mouse hippocampus[J]. Brain Res, 2012, 1435:8—14.
- [7] Terashima A, Suh YH, Isaac JTR. The AMPA receptor subunit GluA1 is required for CA1 hippocampal long-term potentiation but is not essential for synaptic transmission[J]. Neurochem Res, 2017, <https://doi.org/10.1007/s11064-017-2425-3>
- [8] Bannerman DM, Borchardt T, Jensen V, et al. Somatic accumulation of GluA1-AMPA receptors leads to selective cognitive impairments in mice[J]. Front Mol Neurosci, 2018,11: 199. doi: 10.3389/fnmol.2018.00199
- [9] Farkas E, Luiten PG, Bari F. Permanent, bilateral common carotid artery occlusion in the rat: a model for chronic cerebral hypoperfusion- related neurodegenerative diseases[J]. Brain Res Rev, 2007, 54(1) :162—180.
- [10] 华兴邦,李辞蓉,周浩良,等. 大鼠穴位图谱的研制[J]. 实验动物与动物实验, 1991,000(1):1—5
- [11] Antunes M, Biala G. The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications[J]. Cogn Process, 2012, 13(2):93—110.
- [12] Chen LP, Wang FW, Zuo F, et al. Clinical research on comprehensive treatment of senile vascular dementia[J]. J Tradit Chin Med, 2011, 31(3):178—181.
- [13] Gorelick PB. Status of risk factors for dementia associated with stroke[J]. Stroke, 1997, 28(2):459—463.
- [14] 韦登明,贾学敏,尹向旭,等. 电针改善血管性痴呆大鼠学习记忆及其与海马神经细胞蛋白激酶C表达的关系[J]. 中国老年学杂志, 2013, 33(2):328—330.
- [15] 刘佩,刘喆,魏居瑞,等. 电针对血管性痴呆大鼠海马源性神经营养因子mRNA表达及学习记忆的影响[J]. 中国康复医学杂志, 2013, 28(9):822—825.
- [16] Jing X, Chen S, 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.
- [17] Funke L, Dakoji S, Bret D. Membrane-associated guanylate kinases regulate adhesion and plasticity at cell junctions [J]. Annual Review Biochem, 2005, 74: 219—245.
- [18] Jackson AC, Nicoll RA. The expanding social network of ionotropic glutamate receptors: TARPs and other transmembrane auxiliary subunits[J]. Neuron, 2011, 70(2):178—199.
- [19] Ehrlich I, Malinow R. Postsynaptic density 95 controls AMPA receptor incorporation during long-term potentiation and experience-driven synaptic plasticity[J]. J Neurosci, 2004, 24 (4):916—927.
- [20] Elias GM, Funke K, Stein V, et al. Synapse-specific and developmentally regulated targeting of AMPA receptors by a family of MAGUK scaffolding proteins[J]. Neuron, 2006, 52(2):307—320.
- [21] Yudowski GA, Olsen O, Adesnik H, et al. Acute Inactivation of PSD-95 destabilizes AMPA receptors at hippocampal synapses[J]. PLoS One, 2013, 8(1): e53965.
- [22] Opazo P, Choquet D. A three-step model for the synaptic recruitment of AMPA receptors[J]. Mol Cell Neurosci, 2011, 46(1):1—8.

(下转第949页)