

电针通过调控NGF/TrkA信号通路改善脑缺血大鼠学习记忆障碍的研究*

陈潞婷^{1,2} 彭姣姣¹ 黄晓琳¹ 韩肖华^{1,3}

摘要

目的:探讨电针百会、大椎穴促进脑缺血大鼠学习记忆功能的可能机制。

方法:将30只雄性SD大鼠随机分为3组,即假手术组、模型组及电针组。采用永久性双侧颈总动脉结扎(permanent bilateral common carotid artery occlusion, BCCAO)模型。电针组造模后第二天开始行百会、大椎穴电针治疗,每天1次,每次20min,共28天。采用Morris水迷宫检测大鼠的学习记忆功能,免疫荧光染色观察海马神经元存活情况,蛋白质印迹法(Western blot, WB)检测海马组织神经生长因子(nerve growth factor, NGF)、酪氨酸蛋白激酶A(tyrosine kinase A, TrkA)及磷酸化酪氨酸蛋白激酶A(phosphorylated-tyrosine kinase A, p-TrkA)蛋白的表达情况。

结果:模型组大鼠海马神经元标志物NeuN阳性细胞较假手术组显著减少($P<0.01$),电针组海马神经元标志物NeuN阳性细胞较模型组显著增加($P<0.01$)。Morris水迷宫结果显示与假手术组相比,模型组大鼠的平均潜伏期明显延长($P<0.01$),穿过平台次数显著减少($P<0.01$)。与模型组相比,电针组大鼠的平均潜伏期明显缩短($P<0.01$),穿过平台次数显著增加($P<0.05$)。WB结果显示与假手术组相比,模型组大鼠海马组织NGF和p-TrkA蛋白表达量显著下降($P<0.01$),而电针组大鼠海马组织NGF和p-TrkA蛋白表达量比模型组增加($P<0.01$),各组间TrkA蛋白表达量没有显著性差异($P>0.05$)。

结论:电针可以改善脑缺血大鼠学习记忆功能障碍,电针发挥作用的机制可能与激活NGF/TrkA信号通路有关。

关键词 电针;学习记忆;脑缺血;水迷宫;NGF/TrkA通路

中图分类号:R245, R49 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2020)-02-0129-06

Research on the electroacupuncture promoting learning and memory of rats with cerebral hypoperfusion through NGF/TrkA signal pathway/CHEN Luting, PENG Jiaojiao, HUANG Xiaolin, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2020, 35(2): 129—134

Abstract

Objective: To explore the mechanism of electroacupuncture(EA) in promoting learning and memory of rats with cerebral hypoperfusion.

Method: Thirty male SD rats were randomly divided into three groups: the sham group, the model group and the EA group. Permanent bilateral common carotid artery occlusion(BCCAO) model was used in this study. EA was started on the second day after the model surgery, the EA group was given EA therapy at Baihui and Dazhui acupoint for 20min/day, a total of 28 days. Morris water maze was used to assess the learning and memory function of rats. The survival of hippocampal neurons could be determined by immunofluorescence staining and Western blot was used to detect the expression of NGF(nerve growth factor), TrkA (tyrosine kinase A) and p-TrkA (phosphorylated-tyrosine kinase A) protein.

Result: Immunofluorescence staining revealed the marker NeuN in hippocampal neurons was decreased in the

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2020.02.001

*基金项目:国家自然科学基金面上项目(81774404)

1 华中科技大学同济医学院附属同济医院康复医学科,湖北省武汉市,430030; 2 长江航运总医院; 3 通讯作者

第一作者简介:陈潞婷,女,硕士,住院医师; 收稿日期:2019-07-22

model group compared with the sham group($P<0.01$), increased in the EA group compared with the model group($P<0.01$). Morris water maze test showed that compared with the sham group, the escape latency in the model group was significantly longer($P<0.01$), and the times of crossing the platform were reduced($P<0.01$). Compared with the model group, the escape latency in the EA group was shortened($P<0.01$) and the times of crossing the platform were increased($P<0.05$). WB results showed that the expression of NGF and p-TrkA proteins was significantly decreased in the model group($P<0.01$) compared with the sham group, and increased in the EA group compared with the model group($P<0.01$). There were no significant differences between the three groups in TrkA protein expression($P>0.05$).

Conclusion: EA can improve the learning and memory dysfunction in cerebral ischemia rats, and the mechanism may be related to the activation of NGF/TrkA signaling pathway.

Author's address Department of Rehabilitation Medicine, Tongji Medical College, Tongji Hospital, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, 430030

Key word electroacupuncture; learning and memory; cerebral hypoperfusion; Morris water maze; NGF/TrkA signal pathway

血管性认知损害(vascular cognitive impairment, VCI)是导致失智的第二大类因素,仅次于阿尔茨海默病(Alzheimer disease, AD),约20%的失智患者由VCI造成的^[1]。慢性脑灌注不足是导致血管性认知障碍常见的因素之一^[2],而永久性双侧颈总动脉结扎模型是慢性脑灌注不足最常用的模型,可以导致海马神经元进行性损伤,继而引起进行性学习记忆功能障碍^[3]。目前临床上对VCI的治疗尚没有较好的治疗方法,但近年来的研究表明,电针能改善VCI所致的认知功能障碍^[4-5]。研究显示电针百会穴和大椎穴可以改善脑缺血引起的学习记忆功能障碍^[6],百会和大椎穴都是督脉腧穴,而督脉上通于脑,因此在治疗脑血管疾病中较常选用^[7]。虽然电针的作用机制还未明确,有研究显示,电针可以通过促进神经营养因子的释放来发挥作用^[8]。神经生长因子(nerve growth factor, NGF)是一种调节神经系统发育的神经营养因子,参与神经元的生长、分化、成熟、再生等重要的生理过程,是神经生长因子家族中最重要的一类。研究表明NGF影响大鼠海马突触可塑性和学习记忆的形成,阻断内源性的NGF可以减弱海马长时程增强(LTP)及损伤认知功能^[9]。而且,NGF/酪氨酸蛋白激酶A(tyrosine kinase A, TrkA)通路参与胆碱神经元的发育^[10],调节胆碱酯酶的合成,促进基底节胆碱能神经元投射至海马区,并参与海马和内侧隔核间的学习记忆投射环路^[11-12]。因此,在本研究中,我们将探讨电针是否可能通过调控NGF/TrkA信号通路来改善脑缺血大鼠学习记忆功能。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

SPF级雄性SD大鼠30只,体重240—280g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供(许可证号:SCXK湘2011—0003),在华中科技大学同济医学院附属同济医院实验动物中心饲养,每笼3只大鼠,动物房恒温为 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$,通风,保证12h昼夜节律循环,动物可自由摄食饮水。

实验分组:采用随机数字法将30只SD大鼠分为3组:假手术组、模型组、电针组,每组各10只。

1.2 实验试剂、仪器

实验试剂:抗体NeuN(1:100,货号ab177487, abcam公司)、DAPI(Boster公司,货号AR1177)、小鼠单克隆抗体 β -actin(1:200,货号BM0627, Boster公司)、兔多抗NGF(1:1000,货号DF6061, Affinity公司)、兔多抗TrkA(1:1000,货号AF4689, Affinity公司)、兔多抗p-TrkA(1:1000,货号AF7184, Affinity公司)、BCA蛋白浓度测定试剂盒(货号P0010, 碧云天公司)、ECL底物液(货号NCI5079, Thermo公司)。

实验材料和仪器:无菌针灸针(苏州医疗用品厂有限公司)、PVDF膜(IPVH00010, Millipore公司)、脉冲针灸治疗仪(G6805-1A, 上海华谊)、水迷宫实验系统(中国生命科学院)、荧光显微镜(奥林巴斯)、电转仪(DYCZ-40, 北京六一仪器厂)、垂直电泳槽(DYCZ-24DN, 北京六一仪器厂)、微量移液器(Eppendorf)。

1.3 模型制作

制作永久性双侧颈总动脉结扎(permanent bilateral common carotid artery occlusion,BCCAO)模型。大鼠以10%水合氯醛腹腔注射麻醉(3ml/kg),取仰卧位,充分暴露其颈部皮肤。备皮消毒后,沿颈部正中中线切开1.5cm,分离胸锁乳突肌和舌骨锁骨肌暴露双侧的颈总动脉,分离颈总动脉,用4—0缝合线结扎双侧颈总动脉。关闭伤口,缝合皮肤,实验过程中监测大鼠肛温维持在 $37^{\circ}\text{C}\pm 0.2^{\circ}\text{C}$,待其苏醒后放回笼子中。假手术组同模型组操作一致,仅不结扎双侧颈总动脉。

1.4 电针治疗

造完模的第二天即对电针组大鼠进行电针(electrical stimulation,EA)治疗:用30号1寸的无菌针灸针在百会穴处斜刺入1cm,大椎穴处直刺入0.5cm,针柄用电极连接到电针治疗仪上,百会连接到负极,大椎连接到正极。电针治疗选取连续波,频率为2Hz,强度为1—2mA,正确连接后可以观察到大鼠耳朵或胡须轻微颤抖,每次治疗时间为20min,每天1次,持续治疗28天。本实验研究采用盲法,实验的分组、评估、检测均由实验设计者以外对本实验设计不知情的人员来执行。

1.5 检测指标

学习记忆功能检测:在电针治疗28天后即对各组大鼠进行学习记忆检测,Morris水迷宫系统可以从定位航向和空间探索两个方面来评估大鼠学习记忆能力。实验时间持续5天,前4天为定位航向训练,第5天撤掉平台后进行空间探索实验。实验设定在60s内找到平台则记录找到平台时的时间为逃避潜伏期,让大鼠在平台上停留10s再进行下一象限实验,而超过60s未找到平台则逃避潜伏期时间记为60s,统计数据进行分析。

海马NeuN阳性细胞表达并计数:学习记忆检测完成后,每组随机取5只大鼠,经灌注取材并在4%多聚甲醛中固定12h后的脑组织,分别经20%、30%蔗糖脱水后进行冰冻切片,依据大鼠立体定位图谱,以前囟为坐标基点,选取A—P:2—6mm的脑片,切片厚度为30 μm ,将切片保存在冻存液中,置于 -20°C 保存。每只大鼠随机选取3张脑片,进行免疫荧光染色,在荧光显微镜下观察海马CA1区(根

据大鼠立体定位图谱D—V:2.5—3mm,L: ± 1 —3mm)NeuN表达情况并做细胞计数。

海马组织NGF、TrkA及p-TrkA蛋白含量的测定:每组取剩下的5只大鼠麻醉后迅速取出完整脑组织,置于冰面上剥离取出双侧的海马组织,放入冻存管中,于 -80°C 保存。用蛋白质印迹法(Western blot, WB)来检测NGF、TrkA及磷酸化酪氨酸激酶A(phosphorylated-tyrosine kinase A, p-TrkA)蛋白的含量,并做统计学分析。

1.6 统计学分析

统计学分析采用SPSS 18.0进行,多组间比较采用单因素方差(one-way ANOVA)分析,多组间两两对比采用最小显著差异法(LSD)或新复极差法检验(Dunnett T3),数据统一用均数 $\pm$ 标准误(mean $\pm$ SEM)形式表示,以 $P<0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 学习记忆能力检测

Morris水迷宫显示,在经过4天的定位航向训练,各组大鼠的逃避潜伏期均随着训练天数的增加而缩短,如图1A所示。在定位航向实验中,各组大鼠4天的平均潜伏期时间有所不同,分别为假手术组 $23.6\pm 0.83\text{s}$,模型组 $46.6\pm 2.91\text{s}$,电针组 $32.8\pm 1.14\text{s}$,与假手术组比较,模型组的平均潜伏期明显延长($P<0.01$),电针组的平均潜伏期延长($P<0.05$),而与模型组相比,电针组的平均潜伏期缩短($P<0.01$),如图1B所示。在第5天撤掉平台后进行空间探索实验发现,模型组(1.4 ± 0.24)较假手术组(3.2 ± 0.37)在60s内穿过平台的次数明显减少($P<0.01$),与模型组相比,电针组(2.6 ± 0.26)穿过平台的次数增加($P<0.05$),假手术组与电针组比较没有显著性差异($P>0.05$),如图1C所示。

2.2 海马神经元NeuN的表达

大鼠脑组织免疫荧光染色发现,三组海马CA1区NeuN的阳性细胞表达情况如图2A所示。通过各组大鼠NeuN的阳性细胞计数发现,与假手术组(127.2 ± 4.32)相比,模型组(79.2 ± 4.72)大鼠海马CA1区NeuN的阳性细胞数量表达显著较少($P<0.01$),电针组(114.8 ± 6.13)的NeuN阳性细胞数量比模型组增加($P<0.01$),假手术组与电针组NeuN比

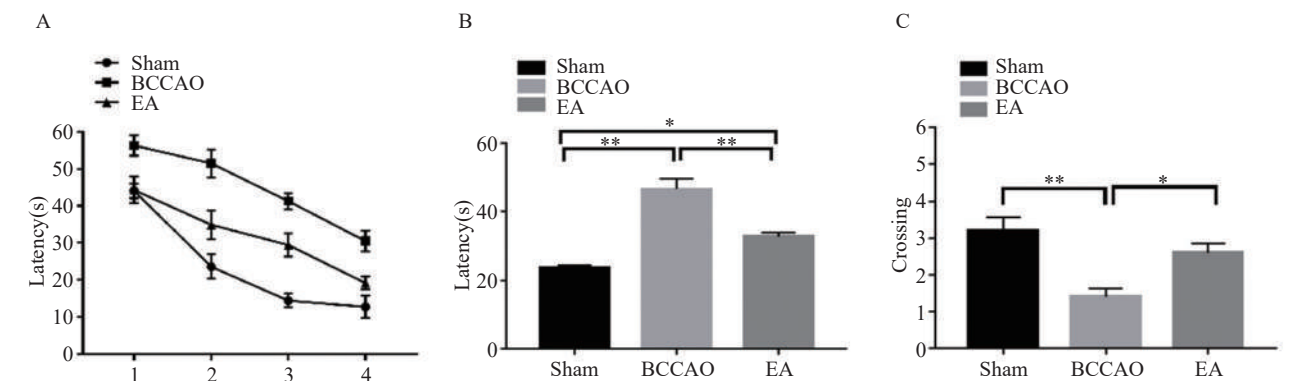
较阳性细胞数量没有显著性差异($P>0.05$),如图2B所示。

2.3 海马区NGF、TrkA及p-TrkA蛋白含量的测定

在水迷宫实验后,采用Western blot方法检测大鼠海马区组织NGF、TrkA及p-TrkA蛋白含量。结果发现与假手术组(0.78 ± 0.043 , 0.44 ± 0.027)相比,模型组的NGF、p-TrkA蛋白表达量(0.41 ± 0.041 ,

0.15 ± 0.014)显著下降($P<0.01$),电针组的NGF、p-TrkA蛋白表达量(0.62 ± 0.051 , 0.28 ± 0.022)下降($P<0.05$ 和 $P<0.01$)。与模型组相比,电针组的NGF、p-TrkA蛋白表达量显著增加($P<0.01$),如图3B、C所示。而假手术组、模型组和电针组的TrkA蛋白表达量没有显著性差异($P>0.05$),如图3D所示。

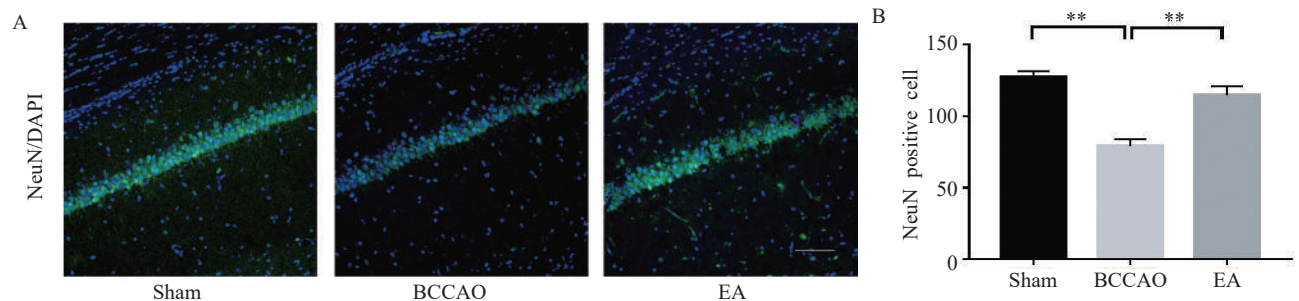
图1 各组大鼠水迷宫检测结果



(A)为各组大鼠在4天训练中逃避潜伏期的变化情况。(B)为3组大鼠4天平均潜伏期的比较。(C)为空间探索实验中各组大鼠穿越目的平台次数的比较。 $**P<0.01$, $*P<0.05$, $n=10$ 。Sham:假手术组,BCCAO:模型组,EA:电针组

图2 各组大鼠海马CA1区神经元标志物NeuN表达的情况

(免疫荧光染色)



(A)为3组大鼠NeuN免疫荧光染色,Bar=100 μ m。(B)为3组大鼠NeuN阳性表达的细胞计数比较。 $**P<0.01$, $n=5$ 。Sham:假手术组,BCCAO:模型组,EA:电针组

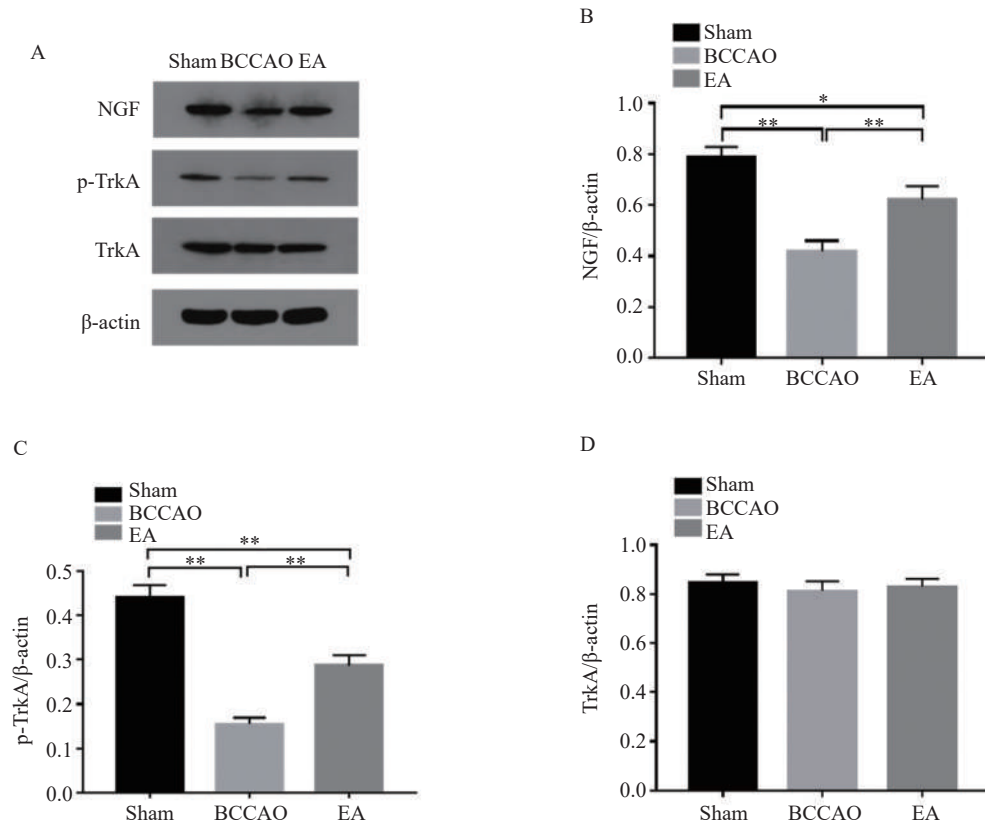
3 讨论

近年来VCI越来越受到人们的关注,其重要的影响因素之一为慢性脑灌注不足,慢性脑灌注不足可导致进行性认知障碍,后逐渐进展为失智。在本研究中采用了永久性双侧颈总动脉结扎模型,通过海马CA1区神经元NeuN阳性细胞的染色计数和水迷宫行为学检测验证了这一模型可以造成海马神经元的死亡且可以引起学习记忆功能的障碍。在Du

等^[13]实验研究中有类似的研究结果,他们用Nissl染色发现永久性颈总动脉结扎造模后大鼠海马神经元的凋亡较假手术组大鼠增加,且针刺治疗可缓解脑缺血大鼠海马神经元的凋亡。另有研究表明在BCCAO模型1个月后可以引起大鼠学习记忆的损伤,用水迷宫实验可以检测其认知功能的变化^[14],与我们的研究结论是一致的。

本研究中观察到,BCCAO造模后1月脑组织中

图3 Western blot方法检测NGF、TrkA及p-TrkA蛋白表达量情况



(A)为NGF、TrkA及p-TrkA蛋白的表达条带。(B)、(C)、(D)分别为3组大鼠海马组织NGF、TrkA及p-TrkA蛋白相对含量的比较。 $**P<0.01$, $*P<0.05$, $n=5$ 。Sham:假手术组, BCCAO:模型组, EA:电针组

NGF表达量较假手术组显著下降,磷酸化的NGF受体p-TrkA表达量也出现下降,提示BCCAO慢性脑缺血模型可能影响NGF/TrkA通路蛋白的表达,同时水迷宫结果表示模型组大鼠学习记忆显著下降,提示NGF/TrkA信号通路的下调可导致认知水平的下降。NGF作为发现最早的一类神经营养因子,不仅在胚胎时期神经元发育过程中起着重要的作用,而且能减轻脑损伤后神经元的损伤,促进神经再生和突触可塑性^[9]。NGF有两个不同的调节受体分别为TrkA和p75, p75在大脑中广泛存在于各种类型的神经细胞中,其可以促进TrkA特异性结合NGF调节神经发育,在没有TrkA结合的情况下, p75结合NGF可能介导细胞凋亡的过程,也可能作为独立受体介导细胞死亡,目前对于p75受体功能还存在争议^[15]。而TrkA多表达于大脑皮层和基底前脑的胆碱能神经元中,研究表明NGF/TrkA对胆

碱能神经元的生长发育起着重要作用,且NGF在胆碱能神经元损伤后可以减缓损伤并维持其胆碱能表型^[16]。NGF/TrkA信号通路异常可以介导胆碱能神经元死亡、功能缺失或紊乱继而导致认知功能的障碍^[12]。在早些年的研究中已经发现胆碱能神经元的损伤参与血管性认知障碍,其中可能机制为脑血流的灌注不足,且这一发生过程也与AD相互关联和影响^[17]。也有研究表示,NGF/TrkA通路异常可加速Aβ前体蛋白沉淀和Aβ介导的毒性作用来影响认知功能^[18], Aβ的毒性作用也会损伤胆碱能神经元,继而导致认知水平的下降。

本研究发现电针组海马组织中NGF和p-TrkA含量较模型组显著增加,同时电针组的大鼠学习记忆水平较模型组大鼠改善,提示电针治疗可能通过调节NGF/TrkA通路蛋白的表达量从而发挥改善认知功能的作用。目前已经有研究显示电针治疗可以

激活 NGF/TrkA 通路。Zhang 等研究发现在脊髓损伤后通过电针治疗, NGF 和 p-TrkA 蛋白表达量显著增加, 大鼠的神经源性膀胱可以得到改善^[19]。Duan 等研究也表示电针作用在脑缺血大鼠的百会、大椎穴, 可以促进海马区 NGF 的表达^[8]。另外 Rocco 等^[20]发现电针和 NGF/TrkA 以及胆碱能神经系统密切相关, 电针可以通过调节 NGF/TrkA 信号通路来缓解糖尿病引起的 Tau 蛋白的磷酸化和大脑胆碱神经元标志物的缺失。此外, 我们的研究结果观察到三组大鼠海马组织中 NGF 和 p-TrkA 蛋白含量有显著差异, 而总的 TrkA 没有显著差异, 提示上调的 NGF 通过磷酸化 TrkA 蛋白传导信号, 而电针对总 TrkA 蛋白的表达量可能没有影响, 这也与之前的一些研究是相符合的^[19]。因此, 结合本实验结果, 我们有理由推断电针对脑缺血大鼠认知功能的改善作用可能是通过激活 NGF/TrkA 信号通路来实现的。

本研究结果显示, 电针百会和大椎穴可以上调慢性脑缺血后 NGF/TrkA 通路蛋白的表达及减少神经元的损伤, 从而改善脑缺血后学习记忆功能。本研究证实了电针百会和大椎穴在未来治疗认知障碍中的可能价值, 同时也为以 NGF/TrkA 通路为靶点研究针灸改善认知障碍提供了一个新的方向。

参考文献

- [1] Dichgans M, Leys D. Vascular cognitive impairment[J]. Circulation Research, 2017, 120(3):573—591.
- [2] Duncombe J, Kitamura A, Hase Y, et al. Chronic cerebral hypoperfusion: a key mechanism leading to vascular cognitive impairment and dementia. Closing the translational gap between rodent models and human vascular cognitive impairment and dementia[J]. Clin Sci(lond), 2017, 131(19):2451—2468.
- [3] 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.
- [4] Kim H, Kim HK, Kim SY, et al. Cognitive improvement effects of electro-acupuncture for the treatment of MCI compared with Western medications: a systematic review and Meta-analysis[J]. BMC Complement Altern Med, 2019, 19(1): 13.
- [5] 詹杰, 王学文, 程南方, 等. 电针治疗脑卒中后认知障碍的系统评价[J]. 中国针灸, 2017, 37(10):1119—1125.
- [6] Ahn SM, Kim YR, Kim HN, et al. Electroacupuncture ameliorates memory impairments by enhancing oligodendrocyte regeneration in a mouse model of prolonged cerebral hypoperfusion[J]. Sci Rep, 2016, 6(1):28464
- [7] 于涛, 付雪松, 许能贵. “百会”穴对脑病的作用机理浅析[J]. 中国中医药现代远程教育, 2009(08):207—208.
- [8] Duan X, Zhang L, Yu J, et al. The effect of different frequencies of electroacupuncture on BDNF and NGF expression in the hippocampal CA3 area of the ischemic hemisphere in cerebral ischemic rats[J]. Neuropsychiatr Dis Treat, 2018, 14:2689—2696.
- [9] Conner J M, Franks KM, Titterness AK, et al. NGF is essential for hippocampal plasticity and learning[J]. J Neurosci, 2009, 29(35):10883—10889.
- [10] Isaev NK, Stelmashook EV, Genrikhs EE. Role of nerve growth factor in plasticity of forebrain cholinergic neurons[J]. Biochemistry (Mosc), 2017, 82(3):291—300.
- [11] Ballinger EC, Ananth M, Talmage DA, et al. Basal forebrain cholinergic circuits and signaling in cognition and cognitive decline[J]. Neuron, 2016, 91(6):1199—1218.
- [12] Latina V, Caioli S, Zona C, et al. Impaired NGF/TrkA signaling causes early AD-linked presynaptic dysfunction in cholinergic primary neurons[J]. Front Cell Neurosci, 2017, 11:68.
- [13] Du SQ, Wang XR, Zhu W, et al. Acupuncture inhibits TXNIP-associated oxidative stress and inflammation to attenuate cognitive impairment in vascular dementia rats[J]. CNS Neurosci Ther, 2018, 24(1):39—46.
- [14] Hei Y, Chen R, Yi X, et al. The expression of hippocampal NRG1/ErbB4 correlates with Neuronal apoptosis, but not with glial activation during chronic cerebral hypoperfusion[J]. Front Aging Neurosci, 2018, 10:149
- [15] Ichim G, Tauszig-Delamasure S, Mehlen P. Neurotrophins and cell death[J]. Exp Cell Res, 2012, 318(11):1221—1228.
- [16] Lee YS, Danandeh A, Baratta J, et al. Neurotrophic factors rescue basal forebrain cholinergic neurons and improve performance on a spatial learning test[J]. Exp Neurol, 2013, 249:178—186.
- [17] Roman GC. Cholinergic dysfunction in vascular dementia[J]. Curr Psychiatry Rep, 2005, 7(1):18—26.
- [18] Liu MY, Wang S, Yao WF, et al. Memantine improves spatial learning and memory impairments by regulating NGF signaling in APP/PS1 transgenic mice[J]. Neuroscience, 2014, 273:141—151.
- [19] Zhang T, Yu J, Huang Z, et al. Electroacupuncture improves neurogenic bladder dysfunction through activation of NGF/TrkA signaling in a rat model[J]. J Cell Biochem, 2019, 120(6):9900—9905.
- [20] Rocco ML, Pristera A, Pistillo L, et al. Brain cholinergic markers and Tau phosphorylation are altered in experimental type 1 diabetes: normalization by electroacupuncture[J]. J Alzheimers Dis, 2013, 33(3):767—773.