

· 基础研究 ·

电针配合神经生长因子对脑缺血大鼠学习记忆能力的影响

林咸明 谭克平 张爱军 何丽华

【摘要】目的 观察电针配合外源性神经生长因子 (NGF) 对脑缺血大鼠学习记忆能力的影响。**方法** 将 Sprague-Dawley 大鼠 40 只按随机数字表分配法随机分为假手术组、模型组、NGF 组、电针组和 NGF + 电针组, 每组大鼠 8 只。模型组、NGF 组、电针组和 NGF + 电针组用脑缺血-再灌注方法建立学习记忆障碍大鼠动物模型, 4 组大鼠血脑屏障稳定后, NGF 组和 NGF + 电针组于尾静脉注射 NGF (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重, 每日 1 次, 连续 15 d), 电针组和 NGF + 电针组同时进行电针治疗 (取哑门、百会穴, 频率 100 Hz, 输出电流 2 mA, 每日 1 次, 每次 20 min, 连续 15 d), 疗程结束后采用 Morris 水迷宫检测大鼠空间学习记忆能力的变化。**结果** 模型组、NGF 组、电针组和 NGF + 电针组大鼠造模后均出现明显的学习记忆障碍, 与假手术组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。各组治疗 15 d 后, NGF 组、模型组和电针组之间, 大鼠学习记忆能力无明显差异 ($P > 0.05$); NGF + 电针组大鼠学习记忆能力明显提高, 与模型组、电针组、NGF 组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。**结论** 电针配合神经生长因子对学习记忆障碍大鼠的学习能力具明显的改善作用。

【关键词】 电针; 神经生长因子; 学习; 记忆; 百会穴; 哑门穴

The effect of electro-acupuncture in combination with nerve growth factor on learning and memory in rats with cerebral ischemia LIN Xian-ming, TAN Ke-ping, ZHANG Ai-jun, HE Li-hua. The Third Clinical Medical College of Zhejiang Chinese Medicine University, Hangzhou 310053, China

【Abstract】Objective To observe the effect of nerve growth factor (NGF) and electro-acupuncture (EA) on learning and memory in rats with cerebral ischemia. **Methods** An experimental model of cerebral ischemia-reperfusion was established in 40 rats, who were then randomly divided into a model group, a sham operated group, a NGF group, an acupuncture group and a NGF plus acupuncture group. Three weeks were allowed for the recovery of the blood-brain barrier lesion caused by ischemia-reperfusion before intravenous injection of NGF (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, once daily for 15 days) via the vena caudalis. In the two acupuncture groups, this was administered in combination with EA at the Baihui (DU20) and Yamen (DU15) acupoints (frequency 100 Hz, 2 mA, 20 min/time, once daily for 15 days). Morris' water maze test was used to assess any changes in spatial learning and memory abilities. **Results** The ischemic rats showed significant learning and memory disorders compared with the sham-operated group. In the NGF group, the rats' learning and memory abilities did not improve significantly compared with the model group and the EA group. Significantly better learning was observed in the NGF + EA group compared with the model group, the EA group and the NGF group. **Conclusion** NGF combined with EA can improve the learning and memory abilities of rats with learning and memory dysfunction caused by cerebral ischemia-reperfusion.

【Key words】 Electro-acupuncture; Nerve growth factor; Learning; Memory; Baihui acupoint; Yamen acupoint

神经生长因子 (nerve growth factor, NGF) 是一种重要的神经营养活性分子。体外实验已经表明 NGF 无论是对中枢和还是周围神经元的生长、发育、分化、正常状态的维持及神经损伤后的保护和轴突的有效再生都有重要调控作用^[1,2]。但由于 NGF 分子量大, 难以透过血脑屏障 (blood-brain barrier, BBB) 到达中枢

脑组织, 从而限制了其在中枢神经系统病中的应用。如何更好地发挥 NGF 对中枢神经系统病症的治疗作用, 是神经康复研究的热点之一。我们在前期实验中发现, 电针对大鼠的 BBB 有一定的影响, 可诱导伊文蓝通过 BBB^[3], 并通过另一个实验证实电针可诱导 NGF 透过 BBB^[4]。本实验旨在观察电针配合 NGF 对大鼠学习记忆能力的影响, 为该方法在中枢神经系统病变中的应用提供实验依据。

材料与方法

一、实验动物及分组

Sprague-Dawley 大鼠 40 只, 健康雄性, 清洁级, 体重

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2009.06.006

基金项目: 国家中医药管理局资助项目 (02-03JL03), 浙江省中医药管理局资助项目 (2007CB160), 浙江省高校“重中之重学科” (针灸推拿学) 开放基金资助项目 (ZJZZ-0806)

作者单位: 310053 杭州, 浙江中医药大学第三临床医学院

(200~220)g,由中科院上海实验动物中心提供。按随机数字表分配法将 40 只大鼠随机分为假手术组、模型组、NGF 组、电针组和 NGF + 电针组,每组大鼠 8 只。

二、主要仪器、试剂与药物

穴位神经刺激仪(型号:LH202H,北京华卫产业开发公司);注射用鼠神经生长因子(批号:G514A, Promega Corporation);Morris 水迷宫测试系统(北京现代太极电子有限公司);NGFEmax 试剂盒(批号:G925A, Promega Corporation)。

三、动物模型制备

参照王蕊等^[5]制定的血管性痴呆模型方法并加以改进制造大鼠学习记忆障碍模型:10%水合氯醛(350 mg/kg体重)腹腔注射麻醉大鼠,仰卧固定,暴露颈部,消毒后,在颈正中作约 1 cm 长的纵向切口,分离双颈总动脉,用血管夹阻断双侧颈总动脉 10 min 后,再灌注 10 min,重复 3 次。第 1 次阻断颈总动脉的同时在距大鼠尾端约 1 cm 处剪尾放血,放血量为大鼠总血容量(占体重的 7.4%)的 10%。造模大鼠于手术后 7 d,采用水迷宫测试,出现明显学习记忆能力障碍的大鼠为造模成功。模型组、NGF 组、电针组及 NGF + 电针组大鼠均造模成功,假手术组仅暴露双颈总动脉,不作缺血及尾部放血处理,其余各组大鼠均造模成功。

四、治疗方法

根据文献^[6]的报道,脑缺血再灌注可造成大鼠 BBB 受损,通透性增高,受损的血脑屏障通常在损伤后 1~2 周左右开始恢复。为更好地模拟临床脑血管病针灸康复患者的病情特点,故取 BBB 损伤后第 3 周进行各项处理(所有大鼠从入组至治疗结束均常规饲养)。

假手术组和模型组在大鼠尾静脉注射 0.9%生理盐水 0.5 ml,每日 1 次,连续注射 15 d;NGF 组于尾静脉注射 NGF,剂量按 10 μ g/kg 体重,用生理盐水按 10 μ g/ml 稀释注射,每日 1 次,连续注射 15 d;电针组取督脉哑门、百会穴,针刺后接通穴位神经刺激仪,频率 100 Hz,输出电流 2 mA,每日 1 次,每次 20 min,连续治疗 15 d;NGF + 电针组于尾静脉注射 NGF,剂量和注射方法同 NGF 组,注药完毕后,立即进行电针治疗,方法同电针组。

五、水迷宫学习记忆行为测试

1. 定位航行试验:检测大鼠学习获取能力,采用逃避潜伏期和搜索策略来表示。将受试大鼠头向池壁分别依次从第一、第二、第三、第四象限放入水中,记录 60 s 内寻找站台的时间(逃避潜伏期)和搜索策略(即大鼠搜索站台的运动轨迹,如该搜索运动轨迹为直线即计为直线式搜索)。如果大鼠在 60 s 内找到站台,记录实际逃避潜伏期;如果在 60 s 内仍未找到站台,由实验者将其引导上站台并停留 5 s,逃避潜伏期记录

为 60 s。四个象限测试结束为 1 次,每只大鼠每日 4 次,上、下午各 2 次,历时 5 d。将 5 d 内的逃避潜伏期和直线式搜索结果汇总统计。

2. 空间探索试验:检测大鼠记忆保存能力,采用大鼠跨越原站台象限的时间长短来表示。方法:定位航行试验结束后撤除站台,任选一相同入水点将大鼠头向池壁放入水中,测其 60 s 内跨越原站台象限的时间。

六、统计学分析

采用 SPSS 13.0 版统计软件处理。数据用($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析。组间两两比较,方差齐性时用 LSD 检验,方差不齐时用 Dunnett T3 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、电针配合 NGF 对大鼠学习能力的影响

表 1 可见,模型组、NGF 组和电针组平均逃避潜伏期明显延长,与假手术组比较差异有统计学意义($P < 0.01$),而以上 3 组相互比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),与 NGF + 电针组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$)。模型组、NGF 组和电针组直线式搜索策略次数与假手术组和 NGF + 电针组比较,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。

表 1 各组大鼠平均逃避潜伏期及直线式搜索策略次数比较($\bar{x} \pm s$)

组 别	只数	逃避潜伏期(s)	直线式搜索策略次数(次)
假手术组	8	20.74 $\pm$ 16.64	3.38 $\pm$ 0.92
模型组	8	32.21 $\pm$ 15.10 ^a	1.63 $\pm$ 0.92 ^a
NGF 组	8	30.32 $\pm$ 13.87 ^a	1.88 $\pm$ 0.83 ^a
电针组	8	28.85 $\pm$ 14.17 ^a	2.13 $\pm$ 0.64 ^a
NGF + 电针组	8	23.75 $\pm$ 17.03	3.00 $\pm$ 0.75

注:与假手术组和 NGF + 电针组比较,^a $P < 0.01$

二、电针配合 NGF 对大鼠记忆能力的影响

表 2 可见,模型组、NGF 组和电针组跨越原平台象限的时间与假手术组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),与 NGF + 电针组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 2 各组大鼠跨越原平台象限的时间比较(s, $\bar{x} \pm s$)

组 别	只数	时间
假手术组	8	30.13 $\pm$ 2.10
模型组	8	22.88 $\pm$ 5.38 ^{ab}
NGF 组	8	24.50 $\pm$ 5.40 ^{ab}
电针组	8	25.13 $\pm$ 5.11 ^{ab}
NGF + 电针组	8	27.50 $\pm$ 5.26

注:与假手术组比较,^a $P < 0.05$;与 NGF + 电针组比较,^b $P < 0.05$

讨 论

学习记忆障碍属祖国医学“遗忘”、“健忘”、“痴

呆”等范畴。现代医学认为,学习与记忆改善的神经基础是中枢神经系统高度的可塑性,包括神经网络、神经环路及突触连接等不同水平的可塑性。其中,突触连接是神经元信息传递的重要环节,是神经可塑性的关键部位。NGF 作为神经营养因子之一,能使神经元前体细胞增殖,对胆碱能神经元、单胺类神经元、肽能神经元、交感神经元均具有支持存活作用,增加神经递质合成,阻止神经元细胞程序性死亡,无论是对中枢和还是周围神经元的生长、发育、分化、正常状态的维持及神经损伤后的保护和轴突的有效再生都有重要调控作用^[7]。有研究表明,NGF 可促进受损的中枢神经纤维长出新的轴突,使其可直接到达原来的靶细胞处,建立新的突触联系^[2,8],故对许多中枢脑病尤其是退行性病变方面将有非常广阔的前景。NGF 能有效拮抗神经细胞凋亡、上调胆碱能神经元的功能并能诱导轴突末端生长,保护基底前脑胆碱能神经元受损导致的神经变性,改善人或动物的空间学习记忆能力。

BBB 是由脑毛细血管内皮细胞及其紧密连接、基底膜、星型神经胶质细胞足突三种成分所构成,内皮细胞间存在大量紧密连接,通透性很低,BBB 对进入脑组织的物质有严格的选择性,如毒素等难以进入脑内,也能将脑内有害或过剩物质排出脑外,从而维持脑的内环境稳定^[9-11]。由于 BBB 的阻碍作用,众多大分子神经营养因子如 NGF 等很难通过 BBB,达不到有效治疗浓度而影响疗效。采用小脑池或脑室给药等避开 BBB 的给药方法,因技术操作要求高,又易继发颅内感染,限制了此类方法的广泛应用。如何协助 NGF 等神经营养药对中枢神经系统疾病的治疗,是一条值得探索的途径。

近年研究发现,电针对脑缺血模型大鼠的神经功能缺失具有一定的重塑作用,其作用机制可能是因为电针可上调缺血相关脑区 NGF 水平,促进神经干细胞增殖^[12]。我们前期的研究发现头穴电针对完整状态的 BBB 具一定程度的促开放作用,且对脑组织不会造成病理性损害^[3]。在本次实验中选取“百会”和“哑门”穴,二穴皆为督脉之要穴,督脉入络于脑中,脑为髓海、元神之府,十二经脉之气血皆上注于头部,针刺“百会”和“哑门”穴可疏通经络,激发经气,益智醒脑。本实验在予模型大鼠尾静脉注射 NGF 的基础上,同时结合“百会、哑门”穴电针刺激,以观察电针促进 NGF 透过 BBB,能否提高智能障碍大鼠的学习记忆能力。结果表明,在 Morris 水迷宫定位航行试验中,模型组大鼠有明显的学习能力障碍,NGF 组大鼠平均逃避潜伏期、直线式搜索策略和跨越平台象限的时间与模型组比较基本无差异($P > 0.05$),提示单用 NGF 大鼠学习能力改善不明显。电针组大鼠与模型组比较,学习能

力虽有一定程度改善,但无统计学意义($P > 0.05$); NGF + 电针组大鼠逃避潜伏期明显缩短,直线式搜索策略次数明显增多,表明其学习能力与模型组及 NGF 组比较有明显提高($P < 0.01$)。提示电针督脉经穴具有醒脑开窍之功,配合 NGF 可产生协同作用,从而更好地发挥 NGF 的神经营养与修复功能,改善并提高脑缺血大鼠的学习记忆能力;还能增强内皮细胞的胞饮作用,帮助大分子物质 NGF 通过 BBB,从而发挥 NGF 的神经营养与修复作用,改善并提高大鼠的学习能力。在空间探索试验中,模型组大鼠有明显的记忆能力障碍,电针组、NGF + 电针组大鼠与模型对照组比较,记忆能力都有一定程度提高,但差异均无统计学意义,这可能与本实验中 NGF 用药持续时间等有关。

本研究将为电针配合 NGF 防治因缺血性脑损伤所致的学习、记忆等功能的恢复提供实验依据。电针配合 NGF 提高脑缺血大鼠学习记忆能力的协同机制还有待进一步的研究。

参 考 文 献

- [1] Biernacki K, Antel JP, Blain M, et al. Interferon beta promotes nerve growth factor secretion early in the course of multiple sclerosis. Arch Neurol, 2005, 62: 563-568.
- [2] Senkova I, Kriegstein J. Neuroprotection mediated via neurotrophic factors and induction of neurotrophic factors. Brain Res Brain Rev, 1999, 30: 176-188.
- [3] 林威明, 陈华德, 严建伟, 等. 穴位注射“冰片液”对血脑屏障通透性的影响. 针刺研究, 2003, 28: 99-100.
- [4] 林威明, 谭克平, 张爱军, 等. 电针诱导神经生长因子透血脑屏障效应及与 PKC 通路的相关性. 针刺研究, 2009, 34: 110-113.
- [5] 王蕊, 杨秦飞, 唐一鹏, 等. 大鼠拟“血管性痴呆”模型的改进. 中国病理生理杂志, 2000, 16: 914-916.
- [6] 李兵, 鲁晓杰, 陈建, 等. 神经生长因子在大鼠脑损伤后血脑屏障的通透性. 中华神经外科研究杂志, 2008, 7: 216-219.
- [7] 徐正东, 李贯维. BDNF, NGF 在大鼠局灶性脑缺血的表达变化及葛根素对其影响的实验研究. 中国实验诊断学, 2005, 9: 578.
- [8] Tamatani M, Ogawa S, Nunez G, et al. Growth factors prevent changes in Bcl-2 and Bax expression and neuronal apoptosis induced by nitric oxide. Cell Death Differ, 1998, 5: 911-919.
- [9] Ballabh P, Braun A, Nedergaard M. The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. Neurobiol Dis, 2004, 16: 1-13.
- [10] Persidsky Y, Ramirez SH, Haorah J, et al. Blood brain barrier: structural components and function under physiologic and pathologic conditions. J Neuroimmune Pharmacol, 2006, 1: 223-236.
- [11] 王顺蓉, 张英, 李著华. 血脑屏障的结构与功能研究进展. 四川生理科学杂志, 2005, 27: 88-89.
- [12] 彭力, 彭锐, 吕军, 等. 电针结合运动疗法对脑缺血大鼠神经功能恢复及神经生长因子的影响. 中国康复, 2007, 22: 370-372.

(修回日期: 2009-04-16)

(本文编辑: 阮仕衡)