

· 基础研究 ·

电针调控海马头蛋白 mRNA 的表达对慢性脑低灌注大鼠学习记忆及海马神经发生的影响

魏居瑞¹ 蒋松涛¹ 刘佩² 夏玮³ 艾琪¹ 钱巍¹ 郑君霞¹ 朱松杰¹ 陈赞¹ 方文焱¹

¹浙江省杭州市临安区第一人民医院康复医学科,杭州 311300; ²浙江省海宁市第三人民医院针灸科,海宁 314408; ³郑州市中医院针灸科,郑州 450007

通信作者:蒋松涛, Email: 1031427738 @ qq.com

【摘要】 目的 通过电针刺激慢性脑低灌注模型大鼠百会穴和大椎穴,观察海马组织头蛋白(Noggin) mRNA 的表达,以及电针对慢性脑低灌注模型大鼠学习记忆和海马神经发生的影响。**方法** 选取雄性 Sprague Dawley (SD) 大鼠 120 只,采用改良永久性结扎双侧颈总动脉法制作慢性脑低灌注模型,将造模成功的 104 只大鼠分为模型组和电针组,每组 52 只;再按照治疗时间的不同,将每组大鼠再细分为治疗后第 1、2、4、6 周四个亚组,每个亚组 13 只。电针组采用电针刺刺激大鼠百会穴和大椎穴,电针输出电流 1 mA,频率 15 Hz 连续波,每次 20 min,每日 1 次,治疗 7 次后休息 2 d;模型组不予特殊处理。分别于治疗后第 1、2、4、6 周,每亚组随机抽取 6 只大鼠进行 BrdU 注射,观察神经干细胞增殖及分化情况;利用 Morris 水迷宫神经行为学检测,观察大鼠空间学习能力和记忆能力的变化情况;采用逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)检测及 BrdU 免疫组织化学法,观察海马神经组织 Noggin mRNA 的表达及海马齿状回神经发生的规律。**结果** 电针组大鼠在第 2、4、6 周的学习记忆能力明显高于同时间点的模型组大鼠($P<0.05$ 或 $P<0.01$);电针组海马组织 Noggin mRNA 表达均明显高于同时间点模型组大鼠($P<0.05$);电针组大鼠海马齿状回颗粒下层的 BrdU 阳性细胞多于同时时间点的模型组,且各组的 BrdU 阳性细胞随着缺血时间的延长均有减少($P<0.05$ 或 $P<0.01$);Pearson 相关分析显示,2 组大鼠海马 Noggin mRNA 含量均与 BrdU 阳性细胞数呈正相关($r=0.561, P=0.000$),且电针组的相关系数大于模型组($P<0.05$)。**结论** 电针可通过调控海马 Noggin mRNA 的表达促进慢性脑低灌注大鼠的海马组织神经发生,从而改善慢性脑低灌注大鼠的空间学习能力和记忆能力。

【关键词】 电针; 慢性脑低灌注; 神经发生; 神经干细胞

基金项目:浙江省自然科学基金项目(Y205389,Y2101356);杭州市临安区科技局项目(临科字 2020 第 31 号)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2021.09.001

Electroacupuncture can promote hippocampal neurogenesis relieving chronic cerebral hypoperfusion

Wei Jurui¹, Jiang Songtao¹, Liu Pei², Xia Wei³, Qian Wei¹, Zhen Junxia¹, Zhu Songjie¹, Chen Yun¹, Fang Wen-yao¹

¹Department of Rehabilitation Medicine, People's Hospital of Lin'an City, Hangzhou 311300, China; ²Department of Acupuncture, The Third People's Hospital of Haining, Haining 314408, China; ³Department of Acupuncture, Zhengzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450007, China

Corresponding author: Jiang Songtao, Email: 1031427738 @ qq.com

【Abstract】 Objective To observe the expression of noggin mRNA in the hippocampus of rats with chronic cerebral hypoperfusion, and explore the effect of electroacupuncture (EA) at the "baihui" and "dazhui" acupoints on their learning and memory and on hippocampal neurogenesis. **Methods** In total, 120 Sprague-Dawley rats had cerebral hypoperfusion induced by permanent bilateral ligation of the common carotid artery. The 104 successfully induced were divided at random into a model group and an EA group, each of 52. The EA group was given EA on the baihui and dazhui acupoints for 20 minutes daily for seven days followed by a two-day break. The output current was 1mA at 15Hz. No special treatment was given to the model group. After one, two, four and six weeks of treatment, 6 rats were given BrdU injections to observe the proliferation and differentiation of neural stem cells. Learning and memory were assessed using the Morris Water Maze. The expression of noggin mRNA and neurogenesis in the dentate gyrus of the hippocampus were measured using reverse-transcription polymerase chain reactions and immunohisto-

chemistry. **Results** After one, two and five weeks of intervention, the average learning and memory ability of the EA group were significantly better than those of the control group. The average expression of noggin mRNA was significantly higher in the EA group than in the model group at the same time points. Compared with the model group, there were more BrdU-positive cells in the hippocampal dentate gyrus in the EA group, and the number decreased with the prolongation of ischemia. Pearson correlation analysis showed that the levels of noggin mRNA in the hippocampus of both groups were positively correlated with their number of BrdU-positive cells. The correlation was stronger in the EA group than in the model group. **Conclusions** Electroacupuncture can promote hippocampal neurogenesis in rats with chronic cerebral hypoperfusion by regulating the expression of hippocampal noggin mRNA, thereby improving their spatial learning and memory ability.

【Key words】 Electroacupuncture; Cerebral hypoperfusion; Neurogenesis; Neural stem cells

Funding: Natural Science Foundation of Zhejiang Province (Y205389 and Y2101356); a project of the Science and Technology Bureau of Lin'an District, Hangzhou (Linke Zi 2020-31)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2021.09.001

慢性脑低灌注 (chronic cerebral hypoperfusion) 是一种常见的中枢神经系统病理状态,由血容量不足、管腔狭窄等原因引起大脑长期慢性供血不足,引发脑缺血缺氧状态,继而出现的以持久或进展性认知功能障碍为主要表现的慢性脑损伤疾病。目前我国逐步进入老龄化社会,各种因素导致的慢性脑低灌注发病率不断升高,大量研究表明,慢性脑低灌注是认知功能障碍、阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD)、血管性认知功能障碍 (vascular cognitive impairment, VCI) 等中枢神经病变的共同病理基础^[1-2]。因此,如何有效防治慢性脑低灌注是治疗此类疾病的重点之一。研究表明,氧化应激是慢性脑低灌注形成关键的病理变化之一^[2],它参与了 AD 和 VCI 等认知疾病的发生发展,并在脑缺血后神经元损伤中起到关键作用^[2-3]。

海马是目前公认的与学习、记忆等高级神经功能活动具有密切关系的重要脑区,缺血对海马的损伤是痴呆的主要病理基础。目前研究证实,成体大脑海马中持续存在神经发生,即海马可产生神经干细胞,而这种细胞具有多向分化功能^[4],可能在学习记忆过程中起着关键性作用^[5]。既往研究发现,电针可改善脑缺血引起的认知功能障碍,可以促进局灶性脑缺血后内源性神经干细胞的增殖^[6];电针通过促进海马中的头蛋白 (Noggin) mRNA 表达来改善慢性脑缺血大鼠的学习记忆能力^[7]。故假设电针治疗缺血性脑损伤可能是通过调控海马 Noggin mRNA 表达来调节海马神经发生,本研究即运用 5-溴脱氧尿苷 (5-bromodeoxyuridine BrdU) 免疫组化、逆转录-聚合酶链式反应 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 方法结合神经行为学检测,观察神经干细胞增殖及海马 Noggin mRNA 的表达情况,从而探讨电针通过调控海马 Noggin mRNA 表达对慢性脑缺血大鼠海马神经发生及其对大鼠学习记忆的影响。

材料与方法

一、动物模型的制作及分组

选用无特定病原体 (specific pathogen free, SPF) 级、健康雄性、3 个月龄的 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 120 只;体重 (230±20) g,购自中科院上海实验动物中心[上海斯莱克实验动物有限责任公司,许可证号 SCXK(沪)2007-0005],饲养于浙江中医药大学实验动物中心。造模前, Morris 水迷宫测试所有大鼠逃避潜伏期。采用李巍等^[8]的改进方法永久性结扎大鼠双侧颈总动脉加尾端放血制作大鼠慢性脑血供灌注不足模型并加以改进,具体操作方法:用 3% 戊巴比妥钠 (40 mg/kg 体重) 腹腔注射麻醉后仰卧固定于手术台上,充分暴露颈部,行正中切口约 1 cm,分离双侧颈总动脉,4 号缝合线结扎,然后将大鼠尾置于 50 ℃ 水中约 30 s 后,立即在距大鼠尾端约 0.7 cm 处剪尾放血,放血量为大鼠总血量的 10% (占体重的 7.4%),按压止血后使用聚维酮碘消毒,缝合切口并用聚维酮碘消毒,再将大鼠置于 37 ℃ 环境中,待其完全苏醒后进行分组并予以相应处理。所有动物手术前后均维持 12 h 明和 12 h 暗的周期环境,自由饮食。

造模过程中因麻醉、刺激迷走神经、结扎等原因导致死亡 4 只,造模后第 1 天死亡 3 只, Morris 水迷宫检测死亡 4 只,共死亡 11 只,造模后大鼠共有 109 只,通过造模前后 Morris 水迷宫检测比较,以造模后大鼠逃避潜伏期明显延长为造模成功标准,剔除 5 只造模后逃避潜伏期无明显变化的大鼠,最终共有 104 只纳入实验,造模成功率 86.67%。将 104 只大鼠按随机数字表分为电针组和模型组,每组 52 只,每组再分为造模成功后第 1、2、4、6 周四个时间点,每个时间点 13 只,将每亚组 13 只大鼠编号后按随机数字表抽取 6 只行大鼠行 BrdU 免疫组化观察神经干细胞增殖,余选 6 只检测 Noggin mRNA 的表达,剩余 1 只 HE 染色观察海

马组织形态变化。

二、电针治疗

1. 电针组: 电针组大鼠在造模成功及 Morris 水迷宫检测后第 1 天开始行电针治疗, 参照《实验针灸学》^[9]中的大鼠穴位定位方法, 用双手固定大鼠头顶, 取百会穴和大椎穴, 百会穴沿头顶正中中线向后斜平刺 0.2 cm, 大椎穴直刺 0.5 mm。电针输出电流 1 mA, 频率 15 Hz 连续波, 时间 20 min。每日 1 次, 治疗 7 次后休息 2 d。分别于治疗后第 1、2、4 和 6 周将大鼠处死并取材。

2. 模型组: 模型组大鼠的模型制备及 Morris 水迷宫检测同电针组, 但不予电针治疗, 其余固定方法、时间、处死方法均与电针组相同(为排除固定及抓取因素对试验大鼠的影响, 均采取了相同的固定和抓取方法)。

三、BrdU 标记

每组大鼠随机抽取 6 只在造模成功后处死前 3 天进行 BrdU (Sigma 公司, 批号 B5002-MW307-1, 50 mg/kg 体重, 0.9% NaCl 稀释为 10 mg/ml) 腹腔注射, 连续注射 3 d, 每日 2 次, 观察神经发生情况; 然后分别于不同的时间点处死大鼠后进行指标检测。

四、Morris 水迷宫神经行为学检测

电针组和模型组大鼠在处死前 5 d 开始采用 Fric 等^[10]方法行 Morris 水迷宫检测, 连续进行 4 d 的训练测试逃避潜伏期, 每日 4 次, 第 5 天进行空间探索实验和定位航行实验: ①空间探索实验, 观察规定时间内大鼠在池中的游泳路径(搜索策略); ②定位航行实验, 观察逃避潜伏期和游泳路径(逃避潜伏期)。通过与安装在迷宫上方的摄像机相联的电脑软件平台进行观察、记录和储存相关数据, 并运用行为轨迹跟踪系统软件(MTApp)进行分析和数据处理(SDK-2000 型, 由北京太极电子有限公司及图码公司提供)。

五、脑组织取材方法

将所有注射过 BrdU (批号 B5002-MW307-1, Sigma 公司提供) 的大鼠(6 只/组)用 3% 戊巴比妥钠(40 mg/kg 体重)腹腔注射麻醉后, 用生理盐水经左心室和升主动脉灌注, 直至流出液为澄清液体, 接着推注含 4% 多聚甲醛的 0.1M 磷酸缓冲液(pH7.4) 200 ml; 随后滴注 4% 多聚甲醛 500 ml (先快滴后慢滴), 然后开颅, 将脑组织迅速取出, 置于上述固定液中, 4℃ 固定 24 h 后, 用 15% 和 30% 蔗糖梯度脱水, 液氮速冻后立即置于 -80℃ 超低温冰箱保存。

六、RT-PCR 半定量检测神经诱导因子 Noggin mRNA 的表达

采用 RT-PCR 方法半定量检测慢性脑低灌注大鼠

(6 只/组) 海马中 Noggin mRNA 的含量, 以及造模成功后第 1、2、4 和 6 周的表达情况及电针治疗后的变化。实验室温度控制在 18℃; 用 3% 戊巴比妥钠(40 mg/kg 体重)腹腔注射麻醉后在冰台上断头并取脑, 大鼠断头取脑后, 分离脑组织, 取出海马组织, 然后放入 2 ml 的离心管中, 置 -80℃ 冰箱中储存。为防止在提取脑组织细胞中总 RNA 时受影响, 每次取脑组织前都要将所用器械及冰台进行冲洗。具体操作方法如下。

1. 总 mRNA 提取: 按上海申能博彩生物有限公司提供 Trizole RNA 抽提试剂说明书进行, 逆转录步骤则根据逆转录试剂盒说明书进行, 整个操作过程无 RNA 酶干扰。

Noggin 上游引物(5'-3'): AGC ACC CAG CGA CAA CCT; Noggin 下游引物(5'-3'): GCC ACA TCT GTA ACT TCC TCC T 扩增序列长度 341 bp Tm 值 61.94℃。

β 肌动蛋白(β-actin)上游引物(5'-3'): TGT ATG CCT CTG GTC GTA CCA C; β-actin 下游引物(5'-3'): ACA GAG TAC TTG CGC TCA GGA 扩增序列长度 460 bp Tm 值 58.00~60.07℃。Noggin 及 β-actin 上下游引物均由上海生物工程有限公司合成(批号 AF50320-1, AF50322-3)。

PCR 扩增: ①Noggin 反应条件——预变性 95℃ 5 min, 变性 94℃ 30 s, 退火 54.5℃ 40 s, 延伸 72℃ 30 s, 30 个循环, 最后延伸 8 min, 4℃ 保存至电泳; ②β-actin 反应条件——预变性 95℃ 5 min, 变性 94℃ 30 s, 退火 54.7℃ 40 s, 延伸 72℃ 30 s, 30 个循环, 最后延伸 8 min, 4℃ 保存至电泳。

2. 产物分析: 将扩增产物 10 μl 加入 2 μl 溴酚兰显色剂, 在含溴化乙锭(EB) (0.15 μg/ml) 的 1.6% 琼脂糖凝胶中电泳, 电压 75 V, 时间 45 min, 使用 1×Tris 硼酸缓冲液(TBE)。电泳产物经紫外透射反射分析仪分析, 比较各组条带的平均密度值, 并以 β-actin 的平均密度值校正, 以两者比值表示 mRNA 相对表达量。

七、免疫组化染色

经上述处理的大鼠脑组织连续冰冻冠状切片(片厚 15 μm)每隔 3 张取 1 张, 每只大鼠取 2~3 套, 按以下步骤进行 BrdU 免疫组化染色: ①BrdU 组化染色前切片中 DNA 解链和变性的预处理: 前述切片入 50% 甲酰胺/2×柠檬酸钠缓冲液(SSC)中, 置于 64℃ 孵育箱, 30 min, 入 2N HCl 中, 37℃ 孵育 30 min, 每步之间漂洗过程略; ②用过氧化物酶染法进行 BrdU 染色, 正常家兔血清(Hemicon 公司提供, 编号 M360-0608033376)常温封闭 1 h, 倾去血清, 继之入一抗[一抗为小鼠抗 BrdU 单克隆抗体(Abcam 公司提供, 编号 ab6326-250-

274536)], 4℃湿盒孵育过夜,加入二抗[二抗为兔抗大鼠 IgG (H+L) 抗体 (Abcam 公司提供,编号 ab6730-1-305279)], 常温 1 h, 继之二氨基联苯胺 (DAB) 显色试剂盒 (博士德生物工程有限公司提供) 显色 5~8 min, 苏木素复染 40 s, 脱水封片。每步之间漂洗过程略。

显微镜下,采用莱卡 DML2500 显微镜图像处理系统进行阳性细胞计数,连续计数 3 个相邻视野海马的颗粒细胞层 (granular cell layer, GCL) BrdU 阳性细胞数,以平均每平方毫米含多少个 BrdU 阳性细胞 (n/mm^2) 表示,每只大鼠细胞数量来自 3~5 张切片的均数。

八、统计学方法

使用 SPSS 13.0 版统计软件对所得数据进行统计学分析处理,计量资料数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示,进行单因素方差分析,组间两两比较,方差齐性时用 LSD 检验,方差不齐时用 Dunnett-t 检验;Noggin mRNA 表达与海马 BrdU 阳性细胞数则进行 Pearson 相关分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、Morris 水迷宫实验

1. 定位航行实验:定位航行实验检测大鼠获取经验 (学习) 的能力 (图 1), 以平均潜伏期表示。治疗后第 1 周时,2 组大鼠的逃避潜伏期组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 但第 2、4 和 6 周时,2 组同时时间点相比,组间差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 且电针组大鼠随着治疗时间的延长平均逃避潜伏期缩短,但与组内第 1 周比较,组内差异并无统计学意义 ($P < 0.05$), 详见表 1。

2. 空间探索实验 (大鼠在第一象限内的游泳时间):电针组大鼠的第一象限内游泳时间明显延长,且第 6 周时与第 1 周时组内比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 同时间点电针组与模型组相比,第 2、4 和 6 周时,2 组组间差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 详见表 1。

二、电针对海马组织 Noggin mRNA 表达的影响

不同时期海马中的 Noggin mRNA 均有表达,且表达在造模后初期较高,但随着造模后时间的延长,各组 Noggin mRNA 表达减少,如图 2 所示,图中自左至右依次为 Maker、1 W (第 1 周) 模型、1 W (第 1 周) 电针、2 W (第 2 周) 模型、2 W (第 2 周) 电针、4 W (第 4 周) 模型、4 W (第 4 周) 电针、6 W (第 6 周) 模型和 6 W (第 6 周) 电针组,第一行为 β -actin 条带,长 490 bp; 第二行为 Noggin 条带,长 341 bp。

表 1 2 组大鼠各时间点逃避潜伏期及第一象限内游泳时间比较 ($s, \bar{x} \pm s$)

组别	只数	逃避潜伏期	第一象限内游泳时间
电针组	52		
第 1 周	13	27.52±8.03	26.20±7.91
第 2 周	13	23.80±4.16 ^a	31.96±9.51 ^a
第 4 周	13	23.70±7.28 ^b	34.43±6.03 ^a
第 6 周	13	22.26±4.90 ^a	36.51±7.36 ^{ac}
模型组	52		
第 1 周	13	25.07±6.44	15.62±6.28
第 2 周	13	32.21±7.91	19.82±5.16
第 4 周	13	32.91±11.68	22.65±4.01
第 6 周	13	30.11±5.76	27.79±4.63

注:与模型组同时时间点比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$;与组内第 1 周比较,^c $P < 0.05$

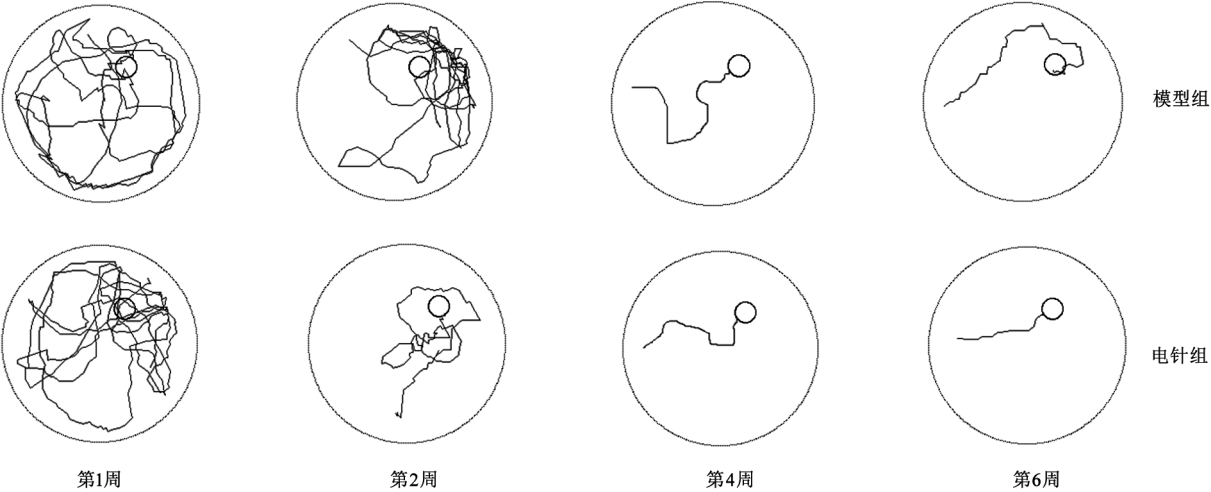


图 1 Morris 水迷宫实验大鼠运动轨迹图

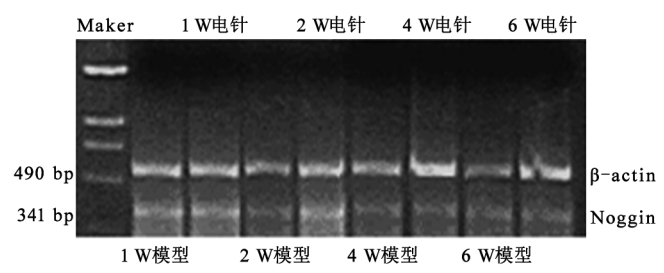


图2 大鼠海马 Noggin 和 β-actin 蛋白电泳图

模型组 Noggin mRNA 表达随造模时间的延长呈递减趋势,电针组在第 1 周和第 2 周时呈上升趋势,第 2 周至第 4 周和第 6 周均呈递减趋势,第 2 周电针组 Noggin mRNA 水平最高;同时间点相比,电针组的 Noggin mRNA 表达均高于模型组 ($P<0.05$)。详见表 2。

表2 2 组大鼠不同时间点的海马 Noggin mRNA 相对表达量比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	只数	第 1 周	第 2 周	第 4 周	第 6 周
电针组	6	0.85±0.03 ^a	0.87±0.04 ^a	0.84±0.06 ^a	0.74±0.07 ^{abc}
模型组	6	0.75±0.06	0.70±0.03	0.69±0.08	0.62±0.10 ^b

注:与模型组同时时间点比较,^a $P<0.05$;与组内第 1 周比较,^b $P<0.05$;与组内第 2 周比较,^c $P<0.05$

三、海马神经干细胞的增殖

光镜下观察海马 BrdU 阳性细胞核呈棕褐色,有些呈簇状分布,大小不一,GCL 区 BrdU 阳性细胞在越靠近颗粒下层分布越多,呈一个由近颗粒下层缘到近齿状回分子层缘分布减少的趋势;第 4 周和第 6 周组有少量 BrdU 阳性细胞已迁入 GCL 区(图 3)。

随着缺血时间的延长,2 组大鼠的 BrdU 阳性细胞

呈递减趋势($P<0.05$)。与同时间点模型组相比,第 1 周和第 2 周大鼠电针组的齿状回颗粒下层 BrdU 阳性细胞数较多($P<0.05$),但第 4 周和第 6 周电针组与同时间点模型组相比,组间差异无统计学意义($P>0.05$)。详见表 3。

表3 2 组大鼠不同时间点的海马齿状回 BrdU 阳性细胞数比较 ($n/\text{mm}^2, \bar{x}\pm s$)

组别	只数	第 1 周	第 2 周	第 4 周	第 6 周
电针组	6	122.60±15.86 ^a	98.49±10.64 ^{ab}	32.84±9.85 ^{bc}	15.11±4.20 ^{bc}
模型组	6	99.86±14.93	78.12±9.36	25.01±3.24 ^b	13.51±2.29 ^b

注:与模型组同时时间点比较,^a $P<0.05$;与组内第 1 周比较,^b $P<0.05$;与组内第 2 周比较,^c $P<0.05$

四、Pearson 相关性分析

Pearson 相关分析显示,2 组大鼠海马 Noggin mRNA 含量均与 BrdU 阳性细胞数呈正相关($r=0.561$, $P=0.000$),且电针组的相关系数大于模型组($P<0.05$),详见表 4。

表4 海马 Noggin mRNA 含量与 BrdU 阳性细胞数的相关性分析

组别	例数	Noggin mRNA ($\bar{x}\pm s$)	BrdU 阳性细胞数 ($\bar{x}\pm s$)	相关系数 (r)	P
模型组	24	0.729±0.090	56.450±40.299	0.520	0.019
电针组	24	0.765±0.111	65.500±24.685	0.577	0.008

讨 论

海马是认知功能障碍研究中涉及最多的脑区之一,它直接参与信息的贮存和回忆,脑缺血可造成海马损伤引起学习记忆能力下降,海马 CA1 区神经元的迟

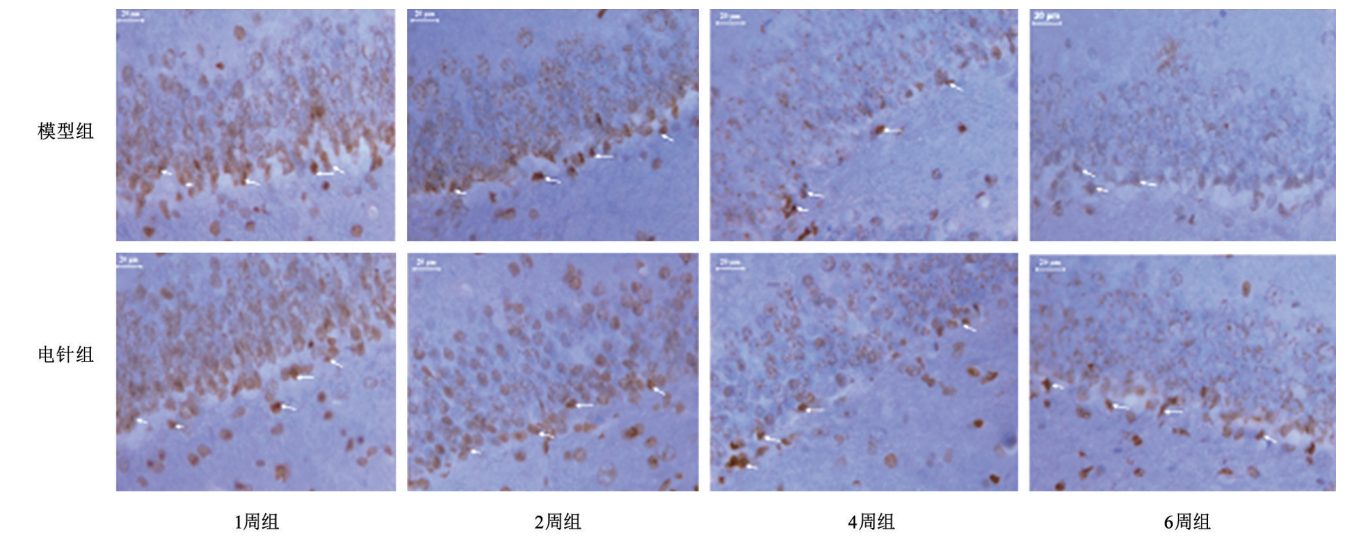


图3 海马齿状回 BrdU 免疫组织化学染色图片 (10×40)

发性凋死可能是缺血性脑血管病导致痴呆的主要原因^[11]。脑室下层及海马齿状回颗粒下层区域持续存在神经发生,产生的神经干细胞具有多向分化潜力,脑卒中无论是缺血性还是出血性引起的脑损伤,都可刺激神经发生及神经干细胞的迁移至损伤部位代替死亡的神经元发挥功能^[5]。有许多证据证明哺乳动物神经干细胞与记忆间有着相关的联系^[12],成年海马产生新生神经元的电生理特性不同于成熟的神经元,对氨基酸抑制不敏感,对海马生理功能的影响比成熟的神经元明显^[13]。本研究结果显示,慢性脑缺血模型大鼠颗粒下层神经干细胞的增殖能力随着缺血时间的延长呈递减趋势,而电针组大鼠颗粒下层神经干细胞增殖能力经治疗有明显的提高,这为缺血性脑卒中的治疗提供了一个全新的思路。

发育学研究表明,不同发育阶段的 Noggin 作为神经发育阶段的重要胚胎蛋白,通过拮抗骨形成蛋白-4 (bone morphogenetic protein-4, BMP4) 的作用对不同脑区神经干细胞的增殖与分化有重要调控作用^[14-16]。Noggin 基因对成年大鼠海马神经发生的调控为正性作用,运用反义寡核苷酸封闭内源性 Noggin 基因后,大鼠海马齿回 BrdU 免疫阳性细胞数明显降低,并伴有星形胶质细胞的大量增生,提示内源性 Noggin 基因的转录抑制可降低海马齿回神经前体细胞的增殖,从而在空间记忆的形成和保留过程中起重要作用^[16]。本研究中,不同时期海马中的 Noggin mRNA 均有表达,且表达在造模初期较高,但随着造模后时间的延长,各组 Noggin mRNA 表达减少;而电针组在第 1 周和第 2 周时呈上升趋势,第 2 周至第 4 周和第 6 周均呈递减趋势,第 2 周电针组 Noggin mRNA 表达量最高;这提示电针治疗更能提高慢性脑低灌注模型大鼠海马 Noggin mRNA 的表达,故认为临床实践中应早期进行针灸治疗,取得最佳治疗时机,提高疗效。

本研究采用永久性结扎双侧颈总动脉加尾端放血制作慢性灌注不足的模型并加以改进,可以有效地模拟诸如椎基底动脉狭窄、颈动脉粥样硬化斑块形成及各种慢性心脑血管疾患引起的脑供血不足而导致的认知功能缺陷性疾病。由于 BrdU 标记的是 S 期的神经干细胞,海马齿状回颗粒下层 BrdU 阳性细胞的数量可反映该部位神经干细胞增殖能力的大小;故本研究通过 BrdU 来标记神经干细胞。脑组织的形态学变化反映造模后大脑病理改变情况,也是衡量电针对慢性脑低灌注模型大鼠海马细胞保护作用的最直观指标。以往研究^[17]发现,电针可改善慢性脑低灌注模型大鼠海马组织形态学损伤;造模初期模型组与电针组大鼠海马齿状回颗粒下层有大量神经干细胞增殖,电针组与模型组相比,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),而相应

的电针组大鼠的学习记忆能力优于模型组,提示电针治疗能改善学习记忆障碍大鼠的空间学习能力,且电针组与模型组同时点相比,电针组学习能力更强;电针组大鼠随着治疗时间的延长平均逃避潜伏期缩短,这也说明电针治疗可通过神经干细胞的增殖来改善学习记忆能力。

本研究还发现,电针可提高慢性脑缺血大鼠海马 Noggin mRNA 的表达,且表达在造模初期较高,但随着造模后时间的延长,各组 Noggin mRNA 表达减少;而海马神经发生在造模后这 2 个时间点最显著,且随着造模后时间的延长呈递减趋势;电针组的学习记忆能力及海马组织形态均明显优于同时时间点的模型组^[17]。本研究通过 Pearson 相关分析显示,电针组和模型组的海马 Noggin mRNA 含量均与 BrdU 阳性细胞数 ($P = 0.000$) 呈正相关,且电针组的相关系数大于模型组 ($P < 0.05$),提示 Noggin mRNA 可能对海马神经干细胞的表达有正相调控作用,而电针可使这一作用加强,说明电针可通过调节 Noggin 的表达来调控海马神经细胞的增殖,从而促进海马神经发生,且随着治疗时间的延长而学习记忆能力改善显著。

综上所述,通过分析电针对慢性脑缺血大鼠学习记忆能力及海马齿状回神经干细胞的增殖和分化之间的关系发现,电针可以通过调节海马神经干细胞的增殖和分化,从而提高大鼠空间学习记忆能力。需更进一步研究将通过抑制海马组织 Noggin 的表达,更加客观地证实电针是否通过 Noggin 调控内源性神经干细胞的增殖与分化来改善慢性脑缺血大鼠学习记忆能力。可以预见在不久的将来,诱导内源性神经发生将是治疗 CNS 疾病的重要有效途径。

参 考 文 献

- [1] Liu H, Zhang J. Cerebral hypoperfusion and cognitive impairment: the pathogenic role of vascular oxidative stress[J]. Int J Neurosci, 2012, 122(9): 494-496. DOI: 10.3109/00207454.2012.686543.
- [2] Zhao Y, Gong CX. From chronic cerebral hypoperfusion to Alzheimer-like brain pathology and neurodegeneration[J]. Cell Mol Neurobiol, 2015, 35(1): 101-102. DOI: 10.1007/s10571-014-0127-9.
- [3] Figueira TR, Barros MH, Camargo AA, et al. Mitochondria as a source of reactive oxygen and nitrogen species: from molecular mechanisms to human health[J]. Antioxid Redox Signal, 2013, 18(16): 2029-2032. DOI: 10.1089/ars.2012.4729.
- [4] Tobin MK, Musaraca K, Disouky A, et al. Human hippocampal neurogenesis persists in aged adults and Alzheimer's disease patients[J]. Cell Stem Cell, 2019, 24(6): 974-982. e3. DOI: 10.1016/j.stem.2019.05.003.
- [5] Moreno-Jiménez EP, Flor-García M, Terreros-Roncal J, et al. Adult hippocampal neurogenesis is abundant in neurologically healthy subjects and drops sharply in patients with Alzheimer's disease [J]. Nat Med, 2019, 25(4): 554-560. DOI: 10.1038/s41591-019-0375-9.

- [6] 刘喆,赖新生.电针对局灶性脑缺血大鼠神经干细胞巢蛋白表达的影响[J].中华物理医学与康复杂志,2005,27(10):20-23. DOI: 10.3760/j.issn.0254-1424.2005.10.004.
- [7] 魏居瑞,刘喆,刘佩,等.电针对慢性脑缺血大鼠学习记忆功能及海马组织 Noggin mRNA 表达的影响[J].中华物理医学与康复杂志, 2014, 36(3): 161-164. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2014.03.001.
- [8] 李巍,张世仪,赵惠敏,等.小鼠脑缺血性学习记忆障碍模型的建立[J].基础医学与临床,1995,15(6):46-49.
- [9] 李忠仁.实验针灸学[M].北京:中国中医药出版社,2003:327-328.
- [10] Frick KM, Baxter MG, Markowska AL, et al. Age-related spatial reference and working memory deficits assessed in the water maze[J]. Neurobiol Aging, 1995, 16(2): 149-160. DOI: 10.1016/0197-4580(94)00155-3.
- [11] Lee GW, Kim JH, Kim MS. Reduction of long-term potentiation at Schaffer collateral-CA1 synapses in the rat hippocampus at the acute stage of vestibular compensation[J]. Korean J Physiol Pharmacol, 2017,21(4):423-428. DOI:10.4196/kjpp.2017.21.4.423.
- [12] Scerri C, Stewart CA, Breen KC, et al. The effects of chronic nicotine on spatial learning and bromodeoxyuridine incorporation into the dentate gyrus of the rat[J]. Psychopharmacology, 2006, 184(3-4): 540-546. DOI:10.1007/s00213-005-0086-4.
- [13] Ambrogini P, Lattanzi D, Ciuffoli S, et al. Morpho-functional characterization of neuronal cells at different stages of maturation in granule cell layer of adult rat dentate gyrus[J]. Brain Res 2004,1017(1-2): 21-31. DOI:10.1016/j.brainres.2004.05.039.
- [14] Mira H, Andreu Z, Suh H, et al. Signaling through BMPR-IA regulates quiescence and long-term activity of neural stem cells in the adult hippocampus[J]. Cell Stem Cell,2010,7(1):78-89. DOI:10.1016/j.stem.2010.04.016.
- [15] Waschek JA. Noggin on heaven's door: a factor that promotes the selective production of serotonergic neurons from murine embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells[J]. J Neurochem,2012,122(1):1-3. DOI:10.1111/j.1471-4159.2012.07732.x.
- [16] Krause C, Guzman A, Knaus P. Noggin[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2011,43(4):478-481. DOI:10.1016/j.biocel.2011.01.007
- [17] 魏居瑞,刘喆,刘佩,等.电针对慢性脑缺血大鼠学习记忆及海马神经组织形态学的影响[J].中华物理医学与康复杂志, 2011,33(8):575-578. DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2011.08.004.

(修回日期:2021-07-12)

(本文编辑:汪 玲)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

中华医学会杂志社对一稿两投问题处理的声明

为维护中华医学会系列杂志的声誉和广大读者的利益,现将中华医学会系列杂志对一稿两投和一稿两用问题的处理声明如下:

1. 本声明中所涉及的文稿均指原始研究的报告或尽管 2 篇文稿在文字的表达和讨论的叙述上可能存在某些不同之处,但这些文稿的主要数据和图表是相同的。所指文稿不包括重要会议的纪要、疾病的诊断标准和防治指南、有关组织达成的共识性文件、新闻报道类文稿及在一种刊物发表过摘要或初步报道而将全文投向另一种期刊的文稿。上述各类文稿如作者要重复投稿,应向有关期刊编辑部做出说明。

2. 如 1 篇文稿已以全文方式在某刊物发表,除非文种不同,否则不可再将该文投寄给他刊。

3. 请作者所在单位在来稿介绍信中注明文稿有无一稿两投问题。

4. 凡来稿在接到编辑部回执后满 3 个月未接到退稿,则表明稿件仍在处理中,作者欲投他刊,应事先与该刊编辑部联系并申述理由。

5. 编辑部认为文稿有一稿两投嫌疑时,应认真收集有关资料并仔细核实后再通知作者,同时立即进行退稿处理,在做出处理决定前请作者就此问题做出解释。期刊编辑部与作者双方意见发生分歧时,应由上级主管部门或有关权威机构进行最后仲裁。

6. 一稿两用一经证实,期刊编辑部将择期在杂志中刊出其作者姓名和单位及撤销该论文的通告;对该作者作为第一作者所撰写的一切文稿,中华医学会系列杂志 2 年内将拒绝其发表;并就此事件向作者所在单位和该领域内的其他科技期刊进行通报。

中华医学会杂志社