· 基础研究 ·

丰富环境康复训练对脑缺血大鼠认知功能及音猬因子信号通路的影响

俞蔼晏[1]　常滋毓[2]　张乃菊[3]　陈守峰[4]　宋晓东[1]　徐磊[1]

[1]蚌埠医学院第一附属医院康复医学科,蚌埠　233004;[2]蚌埠市第一人民医院检验科,蚌埠　233000;[3]蚌埠医学院第一附属医院药理科,蚌埠　233004;[4]蚌埠医学院第一附属医院泌尿外科,蚌埠　233004

通信作者:徐磊,Email:xuleibyfy@163.com

【摘要】 **目的**　观察丰富环境康复训练(EET)对脑缺血大鼠认知功能及音猬因子(SHH)信号通路的影响。**方法**　按照随机数字表法将 60 只成年雄性 SD 大鼠分为空白对照组、模型组、训练组,再按干预时间不同,细分为空白对照 7 d 组、空白对照14 d组、模型 7 d 组、模型14 d组、训练 7 d 组、训练14 d组,每组 10 只。模型 7 d 组及14 d组、训练 7 d 组及14 d组均采用传统线栓法制备大鼠脑缺血模型,训练 7 d 组及14 d 组于造模后予以 EET 干预。干预 7 d 及14 d后,通过 Morris 水迷宫、跳台试验测试大鼠的认知水平,采用 TUNEL 染色法检测大鼠海马部位脑细胞凋亡水平,通过 qRT-PCR、Western blot、免疫组化技术检测大鼠患侧海马部位 SHH、Gli2、PTCH1 RNA 蛋白表达水平。**结果**　与训练 7 d 组和模型14 d组比较,训练14 d组大鼠 Morris 水迷宫测试的逃避潜伏期[(63.37±2.78)s]减短、平均游泳速度[(134.27±2.44)mm/s]增加、穿越平台次数[(6.70±0.95)次]增多、平台所在象限停留时间[(37.08±2.07)s]增加($P<0.05$),在跳台试验中遭遇电击的次数[(3.80±0.63)次]少、平台滞留时间[(25.26±1.64)s]短($P<0.05$)。TUNEL 染色结果显示,训练14 d组大鼠海马细胞凋亡百分比低($P<0.05$)。免疫组化结果显示,训练14 d组大鼠患侧海马 SHH、Gli2 蛋白表达量增加,PTCH1 表达量降低($P<0.05$)。**结论**　EET 可以显著改善脑缺血大鼠的认知功能,其机制可能与 SHH 信号通路的激活增强有关。

【关键词】 脑卒中后认知功能障碍模型;　脑缺血;　认知功能障碍;　丰富环境康复训练

基金项目:安徽省高校科学研究项目(KJ2019A0397);蚌埠医学院研究生科研创新计划项目(Byycx22035)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2024.05.001

Effects of an enriched environment on cognition and sonic hedgehog signaling after cerebral ischemia

Yu Aiyan[1], Chang Ziyu[2], Zhang Naiju[3], Chen Shoufeng[4], Song Xiaodong[1], Xu Lei[1]

[1]Department of Rehabilitation, The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu 233004, China; [2]Department of Clinical Laboratory, Bengbu First People's Hospital, Bengbu 233000, China; [3]Department of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu 233004, China; [4]Department of Urology, The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu 233004, China

Corresponding author: Xu Lei, Email: xuleibyfy@163.com

【**Abstract**】 **Objective**　To observe any effect of an enriched environment (EET) on cognitive functioning and sonic hedgehog (SHH) signaling in rats modeling cerebral ischemia. **Methods**　Sixty adult male Sprague-Dawley rats were randomly divided into a blank control group, a model group and a training group. A model of cerebral ischemia was established in the model and training groups by thread thrombus. The training group was given an EET. After 7 and 14 days, the rats' cognition was tested using the Morris water maze and the platform jumping test. Apoptosis of brain cells in the hippocampus was detected by using TUNEL staining, and the expression of SHH, Gli2 and PTCH1 proteins in the hippocampus were measured using qRT-PCRs, western blotting and immunohistochemistry. **Results**　After 14 days the average escape latency in the Morris water maze test had shortened more in the training group than in the model group, while the average swimming speed, the number of platform crossings and the time spent in the quadrant had increased significantly more. They also received fewer electric shocks and spent significantly less time on the platform in the platform jumping test on average. Apoptosis in the hippocampus after 14 days was significantly less in the training group with significantly greater expression of SHH and Gli2 protein

and significantly less PTCH1 protein expression. **Conclusion** An EET can significantly improve cognition after cerebral ischemia, at least in rats. Its mechanism may be related to enhanced activation of the SHH signaling pathway.

【Key words】 Stroke; Cognitive dysfunction; Brain ischemia; Enriched environments

Funding: An Anhui University research project (KJ2019A0397); Bengbu Medical University's Graduate Innovation Program (project Byycx22035)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2024.05.001

脑卒中后认知功能障碍是脑卒中患者常见的并发症之一[1],主要表现为识物能力减退、反应速度降低、记忆障碍等[2]。认知功能障碍严重影响患者康复的积极性,给患者后期康复带来了一定的阻碍[3]。部分患者会因干预过迟而发展为痴呆[4]。

丰富环境康复训练(enriched environmental training,EET)是一种具有丰富环境理念的康复干预方式,其对脑损伤患者的运动和认知功能均有一定的改善作用[5]。EET 可通过不同种类的训练方法,对听觉、视觉、触觉等不同感官进行多方面的康复干预,重塑机体受损的神经系统,进而改善相关的运动、认知功能[6]。有研究表明,EET 可以增强缺血性脑损伤新生小鼠的神经可塑性、记忆力和空间认知能力[7]。

音猬因子(sonic hedgehog,SHH)是由信号细胞分泌的一种蛋白配体,其在神经系统的增殖与分化中发挥作用[8]。SHH 信号通路的激活,通常包括 SHH 蛋白的合成与释放、与跨膜蛋白补缀同源物(protein patched homolog, PTCH)结合、平滑蛋白(smoothened protein,SMO)游离与激活、Gli 蛋白水平升高等过程[9]。SHH 信号通路受损可能会导致中枢神经系统损伤和相关心理精神疾病[10]。因此推测脑缺血后认知功能障碍的发生和恢复可能与 SHH 通路的蛋白表达相关。本研究采用传统线栓法制备脑缺血后认知功能障碍大鼠模型,旨在探讨 EET 对脑卒中后认知功能障碍大鼠认知功能的影响及潜在机制。

材料与方法

一、实验动物、仪器与试剂

1.实验动物:选取 60 只无特定病原体(specific pathogen free,SPF)级的成年健康雄性 Sprague-Dawley(SD)大鼠(购于济南朋悦试验动物有限公司,许可证号 SCXK 鲁 2019 0003),体重 250~280 g。所有大鼠均给予清洁水源及饲料,适应性饲养 1 周,温度(26±2)℃,湿度(50±15)%,自由摄食和饮水。所有程序均经单位动物伦理委员会批准(伦动科批字 2023 第 549 号)。

2.主要仪器与试剂:SHH 多克隆抗体、PTCH1 单克隆抗体、Gli2 单克隆抗体、actin 多克隆抗体、环保型脱蜡液、无水乙醇均产自中国,RIPA 裂解液、蛋白酶 K 产自美国。水迷宫、跳台设备(中国产),Avanti J-26XP 型离心机、Synergy 2 型酶标仪、Donatello 型脱水机、ASP300S 型包埋机、TY2020000244 型荧光定量 PCR 仪(美国产),HistoCore Arcadia 型病理切片机(德国产)。

二、大鼠分组及造模

1.大鼠分组:按照随机数字表法将 60 只成年雄性 SD 大鼠分为空白对照组、模型组、训练组,再按干预时间不同,细分为空白对照 7 d 组、空白对照 14 d组、模型 7 d 组、模型14 d组、训练 7 d 组、训练 14 d组,每组 10 只。

2.造模方法[11]:采用 3%戊巴比妥钠(1.0~1.5 ml/kg)充分麻醉大鼠后,固定其四肢和牙齿,完全暴露大鼠颈部并消毒备皮,在大鼠颈正中线右侧 1~2 mm作一切口,深度剥离胸锁乳突肌后,找到颈总动脉并结扎其近心端。沿着颈总动脉向上找到"Y"字形分叉处,即颈内动脉和颈外动脉的 Y 型交叉点,结扎颈外动脉。将颈总动脉中上端用止血夹夹住,在止血钳与近心端结扎处之间用血管剪作一小开口。把线栓插入切口中,通过颈总动脉进入颈内动脉,堵塞大脑中动脉入口,进行永久性栓塞。

3.造模标准[12]:术后 24 h,参照 Longa 评分对大鼠的神经功能缺损程度进行评定。无神经功能缺陷,0 分;瘫痪侧前爪不能完全伸展,1 分;向瘫痪侧转圈,2 分;向对侧倾倒,3 分;行走意识丧失,4 分。最低 0 分,最高 4 分,评分越高,表示神经损伤程度越重。大鼠 Longa 评分≥2 分为造模成功。实验过程中死亡或取脑时见颅骨骨折、蛛网膜下腔出血、颈内动脉分叉部出血的大鼠,予以排除。

三、干预方法

1.空白对照组:不进行特殊处理,予以适应性喂养。空白对照 7 d 组大鼠喂养 7 d,空白对照14 d组大鼠喂养14 d。

2.模型组:造模后不施加额外干预,在保证大鼠生命体征稳定的前提下,同等环境适应性喂养。模型 7 d 组大鼠喂养 7 d,模型14 d组大鼠喂养14 d。

3.训练组:造模后予以 EET 干预。每日上午

9：00至 10：00 将大鼠置于 EET 室，进行滚轮、爬坡、滚筒、秋千、爬梯项目训练，每项训练 10 min，项目训练结束后进行音乐声光刺激。训练 7 d 组大鼠干预 7 d，训练14 d组大鼠干预14 d。

四、Morris 水迷宫

干预 7 d、14 d后，将各组大鼠放置于圆形无平台水池（长×宽×高为 180 cm×180 cm×60 cm），水深50 cm，水温 23～25 ℃。在水池上标记 4 个等距点，N、E、S、W 作为试验的起始点，以等距点为中心将水池分为 4 个象限，随机选择 1 个象限放置 70 cm高的平台。随机选择起点，将大鼠面朝池壁放入水池中，记录大鼠找到平台的时间和游泳路程。大鼠找到平台或 120 s 内无法找到平台，则由研究员将其带到平台，在台上休息 10 s 后进行下一次试验。此试验阶段 12 h 后进行后续试验，记录大鼠从入水至首次登上平台并停留的时间，作为逃避潜伏期[13]。

五、跳台试验

干预 7 d、14 d后，对各组大鼠进行跳台试验。当大鼠处于高处时，有向下跳的行为习性。将跳台仪的底部连通 36 V 电压，上方放置绝缘橡胶塞作为跳台。大鼠在通电板上遭遇电击，通过跳上绝缘跳台来躲避电击，在此过程中获得记忆。当大鼠记忆力下降时，每次停留在跳台上的时间会缩短，且遭遇电击的次数增多[14]。记录大鼠首次跳上台面的时间和遭遇电击的次数。

六、大鼠处死与取材

每组大鼠干预结束后进行称重，用 3%戊巴比妥钠（1.0～1.5 ml/kg）进行腹腔麻醉。充分麻醉大鼠后，开胸，用眼科剪分离胸腹部筋膜，剪断胸骨、肋骨后，分离组织直至充分暴露心脏。用连接等渗生理盐水的注射针头插入大鼠左心尖，注射生理盐水至大鼠心脏充盈后，剪开右心耳，持续输入生理盐水灌流冲洗，以至右心耳流出液变白，大鼠口鼻、四肢、尾巴无血色后，改换多聚甲醛固定液持续注入。注入结束后剪开大鼠头部皮肤，分离组织并暴露大鼠颅骨。于枕骨大孔处将眼科剪插入，缓慢施力直至顶骨有较为明显的分裂倾向。剥离大鼠顶骨，用眼科剪和玻璃分针尽可能地剥离暴露的脑膜，以确保脑组织的完整性。用剪刀深入颅底分离神经、脑膜和组织连接部分，剥离左右侧脑组织和神经，确保可以将整块脑组织分离取出。灌注成功的大脑组织缺血，颜色变白，质地较硬，肉眼可见梗死部位与正常脑组织分界线。取脑后将脑组织迅速放在干冰上方的无菌滤纸上，剥离出病变半球的脑组织，迅速放入冻存管内，置于−80℃的冰箱中保存。

七、TUNEL 染色

将各组大鼠患侧（空白对照组取同侧）海马石蜡切片样本脱蜡至水后，用蛋白酶 K 修复，用破膜工作液覆盖组织，常温下孵育 20 min，随后用磷酸盐缓冲液（phosphate buffered solution，PBS）洗涤 3 次，甩干，在组织表面滴加 buffer 溶液，常温孵育 10 min。孵育后，根据组织大小取试剂盒内适量末端脱氧核苷酸转移酶、dUTP、buffer 溶液，按比例混合后覆盖组织。随后用 4′，6-二脒基-2-苯基吲哚（4′，6-diamidino-2-phenylindole，DAPI）染液复染细胞核，避光孵育 10min 后封片，在荧光显微镜下观察并采集图像。

八、qRT-PCR 检测

利用 Trizol 法提取 6 组大鼠海马样本内 RNA，用紫外分光光度计测定其浓度与纯度，逆转录后得到 cDNA，−20℃ 冻存备用。进行荧光实时定量 PCR 检测，以 GAPDH 作为内参。引物序列见表 1。

表 1　各目标基因 qRT-PCR 引物序列

基因	序列（5′-3′）	产物长度（bp）
SHH	上游引物 GAGCAGACCGGCTGATGACT	
	下游引物 CGAGCTTTGGATTCATAGTAGACC	262
Gli2	上游引物 CCAACCAGAATAAGCAGAACAGC	
	下游引物 TCCTGGGTGT CATATTCCTTCG	253
PTCH1	上游引物 ATACCCGCCAGAAGATAGGAGAA	
	下游引物 CCAGAAGCAGTCCAAAGGTGTA	284

九、Western blot 检测

取 6 组大鼠海马区脑组织，低温研磨后按照试剂盒说明书加入裂解液，裂解后匀浆并离心（脑组织较为松散，为保纯度一般采取二次离心），获取蛋白样品，采用二奎啉甲酸法（bicinchonininc acid，BCA）检测蛋白浓度。聚丙烯酰胺凝胶用于蛋白分离，每孔上样 20 μl，随后依次行电泳和转膜。转膜完毕后，使用 5%快速封闭液（室温 1～2 h），加入一抗（1：1 000），4℃ 过夜孵育。选择对应的山羊抗兔 IgG 二抗，室温避光下孵育 2 h，最后采用增强化学发光法（enhanced chemiluminescence，ECL）成像。使用 Image J 软件对各组灰度值进行半定量分析。

十、免疫组化检测

将大鼠脑组织样本常规脱水后，进行石蜡包埋、组织切片，载玻片捞片、烤片后脱蜡，梯度酒精水化，抗原修复，按顺序滴加内源性过氧化物酶阻断剂、山羊血清封闭液、一抗（1：1 000），于湿盒过夜，次日室温复温 30 min，依次滴加生物素标记的羊抗兔聚合物、链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶，然后进行 DAB 显色，苏木素染色 2 s，水洗 3 遍，进

行脱水、树脂封片。具体操作步骤按免疫组化试剂盒说明书进行。采用德国产 Leica DM4000B 正置研究级显微镜拍照,取海马区互不重叠的 6 个视野。

十一、统计学方法

采用 SPSS 26.0 和 GraphPad Prism 9.0 软件进行分析与绘图,所有数据采用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)形式表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用最小显著差异法(least significant difference, LSD)-t 检验。$P<0.05$表示差异有统计学意义。

结　　果

一、6 组大鼠造模后 24 h Longa 评分比较

造模后 24 h,模型 7 d 组和训练 7 d 组大鼠的 Longa 评分,较空白对照 7 d 组大幅度增加($P<0.05$);模型14 d组和训练14 d组大鼠的 Longa 评分,较空白对照14 d组大幅度增加($P<0.05$)。见表 2。

表 2　6 组大鼠造模后 24 h Longa 评分比较(分,$\bar{x}\pm s$)

组别	只数	Longa 评分
空白对照 7 d 组	10	0.00±0.00
空白对照 14 d 组	10	0.00±0.00
模型 7 d 组	10	2.20±0.42[a]
模型 14 d 组	10	2.30±0.48[b]
训练 7 d 组	10	2.40±0.52[a]
训练 14 d 组	10	2.40±0.52[b]

注:与空白对照 7 d 组比较,[a]$P<0.05$;与空白对照14 d组比较,[b]$P<0.05$

二、6 组大鼠干预后认知行为功能比较

在 Morris 水迷宫测试中,与组内 7 d 比较,模型 14 d组和训练14 d组大鼠的逃避潜伏期减短、平均游泳速度增加、穿越平台次数增多、平台所在象限停留时间增加($P<0.05$)。与空白对照 7 d 组及 14 d组比较,模型 7 d 组及14 d组大鼠的逃避潜伏期增加、平均游泳速度降低、穿越平台次数减少、平台所在象限停留时间减少($P<0.05$)。与模型 7 d 组及14 d组比较,训练7 d组及14 d组大鼠的逃避潜伏期减短、平均游泳速度增加、穿越平台次数增多、平台所在象限停留时间增加($P<0.05$)。见表 3。

在跳台试验中,与组内 7 d 比较,模型14 d组和训练14 d组大鼠遭遇电击次数少、平台滞留时间短($P<0.05$)。与空白对照 7 d 组及14 d组比较,模型 7 d 组及14 d组大鼠遭遇电击次数增多、平台滞留时间较长($P<0.05$)。与模型 7 d 组及14 d组比较,训练 7 d 组及14 d组大鼠遭遇电击次数减少、平台滞留时间较短($P<0.05$)。见表 4。

三、6 组大鼠干预后海马细胞凋亡水平比较

TUNEL 染色结果显示,与组内 7 d 比较,模型 14 d组和训练14 d组大鼠海马细胞凋亡百分比降低($P<0.05$)。与空白对照 7 d 组及14 d组比较,模型 7 d 组及14 d组大鼠海马细胞凋亡百分比升高($P<0.05$)。与模型 7 d 组及14 d比较,训练 7 d 组及 14 d组大鼠海马细胞凋亡百分比降低($P<0.05$)。见图 1。

四、6 组大鼠 SHH、Gli2、PTCH1 蛋白表达水平比较

免疫组化结果显示,与组内 7 d 比较,模型14 d 组 SHH、Gli2 蛋白表达量降低、PTCH1 表达量增加($P<0.05$),而训练14 d组 SHH、Gli2 蛋白表达量增加、PTCH1 表达量降低($P<0.05$)。与空白对照 7 d 组比较,模型 7 d 组 SHH、Gli2 蛋白表达量增加、PTCH1 表达量降低($P<0.05$)。与空白对照14 d组比较,模型14 d组 SHH、Gli2 蛋白表达量降低、PTCH1 表达量增加($P<0.05$)。与模型 7 d 组及14 d组比较,训练 7 d 组及14 d组 SHH、Gli2 蛋白表达量增加、PTCH1 表达量降低($P<0.05$)。见图 2~6。

表 3　6 组大鼠干预后 Morris 水迷宫结果比较($\bar{x}\pm s$)

组别	只数	逃避潜伏期(s)	平均游泳速度(mm/s)	穿越平台次数(次)	平台所在象限停留时间(s)
空白对照 7 d 组	10	66.96±1.74	139.01±3.36	6.20±0.79	34.85±2.21
空白对照 14 d 组	10	62.16±2.26	142.51±2.29	7.20±0.79	39.52±3.18
模型 7 d 组	10	97.01±2.57[b]	109.24±3.97[b]	2.90±0.74[b]	16.58±1.41[b]
模型 14 d 组	10	85.06±2.70[ac]	114.16±3.54[ac]	3.80±0.63[ac]	21.06±1.46[ac]
训练 7 d 组	10	78.55±2.06[d]	123.45±2.53[d]	4.50±0.71[d]	27.51±1.94[d]
训练 14 d 组	10	63.37±2.78[ae]	134.27±2.44[ae]	6.70±0.95[ae]	37.08±2.07[ae]

注:与组内 7 d 比较,[a]$P<0.05$;与空白对照 7 d 组比较,[b]$P<0.05$;与空白对照14 d组比较,[c]$P<0.05$;与模型 7 d 组比较,[d]$P<0.05$;与模型14 d组比较,[e]$P<0.05$

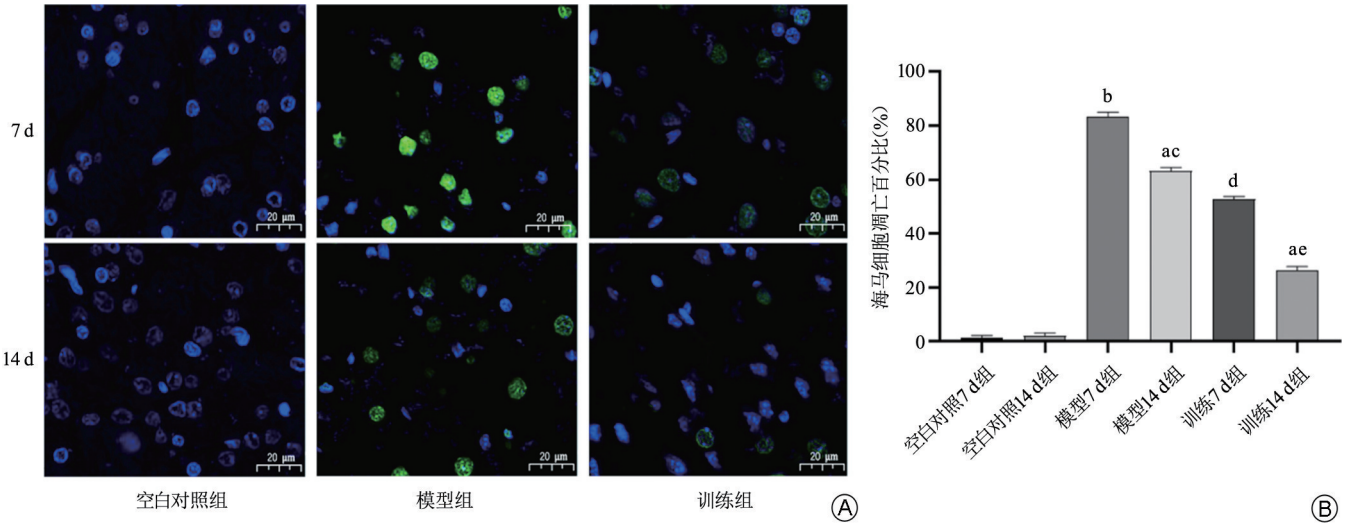
表 4　6 组大鼠干预后跳台试验结果比较($\bar{x}\pm s$)

组别	只数	电击次数(次)	平台滞留时间(s)
空白对照 7 d 组	10	3.00±0.67	23.98±1.36
空白对照 14 d 组	10	2.40±0.52	23.86±1.65
模型 7 d 组	10	7.90±0.74[b]	36.56±1.38[b]
模型 14 d 组	10	6.80±0.63[ac]	33.06±1.44[ac]
训练 7 d 组	10	5.70±0.68[d]	29.37±1.79[d]
训练 14 d 组	10	3.80±0.63[ae]	25.26±1.64[ae]

注:与组内 7 d 比较,[a]$P<0.05$;与空白对照 7 d 组比较,[b]$P<0.05$;与空白对照14 d组比较,[c]$P<0.05$;与模型 7 d 组比较,[d]$P<0.05$;与模型 14 d组比较,[e]$P<0.05$

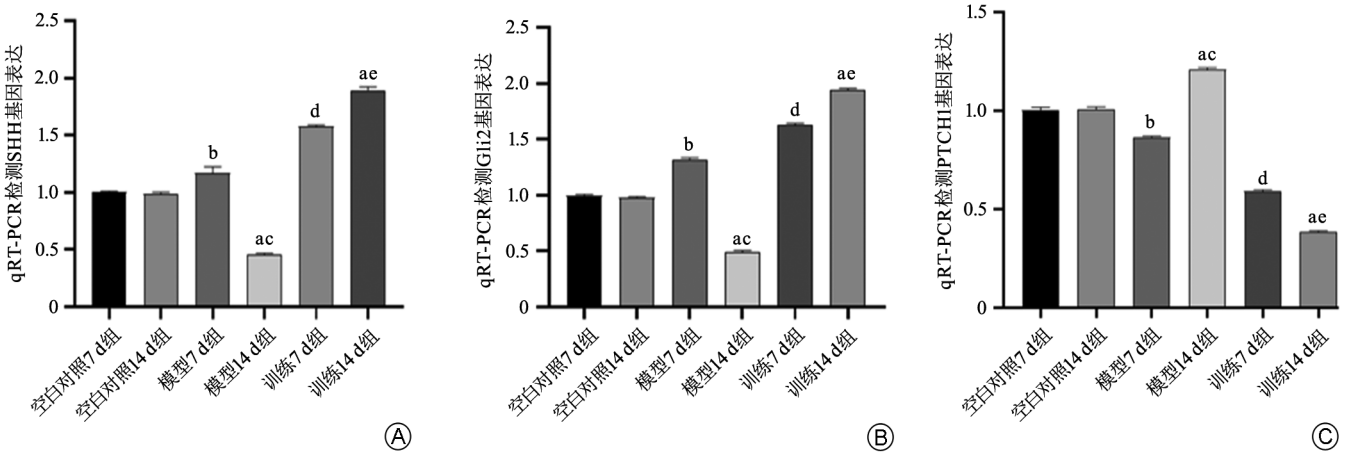
讨　论

本研究采用 EET 对脑缺血性认知功能障碍大鼠开展干预,观察其对大鼠 SHH、Gli、PTCH1 蛋白表达的影响。通过 Morris 水迷宫测试、跳台试验发现,EET 可有效改善脑缺血大鼠的学习记忆能力和方向辨别能力。此外,本研究还发现,造模时间较短(7 d)大鼠的 SHH、Gli2 活性较高,PTCH1 表达受抑制,而造模时间较长(14 d)大鼠的 SHH、Gli2 蛋白表达受抑制,PTCH1 蛋白表达被激活。季辉等[15]研究报道,脑缺血 6 h 后,SHH 及下游蛋白表达水平开始升高,于24 h 达到高峰,72 h 后开始降低,本研究结论与此一致。本研究中,与模型 7 d 组及14 d组比较,训练 7 d 组及 14 d组 SHH、Gli2 蛋白表达量增加、PTCH1 表达量降低($P<0.05$),提示 EET 可促进大鼠海马组织 SHH、Gli2 蛋白表达,抑制 PTCH1 蛋白表达。



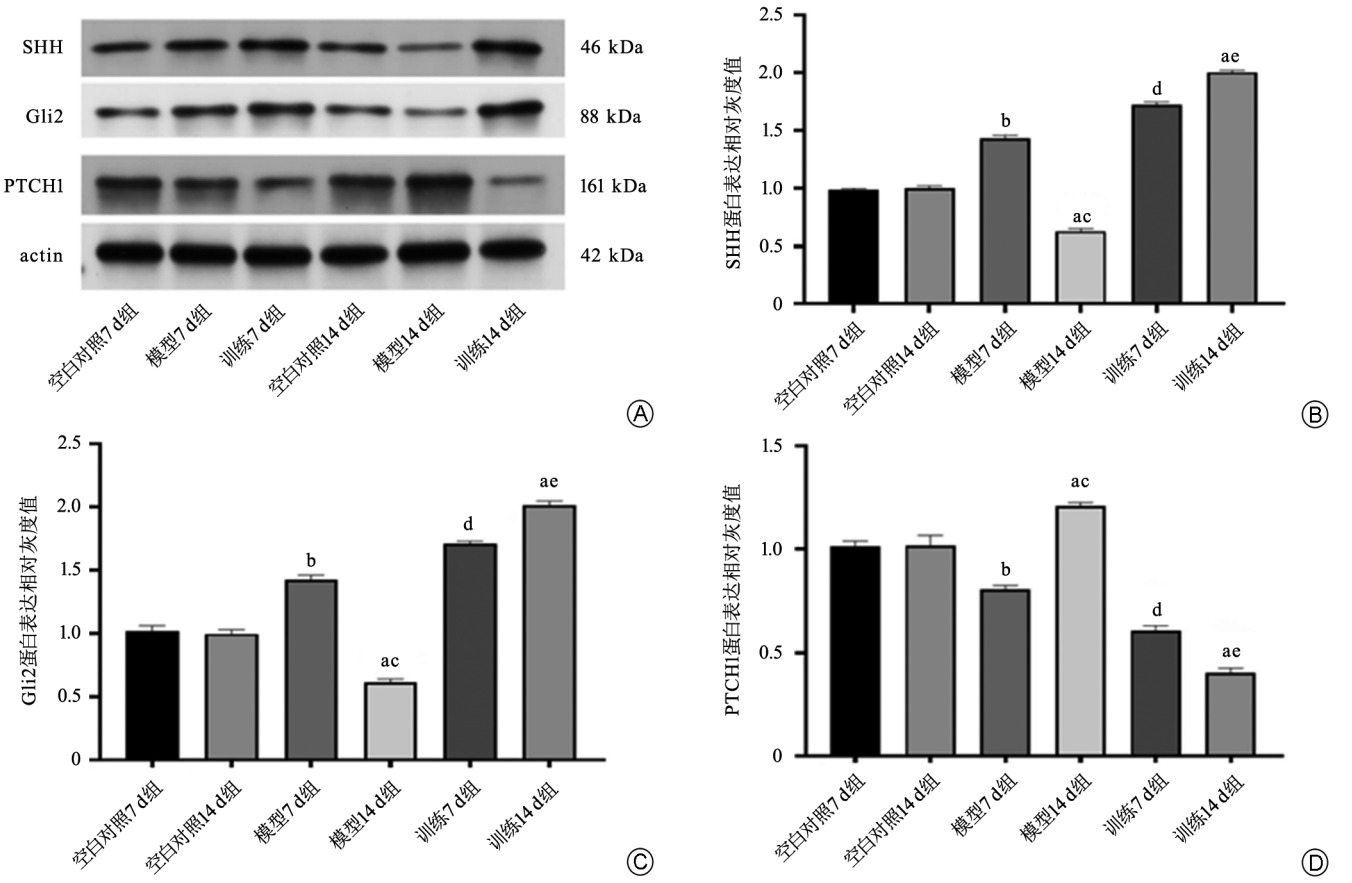
注:图 1A 中正常细胞呈蓝色,凋亡细胞呈绿色;与组内 7 d 比较,[a]$P<0.05$;与空白对照 7 d 组比较,[b]$P<0.05$;与空白对照14 d组比较,[c]$P<0.05$;与模型 7 d 组比较,[d]$P<0.05$;与模型14 d组比较,[e]$P<0.05$

图 1　6 组大鼠海马细胞凋亡情况(TUNEL 染色,×400 倍)



注:与组内 7 d 比较,[a]$P<0.05$;与空白对照 7 d 组比较,[b]$P<0.05$;与空白对照14 d组比较,[c]$P<0.05$;与模型 7 d 组比较,[d]$P<0.05$;与模型14 d组比较,[e]$P<0.05$

图 2　6 组大鼠海马组织 SHH、Gli2、PTCH1 mRNA 含量比较



注：与组内 7 d 比较，[a]$P<0.05$；与空白对照 7 d 组比较，[b]$P<0.05$；与空白对照14 d组比较，[c]$P<0.05$；与模型 7 d 组比较，[d]$P<0.05$；与模型14 d组比较，[e]$P<0.05$

图 3　6 组大鼠海马组织 SHH、Gli2、PTCH1 蛋白表达量的 Western blot 结果

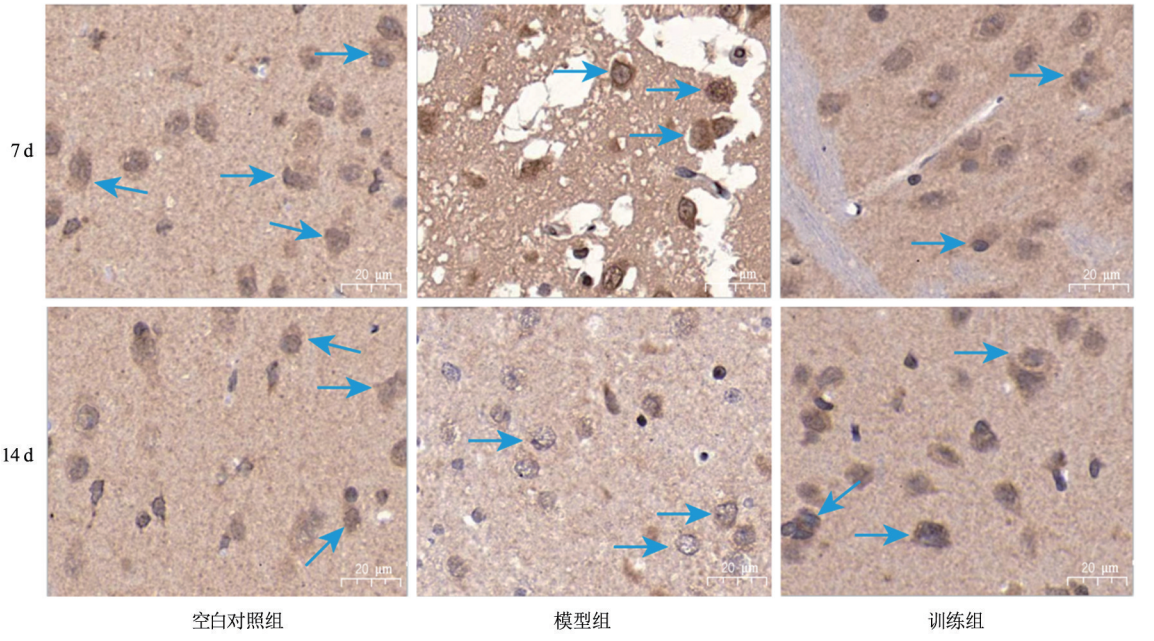


图 4　6 组大鼠海马切片 SHH 蛋白的免疫组化结果(×400 倍)

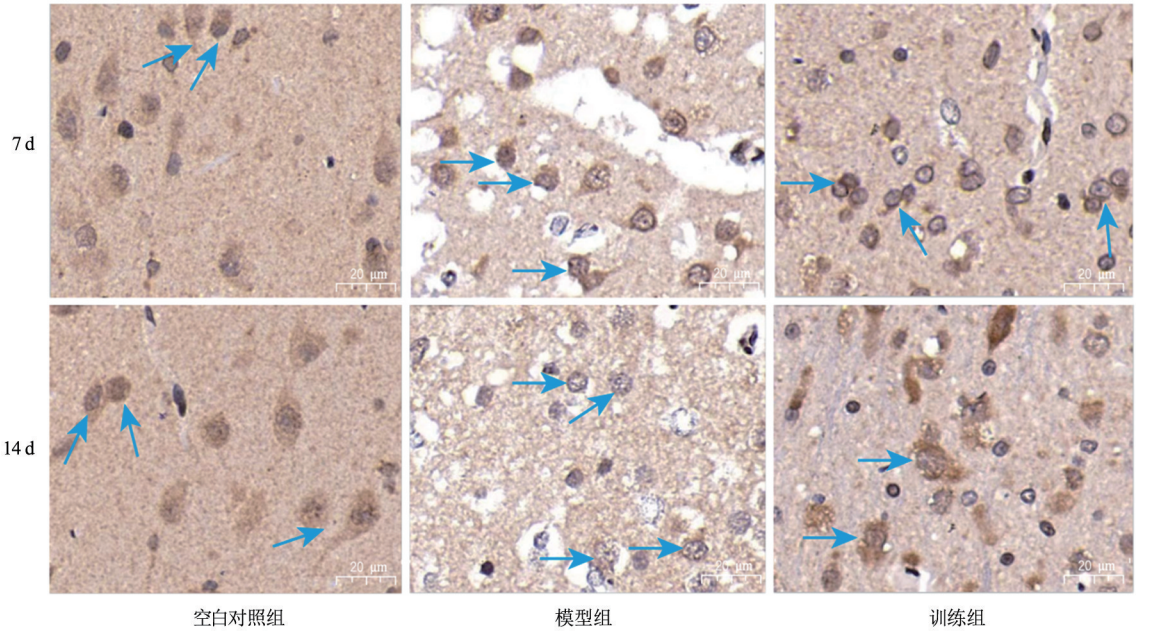


图 5　6 组大鼠海马切片 Gli2 蛋白的免疫组化结果(×400 倍)

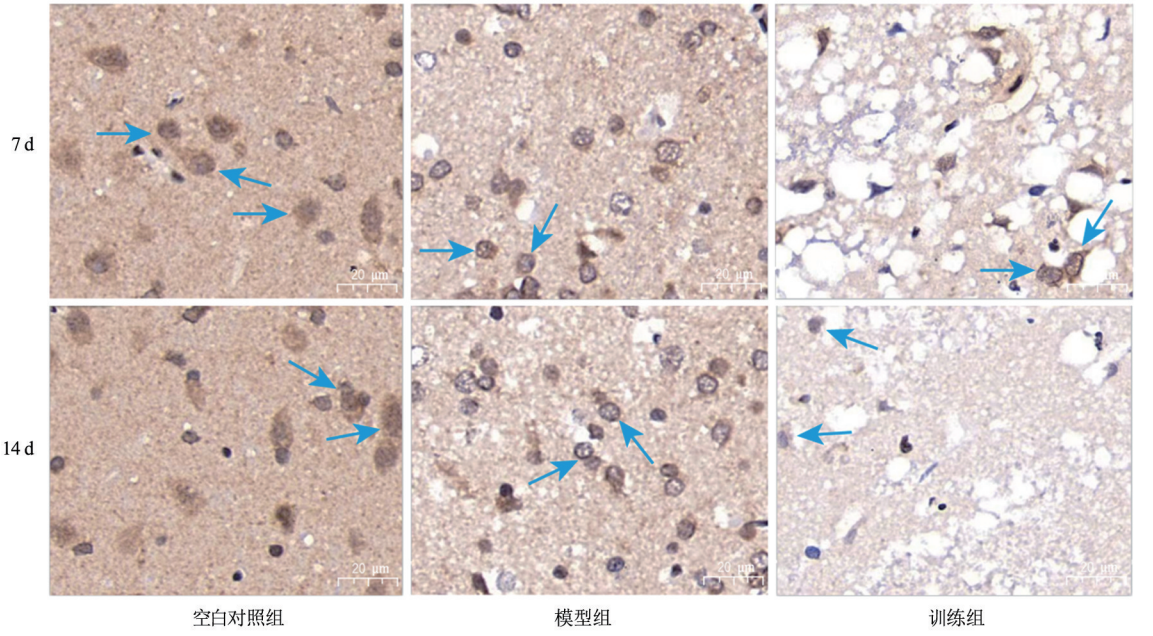


图 6　6 组大鼠海马切片 PTCH1 蛋白的免疫组化结果(×400 倍)

有研究表明,脑卒中后认知功能障碍的最佳康复时期是脑卒中发病后的 3 个月[16]。当大脑血流持续性减少时,患者的认知障碍也会逐步加重[17]。海马部位与记忆能力密切相关,由于海马组织结构的特殊性,其对缺血极为敏感[18],海马组织的持续性缺血缺氧会导致患者记忆力下降、认知功能减退[19]。在海马缺血的过程中,先后会经过炎症、组织增生、组织功能重塑 3 个联级阶段[20]。SHH 信号通路主要参与神经细胞的增生,并能够调节成年海马神经祖细胞的增殖与分化[21]。研究发现,EET 可通过多种感觉刺激促进脑皮质重塑,因此在组织功能重塑阶段予以 EET 干预,将有可能改善功能障碍、促进机体恢复[22]。目前,与此相关的作用机制研究还不完善。

前期研究发现,SHH 信号蛋白在脑缺血的修复、大脑中枢系统的生长发育和分化中发挥重要作用,SHH 鞘内注射或在脑梗死区域局部应用,可以改善功能结局,减少神经元变性,促进神经生长[23]。还有研究表明,SHH 除可对神经元产生直接影响外,还可以刺激脑血管生成,这可能有助于促进脑卒中和慢性神经退行性疾病恢复[24]。本研究发现,经过 EET 干预

的脑卒中后认知功能障碍大鼠,其运动行为能力、空间识别能力、记忆能力均显著改善,海马部位的细胞凋亡百分比也较同时期未经干预的脑缺血大鼠低,干预后大鼠海马部位 SHH 通路被激活,推测认为 EET 可以通过调控 SHH 通路的活性,改善脑缺血大鼠的认知功能,SHH 信号通路的激活,可能是 EET 改善脑缺血性认知功能障碍的重要机制之一。

综上所述,本研究探讨了 EET 对脑缺血认知功能障碍大鼠的影响,结果发现 EET 可以改善脑缺血大鼠的认知功能,其机制可能与 SHH 信号通路的激活有关。此结论为开展 EET 康复提供了相关依据,但脑损伤的发生机制较为复杂,相关研究也并未透彻阐明,本研究在 SHH 通路方面的研究还不够深入和全面,检测指标较为单一。后续会考虑增加 SHH 通路抑制剂、激活剂以及相关指标的检测,以提高研究的科学性与完整性。

参 考 文 献

[1] 董旭,孙洁,李玲.高低频重复经颅磁刺激对卒中后认知障碍伴摄食吞咽困难患者的疗效观察[J].中国康复,2023,38(8):455-459.DOI:10.3870/zgkf.2023.08.002.

[2] 李闻宇,李江,王强,等.经颅直流电刺激和重复经颅磁刺激治疗脑卒中后认知功能障碍的研究进展[J].中华物理医学与康复杂志,2022,44(4):369-372.DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2022.04.019.

[3] Pandian JD,Gall SL,Kate MP,et al.Prevention of stroke:a global perspective[J]. Lancet,2018,392(10154):1269-1278.DOI:10.1016/S0140-6736(18)31269-8.

[4] 汪凯,董强,郁金泰,等.卒中后认知障碍管理专家共识 2021[J].中国卒中杂志,2021,16(4):376-389.DOI:10.3969/j.issn.1673-5765.2021.04.011.

[5] 魏天祺,罗家麒,李紫娟,等.基于丰富环境的增强现实训练对脑卒中步行功能的影响[J].中国康复理论与实践,2023,29(12):1439-1445.DOI:10.3969/j.issn.1006-9771.2023.12.008.

[6] 徐欢岚,梁冠军,张何威,等.丰富环境康复训练对缺氧缺血性脑病新生儿的体格及神经行为发育的影响[J].中国康复医学杂志,2023,38(12):1701-1706.DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2023.12.011.

[7] 刘夕霞,曹湾,李荣祝,等.丰富环境对重复轻度脑损伤小鼠记忆功能及神经再生的影响[J].中国康复医学杂志,2021,36(11):1357-1362.DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2021.11.006.

[8] 张人凤.TTBK2 通过初级纤毛/SHH 信号介导 SNAT2 蛋白在促进神经元再生能力中的作用研究[D].长春:吉林大学,2023:5311.

[9] Ingham PW, Nakano Y, Seger C. Mechanisms and functions of hedgehog signalling across the metazoa[J].Nat Rev Genet,2011,12(6):393-406.DOI:10.1038/nrg2984.

[10] Kumar S,Reynolds K,Ji Y,et al.Impaired neurodevelopmental pathways in autism spectrum disorder:a review of signaling mechanisms and crosstalk[J/OL].J Neurodev Disord,2019,11(1):10[2022-03-14].

[11] 彭洪卫,林如辉,邵丽,等.电针对 MCAO 大鼠海马 CA1 区 NF-κB p65 表达及学习记忆功能的影响[J].中国中医急症,2023,32(3):404-408.DOI:10.3969/j.issn.1004-745X.2023.03.006.

[12] 孔钰,杨骏,樊吟秋,等.基于 Sonic Hedgehog 信号通路探讨化瘀通络灸促血管性痴呆大鼠髓鞘再生的作用机制[J].针刺研究,2023,48(6):578-584.DOI:10.13702/j.1000-0607.20221156.

[13] 董笑博,安阳,杨彩瑜,等.MCC950 抑制 NLRP3 炎性小体活性改善阿尔茨海默病模型小鼠血脑屏障功能研究[J].辽宁中医药大学学报,2023,25(9):57-62.DOI:10.13194/j.issn.1673-842x.2023.09.013.

[14] 张明晓,方峰,杨艳,等.人参皂苷 Rg1 对幼龄大鼠缺氧缺血性脑损伤和神经元凋亡的保护作用[J].西安交通大学学报(医学版),2021,42(5):693-699.DOI:10.7652/jdyxb202105009.

[15] 季辉,刘莹,王力娜,等.白藜芦醇苷对脑梗死大鼠中 Shh 和 Nrf2 信号通路的调节及机制研究[J].脑与神经疾病杂志,2021,29(9):533-538.

[16] 李梓婷,班林强,陈枫.环颅底穴位化裁针刺治疗卒中后轻度认知障碍:随机对照试验[J].中国针灸,2023,43(10):1104-1108.DOI:10.13703/j.0255-2930.20221231-0002.

[17] 宋娟,卞心怡,李键,等.坐骨神经电刺激对慢性脑缺血大鼠海马区血管内皮生长因子表达及学习记忆功能的影响[J].中华物理医学与康复杂志,2023,45(10):878-883.DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2023.10.003.

[18] 戴有勇,严国强,石珊,等.经颅直流电刺激对认知损害模型大鼠学习、记忆功能的影响[J].中华物理医学与康复杂志,2023,45(1):1-5.DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2023.01.001.

[19] 王泽熙,回利,刘帅,等.电针刺激头部运动区对脑瘫大鼠脑损伤及 JAK2/STAT3 信号通路的影响[J].中华物理医学与康复杂志,2023,45(10):872-877.DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2023.10.002.

[20] 文君,朱慧敏,李雪梅,等.抑制 Sonic Hedgehog 信号能抑制脑缺血性损伤后纤维瘢痕形成且不利于神经功能恢复[J].南方医科大学学报,2022,42(6):840-848.DOI:10.12122/j.issn.1673-4254.2022.06.07.

[21] Lazarov O, Mattson MP, Peterson DA, et al.When neurogenesis encounters aging and disease[J]. Trends Neurosci, 2010, 33(12):569-579.DOI:10.1016/j.tins.2010.09.003.

[22] 刘环环,高静,苏凯奇,等.丰富环境对慢性低灌注性认知障碍保护作用的机制研究进展[J].中国全科医学,2022,25(23):2903-2909.DOI:10.12114/j.issn.1007-9572.2022.0122.

[23] Cao W, Zhang C, Chen R, et al.A novel cerebroprotein hydrolysate, CH1, ameliorates chronic focal cerebral ischemia injury by promoting white matter integrity via the Shh/Ptch-1/Gli-1 signaling pathway[J]. Neuropsychiatr Dis Treat, 2020, 16: 3209-3224. DOI: 10.2147/NDT.S289990.

[24] Bao GQ, Yu Y. Vitamin D3 promotes cerebral angiogenesis after cerebral infarction in rats by activating Shh signaling pathway[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2018, 22(20): 7069-7077. DOI: 10.26355/eurrev_201810_16179.

(修回日期:2024-04-02)
(本文编辑:凌　琛)