

· 基础研究 ·

重复经颅磁刺激对慢性脑低灌注大鼠
认知功能的影响

张强 章军建

【摘要】目的 观察重复经颅磁刺激对慢性脑低灌注(CCH)大鼠认知功能的影响。**方法** 选取成年雄性 SD 大鼠 30 只,按随机数字表法分为治疗组 10 只,对照组 10 只,假手术组 10 只。治疗组和对照组均针控线栓法制作双侧颈总动脉重度狭窄 CCH 模型,假手术组仅游离双侧的颈总动脉,暴露双侧颈总动脉后缝合,不予以结扎。造模成功 4 周后,治疗组给予 7 d 的 20 Hz 重复经颅磁刺激治疗。3 组大鼠均于造模成功 4 周后进行 Morris 水迷宫检测,并于行为学测试后处死,采用 TUNEL 法和免疫组织化学分别检测海马神经元凋亡情况和 Bcl-2、Bax 蛋白的表达情况。**结果** 造模成功 4 周后的第 2、3、4、5 天,对照组和治疗组大鼠的平均逃避潜伏期与假手术组同时点比较,均显著延长($P < 0.01$),且治疗组大鼠的平均逃避潜伏期较对照组同时点均显著缩短($P < 0.01$)。训练后,治疗组和对照组大鼠平台象限游泳距离百分比分别为 $(48.79 \pm 3.45)\%$ 和 $(30.45 \pm 2.78)\%$,均显著低于假手术组的 $(64.56 \pm 2.14)\%$ ($P < 0.01$),且治疗组平台象限游泳距离百分比较对照组显著增加($P < 0.01$)。训练后,治疗组和对照组大鼠海马区神经细胞的凋亡率以及 Bcl-2 和 Bax 蛋白的表达与假手术组比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$),且治疗组海马区神经细胞的凋亡率以及 Bcl-2 和 Bax 蛋白的表达与对照组比较,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。**结论** 重复经颅磁刺激可改善慢性脑低灌注大鼠的认知功能,其作用机制可能与抑制海马神经元凋亡有关。

【关键词】 重复经颅磁刺激; 慢性脑低灌注; 海马; 认知功能

Effects of repetitive transcranial magnetic stimulation on cognitive function in rats with chronic cerebral hypoperfusion Zhang Qiang, Zhang Junjian. Department of Neurology, Zhongnan Hospital, Wuhan University, Wuhan 430060, China

Corresponding author: Zhang Junjian, Email: wdsjx@163.com

【Abstract】Objective To observe the effects of repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) on cognitive function in rats with chronic cerebral hypoperfusion. **Methods** The animal model of chronic cerebral hypoperfusion was established in 30 Sprague-Dawley rats by surgically induced bilateral common carotid artery stenosis, who were then divided into a control group and a treatment group. The rats in the treatment group were administered with 20 Hz rTMS 4 weeks postoperation for 7 days. Another 10 rat subject to sham operation served as blank controls. The cognitive function was assessed by Morris water maze (MWM) at the time points of 2nd, 3rd, 4th and 5th days after ending of the 4 weeks of treatment. The morphologic changes of hippocampus neurons were observed with HE staining. The apoptosis was examined by TUNEL, the expression of Bcl-2 or Bax protein was determined using immunohistochemistry assay. **Results** At all the time points the MWM escape latency in the rTMS group was shorter than that in the control group ($P < 0.01$). The percentage of crossing the corresponding platform during the same time period in platform quadrant in the rTMS group was significant higher than that in the control group ($P < 0.01$). Compared with the control group, the treatment group demonstrated significantly decreased percentage of neuronal apoptosis ($P < 0.05$), as well as increased expression of Bcl-2 protein ($P < 0.01$) and reduced expression of Bax protein ($P < 0.01$). **Conclusion** rTMS can improve the cognitive dysfunction in rats caused by chronic cerebral hypoperfusion, probably through inhibiting neuronal apoptosis in hippocampus region.

【Key words】 Repetitive transcranial magnetic stimulation; Chronic cerebral hypoperfusion; Hippocampus; Cognitive function

临床流行病学调查研究显示,慢性脑低灌注

(chronic cerebral hypoperfusion, CCH)可导致大脑灰白质结构改变和认知功能的损害,此类患者极易发展成为血管性痴呆(vascular dementia, VaD)^[1-2],而颈动脉严重狭窄是导致脑组织呈现慢性低灌注状态的主要因素^[3]。有研究显示,重复经颅磁刺激(repeated tran-

cranial magnetic stimulation, rTMS) 可改善血管性痴呆大鼠的认知功能。Wang 等^[4]对血管性痴呆大鼠模型进行研究时发现,高频 rTMS(5 Hz)可显著改善大鼠脑缺血后的学习记忆功能障碍。还有研究表明,低频和高频 rTMS 均可以促进血管性痴呆大鼠学习和记忆能力的恢复^[5]。目前, rTMS 能否改善 CCH 所致的认知功能障碍尚鲜见报道。本研究旨在观察 rTMS 对 CCH 大鼠认知功能及海马神经元凋亡的影响,并初步探讨 rTMS 的疗效及其可能的作用机制。

材料与方法

一、实验动物及分组

选取健康成年雄性 SD (Sprague-Dawley) 大鼠 30 只,体重(250 ± 25) g,由同济医学院实验动物中心提供,按随机数字表法将大鼠随机分成治疗组、对照组和假手术组,每组 10 只大鼠。

二、主要仪器和试剂

YRDCCY-I 型磁刺激仪(武汉依瑞德医疗设备新技术有限公司生产)、超薄切片机(奥地利莱卡公司)、Morris 水迷宫实验装置(中国医学科学院药物研究所)、TUNEL 染色试剂盒(福州迈新生物技术开发有限公司)、多功能显微镜及图像分析系统(德国 Leica 公司)。

三、模型制作和 rTMS 治疗

治疗组和对照组大鼠参照周振华等^[6]的针控线栓法制作双侧颈总动脉重度狭窄 CCH 模型。术前,将手术缝线用地塞米松浸泡 10 min,大鼠乙醚麻醉后固定后行颈正中切口,分离皮肤和肌肉并游离双侧的颈总动脉,在颈总动脉近心端距颈内动脉和颈外动脉分叉约 0.5 cm 处用 0 号手术缝线将直径为 0.45 mm 注射器针头和颈总动脉一起扎紧打成活结,留置线头,然后小心拔出针头,局部滴少量地塞米松,同时少量青霉素(溶于生理盐水中)滴于术野中,缝合伤口。假手术组仅游离双侧的颈总动脉,暴露双侧颈总动脉后缝合,不予以结扎。

造模成功 4 周后,治疗组大鼠头部给予 rTMS 治疗,圆形刺激线圈,直径为 60 mm,脉冲磁场峰值强度为 3.5 T。刺激参数参考严莉等^[7]的研究,频率为 20 Hz,强度为 33% 最大输出强度刺激双侧大脑半球(线圈紧贴头皮,线圈平面与大脑半球呈相切关系,线圈中心位于额叶皮质),每刺激 5 s,间歇 60 s,每个序列 100 个脉冲,共 10 个序列,每天刺激 1 次,连续治疗 7 d。

对照组和假手术组均常规饲养,不进行任何治疗。

四、Morris 水迷宫行为学检测

1. 定位航行实验: Morris 水迷宫为圆形水池,直径为 150 cm,高 50 cm,池壁上标有东、西、南、北四个象限入水点,圆柱平台直径为 10 cm,高 30 cm,水温(22 ± 2)℃,水面上方 1.5 cm 处安装有连接着计算机的摄像系统。以造模成功 4 周后的第 1 天为定位航行实验的起始时间点,于第 1 天,将 3 组大鼠放入 Morris 水迷宫,自由游泳 2 min,使其适应环境;从第 2 天起,将大鼠随机从任一象限面向池壁放入水中,采用计算机监测并记录大鼠从入水开始寻找至找到并爬上平台的路线和所需时间(逃避潜伏期)。每只大鼠每天上午 9 时和下午 4 时各训练 2 次,每次训练间隔 60 s,连续训练 5 d(如大鼠 2 min 内未找到平台,将潜伏期记为 2 min),逃避潜伏期取每日平均值。

2. 空间搜索实验:于造模成功 4 周后的第 1 天(训练前)和训练 5 d 后(训练后)撤除平台,任选一个入水点将大鼠面向池壁放入水中,并记录 2 min 内的运动轨迹,计算其在原平台象限游泳时间和在原平台象限游泳路程占总游泳路程的百分比。

五、标本采集和免疫组化检测

原位 TUNEL 法检测细胞凋亡,免疫组化法检测 Bcl-2 和 Bax 蛋白的表达。行为学观察完成后 1 周,断头处死动物,低温取脑并分离海马组织,切片染色。具体操作步骤按试剂盒说明进行。

六、统计学方法

采用 SPSS 11.0 版统计软件对所有数据进行,数据以($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用独立样本的 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、3 组大鼠水迷宫实验结果

造模成功 4 周后的第 2、3、4、5 天,治疗组和对照组大鼠的平均逃避潜伏期与假手术组同时时间点比较,均显著延长($P < 0.01$),且治疗组大鼠的平均逃避潜伏期较对照组同时时间点均显著缩短($P < 0.01$),详见表 1。训练后,治疗组和对照组大鼠平台象限游泳距离百分比与假手术组比较,均显著下降($P < 0.01$),且治疗组平台象限游泳距离百分比较对照组显著增加($P < 0.01$),详见表 2。

表 1 3 组大鼠不同时间点平均逃避潜伏期的变化($s, \bar{x} \pm s$)

组别	只数	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天
假手术组	10	68.20 ± 1.34	15.35 ± 2.32	8.48 ± 1.56	5.87 ± 0.46	4.07 ± 0.22
对照组	10	85.13 ± 4.59	70.68 ± 3.49 ^b	65.53 ± 3.45 ^b	51.14 ± 2.78 ^b	36.45 ± 1.79 ^b
治疗组	10	72.12 ± 3.45	42.67 ± 2.36 ^{ab}	28.69 ± 2.04 ^{ab}	18.67 ± 2.44 ^{ab}	9.85 ± 1.75 ^{ab}

注:与对照组比较,^a $P < 0.01$;与假手术组比较,^b $P < 0.01$

表 2 3 组大鼠训练前、后平台象限游泳距离百分比的比较(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	只数	治疗前	治疗后
假手术组	10	68.54 ± 2.35	64.56 ± 2.14
对照组	10	35.04 ± 2.76 ^b	30.45 ± 2.78 ^b
治疗组	10	37.28 ± 3.46 ^b	48.79 ± 3.45 ^{ab}

注:与对照组比较,^a $P<0.01$;与假手术组比较,^b $P<0.01$

二、3 组大鼠海马区神经细胞的凋亡率

训练后,治疗组和对照组大鼠海马区神经细胞的凋亡率分别为 $(66.32 \pm 2.45)\%$ 和 $(66.32 \pm 2.45)\%$,均显著高于假手术组的 $(66.32 \pm 2.45)\%$ ($P < 0.01$),且治疗组大鼠海马区神经细胞的凋亡率显著低于对照组 ($P < 0.05$),详见表 3 和图 1。

表3 3组大鼠海马区神经细胞凋亡率以及 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	细胞凋亡率 (%)	Bcl-2 免疫 阳性细胞数 (个/高倍镜视野)	Bax 免疫 阳性细胞数 (个/高倍镜视野)
假手术组	10	3.41 ± 0.54	4.34 ± 1.24	5.01 ± 1.14
对照组	10	66.32 ± 2.45 ^a	24.34 ± 2.86 ^a	38.41 ± 2.34 ^a
治疗组	10	56.21 ± 2.12 ^{ab}	38.34 ± 2.15 ^{ab}	25.24 ± 2.42 ^{ab}

注:与对照组比较,^a $P<0.01$;与假手术组比较,^b $P<0.01$

三、3 组大鼠海马区 Bcl-2 及 Bax 的表达

训练后,治疗组和对照组海马区 Bcl-2 和 Bax 蛋白的表达与假手术组比较,均显著增高($P<0.01$),且治疗组 Bcl-2 和 Bax 蛋白的表达与对照组比较,差异均有统计学意义($P<0.01$)。详见图 2、3 和表 3。

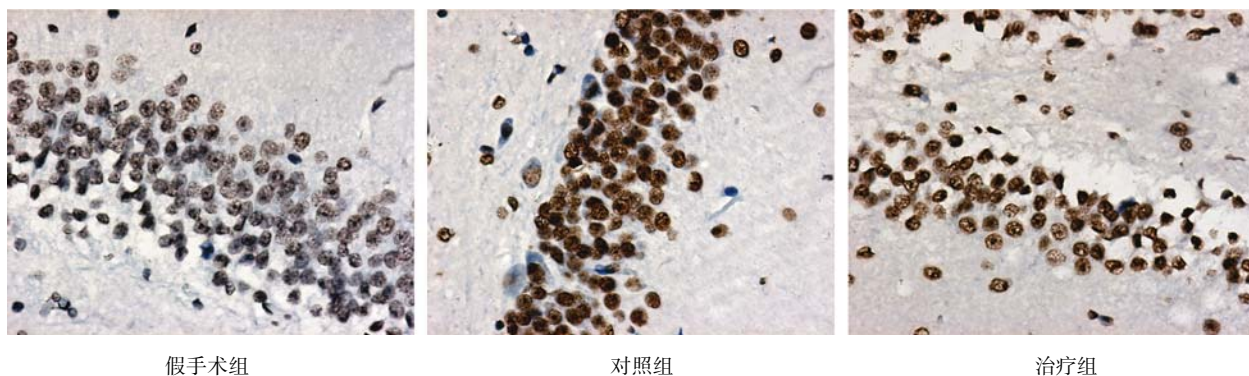


图1 3组大鼠海马区神经细胞(免疫组化染色,×400)

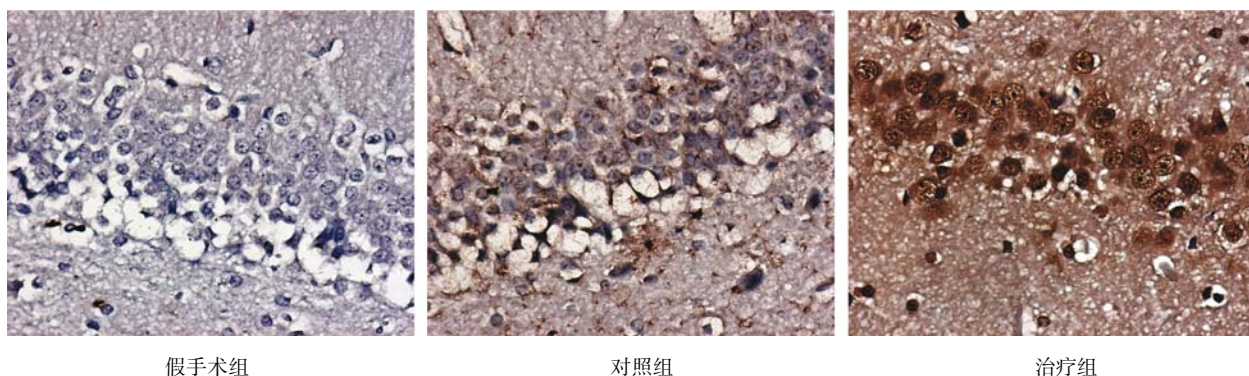


图2 3组大鼠海马区 Bcl-2 蛋白表达(免疫组化染色, ×400)

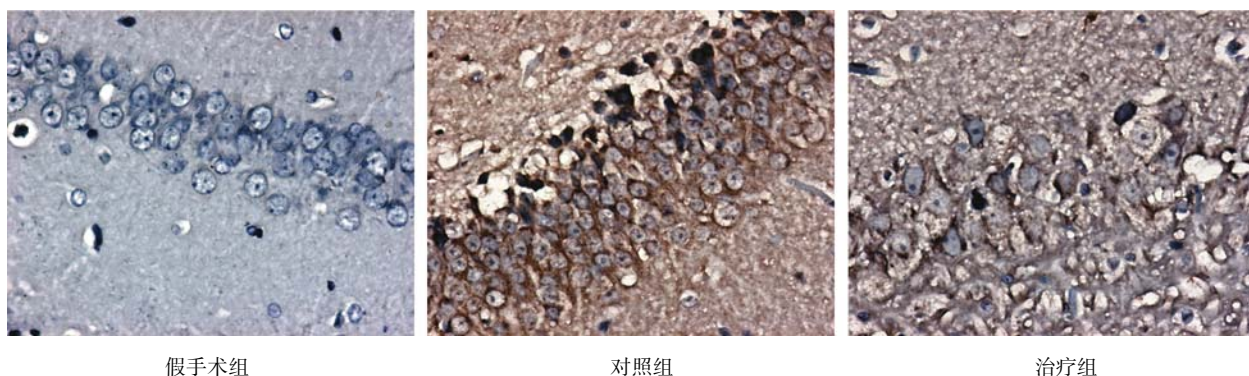


图3 3组大鼠 Bax 蛋白在大鼠海马区的表达(免疫组化染色, ×400)

讨 论

本研究发现,CCH 模型大鼠经 rTMS 治疗后,其在 Morris 水迷宫行为学检测中的表现明显优于对照组(平均逃避潜伏期显著缩短,平台象限游泳距离百分比明显增加),表明 rTMS 可改善 CCH 模型大鼠的认知功能,这与张小乔等^[8]的研究结果一致。相较于双侧颈总动脉结扎两血管阻断法(two-vessel occlusion, 2VO)方法制作血管性痴呆大鼠动物模型^[9],本实验采用的是双侧颈动脉重度狭窄制作 CCH 模型,更适合于研究 CCH 引起的认知功能损害。本研究还发现,经 rTMS 作用后,模型动物海马区细胞凋亡率降低,同时与细胞凋亡相关的 Bcl-2 免疫阳性细胞数增多($P < 0.01$),Bax 免疫阳性细胞数减少($P < 0.01$)。该研究结果提示,rTMS 有助于减轻 CCH 所致的认知功能损害,这可能与抑制海马神经元凋亡机制有关。

Sztrihai 等^[10]研究表明,颈动脉狭窄作为独立的危险因素,可由于导致大脑慢性低灌注引起认知功能障碍。有报道显示,约 9% 的 60 岁以上老年人出现动脉粥样硬化引起的颈动脉狭窄。Yang 等^[5]研究显示,颈动脉闭塞所致血管性痴呆大鼠海马神经元发生形态学变化并有真核起始因子 4E(eukaryotic initiation factor 4E)蛋白表达降低;本研究也表明,慢性低灌注可导致大鼠海马区细胞凋亡。这可能就是脑部低灌注导致认知障碍的病理机制。颈动脉支架植入术及颈动脉内膜剥脱术虽可改善狭窄,但存在手术风险,接受率低,Ogasawara 等^[11]的研究发现,手术治疗会损害认知功能。因此寻找安全、无创的方法对治疗颈动脉狭窄导致 CCH 引起的认知功能损害具有重大意义。本研究对 CCH 引发的认知功能障碍做了初步探讨,结果提示,低频 rTMS 虽然不可能对已狭窄的颈动脉产生影响,但是对于 CCH 所导致的大鼠海马区神经细胞凋亡具有抑制作用,同时对其认知功能损害有明显的改善作用。这提示,如果在 rTMS 干预的同时采取有效措施缓解颈动脉狭窄,改善脑部供血,理应有可能取得更好疗效。

近年来,有关 rTMS 治疗脑缺血后导致的认知功能障碍机制的研究取得了一定的进展。赵秀秀等^[12]研究表明,高频 rTMS 能够通过影响 p-CREB 通路的表达来促进脑缺血后海马神经元存活,抑制凋亡,改善脑缺血后学习记忆功能。王菲等^[13]研究表明,rTMS 通过其磁场的生物学效应,增加血管性痴呆大鼠海马 CA1 区中与神经保护及学习记忆有关的脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)水平以及 N-甲基-D-天冬氨酸受体亚单位 NR1(N-methyl-D-aspartate receptor, NMDAR1)和突触素(synaptophysin, SYN)的表

达,进而实现其对神经元、突触的保护作用,改善认知功能。这些均与本研究所见具有同样的意义。

综上所述,rTMS 可以改善颈动脉狭窄引起的 CCH 所导致的认知功能损害,但本研究样本量较少,且大鼠双侧颈动脉狭窄模型与临床患者是否有同样的病理改变尚不清楚,因此本研究结果应用于临床患者治疗之前尚需进一步验证。此外,本研究未比较不同频率、不同强度以及不同疗程 rTMS 的疗效,亦有待后续研究进一步探讨。

参 考 文 献

- [1] Shibata M, Yamasaki N, Miyakawa T, et al. Selective impairment of working memory in a mouse model of chronic cerebral hypoperfusion [J]. *Stroke*, 2007, 38(10):2826-2832.
- [2] de la Torre JC. Vascular risk factor detection and control may prevent Alzheimer's disease [J]. *Ageing Res Rev*, 2010, 9(3): 218-225.
- [3] 郑宇,华扬,凌晨,等. 颈动脉严重狭窄或闭塞对颅内循环的影响 [J]. *中国医学影像技术*, 2004, 20(6):901-903.
- [4] Wang F, Geng X, Tao HY, et al. The restoration after repetitive transcranial magnetic stimulation treatment on cognitive ability of vascular dementia rats and its impacts on synaptic plasticity in hippocampal CA1 area [J]. *J Mol Neurosci*, 2010, 41(1):145-155.
- [5] Yang H, Shi O, Jin Y, et al. Functional protection of learning and memory abilities in rats with vascular dementia. *Restor Neurol Neurosci*, 2014, 32(5):689-700.
- [6] 周振华,陈康宁,周宇,等. 可控制狭窄程度的鼠颈动脉狭窄模型建立及认知功能改变 [J]. *中国临床康复*, 2005, 8(28):6052-6054.
- [7] 严莉,丰宏林,崔丽英. 经颅重复磁刺激对大鼠脑缺血再灌注损伤后运动皮质兴奋性和神经功能的影响 [J]. *中国临床康复*, 2006, 10(18):79-81.
- [8] 张小乔,李鹏,刘伟,等. 重复经颅磁刺激对血管性痴呆大鼠学习记忆功能及海马胆碱能系统的影响 [J]. *神经损伤与功能重建*, 2014, 9(2):100-104.
- [9] Ni J, Ohta H, Matsumoto K, et al. Progressive cognitive impairment following chronic cerebral hypoperfusion induced by permanent occlusion of bilateral carotid arteries in rats [J]. *Brain Res*, 1994, 8(1-2):231-236.
- [10] Sztrihai LK, Nemeth D, Sefcsik T, et al. Carotid stenosis and the cognitive function [J]. *J Neurol Sci*, 2009, 283(1-2): 36-40.
- [11] Ogasawara K, Yamadate K, Kobayashi M, et al. Postoperative cerebral hyperperfusion associated with impaired cognitive function in patient undergoing carotid endarterectomy [J]. *J Neurosurg*, 2005, 102(1):38-44.
- [12] 赵秀秀,韩肖华,张靖慧,等. 高频重复经颅磁刺激对大鼠脑梗死后学习记忆功能及 pCREB、bcl-2、bax 表达的影响 [J]. *中国康复医学杂志*, 2012, 27(6):1087-1092.
- [13] 王菲,耿鑫,陶华英,等. 重复经颅磁刺激对血管性痴呆大鼠海马 CA1 区 BDNF、NMDAR1、SYN 表达及超微结构的影响 [J]. *中国神经精神疾病杂志*, 2010, 36(6): 397-400.

(修回日期:2014-12-30)

(本文编辑:阮仕衡)