

· 基础研究 ·

电刺激小脑顶核对脑梗死大鼠学习记忆能力及生长相关蛋白-43 的影响

尹琬凌 覃丹 韩造木

【摘要】目的 观察电刺激小脑顶核(FNS)对脑缺血再灌注大鼠学习记忆能力及生长相关蛋白-43(GAP-43)表达的影响。**方法** 选用随机数字表法将 60 只健康成年雄性 SD 大鼠分为正常组、假手术组、FNS 组及模型组,采用线栓法将 FNS 组及模型组大鼠制成左侧大脑中动脉栓塞/再灌注(MCAO/R)模型。FNS 组大鼠于制模 3 h 后给予 FNS 治疗,模型组仅将针电极置于大鼠小脑顶核部位,但不给予电刺激。分别于制模 1 d、3 d 及 7 d 时采用 Morris 水迷宫实验检测各组大鼠学习记忆能力,并于上述时间点采用实时荧光定量 PCR 技术检测各组大鼠脑梗死部位 GAP-43 mRNA 表达。**结果** 制模后 1 d、3 d 及 7 d 时模型组与 FNS 组大鼠 Morris 水迷宫逃避潜伏期均较正常组及假手术组明显延长(均 $P < 0.05$);FNS 组大鼠上述时间点逃避潜伏期[分别为 (25.72 ± 0.42) s, (24.27 ± 0.55) s 和 (23.82 ± 0.63) s]则较模型组显著缩短(均 $P < 0.05$)。在制模后 1 d、3 d 及 7 d 时正常组与假手术组大鼠脑组织中仅存在少量 GAP-43 mRNA 表达;模型组及 FNS 组 GAP-43 mRNA 表达在上述时间点均较正常组及假手术组显著增多(均 $P < 0.05$);并且上述时间点 FNS 组 GAP-43 mRNA 表达[分别为 (1.54 ± 0.34) , (2.03 ± 0.56) 和 (2.78 ± 0.81)]亦显著强于模型组(均 $P < 0.05$)。**结论** FNS 干预有助于改善脑缺血再灌注大鼠学习记忆能力,其治疗机制可能与上调脑梗死部位神经元 GAP-43 mRNA 表达,从而促进脑梗死灶周围神经轴突再生及修复有关。

【关键词】 脑梗死; 电刺激小脑顶核; Morris 水迷宫; 生长相关因子-43; 学习记忆功能

The effect of electrical stimulation of the cerebellar fastigial nucleus on learning, memory and the expression of growth-associated protein-43 after cerebral infarction Yin Wanling, Qin Dan, Han Zaomu. Department of

Integrated Medicine, The Central Hospital of Wuhan, Wuhan 430030, China

Corresponding author: Han Zaomu, Email: hanzaomu1988@163.com

【Abstract】 Objective To study the effect of electrical stimulation of the fastigial nucleus of the cerebellum (FNS) on learning, memory and the expression of growth-association protein-43 (GAP-43) after cerebral ischemia and reperfusion. **Methods** Sixty healthy, adult, male Sprague-Dawley rats were randomly divided into a normal group, a sham-operation group (sham group), a model group and an FNS group, with 15 rats in each. Left middle cerebral artery occlusion and reperfusion (MCAO/R) was administered to the rats in the FNS and model groups using the thread embolism method. The rats of the FNS group were given FNS treatment using a pair of needle electrodes inserted into the cerebellar fastigial nucleus 3 hrs after the MCAO/R. Needle electrodes were similarly inserted in the model group rats, but no electrical stimulus was applied. Then the rats' learning and memory abilities were tested using a Morris water maze on days 1, 3 and 7 after the MCAO/R modeling. The expression of GAP-43 mRNA on the side of the cerebral infarction was detected using a quantitative, real-time polymerase chain reaction. **Results** The average escape latencies of the rats in the model and FNS groups were significantly longer than those of the normal and sham groups at all time points, but the FNS group rats demonstrated a significantly shorter average escape latency than the rats of the model group at each time point. The normal and sham groups showed a significantly lower expression of GAP-43 mRNA than the model and FNS group rats at all time points. The FNS group rats had a significantly higher level of GAP-43 mRNA than the rats of the model group. **Conclusion** FNS improved the rats' learning and memory abilities. This might be associated with the up-regulation of GAP-43 mRNA in neurons on the side of the cerebral infarction which could promote the regeneration and repair of peripheral nerve axons in the area of the infarction.

【Key words】 Cerebral infarction; Cerebellar fastigial nucleus; Electrical stimulation; Growth-associated

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2015.03.002

作者单位:430030 武汉,湖北省武汉市中心医院(后湖院区)综合二科

通信作者:韩造木,Email:hanzaomu1988@163.com

protein-43; Learning; Memory

近年来缺血性脑梗死 (cerebral infarction) 发病率逐年增加,已成为致残率及致死率均较高的疾病之一。当前国内、外学者均发现电刺激小脑顶核 (cerebellar fastigial nucleus electrical stimulation, FNS) 不仅能促进脑梗死动物肢体功能恢复^[1], 同时还能改善实验动物认知功能^[2]。目前关于 FNS 改善实验动物认知功能的确切机制尚未明晰,本实验采用线栓法制作左侧大脑中动脉缺血梗死/再灌注 (middle cerebral artery occlusion/reperfusion, MCAO/R) 大鼠模型,并采用 FNS 对模型大鼠进行干预,通过观察治疗后大鼠学习记忆能力、脑梗死周边区生长相关蛋白-43 (growth associated protein 43, GAP-43) mRNA 表达,从而探讨 FNS 改善脑缺血/再灌注模型大鼠学习记忆能力的相关机制,为临床采用 FNS 治疗缺血性脑卒中患者提供基础资料。

材料与方法

一、实验材料

选取健康成年雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 60 只,由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供,大鼠体重 (220 ± 30) g,鼠龄 12 周;主要实验仪器及试剂包括 G6805-2 型多功能治疗仪 (青岛鑫升实业公司)、Morris 水迷宫 (荷兰 Noldus 公司)、10% 水合氯醛 (武汉市中心医院提供)、7700 型荧光定量 PCR 仪 (美国 ABI 公司)、Labfuge 400R 型台式冷冻多用离心机 (德国 Heraeus 公司)、5810R 型台式高速大容量离心机 (德国 Eppendorf 公司)、Trizol、Oligo (dT18) 及 PCR 引物 (均购于美国 Invitrogen 公司)、M-MLV 逆转录酶、Taq-DNA 聚合酶、dNTP (均购于美国 Promega 公司)、SYBR Green I (购于美国 Biotium 公司)、乙二胺四乙酸钠、胎牛血清等。

二、分组及制模

选用随机数字表法将上述 SD 大鼠分为正常组、假手术组、FNS 组及模型组,每组 15 只大鼠,实验期间各组大鼠均正常摄食、饮水。参照廖维靖等^[3]介绍的改良 Longa 线栓法将 FNS 组及模型组大鼠制成左侧大脑 MCAO/R 动物模型,具体制模步骤如下:采用 10% 水合氯醛按每千克体重 3 ml 对大鼠进行腹腔注射麻醉,待大鼠麻醉固定后行颈部正中切口,暴露其左侧颈总动脉、颈内动脉,结扎颈总动脉近心段,同时分离出颈内动脉;将涂有多聚赖氨酸、直径为 0.28 mm 的尼龙线自颈动脉分叉处插入颈内动脉约 (18.0 ± 1.0) mm 处,固定尼龙线后缝合皮肤;于 90 min 后将线栓拔出约 10 mm 实现血液再灌注。制模成功标准如

下:大鼠苏醒后提尾时出现右前肢内收屈曲;Horner 征阳性;爬行时向右侧划圈;站立时向右侧倾倒等^[4]。正常组大鼠实验期间未给予任何手术处理,假手术组大鼠手术处理过程与模型组及 FNS 组一致,但术中不阻断大脑中动脉血流。

三、干预方法

于制模 3 h 后,参照 Nakai 等^[5]介绍的方法对 FNS 组大鼠进行 FNS 干预,采用 3.5% 水合氯醛按每千克体重 350 mg 进行腹腔注射麻醉,待麻醉生效后将大鼠俯卧位固定于大鼠脑立体定向仪上,根据大鼠脑立体定位图谱^[6]确定小脑顶核座标 (以大鼠前囟后缘为零点,正中中线向后 11.4 ~ 11.8 mm,向右旁开 0.8 ~ 1.0 mm,深 5.2 ~ 5.7 mm)。在病灶对侧颅骨上钻孔,插入同心圆电极 (电极直径 100 μ m),以刺激右侧小脑顶核。设置电刺激参数如下:电刺激波形为方波脉冲,脉宽 0.5 ms,电刺激频率 50 ~ 100 Hz,电刺激强度 50 μ A,以电刺激时大鼠出现血压增高为刺激成功标志,持续刺激 1 h,术中及术后维持大鼠体温在 37 ~ 38 $^{\circ}$ C。正常组、假手术组及模型组大鼠均于上述相同时间点给予假 FNS 治疗,所有操作均与 FNS 组一致,但在干预期间电刺激器无能量输出。

四、大鼠学习记忆能力测定

于制模后 1 d、3 d 及 7 d 时分别采用 Morris 水迷宫对各组大鼠进行空间学习记忆能力测试。本研究所用 Morris 水迷宫为直径 120 cm、高 40 cm 的圆形装置,逃逸平台为直径 10 cm 的圆柱状平台,将平台包裹黑色塑料袋后置入第 3 象限中央,水平面高于逃逸平面 2 cm,水温控制在 (25 ± 2) $^{\circ}$ C 左右,池中水用碳素墨水染黑,每次进行 Morris 水迷宫实验时周围环境均保持一致。将各组实验大鼠随机置入 Morris 水迷宫任意一个象限内,若大鼠在 60 s 内寻找到逃逸平台并在上面停留 15 s 则将其捞起,大鼠从入水至爬上逃逸平台所需时间为逃避潜伏期 (escape latency, EL)。如大鼠在 60 s 内未能寻找到逃逸平台,则由实验者将其引导至平台上,在平台上停留 15 s 后将其捞起,EL 计为 60 s。各组大鼠在造模前按照上述方法连续训练 5 d,每天训练 4 次,于制模后 1 d、3 d、7 d 时分别记录各组大鼠 EL 并将其作为空间学习记忆能力指标。

五、大鼠脑梗死侧 GAP-43 mRNA 检测

各组大鼠于制模后 1 d、3 d 及 7 d 时分别取 5 只采用过量 10% 水合氯醛深度麻醉,于冰盘上快速断头取脑,取脑梗死灶周边组织约 100 mg,每份标本取约 1×10^5 个细胞,去上清液后加入 Trizol 溶液 0.5 ml,混匀

后静置 10 min;加入氯仿 200 μ l 振荡 15 s;于 4 $^{\circ}$ C 环境下离心 (12 000 rpm, 离心半径 6 cm) 15 min;取上清液 400 μ l,加入等体积异丙醇混匀,于 -20 $^{\circ}$ C 环境下静置 30 min;再于 4 $^{\circ}$ C 环境下离心 (12 000 rpm, 离心半径 6 cm) 10 min;去上清液,经 75% 乙醇洗涤、沉淀、离心后,去净残余上清液于室温下晾干;再用 50 μ l 经焦碳酸二乙酯处理过的三蒸水溶解沉淀,选择紫外分光光度计测定其浓度及纯度,在逆转录酶 M-MLV 作用下,将 mRNA 逆转录成 cDNA 分子,采用 SYBR Green I 型荧光染料技术进行实时定量多聚酶链反应,以获取各组标本标准曲线,采用计算机分析 Ct 值。引物设计序列如下, GAP-43 上游引物序列为: 5'-GATGGTGTCAAACCGGAGGAT-3';下游引物序列为: 5'-CTTGT-TATGTGTCCACGAAGC-3'。

六、统计学分析

本研究所得计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用 SPSS 17.0 版统计学软件包进行数据分析,多样本间均数比较采用方差分析和 q 检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

结 果

一、各组大鼠 Morris 水迷宫测试结果比较

在制模后 1 d、3 d 及 7 d 时,发现正常组与假手术组逃避潜伏期组间差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$);模型组与 FNS 组逃避潜伏期均较正常组及假手术组明显延长 (均 $P < 0.05$);进一步比较发现, FNS 组上述时间点逃避潜伏期均较模型组明显缩短 (均 $P < 0.05$),上述结果提示 FNS 治疗能显著改善脑缺血再灌注大鼠学习记忆能力,具体情况见表 1。

二、各组大鼠脑缺血部位 GAP-43 mRNA 表达分析

通过荧光定量 PCR 法检测发现,在制模后 1 d、3 d 及 7 d 时正常组与假手术组大鼠脑组织中仅存在少量 GAP-43 mRNA 表达,且两组间差异无统计学意义 (均 $P > 0.05$);模型组与 FNS 组 GAP-43 mRNA 表达在上述时间点均较正常组及假手术组显著增强 (均 $P < 0.05$);并且 FNS 组 GAP-43 mRNA 表达在上述时间点亦显著强于模型组 (均 $P < 0.05$);上述结果提示 FNS 干预能促进脑梗死周边组织 GAP-43 mRNA 表达增强。

具体情况见表 1。

讨 论

流行病学调查资料显示,无论脑卒中患者有无临床症状、是首发或是复发,均可使患者发生认知障碍的危险性显著增加,在很大程度上影响患者生活质量,同时给患者家庭及社会带来沉重负担。近十余年来,国内、外学者研究发现,通过电刺激小脑顶核可启动中枢神经源性保护机制,促进脑梗死患者神经功能恢复^[7],至于 FNS 是否能改善脑梗死诱发的认知功能障碍,目前尚鲜见报道。本研究结果显示,脑缺血再灌注大鼠经 FNS 治疗后,发现其 Morris 水迷宫逃避潜伏期较模型组大鼠明显缩短 ($P < 0.05$),且其逃避潜伏期以制模后第 7 天时最短,提示 FNS 干预能持续促进脑梗死大鼠学习记忆能力改善。

目前研究发现, GAP-43 是一种轴突膜蛋白,其表达产物主要存在于轴突生长锥质膜面,圆锥是神经纤维生长的启动者与执行者,与神经突触再生、分化及生长锥发育、延生有关,在神经细胞发育及再生过程中高表达,通常被作为神经生长发育及损伤修复等神经元重塑活动的标志物^[8]。当脑组织受到损伤时,其病灶周围神经元 GAP-43 mRNA 合成显著增加,同时伴有轴突再生及侧支出芽,表明脑受损区域有反应性神经网络重建^[9]。本研究也发现脑缺血再灌注大鼠脑梗死灶周边区 GAP-43 mRNA 表达显著强于正常组及假手术组 (均 $P < 0.05$),与相关文献报道结果基本一致^[10];并且脑缺血再灌注大鼠经 FNS 治疗后,其脑梗死灶周边区 GAP-43 mRNA 表达较模型组进一步升高 ($P < 0.05$),并于制模后 7 d 时达到峰值,由此推测 FNS 治疗有助于脑缺血灶周围神经细胞合成 GAP-43,进而促进受损组织神经轴突再生及修复,从而改善机体学习记忆功能。除上述机制以外, FNS 促进脑梗死后认知功能恢复的机制还可能包括: FNS 干预能促使大脑皮质局部脑血流量 (regional cerebral blood flow, rCBF) 增加,脑水肿程度减轻,缩小脑梗死体积^[11]; FNS 干预能下调脑缺血半暗带区半胱氨酸蛋白酶-3 (caspase 3) 表达,上调 B-细胞淋巴瘤/白血病-2 (B cell lymphoma/leukemia-2, Bcl-2) 表达,减少钙超载,从而抑制缺血半

表 1 制模后不同时间点各组大鼠 Morris 水迷宫逃避潜伏期及 GAP-43 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	逃避潜伏期 (s)			GAP-43 mRNA		
		制模后 1 d	制模后 3 d	制模后 7 d	制模后 1 d	制模后 3 d	制模后 7 d
正常组	15	13.98 $\pm$ 0.40	14.02 $\pm$ 0.37	13.89 $\pm$ 0.42	0.51 $\pm$ 0.12	0.47 $\pm$ 0.09	0.57 $\pm$ 0.11
假手术组	15	14.18 $\pm$ 0.82	13.79 $\pm$ 0.60	14.14 $\pm$ 0.74	0.49 $\pm$ 0.15	0.48 $\pm$ 0.10	0.54 $\pm$ 0.13
模型组	15	35.02 $\pm$ 0.60 ^a	34.25 $\pm$ 0.66 ^a	33.96 $\pm$ 0.72 ^a	1.05 $\pm$ 0.28 ^a	1.21 $\pm$ 0.32 ^a	1.56 $\pm$ 0.55 ^a
FNS 组	15	25.72 $\pm$ 0.42 ^{ab}	24.27 $\pm$ 0.55 ^{ab}	23.82 $\pm$ 0.63 ^{ab}	1.54 $\pm$ 0.34 ^{ab}	2.03 $\pm$ 0.56 ^{ab}	2.78 $\pm$ 0.81 ^{ab}

注:与正常组及假手术组相同时间点比较, ^a $P < 0.05$;与模型组相同时间点比较, ^b $P < 0.05$

暗带区神经元凋亡^[12]; FNS 干预能抑制脑梗死后局部炎症反应, 增强 IkB- α 表达, 抑制核转录因子 NF- κ B (nuclear transcription factor- κ B, NF- κ B) 活性, 促使其下游炎症因子[如诱导型 NO 合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)、细胞间黏附分子-1 (intercellular cell adhesion molecule-1, ICAM-1) 等]在脑微血管内皮细胞中表达减少^[13]; FNS 干预还能促进保护性蛋白合成, 如进一步上调热休克蛋白(heat shock protein, HSP) 70 表达等^[14]。

综上所述, 本研究结果表明, FNS 干预能促进脑梗死大鼠认知功能提高, 其治疗机制可能与促进缺血灶周围神经细胞合成 GAP-43, 进而加速受损组织神经轴突再生及修复有关; 关于 FNS 干预是通过何种途径促进脑梗死周边细胞合成 GAP-43 目前尚未明确, 还有待后续进一步深入探讨。

参 考 文 献

- [1] Reis DJ, Berger SB, Underwood MD, et al. Electrical stimulation of cerebellar fastigial nucleus reduces ischemic infarction elicited by middle cerebral artery occlusion in rat[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 1991, 11(5): 810-818.
- [2] Glickstein SB, Ilch CP, Reis DJ, et al. Stimulation of the subthalamic vasodilator area and fastigial nucleus independently protects the brain against focal ischemia[J]. Brain Res, 2001, 912(1): 47-59.
- [3] 廖维靖, 刘淑红, 范明, 等. 线栓阻断大鼠大脑中动脉制作缺血性脑损伤模型的改良[J]. 中华物理医学与康复杂志, 2002, 24(6): 345-348.
- [4] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91.
- [5] Nakai M, Iadecola C, Ruggiero DA, et al. Electrical stimulation of cerebellar fastigial nucleus increases cerebral cortical blood flow without change in local metabolism: evidence for an intrinsic system in brain for primary vasodilation[J]. Brain Res, 1983, 260(1): 40-45.
- [6] 诸葛启钊. 大鼠立体定位图谱[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 35-36.
- [7] Wang J, Dong WW, Zhang WH, et al. Electrical stimulation of cerebellar fastigial nucleus: mechanism of neuroprotection and prospects for clinical application against cerebral ischemia[J]. CNS Neurosci Ther, 2014, 20(8): 710-716.
- [8] Smith SE, Figley SA, Schreyer DJ, et al. Protein-energy malnutrition developing after global brain ischemia induces an atypical acute-phase response and hinders expression of GAP-43[J]. PLoS One, 2014, 9(9): e107570.
- [9] Gajda M, Litwin JA, Tabarowski Z, et al. Development of rat tibia innervation: colocalization of autonomic nerve fiber markers with growth-associated protein 43[J]. Cells Tissues Organs, 2010, 191(6): 489-499.
- [10] Gravel M, Weng YC, Kriz J. Model system for live imaging of neuronal responses to injury and repair[J]. Mol Imaging, 2011, 10(6): 434-445.
- [11] Galea E, Glickstein SB, Feinstein DL, et al. Stimulation of cerebellar fastigial nucleus inhibits interleukin-1 β -induced cerebrovascular inflammation[J]. Am J Physiol, 1998, 275(6): 2053-2063.
- [12] 杨乙, 竞丽, 秦超, 等. 电刺激小脑顶核诱导脑缺血再灌注大鼠端粒酶逆转录酶的表达及其对线粒体凋亡途径的影响[J]. 中华医学杂志, 2011, 91(23): 1643-1648.
- [13] Zhou P, Qian L, Glickstein SB, et al. Electrical stimulation of cerebellar fastigial nucleus protects rat brain, in vitro, from staurosporine-induced apoptosis[J]. J Neurochem, 2001, 79(2): 328-338.
- [14] 邓志宽, 董为伟. 电刺激小脑顶核后感觉皮质及基底节 HSP70 表达变化的研究[J]. 中国神经科学杂志, 2002, 18(2): 499-502, 513.

(修回日期: 2014-12-25)

(本文编辑: 易 浩)

· 外刊撷英 ·

Osteoporotic compression fractures treated with a rigid brace, soft brace or no brace

BACKGROUND AND OBJECTIVE Benign osteoporotic compression fractures without neurologic deficits are inherently stable fractures, most often treated nonoperatively. As treatment often includes wearing an orthosis, this study compared the outcomes of patients treated with no brace, a rigid brace or a soft brace.

METHODS Sixty patients, with an average age of 72.25 years and with an acute, one-level, osteoporotic compression fracture, were randomized to receive a soft brace, a rigid brace or no brace. The patients were instructed to wear the brace at all times except when lying down, for a total of eight weeks. The primary outcome measure was the Oswestry Disability Index (ODI) score at 12 weeks after fracture.

RESULTS At 12 weeks after fracture, ODI scores were 35.95 points in the no brace group, 37.83 points in the soft brace group and 33.54 points in the rigid brace group. In addition, no significant differences were found in secondary outcomes, including visual analogue scale scores for back pain and body compression ratios. No significant differences were noted among the three groups in use of opioids at 12 weeks.

CONCLUSION This prospective, randomized study of patients with osteoporotic compression fractures found no difference in pain or disability scores at 12 weeks between those treated with no brace and those treated with either a soft or rigid brace.

【摘自: Kim HJ, Yi JM, Cho HG, et al. Comparative study of the treatment outcomes of osteoporotic compression fractures without neurologic injury using a rigid brace, a soft brace and no brace. J Bone Joint Surg (Am), 2014, 96(23): 1959-1966.】