

· 基础研究 ·

针刺结合运动训练对脑梗死大鼠学习记忆功能和患侧海马 CA3 区微管相关蛋白-2 表达的影响

姜伟 杨敏 毕研贞 胡可慧 余茜

【摘要】目的 探讨针刺结合运动训练对脑梗死大鼠患侧海马 CA3 区微管相关蛋白-2 (MAP-2) 表达的影响及其促进学习记忆功能恢复的可能机制。**方法** 将 80 只 Wistar 大鼠分为假手术组 (8 只) 和手术组 (72 只), 后者制成右侧大脑中动脉闭塞 (MCAO) 模型后再分为模型组、运动训练组、针刺运动训练组, 每组 24 只, 于术后第 1, 3, 5 周用免疫组化方法检测患侧海马 CA3 区 MAP-2 的表达, 同时在术后第 5 周时进行学习记忆能力测评。**结果** 假手术组 MAP-2 阳性纤维排列整齐, 分布密集。梗死后患侧海马 CA3 区阳性神经元及树突纤维减少。术后 1 周针刺运动训练组 MAP-2 阳性纤维稍有增多, 与模型组、运动训练组比较差异均有统计学意义 ($P < 0.01$); 在术后第 3 周、5 周时 MAP-2 阳性表达明显增多, 光密度值高于运动训练组 ($P < 0.05$) 和模型组 ($P < 0.01$)。术后第 5 周针刺运动训练组在 Y 迷宫分辨学习测试中记忆力明显优于模型组 ($P < 0.01$) 和运动训练组 ($P < 0.05$)。**结论** 针刺配合运动训练可明显促进脑梗死后患侧海马 CA3 区树突结构可塑性变化, 且 MAP-2 表达增加与学习记忆功能恢复成正相关。

【关键词】 脑梗死; 学习记忆; 针刺; 运动训练; 微管相关蛋白-2; 海马

Effects of acupuncture in combination with exercise on learning, memory and the expression of microtubule-associated protein-2 in the hippocampal CA3 region after experimental focal cerebral infarction in rats

JIANG Wei*, YANG Min, BI Yan-zhen, HU Ke-hui, YU Qian. * Department of Rehabilitation, Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000, China

Corresponding author: YU Qian, Email: yqspq@sohu.com

【Abstract】Objective To study the expression of microtubule-associated protein-2 (MAP-2) in the CA3 region of the hippocampus and any effect of acupuncture combined with exercise training on the recovery of learning and memory after experimental cerebral infarction. **Methods** Eighty Wistar rats were randomly divided into a sham-operation group ($n=8$) and an operation group ($n=72$) subdivided randomly and equally into a model group, an exercise training group and an acupuncture plus exercise training group, with 24 rats in each group. After right middle cerebral artery occlusion or a mock operation, the expression of MAP-2 in the CA3 region of the hippocampus was detected with immunohistochemistry 1, 3 and 5 weeks after the operation. Learning and memory function was assessed at the 5th week post operation. **Results** MAP-2-positive fibers were arranged in an orderly way and distributed densely in the sham-operation group. After cerebral infarction, number of MAP-2 positive neurons and dendrite fibers decreased in the CA3 region of the affected side. A week after the operation, MAP-2 positive fibers had increased significantly in the acupuncture plus exercise group compared with the model group and the exercise group. At the 3rd and 5th week post operation, expression of MAP-2 and optical density had increased significantly compared with the model group and the exercise training group. At the 5th week post operation, Y maze discrimination and learning tests showed that learning and memory had improved significantly more in the acupuncture plus exercise training group compared with the model group and the exercise training group. **Conclusions** Exercise training combined with acupuncture can promote changes in dendritic plasticity and increase MAP-2 expression in the CA3 region after cerebral infarction. This may be correlated positively with the recovery of learning and memory after cerebral infarction, at least in rats.

【Key words】 Cerebral infarction; Learning; Memory; Acupuncture; Exercise training; Microtubule-associated protein-2; Hippocampus

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2011.07.002

作者单位: 646000 泸州, 泸州医学院附属医院康复医学科 (姜伟、杨敏、毕研贞、胡可慧); 四川省人民医院康复医学科 (余茜)

通信作者: 余茜, Email: yqspq@sohu.com

学习记忆功能障碍是脑梗死患者最为常见和持久的合并症,极大地影响患者的日常生活活动能力和生活质量,给家庭和社会带来沉重的负担,因此促进其学习记忆功能改善的治疗成为脑梗死治疗的重点和难点。本研究采用大鼠大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型,应用免疫组织化学技术观察微管相关蛋白-2(microtubule-associated protein-2, MAP-2)的表达变化,并与学习记忆功能进行相关分析,初步探讨针刺结合运动训练对脑梗死学习记忆功能的影响。

材料与方法

一、实验动物及分组

选取健康雄性 Wistar 大鼠 80 只,分为假手术组 8 只和手术组 72 只。手术组制成右侧 MCAO 模型,模型成功评定后再平均分为模型组、运动训练组、针刺运动训练组,每组 24 只。模型组大鼠术后另置普通笼中饲养,不予任何治疗;运动训练组于术后第 5 天开始给予滚筒式网状训练、平衡训练、转棒训练、网屏训练,以训练大鼠的平衡、抓握力、旋转、行走等;针刺运动训练组大鼠除运动训练外(同运动训练组),于模型成功评价后即进行头穴针刺治疗。每组各分为手术后 1, 3, 5 周 3 个时段进行观察,每时段 8 只。

二、动物模型制作

参照小泉线栓法^[1]制成右侧 MCAO 模型。造模成功标准:大鼠苏醒后提尾时左侧肢体内收屈曲;右侧霍纳征(+);爬行时向左转圈;站立时向左倾倒。凡具有以上 4 项体征者纳入研究对象。若大鼠死亡及时补充,保证每组大鼠数量。

三、头穴针刺

根据华兴邦^[2]研制的“大鼠穴位图谱”,取头部百会、曲鬓和前顶穴,用透刺法针刺百会透曲鬓、百会透前顶。进针后快速捻转 1 min 后,留针 30 min,每天治疗 1 次,每周治疗 6 d。

四、运动训练

运用自制运动训练仪进行网状滚筒训练、平衡训练、网屏训练和转棒训练。以上训练每天 1 次,每次 40 min,每周训练 6 d。

五、学习记忆的行为学评价方法

使用 Y-型迷宫每天训练 30 min,连续训练 10 次后大鼠休息 2 min。记录大鼠学会(连续 10 次训练中有 9 次跑到暗臂即学会)所需的训练次数,术后 5 周时学会所需的训练次数越少表明大鼠学习能力越强,以此作为判断大鼠学习记忆能力的指标。

六、标本制备及免疫组化

假手术组 8 只大鼠在手术后 1 周评定完后取材。其余各组在手术后各时点进行评分后分别取材,4% 多

聚甲醛快速灌注,断头取脑,将脑组织置于 4% 多聚甲醛溶液中固定过夜,移入梯度酒精固定,常规脱水、透明、浸蜡、包埋、自视交叉向后行连续冠状切片(片厚 4~6 μm),采用光学显微镜观察大鼠大脑的层次结构(HE 染色),确定海马 CA3 区在脑片中的位置。观察患侧海马 CA3 区 MAP-2 阳性产物免疫组化染色及表达情况。用于免疫组化的特异性抗人抗体以及相应工作液,购自武汉博士德生物工程有限公司。

七、MAP-2 图像

从每组大鼠的免疫组化染色切片中,每张随机测定 5 个视野,应用 Image Pro-plus 6.0 医学图像分析软件测定海马 CA3 区阳性反应物的光密度(OD),并同时测定同一张切片上胼胝体的光密度值(ODB),计算出矫正的光密度值 COD,以避免染色过程中非特异性染色所造成的误差。所有 OD 值测量都是在相同的光学、光源条件下完成。

八、统计学分析

用 SPSS 13.0 版统计学软件包进行统计分析,数据用($\bar{x} \pm s$)表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。对大鼠术后 5 周时学习记忆能力测评结果采用 t 检验进行两两比较。对免疫组化 MAP-2 阳性纤维图像分析仪的统计结果采用单因素方差分析做均数间的两两比较,并与学习记忆能力进行相关分析,求 r 值。

结 果

一、学习记忆能力测评

模型组、运动训练组和针刺运动训练组各 8 只大鼠在手术后 5 周采用 Y-型迷宫进行学习记忆能力测评,结果显示针刺运动训练组 Y-型迷宫学习记忆能力优于运动训练组($P < 0.05$),明显优于模型组($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 模型组、运动训练组和针刺运动训练组术后 5 周时学习记忆能力评分比较(分, $\bar{x} \pm s$)

组 别	只数	Y-迷宫学习记忆能力
模型组	8	100.50 $\pm$ 14.02
运动训练组	8	75.63 $\pm$ 11.93 ^a
针刺运动训练组	8	60.00 $\pm$ 10.45 ^{bc}

注:与模型组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$;与运动训练组比较,^c $P < 0.05$

二、MAP-2 染色结果及阳性产物图像分析仪统计分析结果

在光学显微镜下 MAP-2 免疫组化染色显示:假手术组 MAP-2 阳性纤维排列整齐,分布密集。梗死后梗死灶中心区无 MAP-2 阳性染色,边缘区仅见少量阳性短树突纤维。患侧海马 CA3 区阳性神经元及树突纤维减少,光密度值于术后 1 周最低,后逐渐增高,至术后 5

周时仍低于假手术组。术后 1 周模型组、运动训练组 MAP-2 阳性纤维明显减少,针刺运动训练组 MAP-2 阳性纤维稍有增多,与模型组、运动训练组比较差异有统计学意义($P < 0.01$);在术后 3 周、术后 5 周时 MAP-2 阳性表达较模型组明显增多,与运动训练组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),与模型组比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。详见表 2,图 1~4。术后 5 周时 MAP-2 与学习记忆能力进行相关分析, $r = 0.315$,见图 5。

表 2 各组 MAP-2 阳性纤维表达 COD 值比较($\%, \bar{x} \pm s$)

组 别	术后 1 周	术后 3 周	术后 5 周
假手术组	0.465 ± 0.045	无	无
模型组	0.313 ± 0.078	0.322 ± 0.064	0.340 ± 0.055
运动训练组	0.314 ± 0.058	0.377 ± 0.023 ^b	0.415 ± 0.056 ^b
针刺运动训练组	0.412 ± 0.047 ^a	0.443 ± 0.047 ^{ac}	0.453 ± 0.049 ^{ac}

注:与模型组比较,^a $P < 0.01$,^b $P < 0.05$;与运动训练组比较,^a $P < 0.01$,^c $P < 0.05$

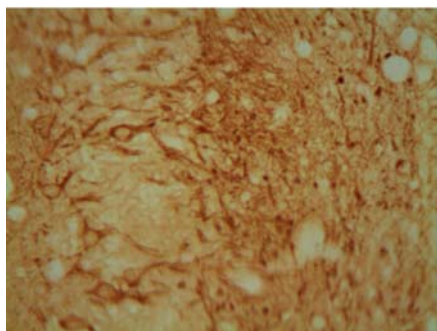


图 1 假手术组 MAP-2 阳性纤维(免疫组化染色, ×400)

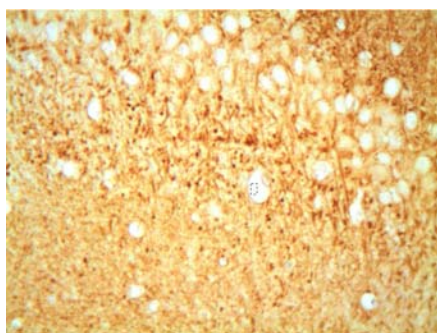


图 2 模型组 MAP-2 阳性纤维(免疫组化染色, ×400)

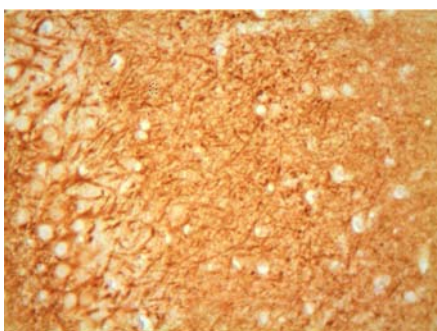


图 3 运动训练组 MAP-2 阳性纤维(免疫组化染色, ×400)

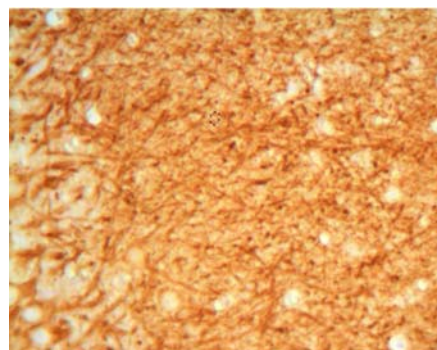


图 4 针刺运动训练组 MAP-2 阳性纤维(免疫组化染色, ×400)

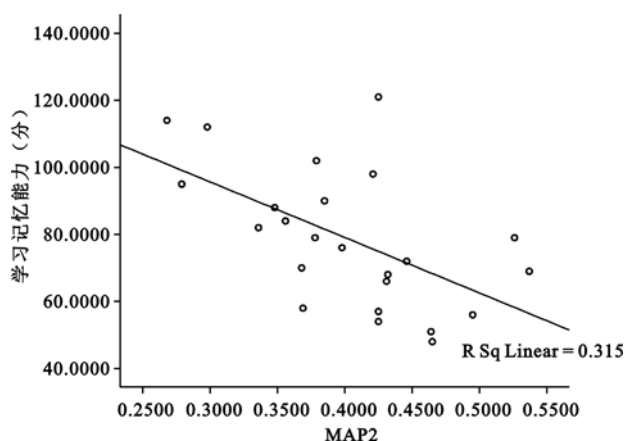


图 5 术后 5 周时 MAP-2 与学习记忆相关性散点图

讨 论

针刺疗法与现代康复治疗技术有极强的互补性,在脑血管疾病的治疗中有降低致残率、缩短病程、提高生命质量的积极作用^[3]。目前有关针刺和运动训练促进脑学习记忆功能恢复的作用机制可能是通过多种途径的复合机制而发挥作用的。针刺可通过增加脑血流量^[4]、减轻脑缺血再灌注的炎症反应^[5]及抑制神经细胞凋亡等^[6]而促进认知功能的恢复,从而提高患者的生活质量。实验研究证明,运动训练可通过改变脑梗死大鼠皮质、海马突触结构参数^[7-9]和增加 NF200 蛋白阳性表达^[10],改变海马 N-甲基-D-门冬氨酸受体通道开放电导水平、开放时间和开放概率,增强突触传递功能^[11],促进突触传递长时程增强形成速度明显增加^[12],电生理表现为认知电位 P300 波幅增高,潜伏期缩短^[13],为机体学习记忆功能的改善提供了基础。

在正常脑组织中,MAP-2 主要存在于神经元树突和胞体,是细胞骨架中微管的重要组成成分^[14],因其调节微管的聚合作用和微管的稳定性,对神经元轴突和树突的发生、延长、稳定和突触可塑性调节具有重要作用,其表达缺少或缺如可能限制神经元的某些功能^[15],而反应性增多则可能代表着树突分叉和树突棘的增加^[16]。有实验发现,敲除了与 PKA 结合区域的

MAP-2 基因,造成 MAP-2 磷酸化功能的下降,形态学上发现海马区神经元的损伤,行为测验则显示皮质记忆的缺失^[17],因此 MAP-2 在认知功能方面起着重要的作用。

有研究显示,在局灶性脑缺血损伤后,损伤灶周围脑组织在损伤后数小时和数天,MAP-2 表达反映的是细胞骨架的降解程度,而在数周后则反映了树突重建的程度^[18]。本实验中各组患侧海马 CA3 区阳性神经元及树突纤维减少,光密度值于术后 1 周最低,后逐渐增高,至术后 5 周时仍低于假手术组。说明脑缺血损伤后存在自我修复的神经可塑性,而且自我修复的能力有限。运动训练组在脑梗死后第 1,3,5 周各时间点海马 CA3 区 MAP-2 阳性细胞数量均高于模型组,并且学习记忆能力较之明显改善。说明运动训练可以提高神经元树突的可塑性改变,其机制可能与通过运动训练增高缺血损伤局部的神经生长因子水平^[19],从而促进内源性神经干细胞增殖;同时改变海马 NMDA 受体通道特性,使兴奋性谷氨酸通过 NMDA 受体而使细胞去极化,引起细胞内与增殖有关的基因转录和蛋白表达增强,最终导致细胞增殖水平上调有关^[11]。本实验术后 1 周,针刺运动训练组 MAP-2 阳性纤维稍有增多,与运动训练组比较差异有统计学意义。由于本实验中对脑缺血大鼠采取造模评定成功后给予针刺治疗,而运动训练时间为手术后 5 d,表明早期针刺可以促进神经元树突发生明显的可塑性改变,其机制可能与针刺改善缺血后脑循环灌注、改善微血管机能、减轻兴奋性神经毒性作用及诱导神经生长因子和脑源性神经营养因子的生长相关。术后 3 周、5 周时针刺运动训练组 MAP-2 阳性表达与单纯运动训练组比较差异有统计学意义,表明单纯运动训练与针刺结合运动训练均能明显促进神经元树突发芽和再生,进一步促进新的突触形成,而后者作用更明显。本实验中 MAP-2 蛋白表达增加与学习记忆功能的恢复成正相关,表明针刺结合运动训练能明显促进脑缺血大鼠学习记忆能力的改善,可能与其促进神经元树突的再生和发芽机制有关。

本实验结果表明,MCAO 大鼠患侧海马 CA3 区存在明显的树突可塑性变化,它可能是学习记忆功能恢复的物质基础。针刺结合运动训练能促进脑缺血大鼠患侧海马 CA3 区 MAP-2 阳性表达增加,使细胞骨架结构发生变化,神经元发生出芽和形成新的突触联系,导致突触结构的可塑性变化,促进神经元信息网络联络网的重建,从而促进学习记忆能力康复。

参 考 文 献

[1] 孟宜良.线栓法大鼠大脑中动脉局灶性脑缺血模型研究现状.国

- 外医学;神经病学.神经外科学分册,2002,29:113-115.
- [2] 华兴邦.大鼠穴位图谱的研制.实验动物与动物实验,1991;1:5.
- [3] 郭泽新,汪润生.治疗中风偏瘫需要针灸与康复医学的结合.中国针灸,2002,22:268-270.
- [4] 韩肖华,黄晓琳,郭铁成,等.电针对脑缺血大鼠碱性成纤维细胞生长因子和血管生成素及其受体表达的影响.中国康复医学杂志,2006,28:581-583.
- [5] 毛庆菊,李厚秀,孔立红.电针对脑缺血再灌注大鼠脑微血管内皮细胞间黏附分子-1 和 P-选择素表达的影响.中华物理医学与康复杂志,2007,29:734-737.
- [6] 沈梅红,李忠仁,项晓人,等.电针对 MCAO 大鼠 ERK 蛋白表达的影响.针刺研究,2007,32:368-372.
- [7] 余茜,李晓红,吴士明.运动训练后脑缺血大鼠学习记忆与健侧脑内突触结构变化的关系.中华物理医学与康复杂志,2002,24:399-402.
- [8] McPhail LT, Oschipok LW, Liu J, et al. Both positive and negative factors regulate gene expression following chronic facial nerve resection. Exp Neurol,2005,195:199-207.
- [9] Yang Min, Chen Jiyun. Effects of movement training on synaptic interface structure in the sensorimotor cortex and hippocampal CA3 area of the ischemic hemisphere in cerebral infarction rats. Neural Regen Res, 2008,3:1078-1082.
- [10] 杨敏,余茜,何成松,等.运动训练对脑梗死大鼠行为学及 NF200 表达变化的影响.中国康复医学杂志,2006,21:980-984.
- [11] 余茜,李晓红,刘曦,等.康复训练对脑梗死大鼠学习记忆与健侧海马神经元 NMDA 受体通道的影响.中华物理医学与康复杂志,2002,24:683-686.
- [12] 余茜,李晓红,吴士明,等.运动康复对脑梗死大鼠学习记忆能力和 LTP 的影响.中华物理医学与康复杂志,2002,24:140-143.
- [13] 余茜,李晓红,覃波等.运动再学习对缺血性卒中患者运动功能及其认知电位 P300 的影响.中国卒中杂志,2009,10:824-827.
- [14] Derksen MJ, Ward NL, Hartle KD, et al. MAP2 and synaptophysin protein expression following motor learning suggests dynamic regulation and distinct alterations coinciding with synaptogenesis. Neurobiol Learn Mem,2007,87:404-415.
- [15] Jalava NS, Lopez-Picon FR, Kukko-Lukjanov TK, et al. Changes in microtubule-associated protein-2 (MAP2) expression during development and after status epilepticus in the immature rat hippocampus. Int J Dev Neurosci,2007,25:121-131.
- [16] Zhao J, Ma Y, Qi J. Expression of cytoskeleton and apoptosis related genes after cerebral infarction. Neural Res,2006,28:71-75.
- [17] Khuchua Z, Wozniak DK, Bardgett ME, et al. Deletion of the N-terminus of murine MAP2 by gene targeting disrupts hippocampal CA1 neuron architecture and alters contextual memory. Neuroscience, 2003, 119:101-111
- [18] Briones TL, Woods J, Wadowska M, et al. Amelioration of cognitive impairment and changes in microtubule-associated protein 2 after transient global cerebral ischemia are influenced by complex environment experience. Behav Brain Res, 2006,168:261-271.
- [19] 唐强,秦颖,倪金霞,等.脑梗死大鼠康复训练后脑功能恢复及免疫组织学改变.中国康复理论与实践,2003,9:136-138.

(修回日期:2011-03-27)

(本文编辑:松 明)