

·针灸推拿·

本文引用:张博,叶阳,刘学伟,张雨薇,黄树明.电针改善去势雌性大鼠记忆障碍的机制研究[J].湖南中医药大学学报,2017,37(6):670-673.

电针改善去势雌性大鼠记忆障碍的机制研究

张博¹,叶阳¹,刘学伟²,张雨薇³,黄树明^{1*}

(1.黑龙江中医药大学中医药研究院,黑龙江 哈尔滨 150040;2.齐齐哈尔医学院,黑龙江 齐齐哈尔 161006;3.黑龙江中医药大学,黑龙江 哈尔滨 150040)

〔摘要〕目的 观察电针对去势雌性大鼠记忆、脑内脑源性神经营养因子(BDNF)及其受体酪氨酸激酶受体B(TrkB)表达的影响。方法 将SD大鼠36只随机分为假手术组,模型组和电针组,每组12只。假手术组大鼠仅切开皮肤,其余各组大鼠给予卵巢摘除,15 d后,电针组给予电针刺激,隔日1次,持续45 d。Morris水迷宫测试各组大鼠学习记忆能力,免疫组化法检测各组大鼠海马CA1区BDNF和TrkB蛋白的表达。结果 水迷宫结果显示,与假手术组比较,模型组大鼠的逃避潜伏期明显延长($P<0.05$),穿越平台次数明显减少($P<0.01$)。与模型组比较,电针组大鼠的逃避潜伏期明显缩短($P<0.05$),穿越平台次数明显增加($P<0.01$)。免疫组化结果显示,与假手术组相比,模型组大鼠海马CA1区BDNF表达明显减少($P<0.01$)。与模型组相比,电针组大鼠海马CA1区BDNF表达明显增加($P<0.01$)。但各组TrkB表达无显著差异($P>0.05$)。结论 电针改善去势雌性大鼠记忆障碍的机制可能与增加海马CA1区BDNF的表达有关。

〔关键词〕电针;去势大鼠;记忆障碍;脑源性神经营养因子

〔中图分类号〕R245.9*7

〔文献标识码〕A

〔文章编号〕doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2017.06.025

Electroacupuncture Improves Memory Dysfunction in Ovariectomized Rats

ZHANG Bo¹, YE Yang¹, LIU Xuewei², ZHANG Yuwei³, HUANG Shuming^{1*}

(1. Institute of Traditional Chinese Medicine, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin, Heilongjiang 150040, China; 2. Qiqihar Medical University, Qiqihar, Heilongjiang 161006; 3. Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin, Heilongjiang 150040, China)

〔Abstract〕 Objective To observe the effects of electroacupuncture on memory and the expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and its receptor tropomyosin receptor kinase B (TrkB) in ovariectomized rats hippocampus. **Methods** The 36 SD rats were randomly divided into sham-operation group, model group and EA group, 12 rats in each group. Rats in sham-operation group were incised skin, while other two groups rats were ovariectomized. 15 days after ovariectomy, EA group were treated with electroacupuncture every other day for 45 days. Then memory function was evaluated by Morris water maze test and expression of BDNF and TrkB in hippocampal CA1 area were determined by immunohistochemical staining. **Results** The results showed that the escape latency prolonged significantly in model group ($P<0.05$) and times of passing through the platform decreased significantly ($P<0.01$), compared with that of sham group. And both of escape latency and times of passing through the platform were reversed in EA group, compared with that of model group. The immunohistochemical staining showed that expression of BDNF in hippocampal CA1 declined significantly in model group ($P<0.01$), compared with that of sham group, while this expression in EA group was increased significantly versus model group ($P<0.01$). However, expression of TrkB in each group didn't show any significance ($P>0.05$). **Conclusion** Electroacupuncture could improve memory dysfunction induced by ovariectomy partly due to the increase of expression of BDNF in hippocampal CA1.

〔Keywords〕 electroacupuncture; ovariectomized rats; memory dysfunction; brain-derived neurotrophic factor

〔收稿日期〕2017-01-22

〔基金项目〕国家自然科学基金青年科学基金项目(81603321);黑龙江省博士后资助项目(LBH-Z13200);黑龙江省自然科学基金(H2016072);黑龙江中医药大学科研基金项目(2015bs04)。

〔作者简介〕张博,女,中医学博士后,助理研究员,研究方向:中医药防治老年性痴呆。

〔通讯作者〕*黄树明,男,教授,博士研究生导师,E-mail:hljzyzb@sina.cn。

雌激素对年老女性的认知功能具有良好的保护作用^[1],绝经后女性随着雌激素水平的改变可能出现轻度认知障碍^[2]。研究显示针刺可改善低水平雌激素动物模型的记忆能力^[3],而脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)是维持记忆的重要神经营养因子,通过与其受体酪氨酸激酶受体 B (tropomyosin receptor kinase B, TrkB) 结合而影响下游的信号转导进而发挥生物学效应。为探讨针刺改善卵巢摘除动物记忆障碍的作用机制,本实验通过 Morris 水迷宫测试去势雌性大鼠的学习记忆能力,采用免疫组化方法检测大鼠海马 CA1 区 BDNF 及其受体 TrkB 的表达情况,以期为明确针刺改善低雌激素水平动物记忆障碍的机制和后续的临床研究提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物及分组 3月龄 SD 大鼠,体质量 190~220 g, 36 只,购自黑龙江中医药大学(许可证号:SCXK(黑)2008-004)。随机分为 3 组,假手术组、模型组和电针组,每组 12 只。所有动物实验均按照科技部发布的《实验动物福利伦理指南》执行,且经黑龙江中医药大学动物实验伦理委员会批准。

1.1.2 试剂 BDNF 一抗(博士德,BA0565-1), TrkB 一抗(博士德,BA0623),SABC 免疫组化试剂盒(博士德,SA1022)。

1.1.3 实验仪器 Morris 水迷宫(安徽淮北正华生物仪器设备有限公司);KD-TS3D1 型生物组织自动脱水机(浙江省金华市科迪仪器设备有限公司);TB-718 型生物组织自动包埋机,R138 型轮转式切片机,TK-212 型自动恒温漂片仪,TK-213 型自动恒温烘片仪(湖北泰维医疗科技有限公司);E-CLIPSE 50i 显微镜(日本 Nikon 公司)。

1.2 方法

1.2.1 模型制备 给予各组大鼠 10%水合氯醛腹腔注射麻醉(0.4 mL/100 g),模型组和电针组大鼠行双侧卵巢切除术,对照组仅切开皮肤,术后予以青霉素 8 万 U 肌肉注射 3 d。

1.2.2 取穴及治疗 电针组卵巢切除 15 d 后进行电针治疗,选取“百会”、“肾俞”、“后三里”穴^[4]。“百会”在顶骨正中;“肾俞”在第 2 腰椎下两旁;“后三

里”在膝关节后外侧,在腓骨小头下约 5 mm 处。在不麻醉状态下,用半寸针刺入穴位,将肾俞和对侧后三里穴连接电针仪,百会和湿纱布上的电极(浸生理盐水的)接正负极。两侧穴位交替进行电针刺激,百会穴每次都给予刺激,采用疏密波,强度为 4~5 mA,以引起大鼠后肢轻颤为宜,在上午 9~10 点进行电针刺激,每次 30 min,隔日 1 次,持续治疗 45 d。

1.2.3 行为学测试 采用 Morris 水迷宫测试进行行为学评价。于造模前、治疗后分别进行测试。平台位于水面下 1.5 cm,水温控制在(24±2)℃。造模前对全部大鼠进行筛选,将基础智力和体力不合格者予以剔除。

(1)定位航行实验:水池等分为 4 个象限,将平台放在第一象限中间,在每个象限固定一点面向水池池壁将大鼠放入水中,试验历时 5 d,每天上午每个象限各测试 1 次,每次测试 90 s。若大鼠在 90 s 之内尚未找到平台,则将大鼠引导至平台上并使它在平台上停留 5 s,若大鼠在 90 s 之内找到平台,也让其在平台上停留 5 s,方结束一次训练,如此训练 5 d。第 5 天训练时大鼠找到水下平台的时间记为逃避潜伏期。

(2)空间探索实验:第 5 天训练结束后,将平台移走,2 h 后将每组大鼠从固定象限(第二象限)的一点放入水中,记录每只大鼠在 90 s 内穿越平台的次数。

1.2.4 免疫组化检测 行为学测试结束后,将大鼠麻醉后进行灌注固定,取脑,浸于 4%多聚甲醛中固定 24 h 后,将固定后的脑矢状切开后,经组织自动脱水机按梯度脱水透明,石蜡包埋成蜡块,切片 4 μm 厚,免疫组化 SABC 法进行检测。脱蜡、水化;3% H_2O_2 室温封闭 15 min;热修复 20 min;5% BSA 室温封闭 20 min,甩去多余液体,不洗。滴加适当稀释的兔抗 BDNF, TrkB 抗原的抗体(1:100),37℃孵育 90 min;滴加生物素化山羊抗兔 IgG,37℃孵育 30 min;滴加试剂 SABC,37℃孵育 20 min;以上各步骤间,PBS 洗 3 次,各 5 min;DAB 显色(镜下掌握显色程度),反应充分即用 PBS 终止反应;自来水冲洗;脱水、透明、封片、镜检。阴性对照用 PBS 替代一抗孵育。

将各组切片进行拍摄(×200 倍),将棕黄色颗粒

作为阳性参考,应用 Image Pro Plus 6.0 进行累积光密度(IOD)和阳性细胞面积(Area)分析,根据公式:平均光密度=IOD/Area 计算 BDNF 和 TrkB 的平均光密度。

1.2.5 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件分析,计量资料以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示。多组样本均数间差异性检验用单因素方差分析,组间两两比较用 LSD 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 电针对去势雌性大鼠记忆功能的影响

水迷宫测试过程中,各组大鼠均有死亡,最后假手术组、模型组和电针组大鼠分别剩余 10 只、9 只、9 只。结果显示,与假手术组比较,模型组大鼠的逃避潜伏期明显延长($P<0.05$),穿越平台次数明显减少($P<0.01$),表明卵巢摘除导致了大鼠的记忆功能障碍。与模型组比较,电针组大鼠的逃避潜伏期明显缩短($P<0.05$),穿越平台次数明显增加($P<0.01$),表明电针增强了卵巢摘除大鼠的记忆能力,提示电针可逆转卵巢摘除诱发的大鼠记忆功能减退,见表 1。

表 1 电针对去势雌性大鼠学习记忆能力的影响 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	逃避潜伏期(s)	穿越平台次数(次)
假手术组	10	20.52±5.45	4.20±1.03
模型组	9	30.04±14.05*	2.00±0.87**
电针组	9	17.38±7.73 [#]	4.11±1.76 ^{##}

注:与假手术组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$ 。

2.2 电针对去势雌性大鼠海马 CA1 区 BDNF 及 TrkB 表达的影响

BDNF 的阳性表达主要在细胞膜和细胞浆,见图 1。筛选未脱片染色清晰的切片进行拍摄和数据分析,每组各 8 张。免疫组化结果显示,与假手术组相比,模型组大鼠海马 CA1 区 BDNF 表达明显减少($P<0.01$)。与模型组相比,电针组大鼠海马 CA1 区 BDNF 表达明显增加($P<0.01$),提示电针改善了卵巢摘除诱发的大鼠海马 CA1 区 BDNF 表达减少,见表 2。

TrkB 的阳性表达主要在细胞膜,见图 2。与 BDNF 的表达改变有所不同,研究结果显示,各组大鼠海马 CA1 区 TrkB 的表达无明显改变,模型组与假手术组比较以及电针组与模型组比较,差异均无统计学意义($P>0.05$),见表 2。

表 2 电针对去势雌性大鼠海马 CA1 区 BDNF 及 TrkB

组别	表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=8$)	
	BDNF	TrkB
假手术组	0.21±0.02	0.11±0.01
模型组	0.16±0.01**	0.12±0.02
电针组	0.24±0.02 ^{##}	0.12±0.02

注:与假手术组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,^{##} $P<0.01$ 。

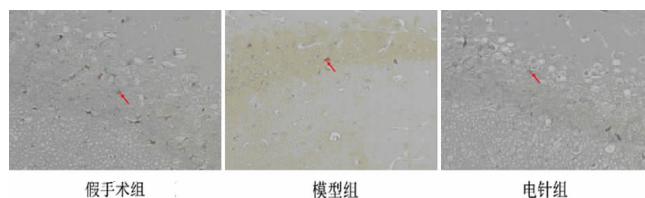


图 1 各组大鼠海马 CA1 区 BDNF 表达光镜图(红色箭室头所示为 BDNF 阳性表达,免疫组化×200)

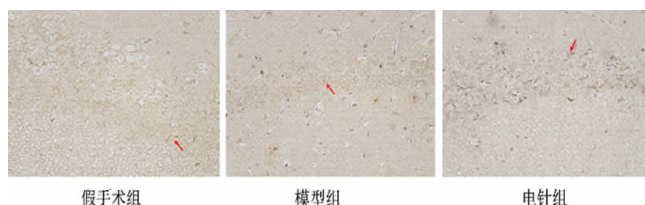


图 2 各组大鼠海马 CA1 区 TrkB 表达光镜图(红色箭头书所示为 TrkB 阳性表达,免疫组化×200)

3 讨论

近来有报道指出,去势雌性大鼠记忆能力减退^[1],这与本实验的行为学测试结果一致,证明卵巢摘除损害了雌性大鼠的记忆功能,可见雌激素具有脑保护作用^[2]。实验中所采用的卵巢切除方法复制了绝经期女性雌激素的低水平状态,这与中医学认为的年老肾虚髓空,脑失濡养相似,结合中医理论“肾通于脑”且“灵机记性不在心在脑”,在治疗上,本实验选用了以益肾健脑为主的治疗原则。肾俞是肾之背俞穴,为补肾要穴,肾为先天之本,所藏肾精的充盛需要后天之精的补充,脾胃为后天之本,气血化生之源,故取后三里穴以补脾胃,益气血,达到补肾的目的。督脉络肾,百会穴位于头顶正中,属督脉,其深部即为脑之所在,故取百会穴以开窍醒神,充盛肾气。三穴同用共奏补肾健脑之效。

临床研究证实电针可改善痴呆患者的认知功能^[3],且实验研究亦显示,电针减轻了 APP/PS1 转基因动物的认知损害^[4],此外,针刺治疗的不良反应少,可见针刺疗法改善记忆的独特优势。实验结果证实,针刺肾俞、百会、后三里穴可改善模型动物因卵巢摘除

诱发的记忆障碍。

BDNF是具有维持神经元功能,突触可塑性和神经元结构完整性的重要内源性蛋白^[8],本研究结果显示,卵巢摘除导致了大鼠脑内 BDNF 表达减少,这是因为卵巢摘除降低了体内雌激素水平,而雌激素可以促进 BDNF 的表达^[9]。有报道指出 BDNF 通过调节突触可塑性的长时程增强和胆碱能神经系统而影响学习记忆功能,因此提示本实验中卵巢摘除大鼠记忆功能减退与 BDNF 表达降低有关。近来国内学者研究发现电针百会穴可增加脑内 BDNF 的表达^[10],且磷酸化的 TrkB 蛋白表达亦增多^[11]。而本实验结果表明,电针增加了去势雌性大鼠脑内 BDNF 表达,逆转了由卵巢摘除引发的 BDNF 表达减少,说明电针肾俞、百会和后三里穴通过增加大鼠海马 CA1 区 BDNF 的表达而改善了卵巢摘除诱发的记忆损害。

然而值得一提的是,本实验未见 TrkB 受体数量明显增多,这可能与实验所检测蛋白为总的 TrkB,而经磷酸化的蛋白才具有活性有关,因此在后续的实验中,课题组需要通过蛋白免疫印迹杂交法进一步明确磷酸化 TrkB 蛋白的表达情况。BDNF 与特异性受体 TrkB 结合后,使 TrkB 发生磷酸化,激活磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶 B(phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B, PI3K/Akt)以及有丝分裂原激活蛋白激酶/细胞外调节蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase, MAPK/ERK)等信号通路,进一步发挥生物学效应^[12]。因此电针此三组穴位是否是通过激活某一信号通路达到改善卵巢摘除诱发的记忆障碍的目的,还有待实验的深入研究。

参考文献:

[1] Daniel JM. Estrogens, estrogen receptors, and female cognitive

aging: the impact of timing[J]. *Horm Behav*, 2013, 63(2): 231-237.

[2] 李文娟,许良智,刘宏伟,等.坤泰胶囊与激素替代疗法对绝经早期妇女认知功能及心理状态影响的随机对照临床研究[J].*中西医结合学报*,2010,8(4):321-327.

[3] 唐曦,唐成林,谢洪武.切除卵巢对大鼠行为学和海马神经元型一氧化氮合酶的影响及电针的干预作用[J].*生物医学工程学杂志*, 2013,30(4):833-837.

[4] 李忠仁.实验针灸学[M].2版.北京:中国中医药出版社,2007:255-257.

[5] Pike CJ, Carroll JC, Rosario ER, et al. Protective actions of sex steroid hormones in Alzheimer's disease. *Frontiers in Neuroendocrinology*[J]. *Front Neuroendocrinol*, 2009, 30(2): 239-258.

[6] 张虹,赵凌,何成奇,等.头电针治疗血管性痴呆的临床多中心随机对照研究[J].*中国针灸*,2008,28(11):783-787.

[7] Li X, Guo F, Zhang Q, et al. Electroacupuncture decreases cognitive impairment and promotes neurogenesis in the APP/PS1 transgenic mice[J]. *BMC Complement Altern Med*, 2014, 14: 37.

[8] Laske C, Stransky E, Leyhe T, et al. BDNF serum and CSF concentrations in Alzheimer's disease, normal pressure hydrocephalus and healthy controls [J]. *J Psychiatr Res*, 2007, 41(5): 387-394.

[9] 唐明山.雌激素改善大鼠记忆及促进海马 BDNF 蛋白表达上调[J].*重庆医学*,2012,41(23):2386-2388, 2391.

[10] 陈吉祥,吴羽楠,郑雅娟,等.电针百会穴对 APP/PS1 双转基因小鼠学习记忆及脑源性神经营养因子表达的影响[J].*中国康复理论与实践*,2015,21(6):642-647.

[11] Lin R, Chen J, Li X, et al. Electroacupuncture at the Baihui acupoint alleviates cognitive impairment and exerts neuroprotective effects by modulating the expression and processing of brain-derived neurotrophic factor in APP/PS1 transgenic mice [J]. *Mol Med Rep*, 2016, 13(2): 1611-1617.

[12] Chan CB, Ye K. Sex differences in brain-derived neurotrophic factor signaling and functions[J]. *J Neurosci Res*, 2017, 95(1/2): 328-335.

(本文编辑 匡静之)