

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.21.005

## 超低频经颅磁刺激对脑缺血大鼠认知功能的影响及机制\*

王莉<sup>1</sup>, 张燕<sup>1</sup>, 余巨明<sup>1</sup>, 胡厚祥<sup>2</sup>

(川北医学院附属医院:1. 神经内科;2. 心血管内科, 四川南充 637000)

**[摘要]** **目的** 研究超低频经颅磁刺激(TMS)对脑缺血大鼠认知功能的影响并探讨其机制。**方法** 将 60 只健康大鼠分为 4 组(各 15 只):A 组(假手术组),B 组(模型组),C 组(TMS 组)和 D 组(TMS+H89 组)。比较各组大鼠的逃避潜伏时间、跨越原平台次数及血管内皮生长因子(VEGF)、脑源性神经营养因子(BDNF)和巢蛋白(nestin)的表达水平。**结果** A 组大鼠逃避潜伏期为(16.31±2.33)s,跨越原平台次数为(8.02±1.76)次;B 组大鼠逃避潜伏期为(57.14±2.89)s,跨越原平台次数为(3.15±0.88)次;C 组大鼠逃避潜伏期为(29.18±1.95)s,跨越原平台次数为(5.44±0.75)次;D 组大鼠逃避潜伏期为(45.87±2.06)s,跨越原平台次数为(4.16±1.02)次。与 A 组比较,B、C、D 组大鼠的逃避潜伏期明显延长,且 B 组长于 D 组及 C 组,差异均有统计学意义( $P<0.05$ );大鼠的跨越原平台次数明显减少,且 B 组少于 D 组及 C 组,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。各组大鼠 VEGF、BDNF 和 nestin 表达水平比较,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。**结论** 低频 TMS 可以明显改善脑缺血大鼠的认知功能,其作用与环磷酸腺苷效应元件结合蛋白及其下游基因(VEGF、BDNF)的表达有关。

**[关键词]** 经颅磁刺激;脑缺血;认知功能**[中图分类号]** R743.3**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2016)21-2897-03

**Influence of ultralow-frequency transcranial magnetic stimulus on cognitive ability of rats with cerebral ischemia and its mechanism\***

Wang Li<sup>1</sup>, Zhang Yan<sup>1</sup>, Yu Juming<sup>1</sup>, Hu Houxiang<sup>2</sup>

(1. Department of Neurology; 2. Department of Cardiology, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong, Sichuan 637000, China)

**[Abstract]** **Objective** To study the influence of ultralow-frequency transcranial magnetic stimulus(TMS) on the cognitive ability of rats with cerebral ischemia and its mechanism. **Methods** 60 healthy rats were divided into 4 groups(15 cases each): A (sham-operation), B(model), C(TMS) and D(TMS+H89). The escape latency time, times of passing through platform, expression level of VEGF, BDNF and nestin protein were compared among 4 groups. **Results** In the group A, the escape latency time was (16.31±2.33)s, times passing through platform were (8.02±1.76) times; in group B, which were (57.14±2.89)s and (3.15±0.88) times; in group C, which were (29.18±1.95)s and (5.44±0.75) times; in group D, which were (45.87±2.06)s and (4.16±1.02) times. Compared with the group A, the escape latency time in the group B, C and D was significantly extended, moreover that in the group B was longer than that in the group D and C, the differences were statistically significant( $P<0.05$ ); the times of passing through platform decreased, which in the group B was less than that in the group D and C, the differences had statistical significance( $P<0.05$ ). The expression levels of VEGF, BDNF and nestin had statistical differences among various groups ( $P<0.05$ ). **Conclusion** Low-frequency TMS can significantly improve the cognitive ability of rats with cerebral ischemia, its effect is related to the expression of cAMP-response element binding protein and its following genes(VEGF and BDNF).

**[Key words]** transcranial magnetic stimulus; cerebral ischemia; cognitive ability

经颅磁刺激(transcranial magnetic stimulation, TMS)是一种利用脉冲磁场作用于中枢神经系统,从容改变皮层神经细胞的膜电位并引起一系列生理生化反应,影响脑内代谢和神经电活动,改变脑可塑性的技术<sup>[1]</sup>。研究发现,低频 TMS 可以降低皮层的兴奋性,促进精神、神经疾病(如脑梗死)的恢复<sup>[2]</sup>,但其机制尚未研究明确。蛋白激酶 A(protein kinase A, PKA)可将其磷酸化成为活化形式,即磷酸化 cAMP 反应元件结合蛋白(phosphorylated cAMP response element binding protein, pCREB),而 H89 则可阻滞这种磷酸化作用。pCREB 与靶基因启动区 DNA 序列 CRE(cAMP response element)结合,调节下游基因的转录。PKA-CREB 信号通路与突触的可塑性和学习记忆功能关系密切<sup>[3]</sup>。本研究旨在分析超低频 TMS 对脑缺血大鼠认知功能的影响并探讨其机制。

**1 材料与方法**

**1.1 实验动物** 选用 60 只健康的雄性 Wistar 大鼠作为实验动物,体质量为 200~220 g,平均(210.4±6.2)g,由川北医学院实验动物中心提供,合格证号 15-0212。将 60 只大鼠分为 4 组:A 组(假手术组)15 只,B 组(模型组)15 只,C 组(TMS 组)15 只,D 组(TMS+H89 组)15 只。

**1.2 仪器与试剂** PKA 抑制剂-H89 2HCl(美国 Selleck 公司),大鼠单抗血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF,北京中杉金桥公司),羊抗兔脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF,北京中杉金桥公司),羊抗兔巢蛋白(nestin,美国 SAB 公司),二抗(北京中杉金桥公司)。Morris 水迷宫(长沙长锦科技有限公司),图像分析系统(北京益林苑科技有限公司),Yrdecy- I 型磁刺激仪(武汉

\* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81070101)。 作者简介:王莉(1977-),副教授,硕士,主要从事神经内科疾病研究。

依瑞德公司)。

### 1.3 方法

**1.3.1 脑缺血模型的制备及给药** 参照文献[4]大鼠右侧大脑中动脉闭塞的造模模型建造方法构建大鼠脑缺血模型(B、C、D组);A组仅游离右侧颈动脉但不给予封闭和结扎,手术过程严格遵循无菌原则,所有大鼠术后均采用无菌培养。D组大鼠在头顶局部常规去皮、消毒,头顶正中矢状线切开约1cm,消毒后于前凶后0.8mm、前凶所在矢状线右侧1.5mm处钻一小孔,缓慢进针至硬膜下4.5mm,按照11.2mg/kg剂量缓慢注射H89 2HCl,全部剂量分3次完成,注射过程持续5min;C组大鼠给予等量生理盐水。术后局部涂抹青霉素粉末,缝合消毒皮肤预防感染。

**1.3.2 磁刺激** 采用自制的固定装置将C组和D组大鼠头部固定于Yrdccy-I型磁刺激仪(频率:11mHz;强度:500Gs)的磁场区接受磁刺激,其余部位固定于非磁场区。每次15min,每日1次,持续4周。A组和B组大鼠假刺激组同样放置,但不接受磁刺激。

### 1.4 观察指标

**1.4.1 大鼠 Morris 水迷宫实验** 大鼠于手术4周后进行Morris水迷宫实验,包括定向航行实验和空间搜索实验。定向航行实验:共进行5d,9个时间段游泳训练,记录其寻找到平台的时间记为逃避潜伏期,最长限制时间为120s,若120s内未找到平台,则逃避潜伏期记为120s。空间探索实验:在第5天下午记录逃避潜伏后撤去平台大鼠120s内跨越原平台次数。

**1.4.2 大鼠海马组织蛋白检测** 于手术后1、2和4周分别取5只大鼠,采用蛋白质印迹法(Western blotting)对大鼠海马组织中的VEGF、BDNF、nestin和5-溴脱氧尿苷(BrdU)蛋白水平进行检测:大鼠全部麻醉处死,断头取梗死侧海马,裂解、匀

浆后取上清液,蛋白定量后进行聚丙烯酰胺凝胶电泳、电转移和膜封闭,封闭结束后分别滴加1:400大鼠单抗VEGF、1:300兔抗BDNF、1:200兔抗Nestin和1:200的兔抗BrdU,4℃孵育过夜。加入二抗室温下于摇床孵育1h,二抗孵育后显色、曝光、显影。测量并分析上述蛋白吸光度值,并以3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)为内参计算相对吸光度值(relative absorbances, RA)。

**1.5 统计学处理** 使用SPSS16.0统计软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较运用单因素方差分析,两两比较采用LSD-*t*检验;以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 各组大鼠的认知功能比较** 各组大鼠的逃避潜伏期及跨越原平台次数比较,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表1。

表1 各组大鼠的认知功能比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	<i>n</i>	逃避潜伏期(s)	跨越原平台次数(次)
A组	15	16.31±2.33	8.02±1.76
B组	15	57.14±2.89*	3.15±0.88*
C组	15	29.18±1.95*#	5.44±0.75*#
D组	15	45.87±2.06*#	4.16±1.02**#
<i>F</i>		5.123	6.012
<i>P</i>		<0.05	<0.05

\*: $P < 0.05$ ,与A组比较;#: $P < 0.05$ ,与B组比较。

**3.2 各组大鼠脑组织 VEGF 及 BDNF 表达水平比较** 各组大鼠不同时刻脑组织 VEGF 及 BDNF 表达水平比较,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表2。

表2 不同时刻各组大鼠组织 VEGF 及 BDNF 表达水平比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	<i>n</i>	VEGF			BDNF		
		术后1周	术后2周	术后4周	术后1周	术后2周	术后4周
A组	15	0.56±0.07	0.55±0.08	0.57±0.09	0.53±0.04	0.54±0.05	0.55±0.06
B组	15	0.17±0.02*	0.19±0.04*	0.25±0.03*	0.15±0.02*	0.18±0.01*	0.22±0.03*
C组	15	0.28±0.04*#	0.35±0.05*#	0.50±0.04#	0.25±0.04*#	0.33±0.03*#	0.48±0.05#
D组	15	0.16±0.05*	0.20±0.04*	0.27±0.06*	0.16±0.03*	0.19±0.02*	0.21±0.04*
<i>F</i>		7.912	6.218	4.921	7.824	5.991	4.874
<i>P</i>		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

\*: $P < 0.05$ ,与A组比较;#: $P < 0.05$ ,与B组比较。

**3.3 各组大鼠脑组织 nestin 表达水平比较** 各组大鼠不同时刻脑组织 nestin 表达水平比较,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表3。

表3 不同时刻各组大鼠 nestin 表达水平比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	nestin		
	术后1周	术后2周	术后4周
A组	0.18±0.07	0.05±0.00	0.02±0.01
B组	0.42±0.03*	0.35±0.04*	0.31±0.03*
C组	0.85±0.06*#	0.69±0.04*#	0.61±0.05*#
D组	0.51±0.02*#	0.43±0.04*#	0.41±0.08*#
<i>F</i>	5.012	3.921	3.928
<i>P</i>	<0.05	<0.05	<0.05

\*: $P < 0.05$ ,与A组比较;#: $P < 0.05$ ,与B组比较。

## 3 讨论

研究发现,低频TMS是一种通过刺激大脑皮层电位改变而引起一系列生物活动的神经电生理技术,具有穿透力强、非侵入性和无痛感等优点[5]。本研究笔者旨在分析超低频TMS对脑缺血大鼠认知功能的影响,并探讨其机制。研究结果显示,与A组(假手术组)大鼠相比,B、C、D组大鼠的逃避潜伏期延长,跨越原平台次数减少,大鼠的认知功能下降。C组大鼠认知功能优于B组(模型组),说明超低频TMS可以改善大鼠的认知功能;尽管与B组相比D组大鼠认知功能改善,但D组大鼠的认知功能明显低于C组,说明PKA抑制剂-H89 2HCl可以在一定程度上阻断TMS对脑缺血大鼠认知功能的改善作用。

对TMS改善大鼠认知功能的机制进行探讨:VEGF是由

内皮细胞产生的有丝分裂原,可以促进内皮细胞的增殖并调控新生血管的形成。研究发现,VEGF 可以促进成年大鼠海马区局部神经的新生并改善大鼠的认知功能,抑制 VEGF 表达可以阻断局部环境诱导的神经新生<sup>[6-7]</sup>。BDNF 是中枢神经系统内广泛存在的神经营养因子,在神经元的分化、发育、维持神经元功能及修复等多发面发挥重要的作用,可以促进海马神经的再生和学习记忆功能的恢复<sup>[8]</sup>。

nestin 主要在未分化和具有分裂能力的细胞中表达,在神经系统中主要表达于神经干细胞(neural stem cells, NSCs),随着 NSCs 的分化, nestin 表达水平逐渐降低并于细胞成熟后停止。因此, nestin 表达水平可以反应细胞的增殖水平<sup>[9-10]</sup>。在手术后 1 周, B、C、D 组大鼠 nestin 水平较 A 组(假手术组)大鼠明显升高,说明大鼠存在神经干细胞的增殖,随着细胞的分化和成熟,大鼠 nestin 表达水平下降。

既往研究发现, VEGF 和 BDNF 均可以促进 NSCs 的增殖, VEGF 的主要作用为早期促进中枢神经系统的神经干细胞增殖<sup>[11]</sup>, 而 BDNF 可以同时促进神经干细胞的增殖和分化<sup>[12]</sup>。因此, VEGF 和 BDNF 在脑缺血大鼠认知功能的恢复中发挥重要作用, 均受 PKA-CREB 途径的调控<sup>[13]</sup>。GREB 作为一种核转录因子, 其活化受 PKA 的调控。GREB 磷酸化形式 pGREB 与靶基因启动区 DNA 序列结合, 从而调节下游基因的转录。PKA 抑制剂-H89 2HCl 可以通过抑制 GREB 的活化而抑制 VEGF 和 BDNF 的表达<sup>[14-15]</sup>。本次研究中, 与 C 组大鼠相比, D 组大鼠的 VEGF、BDNF 和认知功能均明显下降, 说明 TMS 可能通过调控 PKA-GREB-BDNF/VEGF 途径改善大鼠的认知功能。但研究中, 尽管 D 组大鼠的认知功能和 nestin 表达水平明显低于 C 组, 但仍高于 B 组, 说明 H89 2HCl 不能完全阻断 TMS 引起大鼠 NSCs 的增殖和分化, TMS 还可以通过其他机制促进脑缺血大鼠的认知功能恢复。具体机制有待于进一步研究。

综上所述, 低频 TMS 可以明显改善脑缺血大鼠的认知功能, 其作用与环磷腺苷效应元件结合蛋白及其下游基因(VEGF、BDNF)的表达有关。

## 参考文献

- [1] 陈秀荣, 李晓东, 张国忠. 重复经颅磁刺激在缺血性卒中患者运动功能恢复中的应用[J]. 国际脑血管病杂志, 2014, 22(6): 422-425.
- [2] 石海杉, 徐建兰, 林广勇, 等. 11 mHz 超低频经颅磁刺激对局部脑缺血再灌注大鼠海马区巢蛋白、BrdU 表达的影响[J]. 中华神经医学杂志, 2014, 13(11): 1117-1122.
- [3] 赵秀秀. PKA-CREB 信号通路在 rTMS 改善脑缺血后学

习记忆功能中的作用及机制研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2013.

- [4] 刘宗涛, 秦永生, 刘江, 等. 青老年大鼠脑缺血模型比较[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(11): 2003-2006.
- [5] 张展翅. 磁刺激对小鼠原代海马神经元突触可塑性相关蛋白和钙信号转导机制影响的研究[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2012.
- [6] 张会玲, 李世英, 李峥, 等. 缺血预适应对脑缺血再灌注大鼠皮质区血管内皮生长因子及存活素表达的影响[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2015, 17(6): 645-648.
- [7] 陈懿, 葛金文, 廖君, 等. 局灶性脑缺血大鼠 VEGF/Notch1 信号分子的表达及脑泰方的调节作用[J]. 中国老年学杂志, 2014, 34(20): 5784-5786.
- [8] 王建平, 刘聪, 杨直堂, 等. 白藜芦醇对脑缺血小鼠 BDNF 及 NT-3 表达的影响[J]. 中国药理学通报, 2012, 28(4): 531-535.
- [9] 肖莉, 石清明, 毕文杰, 等. 小鼠中脑神经干细胞体外培养方法的研究[J]. 重庆医学, 2012, 41(22): 2240-2241.
- [10] 白瑞樱, 卢娜. Hes1 mRNA 在神经干细胞向神经细胞分化过程中表达变化的研究[J]. 重庆医学, 2013, 42(33): 4048-4050.
- [11] 王玉梅, 刘永平, 曹凯, 等. 黄芩茎叶黄酮对慢性脑缺血大鼠脑内 NMDA 受体和 VEGF 表达的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2012, 28(2): 353-357.
- [12] 白蓉, 梁雪琴, 王魁花. 康复训练对脑缺血大鼠行为学及 BDNF、CaBP-D28k 表达的影响[J]. 山东医药, 2012, 52(21): 33-35.
- [13] Yildirim F, Ji SB, Kronenberg G, et al. Histone acetylation and CREB binding protein are required for neuronal resistance against ischemic injury[J]. PLoS One, 2014, 9(4): e95465.
- [14] Pastuszko P, Scheers GJ, Greeley WJ, et al. Granulocyte colony stimulating factor reduces brain injury in a cardiopulmonary bypass-circulatory arrest model of ischemia in a newborn piglet[J]. Neurochem Res, 2014, 39(11): 2085-2092.
- [15] Yasuda N, Ishii T, Oyama D, et al. Neuroprotective effect of nobiletin on cerebral ischemia-reperfusion injury in transient middle cerebral artery-occluded rats[J]. Brain Res, 2014, 1559(17): 46-54.

(收稿日期: 2016-01-25 修回日期: 2016-04-12)

(上接第 2896 页)

- of GRP78 promotes apoptosis in pancreatic acinar cells and attenuates the severity of cerulein and LPS induced pancreatic inflammation [J]. PLoS One, 2014, 9(3): e92389.
- [10] Yao Z, Zhang P, Guo H, et al. RIP1 modulates death receptor mediated apoptosis and autophagy in macrophages [J]. Mol Oncol, 2015, 9(4): 806-817.
  - [11] Humphries F, Yang S, Wang B, et al. RIP kinases: key

decision makers in cell death and innate immunity[J]. Cell Death Differ, 2015, 22(2): 225-236.

- [12] Nikseresht S, Khodaghali F, Nategh M, et al. RIP1 inhibition rescues from LPS-induced RIP3-mediated programmed cell death, distributed energy metabolism and spatial memory impairment[J]. J Mol Neurosci, 2015, 57(2): 219-230.

(收稿日期: 2016-01-26 修回日期: 2016-04-13)