

重复经颅磁刺激对脑梗死后海马 PSD-95 和 GAP-43 表达的影响及其机制研究

赵秀秀, 韩肖华, 郭风, 于利国, 向艳平, 黄晓琳

【摘要】 目的:观察高频重复经颅磁刺激(rTMS)对脑梗死大鼠缺血侧海马突触后致密物质-95(PSD-95)和生长相关蛋白-43(GAP-43)表达的影响及其可能机制。方法:SD 雄性成年大鼠 20 只,分为模型组(A 组)和 rTMS 组(B 组)各 6 只,rTMS+ NS(normal saline)组(C 组)和 rTMS+阻滞剂 H89 组(D 组)各 4 只,建立脑梗死模型,给予 7d 的 20Hz rTMS 治疗,应用 Western Blot 方法检测 A、B 组缺血侧海马 PSD-95 和 GAP-43 表达并观察超微结构,进一步研究给予 C、D 组间蛋白激酶 A-环磷酸腺苷反应元件结合蛋白(pCREB)、PSD-95 和 GAP-43 表达变化。结果:与 A 组相比,B 组 PSD-95 和 GAP-43 表达增加($P<0.01$),电镜下突触体积增大,突触前后膜电子致密区增宽,电子密度和突触囊泡数量增加。D 组 pCREB、PSD-95、GAP-43 表达较 C 组均减少($P<0.01$)。结论:rTMS 有可能通过对 PKA-CREB 信号通路调节来促进脑梗死后海马 PSD-95、GAP-43 的表达。

【关键词】 脑梗死;重复经颅磁刺激;PKA-CREB;PSD-95;GAP-43

【中图分类号】 R49;R743 **【DOI】** 10.3870/zgkf.2012.06.001

Effects and mechanism of repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) on expression of PSD-95 and GAP-43 in hippocampus of rats with cerebral infarction ZHAO Xiu-xiu, HAN Xiao-hua, GUO Feng, et al. Department of Rehabilitation Medicine, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

【Abstract】 Objective: To investigate the effects of high-frequency repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) on the expression of PSD-95 and GAP-43 and its mechanism in the ischemic hippocampus of rats with cerebral infarction. Methods: A total of 20 SD rats were divided into model control group(A), rTMS group(B), with 6 cases in every group, rTMS+NS group(C) and rTMS+H89 group(D), with 4 cases in every group. Reperfusion model with middle cerebral artery occlusion was established. rTMS of 20Hz was given to successful models for 7 days. Ultrastructures of the ischemic CA1 and expression changes of PSD-95 and GAP-43 in rats of group A and B were investigated under the transmission electron microscopy and western blot respectively. The expression of pCREB, PSD-95 and GAP-43 were detected in the group C and D. Results: As compared with group A, the PSD-95 and GAP-43 expression levels were increased in group B ($P<0.01$). Under the transmission electron microscopy, the synaptic volume was increased, the anterior and posterior electron dense areas of the synapse were widened, the electron density and synaptic vesicles quantity were increased in group B. As compared with group C, the expression levels of pCREB, PSD-95 and GAP-43 were decreased in group D ($P<0.01$). Conclusion: rTMS could promote PSD-95 and GAP-43 expression in the ischemic hippocampus after cerebral ischemia probably by regulating the PKA-CREB pathway.

【Key words】 cerebral infarction; rTMS; PKA-CREB; PSD-95; GAP-43

基金项目:教育部高等学校博士学科点专项科研基金(20090142110013),国家自然科学基金(81071601),国家自然科学基金(81171858)

收稿日期:2012-10-24

作者单位:华中科技大学同济医学院附属同济医院康复医学科,武汉 430030

作者简介:赵秀秀(1984-),女,硕士研究生,主要从事神经康复方面的研究。

通讯作者:黄晓琳,教授,博士生导师。

脑缺血引起的学习记忆功能障碍影响患者的整体康复,这与缺血后海马神经元损伤关系密切。生长相关蛋白-43(growth associated protein-43, GAP-43)是神经元发育和再生的一个内在决定因子^[1],神经系统发育和损伤再生时,GAP-43 表达升高。突触后致密区(postsynaptic density, PSD)是突触后信号转导和整合的结构基础。突触后致密物质-95(postsynaptic

density-95, PSD-95) 是 PSD 的一个主要蛋白成分, PSD-95 能够介导蛋白质间的相互作用。重复经颅磁刺激(repetitive transcranial magnetic stimulation, rTMS)是一种潜在有效的神经康复治疗方法^[2]。本研究拟观察 rTMS 对脑缺血后海马 PSD-95 和 GAP-43 表达的影响并探索其可能的机制。

1 材料与方法

1.1 材料 ①实验动物:健康成年雄性 SD 大鼠 20 只, SPF 级, 鼠龄 7~8 周, 体质量(250±20)g, 购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司[许可证号: SCXK(湘)2009-0004]。②仪器与试剂: 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), 蛋白激酶 A-环磷酸腺苷反应元件结合蛋白(protein kinase A-cyclic adenosine monophosphate response element binding protein, PKA-CREB, pCREB)抗体购自 Santa 公司, PSD-95 和 GAP-43 抗体购自 Abcam 公司。

1.2 方法 ①造模及分组: 20 只大鼠分为 4 组, 模型组(A 组)和 rTMS 组(B 组)各 6 只, rTMS+NS(normal saline)组(C 组)和 rTMS+阻滞剂 H89 组(D 组)各 4 只, A 组制作右侧大脑中动脉栓塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)缺血再灌注模型, 参照 Takano 等^[3]的方法线栓法制备模型; B 组在模型制作的基础上进行 rTMS 治疗; C、D 组在分别侧脑室注射 NS 和药物 H89 后立即进行 MCAO 缺血再灌注模型制作, 并给予 rTMS 治疗。②治疗: 造模后第 1 天 4 组大鼠均在清醒状态下置于自制固定器中, 进行 rTMS 治疗, 圆形线圈, 直径 60mm, 脉冲磁场峰值强度 3.5T。线圈边缘置于大鼠梗死侧大脑上方, 与头皮相切距离颅骨 1cm。刺激参数参考严莉等^[4]的研究, 频率为 20Hz, 强度为 33%最大输出强度, 刺激脉冲持续 5s, 间歇 60s, 每个序列 100 个脉冲, 共 10 个序列, 每天刺激 1 次, 连续 7d。

1.3 检测指标 ①蛋白免疫印迹法(Western Blot): 随机取 A、B 组大鼠各 4 只, C、D 组各 6 只, rTMS 治疗结束后将其处死, 取梗死侧海马, 裂解、匀浆, 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, 封闭结束后分别用抗大鼠 pCREB(稀释比 1:400)、PSD-95(1:500)和 GAP-43(1:300)抗体溶液室温孵育。二抗孵育后显色、曝光、显影, 以 Gel pro 4.0 版凝胶光密度分析软件进行分析, 测定累积光密度值(integrated optical density, IOD), 进行半定量分析。②透射电镜观察: rTMS 治疗结束后 A、B 组各取大鼠 2 只, 快速断头取脑, 参照 Pellegrino 大鼠脑立体

定位图谱^[5], 在冰上快速剥离右侧海马 CA1 区, 切取组织块大小 1mm×1mm×1mm, 每只取 2 个标本, 固定于 3%戊二醛和 4%多聚甲醛固定液中, 行常规电镜包埋、醋酸铀和枸橼酸铅双染, 超薄切片机切片。采用 Tecnai G² 12 型透射电镜(FEI Company, The Netherlands)摄取突触图像。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 17.0 软件进行统计学处理, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

电镜下观察, A 组大鼠海马 CA1 区神经元内线粒体内质网等细胞器肿胀, 胞浆密度低。B 组突触体积较 A 组增大, 突触前后膜电子致密区增宽, 密度增加。A 组大鼠突触前区突触囊泡模糊不清, 数量少, B 组突触囊泡则较 A 组清晰, 数量也增加。见图 1a~d。

Western Blot 结果显示, 所检测蛋白在相应组均有一定量表达。B 组 PSD-95 和 GAP-43 表达较 A 组显著增加, D 组的 pCREB、PSD-95、GAP-43 表达较 C 组均明显减少, 见图 2a~d, 表 1, 2。

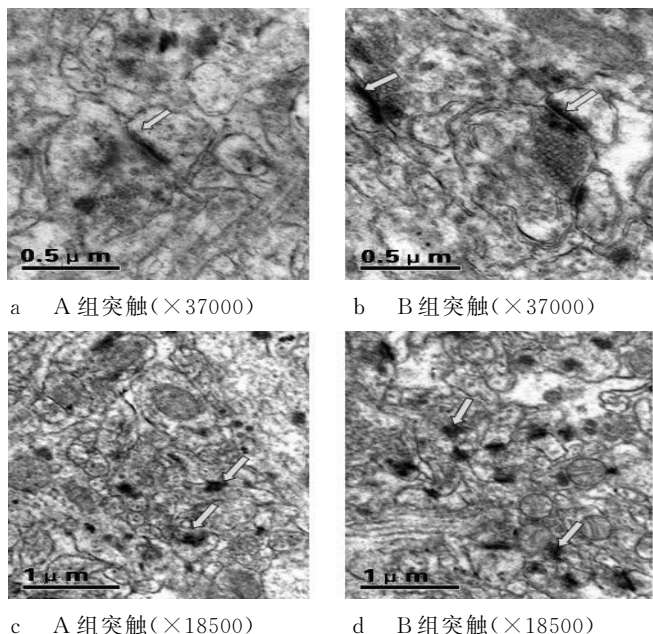


图 1a~d 电镜下 A 组和 B 组大鼠海马 CA1 区超微结构(箭头所指为突触)

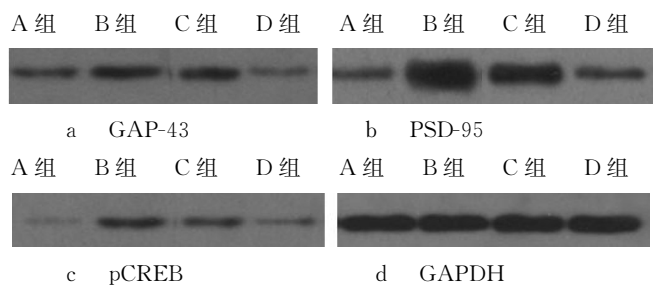


图 2a~d 各组大鼠海马 Western Blot 检测结果

表1 A、B组海马 PSD-95、GAP-43 相对光密度值比较 $\bar{x} \pm s$

组别	n	PSD-95	GAP-43
A组	4	0.20±0.07	0.20±0.07
B组	4	0.99±0.05 ^a	0.49±0.05 ^a

与A组比较,^aP<0.01**表2** C、D组海马 pCREB、PSD-95、GAP-43 相对光密度值比较 $\bar{x} \pm s$

组别	n	pCREB	PSD-95	GAP-43
C组	4	0.36±0.03	0.68±0.08	0.56±0.04
D组	4	0.20±0.03 ^a	0.27±0.06 ^a	0.23±0.08 ^a

与C组比较,^aP<0.01

3 讨论

PSD-95 可通过不同区域与 NMDA 受体 (N-methyl-D-aspartic acid) 及相关蛋白组成复合物,与 NMDA 受体组成的复合物在突触再生、突触可塑性及学习记忆过程等中发挥重要作用。敲除 PSD-95 基因可引起小鼠长时程增强 (long-term potentiation, LTP) 的改变和学习记忆功能障碍^[6]。GAP-43 是一种特异性与神经细胞发育及再生相关的膜磷脂蛋白,被作为突触生长的标志物。随着中枢神经系统的发育成熟,表达逐渐降低,当神经系统损伤后,其在 mRNA 和蛋白水平上的表达均明显升高^[7]。可以看出,GAP-43 和 PSD-95 在神经损伤修复和学习记忆功能恢复中有重要作用。

本课题前期研究发现 rTMS 早期干预可以改善脑梗死后大鼠的学习记忆功能^[8],本研究发现 rTMS 能够促进脑梗死后海马区 PSD-95、GAP-43 的表达,与韩肖华等^[9]报导一致。而且 rTMS 能够促进突触重塑,刘传玉等^[10]发现 rTMS 能够促进脑缺血大鼠健侧突触超微结构并改善神经功能。

CREB 是一种重要的核转录因子,在细胞核内以去磷酸化状态存在,无转录活性,PKA (protein kinase A) 的催化亚基解离进入细胞核将其磷酸化,被磷酸化的 CREB (pCREB) 与靶基因启动区 DNA 序列 (cAMP response element, CRE) 结合,调节位于其下游的大量基因如 CaMK II、bcl-2 等的转录,H89 则可抑制 PKA 对 CREB 的磷酸化作用。PKA-CREB 信号转导通路与突触的可塑性和学习记忆功能关系密切^[11],是长时程记忆形成的一条主要分子途径^[12]。本研究发现 rTMS 有可能通过缺血侧海马区细胞核内 pCREB 的调节进而促进 PSD-95、GAP-43 的表达。记忆功能障碍影响患者的康复进程和生活质量,rTMS 这一新技术则表现出对学习记忆功能积极的改善作用,对其机制的研究具有重要意义。本实验发现 rTMS 能促进脑

梗死后海马 PSD-95、GAP-43 表达,这种作用与 PKA-CREB 信号通路的调节关系密切,而且 rTMS 可以影响突触超微结构,实现结构重建和脑功能的可塑性变化。说明了 PKA-CREB 信号通路在 rTMS 促进脑梗死后海马 PSD-95、GAP-43 表达中的重要性,但其具体机制仍需深入探索。此外,海马各区 PSD-95、GAP-43 表达对 rTMS 反应是否一致等需进一步研究。

【参考文献】

- [1] Benowitz LI, Routtenberg A. GAP-43: an intrinsic determinant of neuronal development and plasticity[J]. Trends Neurosci, 1997, 20(2): 84-91.
- [2] Kakuda W, Abo M, Momosaki R, et al. Combined therapeutic application of botulinum toxin type A, low-frequency rTMS, and intensive occupational therapy for post-stroke spastic upper limb hemiparesis[J]. Eur J Phys Rehabil Med, 2012, 48(1): 47-55.
- [3] Takano K, Tatlisumak T, Bergmann AG, et al. Reproducibility and reliability of middle cerebral artery occlusion using a silicone-coated suture (Koizumi) in rats[J]. J Neurol Sci, 1997, 153(1): 8-11.
- [4] 严莉, 丰宏林, 崔丽英. 经颅低频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.
- [5] Pellegrino LJ, Pellegrino AS, Cushman AJ. A stereotaxic atlas of the rat brain[M]. 2nd ed. New York, Plenum Press, 1979, 43-43.
- [6] Kennedy MB. Signal-processing machines at the postsynaptic density[J]. Science, 2000, 290(5492): 750-754.
- [7] Gajda M, Adriaensen D, Cichocki T. Development of the innervation of long bones: expression of the growth associated protein 43[J]. Folia Histochem Cytobiol, 2000, 38(3): 103-110.
- [8] 赵秀秀, 韩肖华, 张靖慧, 等. 高频重复经颅磁刺激对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(12): 1087-1092.
- [9] 韩肖华, 黄晓琳, 王熠钊, 等. 电针结合经颅磁刺激对脑缺血大鼠学习记忆功能的影响[J]. 中国康复医学杂志, 2009, 24(6): 494-497.
- [10] 刘传玉, 梅元武, 张小乔. 经颅磁刺激对脑缺血大鼠功能恢复和健侧突触结构的影响[J]. 中华物理医学与康复杂志, 2005, 7(12): 707-710.
- [11] Heyward P. Presenilin dysfunction leads to memory and plasticity defects[J]. Lancet Neurol, 2004, 3(6): 327-333.
- [12] Hawk JD, Abel T. The role of NR4A transcription factors in memory formation[J]. Brain Res Bull, 2011, 85(1-2): 21-29.