

rTMS 对脑梗死大鼠记忆功能及海马 IL-1 的影响研究

张靖慧¹, 方莹莹², 李娜¹

【摘要】 目的:研究重复经颅磁刺激(rTMS)对脑梗死大鼠空间记忆功能的影响,并探讨其可能机制。方法:45只大鼠随机分为假手术组、对照组和 rTMS 组各 15 只,采用大脑中动脉栓塞再灌注(tMCAO)法制作脑梗死大鼠模型。采用 Morris 水迷宫评定学习记忆功能变化,通过实时定量聚合酶链式反应(qRT-PCR)观察患侧海马白细胞介素 1 β (IL-1 β)、诱导型一氧化氮合酶(iNOS)、肿瘤坏死因子(TNF- α)以及梗死灶区(IL-1 β)mRNA 表达量。结果:与假手术组相比,对照组及 rTMS 组大鼠逃避潜伏期显著延长($P<0.01$),而 rTMS 组较对照组的逃避潜伏期则明显缩短($P<0.05$)。对照组、rTMS 组 IL-1 β mRNA 在患侧海马及皮层的表达量均较假手术组增高($P<0.01$),rTMS 组患侧海马 IL-1 β mRNA 表达较对照组显著增高($P<0.01$),患侧皮层 IL-1 β mRNA 表达较对照组无明显变化。对照组、rTMS 组 iNOS、TNF- α mRNA 表达量均较假手术组增高($P<0.01$),rTMS 组与对照组无明显差异。结论:rTMS 治疗可促进脑梗死后空间学习记忆功能恢复,并可能通过增加患侧海马区 IL-1 β mRNA 表达来实现。

【关键词】 经颅磁刺激;脑缺血;空间记忆;IL-1 β

【中图分类号】 R49;R743.3 **【DOI】** 10.3870/zgkf.2016.03.001

Effects of rTMS on recovery of memory function and interleukin-1 in hippocampus after focal cerebral ischemia

Zhang Jinghui, Fang Yingying, Li Na. Department of Rehabilitation Medicine, the Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China

【Abstract】 Objective: To investigate the effects of rTMS in high frequency on the recovery of spatial memory function and the expression of interleukin-1 β (IL-1 β) mRNA in ipsilesional hippocampus of rats subjected to focal cerebral ischemia. **Methods:** A rat model of acute focal cerebral ischemia was established using transient middle cerebral artery occlusion technique. Forty-five rats were randomly assigned to sham operative group, ischemic control group and rTMS group. Spatial memory function was evaluated by Morris water maze. The expression of pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , iNOS, TNF- α) in ipsilesional hippocampus and ischemic core was detected by real-time quantitative polymerase chain reaction. **Results:** The escape latency in ischemic control group and rTMS group was delayed more than that in sham operative group ($P<0.01$). The escape latency in rTMS group was significantly shortened as compared with that in model control group ($P<0.05$). The expression of IL-1 β , iNOS and TNF α mRNA was increased in ischemic group and rTMS group ($P<0.01$) as compared with sham operative group ($P<0.01$). In the hippocampus, the expression of IL-1 β mRNA in rTMS group was significantly increased as compared with that in the ischemic control group ($P<0.01$). In the ipsilateral cortex, there was no significant difference in the expression of IL-1 β mRNA between rTMS group and ischemic control group. **Conclusion:** rTMS can promote the recovery of spatial memory function, which was possibly achieved by increasing the expression of IL-1 β mRNA in the ipsilateral hippocampus.

【Key words】 transcranial magnetic stimulation; cerebral ischemia; spatial memory; interleukin-1

重复经颅磁刺激(repetitive transcranial magnetic stimulation, rTMS)是一种新型的无痛无创脑刺激技

术,临床研究发现磁刺激可改善正常受试者及脑卒中患者学习记忆功能^[1],提高恢复期脑卒中患者的运动学习技能,但其机制尚不明确。近年来大量研究表明白细胞介素 1(interleukin-1, IL-1)在低浓度条件下具有一定脑保护作用,参与海马依赖的学习记忆过程^[2],长时程增强(long-term potentiation, LTP)刺激可促进海马内 IL-1 β 表达^[3]。本研究应用脑梗死大鼠模

基金项目:广东省自然科学基金博士启动项目(S2013040013489)

收稿日期:2015-11-04

作者单位:1. 中山大学附属第三医院康复医学科,广州 510630;2. 南方医科大学基础医学院神经生物教研室,广州 510630

作者简介:张靖慧(1983-),女,住院医师,主要从事神经康复方面的研究。

型,观察 rTMS 对脑梗死后空间记忆功能以及海马区 IL-1 β mRNA 表达的影响。

1 材料与方法

1.1 材料 ①实验动物:健康成年雄性 SPF 级 SD 大鼠 45 只,体质量 220.2g,购自南方医科大学实验动物中心。②试剂:Trizol:15596-018,Invitrogen;cDNA 第一链合成试剂盒: # K1622, Fermentas; SYBR Green/Flourescein qPCR Master Mix(2X): # K0242, Fermentas; Ex TaqTM: DRR100A, TAKARA; DL2000 DNA Marker: D501A, TAKARA; DL15000 DNA Marker: D502A, TAKARA; 引物合成:南京金斯瑞。③仪器:磁刺激治疗采用 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);Morris 水迷宫实验采用水迷宫实验系统(中国医学科学院生产);qRT-PCR 使用 illumina eco Real-Time PCR System 测定。

1.2 方法 ①分组:将 45 只大鼠随机分为假手术组、对照组和 rTMS 组,每组 15 只。②造模:将对照组和 rTMS 组大鼠参照改良的 Longa 线栓法制作右侧大脑中动脉阻塞再灌注(transient middle cerebral artery occlusion, tMCAO)模型^[4-5],脑缺血后 90min 将线栓拔出,完成造模。采用 Bederson 评分法观察大鼠清醒后行为学改变^[6]。将 1、2、3 分动物纳入本实验。共 29 只大鼠制模成功并纳入本研究,实验过程中有 3 只死亡,最终对照组有 12 只、rTMS 组有 14 只大鼠完成实验。假手术组线栓从颈总动脉分叉处进入颈内动脉约 5mm,无病理行为学改变。③rTMS 治疗:rTMS 组大鼠从术后 1d 开始给予患侧大脑磁刺激治疗,采用 YRDCCY- I 型磁刺激仪。将清醒状态下的大鼠固定在自制透明固定器中。8 字形线圈(8 字中心最大磁场强度 1.8T),隔着固定器(厚 0.2mm)紧贴大鼠头皮,线圈中心位于大鼠梗死侧大脑上方^[7],刺激强度为 120% 静息运动阈值(50%最大磁场强度),刺激频率为 10Hz,总刺激量为 300 脉冲,单序列 30 脉冲,共 10 个序列,中间间隔 50s^[8],每次治疗 8min。每天 1 次,连续 5d。

1.3 评定标准 ①行为学检测:采用 Morris 水迷宫试验。模型制作的第 3 天开始,3 组大鼠进行水迷宫实验,共 5 次,4d 内完成,第 1 天训练 2 次。圆形平台固定放置于第三象限中心,放入适量水使平台低于水平面 3cm。前 4 次为训练,每次分别从 3 个象限(除平台所在象限)的中点将大鼠逐一向池壁放入水中,设定大鼠在平台上停留 3s 为找到平台,记录大鼠在水中寻找并爬上平台的时间,即逃避潜伏期。如果大鼠在

60s 内未找到平台,则将其引导至平台,停留 20s 以熟悉环境,此时逃避潜伏期记为 60s。最后一次为检测,撤去平台,于第 1 象限入水点处将大鼠面向池壁放入水中,记录大鼠 60s 内第一次穿过平台的搜索时间(逃避潜伏期)。将最后一次成绩进行统计分析,以此来评价大鼠的空间学习记忆能力。②实时定量聚合酶链式反应(Quantitative Real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)检测大鼠海马 IL-1 β mRNA 表达情况:术后 6d 使用 ABI StepOne Plus 测定。并观察梗死灶(皮层、纹状体)IL-1 β mRNA 表达情况。同时检测炎症相关因子:诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor alpha, TNF- α)。qRT-PCR 内参为:肌动蛋白(β -Actin)。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 13.0 软件对结果进行统计学分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析和 Bonferroni post-tests 比较各组间差异。统计学显著性为 $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 Morris 水迷宫测试 与假手术组相比,对照组及 rTMS 组大鼠的逃避潜伏期均显著延长($P < 0.01$),而 rTMS 组较对照组的逃避潜伏期则明显缩短($P < 0.05$),见表 1。

2.2 qRT-PCR 结果 对照组、rTMS 组 IL-1 β mRNA 在患侧海马及皮层的表达量均较假手术组增高($P < 0.01$),rTMS 组在患侧海马的 IL-1 β mRNA 表达较对照组显著增高($P < 0.01$),在患侧皮层中 rTMS 组 IL-1 β mRNA 表达较对照组无明显变化。检测患侧海马 iNOS、TNF β mRNA 以明确炎症反应水平,结果提示对照组、rTMS 组 iNOS、TNF β mRNA 表达量均较假手术组增高($P < 0.01$),rTMS 组较对照组有所下降,但无显著差异。见表 2。

表 1 rTMS 对脑梗死大鼠空间学习记忆功能的影响 分, $\bar{x} \pm s$

组别	n	逃避潜伏时(s)
假手术组	15	18.63 $\pm$ 10.75
对照组	12	51.32 $\pm$ 16.77 ^a
rTMS 组	14	34.49 $\pm$ 18.17 ^{ab}

与假手术组比较,^a $P < 0.05$;与对照组比较,^b $P < 0.05$

表 2 3 组患侧海马及皮层的 IL-1 β mRNA 相对表达量及患侧海马 iNOS 及 TNF- α mRNA 的相对表达量比较 $\bar{x} \pm s$

组别	n	IL-1 β mRNA		患侧海马区	
		患侧海马	患侧皮层	iNOS	TNF- α
假手术组	15	1	1	1	1
对照组	12	1.82 $\pm$ 0.48 ^a	3.34 $\pm$ 0.51 ^a	3.15 $\pm$ 0.27 ^a	1.59 $\pm$ 0.18 ^a
rTMS 组	14	6.14 $\pm$ 1.05 ^{ab}	4.61 $\pm$ 0.93 ^a	2.66 $\pm$ 0.37 ^a	1.46 $\pm$ 0.07 ^a

与假手术组比较,^a $P < 0.05$;与对照组比较,^b $P < 0.05$

3 讨论

本研究通过 Morris 水迷宫实验观察 rTMS 对空间学习记忆功能的影响,结果发现,对照组大鼠逃避潜伏期较假手术组明显延长,rTMS 组大鼠逃避潜伏期较对照组明显缩短,说明 rTMS 一定程度上改善脑梗死大鼠空间学习记忆功能。

IL-1 是一种经典炎性细胞因子,存在 α 、 β 两种异构体,主要合成部位是海马,生理情况下,IL-1 及 IL-1mRNA 在脑内含量很低,并且以 IL-1 β 为主。正常生理状态下,IL-1 β 对记忆固化起重要作用,参与海马依赖的学习记忆过程。生理状态下低浓度 IL-1 β 可协同 IL-6,促进神经生长因子释放、新血管形成、胶质增生,从而增强神经细胞抗缺血能力和促进修复作用^[9]。条件性恐惧实验或者 LTP 刺激后大鼠海马区 IL-1 β mRNA 表达增加^[3,10],腹腔注射小剂量 IL-1 β 可促进大鼠躲避记忆和条件性恐惧记忆能力^[11]。急性脑梗死引起 IL-1 β 浓度病理性增高,成为一种内源性致热源,在炎症和急性期反应中发挥作用,参与神经损伤,促进炎症反应,扩大脑梗死面积。脑梗死后 IL-1 β 表达具有一定时间依赖性,动物研究表明,IL-1 β mRNA 在脑梗死后 6h 开始增高,12h~3d 达到高峰,随后逐渐下降至正常水平^[12],本研究中脑梗死后 6d 梗死灶与患侧海马区 IL-1 β mRNA 表达水平仍高于假手术组,与文献报道基本一致^[12]。本研究于脑梗死急性期(MCAO 术后 1d)给予 rTMS 治疗,结果显示 rTMS 促进患侧海马区 IL-1 β mRNA 表达增加,对梗死灶 IL-1 β mRNA 表达无明显改变,提示其具有部位特异性,而且 rTMS 不影响其它炎症因子(iNOS、TNF- α)表达,提示 rTMS 对炎症反应无增强作用。其具体机制尚不明确,但初步提示了海马区 IL-1 β 浓度改变在脑梗死后学习记忆功能恢复过程中可能起到重要作用。此外 rTMS 为脉冲样刺激模式,一般认为其作用机制与突触可塑性相关。rTMS 对神经的调控作用有明显的频率依赖性,高频(>1Hz) rTMS 对神经兴奋性的调控表现为类似 LTP 作用。LTP 刺激可促进大鼠海马区 IL-1 β mRNA 表达增加^[3,10],根据本研究结果推测 rTMS 可能通过影响海马区 IL-1 β 以改善脑梗死后空间记忆功能。

本研究使用的磁刺激线圈刺激面积较大,无法实现精确靶向刺激患侧海马区。研究表明空间学习记忆功能需要完整的神经网络参与,在空间导航过程中,海马是主要参与部位,而在回忆过程中,除了海马,还需要海马旁皮层的参与,海马旁皮层包括内外侧前额叶、楔前叶、后扣带回、压后皮层以及内外侧颞叶区^[13]。

最新研究发现皮层下内侧隔/斜角带核的 GABA 能神经元的突触与海马神经元形成链接^[14],从细胞层面上证实了海马与皮层间存在神经网络。本研究结果提示患侧大脑在磁刺激后海马区 IL-1 β mRNA 表达增高,可能是海马神经元受到磁刺激直接作用的结果,也可能是磁刺激促进整个学习记忆神经网络重建的结果,其具体机制需进一步研究证实。

综上所述,本研究表明急性期脑梗死行 rTMS 治疗可促进空间学习记忆功能恢复,其作用机制可能与 rTMS 增加患侧海马区 IL-1 β mRNA 表达相关,为进一步探索 rTMS 治疗脑卒中最佳治疗方案提供有力基础依据。

【参考文献】

- [1] Di Pino G, Pellegrino G, Assenza G, et al. Modulation of brain plasticity in stroke: a novel model for neurorehabilitation[J]. Nat Rev Neurol, 2014, 10(10):597-608.
- [2] Labrousse VF, Costes L, Aubert A, et al. Impaired interleukin-1beta and c-Fos expression in the hippocampus is associated with a spatial memory deficit in P2X(7) receptor-deficient mice[J]. PLoS One, 2009, 4(6):e6006-6006.
- [3] Schneider H, Pitossi F, Balschun D, et al. A neuromodulatory role of interleukin-1beta in the hippocampus[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(13):7778-7783.
- [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] Shen CC, Yang YC, Chiao MT, et al. Characterization of endogenous neural progenitor cells after experimental ischemic stroke[J]. Curr Neurovasc Res, 2010 Feb; 7(1):6-14.
- [6] Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, et al. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination[J]. Stroke, 1986, 17(3):472-6.
- [7] 赵秀秀,韩肖华,郭风,等. 高频重复经颅磁刺激对脑缺血后海马 BDNF、VEGF 和 Nestin 表达的影响[J]. 神经损伤与功能重建, 2013, 8(6):431-434.
- [8] 张靖慧,韩肖华,赵秀秀,等. 重复经颅磁刺激对脑缺血后神经干细胞增殖以及 miR-9 表达的影响[J]. 中华物理医学与康复杂志, 2012, 34(10):725-728.
- [9] Hewett SJ, Jackman NA, Claycomb RJ. Interleukin-1beta in Central Nervous System Injury and Repair[J]. Eur J Neurodegener Dis, 2012, 1(2):195-211.
- [10] Goshen I, Kreisel T, Ounallah-Saad H, et al. A dual role for interleukin-1 in hippocampal-dependent memory processes[J]. Psychoneuroendocrinology, 2007, 32(8-10):1106-1115.
- [11] Yirmiya R, Goshen I. Immune modulation of learning, memory, neural plasticity and neurogenesis[J]. Brain Behav Immun, 2011, 25(2):181-213.
- [12] Song C, Zhang Y, Dong Y. Acute and subacute IL-1beta administrations differentially modulate neuroimmune and neurotrophic systems: possible implications for neuroprotection and neurodegeneration[J]. J Neuroinflammation, 2013, 10:59-59.
- [13] Mullally SL, Maguire EA. Memory, Imagination, and Predicting the Future: A Common Brain Mechanism[J]? Neuroscientist, 2013, 20(3):220-234.
- [14] Unal G, Joshi A, Viney TJ, et al. Synaptic Targets of Medial Septal Projections in the Hippocampus and Extrahippocampal Cortices of the Mouse[J]. J Neurosci, 2015, 35(48):15812-15826.