

重复经颅磁刺激通过 IGF-1R 途径改善脑梗死恢复期大鼠学习记忆功能

张子英, 闫莹莹, 申利坊

(郑州大学第五附属医院康复医学科, 河南省郑州市 450052)

[关键词] 脑梗死; 重复经颅磁刺激; 海马; 凋亡; 胰岛素样生长因子1受体

[摘要] **目的** 研究重复经颅磁刺激(rTMS)通过胰岛素样生长因子1受体(IGF-1R)途径改善脑梗死恢复期大鼠学习记忆功能的效果及可能机制。**方法** 成年雄性SD大鼠随机分为对照组、模型组、rTMS组、rTMS+ADW742组,后3组采用线栓法建立脑梗死模型,造模后2周rTMS组给予rTMS干预,rTMS+ADW742组给予rTMS及ADW742干预,持续2周。Morris水迷宫检测学习记忆功能,TUNEL法检测海马的细胞凋亡率,Western blot检测海马中细胞色素C(Cyt-C)、裂解型半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶3(cleaved Caspase-3)、IGF-1、IGF-1R的表达量。**结果** 与对照组比较,模型组大鼠的逃避潜伏期明显延长,穿越平台次数及海马中IGF-1、IGF-1R的表达量明显减少,海马中细胞凋亡率及Cyt-C、cleaved Caspase-3的表达量明显增加($P<0.05$);与模型组比较,rTMS组大鼠的逃避潜伏期明显缩短,穿越平台次数及海马中IGF-1、IGF-1R的表达量明显增加,海马中细胞凋亡率及Cyt-C、cleaved Caspase-3的表达量明显减少($P<0.05$);与rTMS组比较,rTMS+ADW742组大鼠的逃避潜伏期明显延长,穿越平台次数及海马中IGF-1、IGF-1R的表达量明显减少,海马中细胞凋亡率及Cyt-C、cleaved Caspase-3的表达量明显增加($P<0.05$)。**结论** rTMS能够改善脑梗死恢复期大鼠学习记忆功能,激活海马中IGF-1R途径并抑制凋亡是相关的分子机制。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Repetitive transcranial magnetic stimulation improves the learning and memory function of rats in the recovery period of cerebral infarction through IGF-1R pathway

ZHANG Ziying, YAN Yingying, SHEN Lifang

(Department of Rehabilitation Medicine, the Fifth Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450052, China)

[KEY WORDS] cerebral infarction; repetitive transcranial magnetic stimulation; hippocampus; apoptosis; insulin like growth factor-1 receptor

[ABSTRACT] **Aim** To study the effect of repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) on the learning and memory function of rats in the recovery stage of cerebral infarction through insulin-like growth factor-1 receptor (IGF-1R) pathway. **Methods** Adult male SD rats were randomly divided into control group, model group, rTMS group and rTMS+ADW742 group. The latter three groups were used to establish cerebral infarction model by thread bolt method. Two weeks later, rTMS group was given rTMS intervention, rTMS+ADW742 group was given rTMS and ADW742 intervention for two weeks. Morris water maze was used to detect learning and memory function. TUNEL was used to detect apoptosis rate of hippocampus, Western blot was used to detect the expression of cytochrome-c (Cyt-C), cleaved Caspase-3, IGF-1, IGF-1R in hippocampus. **Results** Compared with the control group, the escape latency significantly prolonged, the times of crossing the platform and the expression of IGF-1, IGF-1R in the hippocampus significantly reduced, the apoptosis rate and the expression of Cyt-C, cleaved in the hippocampus significantly increased in model group ($P<0.05$); Compared with the model group, the escape latency significantly was shortened; the times of crossing the platform and the expression of IGF-1, IGF-1R in the hippocampus were significantly increased; the apoptosis rate and the expression

[收稿日期] 2019-12-27

[修回日期] 2020-02-21

[基金项目] 河南省医学科技攻关计划联合共建项目(2018020259)

[作者简介] 张子英,硕士,主治医师,研究方向为神经康复,E-mail为 sunb1191@163.com。

of Cyt-C, cleaved in the hippocampus were significantly reduced in model group ($P < 0.05$). Compared with model group, the escape latency was significantly prolonged; the times of crossing the platform and the expression of IGF-1, IGF-1R in the hippocampus were significantly reduced; the apoptosis rate and the expression of Cyt-C, cleaved in the hippocampus were significantly increased in rTMS+ADW742 group ($P < 0.05$). **Conclusion** rTMS can improve the learning and memory function of rats in the recovery period of cerebral infarction, and activating IGF-1R pathway and inhibiting apoptosis in hippocampus is the related molecular mechanism.

急性脑梗死是临床常见的心脑血管疾病,随着溶栓、介入等治疗手段的普及,其救治的成功率明显提高,疾病的致死率和致残率均明显降低。尽管如此,仍有相当一部分脑梗死患者会恢复期出现认知功能障碍,表现为认知功能异常、学习记忆功能减退等,对日常生活造成不利影响。重复经颅磁刺激(repetitive transcranial magnetic stimulation, rTMS)是临床上常用的非侵入性神经刺激治疗手段,有临床研究报道,rTMS对脑梗死后轻度认知功能障碍及非痴呆型血管性认知功能障碍均具有改善作用^[1-3],但rTMS改善认知功能的机制尚不十分清楚。

胰岛素样生长因子1(insulin-like growth factors-1, IGF-1)是在神经系统中发挥重要作用的细胞因子,通过与IGF-1受体(IGF-1 receptor, IGF-1R)结合发挥生物学作用。脑梗死合并认知功能障碍患者的血清IGF-1水平明显降低,外源性给予IGF-1则能改善脑梗死大鼠的认知功能^[4-5]。国内张志强等^[6]的动物实验报道,rTMS能够增加脑梗死大鼠海马中IGF-1的表达,由此推测,rTMS增加IGF-1表达的作用可能与其改善脑梗死后认知功能障碍有关。为了验证这一推测,本研究以脑梗死恢复期大鼠为实验对象,具体分析了rTMS通过IGF-1R途径改善脑梗死恢复期大鼠学习记忆功能的作用。

1 材料和方法

1.1 动物、试剂和仪器

成年雄性SD大鼠购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司,生产许可SCXK(沪)2018-0006。

IGF-1R选择性抑制剂ADW742购自MCE公司,TUNEL凋亡检测试剂盒购自北京全式金公司,RIPA裂解液、BCA蛋白定量试剂盒购自上海如吉生物公司,细胞色素C(Cytochrome-C, Cyt-C)、裂解型半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶3(cleaved cysteinyl aspartate specific proteinase-3, cleaved Caspase-3)、IGF-1、IGF-1R的抗体购自武汉艾美捷公司。

经颅磁刺激经颅直流电刺激仪购自英国Magstim公司,显微镜购自日本Nikon公司,凝胶成

像系统购自上海勤翔公司。

1.2 动物分组及造模

SD大鼠共32只,随机分为对照组、模型组、rTMS组、rTMS+ADW742组,每组各8只。模型组、rTMS组、rTMS+ADW742组进行脑梗死造模,方法如下:用直径0.2 mm的尼龙线预先制备线栓,75%乙醇浸泡消毒后放入肝素化生理盐水中备用;腹腔注射10%水合氯醛0.3 mL/kg麻醉,分离左侧颈动脉,暂时夹闭颈总动脉及颈内动脉,在颈外动脉与颈总动脉交界处做一小切口,将预先制备好的尼龙线栓,插入约18~19 mm后稍遇阻力,达到大脑前动脉,固定线栓并缝合切口。对照组按照相同的方法麻醉、分离及夹闭颈动脉,但不进行其他操作。造模完成后1 h,参照大鼠肢体运动5分制评价标准,1~3分为造模成功。

1.3 动物干预

造模后2周开始进行干预,rTMS组采用经颅磁刺激经颅直流电刺激仪进行rTMS干预,线圈放置在大鼠矢状缝中点、与顶骨平行且距离透皮5 mm处,干预强度为0.4 Tesla,脉冲频率1 Hz,脉冲宽度70 μ s,每20个为1串,串间间隔为10 s,每天固定时间进行干预,给予400个脉冲、连续14天;rTMS+ADW742组参照rTMS组的方法进行rTMS干预,同时按照Martins等^[7]的研究、选择ADW742的剂量为50 mg/kg、进行腹腔注射1次/日,连续14天。

1.4 Morris水迷宫检测学习记忆功能

干预结束后进行Morris水迷宫检测,水迷宫直径1.6米、高0.5米、水深0.22米,水温22~26 $^{\circ}$ C,在第三象限正中放置直径12 cm、高20 cm的平台。第1~5天进行定位航行实验,记录大鼠60 s内找到平台的时间、记录为逃避潜伏期,如60 s内未找到平台、则逃避潜伏期为60 s;第6天进行空间探索实验,记录大鼠60 s内穿越平台的次数。

1.5 TUNEL检测海马中细胞凋亡

完成Morris水迷宫检测后处死大鼠,解剖海马组织,取适量海马、4%多聚甲醛固定后制作石蜡切片,按照TUNEL凋亡检测试剂盒的说明书进行操作,对石蜡切片进行染色,在显微镜下观察并对TUNEL阳

性细胞进行计数,根据计数结果计算细胞凋亡率。

1.6 Western blot 检测海马中基因表达

另取适量海马,液氮冷冻后用 RIPA 裂解液对组织进行裂解、提取组织中的蛋白,用 BCA 试剂盒测定蛋白含量后,取含有 30 μg 蛋白的样本,加入 SDS-聚丙烯酰胺凝胶中,电泳后电转移至 PVDF 膜,5% 脱脂牛奶在室温封闭 PVDF 膜 1 h 后 1:1 000 稀释的 Cyt-C、cleaved Caspase-3、IGF-1、IGF-1R 抗体或 1:5 000 稀释的 β -actin 抗体 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜;TBS-T 溶液洗膜 3 遍、每遍 5 min,室温孵育 1:2 000 稀释的二抗 1 h,再次 TBS-T 溶液洗膜 3 遍、每遍 10 min,最后在凝胶成像系统中显影,得到 Cyt-C、cleaved Caspase-3、IGF-1、IGF-1R、 β -actin 条带,根据条带的灰度值计算蛋白表达量。

1.7 统计学方法

采用 SPSS20.0 软件录入数据,经正态性检验符合正态分布的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示、组间比较采用方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠学习记忆功能的比较

与对照组比较,模型组大鼠定位航行实验第 1~5 天时的逃避潜伏期明显延长,空间探索实验的穿越平台次数明显减少($P<0.05$);与模型组比较,rTMS 组大鼠定位航行实验第 3~5 天时的逃避潜伏期明显缩短,空间探索实验的穿越平台次数明显增加($P<0.05$);与 rTMS 组比较,rTMS+ADW742 组大鼠定位航行实验第 3~5 天时的逃避潜伏期明显延长,空间探索实验的穿越平台次数明显减少($P<0.05$,图 1、图 2)。

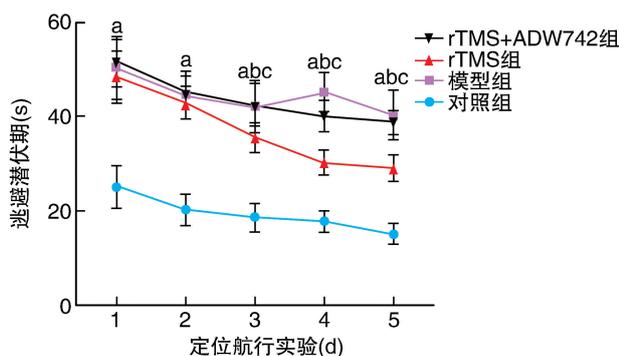


图 1. 各组大鼠定位航行实验逃避潜伏期的比较 a 为 $P<0.05$,与对照组比较;b 为 $P<0.05$,与模型组比较;c 为 $P<0.05$,与 rTMS 组比较。

Figure 1. Comparison of escape latency of rats in each group

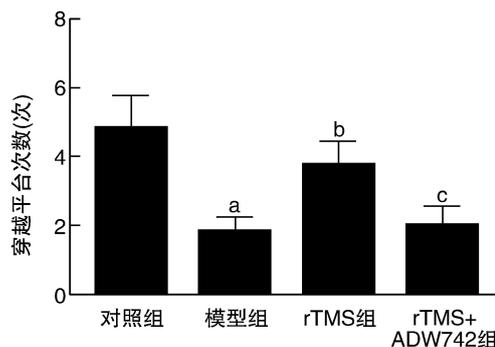


图 2. 各组大鼠空间探索实验穿越平台次数的比较 a 为 $P<0.05$,与对照组比较;b 为 $P<0.05$,与模型组比较;c 为 $P<0.05$,与 rTMS 组比较。

Figure 2. Comparison of times of crossing platform in space exploration experiment of rats in each group

2.2 各组大鼠海马中细胞凋亡的比较

与对照组比较,模型组大鼠海马的细胞凋亡率明显增加($P<0.05$);与模型组比较,rTMS 组大鼠海马的细胞凋亡率明显减少($P<0.05$);与 rTMS 组比较,rTMS+ADW742 组大鼠海马的细胞凋亡率增加($P<0.05$,图 3、表 1)。

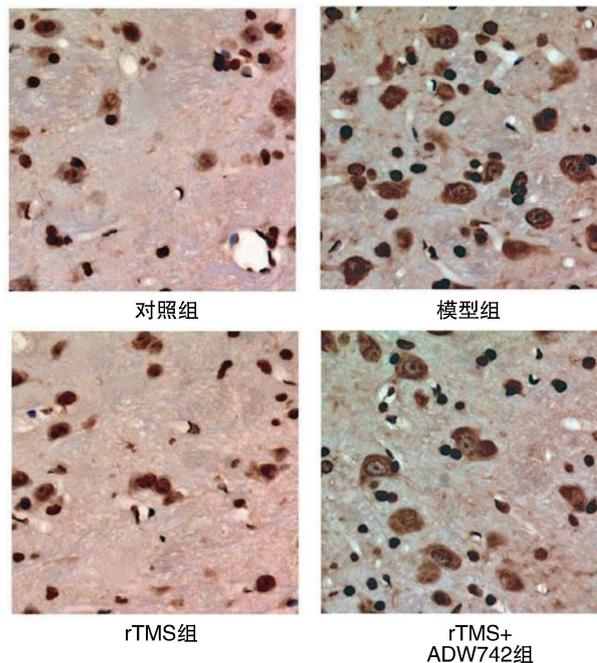


图 3. 各组大鼠海马组织细胞凋亡情况的比较(TUNEL 染色, 4 \times)

Figure 3. Comparison of apoptosis in hippocampus of rats in each group (TUNEL staining, 4 \times)

2.3 各组大鼠海马中凋亡基因表达的比较

与对照组比较,模型组大鼠海马中 Cyt-C 的表

达明显减少,cleaved Caspase-3 的表达明显增加($P < 0.05$);与模型组比较,rTMS 组大鼠海马中 Cyt-C 的表达明显增加,cleaved Caspase-3 的表达明显减少($P < 0.05$);与 rTMS 组比较,rTMS+ADW742 组大鼠海马中 Cyt-C 的表达明显减少,cleaved Caspase-3 的表达明显($P < 0.05$,图 4、表 2)。

表 1. 各组大鼠海马组织细胞凋亡率的比较

Table 1. Comparison of apoptosis rate of hippocampus in each group

分组	n	细胞凋亡率(%)
对照组	8	3.84±0.94
模型组	8	20.38±6.85 ^a
rTMS 组	8	6.68±1.15 ^b
rTMS+ADW742 组	8	15.58±3.76 ^c

a 为 $P < 0.05$,与对照组比较;b 为 $P < 0.05$,与模型组比较;c 为 $P < 0.05$,与 rTMS 组比较。

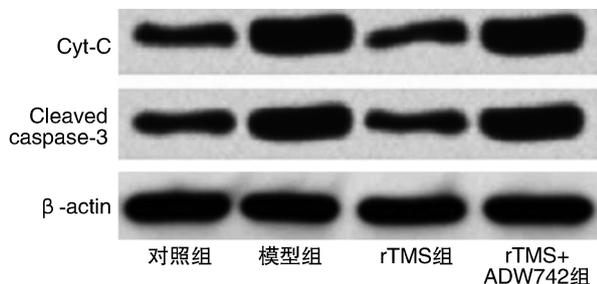


图 4. 各组大鼠海马中 Cyt-C、cleaved Caspase-3 的蛋白条带

Figure 4. Protein bands of Cyt-C and cleaved Caspase-3 in hippocampus of rats in each group

表 2. 各组大鼠海马中 Cyt-C、cleaved Caspase-3 表达量的比较

Table 2. Comparison of the expression of Cyt-C and cleaved Caspase-3 in hippocampus of rats in each group

分组	n	Cyt-C	cleaved Caspase-3
对照组	8	0.73±0.16	0.70±0.14
模型组	8	1.29±0.30 ^a	1.21±0.32 ^a
rTMS 组	8	0.60±0.09 ^b	0.59±0.11 ^b
rTMS+ADW742 组	8	1.20±0.25 ^c	1.10±0.25 ^c

a 为 $P < 0.05$,与对照组比较;b 为 $P < 0.05$,与模型组比较;c 为 $P < 0.05$,与 rTMS 组比较。

2.4 各组大鼠海马中 IGF-1、IGF-1R 表达的比较

与对照组比较,模型组大鼠海马中 IGF-1、IGF-1R 的表达明显减少($P < 0.05$);与模型组比较,rTMS

组大鼠海马中 IGF-1、IGF-1R 的表达明显增加($P < 0.05$);与 rTMS 组比较,rTMS+ADW742 组大鼠海马中 IGF-1、IGF-1R 的表达无明显变化($P > 0.05$,图 5、表 3)。

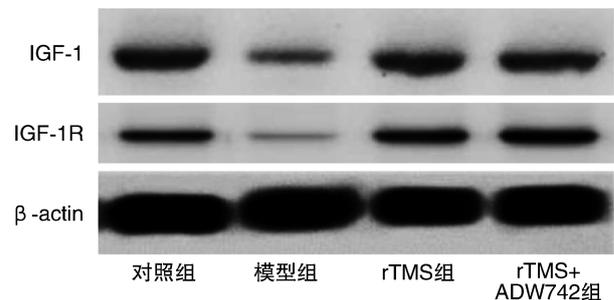


图 5. 各组大鼠海马中 IGF-1、IGF-1R 的蛋白条带

Figure 5. Protein bands of IGF-1 and IGF-1R in hippocampus of rats in each group

表 3. 各组大鼠海马中 IGF-1、IGF-1R 表达量的比较

Table 3. Comparison of IGF-1 and IGF-1R expression in hippocampus of rats in each group

分组	n	IGF-1	IGF-1R
对照组	8	0.63±0.11	0.50±0.09
模型组	8	0.30±0.07 ^a	0.22±0.06 ^a
rTMS 组	8	0.60±0.10 ^b	0.59±0.10 ^b
rTMS+ADW742 组	8	0.58±0.09	0.55±0.08

a 为 $P < 0.05$,与对照组比较;b 为 $P < 0.05$,与模型组比较。

3 讨论

认知功能障碍是常见的脑梗死后遗症^[8-9],rTMS 具有改善认知功能障碍的作用,已有临床研究和动物实验研究证实,rTMS 能够减轻脑梗死患者及脑梗死大鼠的认知功能障碍^[3,6],但 rTMS 作为一种物理治疗手段、发挥上述作用的具体分子机制尚不明确。本研究在脑梗死造模后 2 周采用 Morris 水迷宫对大鼠的学习记忆功能进行评价,以此反应脑梗死恢复期的认知功能,模型大鼠的逃避潜伏期明显延长、穿越平台次数明显减少,表明大鼠在脑梗死恢复期出现了学习记忆功能的损害;在大鼠脑梗死的恢复期进行 rTMS 干预后,大鼠的逃避潜伏期明显缩短、穿越平台次数明显增加,表明 rTMS 能够改善脑梗死恢复期大鼠的学习记忆功能,与既往 rTMS 的动物实验结果一致。在此基础上,本实验将进一步研究 rTMS 改善学习记忆功能的分子机制。

IGF-1 是在中枢神经系统中广泛分布的一类细

胞因子,与胰岛素具有高度同源性,与受体 IGF-1R 结合后介导促有丝分裂及抗凋亡作用^[10-11]。在衰老大鼠、脑出血大鼠、 $A\beta$ 诱导阿尔茨海默细胞模型中,IGF-1/IGF-1R 通路的抑制与认知功能的障碍均密切相关^[12-14]。张志强等^[6]的动物实验将 rTMS 用于脑梗死大鼠的干预,在改善大鼠学习记忆功能的同时也观察到海马中 IGF-1 表达增多,提示 rTMS 改善学习记忆功能的分子机制可能与 IGF-1/IGF-1R 途径有关,为了验证这一机制,IGF-1R 的特异性抑制剂 ADW742 被用于脑梗死恢复期大鼠的干预,在 rTMS 干预的同时加用 ADW742 后,大鼠的逃避潜伏期明显缩短、穿越平台次数明显增加,表明 ADW742 能够削弱 rTMS 改善脑梗死恢复期大鼠学习记忆功能的作用,进而说明 rTMS 改善脑梗死恢复期大鼠学习记忆功能的作用与激活 IGF-1R 途径有关。

IGF-1R 途径主要的功能是促有丝分裂及抗凋亡,海马是与学习记忆功能调控密切相关的脑区,本实验对脑梗死大鼠海马中 IGF-1R 途径的分析显示:模型组大鼠海马中 IGF-1、IGF-1R 的表达明显减少,rTMS 干预后海马中 IGF-1、IGF-1R 的表达明显增加,海马中 IGF-1R 途径的变化与大鼠学习记忆功能的变化吻合。陈琪等^[15]关于 IGF-1 的动物实验证实,IGF-1 能够减轻缺血缺氧引起的脑细胞线粒体途径凋亡,减少 Cyt-C 及 cleaved Caspase-3 的表达,提示 IGF-1R 途径具有抑制线粒体途径凋亡的作用。本实验在此基础上进一步观察了 rTMS 干预对脑梗死恢复期大鼠海马中线粒体途径凋亡的影响,rTMS 干预后海马中的细胞凋亡率及 Cyt-C、cleaved Caspase-3 的表达均明显减少,而联用 ADW742 后海马中的细胞凋亡率及 Cyt-C、cleaved Caspase-3 的表达均明显增加,表明 rTMS 能够抑制脑梗死恢复期大鼠海马的线粒体途径凋亡且这一抑制作用与激活 IGF-1R 有关,通过 IGF-1R 途径抑制海马的线粒体途径凋亡也可能是 rTMS 改善学习记忆功能的分子机制。

综上所述,rTMS 能够改善脑梗死恢复期大鼠学习记忆功能,激活海马中 IGF-1R 途径并抑制线粒体途径凋亡是相关的分子机制之一,今后可进一步开展动物实验,研究更多与 rTMS 治疗作用相关的分子机制,以更深入认知 rTMS 的治疗价值。

[参考文献]

[1] 何予工,周青. 重复经颅磁刺激对非痴呆型血管性认知功能障碍的影响[J]. 中华物理医学与康复杂志, 2017, 39(6):

464-466.

- [2] Wang X, Mao Z, Ling Z, et al. Repetitive transcranial magnetic stimulation for cognitive impairment in Alzheimer's disease: a meta-analysis of randomized controlled trials[J]. J Neurol, 2020, 267(3): 791-801.
- [3] van Lieshout ECC, van Hooijdonk RF, Dijkhuizen RM, et al. The effect of noninvasive brain stimulation on poststroke cognitive function: a systematic review[J]. Neurorehabil Neural Repair, 2019, 33(5): 355-374.
- [4] King M, Kelly LP, Wallack EM, et al. Serum levels of insulin-like growth factor-1 and brain-derived neurotrophic factor as potential recovery biomarkers in stroke[J]. Neurol Res, 2019, 41(4): 354-363.
- [5] Ong LK, Chow WZ, TeBay C, et al. Growth hormone improves cognitive function after experimental stroke[J]. Stroke, 2018, 49(5): 1257-1266.
- [6] 张志强,张莉,张跃奇. 重复经颅磁刺激对卒中后大鼠的学习记忆功能和海马区胰岛素样生长因子1表达的影响[J]. 中国康复医学杂志, 2018, 33(9): 1024-1028, 1049.
- [7] Martins AS, Ordoñez JL, García-Sánchez A, et al. A pivotal role for heat shock protein 90 in Ewing sarcoma resistance to anti-insulin-like growth factor 1 receptor treatment: in vitro and in vivo study[J]. Cancer Res, 2008, 68(15): 6260-6270.
- [8] Kini S, Memon F, Asgaonkar D. Outcome in survivors of middle cerebral artery territory ischemic stroke: can it be predicted? [J]. J Assoc Physicians India, 2019, 67(4): 46-50.
- [9] Lei C, Deng Q, Li H, et al. Association between silent brain infarcts and cognitive function: a systematic review and meta-analysis[J]. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2019, 28(9): 2376-2387.
- [10] 高微,吴伟,周凯丽,等. 胰岛素样生长因子1在神经系统变性病中的作用[J]. 中风与神经疾病杂志, 2019, 36(4): 377-379.
- [11] 吴连连,袁红花,朱孝荣. 外源性胰岛素样生长因子1对老年小鼠认知功能的影响[J]. 中国现代医学杂志, 2017, 27(3): 22-26.
- [12] Farias Quipildor GE, Mao K, Hu Z, et al. Central IGF-1 protects against features of cognitive and sensorimotor decline with aging in male mice[J]. Geroscience, 2019, 41(2): 185-208.
- [13] Fulop GA, Ramirez-Perez FI, Kiss T, et al. IGF-1 deficiency promotes pathological remodeling of cerebral arteries: a potential mechanism contributing to the pathogenesis of intracerebral hemorrhages in aging[J]. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2019, 74(4): 446-454.
- [14] Logan S, Pharaoh GA, Marlin MC, et al. Insulin-like growth factor receptor signaling regulates working memory, mitochondrial metabolism, and amyloid- β uptake in astrocytes[J]. Mol Metab, 2018, 9: 141-155.
- [15] 陈琪,步仰高,王杨,等. IGF-1对缺氧缺血性脑损伤新生小鼠脑细胞线粒体 Cyt-C、caspase-3 表达的影响[J]. 安徽医科大学学报, 2014, 49(10): 1422-1427.

(此文编辑 朱雯霞)