

· 基础研究 ·

康复训练对血管性痴呆大鼠海马 β 淀粉样多肽及胰岛素降解酶的影响

叶青 王红卫 游咏 黄海芬 廖慧颖 潘思 黄雁

【摘要】目的 观察康复训练对血管性痴呆 (VD) 大鼠海马 β -淀粉样多肽 ($A\beta$) 及胰岛素降解酶 (IDE) 的影响。**方法** 共选取 30 只 SD 大鼠, 采用随机数字表法将其分为康复组、模型组及假手术组。选用结扎双侧颈总动脉方法制成 VD 大鼠模型, 康复组每天进行 1 h 康复训练。于术后第 4 周进行行为学测试, 以评估各组大鼠学习记忆能力; 待行为学测试结束后采用免疫组化法检测各组大鼠海马 (DG) 区 $A\beta$ 及 IDE 表达。**结果** 术后第 4 周时发现康复组大鼠学习记忆功能明显优于模型组 ($P < 0.05$); 且康复组大鼠海马区 $A\beta$ 表达较模型组显著降低 ($P < 0.05$), IDE 表达则较模型组明显增高 ($P < 0.05$)。**结论** 康复训练能改善 VD 大鼠学习记忆功能, 其治疗机制可能与上调 IDE 表达、减少 $A\beta$ 在海马中的蓄积有关。

【关键词】 血管性痴呆; 康复训练; β -淀粉样多肽; 胰岛素降解酶

The effects of rehabilitation training on amyloid-beta peptide and insulin-degrading enzyme levels in the hippocampus of rats with vascular dementia YE Qing, WANG Hong-wei, YOU Yong, HUANG Hai-fen, LIAO Hui-ying, PAN Si, HUANG Yan. Department of Neurology, First Affiliated Hospital of Nanhua University, Hengyang 421001, China

Corresponding author: YOU Yong, Email: xhjyy88@yahoo.com

【Abstract】Objective To investigate the effects of rehabilitation training on hippocampal amyloid-beta peptide ($A\beta$) and insulin-degrading enzyme (IDE) levels in vascular dementia (VD). **Methods** Thirty female Sprague-Dawley rats were randomly assigned to a rehabilitation group ($n = 10$), a model group ($n = 10$) or a sham-operation group ($n = 10$). An experimental VD model was established in the rats of the first 2 groups by bilateral common carotid artery permanent ligation. The rats in the rehabilitation group then received 1 h of rehabilitation training daily. Learning and memory were assessed at 4 weeks after the operation. Immunohistochemical staining was used to detect $A\beta$ and IDE expression in the hippocampus dentate gyrus (DG) area. **Results** The rats in the rehabilitation group showed significantly better learning ability compared with the model group. The expression of $A\beta$ in the rehabilitation group was significantly less than in the model group. The expression of IDE in the rehabilitation group was significantly greater. **Conclusion** Rehabilitation can accelerate the recovery of learning and memory in VD, at least in rats. The mechanism is possibly related to decreased accumulation of $A\beta$ in the hippocampus due to up-regulation of the expression of IDE.

【Key words】 Vascular dementia; Rehabilitation; Amyloid-beta peptide; Insulin-degrading enzyme

据相关研究报道, β -淀粉样多肽 (amyloid-beta peptide, $A\beta$) 在脑内聚集、沉淀可形成老年斑, 是阿尔茨海默病 (Alzheimer disease, AD) 最主要的发病机制之一^[1]。近年来有研究表明, 大脑低灌注可促进 $A\beta$ 分泌与沉淀, 并随着 $A\beta$ 蓄积量增加, 大脑可出现类似 AD 样病理改变, 导致机体认知功能出现进行性损伤^[2]。因此如何清除 $A\beta$ 对保护脑组织功能具有重要意义。临床上血管性痴呆 (vascular dementia, VD) 患

者经康复训练后其病情通常可获得一定程度改善^[3], 其治疗机制是否与清除 $A\beta$ 有关目前尚未明确。由于胰岛素降解酶 (insulin-degrading enzyme, IDE) 是机体降解 $A\beta$ 的主要酶之一, 故本研究通过制作 VD 大鼠模型并给予康复训练, 观察训练前、后大鼠海马区 (dentate gyrus, DG) $A\beta$ 及 IDE 表达变化情况, 从而初步探讨康复训练治疗 VD 的可能机制。

材料与方法

一、主要实验动物及材料

共选取 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 30 只, 雄性, 体重 250 ~ 280 g, 由南华大学实验动物学部提供; 主要实验试剂及仪器包括兔抗大鼠 $A\beta$ 1-42 多克隆抗体 (北

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2012.010.001

基金项目: 衡阳市科技局课题 (2010kj43), 湖南省卫生计生厅课题 (2010-66)

作者单位: 421001 衡阳, 南华大学附属第一医院神经内科
通信作者: 游咏, Email: xhjyy88@yahoo.com

京博奥森公司)、兔抗大鼠胰岛素降解酶多克隆抗体(北京博奥森公司)、即用型快速免疫组化 MaxVision™ 检测试剂盒(福建迈新公司)及 MOTIC images advanced 3.2 版数码医学图像分析系统。

二、动物分组及制模

采用随机数字表法将其分为康复组、模型组及假手术组,每组 10 只大鼠。选用双侧颈总动脉永久结扎法制作 VD 大鼠模型,具体制模方法如下:大鼠术前 12 h 禁食,术前 4 h 禁水,按每千克体重 3 ml 腹腔注射水合氯醛(10%),待麻醉剂生效后将大鼠仰卧位固定,颈部去毛、消毒、铺无菌巾,行颈部正中切口,小心分离双侧颈总动脉,尽量避免过度牵拉迷走神经,用 0 号线结扎双侧颈总动脉远、近端,并从中间剪断颈总动脉以确保阻断双侧颈总动脉血流,术后缝合切口、消毒,切口涂洒青霉素粉,放回笼中饲养。假手术组除不阻断双侧颈总动脉血流外,其余操作过程均与模型组相同。

三、制模后干预

康复组大鼠于制模后每天进行康复训练,包括:①滚笼训练,所用滚筒式网状训练器为长 1 m、直径 60 cm 的圆筒状网状器,中间分为 4 格,可同时训练 4 只大鼠,底座有一固定架,一端有一手摇柄,以 5 r/min 转动滚笼,该训练主要是提高大鼠的抓握、旋转及爬行功能。②平衡木训练,所用平衡木为一根长 120 cm、宽 2 cm 的方木棒,平放于距地面 7 cm 处,将大鼠放于平衡木上来回爬行以训练其平衡功能。上述各项训练每次持续 15 min,中间休息 10 min,每天训练 2 次。模型组及假手术组大鼠待制模结束后,均放回笼中自由活动,未给予任何康复训练。整个研究期间各组大鼠均单笼饲养。

四、大鼠行为学检测

于术后 2 d 及 4 周时进行大鼠行为学检测,具体检测项目包括以下内容。

1. Y 迷宫实验:Y 迷宫由南华大学生理学教研室提供,由 3 个等长的黑色臂及三者交界区组成,3 条臂两两间夹角为 120°,呈“Y”形,每条臂长×宽×高分别为 45 cm×14 cm×15 cm。将大鼠置于 Y 迷宫中央的交界区域让其自由活动 8 min,记录其入臂次数及顺序。入臂标准为大鼠后肢完全进入臂内。统计各组大鼠的正确交替率,正确交替率=大鼠连续进入 3 个不同臂次数/(入臂总次数-2)。

2. 新颖物体识别实验:该实验装置由南华大学生理学教研室提供,主要由一个测试盒及 2 套测试物(每套 2 个)组成,测试盒为 0.5 m×0.5 m×0.5 m 塑料盒,内面漆成黑色,底面平铺一层木屑,A 套物体为白色塑料材质,B 套物体为透明玻璃材质,高度约 15~

18 cm,两套物体均足够重以防止大鼠推动。整个测试过程分为适应期、熟悉期和识别期共 3 个阶段。适应期阶段:将大鼠放入测试盒中央,盒内不放置任何物体,让其自行活动 10 min;待适应期结束 24 h 后进入熟悉期阶段,将两个相同测试物体(均属于 A 套或 B 套)放入测试盒内,与侧壁距离均为 10 cm,然后将大鼠置入测试盒正中(与两物体等距),让其自行活动 10 min。测试者分别用秒表记录大鼠在每个测试物体上的探索时间,即鼠嘴凑近测试物体 2 cm 以内或用鼻触测试物体的时间,如大鼠仅在测试物体附近爬行或趴在测试物体上则不计入时间。待熟悉期结束 4 h 后进入测试期阶段,将测试盒中的一个物体替换为另一套样品中的测试物,让大鼠自由活动 3 min,记录每只大鼠探索新、旧物体的时间(与熟悉期计时方法一致),并以此计算分辨指数(discrimination index, DI)以评价大鼠识别能力, $DI = [(N - F) / (N + F)] \times 100\%$, 式中 N 为探索新物体所用的时间, F 为探索旧物体所用的时间。

本研究以假手术组大鼠在制模后第 2 天时的 Y 迷宫正确交替率及新颖物体识别实验 DI 指数均值作为参考值,计算模型组及康复组大鼠在制模后第 2 天时正确交替率及 DI 指数与参考值之差占平均正确交替率或 DI 指数(假手术组的参考值)的比值,如该值 >20% 则提示 VD 大鼠模型制作成功,如达不到痴呆标准则从本研究中剔除,同时补充相应数量的大鼠完成制模。

五、免疫组化检测

3 组大鼠分别于术后第 4 周行为学检查结束后处死,取各组大鼠脑组织置于 pH 值为 7.4 的中性福尔马林缓冲液中固定 12 h,然后按下列步骤脱水,包括自来水洗 30 min,70% 乙醇洗 30 min,95% 乙醇洗 1 h×2 次,100% 乙醇洗 1 h×2 次,二甲苯透明处理 20 min×2 次,浸蜡(温度为 58~60 °C) 3 h,包埋组织切片,取海马冠状位切片(片厚约 4 μm)将其贴附于载玻片上,置于 60~62 °C 烘箱中烤片 4 h 后待测。采用 EnVisionIM 二步法,将石蜡切片经二甲苯脱蜡后,用无水乙醇、95%、80%、70% 乙醇至水化,蒸馏水洗,抗原修复采用高温高压修复(采用 0.01 mol/L 柠檬酸缓冲液, pH 值为 6.0),持续时间 100 s;然后经蒸馏水、磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS)冲洗 5 min×3 次,用 3% H₂O₂ 阻断内源性过氧化物酶 10 min,经 PBS 液冲洗 5 min×3 次后,滴加一抗(兔抗大鼠 Aβ1-42 多克隆抗体,兔抗大鼠 IDE 多克隆抗体,采用 PBS 液代替一抗作空白对照),4 °C 过夜。经 PBS 液冲洗后滴加山羊抗兔 IgG 抗体-HRP 多聚体(37 °C) 孵育 40 min,经 PBS 液冲洗后采用 DAB 显色液显色

3 min。应用 MOTIC images advanced 3.2 版数码医学图像分析系统测定各组大鼠海马区免疫阳性产物(包括 $A\beta$ 、IDE)灰度值,若灰度值越大,则相应免疫阳性物表达强度越弱。

六、统计学分析

本研究所得数据以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,采用 SPSS 13.0 版统计学软件包进行数据分析,按完全随机成组设计资料进行方差分析,组间比较采用单因素方差分析,多个样本均数两两比较采用 q 检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

结 果

一、各组大鼠行为学检查结果分析

模型组、康复组及假手术组大鼠 Y 迷宫正确交替率分别为 (0.40 ± 0.05) 、 (0.57 ± 0.13) 及 (0.75 ± 0.09) ,各组间两两比较,发现差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$)。模型组、康复组及假手术组大鼠新颖物体识别实验 DI 指数分别为 (0.24 ± 0.1) 、 (0.46 ± 0.11) 及 (0.67 ± 0.08) ,各组间两两比较,发现差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$)。上述结果表明,康复组、假手术组 Y 迷宫正确交替率及 DI 指数均显著优于模

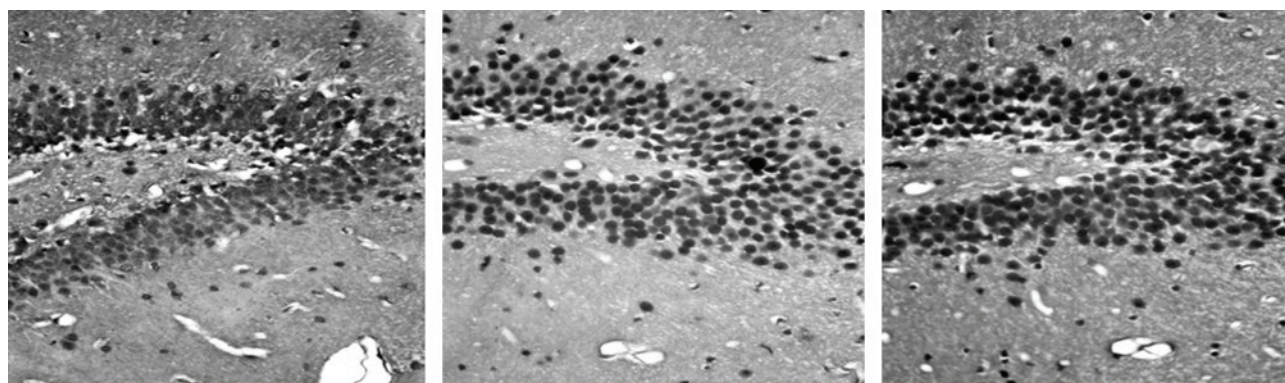
型组,提示康复组及假手术组大鼠认知功能明显优于模型组。

二、各组大鼠海马区 $A\beta$ 及 IDE 检测结果比较

假手术组、康复组及模型组大鼠海马区 $A\beta$ 灰度值分别为 (148 ± 17.67) 、 (131 ± 19.01) 及 (116 ± 23.67) ,各组间两两比较,发现差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$),提示模型组大鼠海马区 $A\beta$ 表达明显强于康复组及假手术组,具体情况见图 1。假手术组、康复组及模型组大鼠海马区 IDE 灰度值分别为 (101 ± 18.11) 、 (126 ± 13.48) 及 (141 ± 23.7) ,各组间两两比较,发现差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$),提示康复组大鼠海马区 IDE 表达明显强于模型组,具体情况见图 2。

讨 论

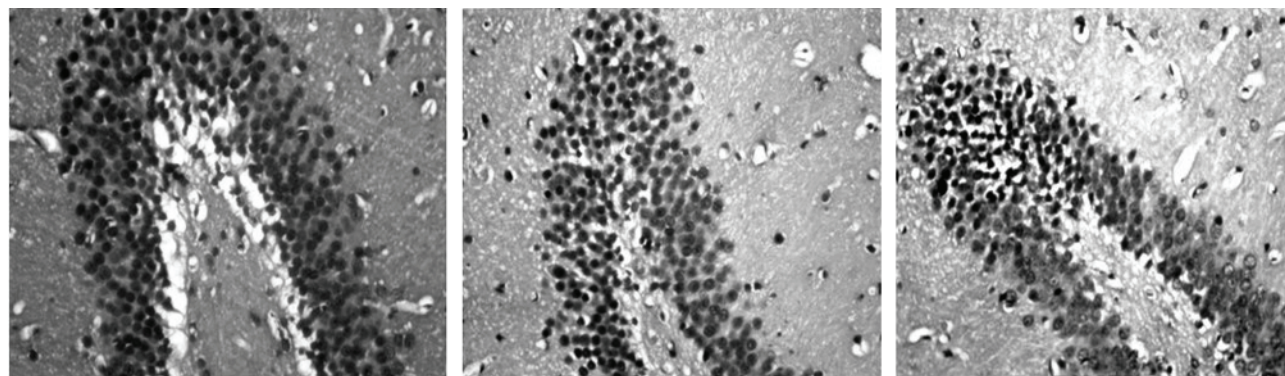
据相关调查统计,我国血管性痴呆(VD)患者占有痴呆患者总数的 30.9%^[4],通过临床早期干预,可有效改善 VD 患者病情,促其认知功能恢复。近年来针对 VD 的治疗方案已成为临床研究热点,有不少文献报道康复训练能改善 VD 大鼠认知功能障碍。本研究也有类似结果发现,如康复组大鼠经滚笼训练及平衡



假手术组

康复组

模型组

图 1 各组大鼠海马区 $A\beta$ 表达情况比较(免疫组化染色, $\times 400$)

假手术组

康复组

模型组

图 2 各组大鼠海马区 IDE 表达情况比较(免疫组化染色, $\times 400$)

木训练后,其 DI 指数、正确交替率等指标均显著高于模型组($P < 0.05$),提示康复训练能在一定程度上改善 VD 大鼠认知功能,增强大脑认知功能“储备”,但其分子机制目前尚未明确。

当前有研究表明,脑缺血能够上调大鼠脑内淀粉样蛋白前体蛋白(amyloid precursor protein, APP)及 β -APP mRNA 表达,同时还能提高 β 分泌酶活性及表达,有利于 $A\beta$ 生成,促其沉积于缺血梗死区周围及含胆碱能丰富的区域(如大脑海马部位等)^[5-7]。随着 $A\beta$ 不断蓄积,可产生一系列毒性作用,不仅能直接损伤神经元,而且还能增强、放大各种伤害性刺激对神经元的损伤作用,并诱导神经元对各种伤害性刺激的敏感性增强;另外 $A\beta$ 还能促使各种毒性反应及伤害性刺激连锁激发形成毒性网络,加快神经元凋亡及坏死。有研究证明,脑缺血所致 $A\beta$ 升高与认知功能呈负相关性^[8]。本研究也有类似结果发现,如模型组与假手术组比较,发现前者海马区 $A\beta$ 表达明显增强($P < 0.05$);而康复组大鼠经滚笼及平衡木训练后,其海马区 $A\beta$ 表达较模型组明显降低($P < 0.05$),学习、记忆能力也有显著改善,提示康复训练改善 VD 大鼠认知功能可能与清除海马部位 $A\beta$ 有关。

胰岛素降解酶(IDE)是体内清除 $A\beta$ 的关键酶之一^[9]。在针对 AD 模型大鼠的研究中,发现 IDE 激动剂可显著减少 $A\beta$ 在脑内的蓄积,从而改善 AD 模型大鼠认知功能^[10]。本研究康复组大鼠经滚笼及平衡木训练后,除了发现 $A\beta$ 在脑内海马区蓄积减少及认知功能改善外,还观察到康复组大鼠海马区 IDE 表达较模型组明显增强($P < 0.05$),提示康复训练可能通过上调 IDE 表达促进 $A\beta$ 降解。至于康复训练上调 IDE 表达的具体机制尚未明确。近年来有研究表明,急性脑缺血大鼠容易出现高胰岛素血症^[11],在高水平胰岛素作用下,胰岛素与 $A\beta$ 竞争性结合 IDE,由于 IDE 与胰岛素的亲和力大于 $A\beta$,将直接导致 IDE 清除 $A\beta$ 的能力下降,从而加剧 $A\beta$ 在神经元内聚集,导致认知功能受损^[12]。康复训练可增强脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)表达^[13],而 BDNF 能改善机体胰岛素抵抗^[14],降低胰岛素水平,进而提高 IDE 活性及表达,有助于促进 $A\beta$ 降解,但该机制还有待进一步研究证实。

综上所述,本研究结果表明,康复训练能明显改善 VD 大鼠认知障碍,其治疗机制可能与康复训练上调 IDE 表达、促进 $A\beta$ 降解,从而减少 $A\beta$ 在海马区聚集及沉淀有关。

参 考 文 献

- [1] Choi BR, Lee SR, Han JS, et al. Synergistic memory impairment through the interaction of chronic cerebral hypoperfusion and amyloid toxicity in a rat model. *Stroke*, 2011, 42:2595-2604.
- [2] Wang X, Xing A, Xu C, et al. Cerebrovascular hypoperfusion induces spatial memory impairment, synaptic changes, and amyloid- β oligomerization in rats. *J Alzheimers Dis*, 2010, 21:813-822.
- [3] Quaney BM, Boyd LA, McDowd JM, et al. Aerobic exercise improves cognition and motor function poststroke. *Neurorehabil Neural Repair*, 2009, 23:879-885.
- [4] Zhang Y, Xu Y, Nie H, et al. Prevalence of dementia and major dementia subtypes in the Chinese populations: a meta-analysis of dementia prevalence surveys. *J Clin Neurosci*, 2012, 19:1333-1337.
- [5] Shi J, Yang SH, Stubble L, et al. Hypoperfusion induces overexpression of β -amyloid precursor protein mRNA in a focal ischemic rodent model. *Brain Res*, 2000, 853:1-4.
- [6] Wen Y, Onyewuchi O, Yang S, et al. Increased beta-secretase activity and expression in rats following transient cerebral ischemia. *Brain Res*, 2004, 1009:1-8.
- [7] Nihashi T, Inao S, Katita Y, et al. Expression and distribution of β -amyloid precursor protein and β -amyloid peptide in reactive astrocytes after transient middle cerebral artery occlusion. *Acta Neurochir*, 2001, 143:287-295.
- [8] Zhiyou C, Yong Y, Shanquan S, et al. Upregulation of BACE1 and b-Amyloid protein mediated by chronic cerebral hypoperfusion contributes to cognitive impairment and pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neurochem Res*, 2009, 34:1226-1235.
- [9] 王颖玉, 吴晶, 洪浩, 等. 脑内 β 淀粉样蛋白水平的调节. *中国临床药理学与治疗学*, 2009, 14:711-715.
- [10] 赵倩华, 罗玉敏, 周玢, 等. 碘乙酰胺对 $A\beta$ 海马注射 AD 模型大鼠认知及生化作用的研究. *中国病理生理杂志*, 2006, 22:2090-2093.
- [11] Wang YY, Lin SY, Chuang YH, et al. Adipose proinflammatory cytokine expression through sympathetic system is associated with hyperglycemia and insulin resistance in a rat ischemic stroke model. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2011, 300:155-163.
- [12] Farris W, Mansourian S, Chang Y, et al. Insulin-degrading enzyme regulates the levels of insulin, amyloid beta-protein and the beta-amyloid precursor protein intracellular domain in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100:4162-4167.
- [13] Cotman CW, Berchtold NC. Physical activity and the maintenance of cognition: learning from animal models. *Alzheimers Dement*, 2007, 3: S30-37.
- [14] Fujinami A, Ohta K, Obayashi H, et al. Serum brain-derived neurotrophic factor in patients with type 2 diabetes mellitus: relationship to glucose metabolism and biomarkers of insulin resistance. *Clin Biochem*, 2008, 41:812-817.

(修回日期:2012-09-26)

(本文编辑:易 浩)