

研究论文

不同疗程电针对放射性脑损伤小鼠突触超微结构及突触功能相关蛋白的影响

武鑫, 李炎辉, 张文靖, 张松江, 高剑峰*

河南中医药大学基础医学院, 郑州 450046

摘要: 本研究旨在探讨不同疗程电针穴位干预对放射线照射所致脑损伤模型小鼠突触结构及突触功能相关蛋白表达的影响。60只1月龄C57BL/6J雄性小鼠随机分为对照组、放射性脑损伤模型组、电针1周组、电针2周组、电针3周组和电针对照组。模型组小鼠接受X-射线照射(8 Gy, 10 min)建立放射性脑损伤模型, 电针组在X-射线照射后分别接受1周、2周和3周电针穴位(百会、风府、双侧肾俞)干预, 电针对照组在照射后进行非穴位电针干预。免疫组织化学染色检测海马CA1区突触超微结构, RT-qPCR和Western blot检测脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)、突触蛋白-1 (synapsin-1)和突触后致密蛋白95 (postsynaptic density 95, PSD95)的基因和蛋白表达。结果显示, 与对照组比较, 模型组和电针对照组小鼠神经元核间隙明显减小, 神经元核质比显著增大, 突触间隙和突触后致密物(postsynaptic density, PSD)厚度则明显降低, 线粒体表面积密度、体密度和比表面均显著降低。与模型组比较, 电针2周组小鼠的神经元核质比显著减小, PSD厚度显著增加, 线粒体体密度显著增加; 电针3周组小鼠核间隙显著增加, 核质比显著减小, 突触间隙和PSD厚度均显著增大, 线粒体表面积密度和比表面均显著增加。此外, 与对照组比较, 模型组和电针对照组小鼠海马CA1区BDNF、synapsin-1、PSD95基因及蛋白表达均不同程度地下降。而与模型组比较, 电针各组synapsin-1基因表达均显著上调, 电针1和2周组BDNF基因表达显著上调, 电针2周组PSD95基因表达显著上调, 而电针各组3种蛋白表达均显著上调。以上结果表明, 放射线照射损伤小鼠海马CA1区突触超微结构及突触功能相关蛋白表达, 电针干预可显著改善放射线照射所导致的突触结构和功能损伤。

关键词: 电针; 海马区; 突触结构; 突触可塑性

中图分类号: R338

Effects of electroacupuncture with different courses on the synaptic structure and synaptic function-related proteins in mice with radiation-induced brain injury

WU Xin, LI Yan-Hui, ZHANG Wen-Jing, ZHANG Song-Jiang, GAO Jian-Feng*

School of Basic Medicine, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China

Abstract: The aim of the present study was to investigate the effects of different courses of electroacupuncture on synaptic structure and synaptic function-related proteins expression in the hippocampal CA1 region of radiation-induced brain injury mice. Sixty C57BL/6J male mice were randomly divided into control group, radiation-induced brain injury model group, 1-week electroacupuncture group (EA1), 2-week electroacupuncture group (EA2), 3-week electroacupuncture group (EA3), and electroacupuncture-control (EA-Ctrl) group. The mice in model group were exposed to X-ray irradiation (8 Gy, 10 min) to establish radiation-induced brain injury model. The mice in EA groups were acupunctured at electroacupuncture points (Baihui, Fengfu and bilateral Shenshu) for 1 week, 2 weeks and 3 weeks respectively after radiation. Immunohistochemistry was used to observe synaptic structure in hippocampal CA1

Received 2021-01-16 Accepted 2021-05-13

This work was supported by the Natural Science Foundation of Henan Province (No. 202300410267), the Key Research and Development Breakthrough-Science Program in Henan Province (No. 212102311082), the PhD Research Fund of Henan University of Chinese Medicine (No. BSJJ-201510), and the Young Backbone Teacher in Colleges and Universities Training Program of Henan Province (No. 2021GGJS085), China.

*Corresponding author. Tel: +86-371-65676898; E-mail: jc.gjfeng@hotmail.com

region. The expressions of brain-derived neurotrophic factor (BDNF), synapsin-1 and postsynaptic density 95 (PSD95) in the hippocampal CA1 region of each group were detected by RT-PCR and Western blotting. The results showed that the nuclear gap in model and EA-Ctrl groups was significantly decreased compared to control group, however nucleus to cytoplasm ratio was significantly increased. The synaptic cleft, postsynaptic density (PSD) thickness, the mitochondrial surface density, volume density and specific surface area were significantly reduced. Compared with model group, the nucleus to cytoplasm ratio of EA2 group was significantly decreased, the PSD thickness and mitochondrial volume density were significantly increased; the nuclear gap of EA3 group was significantly increased, nucleus to cytoplasm ratio was significantly decreased, synaptic cleft and PSD thickness were significantly increased, and the mitochondrial surface density and specific surface area were all increased significantly. In addition, compared with the control group, the gene and protein expressions of BDNF, synapsin-1 and PSD95 in the hippocampal CA1 region of the model group and EA-Ctrl group were significantly decreased. However, compared with the model group, the gene expression of synapsin-1 in EA groups was significantly up-regulated, the gene expression of BDNF in EA1 and EA2 groups was significantly up-regulated, and the gene expression of PSD95 in EA2 group was significantly up-regulated. Moreover, the protein expressions of BDNF, synapsin-1 and PSD95 of EA groups were significantly up-regulated compared with the model group. These results indicate that the synaptic structure and the expression of synaptic function-related proteins in hippocampal CA1 region were injured by radiation exposure, whereas electroacupuncture intervention can significantly improve the synaptic structure and function damage caused by radiation.

Key words: electroacupuncture; hippocampus; synaptic structure; synaptic plasticity

突触是神经元与神经元之间完成信息传递的功能结构, 在维持神经元之间相互联系中起到重要作用。突触数量和突触结构的完整是神经系统实现功能的基础。而突触的形成与功能可通过相关功能蛋白如突触蛋白-1 (synapsin-1)、突触后致密蛋白 95 (postsynaptic density 95, PSD95) 等体现^[1]。放射线脑损伤是神经系统肿瘤放疗后的严重并发症之一, 到目前为止尚没有有效防治措施^[2]。我们前期实验结果表明, 给予 X-射线照射 (8 Gy) 可显著诱发小鼠海马区神经元的凋亡, 认知功能受损, 主要表现为旷场实验中模型鼠的水平及垂直运动次数显著减少, 新物体认知指数显著下降, 而给予电针穴位干预可抑制神经元凋亡, 改善模型鼠认知功能受损, 说明电针干预对放射线照射损伤具有一定的保护作用^[3]。正常的突触结构与功能是大脑实现高级功能如认知功能、学习记忆的基础。因此我们在前期实验结果的基础上, 从中枢神经系统中认知及学习记忆核心区海马 CA1 区突触结构及功能相关蛋白表达的角度, 探讨电针干预对放射线照射所致脑损伤的保护作用及机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物分组 60只C57BL/6J小鼠, 雄性, 1月龄, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 动物合格证号: 11400700063049。动物实验方案经河南中医药大学实验动物伦理委员会审核批准, 符合科技部《关于善待实验动物的指导意见》

和《河南中医药大学实验动物伦理委员会章程》。将实验小鼠置于7:00~19:00光照、19:00~7:00黑暗的实验室, 食水不限。适应性饲养一周, 随机将其分为对照组、放射线照射模型组、电针1周组、电针2周组、电针3周组、电针对照组, 每组10只。

1.2 主要设备及试剂 Morris水迷宫 (淮北正华生物仪器设备有限公司); 电针仪 (上海华谊医用仪器, G6805-2A); 低温高速离心机 (日立, CF6RX II); 直线加速器 (Varian Clinac 600 CD, Radiation Oncology Systems, San Diego, CA, USA); 核酸定量仪 (岛津, Biospec-nano); 生物分子成像仪 (富士, LAS-4000MINI); 凝胶成像仪 (Bio-Rad); 显微镜 (OLYMPUS, DP73); 透射显微镜 (JEM-1400); 图像分析 (CellSens dIMENSION 1.11); 图像分析系统 ImageJ (National Institutes of Health, USA); β -actin 抗体 (Abcam); synapsin-1 抗体 (Abcam, ab64581); BDNF 抗体 (Servicebio, GB11559); PSD95 抗体 (Servicebio, GB11277); HRP 标记的羊抗兔 IgG (北京中杉金桥生物技术有限公司, ZB-2301), BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (北京赛默生物科技有限公司, 300000-B), PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas, SM0671), eECL Western Blot Kit 高灵敏度化学发光检测试剂盒 (北京康为世纪生物科技有限公司, CW0049)。

1.3 放射性脑损伤模型制备 具体方法参考发表文献^[4]。将雄性 C57/BL6J 模型组小鼠腹腔注射 2% 戊巴比妥钠 (0.1 mL/10 g) 进行麻醉, 小鼠俯卧位固定

于垫有聚乙烯膜的放射平台, 大脑半球照射范围为 $1\text{ cm} \times 2\text{ cm}$, 射线源距离脑为 99.5 cm , 铅模覆盖避免其他系统受照射损伤, 照射剂量为 8 Gy , 剂量率为 400 cGy/min 。照射剂量变异约 $\pm 5\%$ 。放射线照射时间为 10 min , 完成后将小鼠送回鼠笼, 按照实验分组于第二天开始不同疗程电针干预。对照组小鼠麻醉后进行假照射。

1.4 电针干预方法 对照组和模型组不进行电针干预。电针组参考文献^[3]分别取穴位百会: 顶骨正中, 风府: 枕骨项脊后枕寰关节背凹陷处, 肾俞: 第2腰椎后两旁凹陷处, 取回路1(百会和风府)、回路2(双侧肾俞)用无菌针灸针(苏州医疗用品厂, $0.30\text{ mm} \times 13\text{ mm}$)向后斜刺入皮下约 1 mm , 然后连接电针仪正负极, 设置刺激电流参数为: 疏密波, 电压 1.5 V , 频率 10 Hz , 波宽 1 ms , 电针每天一次, 每次 30 min ^[4]。电针1周组: 连续电针1周, 电针2周组: 连续电针两周, 电针3周组: 连续电针3周。电针对照组的针刺位置: 非穴位1: 尾根前 0.5 cm , 后背正中线旁开 0.3 cm ; 非穴位2: 尾根前 1.0 cm , 后背正中线旁开 0.3 cm , 取回路1(左侧非穴位1和2)、回路2(右侧非穴位1和2)进行电针干预, 每天一次, 每次 30 min , 连续电针3周。

1.5 突触超微结构形态检测 电针干预结束后, 2% 戊巴比妥钠麻醉小鼠, 开胸暴露心脏, 穿刺针从左心室插入, 打开右心耳并用PBS灌注 10 min , 当流出液体清亮后, 4% 多聚甲醛灌注固定, 快速断头取脑, 多聚甲醛固定, 取出固定完成的海马组织样品, PBS漂洗4次, 每次 10 min , 然后用 1% 锇酸进行固定 1.5 h , PBS漂洗4次, 每次 10 min , 进行脱水处理, 按 $30\% \rightarrow 50\% \rightarrow 70\%$ (过夜) $\rightarrow 90\% \rightarrow 100\%$ I丙酮脱水 10 min , 然后浸入 100% II、III丙酮各 45 min , 添加环氧树脂812, 4 h 后进行聚合包埋, 包埋条件为: $37\text{ }^\circ\text{C}\ 12\text{ h} \rightarrow 45\text{ }^\circ\text{C}\ 12\text{ h} \rightarrow 60\text{ }^\circ\text{C}\ 24\sim 48\text{ h}$ 。待包埋组织完全聚合后进行修整, 最后切片厚度 70 nm 。超薄切片染色方法为柠檬酸铅染色 5 min 后醋酸双氧铀染色 25 min 。透射电子显微镜JEM1400观察并拍照留存。观察大鼠海马神经元、神经元中线粒体数量、突触超微结构。依据统计需要选取不同放大倍数电镜图片进行海马神经元、神经元中细胞器及突触超微结构定量分析: 每组取2个组织, 每个组织取3个细胞, 每个细胞选5个细胞器, 样本共计 $n = 30$ 。利用ImageJ软件测量图像参数, 采用多点平均法测量突触前后膜的间隙(nm)、

突触后致密物(postsynaptic density, PSD)厚度(nm), 测量神经元胞体面积和胞核面积, 计算核质比 = 胞核面积/胞体面积, 测量有效线粒体轮廓的面积、周长和最大长宽比, 利用交点计数法计算线粒体表面积密度、体密度, 计算比表面 = 线粒体表面积/线粒体体积。

1.6 基因表达检测 RT-qPCR进行基因表达检测, 无需进行灌注, 取各组小鼠海马区新鲜组织置于液氮 3 h , 然后将其移入 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱备用。利用RNA提取试剂盒提取总RNA, 利用紫外线分光光度计测定 $260\text{ nm}/286\text{ nm}$ 吸光度比值, 并用琼脂糖电泳鉴定其纯度。采用Primer Premier 5.0设计检测基因引物, 其中synapsin-1基因引物正义链为 $5'\text{-ATCCTCTCCTGGAGCTCTGA-3}'$, 反义链为 $5'\text{-GGGCTTCTTATGGAATTGGA-3}'$; BDNF基因引物正义链为 $5'\text{-CAGTATTAGCGAGTGGGTCA-3}'$, 反义链为 $5'\text{-CCGAACATACGATTGGGT-3}'$; PSD95基因引物正义链为 $5'\text{-CATCTCCTTCATCCTTGCTG-3}'$, 反义链为 $5'\text{-ATGTCGTCGGTCTCACTGTC-3}'$; 内参基因 $\beta\text{-actin}$ 引物正义链为 $5'\text{-CAGGCATTGCTGACAGGATG-3}'$, 反义链为 $3'\text{-TGCTGATCCACATCTGCTGG-5}'$ 。PCR反应程序: $95\text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 1 min , $95\text{ }^\circ\text{C}$ 变性 15 s , $60\text{ }^\circ\text{C}$ 退火 1 min 。PCR产物用含 $0.5\text{ }\mu\text{g/mL}$ 溴乙啶的 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离, LAS1000 CCD曝光系统进行检测。取平均值为样品的Ct值, 并计算目的基因的相对表达量。

1.7 Western blot检测蛋白表达 常规海马组织提取蛋白质, 将蛋白标本加入等量 $3 \times \text{SDS-PAGE}$ (聚丙烯酰胺凝胶电泳)缓冲液, $96\text{ }^\circ\text{C}$ 加热 5 min , 采用 $4\%\sim 20\%$ 的Tris-Glycine胶电泳 90 min 进行蛋白分离, 转移至硝酸纤维素膜, 然后采用含 5% 脱脂牛奶的TBST-T($30\text{ mmol/L Tris-HCl}$, $\text{pH } 7.5$, 100 mmol/L NaCl , $0.1\% \text{ Tween } 20$)在室温条件下振荡封闭 1 h , 采用 $1 \times \text{TBST-T}$ 反复洗涤, 然后与synapsin-1抗体、BDNF抗体、PSD95抗体、 $\beta\text{-actin}$ 抗体(均 $1:1\ 000$ 稀释)在 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育过夜。随后取出膜用TBST漂洗4次, 每次 5 min , 与过氧化物酶标记的二抗($1:3\ 000$ 稀释)进行室温振荡孵育 1 h , TBST洗涤, 然后在显色底物液(Pierce, Rockford, IL)中显色, 采用LAS1000 CCD曝光系统检测特异性条带, 以 $\beta\text{-actin}$ 作为内参蛋白对样品条带进行半定量分析。

1.8 统计学方法 实验数据均以 $\text{mean} \pm \text{SEM}$ 表

示, 数据采用Graphpad Prism 6.0软件进行统计分析, 多样本比较采用单因素方差分析结合Tukey's多重比较检测, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 不同疗程电针对海马CA1区突触超微结构的影响

电镜下观察到对照组海马CA1区突触结构完

整, 神经元核间隙清晰, 模型组海马CA1区神经元核间隙边缘不清晰(图1)。表1结果显示, 与对照组比较, 模型组和电针对照组小鼠海马CA1区的神经元核间隙明显降低($P < 0.0001$), 神经元核质比显著增大($P < 0.01$)。而与模型组比较, 电针2周组小鼠的神经元核质比显著减小($P < 0.05$); 电针3组小鼠核间隙显著增加($P < 0.01$), 核质比显

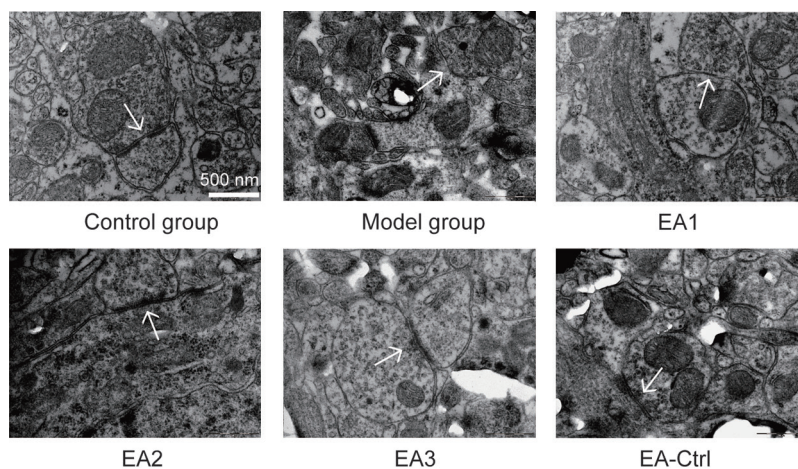


图 1. 各组小鼠海马CA1区突触超微结构示意图

Fig. 1. The diagram of synapse structure in the hippocampal CA1 region of each group of mice. Model group: radiation-induced brain injury model group; EA1: 1-week electroacupuncture group; EA2: 2-week electroacupuncture group; EA3: 3-week electroacupuncture group; EA-Ctrl: electroacupuncture-control group. The arrow marks indicate the typical synaptic structure. Scale bar, 500 nm.

表 1. 各组小鼠海马CA1区神经元核质比和核间隙

Table 1. The ratio of nucleus to cytoplasm and nuclear gap in the hippocampal CA1 region of each group of mice

Groups	<i>n</i>	Nuclear gap (nm)	Ratio of nucleus to cytoplasm
Control	30	61.14 ± 8.63	0.37 ± 0.07
Model	30	38.71 ± 7.75 ^{****}	1.59 ± 0.26 ^{**}
EA1	30	33.78 ± 4.63	1.57 ± 0.96
EA2	30	42.33 ± 4.22	0.85 ± 0.39 [#]
EA3	30	53.33 ± 4.50 ^{###&}	0.63 ± 0.24 ^{###&}
EA-Ctrl	30	37.75 ± 8.64 ^{****}	1.15 ± 0.40 ^{**}

Mean ± SEM. ^{**} $P < 0.01$, ^{****} $P < 0.0001$ vs control group; [#] $P < 0.05$, ^{###} $P < 0.01$ vs model group; [&] $P < 0.05$ vs EA1 group.

表 2. 各组小鼠海马CA1区突触间隙和PSD厚度

Table 2. The synaptic cleft and postsynaptic density (PSD) thickness in the hippocampal CA1 region of each group of mice

Groups	<i>n</i>	Synaptic cleft (nm)	PSD thickness (nm)
Control	30	25.51 ± 3.56	18.90 ± 7.46
Model	30	19.34 ± 5.29 ^{**}	11.37 ± 5.03 [*]
EA1	30	22.30 ± 5.62	16.01 ± 3.17
EA2	30	20.24 ± 4.81	18.91 ± 4.06 [#]
EA3	30	32.71 ± 5.55 ^{####&&}	29.63 ± 4.20 ^{####&&}
EA-Ctrl	30	20.24 ± 3.61 ^{**}	12.05 ± 5.46 [*]

Mean ± SEM. ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ vs control group; [#] $P < 0.05$, ^{####} $P < 0.0001$ vs model group; ^{&&} $P < 0.01$, ^{&&&} $P < 0.001$ vs EA1 & EA2 groups.

著减小 ($P < 0.01$)。三个电针组间比较, 电针 3 周组作用最为显著, 其与电针 1 周组比较核间隙和核质比均具有显著性差异 ($P < 0.05$)。表 2 结果显示, 与对照组比较, 模型组和电针对照组小鼠突触间隙、PSD 厚度明显降低 ($P < 0.01, P < 0.05$)。与模型组比较, 电针 2 周组小鼠突触 PSD 厚度显著增加 ($P < 0.05$), 而电针 3 周组小鼠突触间隙和 PSD 厚度均显著增大 ($P < 0.001$)。电针 3 周组与电针 1 和 2 周组比较, 突触间隙和 PSD 厚度均具有显著差异性, 作用效果最显著 ($P < 0.01, P < 0.001$)。电镜下观察

到模型组和电针对照组小鼠的线粒体嵴断裂紊乱, 部分结构消失; 与模型组比较, 电针 1、2 和 3 周组小鼠线粒体结构完整, 无显著损伤 (图 1)。表 3 结果显示, 与对照组比较, 模型组和电针对照组的小鼠海马 CA1 区线粒体表面积密度、体密度、比表面显著降低 (模型组: $P < 0.001, P < 0.01, P < 0.01$; 电针对照组: $P < 0.0001, P < 0.01, P < 0.05$)。与模型组比较, 电针 1 周组小鼠线粒体表面积密度、比表面和体密度均不同程度增加, 但不具统计学差异性, 电针 2 周组小鼠海马 CA1 区线粒体体

表 3. 各组小鼠海马 CA1 区神经元线粒体表面积密度、体密度及比表面

Table 3. The mitochondrial surface density (S_{vmit}), volume density (V_{vmit}) and specific surface area (δ_{mit}) in the hippocampal CA1 region of each group of mice

Groups	<i>n</i>	S_{vmit}	V_{vmit}	δ_{mit}
Control	30	1.53 ± 0.12	0.007 ± 0.0006	26.86 ± 4.20
Model	30	$0.65 \pm 0.10^{***}$	$0.003 \pm 0.0003^{**}$	$11.28 \pm 1.64^{**}$
EA1	30	0.73 ± 0.20	0.004 ± 0.0002	16.02 ± 2.72
EA2	30	0.84 ± 0.09	$0.007 \pm 0.0013^{###\&\&}$	19.10 ± 2.90
EA3	30	$1.26 \pm 0.09^{###\&}$	0.004 ± 0.0002	$29.85 \pm 4.00^{###\&}$
EA-Ctrl	30	$0.61 \pm 0.05^{****}$	$0.002 \pm 0.0006^{**}$	$14.19 \pm 2.07^*$

Mean \pm SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ vs control group; # $P < 0.01$ vs model group; & $P < 0.05$ vs EA1 & EA2 groups, && $P < 0.01$ vs EA1 & EA3 groups.

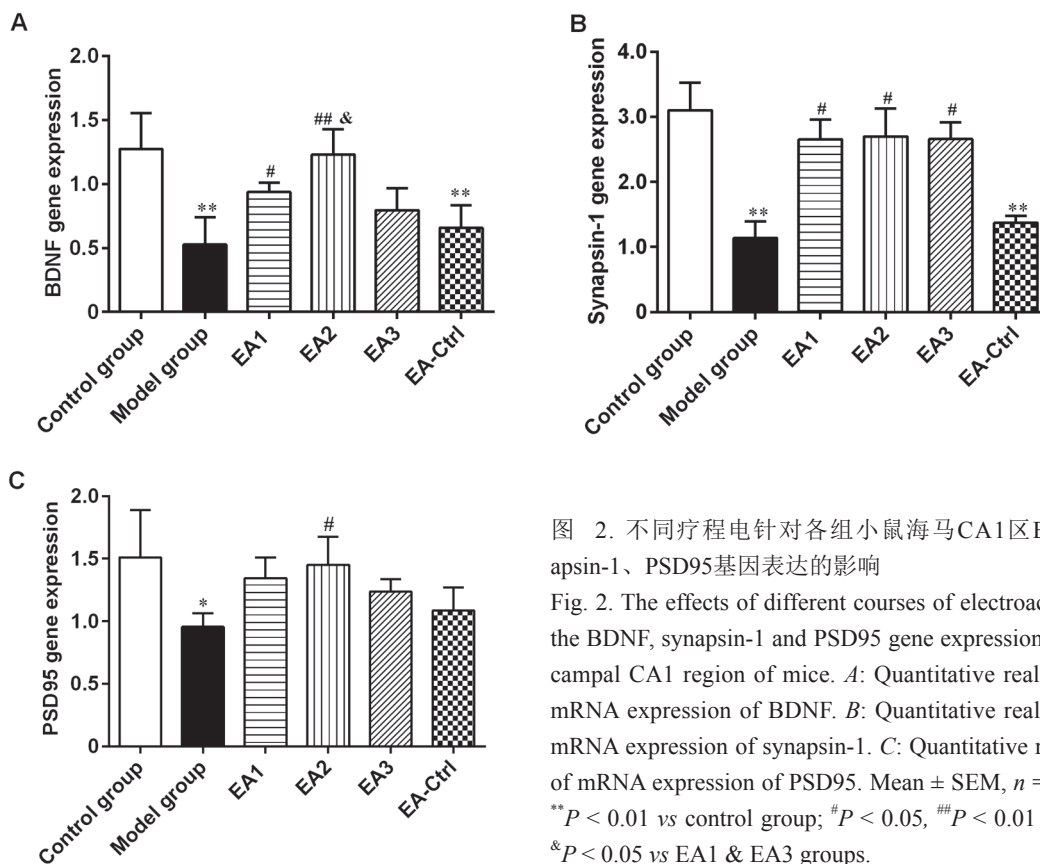


图 2. 不同疗程电针对各组小鼠海马 CA1 区 BDNF、synapsin-1、PSD95 基因表达的影响

Fig. 2. The effects of different courses of electroacupuncture on the BDNF, synapsin-1 and PSD95 gene expression in the hippocampal CA1 region of mice. A: Quantitative real time-PCR of mRNA expression of BDNF. B: Quantitative real time-PCR of mRNA expression of synapsin-1. C: Quantitative real time-PCR of mRNA expression of PSD95. Mean \pm SEM, $n = 4$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$, ### $P < 0.01$ model group; & $P < 0.05$ vs EA1 & EA3 groups.

密度显著增加 ($P < 0.01$)；电针3周组小鼠海马CA1区线粒体表面积密度和比表面均显著增加 ($P < 0.01$)。此外，电针2周组线粒体体密度与电针1和3周组比较具有显著性差异 ($P < 0.01$)，而电针3周组线粒体表面积密度和比表面与电针1和2周组比较具有显著性差异 ($P < 0.05$)，说明电针2和3周组的作用较显著。

2.2 不同疗程电针对海马CA1区突触功能相关蛋白表达的影响

本研究在突触形态结构观察的基础上，进一步从基因及蛋白表达水平检测与突触功能密切相关的功能蛋白BDNF、synapsin-1和PSD95的表达变化。

RT-qPCR实验结果显示(图2)，与对照组比较，模型组小鼠海马CA1区BDNF、synapsin-1和PSD95基因表达水平均显著下降 ($P < 0.05, P < 0.01$)，电针对照组BDNF和synapsin-1基因表达均显著下降 ($P < 0.01$)，PSD95基因表达也下降，但差异不显著。而与模型组比较，电针1周组和电针2周组的BDNF基因表达显著提高 ($P < 0.05, P < 0.01$)，三个电针组的synapsin-1基因表达也均显著提高 ($P < 0.05$)，电针对照组BDNF、synapsin-1和PSD95基因表达水平均无显著性变化。不同电针组间比较表明，电针2周组作用效果最为显著，BDNF基因

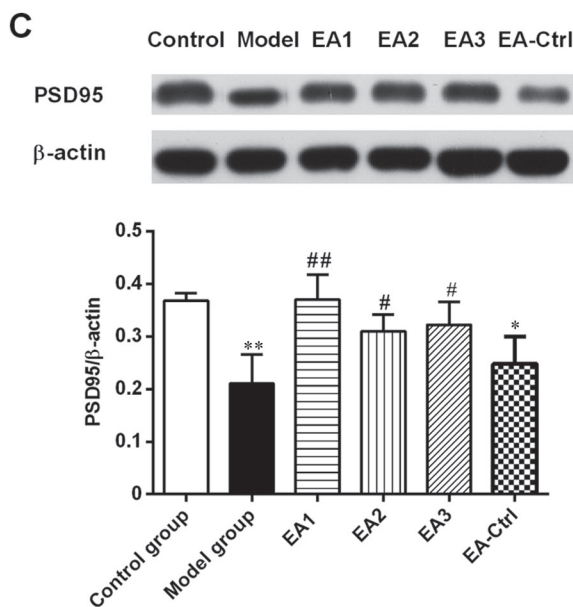
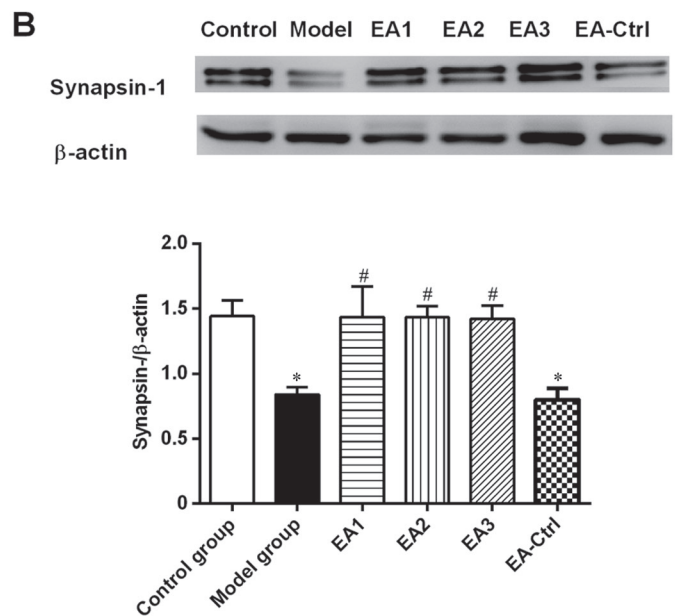
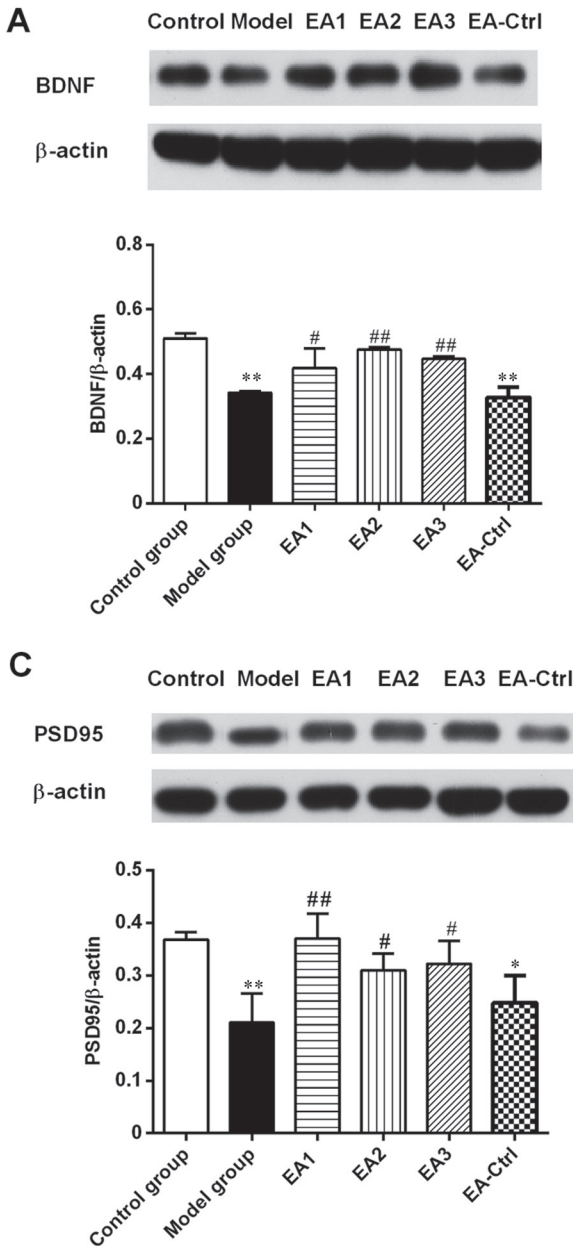


图 3. 不同疗程电针对各组小鼠海马CA1区BDNF、synapsin-1、PSD95蛋白表达的影响

Fig. 3. The effects of different courses of electroacupuncture on the BDNF, synapsin-1 and PSD95 protein expression in the hippocampal CA1 region of mice. *A*: Western blotting bands for BDNF protein expression of mice, and quantitative analysis of the protein expression of BDNF of mice. *B*: Western blotting bands for synapsin-1 protein expression of mice, and quantitative analysis of the protein expression of synapsin-1 of mice. *C*: Western blotting bands for PSD95 protein expression of mice, and quantitative analysis of the protein expression of PSD95 of mice. Mean \pm SEM, $n = 4$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs model group.

表达较电针 1 和 3 周组显著增加 ($P < 0.05$)。Western blot 实验结果显示 (图 3), 与对照组比较, 模型组和电针对照组小鼠海马 CA1 区 BDNF 蛋白表达均显著下降 ($P < 0.01$), 而与模型组比较, 3 个电针组 BDNF 蛋白表达均显著上调 ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.01$), 电针各组之间无显著性差异。此外, 与对照组比较, 模型组和电针对照组小鼠海马 CA1 区 synapsin-1 蛋白表达也显著下降 ($P < 0.05$), 而与模型组比较, 3 个电针组 synapsin-1 蛋白表达均显著上调 ($P < 0.01$), 电针各组之间无显著性差异。与对照组比较, 模型组和电针对照组小鼠的 PSD95 蛋白表达也显著下降 ($P < 0.01$, $P < 0.05$), 而与模型组比较, 3 个电针组 PSD95 的表达水平均显著提高 ($P < 0.01$, $P < 0.05$, $P < 0.05$), 电针各组之间无显著性差异。

3 讨论

放射性脑损伤的认知障碍主要表现为认知、记忆、判断和执行能力受损, 损伤的严重程度与照射剂量有关^[4]。本研究组前期实验结果表明, 给予不同剂量放射线照射 (4 Gy、8 Gy 和 16 Gy) 可不同程度地抑制小鼠海马区神经干细胞的增殖及进一步分化成功能神经元和星形胶质细胞, 其中 8 Gy 组损伤效果十分显著。而给予电针干预可一定程度促进海马区神经干细胞的增殖和分化, 从而减轻放射线照射所导致的学习记忆功能损伤, 这一作用可能与调节 Notch 蛋白信号通路有关^[5]。学习记忆是脑的高级功能, 而海马区作为边缘系统的重要组成部分, 是参与调节认知、学习记忆功能的中心核团。有研究表明 X 射线照射可抑制海马区神经元的增殖和分化, 导致认知功能和学习记忆功能受损^[6, 7]。也有研究报道电针干预能通过调节海马 CA1 区 5-HT 受体功能改善缺血再灌注大鼠学习记忆功能^[8]。突触是实现相邻神经元之间信息传递的连接区域, 突触的结构和功能与学习记忆密切相关。突触功能和突触可塑性建立在神经元结构和功能的完整性上, 有临床研究发现放疗后患者出现神经元密度下降及结构改变^[9]。本研究结果表明给予放射线照射后模型组小鼠海马 CA1 区神经元核间隙减小、核质比增大, 神经元结构发生改变, 而突触间隙及 PSD 厚度均显著减小。此外, 为细胞提供能力动力的线粒体的数目和结构也发生显著改变, 提示放射线照射可引起线粒体水肿, 导致结构受损, 数目减少。

而在给予不同疗程电针干预后, 均不同程度地对上述突触结构损伤发挥了改善和保护作用, 其中电针 2 周组和电针 3 周组的作用效果较电针 1 周组更为显著。

突触前膜囊泡蛋白 (synapsins) 是一类与突触小泡相关的神经元特异的磷酸蛋白, 其中 synapsin-1 是目前研究较多的影响突触效能作用的蛋白质。目前研究发现多种神经系统疾病如阿尔茨海默病、脑缺血、癫痫等均存在突触蛋白表达变化现象。有研究报道 synapsin-1 在海马区大量表达, 其表达水平与海马区结构形成以及突触功能可塑性密切相关, 并且在突触囊泡运输、神经递质释放、学习记忆过程中发挥重要的调节作用^[10]。此外, 也有研究表明用药物促进小鼠海马 CA1 和 CA3 区 synapsin-1 的表达可以改善创伤后应激模型的症状^[11]。本研究结果表明, 放射线照射后小鼠海马 CA1 区 synapsin-1 基因及蛋白表达均显著下降, 而给予不同疗程 (1 周、2 周和 3 周) 电针穴位干预后, 该功能脑区 synapsin-1 基因及蛋白表达均显著上调。PSD95 是另外一种与突触结构功能密切相关的蛋白质, 是鸟苷酸激酶家族的一员。PSD95 可通过与其他蛋白相互作用参与突触的形成与维持。有研究发现老年痴呆患者认知功能受损与突触数量减少密切相关, 而 PSD95 表达减少会导致海马依赖性学习记忆及认知功能缺陷^[12]。本研究结果表明, 放射线照射可使小鼠海马 CA1 区 PSD95 基因及蛋白表达水平显著下降, 给予电针干预 (1 周、2 周和 3 周) 可不同程度地上调该蛋白的表达。此外, BDNF 是一种由神经元合成和释放的重要神经营养因子, 具有神经营养及保护作用, 在维持神经元的生长、发育与突触功能完整性方面具有重要的生理学意义。有研究报道, 给予 BDNF 可以起到保护和营养作用, 并促进受损突触传递功能的恢复^[13, 14]。也有研究表明在缺糖缺氧条件下外源性给予 BDNF 能够有效提高神经元 synapsin-1 蛋白的表达量, 缓解由于缺糖缺氧造成的神经元损伤作用^[15]。本研究结果表明, 放射线照射小鼠海马 CA1 区 BDNF 基因及蛋白表达显著下降, 给予不同疗程电针穴位干预后, BDNF 的基因及蛋白表达水平均不同程度地提高, 其中电针 2 周组作用效果较显著。有研究报道 synapsin-1 可以作为 BDNF 信号通路的下游效应物, 共同作用维持突触结构和功能的完整性, 从而起到维持突触结构功能的作用^[16]。也有研究报道, 外源性给予老年大鼠 BDNF 可以显

著改善认知功能和结构突触可塑性^[17]。本研究结果显示, 电针穴位干预后各组小鼠海马区 BDNF 和 synapsin-1 的基因及蛋白水平均出现上调。上述结果说明, 放射线照射可抑制小鼠海马区突触功能相关蛋白 BDNF、synapsin-1 以及 PSD95 的表达水平, 从而从整体水平诱导空间学习记忆功能的损伤。而给予不同疗程电针穴位干预, 可以通过上调海马 CA1 区 BDNF、synapsin-1 和 PSD95 蛋白表达水平, 从而达到改善突触功能和学习记忆功能的作用。

综上所述, 放射线照射损伤小鼠海马 CA1 区突触超微结构及功能可塑性, 从而导致认知能力和学习记忆功能下降, 给予不同疗程电针穴位干预可有效提高小鼠海马 CA1 区与突触功能密切相关的 BDNF、synapsin-1 和 PSD95 蛋白的表达水平, 减轻放射线照射所导致的上述损伤作用。本研究结果为临床合理利用电针防治放射性脑损伤提供了实验及理论依据。

参考文献

- Liang YL (梁燕玲), Zhang SM. The structure and function of synapsins. *J Med Postgrad (医学研究生学报)* 2003; 16(12): 929–932 (in Chinese).
- Monje M. Cranial radiation therapy and damage to hippocampal neurogenesis. *Dev Disabil Res Rev* 2008; 14(3): 238–242.
- Gao JF (高剑峰), Zheng WJ, Lv MH, Su SH, Zhang SJ, Wu X. Effect and mechanism of electroacupuncture intervention on radiation-induced hippocampal neuronal apoptosis in mice. *Chin J Radiat Oncol (中华放射肿瘤学杂志)* 2017; 26(12): 1443–1448 (in Chinese).
- Lawrence YR, Li XA, Naqa IE, Hahn CA, Marks LB, Merchant TE, Dicker AP. Radiation dose-volume effects in the brain. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2010; 76(3 Suppl): S20–S27.
- Wu X (武鑫), Su SH, Sun NN, Lyu MH, Zhang SJ, Gao JF. Effects and mechanism of electro-acupuncture on proliferation and differentiation of neural stem cells in C57 mice exposed to different doses of X-ray radiation. *Acta Physiol Sin (生理学报)* 2019; 71(3): 431–438 (in Chinese).
- Jenrow KA, Brown SL, Lapanowski K, Kolozsvary A, Kim JH. Selective inhibition of microglia-mediated neuroinflammation mitigates radiation-induced cognitive impairment. *Radiat Res* 2013; 197(5): 549–556.
- Wu X (武鑫), Zheng WJ, Li L, Gao JF. Effects of electroacupuncture on cognitive function and learning and memory of mice exposed to ionizing radiation. *Chin J Radiol Med Prot (中华放射医学与防护杂志)* 2016; 36(2): 14–19 (in Chinese).
- Huang LL (黄丽丽), Jiang JZ, Ma LC, Han F. Fluoxetine inhibits down-regulation of PSD-95 and synapsin I in the hippocampal neuron and impairment of the learning and memory ability of PTSD rats. *Chin J Histochem Cytochem (中国组织化学与细胞化学杂志)* 2017; 26(4): 321–326 (in Chinese).
- Petr P, Tomas K, Ludmila H, Martin B, Marie D, Petr B, Nadia NL, Pavel S, Radim J. Post-WBRT cognitive impairment and hippocampal neuronal depletion measured by *in vivo* metabolic MR spectroscopy: Results of prospective investigational study. *Radiother Oncol* 2017; 122(3): 373–379.
- Zhang ZH (张志华), Wang XL, Wu JH, Lyu YJ, Liu L. Effect of different components of acori tatarinowii rhizome-polygalae radix on learning and memory capacity and hippocampal synaptic proteins expression in AD model rats. *Chin J Exp Trad Med Form (中国实验方剂学杂志)* 2016; 22(7): 120–124 (in Chinese).
- Herrmann L, Ionescu IA, Henes K, Golub Y, Wang NX, Buell DR, Holsboer F, Wotjak CT, Schmidt U. Long-lasting hippocampal synaptic protein loss in a mouse model of post-traumatic stress disorder. *PLoS One* 2012, 7(8): e41603.
- Sasi M, Vignoli B, Canossa M, Blum R. Neurobiology of local and intercellular BDNF signaling. *Pflugers Arch* 2017; 469(5–6): 593–610.
- Luo L, Liu XL, Li J, Mu RH, Liu Q, Yi LT, Geng D. Macranthol promotes hippocampal neuronal proliferation in mice via BDNF-TrkB-PI3K/Akt signaling pathway. *Eur J Pharmacol* 2015; 762: 357–363.
- Kowianski P, Lietzau G, Czuba E, Waskow M, Steliga A, Morys J. BDNF: a key factor with multipotent impact on brain signaling and synaptic plasticity. *Cell Mol Neurobiol* 2018; 38(3): 579–593.
- Yu XL (喻晓路), Fu H. Effect of BDNF on synapsin-1 in NAr slices of mice with oxygen-glucose deprivation. *Systems Med (系统医学)* 2018; 3(7): 13–16 (in Chinese).
- Xiao JW (肖经纬), Chen X, Zhang B, Wang XH, Li B. Study on effects of brain-derived neurotrophic factor in acrylamide-induced subacute neurotoxicity *in vivo*. *J Toxicol (毒理学杂志)* 2014; 28(6): 415–419 (in Chinese).
- Li M, Dai FR, Du XP, Yang QD, Zhang X, Chen Y. Infusion of BDNF into the nucleus accumbens of aged rats improves cognition and structural synaptic plasticity through PI3K-ILK-Akt signaling. *Behav Brain Res* 2012; 231(1): 146–153.