

电针干预放射性脑损伤小鼠海马区突触可塑性相关蛋白的表达

<https://doi.org/10.3969/j.issn.2095-4344.3511>王冬慧¹, 武鑫¹, 孙宁宁¹, 张晗¹, 高剑峰²

2095-4344.3511

投稿日期: 2020-07-13

送审日期: 2020-07-15

采用日期: 2020-08-19

在线日期: 2020-09-30

中图分类号:

R459.9; R318; R245

文章编号:

2095-4344(2021)14-02205-06

文献标识码: B

文章快速阅读:

文章特点—

△电针干预显著改善放射性脑损伤小鼠的学习记忆障碍,其机制可能与电针调节突触可塑性蛋白表达增加有关。

C57BL/6J 小鼠:

(1) 随机分为3组:空白组、模型组、电针组,每组10只;
(2) 以8 Gy放射剂量构建放射性脑损伤小鼠模型。

结果:

(1) 电针干预后小鼠逃避潜伏期缩短,穿越平台次数增多,目的象限停留时间增加;
(2) 电针干预后小鼠T迷宫错误次数减少;
(3) 电针干预后Notch1蛋白表达升高,Hes1蛋白表达降低,BrdU阳性表达增加,同时促进突触素、突触后致密蛋白95和脑源性神经营养因子表达增加。

电针干预:

(1) “百会”;
(2) “风府”;
(3) “肾俞”。

文题释义:

Notch信号通路:主要由Notch受体、Notch配体(DSL蛋白)、CSL(CBF-1, Suppressor of hairless, Lag)DNA结合蛋白等组成。Notch信号通路在神经干细胞增殖分化、突触可塑性及学习记忆中起着重要作用。

突触可塑性:是指突触结构与功能上的变化,对脑损伤修复起着重要的作用。突触可塑性是多基因调控的复杂过程,突触可塑性是大脑学习与长期记忆的基础。

摘要

背景:放射性脑损伤作为放疗后的严重并发症之一,严重危害人们的健康,损害学习及记忆功能,但是关于电针干预防治放射性脑损伤的报道相对较少。

目的:探讨电针干预对放射性脑损伤小鼠突触可塑性相关蛋白表达的影响。

方法:将30日龄C57BL/6J小鼠随机分为空白组、模型组和电针组。除空白组外,其余各组给予8 Gy放射剂量构建放射性脑损伤模型,电针组给予针刺“百会”“风府”及双侧“肾俞”穴干预21 d,同时腹腔注射BrdU。电针结束后,采用Morris水迷宫实验和T迷宫实验检测小鼠学习记忆能力,免疫组化法检测海马区BrdU阳性表达,Western blot检测海马区Notch信号通路相关蛋白Notch1和Hes1以及突触可塑性相关蛋白突触素、突触后致密蛋白95、脑源性神经营养因子的表达。

结果与结论:①电针干预显著改善放射性脑损伤小鼠学习记忆障碍;②模型组BrdU阳性表达较空白组显著减少($P < 0.01$),电针组BrdU阳性表达较模型组显著增加($P < 0.01$);③模型组Notch1、Hes1、突触后致密蛋白95、突触素和脑源性神经营养因子表达量较空白组降低($P < 0.01$, $P < 0.01$, $P < 0.01$, $P < 0.05$, $P < 0.01$);与模型组比较,电针组Notch1、突触后致密蛋白95、突触素和脑源性神经营养因子表达量增加($P < 0.01$, $P < 0.01$, $P < 0.05$, $P < 0.01$),Hes1表达量明显降低($P < 0.05$);④结果表明,电针干预改善放射性脑损伤小鼠学习记忆功能的机制可能与Notch信号通路以及电针调节突触可塑性蛋白表达增加有关。

关键词:电针;放射性脑损伤;突触可塑性;Notch;信号通路;C57BL/6J小鼠;学习;记忆

Electroacupuncture intervention on the expression of synaptic plasticity-related proteins in the hippocampus of mice with radiation-induced brain injury

Wang Donghui¹, Wu Xin¹, Sun Ningning¹, Zhang Han¹, Gao Jianfeng²

¹School of Basic Medicine, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, Henan Province, China; ²Graduate School of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, Henan Province, China

Wang Donghui, Master candidate, School of Basic Medicine, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, Henan Province, China

Corresponding author: Gao Jianfeng, Professor, Master's supervisor, Graduate School of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, Henan Province, China

河南中医药大学,¹基础医学院,²研究生院,河南省郑州市 450046

第一作者:王冬慧,女,1994年生,河南中医药大学在读硕士,主要从事中枢性脑损伤的防治研究。

通讯作者:高剑峰,教授,硕士生导师,河南中医药大学研究生院,河南省郑州市 450046

<https://orcid.org/0000-0003-1772-5967>(王冬慧)

基金资助:国家自然科学基金项目(81373852),项目负责人:高剑峰

引用本文:王冬慧,武鑫,孙宁宁,张晗,高剑峰.电针干预放射性脑损伤小鼠海马区突触可塑性相关蛋白的表达[J].中国组织工程研究,2021,25(14):2205-2210.



Abstract

BACKGROUND: Radiation-induced brain injury, as one of the serious complications after radiotherapy, seriously endangers people's health and damages learning and memory functions. However, there are relatively few reports on the prevention and treatment of brain damage caused by electroacupuncture intervention.

OBJECTIVE: To explore the effect of electroacupuncture intervention on the expression of synaptic plasticity related proteins in mice with radiation-induced brain injury.

METHODS: C57BL/6J mice, 30 days old, were randomly divided into blank group, model group and electroacupuncture group. Except for the blank group, the other groups were given 8 Gy radiation dose to construct a radiation-induced brain injury model. The electroacupuncture group was given acupuncture at "Baihui" (GV 20), "Fengfu" (GV 16) and bilateral "Shenshu" (BL 23) for 21 days for intervention, and mice were intraperitoneally injected with BrdU. After electroacupuncture, Morris water maze test and T maze test were used to detect the learning and memory abilities of mice. Immunohistochemical method was used to detect the expression of BrdU in the hippocampus. Western blot assay was used to detect Notch1 and Hes1 related to Notch signaling pathway in the hippocampus, and synaptic plasticity-related proteins synaptophysin (SYN), postsynaptic density protein-95 (PSD-95) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) expression.

RESULTS AND CONCLUSION: Electroacupuncture intervention significantly improved learning and memory impairment in mice with radiation-induced brain injury. The positive expression of BrdU in the model group was significantly lower than that in the blank group ($P < 0.01$), and the positive expression of BrdU in the electroacupuncture group was significantly increased ($P < 0.01$). The expression levels of Notch1, Hes1, PSD-95, SYN and BDNF were lower in the model group than that of the blank group ($P < 0.01$, $P < 0.01$, $P < 0.01$, $P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the model group, the expression levels of Notch1, PSD-95, SYN and BDNF increased in the electroacupuncture group ($P < 0.01$, $P < 0.01$, $P < 0.05$, $P < 0.01$), and the expression level of Hes1 decreased significantly ($P < 0.05$). Therefore, the mechanism by which electroacupuncture improves the learning and memory function of mice with radiation-induced brain injury may be related to the Notch signaling pathway and the increased expression of synaptic plasticity protein regulated by electroacupuncture.

Key words: electroacupuncture; radiation-induced brain injury; synaptic plasticity; Notch; signaling pathway; C57BL/6J mice; learning; memory

Funding: the National Natural Science Foundation of China, No. 81373852 (to GJF)

How to cite this article: WANG DH, WU X, SUN NN, ZHANG H, GAO JF. Electroacupuncture intervention on the expression of synaptic plasticity-related proteins in the hippocampi of mice with radiation-induced brain injury. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2021;25(14):2205-2210.

0 引言 Introduction

放射疗法在控制疾病的进程中有重要意义,但放射线治疗引发的脑部损伤也不容忽视^[1]。放射性脑损伤是放疗引发的并发症之一,严重危害人类的健康,可降低患者生活质量^[2]。放射性脑损伤的严重程度与放射剂量呈正相关^[3]。2.3 Gy的X射线辐射可对Long-Evans大鼠学习记忆能力产生影响^[4],课题组前期研究同样发现8 Gy以上放射剂量即可造成C57BL/6J小鼠出现认知功能损伤^[5]。动物实验发现电针干预可改善阿尔茨海默病模型小鼠学习记忆功能,但其具体机制尚不明^[6]。此外,Notch信号通路对神经干细胞增殖具有调控作用,并且Notch信号通路海马突触可塑性以及学习记忆密切相关^[7-8]。因此,该研究采用电针干预放射性脑损伤小鼠“百会”“风府”及双侧“肾俞”穴,观察电针对放射性脑损伤小鼠学习记忆的影响,检测海马区Notch通路相关蛋白及突触可塑性相关蛋白表达变化,探讨电针对放射性脑损伤的保护作用机制。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照动物实验。

1.2 时间及地点 实验于2019年4至6月在河南中医药大学动物实验中心完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 30只SPF级30 d龄C57BL/6J雄性小鼠,体质量10-13 g,购于北京维通利华生物科技有限公司,许可证号为SCXK(京)2016-0006,实验单位许可证号为SYXK(豫)2015-0005。将实验动物随机分为空白组、模型组和电针组,每组10只。该实验已通过河南中医药大学伦理委员会批准(动物伦理审查批准编号为DWLL16020034)。将小鼠置于7:00-19:00光照和19:00-7:00黑暗的实验室,水食不限,室温20-25℃,湿度为50%-60%。

1.3.2 实验用主要仪器与试剂 一次性针灸针(苏州医疗用品厂0.30 mm×13 mm);电子针灸治疗仪(无锡佳健医疗器械股份有限公司,型号G6805);全自动Morris水迷宫设备(淮

北正华生物仪器设备有限公司,型号SC-b5);体视学显微镜(Leica,型号M205FA);直线加速器(Varian Clinac 600 CD, Radiation Oncology Systems, San Diego, CA, USA);石蜡切片机(Leica,型号2235);LAS1000 CCD曝光检测系统(Fujifilm, Tokyo, Japan);抗BrdU单克隆抗体(Abcam, ab895);BrdU(Servicebio, B8010);兔抗单克隆Notch1抗体(Abcam, ab52627);兔抗单克隆Hes1抗体(Servicebio, GB11374);突触素兔抗鼠多克隆抗体(武汉三鹰, 17785-1-AP);脑源性神经生长因子兔抗鼠多克隆抗体(Servicebio, GB11559);突触后致密蛋白95兔抗鼠多克隆抗体(Servicebio, GB11277)。

1.4 实验方法

1.4.1 放射性脑损伤模型制备^[4, 9] 将模型组与电针组C57BL/6J小鼠进行造模。腹腔注射2%戊巴比妥钠(0.01 mL/g)麻醉,将小鼠俯卧置于放射平台进行X射线照射,照射剂量为单次8 Gy,射线源距离脑99.5 cm,剂量率为400 cGy/min,照射过程持续约10 min。脑组织接受剂量的变异约±5%,造模结束后次日每组10只小鼠进行T迷宫及水迷宫行为学测试进行模型评估,测试后每组随机筛选6只小鼠进行后续的电针干预等操作。

1.4.2 电针干预方法 用小鼠固定器将小鼠俯卧位固定于操作台上,取穴方法参考《实验针灸学》^[10]。电针穴位取百会(顶骨正中)、风府(枕骨项嵴后枕寰关节背凹陷处)及肾俞(第2腰椎后两旁凹陷处)。回路1取百会和风府,回路2取双侧肾俞。用一次性无菌针灸针刺入深度约为1 mm,连接电针仪设置电压1.5 V,频率10 Hz,波宽1 ms,针刺时间为20 min/次,1次/d,连续针刺21 d。每日电针干预后各组小鼠以0.01 mL/g腹腔注射5 g/L胸腺嘧啶衍生物BrdU。模型组和空白组不进行电针干预,但模拟抓取与固定。电针干预结束后次日开始行为学测试。

1.4.3 T迷宫实验 在迷宫两臂碗里放入食物,将小鼠放入T迷宫适应2 d,训练时将T迷宫的左臂闸门打开,右臂关闭,小鼠只能进入右臂获取食物,15 s后撤去所有闸门,两臂全

组织工程实验动物造模过程的相关问题

造模目的: 通过建立放射性脑损伤模型,探讨电针干预“百会”“风府”及双侧“肾俞”对放射性脑损伤小鼠学习记忆的可能调控机制

动物来源及品系: SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠由北京维通利华生物科技有限公司提供

造模技术描述: 小鼠麻醉后,将小鼠俯卧置于放射平台进行 X 射线照射,照射剂量为单次 8 Gy,射线源距离脑 99.5 cm,脑组织接受剂量的变异约 $\pm 5\%$,剂量率为 400 cGy/min,照射过程持续约 10 min 建立放射性脑损伤模型。如造模期间发生动物死亡,及时进行造模补充

造模后实验观察指标: ①水迷宫实验相关指标:逃避潜伏期、穿越平台次数和目的象限停留时间;②T 迷宫实验相关指标:错误次数;③ Notch 通路相关蛋白表达: Notch1 和 Hes1;④海马区 BrdU 阳性表达;⑤突触可塑性相关蛋白表达:突触素、突触后致密蛋白 95 和脑源性神经营养因子

伦理委员会批准: 实验已通过河南中医药大学伦理委员会批准 (DWLL16020034)

部打开后将小鼠放入开始臂中,若小鼠选择未曾进入的臂为正确选择,反之为错误选择。每只动物每天进行 4 次训练,每次间隔 15 min,连续 4 d。随后进行测试,记录每组小鼠的错误次数。

1.4.4 水迷宫实验 T 迷宫实验结束后进行水迷宫测试,圆形水池直径为 120 cm,高 40 cm,水池内放一直径 10 cm,高 25 cm 的圆形平台,将圆形水池任意等距离的分为 (I、II、III、IV) 4 个象限,并将圆形平台置于其中 1 个象限。开始往水池注水,水深约 30 cm,水温控制约 25 °C,水面高于平台约 1 cm,然后倒入脱脂奶粉使水不透明。系统跟踪分析软件自动记录游泳路线。定位航行实验为前 6 d,记录其逃避潜伏期,第 7 天撤去平台,记录其穿越平台次数和目的象限停留时间。

1.4.5 免疫组织化学染色 行为学测试结束后,每组取 3 只小鼠,2% 戊巴比妥钠以 0.01 mL/g 腹腔注射麻醉后,打开胸腔并暴露心脏,0.1 mol/L PBS 及 50 g/L 多聚甲醛各 30 mL 冲洗全身毛细血管,然后断头取脑,取海马组织,用 50 g/L 多聚甲醛固定 24 h 后进行石蜡包埋、切片。经脱蜡、抗原修复、灭活过氧化物酶、血清封闭、添加一抗 (BrdU 单克隆抗体,1 : 40) 和山羊抗小鼠二抗、DAB 染色、复染等过程后在 400 倍显微镜下观察 BrdU 阳性表达。每只动物选取 2 个切片,每张切片随机选取 2 个视野,采用 Image 软件进行平均吸光度分析。

1.4.6 Western blot 检测相关蛋白的表达 行为学测试结束后,每组取 3 只小鼠,2% 戊巴比妥钠以 0.01 mL/g 腹腔注射麻醉后,打开胸腔并暴露心脏,用 0.1 mol/L PBS 30 mL 经左心室-主动脉灌注并固定。灌注结束后断头取脑,并快速分离出海马组织,该操作于冰上进行。提取组织蛋白后,经电泳转膜、一抗 (Notch 1、Hes 1、突触素、突触后致密蛋白 95 和脑源性神经营养因子,1 : 1 000) 孵育、TBST 冲洗、二抗 (兔抗鼠多克隆抗体,1 : 3 000) 孵育后 TBST 冲洗并滴入增强发光试剂,在暗室曝光匣对胶片曝光,采用 Image J 软件系统分析条带的吸光度值,实验结果为目的蛋白条带的吸光度值/内参蛋白条带的吸光度值的比值。重复实验 3 次。

1.5 主要观察指标 ①水迷宫实验中逃避潜伏期、穿越平

台次数和目的象限停留时间,T 迷宫实验中错误次数;② Notch 信号通路相关蛋白 Notch1 和 Hes1 的表达;③ BrdU 阳性细胞数量;④突触可塑性相关蛋白突触素、突触后致密蛋白 95 和脑源性神经营养因子的表达。

1.6 统计学分析 实验数据采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计分析,实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析结合 Tukey's 两两比较和重复测量方差分析进行检验。以 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 实验选用雄性 C57BL/6J 小鼠 30 只,随机分为 3 组,造模后进行水迷宫与 T 迷宫实验,按照随机原则并在保证每组动物数量相同的条件下每组选取 6 只小鼠进行后续实验,共筛选 18 只动物。

2.2 T 迷宫实验结果 电针干预前,与空白组比较,模型组与电针组小鼠错误次数均明显增加 ($P < 0.05$),模型组与电针组差异无显著性意义。电针干预后,与空白组比较,模型组小鼠错误次数明显增加 ($P < 0.05$);与模型组比较,电针组小鼠错误次数明显降低 ($P < 0.05$),差异有显著性意义,见表 1。

表 1 | 电针干预前后各组小鼠 T 迷宫实验错误次数 ($\bar{x} \pm s, n=6$)
Table 1 | Number of errors in the T maze of mice in each group before and after electroacupuncture intervention

组别	电针干预前	电针干预后
空白组	1.67 \pm 0.82	1.67 \pm 0.52
模型组	2.83 \pm 0.75 ^a	2.67 \pm 0.52 ^a
电针组	3.00 \pm 0.63 ^a	1.67 \pm 0.52 ^b

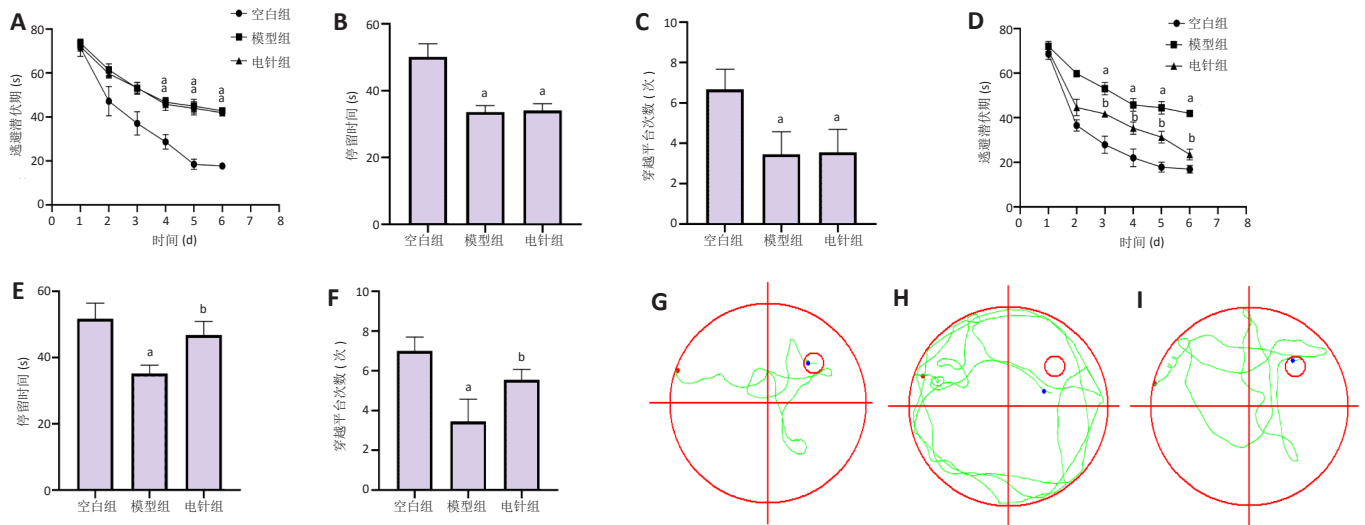
表注:与空白组比较,^a $P < 0.05$;与模型组比较,^b $P < 0.05$

2.3 水迷宫实验结果 电针干预前,与空白组比较,模型组及电针组逃避潜伏期显著延长,目的象限停留时间及穿越平台次数均显著降低 (P 均 < 0.01),模型组与电针组差异无显著性意义。电针干预后,与模型组比较,电针组逃避潜伏期显著缩短,目的象限停留时间及穿越平台次数均显著增加 (P 均 < 0.01),见图 1。

2.4 各组小鼠海马 CA1 区 BrdU 阳性细胞数 BrdU 免疫组织化学阳性染色呈棕褐色,主要位于细胞核内。与空白组比较,模型组 BrdU 阳性细胞数显著降低 ($P < 0.01$);与模型组比较,电针组 BrdU 阳性细胞数显著增加 ($P < 0.01$),见图 2。

2.5 各组小鼠海马区 Hes1 和 Notch1 蛋白表达 与空白组比较,模型组 Notch1、Hes1 蛋白表达显著降低 ($P < 0.01$);与模型组比较,电针组 Notch1 蛋白表达显著增加 ($P < 0.01$),Hes1 蛋白表达量明显降低 ($P < 0.05$),见图 3。

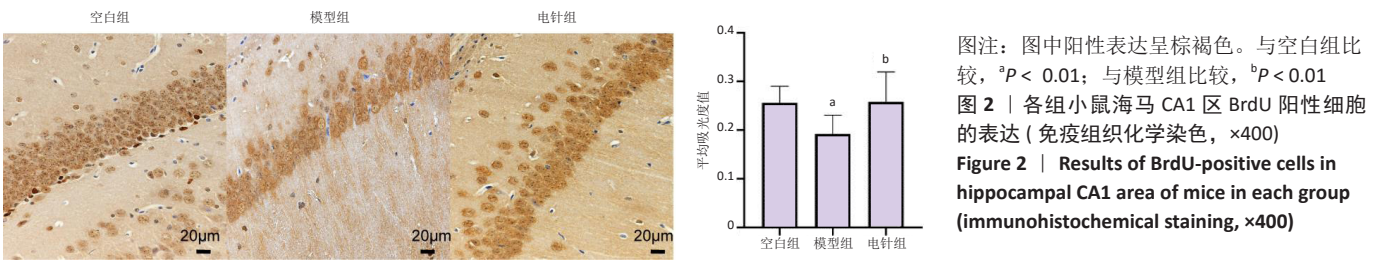
2.6 各组小鼠海马区突触素、突触后致密蛋白 95 和脑源性神经营养因子蛋白表达 与空白组比较,模型组小鼠海马区突触素、突触后致密蛋白 95 和脑源性神经营养因子蛋白表达均不同程度降低 ($P < 0.05, P < 0.01, P < 0.01$);与模型组比较,电针组小鼠海马区突触素、突触后致密蛋白 95 和脑源性神经营养因子蛋白表达均不同程度增加 ($P < 0.05, P < 0.01, P < 0.01$),见图 4。



图注：A-C 依次为电针干预前各组小鼠逃避潜伏期、目的象限停留时间以及穿越平台次数比较；D-F 依次为电针干预后各组小鼠逃避潜伏期、目的象限停留时间以及穿越平台次数比较；G-I 依次为电针干预后空白组、模型组和电针组水迷宫轨迹图。与空白组比较，^a $P < 0.01$ ；与模型组比较，^b $P < 0.01$

图 1 | 电针干预前后各组小鼠水迷宫实验结果

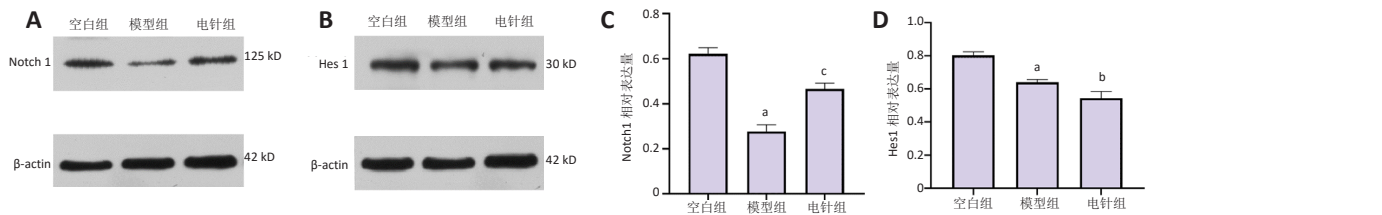
Figure 1 | Results of water maze test of mice in each group before and after electroacupuncture intervention



图注：图中阳性表达呈棕褐色。与空白组比较，^a $P < 0.01$ ；与模型组比较，^b $P < 0.01$

图 2 | 各组小鼠海马 CA1 区 BrdU 阳性细胞的表达 (免疫组织化学染色, $\times 400$)

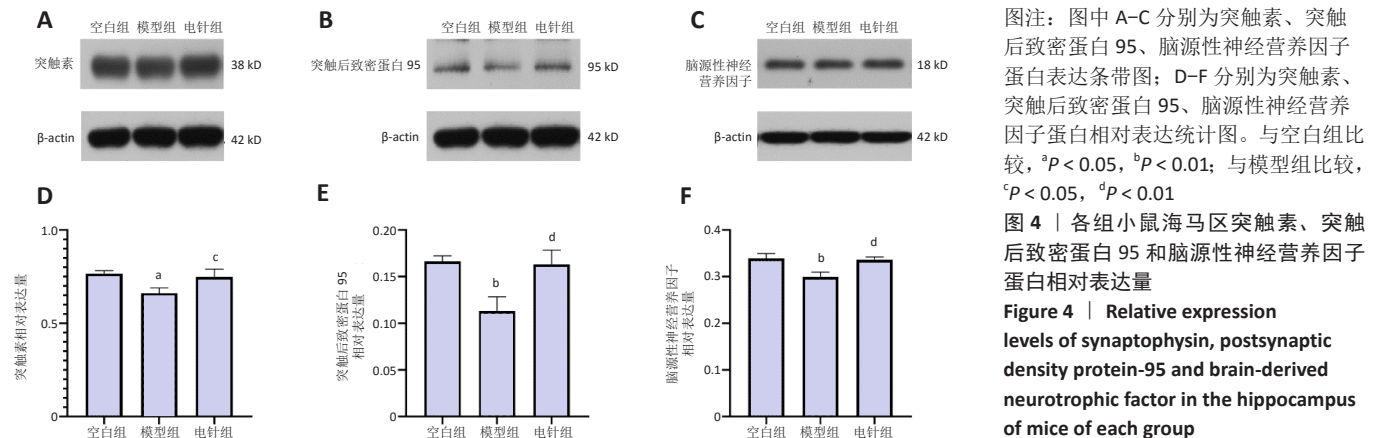
Figure 2 | Results of BrdU-positive cells in hippocampal CA1 area of mice in each group (immunohistochemical staining, $\times 400$)



图注：图中 A, B 分别为 Notch1、Hes1 蛋白表达条带图；C, D 分别为 Notch1、Hes1 蛋白相对表达统计图。与空白组比较，^a $P < 0.01$ ；与模型组比较，^b $P < 0.05$ ，^c $P < 0.01$

图 3 | 各组小鼠海马区 Hes1 和 Notch1 蛋白相对表达量

Figure 3 | Relative expression levels of Hes1 and Notch1 in the hippocampus of mice of each group



图注：图中 A-C 分别为突触素、突触后致密蛋白 95、脑源性神经生长因子蛋白表达条带图；D-F 分别为突触素、突触后致密蛋白 95、脑源性神经生长因子蛋白相对表达统计图。与空白组比较，^a $P < 0.05$ ，^b $P < 0.01$ ；与模型组比较，^c $P < 0.05$ ，^d $P < 0.01$

图 4 | 各组小鼠海马区突触素、突触后致密蛋白 95 和脑源性神经生长因子蛋白相对表达量

Figure 4 | Relative expression levels of synaptophysin, postsynaptic density protein-95 and brain-derived neurotrophic factor in the hippocampus of mice of each group

3 讨论 Discussion

中医认为督脉为“阳脉之海”，有总督全身阳气的作用，五脏六腑之经气皆输注于此。“百会”为“三阳五会”，总领一身之阳气^[11]，对阳经的气血有蓄积和渗灌的调节作用；

“风府”是督脉、阳维脉之交会穴，具有醒脑开窍、熄风宁神之效，《备急千金药方》记载“风府”可治脑中百病^[12]；“肾俞”穴位属足太阳膀胱经穴，是肾之背俞穴，此穴具有强肾固本、滋养脑髓的作用^[13]。因此，该实验选取“百会”“风府”及“肾俞”穴，此三穴相互联系，具有健脑益髓、化浊开窍之效^[14-15]。

目前已有实验表明放射线可导致认知及学习记忆功能受损^[16]。Morris 水迷宫实验是检验空间学习记忆的经典实验^[17]，水迷宫实验结果显示，在电针干预前，模型组和电针组小鼠与空白组比较均受到放射线照射影响，其学习记忆功能损伤，表明造模成功，模型组与电针组差异无显著性意义；在电针干预后，与模型组比较，电针组小鼠逃避潜伏期缩短，穿越平台次数增多以及目的象限停留时间延长，表明小鼠的空间学习记忆能力得到改善。T 迷宫实验可以用来检验动物模型工作学习记忆^[17]，与模型组比较，电针组小鼠错误次数显著降低，提示电针对放射线照射小鼠学习记忆的保护作用。该实验结果表明 8 Gy 的放射剂量可致 C57BL/6J 小鼠学习记忆及认知功能损伤，提示模型构建成功，而给予电针干预可显著改善放射线照射所导致的学习记忆功能损伤，与既往研究结果一致^[5]。

海马是一个具有可塑性的脑区，包括结构性可塑性和功能可塑性，海马的可塑性与其的学习记忆功能有密切关系^[18-19]。Notch 信号通路可调节胚胎发育和成年期间的海马神经发生，在调节神经干细胞增殖和分化方面都具有重大意义^[20-23]。目前发现电针可通过 Notch 信号通路促进神经干细胞增殖，改善脑损伤^[7, 22]。Notch 信号通路由 Notch 受体、Notch 配体(DSL 蛋白)、CSL(CBF-1, Suppressor of hairless, Lag)DNA 结合蛋白等组成。Notch 受体与配体结合后经 2 次水解产生胞内片段(Notch intracellular domain, NICD)，NICD 进入细胞核与 CSL DNA 相互作用刺激下游靶基因如 Hes 1，进而维持神经干细胞的未分化状态，OHTSUKA 等^[24]研究发现 Hes 1 表达降低会促进神经干细胞向神经元和星形胶质细胞分化。课题组前期研究已证实电针干预后神经干细胞分化为神经元和星形胶质细胞的数量增多^[25]。该实验电针干预后，电针组 Notch 蛋白表达显著上升，Hes1 蛋白表达明显下降。上述结果说明电针干预“百会”“风府”及双侧“肾俞”穴后上调 Notch1 同时下调 Hes1 的表达可促进神经干细胞的增殖分化，这可能与电针组小鼠学习记忆功能改善有关。该实验通过腹腔注射 BrdU 标记新合成的 DNA 来检测海马区阳性细胞表达来发现海马区神经元再生情况^[26]，结果显示电针干预后海马区阳性细胞表达显著增高，说明电针干预可促进神经干细胞的增殖，此过程可能与电针调控 Notch 信号通路有关。

Notch1 是重要的突触可塑性调节因子，目前哺乳动物中发现 4 种 Notch 受体，其中 Notch 1 与学习记忆关系最为密切，

Notch1 是突触可塑性和记忆形成机制的重要调控者，Notch1 信号失调会导致突触可塑性降低，学习记忆能力受损^[27-28]。脑源性神经营养因子是一种对于神经系统生长发育十分重要的神经营养因子，对中枢神经系统突触的形成、成熟以及可塑性均有重要意义^[29-30]。脑源性神经营养因子及其受体 TrkB 信号通路诱导的信号级联将神经元的生长和分化与突触可塑性联系起来^[31]，在阿尔茨海默病动物模型中，小鼠海马中脑源性神经营养因子/TrkB/CREB 信号通路上调后，突触可塑性相关蛋白突触后致密蛋白 95 和突触素表达增加，小鼠突触可塑性增强并且在水迷宫实验中表现为学习记忆功能提高^[32]，在抑郁症模型大鼠中，脑源性神经营养因子表达降低同样影响突触后致密蛋白 95 和突触素等突触相关蛋白的表达，从而导致杏仁核和前额叶皮质神经突触结构可塑性的变化^[33-35]。在该实验中，电针干预后学习记忆功能改善且脑源性神经营养因子表达增高，提示脑源性神经营养因子对突触可塑性具有重要意义。突触素参与神经递质的传递与释放，因此可衡量海马突触结构和功能的可塑性^[36-38]。该实验电针干预后突触素表达增加，提示电针对放射性脑损伤小鼠突触可塑性的改善作用。突触后致密蛋白 95 常聚集于突触后膜的谷氨酸受体上，其作为信号复合体的“脚手架”在突触发生和神经发育过程中发挥重要作用。突触后致密蛋白 95 可以维持突触的连接、调节树突棘形态及突触功能，因此常被作为突触活性的标志性蛋白。在阿尔茨海默病中发现突触可塑性降低及学习记忆受损与突触后致密蛋白 95 低表达有关^[39]，进一步研究发现人工转录因子突触后致密蛋白 95 的运用改善了阿尔茨海默病小鼠的记忆缺陷^[40]；突触后致密蛋白 95 缺乏或异常可影响自闭症与精神分裂症患者的认知与学习记忆功能障碍^[41]，提示突触后致密蛋白 95 可调节突触可塑性并改善学习记忆功能。该实验中，电针干预后突触后致密蛋白 95 表达增高，说明电针干预改善了学习及记忆功能。

综上所述，电针刺激“百会”“风府”及双侧“肾俞”穴可改善放射线照射所致学习记忆损伤，其作用机制可能与电针上调突触功能相关蛋白突触素、突触后致密蛋白 95 及脑源性神经营养因子的表达有关，但是电针对于突触功能相关蛋白的具体调节机制仍需后续实验进一步探究。

作者贡献：第一作者王冬慧负责实验实施和论文撰写，通讯作者高剑峰负责实验课题设计，其他作者参与协助及评估。

经费支持：该文章接受了“国家自然科学基金(81373852)”的资助。所有作者声明，经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突：文章的全部作者声明，在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

机构伦理问题：实验方案经过河南中医药大学伦理委员会批准(动物伦理审查批准编号：DWLL16020034)。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。

写作指南：该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

文章查重：文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审: 文章经小同行外审专家双盲外审, 同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

生物统计学声明: 文章统计学方法已经通过河南中医药大学生物统计学专家审核。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- [1] LIEVENS Y, GOSPODAROWICZ M, GROVER S, et al. Global impact of radiotherapy in oncology: Saving one million lives by 2035. *Radiother Oncol.* 2017;125(2):175-177.
- [2] 朱小娟, 姜东耀, 东贵荣. 放射性脑病案 [J]. *中国针灸*, 2020,40(6): 678.
- [3] HOPEWELL JW, TROTT KR. Volume effects in radiobiology as applied to radiotherapy. *Radiother Oncol.* 2000;56(3):283-288.
- [4] DAVIS CM, ROMA PG, ARMOUR E, et al. Effects of X-ray radiation on complex visual discrimination learning and social recognition memory in rats. *PLoS One.* 2014;9(8):e104393.
- [5] 高剑峰, 郑婉君, 吕明惠, 等. 电针干预对放射线照射小鼠海马神经元凋亡的影响及机制研究 [J]. *中华放射肿瘤学杂志*, 2017,26(12): 1443-1448.
- [6] 杨光, 裴亚妮, 邵淑君, 等. 电针“百会”“涌泉”对 APP/PS1 双转基因小鼠海马突触可塑性相关蛋白表达的影响 [J]. *针刺研究*, 2020,45(4):310-314.
- [7] ZHAO J, SUI M, LÜ X, et al. Electroacupuncture promotes neural stem cell proliferation and neurogenesis in the dentate gyrus of rats following stroke via upregulation of Notch1 expression. *Mol Med Rep.* 2015;12(5):6911-6917.
- [8] WANG Y, CHAN SL, MIELE L, et al. Involvement of Notch signaling in hippocampal synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(25): 9458-9462.
- [9] 武鑫, 孙宁宁, 王冬慧, 等. 电针干预对放射线照射小鼠海马区突触蛋白-1 表达的影响 [J]. *上海针灸杂志*, 2020,39(6):783-789.
- [10] 余曙光, 郭义. *实验针灸学* [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2009: 149-150.
- [11] 邵莹, 罗占收. 中医“治未病”思想与现代医学“预防、诊断和治疗”早期阿尔茨海默病 [J]. *中国老年学杂志*, 2019,39(4):991-996.
- [12] 夏昆鹏, 逢静, 李书霖, 等. 督脉电针对阿尔茨海默病患者学习记忆能力及血清 APP、A β (1-42) 的影响 [J]. *中国针灸*, 2020,40(4): 375-378.
- [13] 张涛, 徐福如, 蒋文君, 等. 电针肾俞穴对肾阳虚豚鼠形态行为及血清激素的影响 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2020,40(6):703-707.
- [14] 郑丹妮, 刘悦, 刘通. 基于数据挖掘的针刺治疗中风后抑郁的选穴规律分析 [J]. *广州中医药大学学报*, 2020,37(7):1403-1409.
- [15] 高媛媛, 王旭, 任路. “肾脑相济”电针对阿尔茨海默病模型小鼠行为学及 IL-1b、TNF- α 表达的影响 [J]. *上海针灸杂志*, 2020,39(3): 359-364.
- [16] FAN XW, LIU HH, WANG HB, et al. Electroacupuncture Improves Cognitive Function and Hippocampal Neurogenesis after Brain Irradiation. *Radiat Res.* 2017;187(6):672-681.
- [17] 杨玉洁, 李玉姣, 李杉杉, 等. 用于评价大小鼠学习记忆能力的迷宫实验方法比较 [J]. *中国比较医学杂志*, 2018,28(12):129-134.
- [18] BREUNIG JJ, SILBEREIS J, VACCARINO FM, et al. Notch regulates cell fate and dendrite morphology of newborn neurons in the postnatal dentate gyrus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(51):20558-20563.
- [19] KOYANAGI I, AKERS KG, VERGARA P, et al. Memory consolidation during sleep and adult hippocampal neurogenesis. *Neural Regen Res.* 2019; 14(1):20-23.
- [20] HO DM, ARTAVANIS-TSAKONAS S. The Notch-Mediated Proliferation Circuitry. *Curr Top Dev Biol.* 2016;116:17-33.
- [21] ROESE-KOERNER B, STAPPERT L, BRÜSTLE O. Notch/Hes signaling and miR-9 engage in complex feedback interactions controlling neural progenitor cell proliferation and differentiation. *Neurogenesis (Austin).* 2017;4(1):e1313647.
- [22] SHA R, HAN X, ZHENG C, et al. The Effects of Electroacupuncture in a Rat Model of Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury Following Middle Cerebral Artery Occlusion Involves MicroRNA-223 and the PTEN Signaling Pathway. *Med Sci Monit.* 2019;25:10077-10088.
- [23] 雷蕾, 孙宁, 杜巧荣, 等. Notch 信号通路在神经精神领域的研究进展 [J]. *中华临床医师杂志 (电子版)*, 2015,9(5):838-842.
- [24] OHTSUKA T, SAKAMOTO M, GUILLEMOT F, et al. Roles of the basic helix-loop-helix genes Hes1 and Hes5 in expansion of neural stem cells of the developing brain. *J Biol Chem.* 2001;276(32):30467-30474.
- [25] 武鑫, 孙宁宁, 吕明惠, 等. 不同疗程电针干预对放射线照射小鼠海马神经干细胞增殖分化的影响 [J]. *针刺研究*, 2019,44(11): 787-792,816.
- [26] ERIKSSON PS, PERFILIEVA E, BJÖRK-ERIKSSON T, et al. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med.* 1998;4(11):1313-1317.
- [27] BRAI E, MARATHE S, ASTORI S, et al. Notch1 Regulates Hippocampal Plasticity Through Interaction with the Reelin Pathway, Glutamatergic Transmission and CREB Signaling. *Front Cell Neurosci.* 2015;9:447.
- [28] ALBERI L, LIU S, WANG Y, et al. Activity-induced Notch signaling in neurons requires Arc/Arg3.1 and is essential for synaptic plasticity in hippocampal networks. *Neuron.* 2011;69(3):437-444.
- [29] RAUTI R, CELLOT G, D'ANDREA P, et al. BDNF impact on synaptic dynamics: extra or intracellular long-term release differently regulates cultured hippocampal synapses. *Mol Brain.* 2020;13(1):43.
- [30] LEAL G, COMPRIDO D, DUARTE CB. BDNF-induced local protein synthesis and synaptic plasticity. *Neuropharmacology.* 2014;76 Pt C: 639-656.
- [31] SASI M, VIGNOLI B, CANOSSA M, et al. Neurobiology of local and intercellular BDNF signaling. *Pflugers Arch.* 2017;469(5-6):593-610.
- [32] 何丽玲, 龙清华, 胡慧, 等. 大补元煎通过上调 BDNF/TrkB/CREB 信号通路改善 APP/PS1 双转基因痴呆小鼠海马突触可塑性 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020(网络首发)
- [33] 郑丹赞, 李芝慧, 张民远, 等. 电针对急性束缚性应激大鼠海马组织 BDNF/TrkB 表达的影响 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2018,38(7): 865-869.
- [34] 李秘, 李凯, 丁宁, 等. 电针对创伤后应激障碍大鼠杏仁核及海马区环磷腺苷效应元件结合蛋白的表达及与突触蛋白结合能力的影响 [J]. *针刺研究*, 2020,45(7):517-523.
- [35] 周鹏佑, 蒲博轩, 刘洋, 等. 生命早期 PM(2.5) 暴露对大鼠海马突触可塑性及 Wnt/ β -连环蛋白通路的影响 [J]. *卫生研究*, 2020,49(3): 473-479.
- [36] ZHU X, WANG P, LIU H, et al. Changes and Significance of SYP and GAP-43 Expression in the Hippocampus of CIH Rats. *Int J Med Sci.* 2019; 16(3):394-402.
- [37] KOLOS YA, GRIGORIYEV IP, KORZHEVSKIY DE. A synaptic marker synaptophysin. *Morfologija.* 2015;147(1):78-82.
- [38] KWON SE, CHAPMAN ER. Synaptophysin regulates the kinetics of synaptic vesicle endocytosis in central neurons. *Neuron.* 2011;70(5): 847-854.
- [39] GOOZEE KG, SHAH TM, SOHRABI HR, et al. Examining the potential clinical value of curcumin in the prevention and diagnosis of Alzheimer's disease. *Br J Nutr.* 2016;115(3):449-465.
- [40] BUSTOS FJ, AMPUERO E, JURY N, et al. Epigenetic editing of the Dlg4/PSD95 gene improves cognition in aged and Alzheimer's disease mice. *Brain.* 2017;140(12):3252-3268.
- [41] COLEY AA, GAO WJ. PSD95: A synaptic protein implicated in schizophrenia or autism? *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2018;82:187-194.