

# 学习记忆训练对全脑缺血大鼠认知能力的影响及其胆碱能机制

张军艳<sup>1,2</sup> 张博爱<sup>1,4</sup> 朱红灿<sup>1</sup> 黄晓琳<sup>3</sup>

**摘要** 目的:探讨学习记忆训练对全脑缺血大鼠空间学习记忆能力的影响及其胆碱能机制。方法:选用健康雄性SD大鼠90只随机分为假手术组、对照组、训练组。采用改良Pulsinelli's 4血管闭塞法制作全脑缺血大鼠模型。术后1周以Y型电迷宫训练大鼠,分别在训练7d、14d、21d后应用Y型电迷宫检测比较三组大鼠的空间学习记忆能力的差异。结果:训练21d后,对照组与假手术组和训练组比较,Y型电迷宫全天总反应时间和潜伏期明显延长( $P<0.05$ ),错误反应次数明显增多( $P<0.05$ )。对照组神经元明显水肿,细胞器明显减少。训练组神经元细胞大、圆,细胞质丰富。对照组CA1区乙酰胆碱转移酶的光密度值明显低于假手术组和训练组( $P<0.05$ ),而训练组和假手术组之间差异无显著性意义( $P>0.05$ )。结论:学习记忆训练可以改善全脑缺血大鼠的空间学习记忆能力,其机制可能是训练增加了乙酰胆碱转移酶的活性或训练抑制了乙酰胆碱转移酶活性的降低。

**关键词** Y型电迷宫;全脑缺血;空间学习记忆;乙酰胆碱转移酶

中图分类号:R493, R743 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2008)-04-0305-04

Effects of learning and memory training on spatial learning and memory deficits and its cholinergic mechanism in rats with global cerebral ischemia/ZHANG Junyan, ZHANG Boai, ZHU Hongcan, et al// Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2008, 23(4):305-308

**Abstract Objective:**To explore the effects of learning and memory training on spatial learning and memory deficits and its cholinergic mechanism in rats with global cerebral ischemia. **Method:** Ninety male SD rats were randomly divided into three groups: sham-operated group, control group and training group. Rat model of global cerebral ischemia were made by a modified Pulsinelli's 4-vessel occlusion method. The rats were trained with Y-type maze seven days after operation. **Result:** After training for 21 days, the total reaction time and reaction time in control group were significantly longer than those in training group and sham-operated group ( $P<0.05$ ), and the error number were significantly increased ( $P<0.05$ ). The ultrastructure of hippocampus CA1 pyramidal neuron in the control group were distorted compared with those in the sham-operated group and the training group. The expression of ChAT in hippocampal CA1 region of the control group were significantly less than those in the sham-operated group and the training group. **Conclusion:** Learning and memory training can significantly improve the spatial learning and memory abilities in rats with global cerebral ischemia. Its mechanism may be related to training increased ChAT activity or suppressed ChAT activity decrease after global cerebral ischemia in hippocampal CA1 region.

**Author's address** Dept. of Neurology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou, 450000

**Key words** Y-type maze; global cerebral ischemia; spatial learning and memory; choline acetyltransferase

全脑缺血后会导致大鼠出现学习记忆能力的减退,并且脑内胆碱乙酰转移酶(choline acetyltransferase, ChAT)的含量也会降低。关于学习记忆训练对全脑缺血大鼠空间学习记忆能力的影响以及ChAT变化的报道甚少。本实验采用全脑缺血大鼠模型,应用Y型电迷宫进行训练及测试大鼠学习记忆能力的变化,透射电镜观察海马CA1区神经元的超微结构变化,并用免疫组织化学检测海马CA1区ChAT的活性的变化,探讨通过学习记忆训练对于改善全脑缺血引起的学习记忆障碍的恢复机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 主要实验仪器和试剂:**Y型电迷宫(张家港生物医学仪器厂); Powerlab 多导电生理系统、Chart5

1 河南省郑州大学第一附属医院神经内科,郑州市,450000

2 河南省新乡医学院第三附属医院神经内科

3 湖北省华中科技大学同济医院康复科

4 通讯作者:张博爱(河南省郑州大学第一附属医院神经内科,郑州市,450000)

作者简介:张军艳,女,硕士在读

收稿日期:2007-10-17

分析软件(澳大利亚);日立 H-7500 型透射电子显微镜;一抗(兔抗乙酰胆碱转移酶血清,北京中山生物技术有限公司)。免疫组化试剂盒(北京中山生物技术有限公司)。

**1.1.2 实验动物:**健康成年雄性 SD 大鼠,清洁级,体质量 250—350g,由河南省实验动物中心提供。

## 1.2 方法

**1.2.1 实验动物的筛选及分组:**大鼠经 Y 型迷宫测试,选择活跃,对电击反应较敏感,逃避反应迅速的大鼠进行训练。淘汰掉反应过于迟钝或特别敏感的大鼠。预选出达到连续 2 次正确反应,电击次数 $\leq 3$ 次,对电击反应较敏感的大鼠供实验用。在上述初步筛选的基础上,通过正式迷宫训练 4—7 天,淘汰达不到学会标准的大鼠。将筛选合格的大鼠随机分为 3 组:假手术组、对照组和训练组。

**1.2.2 全脑缺血模型制备:**采用改良的 Pulsinelli's 4 血管闭塞法制作全脑缺血大鼠模型<sup>[1]</sup>。模型成功的标志是:①大鼠在夹闭后 1—2min 内深昏迷,翻正反射消失,但是能够自主呼吸。②夹闭 2—4min 后大鼠脑电图成等电位,直到再灌注后才逐渐恢复。手术过程中用 100W 日光灯照射,术中使大鼠的肛温保持在 36.5—37.5℃,假手术组除不电凝椎动脉、不夹闭双侧颈总动脉外,其余过程与手术组相同。切口内注射 32 万 U/ml 青霉素注射液 0.1ml,缝合切口,进行络合碘消毒,腹腔注射上述浓度的青霉素注射液 0.3ml,放回原环境饲养。术后第 7 天进行迷宫测试后,根据训练时间的不同将各组再分为 7d、14d 和 21d 3 组,分别编号、称重及分笼饲养,每组各时间点 10 只大鼠。

**1.2.3 学习记忆训练:**用 Y 型电迷宫对大鼠进行学习记忆训练:Y 型电迷宫为三等分辐射式反射箱,通过电刺激控制仪电击动物足部,电流强度 0.7mA,电击电压为 50—70V,延迟 5s。反射箱 3 个臂的顶端有信号灯,信号灯亮时此臂无电,另外两个臂通电。采用固定次数随机不休息法:安全区以无规则次序变换,大鼠逃到安全区后,灯光继续作用 10s,不熄灯,大鼠也不休息,而以大鼠所在支臂作为下一次测试的起点,依次重复,每轮固定训练 20 次。每天训练两轮(早 8 时和晚 8 时),连续训练 21d。假手术组和对照组不进行电击和灯光指示,大鼠可以在迷宫中自由活动,操作时间和训练次数同训练组。分别在训练的 7d、14d、21d 对大鼠进行检测,连测 3 天取其平均值记录每只大鼠错误反应次数、全天总反应时间和潜伏期。

**1.2.4 透射电子显微镜观察:**训练 21d 后,将大鼠用

10%的水合氯醛(0.3ml/100g)麻醉后,快速断头取脑(4℃),剥离海马 CA1 区,将组织块切成 1mm<sup>3</sup>的小块放入 4%戊二醛内前固定,用 PBS 充分清洗后,放入 1%锇酸中后固定,再用 PBS 充分清洗,乙醇梯度逐级脱水,每次 10—15min,再行 100%丙酮脱水 2 次,每次 10—15min,环氧树脂 812、815 混合物包埋聚合后,用 Leica 超薄切片机切片,厚度为 50nm,醋酸铀和柠檬酸铅双重电子染色,日立 H-7500 型透射电子显微镜观察海马 CA1 区神经元超微结构。

**1.2.5 免疫组织化学染色:**各组大鼠分别于训练的第 7 天、14 天、21 天进行学习记忆测试后取材。将大鼠用 10%的水合氯醛(0.3ml/100g)麻醉后,打开胸腔,行左心室插管(将右心耳剪开),经升主动脉快速灌注生理盐水约 500ml,自右心房流出的生理盐水变清后快速灌注 4℃ 4%多聚甲醛溶液约 250ml,约灌注 3—4min 时可以观察到大鼠出现全身抽搐,之后减慢灌注速度,持续 3—4h,此时大鼠全身僵硬。灌注完毕后立即小心地取出脑组织置于灌满灌注液的瓶子中,尽快行石蜡包埋、切片,以视交叉、乳头体中部,平行大脑后缘与小脑的连线,自前向后,连续切片,片厚 5 $\mu$ m。采用标准 ABC 免疫组织化学法染色,一抗为兔抗乙酰胆碱转移酶(1:200),阴性对照用 0.01MPBS 代替一抗。通过彩色图文分析系统,在 400 倍物镜下每组随机选取 5 张切片,在每个海马 CA1 区分别选择 5 个相邻的视野摄取图像传递至计算机显示屏,分析各组乙酰胆碱转移酶免疫阳性神经元的平均光密度值以反映乙酰胆碱转移酶表达的强弱。

## 1.3 统计学分析

数据采用均数 $\pm$ 标准差表示,应用 SPSS13.0 统计软件包对数据进行分析,统计分析采用单因素方差分析(ANOVA)处理实验数据。 $P < 0.05$  为差异有显著性意义。

## 2 结果

### 2.1 各组大鼠不同时间点学习记忆测试结果

术前各组大鼠的学习能力一致,均达到了学会标准,错误次数为  $1.00 \pm 0.82$ ,全天总反应时间为  $(89.08 \pm 19.07)$ s,潜伏期为  $(4.45 \pm 1.69)$ s。

训练 7d 后,与假手术组比较,对照组的学习记忆能力明显减退,具有显著性意义( $P < 0.05$ )。与对照组比较,训练组的学习记忆能力有所改善( $P < 0.05$ );与假手术组比较,训练组的全天总反应时间和潜伏期延长,具有显著性意义( $P < 0.05$ ),错误反应次数无显著性意义( $P > 0.05$ )。

训练 14d 和 21d 时,与假手术组比较,对照组学习记忆能力进一步减退。与对照组比较,训练组学习记忆能力进一步改善,各项测试指标均具有显著性意义( $P<0.05$ )。训练 21d 时,与假手术组比较,训练组错误反应次数和潜伏期无显著性意义( $P>0.05$ ),全天总反应时间具有显著性意义( $P<0.05$ ),见表 1。

表 1 Y 型迷宫训练前后各组大鼠学习记忆能力的检测 ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	鼠数	错误反应次数	全天总反应时间(s)	潜伏期(s)
<b>训练组</b>				
7d 组	10	5.83±4.07 <sup>②③</sup>	171.92±41.67 <sup>①③</sup>	8.60±5.93 <sup>①③</sup>
14d 组	10	2.17±2.14 <sup>②③</sup>	135.96±55.96 <sup>②③</sup>	6.78±5.19 <sup>②③</sup>
21d 组	10	1.75±1.50 <sup>②③</sup>	155.98±35.78 <sup>①③</sup>	6.55±5.45 <sup>②③</sup>
<b>对照组</b>				
7d 组	10	16.00±1.41 <sup>①</sup>	299.72±13.21 <sup>①</sup>	14.97±9.01 <sup>①</sup>
14d 组	10	14.00±4.24 <sup>①</sup>	250.52±55.26 <sup>①</sup>	12.50±7.94 <sup>①</sup>
21d 组	10	15.50±2.12 <sup>①</sup>	291.46±6.64 <sup>①</sup>	15.27±9.48 <sup>①</sup>
<b>假手术组</b>				
7d 组	10	2.00±1.00	107.02±16.81	5.35±1.69
14d 组	10	2.00±2.31	96.71±26.91	4.84±2.29
21d 组	10	1.50±0.71	113.94±18.65	5.69±1.53

与假手术组比较:① $P<0.05$ ,② $P>0.05$ ;与对照组比较:③ $P<0.05$

## 2.2 各组海马 CA1 区神经元超微结构比较

训练 21d 后,经透射电镜观察,假手术组海马 CA1 区锥体神经元大而圆,核膜清晰,核仁明显,细胞器丰富,可见线粒体、粗面内质网、游离的核糖体,还见不典型的高尔基复合体,突触结构完整。与假手术组比较,对照组神经元细胞质水肿明显,核形状不规则,细胞器明显减少,散在,线粒体大部分或全部嵴融合或消失,粗面内质网脱颗粒明显,部分双层核层融合或消失,神经元突触间隙增宽。训练组神经元细胞大而圆,细胞质丰富,内有线粒体、粗面内质网等细胞器,核大而椭圆,居中,线粒体的部分嵴与膜融合或消失,粗面内质网有脱颗粒现象,常染色质丰富,异染质较少(图 1,见前置彩色插页 5)。

## 2.3 各组不同时间点海马 CA1 区乙酰胆碱转移酶表达的光密度值比较

光镜下假手术组海马 CA1 区可见较多的乙酰胆碱转移酶免疫阳性神经元,阳性产物呈棕黄色点状沉积,主要分布在神经元内。训练组和对照组乙酰胆碱转移酶免疫阳性神经元相对较少,对照组乙酰胆碱转移酶免疫阳性神经元分布稀疏,随着缺血时间的延长,数量逐渐减少,着色变浅(图 2,见前置彩色插页 5)。阴性对照用 PBS 代替一抗,未见阳性产物。训练 7d 后,与假手术组比较,训练组和对照组海马 CA1 区乙酰胆碱转移酶 AOD 值明显降低( $P<0.05$ ),训练组和对照组之间比较差异无显著性意义( $P>0.05$ )。训练 14d 后,训练组 AOD 值升高,与对照组比较差异具有显著性意义( $P<0.05$ )。训练 21d 后,训练组 AOD 值进一步升高,与对照组比较,差异更

明显( $P<0.05$ ),与假手术组比较,差异无显著性意义( $P>0.05$ ),表 2。

表 2 各组海马 CA1 区乙酰胆碱转移酶免疫阳性神经元图像分析结果 ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	鼠数	平均光密度值
<b>训练组</b>		
7d 组	10	0.0945±0.0138 <sup>①④</sup>
14d 组	10	0.1142±0.0134 <sup>①③</sup>
21d 组	10	0.1220±0.0186 <sup>②③</sup>
<b>对照组</b>		
7d 组	10	0.0900±0.0150 <sup>①</sup>
14d 组	10	0.0679±0.0102 <sup>①</sup>
21d 组	10	0.0654±0.0134 <sup>①</sup>
<b>假手术组</b>		
7d 组	10	0.1384±0.0185
14d 组	10	0.1338±0.0146
21d 组	10	0.1329±0.0197

与假手术组比较:① $P<0.05$ ,② $P>0.05$ ;与对照组比较:③ $P<0.05$ ,④ $P>0.05$

## 3 讨论

乙酰胆碱是迄今发现的与学习记忆关系最为密切的一种神经递质,ChAT 是乙酰胆碱的合成酶,它可以催化乙酰辅酶 A 和胆碱生成乙酰胆碱,因此 ChAT 的活力变化可以反映乙酰胆碱在脑中代谢率的变化,可以作为合成乙酰胆碱的指示剂,ChAT 表达增强,则乙酰胆碱合成增加,反之,则乙酰胆碱的合成减少,从而学习记忆能力下降。

海马胆碱能神经元与学习记忆能力关系密切,脑缺血后会导致不同程度的学习记忆障碍。Wiard RP 等<sup>[2]</sup>在反复脑出血后大鼠海马、纹状体、丘脑和颞叶皮质等脑区,测定乙酰胆碱、乙酰胆碱转移酶含量均显著下降。Tohgi H 等<sup>[3]</sup>测定了血管性痴呆患者脑脊液中胆碱及乙酰胆碱的含量,发现乙酰胆碱的含量下降,且下降的程度与血管性痴呆的评分呈显著正相关。双侧颈总动脉反复缺血-再灌注后,模型组小鼠学习记忆能力下降,应用石杉碱甲后学习记忆改善并且与 ChATmRNA 表达增高有关<sup>[4]</sup>。Kimura S 等<sup>[5]</sup>经过对有卒中倾向的自发性高血压大鼠所致血管性痴呆模型的研究发现,包括海马在内的脑组织的胆碱和乙酰胆碱含量均明显下降,并且与大鼠被动躲避能力的下降显著相关。苗建亭等<sup>[6]</sup>应用 4-血管阻断全脑缺血法建立学习记忆障碍大鼠血管性痴呆模型,用 Y 型迷宫定量测试其学习记忆能力,发现模型组大鼠在术后 2 周出现严重的空间分辨学习记忆能力障碍,海马 CA1 区胆碱乙酰转移酶阳性神经元分布及其数量显著减少。本实验发现术后 1 周模型组大鼠出现学习记忆障碍,并且随着缺血时间的延长,学习记忆障碍逐渐加重。术后 4 周电镜下观察对照组海马 CA1 区神经元细胞质明显水肿,核形状不规则,细胞器明显减少,散在,线粒体大部分或

全部嵴融合或消失,粗面内质网脱颗粒明显,部分双层核层融合或消失。对照组海马 CA1 区乙酰胆碱转移酶的表达亦明显减少,与假手术组和训练组比较有显著性意义,并且与学习记忆能力具有相关性,符合以往的文献报道。可以认为全脑缺血后所导致的大鼠学习记忆障碍,其原因与中枢胆碱能神经元受损功能降低有关。

脑缺血大鼠发生空间学习记忆障碍的同时,海马胆碱乙酰转移酶活性降低,乙酰胆碱含量下降,但是经过训练后海马乙酰胆碱和乙酰胆碱转移酶含量会有所升高<sup>[7]</sup>。沈维高等<sup>[8]</sup>以水迷宫法建立大鼠空间分辨性学习记忆动物模型后,测定海马乙酰胆碱和胆碱酯酶的含量,发现具有空间分辨性学习记忆能力的老年大鼠海马乙酰胆碱含量和乙酰胆碱能纤维的密度均比对照组增加。Dunbar 等<sup>[7]</sup>通过大量研究发现在水迷宫中表现较好的大鼠其海马中乙酰胆碱转移酶的活性和胆碱的摄取量都有所增加。左萍萍等<sup>[9]</sup>通过对缺血再灌注大鼠进行 Y 型迷宫空间变换训练后发现实验组大鼠海马和皮层乙酰胆碱转移酶较假训组高。本实验发现全脑缺血大鼠经 Y 型迷宫训练 3 周后,训练组神经元细胞大而圆,细胞质丰富,内有线粒体、粗面内质网等细胞器,核大,常染色质丰富,异染质较少。海马 CA1 区乙酰胆碱转移酶的表达较对照组明显增加,同时大鼠的空间学习记忆能力也明显改善。因此认为 Y 型迷宫训练可以改善全脑大鼠的学习记忆障碍,其原因可能是因为训练信息不断经过海马传入脑内,减轻了胆碱能神经元的坏死,增加了乙酰胆碱转移酶的活性或训练抑制了乙酰胆碱转移酶活性的降低。

缺血早期进行学习记忆训练可以改善全脑大鼠

的学习记忆障碍,但是停止训练后,大鼠的学习记忆能力会发生什么变化,是否能够延迟或减缓全脑缺血大鼠的学习记忆能力障碍的进一步加重,尚需进一步研究,从而能够为临床对于血管性认知障碍患者早期进行康复训练改善其学习记忆障碍提供实验室依据。

## 参考文献

- [1] 贾建民, 贾建平. 大鼠脑反复缺血致不可逆学习障碍的研究[J]. 心理学报, 1995, 27(1): 69—76.
- [2] Tohgi H, Abe T, Kimura M, et al. Cerebrospinal fluid acetylcholine and choline in vascular dementia of Binswanger and multiple small infarct types as compared with Alzheimer-type dementia[J]. *Neural Transm*, 1996, 103: 1211—1220.
- [3] Wiard RP, Dickerson MC, Beek O, et al. Neuroprotective properties of the novel antiepileptic lamotrigine in a Gerbil model of global cerebral ischemia[J]. *Stroke*, 1995, 26(3): 466—472.
- [4] 吕佩源, 宋春风, 樊敬峰, 等. 血管性痴呆小鼠海马胆碱乙酰转移酶 mRNA 表达特征及石杉碱甲的影响[J]. *中风与神经疾病杂志*, 2006, 23(1): 15—17.
- [5] Kimura S, Saito H, Minami M, et al. Pathogenesis of vascular dementia in stroke-prone spontaneously hypertensive rats [J]. *Toxicology*, 2000, 153: 167—168.
- [6] 苗建亭, 游国雄, 王者晋. 血管性痴呆大鼠记忆障碍与海马胆碱能神经元关系的研究 [J]. *中华老年医学杂志*, 1997, 16(6): 327—330.
- [7] Dunbar GL, Rylett RJ, Schnidt BM, et al. Hippocampal choline acetyltransferase activity correlates with spatial learning in aged rats[J]. *Brain Res*, 1993, 604: 266—272.
- [8] 沈维高, 何欣, 冯利民, 等. 老年大鼠在空间辨别性学习记忆时海马 Ach 和 Ach 能纤维的变化 [J]. *中国老年学杂志*, 2006, 26(11): 1528—1529.
- [9] 左萍萍, 刘娜, 陈纪君, 等. 空间学习记忆引起脑内胆碱乙酰转移酶活性的变化[J]. *基础医学与临床*, 1997, 17(6): 72.