

· 基础研究 ·

电针对慢性脑缺血大鼠学习记忆及海马神经组织形态学的影响

魏居瑞 刘喆 刘佩 夏玮 何方 曾宇晴 陈萍 骆碧君

【摘要】目的 观察电针对慢性脑缺血大鼠学习记忆功能和海马神经组织形态学的影响。**方法** 雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 120 只, 采用改良永久性结扎双侧颈总动脉法造成慢性脑缺血模型, 将造模成功的 104 只分为模型组和电针组, 每组 52 只, 每组再分为术后第 1, 2, 4, 6 周 4 个时间点, 每个时间点 13 只。电针组采用电针治疗; 利用 Morris 水迷宫、HE 染色分别在术后第 1, 2, 4, 6 周观察 2 组空间学习能力和记忆能力的变化情况以及海马神经组织形态学变化。**结果** 电针组大鼠在术后第 2, 4, 6 周时学习记忆能力明显高于同时点模型组大鼠 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 电针组大鼠海马齿状回区神经细胞结构紧密, 排列整齐, 层次丰富。**结论** 电针能够改善慢性脑缺血大鼠空间学习能力和记忆能力, 并能改善慢性脑缺血大鼠受损海马组织形态学。

【关键词】 电针; 海马; 学习记忆; 大鼠

Effects of electro-acupuncture on learning, memory and the morphology of hippocampal nerve tissue after cerebral ischemia in rats WEI Ju-rui*, LIU Zhe, LIU Pei, XIA Wei, HE Fang, ZENG Yu-qing, CHEN Ping, LUO Bi-jun. * Department of Comprehensive Rehabilitation, People's Hospital of Linan City, Linan 311300, China Corresponding author: LIU Zhe, Email: srsliu@163.com

【Abstract】Objective To observe the effects of electro-acupuncture (EA) on learning, memory and the morphology of hippocampal neural tissues in rats with a model of chronic cerebral ischemia. **Methods** One hundred and twenty male Sprague-Dawley rats were used. Chronic cerebral ischemia models were successfully established in 104 of them, and those rats were randomly divided into an EA group and a model group with 52 rats each. These were further subdivided into 1, 2, 4 and 6 week subgroups with 13 rats in each. The EA group was given EA. The changes in spatial learning and memory ability were observed using a Morris water maze. The morphological changes in hippocampal nerve tissue were observed by HE staining. **Results** The escape latency in the EA group was significantly different from the model group at the 2nd, 4th and 6th week. The nerve cells in the dentate gyrus were more tightly and consistently lined-up and had rich layers, and the structures in the EA group were better than in the model group. **Conclusions** EA can improve spatial learning and memory and promote the repair of injury after cerebral ischemia.

【Key words】 Electro-acupuncture; Hippocampus; Learning; Memory

缺血性脑卒中 (ischemic stroke) 约占脑血管病的 70%, 是脑血液供应障碍引起的缺血缺氧导致脑组织缺血性坏死或软化。研究显示, 约有 25% 的脑卒中患者伴有程度不同的智能障碍^[1]。随着我国社会老龄化程度的加剧, 各种因素导致的脑血流不足致使脑血管疾病发生率升高, 尤其是脑卒中及各种类型的痴呆

发生率升高。长期慢性全脑缺血、缺氧可引起记忆、认知障碍, 从而导致各种认知功能缺陷疾病的发生。海马是目前公认的与学习、记忆等高级神经功能活动具有密切关系的重要脑区, 缺血对海马的损伤是痴呆的主要病理基础。目前研究认为, 新生神经元可增殖、迁移、并分化为特殊的神经细胞表型^[1]。我们以往的研究发现, 电针可促进局灶性脑缺血后内源性神经干细胞的增殖并改善其损伤的运动能力^[2-3]。近期研究证实, 人类成体组织可诱导成为多潜能干细胞^[4-8], 但由于缺乏科学设计的高等哺乳动物实验和临床实验的证实以及最佳移植时机尚处于实验阶段, 故这是今后的研究重点。本研究旨在观察电针治疗对慢性脑缺血大鼠学习记忆功能和海马神经组织形态学的影响。

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2011.08.004

基金项目: 浙江省自然科学基金项目 (Y205389), 浙江省中医药科研基金 (2006 C009)

作者单位: 311300 临安, 浙江省临安市人民医院综合康复科 (魏居瑞、何方、曾宇晴、陈萍、骆碧君); 浙江中医药大学第三临床医学院 (刘喆); 浙江省海宁第三市人民医院针灸科 (刘佩); 郑州市中医院中医院针灸科 (夏玮)

通信作者: 刘喆, Email: srsliu@163.com

材料与方法

一、动物模型的制作及分组

选用 SPF 级、健康雄性、3 个月龄的 SD 大鼠 120 只,体重(230 ± 20)g,购自中科院上海实验动物中心,饲养于浙江中医药大学实验动物中心。造模前用 Morris 水迷宫测试所有大鼠逃避潜伏期。采用李巍等^[9]改良的永久性结扎双侧颈总动脉加大鼠尾端放血制作慢性灌注不足的模型。用 3% 戊巴比妥钠(40 mg/kg 体重)腹腔注射麻醉大鼠,麻醉后将大鼠仰卧固定于手术台上,充分暴露颈部,用弯剪将颈部正中毛剪去约 1.5 cm × 3 cm 见方,用 PV 碘消毒后行颈部正中切开术,切口约 1 cm,分离双侧颈总动脉,4#缝合线结扎,然后将大鼠尾置于 50℃ 水中约 30 s 后,立即在距大鼠尾端约 0.7 cm 处剪尾放血,放血量为大鼠总血量的 10% (占体重的 7.4%),按压止血,PV 碘消毒,缝合切口并用 PV 碘消毒,并撒适量的青霉素钠抗感染,再将大鼠置于 37℃ 环境中,待其完全苏醒后分组并予以处理。造模前共有大鼠 120 只,有 11 只在造模前后死亡。造模后大鼠共有 109 只,通过造模前后 Morris 水迷宫检测比较,以造模后大鼠逃避潜伏期明显延长为造模成功标准,剔除 5 只造模后逃避潜伏期无明显变化的大鼠,共有 104 只进入本实验,造模成功率 86.67%。

术后将 104 只大鼠分为模型组和电针组,每组 52 只,每组再分为术后第 1,2,4,6 周 4 个时间点,每个时间点 13 只。

二、电针治疗

1. 电针组:造模后第一天开始行电针治疗。用双手固定大鼠头顶部,参照《实验针灸学》^[10]中大鼠穴位定位方法取百会穴和大椎穴,百会穴沿头顶正中线向后斜平刺 0.2 cm,大椎穴直刺 0.5 mm。输出电流 1 mA,频率 15 Hz 连续波,每次治疗 20 min,每天 1 次,治疗 7 次后休息 2 d。分别在术后第 1,2,4,6 周后处死取材。

2. 模型组:模型制备同电针组,但不予电针治疗,其余固定方法、时间、处死同电针组。

三、Morris 水迷宫检测

2 组大鼠在处死前 5 d 开始用 Fric 等^[11]的方法行 Morris 水迷宫检测。连续进行 4 d 的训练测试逃避潜伏期,每日 4 次。第 5 天进行:①空间探索实验,观察规定时间内大鼠在池中的游泳路径(搜索策略);②定位航行实验,观察逃避潜伏期和游泳路径(逃避潜伏期)。上述试验通过与安装在迷宫上方的摄像机相联的 PC 机 Windows 平台上观察并记录、储存,并运用行为轨迹跟踪系统软件(MTApp)进行分析和数据处理。

四、HE 染色

2 组大鼠各时间点均抽取 7 只大鼠(其余大鼠行 RT-PCR 等指标检测),分别在术后 1,2,4,6 周 Morris 水迷宫检测后,用 3% 戊巴比妥钠(40 mg/kg 体重)腹腔注射麻醉后用生理盐水经左心室、升主动脉灌注,直至流出液为澄清液体,接着推注含 4% 多聚甲醛的 0.1 M 磷酸缓冲液(pH7.4)200 ml。随后滴注 4% 多聚甲醛 500 ml(先快滴后慢滴),然后开颅,将脑迅速取出,置于上述固定液中,4℃ 固定 24 h;取出脑组织,自鼠脑前囟后 2.12 mm(即对耳线 6.88 mm 处)开始,切取 5 mm 厚的组织块,后移入 4% 多聚甲醛中再固定 4 ~ 5 h,常规切片,梯度酒精脱水、透明、石蜡包埋。再脱蜡、水化。选取海马部位做连续冠状切片(片厚 8 μm),取部分切片进行 HE 染色,光镜下观察并且对比电针及模型组大鼠海马齿状回区神经细胞结构、形态以及细胞脱失情况。

五、统计学分析

采用 SPSS 11.5 版统计软件处理。数据以($\bar{x} \pm s$)表示;进行单因素方差分析(One-Way ANOVA),组间两两比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。方差齐性时用 LSD 检验,方差不齐时用 Dunnett-t 检验。

结 果

一、Morris 水迷宫检测

1. 定位航行实验:定位航行实验检测大鼠获取经验(学习)的能力,以平均潜伏期表示。同时间点电针组与模型组相比,电针组学习能力提高,但术后第 1 周时 2 组间差异无统计学意义($P > 0.05$),术后第 2 周、6 周时 2 组差异有统计学意义($P < 0.05$),术后第 4 周时 2 组间差异亦有统计学意义($P < 0.01$)。电针组大鼠随着治疗时间的延长平均逃避潜伏期缩短,但差异无统计学意义。提示电针能改善学习记忆障碍大鼠的空间学习能力。详见表 1。

表 1 2 组大鼠各时间点逃避潜伏期、第一象限内游泳时间比较($s, \bar{x} \pm s$)

组 别	只数	逃避潜伏期	第一象限内游泳时间
模型组	52		
术后第 1 周	13	25.07 ± 6.44	15.62 ± 6.28
术后第 2 周	13	32.21 ± 7.91	19.82 ± 5.16
术后第 4 周	13	23.7 ± 7.28	22.65 ± 4.01
术后第 6 周	13	30.11 ± 5.76	27.79 ± 4.63
电针组	52		
术后第 1 周	13	27.52 ± 8.03	26.2 ± 7.91
术后第 2 周	13	23.8 ± 4.16 ^a	31.96 ± 9.51 ^a
术后第 4 周	13	32.91 ± 11.68 ^b	34.43 ± 6.03
术后第 6 周	13	22.26 ± 4.90 ^a	36.51 ± 7.36 ^{ac}

注:与模型组同期比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$;与组内术后 1 周比较,^c $P < 0.05$

2. 空间探索实验:空间探索实验可以反映大鼠的空间记忆能力即目标象限内的游泳时间,以及初始角度、跨越平台次数。同时间点电针组与模型组相比,电针组在第一象限的游泳时间长($P < 0.05$),术后第 2,4 周时 2 组间差异有统计学意义($P < 0.05$),说明电针组记忆能力提高,表明电针可以提高慢性脑缺血模型大鼠的空间记忆能力,明显改善其空间记忆障碍。见表 1。

二、海马组织形态学变化

通过对海马组织进行 HE 染色后镜下观察,细胞核为蓝色,细胞质为粉红色,在缺血早期即术后第 1,2 周时大鼠海马齿状回区神经细胞排列紧密但杂乱,表现为胞体不同程度缩小、胞膜皱缩、突起回缩、核膜皱缩、核深染、细胞轮廓不清晰,染色质模糊不清;但可以看到术后第 1 周时电针组海马齿状回区神经细胞大量增殖;随着缺血时间的延长海马齿状回区神经细胞严重脱失排列稀疏、胶质细胞大量增生,形成结节,有少数细胞核固缩为三角形或多角形,呈现海马硬化;这些存活神经细胞有不同程度变性的形态学改变,但是同时间点电针组与模型组相比,电针组形态较好,见图 1。提示电针治疗能改善慢性脑缺血模型大鼠海马组织形态学损伤。

讨 论

海马在许多记忆过程中起重要作用,包括空间学习、对环境中物体的方位进行定位及将不连续的信息连接起来。有实验表明,海马及其周围皮质是外显记忆神经通路的重要组成部分,同时损伤海马和周围皮质会出现严重的记忆障碍^[12]。脑缺血可造成海马损伤引起学习记忆能力下降,而海马是缺血损伤最敏感脑区,直接参与信息贮存和回忆,为认知功能障碍研究中涉及最多的脑区之一^[13-14]。赵建新等^[15]认为,海马 CA1 区神经元的迟发性死亡可能是缺血性脑血管病导致痴呆的主要原因。即使短暂的脑缺血也可造成神经元延迟性死亡^[16]。本实验采用永久性结扎双侧颈总动脉加上大鼠尾端放血制作慢性灌注不足的模型并加以改进,可以有效地模拟如椎基底动脉狭窄、颈动脉粥样硬化斑块形成及各种慢性心脑血管疾患引起的脑供血不足而导致的认知功能缺陷性疾病。病理形态学观察结果显示,模型组脑组织海马呈缺血性改变,HE 染色海马 CA1 区锥体细胞层次不清,细胞明显脱失,许多细胞结构不完整,细胞排列稀疏、紊乱,细胞核体积变小、深染,呈核固缩表现,有的形成三角形、多角形或碎片。

针灸治疗慢性脑缺血引起的认知功能障碍疾病(如血管性痴呆)疗效确切^[17-19]。本实验发现,在造模初期模型组与电针组大鼠海马齿状回颗粒下层有大量神经细胞增殖,但是随着缺血时间的延长海马神经细胞数大量减少,相应的大鼠学习记忆能力减弱,这间接证实了海马在学习记忆过程中的主导作用。电针组不管是学习记忆能力还是海马组织形态均优于同时时间点的模型组,这说明电针治疗可通过保护海马神经细胞改善学习记忆能力,并且随着治疗时间的延长学习记忆能力改善显著。研究发现,针灸可通过改善颅内血流动力学状态及血流变的高黏、高凝;清除氧自由基,阻断脂质过氧化反应;保护神经元结构和细胞器结构完整;提高大脑皮质兴奋性,改善脑血流,从而增加脑血氧供应;减少大脑皮质神经细胞的死亡;调节神经递质特别是增加脑内乙酰胆碱的含量^[20-22]。电针百会、大椎穴对慢性脑缺血模型大鼠出现的脑缺血、缺氧状态及海马神经细胞形态有显著改善作用。电针治疗改善缺血性脑损伤的主要作用机制之一可能是通过多种途径激发海马神经细胞自身参与脑神经结构和功能的自身修复实现的^[2-3],从而改善和提高了其学习记忆能力。近年来干细胞研究渐渐成为医学研究的热点,在将来更进一步的研究中,我们将观察电针治疗对海马神经干细胞的增殖、分化作用,从而更客观深入地揭示电针治疗对缺血性脑病的作用机制。

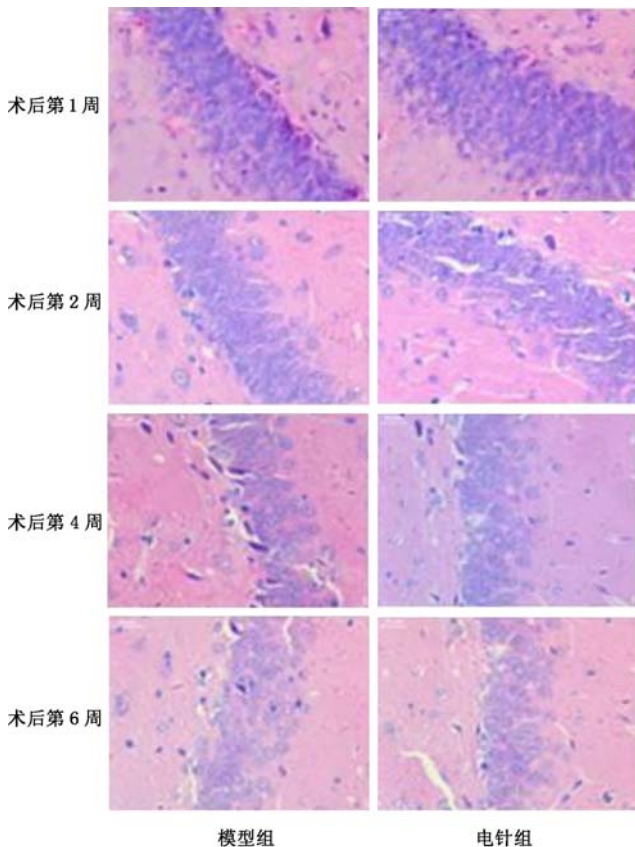


图 1 不同时间点 2 组大鼠海马组织(HE 染色, $\times 400$)

参 考 文 献

- [1] Desmond DW, Moroney JT, Paik MC, et al. Frequency and clinical determinants of dementia after ischemic stroke. *Neurology*, 2000, 54: 1124-1131.
- [2] 刘喆, 赖新生. 电针对成年脑缺血大鼠缺血侧神经干细胞巢蛋白表达的影响. *中国临床康复*, 2005, 9: 89-91.
- [3] 刘喆, 赖新生. 电针对局灶性脑缺血大鼠神经干细胞巢蛋白表达的影响. *中华物理医学与康复杂志*, 2005, 27: 591-594.
- [4] Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, 2007, 318: 1917-1920.
- [5] Hanna J, Markoulaki S, Patrick Schorder P, et al. Direct reprogramming of terminally differentiated mature B lymphocytes to pluripotency. *Cell*, 2008, 133: 250-264.
- [6] Kim JB, Zaehres H, Wu G, et al. Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors. *Nature*, 2008, 454: 646-650.
- [7] Judson RL, Babiarz JE, Venere M, et al. Embryonic stem cell-specific microRNAs promote induced pluripotency. *Nat Biotechnol*, 2009, 27: 459-461.
- [8] Dimos JT, Rodolfa KT, Niakan KK, et al. Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science*, 2008, 321: 1218-1221.
- [9] 李巍, 张世仪, 赵惠敏, 等. 小鼠缺血性学习记忆障碍模型的建立. *基础医学与临床*, 1995, 15: 46.
- [10] 李忠仁. *实验针灸学*. 北京: 中国中医药出版社, 2003: 327.
- [11] Frick KM, Baxter MG, Markowaska AL, et al. Age-related spatial reference and working memory deficits assessed in the water maze. *Neurobiol Aging*, 1995, 16: 149-160.
- [12] 万选才, 杨天祝, 徐承焘. *现代神经生物学*. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1999: 537.
- [13] 张雪朝, 贺志光, 吕明庄, 等. 血管性痴呆大鼠记忆障碍与海马 Bcl2 蛋白表达的研究. *中国病理生理杂志*, 2002, 18: 1294-1295.
- [14] 叶建新, 崔晓萍, 林航, 等. 海马锥体细胞的变化对血管性痴呆大鼠学习记忆能力的影响. *精神疾病和精神卫生*, 2008, 8: 187-189.
- [15] 赵建新, 田元祥, 李国明, 等. 脑缺血再灌注拟血管性痴呆小鼠皮层及海马细胞病理形态学动态观察. *中风与神经疾病杂志*, 2000, 17: 200-202.
- [16] 田金洲. *血管性痴呆*. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 315-327.
- [17] 彭唯娜, 赵宏, 刘志顺, 等. 电针治疗血管性痴呆的系统评价. *中国针灸*, 2004, 24: 297-232.
- [18] 包烨华, 冯伟民, 朱国祥, 等. 头穴久留针治疗血管性痴呆的随机对照研究. *中国针灸*, 2004, 24: 81-84.
- [19] 赵惠, 孙忠人, 孙远征, 等. 原络配穴为主治疗血管性痴呆疗效观察. *中国针灸*, 2004, 24: 525-527.
- [20] 张志真, 周德安, 刘慧林, 等. 中药疏调益智方及针灸元神方治疗血管性痴呆的临床研究. *北京中医*, 2001, 20: 36-39.
- [21] 赖新生, 莫飞智, 江钢辉, 等. 针刺治疗血管性痴呆的临床疗效及对超氧化物歧化酶, 脂质过氧化物及一氧化氮的影响. *中国中西医结合杂志*, 1998, 18: 648-651.
- [22] 莫启忠, 方军, 等. 针刺足三里穴位对大鼠脑及脾脏组织中 5-HT 和 M 受体功能的影响. *针刺研究*, 1994, 19: 33.

(修回日期: 2011-06-17)

(本文编辑: 松 明)

· 消息 ·

《中华物理医学与康复杂志》2012 年征订启事

《中华物理医学与康复杂志》是中华医学会主办的物理医学与康复(康复医学)专业的高水平学术期刊, 本刊为月刊, 大 16 开, 内芯 80 页码, 中国标准刊号: ISSN 0254-1424 CN 42-1666/R, 邮发代号: 38-391, 每月 25 日出版; 每册定价 15 元, 全年 180 元整。热忱欢迎国内外物理治疗、物理医学与康复、康复医学领域以及神经内科、神经外科、骨科等相关科室的各级医务工作者踊跃订阅、投稿。订购办法: ①邮局订阅: 按照邮发代号 38-391, 到全国各地邮局办理订阅手续。②直接订阅: 通过邮局汇款至本刊编辑部订购, 各类订户汇款时务请注明所需的杂志名称及年、卷、期、册数等。编辑部地址: 430030 武汉市解放大道 1095 号同济医院内《中华物理医学与康复杂志》编辑部; 电话: (027) 83662874; 传真: (027) 83663264; E-mail: cjpmr@tjh.tjmu.edu.cn; 杂志投稿网址: www.cjpmr.cn。