

高压氧对脑小血管病大鼠学习记忆功能及脑源性神经生长因子、乙酰胆碱表达的影响

杨杰华 冼晓琪 区大明 孙静

【摘要】目的 观察高压氧治疗对脑小血管病(CSVD)模型大鼠脑皮质及海马区脑源性神经生长因子(BDNF)及乙酰胆碱(Ach)表达的影响,同时观察治疗前、后大鼠学习记忆功能改善情况,并探讨高压氧治疗CSVD的可能机制。**方法** 选取健康雄性Wistar大鼠60只,采用颈外动脉注射粒径为48~74 μm大鼠同种异体血栓制成CSVD大鼠模型。选用随机数字表法将上述CSVD模型大鼠分为高压氧组、尼膜同组及对照组。高压氧组大鼠于制模12 h后给予高压氧治疗,尼膜同组大鼠于制模12 h后给予尼膜地平片-混悬液灌胃,对照组大鼠制模后不给予任何特殊干预。各组大鼠分别于制模7 d、14 d及28 d时通过Morris水迷宫实验观察其学习记忆功能改变;于制模28 d时采用酶联免疫吸附法(ELISA)检测各组大鼠脑皮质及海马区BDNF、Ach含量。**结果** 制模14 d、28 d时高压氧组大鼠逃避潜伏期[分别为(28.5±6.6)s和(15.8±4.7)s]均显著短于尼膜同组及对照组($P<0.05$),穿越平台次数[分别为(3.4±1.2)次/分钟和(4.5±1.9)次/分钟]均较尼膜同组及对照组明显增多($P<0.05$);另外制模14 d、28 d时尼膜同组逃避潜伏期及穿越平台次数亦显著优于对照组($P<0.05$)。高压氧组大鼠脑皮质、海马中Ach含量[分别为(175.1±23.5) μg/g和(158.8±25.5) μg/g]及BDNF含量[分别为(105.1±7.9) μg/g和(172.1±23.1) μg/g]均较尼膜同组和对照组明显增多($P<0.05$);尼膜同组脑皮质、海马部位Ach及BDNF含量亦较对照组明显增多($P<0.05$)。**结论** 高压氧干预能促进CSVD大鼠BDNF释放,有助于保护及修复神经元线粒体,维持脑皮质及海马区神经递质Ach处于稳定水平,对改善大鼠学习、记忆功能具有重要作用,其疗效优于尼膜同药物治疗。

【关键词】 高压氧; 尼膜同; 脑小血管病; 脑源性神经生长因子; 乙酰胆碱; 学习记忆

Effects of hyperbaric oxygen on learning, memory and the expression of brain-derived growth factor and acetylcholine Yang Jiehua, Xian Xiaoqi, Ou Daming, Sun Jing. Hyperbaric Oxygen Treatment Center, The First People's Hospital of Foshan, Foshan 528000, China

【Abstract】 Objective To observe the effects of hyperbaric oxygen (HBO) on cerebral small vessel disease (CSVD) and on learning, memory and the expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and acetylcholine (Ach) in the cerebral cortex and hippocampus. **Methods** Sixty healthy, male Wistar rats were studied. Allograft thrombosis particles 48 to 74 μm in diameter were injected into the rats' external carotid arteries to create a CSVD model. The rats were then divided randomly into a hyperbaric oxygen group, a nimotop group and a control group. The hyperbaric oxygen group rats were given hyperbaric oxygen therapy 12 hours after the modeling. The nimotop group rats were given nimodipine by intragastric perfusion 12h after the modeling. The rats in the control group had no special intervention. At 7, 14 and 28 days after the modeling, any changes in learning and memory were assessed with a Morris water maze test. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the expression of BDNF in the cerebral cortex and of Ach in the hippocampus at 28 days. **Results** At both 14 and 28 days the average escape latency of the rats in the hyperbaric oxygen group was significantly shorter than those of the nimotop and control groups. The average platform crossing time had increased significantly more than in the nimotop and control groups. At both 14 and 28 days the escape latency and platform crossing times of the nimotop group were significantly better than in the control group. Ach content and BDNF content were significantly higher in the HBO group than in the nimotop and control groups. **Conclusions** Hyperbaric oxygen treatment can promote BDNF release in CSVD, which is helpful to protect and repair neural mitochondria, to maintain the cortex and hippocampal neurotransmitters on a stable level, and to improve learning and memory. Its effect is better than that of nimotop.

【Key words】 Hyperbaric oxygen; Nimotop; Cerebral small vessel disease; Brain-derived neurotrophic

factors; Acetylcholine; Learning; Memory

脑小血管病(cerebral small vessel disease, CSVD)是指由脑内小血管(包括小动脉、微动脉、毛细血管和微静脉等)病变导致的疾病,主要引起皮质下多发点状缺血缺氧灶、微出血灶、腔隙性梗死、白质损伤等病理学改变,能导致中枢胆碱能系统中神经递质乙酰胆碱(acetylcholine, Ach)释放减少^[1-2]。由于 Ach 在大脑皮质及海马区神经元中的含量直接影响机体学习记忆、认知、人格、情感及行为等多方面功能,其含量下降可直接诱发一系列临床症状。脑源性神经生长因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)被认为是一种抗凋亡剂、抗氧化剂及钙通道阻滞剂,在大脑皮质及海马区分布广泛,对神经元生长发育及损伤修复具有重要作用。本研究通过观察高压氧干预对 CSVD 模型大鼠学习记忆功能及皮质和海马中 Ach、BDNF 含量的影响,为临床采用高压氧治疗 CSVD 患者提供参考资料。现报道如下。

材料与方法

一、动物模型及分组

共选取健康雄性 Wistar 大鼠 60 只,体重 200 ~ 250 g,由佛山市第一人民医院动物房提供,实验大鼠采用戊巴比妥钠按每千克体重 100 mg 经腹腔深度麻醉后,采用颈外动脉注射半径为 48 ~ 74 μm 的大鼠同种异体血栓以制备 CSVD 模型。采用随机数字表法将制模成功大鼠分为高压氧组、尼膜同组及对照组,每组 20 只大鼠。

二、干预方法

高压氧组大鼠于制模 12 h 后给予高压氧治疗,采用武汉船舶厂生产的小型婴儿用高压氧舱作为动物实验舱,舱内温度设定为 18 ~ 24 $^{\circ}\text{C}$,舱底铺满新鲜钠石灰。待大鼠进舱后,先用纯氧(浓度大于 99%)连续洗舱(氧流量为 10 ~ 12 L/min) 10 min,经检测发现舱内氧浓度达 90% 以上时升压(氧流量为 8 ~ 10 L/min),在 15 min 内加压至 0.2 MPa,稳压期持续 60 min,期间继续采用纯氧换气 10 ~ 15 min,以保证舱内氧浓度达 90% 以上,待稳压期结束后于 20 min 内减至常压大鼠出舱,每次高压氧治疗需时约 100 min。上述高压氧治疗每天 1 次,每周休息 1 d,连续治疗 4 周。尼膜同组大鼠于制模 12 h 后给予尼膜同治疗,将尼膜地平片[每片 30 mg,拜耳(中国)医药保健有限公司出品,药物批号:国药准字 H200301]制成混悬液按每千克体重 0.50 mg 灌胃,每天治疗 3 次,连续治疗 4 周。对照组大鼠制模后不给予任何特殊处理。

三、大鼠学习记忆功能检查

各组大鼠分别于制模 7 d、14 d 及 28 d 时采用 Morris 水迷宫实验进行学习记忆功能检查,水迷宫为一直径 120 cm 圆筒,周围涂黑色,水为不透明乳白色,实验时水深 40 cm,池壁四周分别标有 A(东)、B(南)、C(西)、D(北)4 个入水点,将水池等分为 4 个象限,分别在每个区正中离池壁 33 cm 处放置一个直径 9 cm、高 39 cm 的圆形透明平台,平台顶部低于水面 1 cm。Morris 水迷宫检查项目包括:①逃避实验,将实验大鼠面向水池壁分别从 A、B、C、D 入水点放入水中,记录其在 2 min 内寻找并爬上平台所需的时间(即逃避潜伏期);若 2 min 内未找到平台,实验者则将大鼠引导至平台上,停留 10 s 后放回笼中,此时逃避潜伏期计为 120 s,每只大鼠 1 d 内重复测试 4 次,取其平均值纳入后续分析。②空间探索实验,首先将水池内 4 个平台撤除,然后将各组实验大鼠面向水池壁分别从 A、B、C、D 入水点放入水中,观察大鼠在 2 min 内跨越原平台所在区域的次数,每只大鼠 1 d 内重复测试 2 次,取其平均值纳入后续分析^[3]。

四、标本取材及 ELISA 检测

各组实验大鼠分别于制模 28 d 且 Morris 水迷宫实验结束后,采用戊巴比妥钠按每千克体重 100 mg 经腹腔深度麻醉后断头取脑,迅速剥离脑组织并在冰盘上分离脑皮质及海马组织,称湿重后分别按 1:20 (W:V)比例加入 0.9 ml、浓度为 0.01 mmol/L 的磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS),采用高速均质机在冰水浴中匀浆,经离心(4500 r/min) 10 min 后分别收集上清液,分装后保存于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱中待测。采用上海源叶生物科技有限公司酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒测定各组大鼠脑皮质及海马组织中 Ach 及 BDNF 含量,整个检测过程均严格按照 ELISA 试剂盒说明书进行^[4]。

五、统计学分析

本研究所得计量数据以($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 11.0 版统计学软件包进行数据分析,计量资料比较采用 *t* 检验,计数资料比较采用确切概率法或校正 χ^2 检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

结 果

一、治疗前、后各组大鼠学习记忆功能比较

治疗前、后各组实验大鼠学习记忆功能检查结果详见表 1,表中数据显示,制模 7 d 时各组大鼠逃避潜伏期及穿越平台次数组间差异均无统计学意义($P > 0.05$);制模 14 d、28 d 时高压氧组逃避潜伏期均显著短于尼膜同组及对照组,穿越平台次数均较尼膜同组

表 1 治疗前、后各组大鼠学习记忆功能检查结果比较($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	Morris 水迷宫逃避潜伏期(s)			Morris 水迷宫穿越平台次数(次/分钟)		
		制模 7 d 时	制模 14 d 时	制模 28 d 时	制模 7 d 时	制模 14 d 时	制模 28 d 时
对照组	20	55.8 ± 6.5	48.3 ± 6.8	42.8 ± 5.9	1.1 ± 1.1	1.3 ± 1.6	1.7 ± 1.4
尼膜同组	20	49.1 ± 5.3	40.5 ± 7.3 ^a	30.5 ± 5.3 ^a	1.8 ± 1.4	2.3 ± 1.8 ^a	2.7 ± 1.3 ^a
高压氧组	20	48.7 ± 7.5	28.5 ± 6.6 ^{ab}	15.8 ± 4.7 ^{ab}	2.2 ± 1.7	3.4 ± 1.2 ^{ab}	4.5 ± 1.9 ^{ab}

注:与对照组相同时间点比较,^a $P < 0.05$;与尼膜同组相同时间点比较,^b $P < 0.05$

及对对照组明显增多,组间差异均具有统计学意义($P < 0.05$);另外制模 14 d、28 d 时尼膜同组逃避潜伏期及穿越平台次数亦显著优于对照组水平,组间差异亦具有统计学意义($P < 0.05$)。

二、治疗后各组大鼠脑组织中 Ach 及 BDNF 含量比较

通过 ELISA 法检测发现,各组实验大鼠脑组织中 Ach 与 BDNF 含量均呈现不均态分布,如皮质中 Ach 含量较海马组织明显增多,可能与皮质神经元数量较多有关;而海马区 BDNF 含量较皮质区明显增多,可能与海马区主要发挥神经递质功能有关。进一步分析发现,高压氧组大鼠脑皮质、海马中 Ach 及 BDNF 含量均较尼膜同组及对对照组明显增多,组间差异均具有统计学意义($P < 0.05$);尼膜同组脑皮质、海马部位 Ach 及 BDNF 含量亦较对照组明显增多,组间差异也具有统计学意义($P < 0.05$)。具体数据见表 2。

表 2 治疗后各组实验大鼠脑皮质及海马部位 Ach、BDNF 含量比较($\mu\text{g/g}$, $\bar{x} \pm s$)

组别	只数	脑皮质 Ach 含量	脑皮质 BDNF 含量	海马 Ach 含量	海马 BDNF 含量
对照组	20	129.5 ± 17.0	85.7 ± 11.3	98.7 ± 15.5	141.9 ± 18.3
尼膜同组	20	141.3 ± 22.3 ^a	91.1 ± 9.1 ^a	143.2 ± 26.1 ^a	159.7 ± 24.2 ^a
高压氧组	20	175.1 ± 23.5 ^{ab}	105.1 ± 7.9 ^{ab}	158.8 ± 25.5 ^{ab}	172.1 ± 23.1 ^{ab}

注:与对照组相同时间点比较,^a $P < 0.05$;与尼膜同组相同时间点比较,^b $P < 0.05$

讨 论

CSVD 是老年人群常见隐袭性脑血管疾病,也是导致血管性痴呆的重要危险因素。目前关于 CSVD 的发病机制仍未明确,其可能机制包括:单一小动脉阻塞会导致散在腔隙性梗死,以皮质下白质较容易受损;小动脉狭窄和低灌注可影响多支血管,能导致两个或多个动脉边缘带缺血,以侧脑室旁和深部白质容易受到损伤,而腔隙性梗死或深部白质病变均能破坏额叶-皮质下环路,从而导致认知功能损害甚至痴呆。由于 CSVD 严重影响患者日常生活质量,目前已逐渐引起临床重视,如 2008 年国际卒中会议及欧洲卒中会议上均将 CSVD 与认知功能障碍作为讨论热点^[6]。

目前国内、外临床针对 CSVD 患者多给予尼莫地平类药物,如尼莫同是一种二氢吡啶类钙通道阻

滞药,能从血管层面对认知障碍进行干预,其治疗机制包括:①能阻断 L2 型钙通道,抑制血管平滑肌钙内流,对脑血管自主调节具有一定作用,能舒张脑血管、改善脑灌注;②能抑制神经细胞钙超载,阻断神经细胞死亡的“共同通道”,从而发挥神经保护作用^[7]。目前国内、外指南、共识及循证学证据均推荐采用尼莫同治疗 CSVD 患者^[8]。本研究结果表明,尼莫同组大鼠经 4 周治疗后,发现其学习记忆功能均较对照组明显改善,进一步证明尼莫同对治疗 CSVD 具有确切疗效。

大量研究表明,高压氧干预能显著提高机体血氧分压,增加氧有效弥散距离,加速侧支循环形成,增强病变部位脑血流灌注,提高有氧代谢水平及促进三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)生成增多,加速酸性代谢产物清除,减轻脑水肿,从而为神经组织再生及功能恢复提供良好基础^[9];还有研究发现高压氧可抑制脑小血管纤维样或淀粉样变性,直接改善微小血管能量代谢及内皮细胞功能^[10]。线粒体是机体进行氧化磷酸化反应、合成能量物质 ATP 的重要结构,当因脑缺血等损伤使线粒体功能出现紊乱时,细胞色素 C (cytochrome C, Cyt C) 从线粒体中释放,并活化半胱氨酸蛋白酶(caspase)前体,进而激活 caspase 3,引发 caspases 级联反应,从而诱发细胞凋亡^[11]。杨传红等^[12]通过研究发现,高压氧干预对脑缺血性老龄大鼠海马神经元线粒体形态、线粒体中 caspases 3 表达、凋亡细胞 Cyt C 释放等均具有明显调控及保护作用,可促使脑神经元细胞能量代谢迅速恢复,减轻线粒体因缺血、缺氧受到的损伤,并能抑制线粒体损伤诱发的凋亡级联反应,加速酸性代谢产物清除,减轻脑水肿。马明明等^[13]研究证明高压氧干预能保护帕金森病小鼠线粒体功能并抑制细胞凋亡,从而尽可能保留黑质多巴胺能神经元;侯丽敏等^[14]研究发现高压氧能促进成年大鼠脑梗死后神经干细胞增殖及向神经元分化,有助于其神经功能改善。本研究结果也显示,高压氧组大鼠经 4 周治疗后,其学习记忆功能均显著优于尼莫同组及对对照组,提示采用高压氧治疗 CSVD 具有可行性基础。

目前临床上许多疾病发病机制均与神经递质缺乏具有一定相关性,如 Ach 是中枢胆碱能系统中重要的神经递质之一,广泛分布于乙酰胆碱能神经末梢中, Ach 通过与 M1 型毒蕈碱乙酰胆碱受体结合,能激活细

胞外信号调节激酶 (extracellular signal-regulated kinase, ERK) 表达, 有助于学习、记忆能力增强; 如机体脑干、丘脑、基底节区、海马、杏仁核等部位缺乏 Ach, 则容易诱发运动、学习及记忆功能障碍 (如帕金森病、痴呆、抑郁症等)。BDNF 主要分布于机体海马及皮质区, 对海马及皮质神经元损伤后再生修复及防止神经细胞退行性变均具有重要作用^[15]。脑损伤后 BDNF 可通过调节 caspase 3 活性来抑制神经元凋亡, 如损伤导致机体 caspase 3 活性丧失, 则 BDNF 治疗无明显疗效^[16]; 另外也有研究表明 BDNF 可能通过作用于内源性神经祖细胞而增强神经再生功能^[17]。由此可见通过检测海马及脑皮质区 Ach、BDNF 含量能在一定程度上了解机体神经功能状况。目前研究实验动物学习记忆功能的常用方法主要为 Morris 水迷宫检查, 其结果能反映实验动物对目标平台空间位置的学习记忆功能, 从而评价实验动物空间学习记忆能力改善情况, 如逃避潜伏期越短则说明实验动物空间学习记忆能力越好。本研究结果显示, 高压氧组实验大鼠经 4 周治疗后, 其脑皮质及海马中 Ach、BDNF 含量均较尼膜同组、对照组明显增多; 并且高压氧组 Morris 水迷宫逃避潜伏期、穿越平台次数亦显著优于尼膜同组及对照组; 上述结果表明高压氧治疗 CSVD 的疗效优于尼膜同药物治疗, 同时还提示实验大鼠脑皮质、海马区 Ach、BDNF 含量增高可能与其学习记忆功能改善具有密切联系。

综上所述, 本研究结果表明, 高压氧干预能促进 CSVD 模型大鼠 BDNF 释放, 有利于神经元线粒体功能修复, 促进脑皮质、海马区神经递质 Ach 含量增高及胆碱能系统功能恢复, 对改善 CSVD 大鼠学习记忆功能具有重要作用。

参 考 文 献

- [1] 张微微. 脑小血管病的新进展 [J]. 中华脑血管病杂志, 2008, 2(4): 210-213.
- [2] Niu KC, Huang WT, Lin MT, et al. Hyperbaric oxygen causes both anti-inflammation and antipyresis in rabbits [J]. Eur J Pharmacol, 2009, 606(1): 240-245.

- [3] 叶翠飞, 张丽, 艾厚喜, 等. 两种水迷宫实验对拟痴呆模型动物学习记忆功能测试的比较 [J]. 中国行为医学科学杂志, 2004, 13(3): 256-261.
- [4] 李启华, 吉青. 创伤性脑损伤大鼠乙酰胆碱、脑源性神经生长因子表达变化的研究 [J]. 中国医药导报, 2012, 9(22): 28-30.
- [5] 周桂娟, 王彦. 尼膜同改善脑小血管病性认知功能障碍的临床疗效观察 [J]. 现代预防医学, 2012, 39(7): 1838-1840.
- [6] Hachinski V. World Stroke Day 2008: "little strokes, big trouble" [J]. Stroke, 2008, 39(9): 2407-2408.
- [7] 王炜, 王鲁宁. 尼莫地平对轻度认知功能损害患者的干预治疗研究 [J]. 中华内科杂志, 2006, 45(4): 274-276.
- [8] Pantoni L, Del Ser T, Soglian AG, et al. Efficacy and safety of nimodipine in subcortical vascular dementia: a randomized placebo-controlled trial [J]. Stroke, 2005, 36(3): 619-624.
- [9] 谭敏, 彭华, 段军伟, 等. 高压氧治疗对重型脑外伤患者全身炎症反应的影响 [J]. 中华物理医学与康复杂志, 2011, 33(2): 116-119.
- [10] 田小强, 张丽, 杨琳, 等. 高压氧对 Aβ25-35 诱导大鼠认知和记忆障碍及其海马神经元凋亡的影响 [J]. 中华物理医学与康复杂志, 2011, 33(2): 116-119.
- [11] Shore GC, Papa FR, Oakes SA. Signaling cell death from the endoplasmic reticulum stress response [J]. Curr Opin Cell Biol, 2011, 23(2): 143-149.
- [12] 杨传红, 赖晔文, 刘燕, 等. 高压氧对脑缺血性老龄大鼠海马神经元超微结构的影响及线粒体形态计量分析 [J]. 中风与神经疾病杂志, 2004, 21(4): 22-25.
- [13] 马明明, 王雪晶, 丁雪冰, 等. 高压氧对四氢吡啶诱导的帕金森病小鼠黑质多巴胺能神经元的线立体保护作用研究 [J]. 中华物理医学与康复杂志, 2012, 34(9): 641-645.
- [14] 侯丽敏, 种玉飞, 陈红, 等. 高压氧对成年大鼠脑梗死后神经干细胞的增殖和分化的影响 [J]. 中华物理医学与康复杂志, 2013, 35(11): 839-842.
- [15] Von Bartheld CS, Johnson JE. Target-derived BDNF (brain-derived neurotrophic factor) is essential for the survival of developing neurons in the isthmo-optic nucleus [J]. J Comp Neurol, 2001, 433(4): 550-564.
- [16] Kim DH, Zhao X. BDNF protects neurons following injury by modulation of caspase activity [J]. Neurocrit Care, 2005, 3(1): 71-76.
- [17] Henry RA, Hughes SM, Connor B. AAV-mediated delivery of BDNF augments neurogenesis in the normal and quinolinic acid-lesioned adult rat brain [J]. Eur J Neurosci, 2007, 25(12): 3513-3525.

(修回日期: 2014-06-20)

(本文编辑: 易 浩)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

本刊对医学名词使用的要求

为规范医学名词, 本刊以 1989 年及其以后由全国科学技术名词审定委员会 (原全国自然科学名词审定委员会) 审定、公布、科学出版社出版的《医学名词》和相关学科的名词为准, 暂未公布的名词仍以人民卫生出版社出版的《英汉医学词汇》为准。中文药物名称应使用最新版药典 (法定药物) 或卫生部药典委员会编辑的《药名词汇》(非法定药物) 中的名称, 英文药物名称采用国际非专利药名, 不用商品名。