

· 基础研究 ·

电针对血管性痴呆大鼠学习记忆功能和海马突触可塑性的影响

韦登明 贾学敏 尹向旭 蒋雯雯

【摘要】 目的 观察电针对血管性痴呆 (VD) 大鼠学习记忆功能的影响,探讨电针治疗 VD 的作用机制。**方法** 将 40 只 Sprague-Dawley 大鼠分为假手术组、模型组、电针组和西药组,除假手术组行假手术外,其余各组建立 VD 大鼠模型。电针组术后给予电针百会、大椎穴治疗,药物组给予尼莫地平灌胃,均治疗 10 d。采用 Morris 水迷宫试验检测大鼠学习记忆能力,微电极记录海马齿状回长时程增强效应,免疫组织化学染色技术观察脑组织海马突触素 (Syp) 染色情况。**结果** 与模型组比较,电针组和西药组治疗后水迷宫逃避潜伏期明显缩短 ($P < 0.01$),相同时间内在原平台象限跨越相应平台次数明显增多 ($P < 0.01$),高频刺激后相对群峰电位潜伏期缩短、相对兴奋性突触后电位斜率和相对群峰电位幅值增大 ($P < 0.05$),Syp 免疫阳性细胞积分光密度值显著增大 ($P < 0.01$)。**结论** 电针大鼠百会、大椎穴能改善大鼠学习记忆能力,其机制可能是通过促进海马 Syp 的表达从而增强海马突触可塑性以及加快海马神经元突触传递过程来实现。

【关键词】 血管性痴呆; 电针; 学习记忆能力; 长时程增强效应; 突触素

The effects of electroacupuncture on learning, memory and hippocampal synaptic plasticity in vascular dementia WEI Deng-ming, JIA Xue-min, YIN Xiang-xu, JIANG Wen-wen. Department of Pathology, Medical School of Ningbo University, Ningbo 315211, China

【Abstract】 Objective To investigate the effects of electroacupuncture (EA) on spatial learning and memory ability, long-term potentiation (LTP) and synaptophysin (Syp) levels in the dentate gyrus of the hippocampus. **Methods** Forty Sprague-Dawley rats were randomly divided into a sham-operated control group, a model group, an EA group and a medication group. A rat model of vascular dementia (VD) was established by repeated ischemia and reperfusion after pretreatment with sodium nitroprusside. EA was applied to the rat homologues of the human "Baihui" (GV20) and "Dazhui" (DU14) acupoints of the rats in the EA group for 20 min, once daily for 10 d. Morris water maze tests were conducted for evaluating the rats, learning and memory ability. LTP in the hippocampal dentate gyrus was recorded as an electrophysiological index for evaluating learning and memory. Antigenic Syp produced in hippocampal tissue was examined with immunohistochemical assays. **Results** In comparison the with model group, escape latency (EL) shortened and target-platform crossing times increased significantly in the EA and medication groups. After high frequency stimulation the population spike (PS) latency shortened in the EA group compared with the model group, and the excitatory postsynaptic potential (EPSP) slope and PS amplitude increased. All of these differences were statistically significant. Syp positive cells also increased significantly in the EA-treated rats. **Conclusions** EA can increase Syp expression and improve the learning and memory ability of rats with this model of VD. EA could facilitate the induction and maintenance of LTP in the dentate gyrus of the hippocampus through influencing synaptic transmission.

【Key words】 Vascular dementia; Electroacupuncture; Learning; Memory ability; Long-term potentiation; Synaptophysin

血管性痴呆 (vascular dementia, VD) 是指各种缺血性脑血管疾病引起的脑功能障碍而造成的获得性智能损害综合征,以记忆、认知功能缺损为主,是最常见

的老年痴呆之一。目前,电针在临床脑卒中治疗中对学习记忆能力的改善有肯定的作用^[1-2],但其具体的分子生物学机制还不十分清楚。本实验在建立大鼠 VD 模型基础上,通过观察电针干预 VD 大鼠时对海马长时程增强效应 (long-term potentiation, LTP) 及突触素 (synaptophysin, Syp) 表达的影响,探讨电针对 VD 大鼠学习记忆能力的作用及其影响海马突触可塑性变化的机制,现报道如下。

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2011.02.006

基金项目:浙江省自然科学基金项目 (Y2080445),宁波市科技局自然科学基金项目 (2009A610161)

作者单位:315211 宁波,宁波大学医学院病理教研室

材料与方法

一、实验动物及分组

Sprague-Dawley 大鼠 40 只,由浙江大学医学院实验动物中心提供,合格证号 0102008。雌、雄不限,体重 200~250 g,自由饮食。大鼠适应性喂养 7 d 后,分为假手术组、模型组、电针组、西药组,每组 10 只。

二、试剂和仪器

G6805 电针仪(上海华谊仪器制造厂生产);Morris 水迷宫(北京新天地科技公司生产);兔抗大鼠 Syp 多克隆抗体、生物素化羊抗兔 IgG、SABC 试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司);RY-2000 瑞医病理图文分析系统(东南大学瑞医科技产品)。

三、模型制备

模型组、电针组和西药组采用王蕊等^[3]推荐的方法造模,将大鼠用 10% 的水合氯醛麻醉后,仰卧位固定在手术台上,常规消毒,颈正中切口,分离双侧颈总动脉;腹腔注射硝普钠(3.5 mg/kg 体重)后,随即用无创动脉夹夹闭双侧颈总动脉,夹闭 10 min 再通 10 min,再夹闭 10 min,再通后缝合伤口,放回笼中保温饲养。假手术组麻醉及手术过程同上,但不阻断颈总动脉及注射硝普钠。

四、电针及药物干预方法

电针组大鼠术后第 7 天,手术切口基本愈合,饮食正常,开始给予电针治疗。参照实验针灸学^[4]中大鼠的穴位定位方法取百会、大椎穴进针,用 28 号 30 mm 长毫针,于大鼠头部百会穴(顶骨正中)斜刺 1.5 mm,大椎穴(第 7 颈椎与第 1 胸椎间,背部正中)直刺 1.5 mm,连接电针仪,采用连续波,频率为 50 Hz,强度以大鼠能耐受为度(约 1 mA),每天电针 1 次,留针 20 min,连续治疗 10 d。西药组大鼠给予尼莫地平,按 12 mg/kg 体重的剂量灌胃,每日 1 次,连续 10 d。

五、检测方法

1. 学习记忆行为学检测:采用 Morris 水迷宫试验^[5],于电针及西药治疗结束时(即实验第 17 天)进行检测。①定位航行试验(place test):将大鼠固定从第一象限面向池壁放入水中,记录其 2 min 内寻找到平台的时间,即逃避潜伏期(escape latency),历时 6 d,每天试验 2 次。逃避潜伏期越短提示大鼠学习记忆能力越强,反之则越差。②空间探索试验(spatial probe test):定位航行试验结束后(即实验第 22 天)撤除平台,将大鼠固定从第一象限放入水中,记录其 2 min 内跨越原平台的次数及其在水迷宫外环停留的时间。大鼠在相同时间内跨越原平台的次数越多,学习记忆能力越强,反之则越差。由配套电脑系统自动记录成绩。

2. 海马齿状回 LTP 的检测:水迷宫试验结束后

(即实验第 23 天),检测各组大鼠海马齿状回 LTP。大鼠麻醉后固定于脑立体定位仪上,参照 George 图谱^[6],将刺激电极植入左侧大脑内嗅皮质穿通纤维间(前囟后 8.0 mm,左旁开 4.3 mm,颅骨面下 2.95 mm),记录电极插入同侧海马齿状回颗粒细胞层(前囟后 3.5 mm,左旁开 1.95 mm,颅骨面下 3.45 mm),记录高频刺激前、后的最大群峰电位(population spike,PS)潜伏期、兴奋性突触后电位(excitatory postsynaptic potential,EPSP)斜率及 PS 幅值变化百分比。高频刺激采用频率 100 Hz 的串刺激,每串刺激由 5 个波宽 0.1 ms 的方波组成,刺激间隔 200 ms。以进行高频刺激前 10 min 的 PS 潜伏期、EPSP 斜率、PS 波幅的平均值为标准,计算各组高频刺激后第 10、60 和 90 分钟的 PS 潜伏期、EPSP 斜率、PS 波幅与其相对值百分比(即相对 PS 潜伏期、相对 PS 波幅和相对 EPSP 斜率)。

3. 脑组织 Syp 免疫组织化学染色观察:海马齿状回 LTP 检测完毕后,用 10% 水合氯醛(3 ml/kg 体重)麻醉大鼠,迅速开胸暴露心脏;经升主动脉插管后,先用 100 ml 生理盐水快速冲洗,随后用 4% 多聚甲醛磷酸缓冲液(pH 值 7.4)灌注约 1 h;灌注完毕后取海马组织,用福尔马林液固定 24 h,石蜡包埋切片后行 Syp 免疫组织化学染色。

Syp 免疫组织化学染色主要步骤为:石蜡切片常规脱蜡至水,滴加 0.3% H_2O_2 在 37℃ 下处理 15 min;滴加 10% 正常羊血清在 37℃ 下处理 10 min,勿洗;滴加兔抗大鼠 Syp 多克隆抗体(1:300)在 4℃ 下处理 24 h;滴加生物素化羊抗兔 IgG 二抗(1:100)在 37℃ 下处理 2 h;滴加 SABC 适量,在 37℃ 下处理 1 h;DAB 显色 5~10 min;阴性对照实验用磷酸盐缓冲液代替一抗,其余步骤相同。每步之间用 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 值 7.4)洗 3 次,每次 5 min。常规脱水、透明、封片。

结果判断:显微镜下海马神经细胞胞浆棕色着色者为阳性细胞,用 RY-2000 瑞医病理图文分析系统计算其积分光密度。

六、统计学分析

数据以($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 13.10 版统计软件进行单因素方差分析,组间两两比较用 LSD 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、电针对大鼠空间学习记忆能力的影响

假手术组、电针组和西药组大鼠 6 d 平均逃避潜伏期明显较模型组短($P < 0.01$),而假手术组和西药组、电针组之间比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

假手术组、电针组和西药组大鼠在平台象限跨越次数明显多于模型组 ($P < 0.01$), 而电针组、西药组、假手术组 3 组之间比较, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。表明未给予治疗的模型大鼠学习记忆能力较差, 而电针和西药治疗则可改善模型大鼠的学习记忆能力。见表 1。

表 1 各组水迷宫学习记忆行为学检测结果 ($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	逃避潜伏期 (s)	平台跨越次数 (次)
假手术组	10	34 ± 5.65	7.13 ± 1.06
模型组	10	78 ± 6.42 ^a	1.52 ± 1.37 ^a
电针组	10	41 ± 4.36 ^b	5.68 ± 1.64 ^b
西药组	10	40 ± 9.25 ^b	6.25 ± 1.26 ^b

注: 与假手术组比较, ^a $P < 0.01$; 与模型组比较, ^b $P < 0.01$

二、电针对大鼠齿状回 LTP 的影响

各组动物高频刺激后第 10、60 和 90 分钟的相对 PS 潜伏期、相对 PS 波幅和相对 EPSP 斜率见表 2。各组不同观察时间点相对 PS 潜伏期显示, 模型组较假手术组明显延长 ($P < 0.01$), 表明模型组大鼠海马神经元突触传递时间减慢; 而电针组和西药组与模型组比较明显缩短 ($P < 0.05$)。各组不同观察时间点相对 PS 波幅显示, 模型组较假手术组明显减小 ($P < 0.01$); 电针组和西药组与模型组比较明显增大 ($P < 0.05$)。各组不同观察时间点相对 EPSP 斜率显示, 模型组与假手术组比较明显减小 ($P < 0.01$); 电针组和西药组与模型组比较明显增大 ($P < 0.05$)。上述结果提示电针百会、大椎穴可加快大鼠海马神经元突触传递过程。

表 2 各组大鼠齿状回 LTP 的比较 ($\%, \bar{x} \pm s$)

组别	只数	相对 PS 潜伏期	相对 PS 波幅	相对 EPSP 斜率
假手术组	10			
第 10 分钟		72.3 ± 6.1	192.2 ± 7.3	172.3 ± 15.2
第 60 分钟		56.4 ± 3.6	204.4 ± 18.3	189.2 ± 6.3
第 90 分钟		49.3 ± 4.1	269.6 ± 21.4	199.0 ± 7.4
模型组	10			
第 10 分钟		98.2 ± 4.2 ^a	102.5 ± 6.1 ^a	89.2 ± 3.5 ^a
第 60 分钟		91.1 ± 5.3 ^a	110.0 ± 6.2 ^a	99.3 ± 7.1 ^a
第 90 分钟		82.2 ± 6.2 ^a	113.6 ± 7.0 ^a	94.0 ± 7.3 ^a
电针组	10			
第 10 分钟		86.2 ± 4.5 ^b	131.2 ± 9.5 ^b	112.6 ± 7.6 ^b
第 60 分钟		72.3 ± 4.1 ^b	142.1 ± 10.2 ^b	127.5 ± 5.7 ^b
第 90 分钟		65.6 ± 3.7 ^b	145.5 ± 15.5 ^b	118.2 ± 4.5 ^b
西药组	10			
第 10 分钟		81.3 ± 5.4 ^b	136.4 ± 7.2 ^b	119.5 ± 6.8 ^b
第 60 分钟		69.4 ± 6.2 ^b	146.2 ± 9.2 ^b	131.6 ± 6.6 ^b
第 90 分钟		61.5 ± 5.5 ^b	149.3 ± 12.1 ^b	121.4 ± 6.5 ^b

注: 与假手术组比较, ^a $P < 0.01$; 与模型组比较, ^b $P < 0.05$

三、电针对大鼠脑组织 Syp 表达的影响

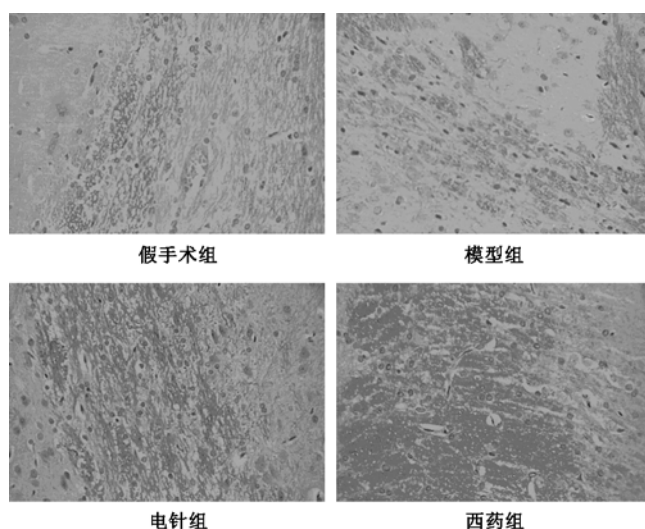
假手术组大鼠海马组织见少量阳性细胞; 模型组

大鼠脑组织见较多 Syp 免疫染色阳性细胞, 主要分布于海马神经细胞胞浆; 应用电针和西药治疗后, 大鼠脑组织 Syp 免疫染色阳性细胞积分光密度值较模型组明显增加, 与模型组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 见表 3 和图 1。

表 3 各组大鼠海马组织 Syp 表达的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	积分光密度
假手术组	10	51.26 ± 5.65
模型组	10	76.18 ± 7.25 ^a
电针组	10	112.35 ± 5.32 ^b
西药组	10	119.15 ± 8.16 ^b

注: 与假手术组比较, ^a $P < 0.05$; 与模型组比较, ^b $P < 0.01$



注: 假手术组见少量 Syp 免疫染色阳性细胞, 模型组见较多 Syp 免疫染色阳性细胞, 电针组和西药组 Syp 免疫染色阳性细胞进一步增多

图 1 各组大鼠脑组织 Syp 表达 (免疫组织化学染色, $\times 200$)

讨 论

电针作为一种传统的非药物治疗手段, 多年来在我国得到广泛应用, 而且在临床老年性痴呆治疗中有肯定的价值^[1,7,9]。中医学认为, VD 病变在脑, 督脉通于脑, 百会、大椎皆属督脉, 百会为“三阳五会”, 大椎为“诸阳之会”, 针刺两穴, 可醒脑益智开窍、振奋阳气, 并达阳以生阴之功, 可促进 VD 大鼠脑组织功能恢复^[10], 故本实验选穴以督脉之百会、大椎为治疗穴。电针及药物治疗后, 我们采用水迷宫试验检测实验动物学习记忆能力的变化, 结果表明: 与模型组比较, 经电针治疗后的大鼠逃避潜伏期明显缩短 ($P < 0.01$), 相同时间内跨越原平台次数明显增多 ($P < 0.01$); 且电针组与西药组上述两项指标比较, 差异无统计学意义。该结果提示电针百会、大椎穴在改善 VD 大鼠学习记忆能力方面有显著疗效, 且西药与电针的治疗效

果相近。

有研究证实,记忆的神经学基础是海马突触可塑性的改变,LTP 是突触可塑性的重要表现形式,研究最多和最熟知的突触可塑性细胞学机制就是 LTP^[11]。所谓突触可塑性,是指突触传递的效率和强度的变化,对记忆的形成起着关键性作用^[12]。本研究采用微电极记录海马齿状回 LTP 的电生理参数的变化,发现电针组与模型组比较,PS 潜伏期缩短、EPSP 斜率和 PS 波幅增大,表明电针大鼠百会、大椎穴,可加快大鼠海马神经细胞的突触传递过程,并加强突触后神经元的同步活动,提示电针治疗对海马神经突触功能的可塑性有调节作用。

Syp 是一种与突触结构和功能密切相关的膜蛋白。Syp 作为突触囊泡的一种特异标志性蛋白,其数量和分布密度可间接反映突触的密度^[13];突触重建时 Syp 表达明显增多,提示其与神经可塑性密切相关。Syp 作为突触前终末标记物,使用免疫组织化学方法及图像分析技术检测其免疫阳性物质在给定区域的光密度值,可以间接反映突触的密度及分布。免疫组织化学研究证实,Syp 的免疫活性物质在成熟脑组织中高度集中于突触前轴突末梢内,围绕着神经元及其树突,因此该蛋白被广泛用于标记轴突终末,是突触重建的重要标志。有研究发现,机体在缺血缺氧时,反映神经细胞代偿及重塑的 Syp 表达和生成增加^[14-16]。本研究采用免疫组织化学染色技术观察脑组织海马 Syp 染色,发现与模型组比较,电针组和西药组大鼠 Syp 免疫阳性细胞积分光密度值显著增大。提示电针大鼠百会、大椎穴可提高海马神经突触密度,增强突触结构的可塑性。

海马既是缺血损伤敏感脑区,又是学习记忆的相关脑区。海马脑区的结构和功能状态,能够反映学习记忆障碍的程度和治疗效果。我们的研究结果显示:电针百会、大椎穴可改善 VD 大鼠学习记忆能力,其机制可能是通过促进海马神经突触功能和结构的可塑性

来实现的,具体机制仍有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 赵宏,曹乃钊,刘志顺,等. 电针治疗中重度血管性痴呆疗效观察. 上海针灸杂志,2006,25:82-84.
- [2] 张晓彤. 针刺治疗血管性痴呆临床研究进展. 医学综述,2006,12:502-503.
- [3] 王蕊,杨秦飞,唐一鹏,等. 大鼠拟血管性痴呆模型的改进. 中国病理生理杂志,2000,16:914-916.
- [4] 林文注. 实验针灸学. 上海:上海科学技术出版社,1996:68-69.
- [5] Morris R. Developments of a water maze procedure for studying spatial learning in the rat. J Neurosci Meth,1984,11:47-60.
- [6] Paxinos G, Watson C, 诸葛启钊. 大鼠脑立体定位图谱. 3 版. 北京:人民卫生出版社,2005:89-90.
- [7] 陈振虎,赖新生,江钢辉. 电针治疗血管性痴呆 23 例临床观察. 江西中医药,2006,37:46-48.
- [8] 计毅,刘艳彬,郭振军. 电针治疗血管性痴呆的临床观察. 中华中医药学刊,2007,25:1070-1071.
- [9] 张虹,赵凌,何成奇,等. 头电针治疗血管性痴呆的临床多中心随机对照研究. 中国针灸,2008,28:783-784.
- [10] 程为平,马莉,原田俊英,等. 针刺百会、大椎对拟血管性痴呆大鼠脑内谷胱甘肽过氧化物酶及细胞凋亡的影响. 针刺研究,2004,29:10-12.
- [11] Malenka RC, Nicoll RA. Long-term potentiation: a decade of progress? Science,1999,285:1870-1874.
- [12] Bear MF. A synaptic basis for memory storage in the cerebral cortex. Proc Natl Acad Sci USA,1996,93:13453-13459.
- [13] 赵小贞,王玮,康仲涵. 血管性痴呆大鼠海马突触结构参数的变化. 解剖学杂志,2002,25:30-32.
- [14] Ishimaru H, Casamenti F, Ueda K, et al. Changes in presynaptic proteins, SNAP-25 and synaptophysin, in the hippocampal CA1 area in ischemic gerbils. Brain Res,2001,903:94-101.
- [15] Angers A, Fioravante D, Chin J, et al. Serotonin stimulates phosphorylation of Aplysia synapsin and alters its subcellular distribution in sensory neurons. J Neurosci,2002,22:5412-5422.
- [16] 王守春,吴江,孙莉,等. 慢性脑缺血大鼠海马区和齿状回突触素表达变化与其认知功能关系的研究. 现代神经疾病杂志,2003,3:142-145.

(修回日期:2010-11-26)

(本文编辑:吴 倩)

本刊办刊方向:

立足现实; ; 关注前沿; ; 贴近读者; ; 追求卓越