

· 论 著 ·

运动训练后脑缺血大鼠学习记忆与健侧脑内突触结构变化的关系

余茜 李晓红 吴士明

【摘 要】 目的 研究运动训练后脑缺血大鼠健侧突触结构参数的变化,探讨其代偿机理。方法 选用 Wistar 雄性大鼠制成右侧大脑中动脉缺血模型,采用运动训练进行干预,观察左侧大脑感觉运动皮层和海马 CA₃ 区突触超微结构参数的变化。结果 电镜下观察到康复组大鼠感觉运动皮层和海马 CA₃ 区突触界面曲率、PSD 厚度和穿孔性突触百分率增加,与对照组比较有意义($P < 0.05$),并有“U”形突触出现。相应行为学检测康复组在 Y-迷宫分辨学习和一次性被动回避反应记忆能力均明显优于对照组($P < 0.05$)。结论 运动训练对脑缺血大鼠学习记忆的改善可能与健侧突触超微结构参数的改变有关。

【关键词】 缺血性脑损伤; 运动训练; 突触结构参数; 学习记忆

The relationship between changes of synaptic interface structure in the contralateral brain area and the ability of learning-memory following motor training in brain ischemic rats YU Qian*, LI Xiaohong, WU Shiming.

* Department of Physiotherapy and Rehabilitation, Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000, China

【Abstract】 Objective To evaluate the effects of behavioral training on the brain plasticity and its role in functional outcome after brain damage in rats. Methods Thirty-two 2-month male Wistar rats were divided randomly and equally into 2 groups after the establishment of models of ischemic brain injuries. Motor training was given to the rats of the experimental group (40 min/d and 6 times per week), while those in the control group were reared in their original living state. Synaptic substructure in the sensori-motor cortex and hippocampus CA₃ area were assessed morphologically and quantitatively. Results The synaptic curvatures and post-synaptic density (PSD) as well as the percentage of perforated synapses were significantly increased in the rats of the experimental group in comparing with those of the control group ($P < 0.05$). Both the learning and the memory abilities were improved in these rats following the rehabilitative motor training. Conclusion It is postulated that the improved ability of the learning and memory in rats following motor training are likely to be related to the changes of synaptic substructure and increased synaptic plasticity.

【Key words】 Ischemic brain injury; Synaptic substructures; Motor training; Learning-memory

脑缺血是危害人类健康的常见病、多发病,患者常有相应的运动、感知觉以及学习记忆障碍,其中学习记忆障碍最为常见、持久,成为脑损伤后最主要的认知缺陷,也是许多患者躯体功能恢复后影响其生活质量和社会适应的主要原因。因此,怎样促进学习记忆功能的恢复已成为现代康复的重点之一。运动训练可明显改善运动神经功能和学习记忆能力^[1-3],目前对于患侧在行为训练后的变化研究不少,而对于健侧在其间是否发生变化以及怎样变化报道较少。为此,本研究采用大脑中动脉缺血大鼠模型,观察运动训练后其健侧脑突触结构参数的变化,从突触机制上探讨运动训练促进脑缺血大鼠学习记忆改善的机制。

材料与方法

一、实验动物

Wistar 雄性大鼠,体重(250 ± 50)g,周龄 8 周,分为脑缺血自由活动组(对照组)、脑缺血运动训练组(康复组),每组 16 只。

二、模型制作

参照小泉线拴法制成右侧大脑中动脉缺血模型^[4],动物苏醒后表现为提尾时左侧前肢内收屈曲;同侧 Horner 氏征;爬行时向左划圈;站立时左侧倾倒。凡具有上述四项体征者列入研究对象。动物成活 4 d 后,于第 5 天开始运动训练。

三、运动训练^[1]

1. 滚桶式网状训练:将大鼠放于长 100 cm,直径 60 cm 的圆形网状仪中,手摇转动,让其被动跑笼,训练大鼠抓握、旋转及行走能力。

2. 平衡训练:将大鼠放于距地面 5 cm 高、长

作者单位:646000 泸州,四川省泸州医学院附属医院康复理疗科(余茜),神经内科(李晓红);重庆第三军医大学新桥医院康复理疗科(吴士明)

150 cm、宽 2 cm 的方木棒上用食物诱导让其行走,训练平衡能力。

3. 网屏训练:将大鼠放于网眼 1 cm × 1 cm、网宽 50 cm × 40 cm 的网屏上,网屏距地面高度 80 cm,下铺 12 cm 厚的海绵。网屏由水平到逐步垂直并保持 5 s,观察大鼠是否从网屏上掉下来或用前爪抓住网屏。大鼠在网屏上的时间越长反映肌力越好,训练大鼠抓握能力及肌力。以上训练每天共计 40 min,每周 6 d。

四、学习记忆的行为学研究方法

康复组与对照组于术后 5 周进行行为学测试。

1. Y-型迷宫^[5]:Y-迷宫为一三等臂式迷宫(张家港生物医学仪器厂),每臂顶端设一个信号灯,以此提示“危险区”。信号灯亮后 6 s,此臂即为危险区,通以 36 V 交流电,刺激大鼠在通电后从所在的亮臂跑到暗臂。训练中始终有一臂为安全区,安全区以无规则的次序变换。实验在安静、光线较暗的环境中进行。实验前,将大鼠放入迷宫中,使其适应 5 min,然后开始实验。大鼠在通电后从所在亮臂跑到另一亮臂记为错误,跑到暗臂记为正确。每天训练 30 min,连续刺激 10 次后大鼠休息 2 min。记录大鼠学会(连续 10 次刺激中有 9 次跑到暗臂即学会)所需的训练次数,训练次数越少表明大鼠学习能力越强,以此作为判断大鼠学习分辨能力的指标。

2. 被动回避反应:采用多功能条件反应箱^[6]。实验方法:将多功能条件反应箱平放在高 60 cm 的桌边,跳板完全悬空,将大鼠尾对门洞平放在跳板上,它此时的正常反应为惊慌、探究,很快找到并穿过门洞进入反应箱,这段时间记为电击前步入潜伏期(step-through latency, STL);关闭门洞,用适宜电压电击前爪 5 ~ 10 s。如此反复三次,24 h 后重复测定大鼠在跳板上停留的潜伏期,记为电击后步入潜伏期,以电击后 24 h 的步入潜伏期的长短(观察以 300 s 为限)作为记忆保持的指标,STL 越长说明记忆保持越好^[7]。STL 所得数据以中位数按 Mann - Whitney 法进行非参数统计的等级检验,比较组间差异。

五、透射电镜技术

学习记忆检查完毕后,两组大鼠随机各取 8 只,在 0.4% 戊巴比妥钠腹腔麻醉后,参照 Woolsey^[8]的新皮层机能分区法和边缘系统解剖图^[9]取左侧大脑感觉运动皮层和海马 CA₃ 区。两脑区各取 2 mm × 2 mm × 5 mm 组织,固定于 3% 戊二醛 + 4% 多聚甲醛固定液中。行常规电镜标本包埋、醋酸铀和枸橼酸铅双染。每份标本制作 2 张铜网,每张铜网由左上角至右上角的斜线上移动,随机摄取突触像 5 张,15 000 倍显微照片(HU - 12A 型透射电镜),再光学放大至 30 000 倍。

六、脑组织病理检测

两组剩余大鼠在乙醚麻醉下行左心室内灌 500 ml 生理盐水,再以 10% 福尔马林灌注,取大脑于相同固定液中固定,常规脱水、石蜡包埋、切片及 HE 染色,于光镜下检测脑损伤程度,分别计数每只大鼠左右两侧大脑感觉运动皮层及海马 CA₃ 区存活细胞数,以死亡细胞百分数 = (左侧存活细胞数 - 右侧存活细胞数) / 左侧存活细胞数 × 100% 表示。

七、突触形态参数的定量分析

用 QUANTIMENT - 520 图像分析仪测量突触间隙宽度、突触后致密物(postsynaptic density, PSD)的厚度、突触后膜的弦长和弧长及突触活性区的长度。其中活性区长度与 PSD 的厚度参考 Guldner^[10]方法测量;突触界面曲率的测量参数参照 Jones^[11]等方法,即活性区弧长与相应的弦长之比等于界面曲率;突触间隙宽度用多点平均法测定。每组测定 40 张电镜照片,所有数据用 *t* 检测法进行统计处理。

结 果

一、学习记忆行为检测结果

从行为检测结果来看,康复组大鼠 Y-迷宫分辨学习能力明显优于对照组,前者达到学会标准所需次数为 68.02 ± 11.67,而后者需要 107.07 ± 16.32,二者差异显著($P < 0.05$)。两组大鼠一次性被动回避反应的记忆保持力,康复组 STL 中位数为 286.7 s,而对照组 STL 中位数仅 126.7 s,两组差异显著($P < 0.05$),表明对照组大鼠记忆明显衰退。

二、突触界面参数检测统计

拍摄的两组 Gray I 型突触图象均符合兴奋性突触形态特征,具有典型的不对称界面,突触后膜有浓密的电子致密物,突触后膜比突触前膜明显增厚。对照组突触多为平直型,即突触前、后膜近于直线且平行,少数突触的前后膜轻度弯曲形成微凹型或微凸型,一般只有一个活性区(图 1)。康复组凹型突触有增加趋势,并可见前膜深深突向后膜,在纵切面上呈“U”型的突触,其体积较大,大多有两个以上的活性区(图 2)。两组大鼠海马 CA₃ 区和感觉运动皮层突触界面结构参数测量结果见表 1,从表 1 可看出,康复组突触界面参数具有显著特征,表现为两脑区突触界面曲率、PSD 厚度、穿孔性突触百分率增多,与对照组比较差异显著($P < 0.05$);两组大鼠两脑区突触活性带长度以及突触间隙宽度差异无显著意义($P > 0.05$)。

三、死亡细胞百分数统计

光镜下病理损伤主要表现为神经元缺失、神经元死亡、胶质细胞增生、囊状坏死等,两组大鼠右侧皮质和海马部位死亡细胞的百分数比较无显著差异($P > 0.05$)。见表 2。

表 1 两组大鼠马 CA₃ 区和皮层感觉运动区突触界面结构参数 ($\bar{x} \pm s$)

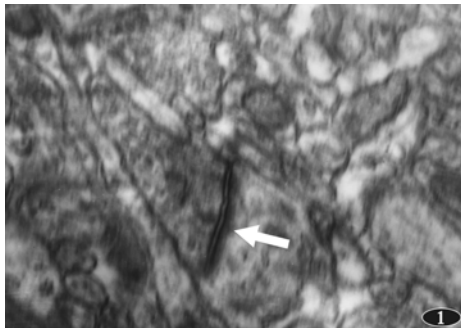
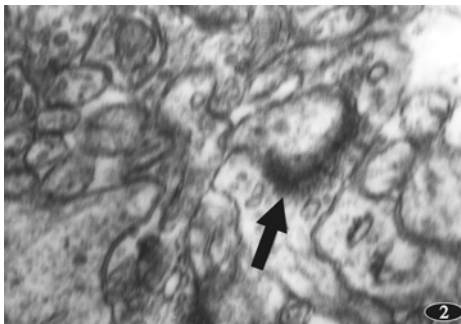
结构参数	n	CA ₃		皮层感觉运动区	
		康复组	对照组	康复组	对照组
突触间隙宽度 (nm)	40	18.68 ± 3.24	233.98 ± 8.72	17.68 ± 1.76	22.42 ± 3.28
PSD 厚度 (nm)	40	70.26 ± 10.47 *	61.32 ± 11.74	69.86 ± 13.48 *	60.04 ± 11.92
突触界面曲率	40	1.049 ± 0.038 *	1.020 ± 0.029	1.068 ± 0.074 *	1.026 ± 0.039
活性区长度 (nm)	40	348.56 ± 92.32	341.32 ± 87.39	357.49 ± 103.48	341.11 ± 101.36
穿孔性突触 (%)	40	24.31 *	7.98	23.82 *	8.02

注: n 为突触数, 康复组与对照组比较, * $P < 0.05$

表 2 大鼠皮层和海马部位死亡细胞百分数 ($\bar{x} \pm s$)

分 组	n	皮 层	海 马
康复组	25	28.16 ± 9.62 *	29.26 ± 8.32 *
对照组	25	29.56 ± 9.88	35.18 ± 10.32

注: n 为 HE 染色片, 康复组与对照组比较, * $P > 0.05$

图 1 对照组平直型突触, 透射电镜 ($\times 30\,000$)图 2 康复组“U”形突触, 透射电镜 ($\times 15\,000$)

讨 论

大量研究表明, 中枢神经系统突触结构和功能的可塑性是神经康复的基础, 而突触的可塑性受各种因素的影响。本实验采用滚桶式网状训练、平衡训练和网屏训练对脑缺血大鼠进行运动训练, 5 周后观察健侧大脑感觉运动皮层和海马 CA₃ 区突触超微结构参数的改变。结果发现康复组大鼠两脑区突触界面曲率、突触后致密物厚度和穿孔性突触数量明显增加。突触界面曲率的改变是突触可塑性的一个形态学特征, 有可能作为神经递质释放状况的标志^[12]。康复组两脑区突触界面曲率明显大于对照组, 可能是运动训练导致突触机能代偿, 因为界面曲率增大就能扩大接触面积;

同时, 弯曲度大的界面呈“袋状”, 更能保持其释放的递质分子到达靶部位, 减少向周围间隙扩散, 有利于递质与受体更有效的结合, 以及递质作用后被重新摄取, 从而提高神经信息传递的有效性^[13]。

PSD 也是中枢突触结构可塑性的重要参数, 研究表明 PSD 的厚度与学习记忆的训练和记忆的保持能力密切相关^[14, 15]。PSD 由细胞骨架蛋白和调节蛋白组成, 其中有些蛋白与突触后膜的受体通道有联系, 并且 PSD 的位置恰好处于神经递质引发的突触区离子流及第二信使级联反应的“关口”途径, 它作为中介者将信号分子、调节分子和靶分子联系起来, 起着突触后信号传导的组建作用, 对突触的整合功能与调节作用具有关键性意义^[16, 17]。组成 PSD 的蛋白质构像的转变以及蛋白质分子单体的聚合和解聚都可能引起突触后膜致密物厚度的改变, 以及突触功能的变化。运动训练使康复组大鼠两脑区 PSD 厚度增加可能影响了突触的传递功能, 在行为上表现为其学习记忆能力优于对照组。穿孔性突触在突触可塑性中的作用已日益引起重视, 它随环境因素而改变。本实验显示, 康复组穿孔性突触百分率明显高于对照组。Geinisman 等^[18]认为突触穿孔是突触分裂的中间步骤, 且突触穿孔后 PSD 变成节段, 出现多个活性区, 使得不同受体活性区传递功能大大增强, 进一步增强了突触传递功能。

实验中观察到二组大鼠损伤程度的差异无统计学意义, 可能因为本实验运动训练自恢复期开始, 并不改变脑缺血早期神经元死亡, 但运动训练导致健侧突触结构参数的改变, 使突触界面曲率、PSD 厚度和穿孔性突触百分率增加而使健侧突触传递功能增强, 实现了对脑缺血大鼠学习记忆的改善, 表明了运动训练能使健侧脑对学习记忆的代偿作用。

参 考 文 献

- 1 李玲, 徐莉, 袁华, 等. 康复训练促进脑梗塞大鼠记忆功能的恢复. 第四军医大学学报, 2000, 21: 1555-1557.
- 2 徐莉, 李玲, 陈景藻, 等. 康复训练对脑梗塞大鼠神经功能恢复的影响. 中华物理医学与康复杂志, 2000, 22: 12-14.
- 3 常俊玲, 孔波. 运动再学习对偏瘫患者上肢功能恢复的影响. 现代康复, 2000, 4: 684-685.
- 4 屈秋民, 曹振玲, 扬剑波. 线栓法大鼠大脑中动脉闭塞局灶性脑缺血

- 模型 Longa 法和小泉法的比较. 中华神经科杂志, 2000, 33: 289.
- 5 赵崇侃, 程光, 陈启盛. 一种智能化的 Y 迷宫. 中国应用生理学杂志, 1997, 13: 363-365.
 - 6 隋建峰, 熊鹰, 张长城. 一种用于大鼠被动回避行为训练的多功能条件反射箱. 第三军医大学学报, 1994, 16: 363-365.
 - 7 章子贵, 陆汉新, 李振武, 等. 小鼠记忆保持能力与海马 CA₃ 区突触界面结构的相关性. 中国神经科学, 1995, 2: 136-140.
 - 8 Woolsey CN. Organization of somatic sensory and motor areas in the cerebral cortex, biological and biochemical bases of behavior. Madison: University of Wisconsin Press, 1958. 65-81.
 - 9 陈宜张. 大鼠边缘系统的解剖. 上海: 第二军医大学出版社, 1979. 50-58.
 - 10 Guldner FH, et al. Increase in postsynaptic density material in optic target neuron of the rat suprachiasmatic nucleus after bilateral enucleation. Neurosci Lett, 1980, 17: 27-32.
 - 11 Jones DG. Synaptic plasticity perforated synapses: their relevance for an understanding of abnormal synaptic organization. APMIS - Suppl. 1993, 40: 25-34.
 - 12 Week AC, Ivanko TL, Leboutillier JC, et al. Sequential changes in the synaptic structural profile following long-term potentiation in the rat dentate gyrus. Induction/early maintenance phase. Synapse, 2000, 36: 286-289.
 - 13 吴馥梅, 杜红燕, 章子贵. 突触界面曲率及其生理意义. 神经解剖学杂志, 1994, 1: 89-92.
 - 14 Guldner FH, Bahar E, Young CA, et al. Structural plasticity of optic synapses in the rat suprachiasmatic nucleus: adaptation to long-term influence of light and darkness. Cell Tissue Res, 1997, 287: 43-60.
 - 15 章子贵, 陆汉新, 李振武, 等. 小鼠记忆保持能力与海马 CA₃ 区突触界面结构的相关性. 神经科学, 1995, 2: 136.
 - 16 Klanck TM, Scott JD. The post-synaptic density: a subcellular anchor for signal transduction enzymes. Cell Signal, 1995, 7: 747-757.
 - 17 Kennedy MB. The postsynaptic density at glytamatergic synaptic. Trends Neurosci, 1997, 20: 264-268.
 - 18 Geinisman Y, Morrell LT. Structural synaptic plasticity associated with the induction of long-term potentiation is preserved in the dentate gyrus of aged rats. Hippocampus, 1992, 2: 445-456.

(收稿日期: 2001-11-13)

(本文编辑: 欧阳兆明)

· 短篇报道 ·

当归注射方法治疗强直性脊柱炎的临床观察

刘玲琍 杨万同

强直性脊柱炎 (ankeklosing spondylitis, AS), 是病因不明的一种疾病, 可能与遗传基因有关^[1], 目前临床尚无特效疗法。我院康复科门诊自 1997 年 3 月 ~ 2001 年 12 月采用当归注射方法治疗 AS 患者 13 例, 现报告如下。

13 例均为门诊男性患者, 年龄 16 ~ 50 岁, 平均 28 岁; 病程 6 个月 ~ 15 年, 平均 7 年。全部病例根据 1988 年 4 月昆明第一次全国中西医结合风湿类疾病学术会议修订通过的诊断标准确诊^[2]。13 例患者中早期 1 例, 中期 5 例, 晚期 6 例。

对患者进行当归静脉和局部注射。方法如下: 25% 当归注射液 250 ml 静脉注射, 第 1 个月每日 1 次, 第 2 个月隔日 1 次, 第 3 个月每周 1 ~ 2 次。3 个月为 1 疗程。10% 当归注射液沿脊柱旁开 2 ~ 3 cm 局部注射, 每一椎体或隔一椎体旁注射, 每点注射 5 ml。颈部注射取低头坐位, 胸、腰部及骶髂关节注射取俯卧位, 注射局部有酸胀感, 疗程同静脉注射。

疗效评定根据昆明会议制定的标准进行^[2]。显著好转: 经治疗后受累部位疼痛消失, 活动功能改善或恢复正常, 血沉恢复正常, X 线显示骨质病变有改善或无发展, 恢复日常劳动能力; 好转: 受累部位疼痛减轻, 活动范围增大, 血沉降低; 无效: 经治疗受累部位症状无改善。

经过治疗, 13 例患者中显著好转 3 例 (23.1%), 好转 9 例 (69.2%), 无效 1 例 (7.7%)。

讨论 强直性脊柱炎是一种以侵犯脊柱和骶髂关节为主的慢性进行性疾病, 治疗难度较大。中医认为本病属于痹症范畴, 相当于人们所说的“骨痹”。其发生系因“风寒湿三气杂至, 合而为痹”。气血被阻, 经脉壅滞, 凝涩不通, 或可郁而化热或可“内舍于肾”, 导致骨节肿痛, 屈伸不利, 腰脊不举, 甚至强直畸形。当归具有活血化瘀、消炎止痛、改善微循环的功能^[3]。当归静脉注射改善全身血液循环, 增强机体免疫力^[3]; 当归局部注射直接改善局部的血液循环, 减轻疼痛^[4]。本组病例好转率 92.3%。我们认为当归注射治疗是一种疗效确定的方法, 值得临床推广应用。

参 考 文 献

- 1 王兆铭, 主编. 中国中西医结合实用风湿病学. 北京: 中国古籍出版社, 1997. 145.
- 2 王兆铭. “风湿四病”的中西医结合诊断标准. 中西医结合杂志, 1989, 9: 52-53.
- 3 蔡正华. 浓当归注射液治疗突发性聋患者甲皱微循环观察. 中西医结合杂志, 1991, 11: 109.
- 4 张竹青. 颈夹脊穴注射归红液治疗颈椎病 150 例. 湖南中医学院学报, 1995, 15: 64-65.

(收稿日期: 2002-03-18)

(本文编辑: 熊芝兰)