

· 论 著 ·

围产期缺氧缺血对大鼠学习记忆的影响及其机制探讨

常燕群 谢集建 王淑珍 徐宁 杨涛

【摘 要】 目的 观察缺氧缺血(HI)对新生大鼠远期学习记忆及海马长时程增强发生率的影响,探讨缺氧缺血损伤学习记忆的神经机制。**方法** 选择符合条件的 7 日龄 Wistar 大鼠 49 只,随机分为正常对照组($n=15$)、HI 组($n=21$)和尼莫通治疗组($n=13$)。HI 组经结扎左侧颈总动脉、吸入含 8% 氧和 92% 氮的混合气体 2 h 的处理。大鼠经 HI 处理后给予尼莫通($160 \mu\text{g}/\text{kg}$,腹腔注射,每日 1 次,共 5 d)治疗的为治疗组。正常对照组给予等量生理盐水腹腔注射。至生后 80 d 左右对各组动物进行 Y 迷宫分辨学习和记忆能力测试,行为实验结束后每组取 5 只,采用离体脑片电生理技术检测海马 LTP 的发生率。**结果** HI 组大鼠 Y 迷宫中达到学会标准前所需的训练次数为 32.82 ± 8.22 ,明显多于对照组($P < 0.01$)。24 h 后的记忆保持率为 $59.00\% \pm 21.32\%$,显著低于对照组($P < 0.05$)。尼莫通可明显提高 HI 大鼠的学习能力($P < 0.01$),但对记忆无明显效果;高频刺激(HFS)前各组群峰电位(PS)的平均幅值及平均峰潜伏期之间均无显著性差异,HFS 后对照组 PS 平均幅值始终高于 HI 组和治疗组。HFS 后 HI 组 LTP 发生率为 30.8%,对照组为 57%,两组间差异显著($P < 0.05$),治疗组 LTP 发生率 45.5%,较 HI 组有所提高,但差异无显著性($P > 0.05$)。**结论** HI 可使大鼠学习和记忆能力明显下降,HI 引起海马 LTP 抑制可能是 HI 所致学习记忆障碍的重要神经机制。尼莫通可提高大鼠缺氧缺血性脑损伤(HIBD)后学习能力,但对记忆无明显效果。

【关键词】 缺氧缺血; 学习记忆; 长时程增强; 尼莫通

Learning and memory deficits caused by perinatal hypoxia-ischemia and its mechanisms CHANG Yanqun*, XIE Jijian, WANG Shuzhen, XU Ning, YANG Tao. * Department of Neurology and Rehabilitation, Guangdong Maternal and Children's Hospital, Guangzhou 510010, China

【Abstract】 Objective To investigate the effect of perinatal hypoxia-ischemia (HI) on long-term learning and memory in rats and the underlying mechanisms. **Methods** Forty-nine postnatal Wistar rats aged 7 days were randomly divided into 3 groups: the nimotop group ($n=13$), in which the animals received an intraperitoneal injection of $160 \mu\text{g}/\text{kg}$ body weight of nimotop once a day for 5 days, immediately after the establishment of HI model by ligation of left common carotid artery, followed by exposure to 8% oxygen and 92% nitrogen at 37°C for 2 hours, the HI group ($n=21$), and a control group ($n=15$) in which the animals received an injection of equivalent volume of normal saline only. When the rats reached the age of about 80 days, Y-maze discrimination learning abilities and memory keeping percentage were tested, and later, the incidence of long-term potentiation (LTP) of CA1 area was investigated in vitro on the hippocampal slices taken from five rats of each group using the electrophysiological technique. **Results** In comparing with the control group, hypoxia-ischemia significantly decreased the Y-maze discrimination learning abilities ($P < 0.01$) and memory keeping percentage ($P < 0.05$). Nimotop significantly increased the learning abilities ($P < 0.01$) of the rats after HI, but had no effect on their memory keeping power. No significant differences of average peak potentials and the peak value of latency of the population spikes (PS) among these groups were revealed before the application of high frequency stimulation (HFS). After the application of HFS, the average peak value of the PS in the control group was consistently higher than that in HI and nimotop groups. The incidence of LTP was 30.8% after the application of HFS, significantly lower than that of the control (57%, $P < 0.05$). This difference between the nimotop and the HI groups was not significant, although it was slightly higher in the former group. **Conclusion** Both learning abilities and memory keeping power may be impaired by HI, which may be correlated with the inhibition of LTP in the hippocampal area. Nimotop may be of use to improve the learning ability, but it has no obvious beneficial effect on memory keeping.

【Key words】 Hypoxia-ischemia; Learning and memory; Long-term potentiation; Nimotop

学习记忆是脑的高级功能,是思维和认识的基础,

它受脑内多个部位管理,其神经基础是脑功能研究的核心问题。目前在大脑学习记忆的神经机理研究中,最富有吸引力的是突触传递效能的长时程增强(long-

作者单位:510010 广东省妇女儿童医院神经康复科(常燕群、王淑珍、徐宁、杨涛);湖北武汉大学医学院(谢集建)

term potentiation, LTP), 它被公认为是在突触水平研究学习记忆的神经模型^[1]。任何先天或后天的损伤都可以引起脑结构的破坏, 进而影响学习记忆。因此, 及早对高危因素和已经发生的脑损伤进行干预十分重要。我们采用行为学实验和离体脑片电生理技术检测缺氧缺血(HI)大鼠学习记忆能力和海马 CA1 区 LTP 的发生情况, 以探索 HI 对海马功能可塑性的影响, 揭示 HI 影响学习记忆的神经机制。

材料与方法

一、动物模型及分组

7 日龄健康 Wistar 大鼠 49 只, 体重 15 ~ 20 g。随机分为对照组(15 只)、HI 组(21 只)和治疗组(13 只)。HI 组大鼠经结扎左侧颈总动脉 2 h 后, 吸入含 8% 氧和 92% 氮的混合气体 2 h。由此造成缺氧缺血。治疗组大鼠于 HI 后立即腹腔注射尼莫通(160 μ g/kg), 每天一次, 共 5 天。对照组仅腹腔注射等量生理盐水, 不作任何其他处理。

二、行为学实验

各组动物均在生后 80 d 左右进行 Y 迷宫实验^[2]。先将动物放入迷宫中任意一臂适应 2 ~ 3 min, 然后将另一臂的信号灯打开作为条件信号, 示安全区, 指示动物应跑向该臂; 经 5 s 延时后, 不亮灯的两臂及连接区通电(50 $\pm$ 5 V), 作为非条件刺激。当动物逃避电击至安全区后, 切断电流并使灯光仍持续约 30 s, 使动物产生记忆, 然后熄灯, 即完成一次测试。凡通电时动物直接跑向安全区为正确反应, 反之为错误。学会标准为连续 10 次训练中有 9 次正确。记录每一动物达标前所需测试次数, 以此作为学习快慢的客观指标。24 h 后检测记忆保持情况, 即在连续 10 次测试中正确反应尚保持多少, 以记忆保持的百分数表示。实验中保持安静、清洁, 室温 18 ~ 24℃。

三、海马离体薄脑片电生理实验

行为学实验结束后, 部分动物在 4℃ 下快速断头取脑, 用震动切片机连续切片, 片厚 400 ~ 450 μ m; 解剖显微镜下剥离形态较好的海马, 迅速移至准备好的浴槽尼龙网上, 用恒温(32 $\pm$ 0.5℃)的人工脑脊液(ACSF, pH 值 7.4 ~ 7.6)灌流(1 ~ 2 L/min)。95% O₂ 与 5% CO₂ 的混合气体通过室外热水加热、湿化再散于脑片的表面, 供气量 0.1 L/min。脑片孵育 1.5 ~ 2 h 后开始刺激和记录。刺激电极为直径 0.05 mm 的双根银丝电极, 记录电极采用玻璃微电极, 尖端直径 1 μ m, 内充 2 mmol/L 的 NaCl 溶液, 阻抗 2 ~ 4 M Ω 。解剖显微镜下将刺激电极置于来自 CA3 区锥体细胞的 Schaffer 侧枝上, 记录电极置于 CA1 区锥体细胞层, 故实验所记录的电活动是 Schaffer 侧枝 - CA1 区的群

峰电位(PS)。记录时先行测试刺激, 刺激参数为: 单个脉冲、波宽 0.2 ms、强度为引出最大 PS 斜率的 60% 左右时的刺激强度。待 PS 稳定 10 ~ 15 min 后再行条件刺激: 100 Hz、100 ~ 400 个脉冲、60% 最大刺激强度、波宽 0.2 ms。条件刺激后, 每 5 ~ 10 min 观察一次, 至少观察 30 ~ 60 min。条件刺激后 PS 幅度增加 20%、并持续 30 min 以上, 即判定为 LTP 发生。

四、统计学分析

实验所得数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 在确定方差齐同后用方差分析, LTP 发生率用 χ^2 检验, 若差异有显著性, 再行两两 q 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

结 果

一、行为学实验结果

HI 组大鼠在 Y 迷宫中分辨学习和记忆能力均低于对照组, 尼莫通治疗组学习能力较 HI 组显著提高, 而记忆保持率与 HI 组无显著差异(表 1)。

表 1 Y 迷宫中大鼠分辨学习和记忆保持率($\bar{x} \pm s$)

组 别	例数	学习能力(训练次数)	记忆保持率(%)
对照组	15	20.67 $\pm$ 7.03 ***	80.00 $\pm$ 18.90 **
HI 组	21	32.82 $\pm$ 8.22	59.00 $\pm$ 21.32
治疗组	13	20.69 $\pm$ 7.96 ***	69.13 $\pm$ 22.42 *

注: 与 HI 组比较, * $P > 0.05$, ** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$

二、LTP 实验结果

1. HFS 前的反应: HFS 前对照组($n = 12$)、HI 组($n = 13$)和治疗组($n = 11$)单脉冲刺激诱发的 PS 的平均幅值依次为(1.23 $\pm$ 0.51) mV、(1.09 $\pm$ 0.52) mV 和(1.06 $\pm$ 0.44) mV; 平均峰潜伏期依次为(4.48 $\pm$ 0.42) ms、(4.94 $\pm$ 0.86) ms 和(5.02 $\pm$ 0.37) ms。各组之间均无显著性差异。

2. HFS 后反应:

(1) LTP 发生率的比较: HFS 后, 12 例对照组脑片中有 9 例产生了 LTP, 占 75%; HI 组 13 例脑片中 4 例产生了 LTP, 占 30.8%; 治疗组 11 例脑片有 5 例产生了 LTP, 占 45.5%。HI 组与对照组间 LTP 发生率差异显著($\chi^2 = 4.89$, $P < 0.05$), 表明 HIBD 可致大鼠海马 LTP 发生率下降。治疗组 LTP 发生率较 HI 组有所提高, 但差异无显著性($P > 0.05$)。

(2) PS 幅值变化的比较: HFS 后, 对照组($n = 12$)中产生 LTP 的脑片($n = 9$)的 PS 幅值相对于基线值明显增大, 平均达基线值的 179.6% $\pm$ 27.7%; 治疗组($n = 11$)中产生 LTP 的脑片($n = 5$), 其 PS 平均幅值达基线值的 166.3% $\pm$ 24.2%; HI 组($n = 13$)中产生 LTP 的脑片($n = 4$), 其 PS 平均幅值增加较小, 达基线值的 140.4% $\pm$ 25.3%。图 1 所示为 HFS 前、后各组 PS 幅值变化的记录, 分别表示对照组、HI 组及治疗组 PS 幅

值变化过程。从图中可以看到,在 HFS 结束后的即刻,均有一个短暂的 PS 幅值缩小时期,而后对照组 PS 幅值开始恢复并稳定增强,而 HI 组和治疗组 PS 幅值增加比对照组小。

将各组所有脑片 HFS 后的反应综合起来进行比较(如图 2 所示),可以看到在整个记录过程中,对照组 PS 相对于基线值的平均幅值为 $147.73\% \pm 6.56\%$,始终高于 HI 组($20.66\% \pm 15.46\%$)和治疗组($26.80\% \pm 14.33\%$)。

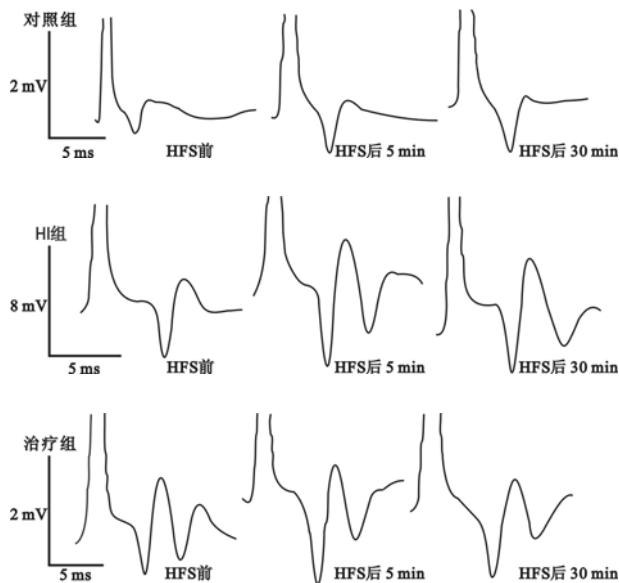


图 1 各组海马脑片 HFS 前后各时间 PS 变化

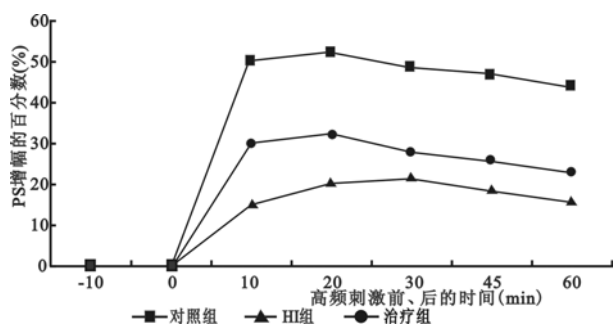


图 2 各组大鼠海马脑片 HFS 后 PS 增幅的百分率比较

讨 论

学习记忆的高级中枢如大脑皮层、海马等区对 HI 具有选择性易损性,因而 HI 后这些结构将首先遭受破坏,进而引起脑发育过程中功能和行为的异常。Ike-da^[3]对 7 日龄 HI 大鼠分别检测了四种不同的学习和记忆能力,实验从脑损伤后 4 周一直持续到 18 周。结果 HI 大鼠在与注意力相关的选择性任务中的学习能力及在多迷宫和水迷宫中的长期参考记忆显著受损,

而在 8 臂辐射状迷宫中短期工作记忆和长期参考记忆下降是暂时的。HI 组大鼠感觉运动测试结果正常,虽然当吊尾时 HI 组有 30% 的大鼠右前臂轻度弯曲,但这些异常并不影响学习任务完成。结果表明 7 日龄大鼠单侧 HI 可导致选择性和长期持续的学习记忆受损。缺氧性脑损伤对动物认知能力的影响也有一些矛盾的报道,如 Carratala 等^[4]首先使新生大鼠不同程度缺氧 ($FiO_2 = 0.05$ 及 $FiO_2 = 0.1$),一个月后通过迷宫试验进行检测,表明暴露于 $FiO_2 = 0.1$ 组者学习比 $FiO_2 = 0.05$ 低。这些矛盾的结果可能与研究者缺氧的方式和缺氧的程度、以及行为学试验的条件和模型不同有关。本实验采用 7 日龄 Wistar 大鼠缺氧缺血性脑损伤 (HIBD) 模型,通过三等臂辐射状 Y 迷宫检测远期学习记忆能力的改变,结果发现 HIBD 组大鼠在 80 ~ 90 d 时仍表现出迷路分辨学习和记忆能力显著下降,与上述报道一致。

LTP 是高频刺激传入纤维所引起的海马突触传递效能的持续性增强,被认为是在突触水平研究学习记忆的模型^[1]。LTP 是突触活动的易化现象,包括诱导和维持两个过程,是突触前后机制的联合作用,但以突触后机制为主。N-甲基-D-门冬氨酸 (NMDA) 受体的激活对 LTP 的诱导是必要的,当刺激达到一定强度时,通过 α -氨基羟基甲基基唑丙酸 (AMPA) 受体的离子流增强,使邻近的 NMDA 受体突触后膜局部去极化,继而触发一系列反应(如激活蛋白酶系统),改变膜的性质,导致 LTP 的产生^[5]。

研究证明,LTP 与学习记忆关系密切,表现在影响 LTP 的因素多数对学习记忆有影响,一些影响学习过程的因素也影响 LTP,而 LTP 的诱导可加速学习过程,学习过程可以促使 LTP 产生^[5]。海马是与学习记忆有关的重要脑区,亦是对缺氧最敏感的部位之一。离体海马脑片由于便于条件控制及基本保持完整的神经回路等,所得实验结果接近在体实验,是研究脑缺氧的理想模型^[6]。本实验对在体缺氧的部分大鼠行为测试结束后采用离体海马薄脑片电生理技术研究发现,高频刺激前缺氧组与对照组 PS 幅值及潜伏期无明显差异,而在相同参数的高频刺激后 HI 组 LTP 的发生率明显低于对照组,统计学处理表明两组间 LTP 的发生率有显著差异,提示 HI 可损害大鼠 LTP 的诱导,这可能是脑缺氧缺血在突触水平上影响学习记忆的重要神经机制。

Ca^{2+} 是神经细胞信息传递的重要第二信使,关系到神经细胞正常代谢与功能的维持。在缺氧缺血时,神经元释放兴奋性氨基酸递质增多,作用于突触后膜上的 NMDA 受体,进而促使胞外钙内流,导致胞内钙增加。而越来越多的研究表明钙是缺氧引起神经元损

伤和突触传递功能丧失的主要原因^[7]。尼莫通的主要成份为尼莫地平,为 1,4-二氢吡啶类电压敏感性 L 型钙通道阻滞剂,对神经细胞和脑血管内皮细胞膜上的 Ca^{2+} 通道有高度选择性阻断作用,能抑制 Ca^{2+} 进入细胞内,还能促进细胞胞浆钙的排除,增强线粒体内质网对 Ca^{2+} 摄取和储存,从而大大减轻细胞 Ca^{2+} 超载及继发性脑损伤。崔尧元等^[8]的研究表明,尼莫地平可减轻大脑中动脉闭塞(MACO)模型大鼠神经细胞钙超载和脑水肿,缩小梗死范围,并显著改善大鼠在 Morris 水迷宫中的学习和记忆能力。本实验对 HI 新生大鼠给予尼莫通干预治疗,发现尼莫通对学习能力和记忆提高,而对记忆保持无明显作用。这在以前的实验中未见报道。其原因是与尼莫通的作用途径和部位有关,还是因为动物模型、药物剂量、用药方式以及选择的行为学模型不同,目前尚不清楚。尼莫通对缺氧缺血后海马 LTP 发生率的影响不明显,可能是尼莫同改善远期记忆不明显的一个原因。而具体到学习和记忆的发生机制的不同,还有待进一步认识。

参 考 文 献

- 1 Biss TVP, Collingridge GL. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, 1993, 361: 31.
- 2 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.
- 3 Ikeda T, Mishima K, Yoshikama K, et al. Selective and long-term learning impairment following neonatal hypoxic-ischemic brain insult in rats. *Behav Brain Res*, 2001, 118: 17-25.
- 4 Carratala F, Moya M, Ferrer E. Influence of different levels of neonatal mild/moderate hypoxia-ischemia in learning abilities of rats at the age of one month. *Biol Neonate*, 1997, 72: 42-50.
- 5 于英心,关新民. 突触传递的可塑性和学习记忆. 见: 韩济生,关新民,主编. *医用神经生物学*. 武汉: 武汉出版社, 1996. 229-237.
- 6 Dong WQ, Schurr A, Reid KH, et al. The rat hippocampal slice preparation as an in vitro model of ischemia. *Stroke*, 1988, 19: 49.
- 7 Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci*, 1999, 22: 391-397.
- 8 崔尧元,史玉泉. 尼莫地平对大鼠脑梗死后学习记忆的影响. *中国行为医学科学*, 1995, 4: 120-122.

(收稿日期: 2001-10-29)

(本文编辑: 郭铁成)

· 短篇报道 ·

癔症性瘫痪 18 例报告

邢东风 崔大勇 卢留斌

我院自 1983 年 5 月~2000 年 12 月收治癔症性瘫痪 18 例,现报道如下。

本组 18 例中,男 4 例,女 14 例,年龄 17~55 岁;发病原因:受伤后发病 12 例(打伤 7 例,交通伤 4 例,跪伤 1 例),家族琐事、个人婚姻问题而吵架、生气后发病 6 例;病程 3 h~15 d。临床表现:偏瘫 9 例,截瘫 6 例(腰穿后截瘫加重 1 例),四肢瘫 2 例,单肢瘫 1 例,失眠 3 例,呕吐 2 例,失语 1 例,头晕、头痛、精神差、全身无力 15 例,18 例均无大小便障碍现象。检查:瘫痪肢体肌力 0 级,肌张力及腱反射正常,病理征阴性,瘫肢感觉减退 13 例、消失 1 例,头皮血肿 3 例;腰穿 CSF 压力正常,Queckenstedt 氏试验(-),CSF 化验正常;颈椎、腰椎及肢体 X 线拍片 6 例、CT 扫描 11 例及 MR 扫描 4 例(头 1、脊柱 3)均未见异常。治疗方法以精神治疗为基础,对症和暗示疗法相结合;结果:18 例全部治愈,步行出院。有随访结果 10 例中有 1 例再受精神刺激再发病。

讨论 癔症性瘫痪是一种心因性疾病,是癔症性躯体障碍的一种表现,以女性为多,本组有 14 例(占 77.8%),可能与心胸狭隘、精神易受刺激有关。

癔症性瘫痪的诊断与鉴别诊断:本症诊断必须符合①有精神受刺激因素;②除患肢瘫痪外,客观检查肢体肌张力、腱反射、病理反射均正常;③患肢感觉存在或减退,大小便正常,不能用器质性损害解释肢体瘫痪;④X 线拍片、CT 或 MR 扫描及腰穿脑脊液检查均正常。癔症性瘫痪应与低钾血症、脊髓血管(前动脉)闭塞、早期脑血管梗死相区别。

精神、心理治疗及对症与暗示疗法是本病治疗与康复的有效方法;患者多由心因性因素诱发本病,因此医护人员应从生活上多照顾病人,热心与病人多交谈(如生活、学业、工作、社交、政治等方面),与其沟通,取得病人信任,掌握病人的思想动态和心理症结所在,策略性地去除病人思想障碍,鼓励病人树立战胜疾病的信心。经过一段时间的精神、心理治疗,在病人心理障碍消除,精神状态良好的情况下,安排病人所信赖的医护人员或极富经验的专家实施暗示治疗。对病人所述的其它不适症状亦应及时给予治疗,如使用镇静剂等。

需要强调的是:①诊断此病必须排除器质性病变所致瘫痪;②治疗必须在精神、心理治疗有效,且病人能配合暗示治疗情况下,才能取得成功的效果;③愈后必须避免精神再受刺激,以免再发病。

作者单位:450007 郑州市红十字医院(邢东风);解放军四六〇医院(崔大勇、卢留斌)

(收稿日期: 2001-10-31)

(本文编辑: 阮仕衡)