

· 基础研究 ·

电针对血管性痴呆大鼠海马胆碱能神经的影响

郭国际 邓医宇 茹立强 田代实

【摘要】 目的 研究电针对血管性痴呆大鼠海马胆碱能神经的影响。方法 将 48 只 Wistar 大白鼠随机分为 4 组:假手术对照组、模型组、电针治疗组、模型非治疗组,每组 12 只。采用反复夹闭双侧颈总动脉再灌注法制作血管性痴呆大鼠模型,应用避暗法、胆碱酯酶组织化学染色法观察电针对大鼠的记忆功能及海马胆碱能神经的影响。结果 电针治疗组中有记忆力的大鼠占 54.55%,模型非治疗组为 9.09%,电针治疗组明显高于模型非治疗组($P < 0.01$);电针治疗组的海马胆碱酯酶阳性纤维的密度亦明显高于模型非治疗组($P < 0.01$)。结论 电针对血管性痴呆大鼠有显著的治疗作用,其机制可能与增加海马胆碱能神经的密度有关。

【关键词】 血管性痴呆; 胆碱能神经; 电针; 海马

Effect of electroacupuncture on cholinergic nerves in the hippocampus of rat with vascular dementia GUO Guo-jī*, DENG Yi-yu, RU Li-qiang, TIAN Dai-shi. * Department of Neurology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

【Abstract】 Objective To study the therapeutic effect of electroacupuncture on vascular dementia (VD). Methods Following the establishment of VD models in 48 rats, the rats were equally and randomly divided into four groups: a sham-operated control group, a model group, an electroacupuncture therapy group, and a nontherapy model group, and were intervened accordingly. The hippocampal tissues were studied for morphological changes of cholinergic nerves by use of acetylcholinesterase histochemical staining. The effect of electroacupuncture on memory of model animals and cholinergic nerves in the hippocampus was observed. Results It was revealed that, 54.55% of the rats in the electroacupuncture therapy group retained intact memory, significantly higher than that in the nontherapy model group (9.09%, $P < 0.01$); the density of acetylcholinesterase-positive nerves in the hippocampus in rats of electroacupuncture therapy group was significantly higher than that in the nontherapy model group ($P < 0.01$). Conclusion Electroacupuncture has valuable therapeutic effect for VD. The mechanism is possibly related to the increase of the density of cholinergic nerves in the hippocampus.

【Key words】 Vascular dementia; Cholinergic nerves; Electroacupuncture; Hippocampus

随着脑血管病发病率的增高,血管性痴呆(vascular dementia, VD)患者日益增多。目前对 VD 患者缺乏有效的药物治疗。近年来资料^[1]显示,针灸治疗 VD 具有肯定疗效。本实验旨在观察 VD 大鼠经电针治疗前、后海马胆碱能神经纤维的变化,为临床电针治疗 VD 提供理论依据。

资料与方法

一、实验动物

成年纯种雄性 Wistar 大白鼠 48 只,体重 220 ~ 280 g,由同济医学院实验动物研究中心提供(清洁二级),实验条件下自然饮食,适应环境 1 周后进行实验。

二、实验器材

无创动脉夹、冰冻恒冷切片机、恒温箱、电针刺激仪(G-6805 电针仪)。

三、实验方法

1. VD 大鼠模型制备:采用王蕊等^[2]改进的方法。将大鼠用 10% 的水合氯醛(350 mg/kg 体重, i. p)麻醉后,仰卧固定在手术台上,常规消毒,颈正中切口,分离双侧颈总动脉,VD 模型组、电针治疗组、模型非治疗组在夹闭双侧颈总动脉之前,腹腔注射硝普钠(sodium nitroprusside, 2.5 mg/kg 体重,用无菌蒸馏水溶解),随即用无创动脉夹夹闭双侧颈总动脉 10 min 后,开通 10 min,再夹闭 10 min,再通后缝合伤口,放回笼中保温饲养。假手术对照组的麻醉及手术过程与模型组相同,但不阻断双侧颈总动脉。在造模全过程中,大鼠直肠温度保持在(37 ± 0.2)℃,以防止低温对脑缺血损伤的保护作用。

2. 动物分组:将 48 只大白鼠随机分为假手术对照组、模型组、电针治疗组、模型非治疗组,每组 12 只。

作者单位:430030 武汉,华中科技大学同济医学院附属同济医院神经内科(郭国际、邓医宇、田代实);华中科技大学同济医学院神经生物学教研室(茹立强)

假手术对照组和模型组手术 7 d 后进行记忆功能测定,随后用于酶组织化学染色。电针治疗组和模型非治疗组手术 7 d 后进行记忆功能测定,每组各有 1 只大鼠未出现记忆功能障碍,将其去掉,因而电针治疗组和模型非治疗组每组有记忆功能障碍的大鼠均为 11 只。

3. 治疗方法:于造模第 7 天进行记忆功能测定后开始治疗。①电针治疗组,以 28 号 1 寸毫针于大鼠百会、大椎穴捻入 0.5 寸,连接 G-6805 电针仪,施以连续波,频率 150 Hz,20 min 后出针。每天 1 次,每次 20 min,治疗 10 d。②模型非治疗组不施行任何治疗。

4. 记忆功能测定:应用明暗箱装置,以大鼠被动回避反应为指标测定记忆能力。明箱用灯光照明,暗箱底部置铜栅可电击动物,两箱之间有一小洞相通供大鼠通过。测定第 1 天将大鼠置于明箱,利用大鼠趋暗性,记录大鼠四肢全部进入暗箱停留的时间,即为进洞潜伏期。当大鼠进入暗箱后即刻通电(30 V 交流电)电击动物,大鼠逃至明箱后 30 s 取出。次日相同时间再将大鼠放入明箱,观察进洞潜伏期变化,以检查大鼠记忆能力。此外,按进洞潜伏期长短将记忆能力分为 3 种情况,即电击后次日 10 min 内不进入暗箱者为“有记忆”,次日进洞潜伏期减去电击前的差值大于 30 s 者为“稍有记忆”,差值小于 30 s 者为“无记忆”。假手术对照组和模型组手术 7 d 后依照上述方法测定各大鼠的记忆能力。电针治疗 10 d 后,再用上述方法测定电针治疗组和模型非治疗组各大鼠的记忆能力。

5. 酶组织化学染色及形态学观察:假手术对照组和模型组各大鼠手术 7 d 后进行酶组织化学染色及形态学观察,电针治疗组和模型非治疗组各大鼠手术 17 d 后进行酶组织化学染色及形态学观察。方法——经 10% 水合氯醛(350 mg/kg 体重)腹腔注射麻醉,按常规灌注(冷 4% 多聚甲醛, pH 7.2),固定后做冠状连续冰冻切片,厚 30 μ m。胆碱酯酶染色——冰冻切片贴片后,用 PBS 漂洗 2 次,每次 5 min。加入孵育液(碘化乙酰硫胆碱 6.25 mg, 0.82% 醋酸钠 7.9 ml, 0.6% 醋酸 0.25 ml, 2.94% 枸橼酸钠 0.6 ml, 0.75% 硫酸铜 1.25 ml, 0.165% 铁氰化钾 1.25 ml, 0.137% 四异丙基焦磷酸胺 0.25 ml, 双蒸水 1 ml), 37℃, 2 h, 转入 PBS 洗 2 次,每次 5 min 终止反应。然后再加 DAB 5 mg, Tris-HCl 1 ml, 3% 硫酸镍铵 10 ml, H₂O₂ 1 μ l 加强显色 15 min, 用 PBS 洗 2 次,每次 5 min 终止反应。常规脱水、透明、封片。在光镜下观察海马 CA₁ 区胆碱酯酶阳性神经纤维密度的变化。用计算机图像分析系统测定各组大鼠海马 CA₁

区胆碱酯酶阳性神经纤维的平均光密度值(每组取 20 个视野)。

四、统计学分析

各组均数用 *t* 检验进行统计学分析,实验数据用 ($\bar{x} \pm s$) 表示。各组百分比用 Fisher's 精确概率检验进行统计学分析。

结 果

一、行为学测试

记忆功能测定结果见表 1、表 2。手术前各组大鼠的记忆能力基本一致。假手术对照组大鼠电击后 24 h 进洞潜伏期与电击前相比明显延长 ($P < 0.01$), 表明未出现记忆障碍;模型组造模 7 d 后进行记忆功能测定,电击后 24 h 进洞潜伏期与电击前之间的差异无显著性 ($P > 0.05$), 表明出现明显记忆障碍;模型非治疗组电击后 24 h 进洞潜伏期与电击前相比,差异无显著性 ($P > 0.05$), 表明记忆功能无明显恢复;电针治疗组治疗 10 d 后电击后 24 h 进洞潜伏期与电击前相比明显延长 ($P < 0.01$), 表明电针治疗可以明显恢复 VD 大鼠的记忆功能。有记忆能力的动物所占的百分比比较也表明,假手术对照组电击后 24 h 有记忆者为 58.3%, 模型组为 8.30%, 两者之间的差异有显著性 ($P < 0.01$);电针治疗组电击后 24 h 有记忆者为 54.55%, 模型非治疗组为 9.09%, 两者之间的差异有显著性 ($P < 0.01$)。

表 1 各组大鼠被动回避反应测试结果比较 ($s, \bar{x} \pm s$)

组 别	<i>n</i>	电击前进洞潜伏期	电击后 24 h 进洞潜伏期
假手术对照组	12	32.50 $\pm$ 14.52	490.40 $\pm$ 250.87 *
模型组	12	33.17 $\pm$ 20.23	41.83 $\pm$ 28.00 Δ
模型非治疗组	11	35.46 $\pm$ 15.02	40.45 $\pm$ 19.14 Δ
电针治疗组	11	35.27 $\pm$ 11.88	513.73 $\pm$ 204.64 *

注:电击 24 h 后进洞潜伏期与电击前比较, * $P < 0.01$, $\Delta P > 0.05$

表 2 各组大鼠有记忆、稍有记忆、无记忆百分比结果比较 (%)

组 别	<i>n</i>	有记忆	稍有记忆	无记忆
假手术对照组	12	58.3	16.70	25.00
模型组	12	8.30 *	16.70	75.00
模型非治疗组	11	9.09	27.27	63.64
电针治疗组	11	54.55 **	36.36	9.09

注:与假手术对照组比较, * $P < 0.01$; 与模型非治疗组比较, ** $P < 0.01$

二、各组大鼠海马胆碱酯酶阳性神经纤维染色

各组大鼠海马 CA₁ 区胆碱酯酶阳性神经纤维平均光密度值(optical density, OD)见表 3。在光镜下可以观察到:模型组和模型非治疗组海马 CA₁、CA₂、CA₃、CA₄ 各区的阳性纤维变稀疏,尤其 CA₁ 区明显。假手术对照组和电针治疗组海马 CA₁、CA₂、CA₃、CA₄

各区的阳性纤维密集,分布均匀。模型组与假手术对照组比较大鼠海马 CA₁ 区胆碱酯酶阳性神经纤维密度明显稀疏(图 1、2),OD 值明显降低($P < 0.01$)。电针治疗组与模型非治疗组比较大鼠海马 CA₁ 区胆碱酯酶阳性神经纤维密度明显变密(图 3、4),OD 值明显升高($P < 0.01$),表明电针对 VD 大鼠有明显的治疗作用。

表 3 各组大鼠海马 CA₁ 区胆碱能纤维平均光密度值结果比较($\bar{x} \pm s$)

组 别	视野数(个)	平均光度值
假手术对照组	20	1.52 ± 0.39
模型组	20	1.05 ± 0.23 *
模型非治疗组	20	1.07 ± 0.44
电针治疗组	20	1.43 ± 0.39 [△]

注:与假手术对照组比较,* $P < 0.01$;与模型非治疗组比较,[△] $P < 0.01$

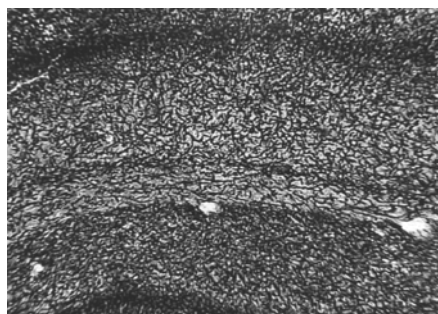


图 1 假手术对照组海马 CA₁ 区胆碱酯酶阳性纤维(×200)

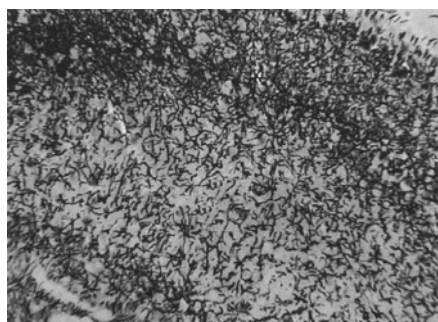


图 2 模型组海马 CA₁ 区胆碱酯酶阳性纤维(×200)

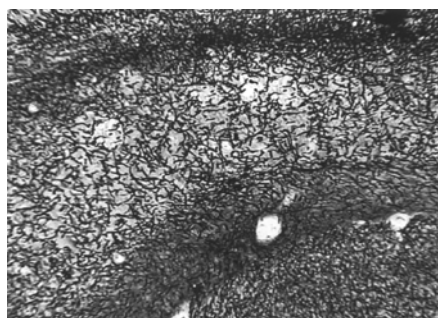


图 3 模型非治疗组海马 CA₁ 区胆碱酯酶阳性纤维(×200)

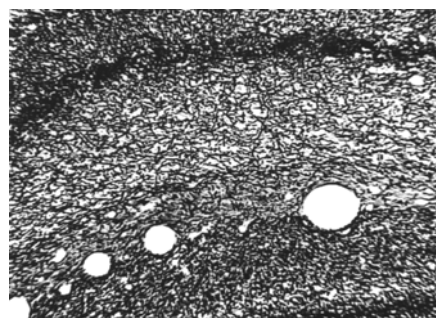


图 4 电针治疗组海马 CA₁ 区胆碱酯酶阳性纤维(×200)

讨 论

目前关于学习记忆的神经生物学机制尚未阐明。已有证据表明,海马直接参与信息的贮存和回忆,且与海马的胆碱能系统直接相关^[3]。近 20 年来,中枢胆碱能系统在痴呆发病机理中的作用逐渐被认识。胆碱能突触称为记忆突触,胆碱能神经通路本身即参与构成记忆痕迹^[4]。许多资料表明,胆碱酯酶阳性是显示基底前脑胆碱能神经元的一个很好指标,但在海马内胆碱能神经元少,其神经支配主要来自其他脑区,所以以胆碱酯酶阳性纤维来反映胆碱能纤维比以胆碱酯酶阳性神经元来反映胆碱能神经元更为可靠。由此可见,胆碱酯酶阳性纤维组化染色作为海马结构胆碱能纤维的显示方法是较特异的,也是可靠的^[5]。本实验动物模型的优点为手术操作简单、对动物创伤较小、易于恢复,尤其是以学习记忆能力低下为主要特点,与临床“血管性痴呆”有相似之处,有的作者认为可作为拟“血管性痴呆”的动物模型使用,适用于研究血管性痴呆的病理生理机制和评价药物的作用^[2]。我们的实验结果表明:反复脑缺血再灌注所致血管性痴呆大鼠的记忆功能明显障碍,海马胆碱酯酶阳性纤维明显受损。这与有些作者研究脑经反复缺血后,海马、纹状体、丘脑和颞叶皮质等脑区中乙酰胆碱含量下降、胆碱酯酶活性降低的结果相一致^[6]。根据乙酰胆碱合成反应的质量作用规律,缺血缺氧抑制了三羧酸循环,从而减少胆碱及乙酰辅酶 A 的供应,使乙酰胆碱合成的原料供应不足,最终使乙酰胆碱合成减少^[7]。

中医学认为,脑为髓海,其气血上输于盖(百会),下在风府。大椎为督脉经穴,为手足诸阳之会。VD 的病理机制为气血两亏、肝肾不足或气滞血瘀、痰阻经络而导致气血不能上养脑窍进而髓海失充所致。针刺百会、大椎可以激发经气、疏通经络,使脑髓得气血之荣而复聪^[8]。我们的实验结果还显示:针刺治疗 VD 大鼠百会、大椎 10 d 后,海马胆碱酯酶阳性纤维密度明显增加,同时 VD 大鼠记忆功能明显增强。这与中医理论相一致。

多项实验研究显示^[9]: AchE 易被针刺、按摩等机械作用或适当的热、磁作用所激活而提高其活性。针刺穴位不仅能使该穴位局部的 AChE 活性增高,且能使与其同经的远隔穴、脏腑、甚至脑和全血中的 AchE 的活性也得到提高,但不影响异经穴位中的 AchE。这些说明, AchE 不仅能对激动因子的作用做出反应,而且还能循经传递这种反应。由此可见,针刺百会、大椎可以激活该穴位的 AchE,还能循经传递激活海马的 AchE 活性,从而提高了学习记忆环路的信息传递处理能力,使学习记忆功能得到一定的恢复。电针治疗还可以提高脑缺血区的血流量,改善脑组织内能量代谢,促进三羧酸循环^[10],这可能使乙酰辅酶 A 含量增加,为乙酰胆碱的合成提供更多原料,引起乙酰胆碱的合成增加,从而提高学习记忆能力。

参 考 文 献

- 1 黄诚, 陈汉平. 针灸治疗老年性痴呆概况. 中国针灸, 1997, 17: 61-63.
- 2 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.
- 3 Corey Bloom J, Thal LJ, Galasko D, et al. Diagnosis and evaluation of dementia. Neurology, 1995, 45: 211-218.
- 4 Kato H, Kogure K, Nakano S, et al. Temporal profile of effects of pre-treatment with brief cerebral ischemia on the neuronal damage following secondary ischemic insult in the gerbil: cumulative damage and protective effects. Brain Res, 1991, 553: 238-245.
- 5 Mesulam MM, Mufson EJ, Levey AI, et al. Cholinergic innervation of cortex by the basal forebrain: cytochemistry and cortical connections of the septal area, diagonal band nuclei, nucleus basalis, and hypothalamus in the rhesus monkey. J Comp Neurol, 1983, 214: 170-197.
- 6 Wiard RP, Dickerson MC, Beek O, et al. Neuroprotective properties of the novel antiepileptic lamotrigine in a gerbil model of global cerebral ischemia. Stroke, 1995, 26: 466-472.
- 7 邢宏义, 王才源, 关新民. 脑缺血时大鼠大脑皮层乙酰胆碱含量变化的动态观察. 中国神经科学杂志, 1996, 3: 120-124.
- 8 孙申田, 高维滨, 主编. 针灸临床学. 北京: 中国医药科技出版社, 1996. 54-55.
- 9 林真. 试析乙酰胆碱酯酶活性传变与针灸作用及经络现象的关系. 中国针灸, 1996, 43: 43-45.
- 10 许能贵, 易玮, 马勤耘, 等. 电针对大鼠局灶性脑缺血后神经元损伤保护作用的研究. 中国针灸, 2000, 4: 237-240.

(收稿日期: 2002-09-25)

(本文编辑: 郭正成)

· 短篇论著 ·

内镜微波技术治疗消化道息肉临床疗效观察

林莉 王胜军

1993 年 8 月~2001 年 8 月, 我院应用微波治疗仪在内镜下共摘除消化道息肉 244 枚, 疗效满意, 现报道如下。

一、资料与方法

消化道息肉患者 127 例(共计 244 枚息肉), 男 89 例, 女 38 例; 年龄 7~77 岁; 单发 106 例, 多发 21 例(其中 1 例大肠息肉多达 30 枚)。息肉分布: 食管 6 枚(中段 2 枚, 下段 4 枚), 胃 17 枚(胃底 2 枚, 胃体 4 枚, 胃窦及幽门部 11 枚), 十二指肠球部息肉 12 枚, 大肠息肉 209 枚(回盲部 2 枚, 升结肠 33 枚, 横结肠 42 枚, 降结肠 37 枚, 乙状结肠 63 枚, 直肠 32 枚)。息肉直径 0.3 cm~2.0 cm, 息肉有蒂 34 枚, 亚蒂 72 枚, 广基 138 枚。病理组织学示: 炎性息肉 107 枚, 腺瘤性息肉 137 枚, 其中 2 枚腺瘤性息肉有恶变。

内镜为奥林巴斯 GIF-XQ30 型纤维胃镜、富士能-450HR 型电子胃镜及富士能-88 型电子大肠镜。微波内镜治疗仪为合肥产 WNZ-1C 型, 频率为 2 450 MHz, 波长为 12 cm, 输出电流为 0~200 mA 可调。

术前检查心电图、血常规、血小板及出、凝血时间。术前 10 min 肌肉注射解痉药物 654 210 mg。选择电流为 80~100 mA, 时间每次 3~5 s, 烧灼次数约 5~10 次。通过内镜检查孔插入微波电缆天线, 并接触息肉, 对广基与亚蒂型息肉同

时采用“顶部点灼法”及“熨烙法”, 对有蒂息肉采用“基底部两侧点灼切割法”治疗, 直至息肉脱落。对所有息肉均在微波治疗前取活组织送病理检查。

二、结果

本组 244 枚息肉经内镜微波治疗 1 周后复查息肉全部脱落, 创面完全愈合, 未出现并发症。2 例多发性结肠息肉患者经 2~3 次微波治疗后治愈。其余 125 例患者均 1 次痊愈。2 例息肉恶变经微波 1 次治愈, 1 例随访 4 年, 1 例随访 1 年均无复发。

三、讨论

微波作用于人体组织所产生的热效应可使组织中水分子、蛋白质分子及各种离子在微波作用下产生各种生理反应。当微波使组织温度升高到 42℃ 时, 可抑制细胞的呼吸和癌细胞 DNA 的合成, 同时抑制 RNA 的转录及蛋白质合成, 从而阻止肿瘤细胞增殖, 使细胞失去活力, 甚至死亡。利用微波的凝固作用, 可行内镜下止血术、息肉灼除术及良、恶性消化道狭窄扩张术等。微波治疗时应注意: ①要求操作熟练, 天线探头一定要准确触及息肉以免损伤正常组织; ②选用功率、时间要适当, 避免穿孔; ③对于不同部位的多发性息肉宜分期治疗; ④治疗后 3 d 内应避免剧烈运动, 饮食以软食易消化为宜, 保持大便通畅。治疗时可酌情应用抗菌、止血及抑酸药物。

(收稿日期: 2003-03-16)

(本文编辑: 阮仕衡)