

• 基础研究 •

高压氧对血管性痴呆大鼠海马胆碱能神经元的影响及行为学疗效

叶建新 姚丽青

[摘要] 目的 研究高压氧(HBO)治疗对血管性痴呆大鼠海马胆碱能神经元及行为的影响。方法 制作血管性痴呆大鼠模型,随机分成对照组及治疗组,HBO治疗30 d后,用 Morris 水迷宫检测大鼠空间记忆能力,免疫组织化学染色检测海马 CA1 区胆碱能神经元数目的变化。结果 治疗组大鼠空间记忆能力明显提高,海马 CA1 区胆碱能数目较对照组明显增加。结论 高压氧对血管性痴呆大鼠有明显治疗作用。

[关键词] 高压氧;血管性痴呆;胆碱能神经元;Morris 水迷宫;大鼠

Effect of hyperbaric oxygen therapy on the cholinergic neurons of hippocampus and praxiology of vascular dementia rats YE Jian-xin, YAO Li-qing. Department of Neurology, Department of Pathology, Fuzhou Military General Hospital of Nanjing Army Area, Fuzhou 350025, Fujian, China

[Abstract] Objective To study the effect of hyperbaric oxygen therapy on the cholinergic neurons of hippocampus and praxiology of vascular dementia rats. Methods The vascular dementia models were made and divided into control and therapy group. After 30 days of HBO therapy, abilities of learning and memory of rats were tested by using the Morris water maze. Immunohistochemistry staining was used to observe the number of cholinergic neurons of CA1 subfield of hippocampus. Results Abilities of learning and memory of rats and the number of the neurons positive to ChAT-like immunoreaction in the CA1 subfield of the hippocampus significantly increased in therapy group. Conclusion Hyperbaric oxygen therapy is effective on the vascular dementia model rats.

[Key words] hyperbaric oxygen therapy; vascular dementia; cholinergic neurons; Morris water maze; rat

中图分类号:R749.1 文献标识码:A 文章编号:1006-9771(2004)09-0529-03

[本文著录格式] 叶建新,姚丽青.高压氧对血管性痴呆大鼠海马胆碱能神经元的影响及行为学疗效[J].中国康复理论与实践,2004,10(9):529-531.

1 材料与方法

1.1 实验动物 12—14 个月龄雄性 SD 大鼠 30 只(由福州总医院实验动物中心提供),体重(500±50)g。以 Y 型电迷宫实验筛选学习记忆良好的大鼠 29 只(指标见 1.4.1),随机分为:治疗组 12 只,对照组 10 只,假手术组 7 只。

1.2 试剂 ChAT 单克隆抗体、ABC 试剂盒(博士德公司)。

1.3 模型制作方法(2-VO 法) 参照 Ohta 等的方法^[1]制作慢性脑灌注不足动物模型。治疗组、对照组大鼠术前 12 h 禁食,4 h 禁水。用 2%戊巴比妥钠 40 mg/kg 腹腔注射麻醉,保证手术期间有自主呼吸。大鼠仰卧固定,颈前部去毛,碘伏消毒后沿颈正中中线切开,分离出双侧颈总动脉,双重丝线结扎,用 1-0 号线依次缝合颈部肌肉和皮肤。观察其行为变化。假手术组仅行颈部切开,不结扎双侧颈总动脉。大鼠术后送至有通风条件的饲养房饲养。

1.4 高压氧(HBO)治疗 将治疗组大鼠置于 40 cm

× 40 cm × 20 cm 特制木箱内,木箱上、下两侧各有 1 个直径 2.0 cm 的圆孔,箱下方 1 孔为进气孔,与输氧管连接,箱上方 1 孔为出气孔,与排气孔相接。木箱置空气加压舱内,舱内温度(24±2)℃。按 6 L/min 速率通入医用纯氧(氧浓度为 99.5%),给氧 5 min 后测排气孔处氧浓度为 99.0%。以微机程序自动操舱,按 4 kPa/min 速率升压,压力升至 160 kPa 时,稳压给氧 65 min。以 3 kPa/min 速率减压出舱。每天 1 次,连续治疗 30 d。

1.5 检测方法

1.5.1 Y 型电迷宫实验^[2] Y 型电迷宫的 3 条臂尽头各有一灯,各臂底部为铜网。当按电刺激按钮时,仅有 1 条臂尽头的灯发出亮光,此时该臂底部的铜网无电流通过,即为安全区;另外 2 臂的灯不亮,底部铜网有电流通过,为非安全区(实验时,选中一臂为起步区,另一臂为危险区)。大鼠在起步区通电后,一次性跑向安全区即被判为正确,否则为错误。

用 MG-2 Y 型电迷宫筛选动物(刺激电压:50 V,延迟 2 s),每只大鼠每天训练 20 次,记录错误次数(EN)和 20 次训练总时间(TRT)。以 10 次测试中连续 9 次出现正确反应,TRT ≤ 160 s,EN ≤ 8 次为合格标准,其中任何 1 项超过者则认为学习障碍,24 h 后再

作者单位:350025 福建福州市,南京军区福州总医院神经内科。作者简介:叶建新(1969-),女,福建福州市人,主治医师,硕士,主要从事血管性痴呆的临床及基础研究。

检测其记忆保持能力。

1.5.2 Morris 水迷宫 Morris 水迷宫为圆形水池,直径 100 cm,深 50 cm,水深 30 cm,水温(24±2)℃,水面覆一层塑料泡沫屑,池壁上 4 个等距离点分水池为 4 个象限,在第三象限中央放置平台,平台无色透明,直径 6 cm,高 28 cm,平台没于水面下 2 cm,水池周围参照物保持不变。

试验包括:①定位航行试验(place navigation test):实验历时 7 d。将大鼠从入水点面向池壁置入水槽中,记录大鼠从入水到爬上平台所需的时间,即逃避潜伏期。每只大鼠每天从 4 个不同象限入水点入水进行训练各 1 次,取其平均值为其每天逃避潜伏期。训练中,若大鼠在 60 s 内找到平台,让其于平台上站立 10 s;若未找到,用棒将其引上平台,并让其站立 10 s,潜伏期限记为 60 s。将大鼠从平台上拿下来休息 60 s 之后,再按序由下一入水点入水进行下一次实验。②空间探索试验(spatial probe test):第 8 天撤去平台,将大鼠从第二象限入水点放入水槽,记录 60 s 内其在平台象限的滞留时间。

1.5.3 统计方法 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 统计软件进行单因素方差分析。

1.5.4 组织学观察 光镜组织切片的制备:随机取治疗组、对照组、假手术组大鼠各 3 只,均为手术后 4 周并经水迷宫检测 8 d 后的大鼠。用 2%戊巴比妥钠 50 mg/kg 腹腔注射麻醉后,掀开颅盖,迅速取脑,在外侧膝状体冠状位切取脑组织,将脑组织固定于 4%多聚甲醛磷酸缓冲液中。脑组织经冲洗、脱水、透明、浸蜡、包埋,制成 5 μm 厚切片,每 10 张切片取 1 张行常规 HE 染色。

1.5.5 免疫组织化学染色 HBO 治疗 30 d 后的治疗组大鼠及对照组和假手术组大鼠水迷宫检测后,用 2%戊巴比妥钠 40 mg/kg 腹腔注射麻醉后,仰卧固定,剪开胸腔,暴露心脏,将针头插入左心室,剪破右心耳,先用预冷的 0.01 M PBS(pH 7.4)灌注,待右心耳流出的液体基本无血色(约 5 min),更换用 0.01 M PBS(pH 7.4)配制的 4%多聚甲醛磷酸缓冲液灌注 20 min,灌流量约 10 ml/min。掀开颅盖,迅速取出脑,以移植位点为中心,冠状位切取脑组织,将脑组织固定于相同的固定液中 2 h。脑组织经冲洗、脱水、透明、浸蜡、包埋,制成 5 μm 厚连续切片,每 20 张切片中取 1 张。

切片常规脱蜡至水,浸入 0.01 M 枸橼酸盐缓冲液(pH 6.0)高压修复至冒气 1 min 断电,冷却后 PBS(pH 7.4)洗涤 2 次。3% H₂O₂ 室温 10 min,蒸馏水洗 3 次。滴加正常山羊血清封闭液,室温 20 min。甩去多余液体,不洗。滴加 1:50 乙酰胆碱(ChAT)单克隆抗体,4℃过夜,PBS(pH 7.4)洗涤 2 min,共 3 次。滴加生物

素化山羊抗兔 IgG,37℃ 20 min,PBS(pH 7.4)洗涤 2 min,共 3 次。滴加试剂 SABC,37℃ 20 min,PBS(pH 7.4)洗涤 5 min,共 4 次。甩去 PBS 液,每张切片加 100 μl 新鲜配制的 AEC 显色液。阳性显色为红色。苏木素轻度复染,脱水、透明、封片,光学显微镜观察。

2 结果

治疗组有 2 只,对照组有 1 只在麻醉过程中死亡。双侧颈总动脉结扎后首先出现短暂惊厥,体温降低,呼吸减慢,翻身反射消失,治疗组和对照组大鼠在手术后数小时内均能复苏,早期观察动物运动减少,共济失调,术后 7 d 实验组已基本恢复,与假手术组相比无明显的运动障碍。

2.1 组织学观察 在光学显微镜下,假手术组术后 4 周大鼠的海马 CA1 区锥体细胞排列紧密有序,细胞核圆而大,染色浅,核仁清晰。永久性结扎双侧颈总动脉术后 4 周大鼠的海马 CA1 区,细胞排列稀疏,形态正常,锥体细胞数量减少,细胞核固缩,染色深,结构不清,胞浆嗜酸性变。见封三图 3.1 - 图 3.3。

2.2 行为学观察 定位航行试验中,假手术组平均逃避潜伏期 25.61 s,对照组平均逃避潜伏期 55.42 s,较假手术组明显延长(P<0.01),治疗组平均逃避潜伏期 36.93 s,比对照组明显缩短(P<0.01)。见图 1。

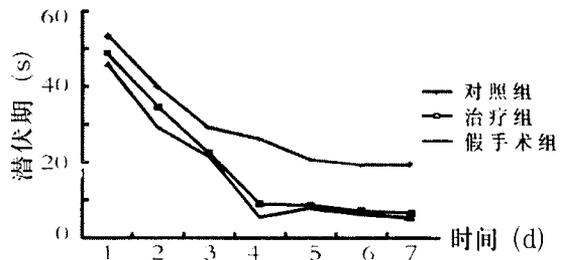


图 1 各组大鼠寻找平台的平均潜伏期比较

对照组、治疗组及假手术组大鼠在平台象限的平均滞留时间分别为(7.89±2.62) s、(12.73±2.98) s、(13.38±3.29) s,经单因素方差分析,对照组较治疗组明显缩短(P<0.01),假手术组较治疗组明显延长(P<0.01)。

2.3 免疫组织化学染色 治疗组海马 CA1 区可见较多 ChAT 免疫反应阳性神经元,假手术组海马 CA1 区也可见较多 ChAT 免疫反应阳性神经元,对照组 ChAT 免疫反应阳性神经元分布稀疏,数量明显减少;在海马 CA1 区的锥体细胞层,分别选择 3 个相邻视野,在 15×10 光镜下做免疫反应阳性神经元计数,假手术组、治疗组、对照组海马 CA1 区 ChAT 免疫反应阳性神经元计数分别为(109.13±2.32)、(102.02±1.75)、(39.87±3.07),治疗组与对照组组间有非常显著性差异(P<0.01),治疗组与假手术组组间无显著性差异(F=3.26, P>0.05)。见封三图 3.4 - 图 3.6。

3 讨论

血管性痴呆(vascular dementia, VD)是由于缺血性或出血性脑血管病,以及全脑性缺氧缺血而引起的认知障碍痴呆综合征,以记忆力减退、表情淡漠、呆滞或人格改变为主要临床表现的一组神志异常症候群。VD 多源于大脑特定部位,如额叶、颞叶及边缘系统的血管原性损害,特别是动脉粥样硬化、动脉狭窄、脑梗死等缺血性病变。随着脑血管发病率的不断升高,血管性痴呆发病率也逐渐升高,它不仅给患者带来长期痛苦,严重影响其生活质量,而且给家庭、社会造成沉重负担。因此,血管性痴呆的防治越来越被人们所重视。

既往采用血管性痴呆动物模型的方法中,有四血管阻断法(4-VO)^[3]、双侧颈总动脉结扎模型(2-VO)^[4]、颅外安置小磁铁吸附经舌下静脉注入四氧化三铁粉、颈内动脉注射微小栓子^[5]、大脑中动脉(MCA)凝闭及再灌注^[6-7]等,大多数模型缺血时间短暂或仅模拟了单一部位(如额部)的缺血梗塞,或局限于缺血急性期。慢性脑灌注不足是血管性痴呆主要原因,模拟慢性缺血改变对阐明血管性痴呆的病理生理过程十分重要。

范文辉等通过数字减影血管造影检查大鼠模型的血管阻断情况得到证实^[8]。本实验采用的 2-VO 法可造成稳定的不完全性前脑缺血,更接近慢性脑灌注不足时脑组织病理生理演变过程,脑的幕上部分血流减少,而脑干灌注良好,具备维持生命中枢的基本功能,适用于研究慢性脑缺血;早期缺血可以通过基底动脉和基底动脉环血流调节,并逐渐形成侧枝循环,术后 12 周脑血流量趋于稳定,但海马区达不到正常脑血流量。

研究表明,VD 大鼠的学习记忆能力与海马 CA1 区锥体细胞数量减少以及细胞间突触的结构和功能下降有关^[2]。有研究发现,2-VO 法模型制作手术后 7 d,实验大鼠即出现明显的学习记忆障碍,空间定位、识别能力损伤较为严重,形态学观察 VD 大鼠 CA1 区锥体细胞出现变性、死亡、丢失。

本实验采用的大鼠为老龄鼠,双侧颈总动脉结扎能较好地模拟人类 VD 的发病机制,并从形态学上提供了 VD 患者海马区锥体细胞出现变性、死亡、丢失的证据,提示老龄大鼠双侧颈总动脉结扎能较好模拟 VD 患者的发病机理。

HBO 可使血小板的聚集率下降,血液粘度降低,血中乳酸降低,促进血栓溶解吸收,改善微循环的状态,有助于缺血缺氧状态的恢复。高压氧下血液氧分压和细胞外液的氧分压增高,组织新陈代谢旺盛,ATP

生成增多,可促进血管成纤维细胞的活动和分裂以及胶原纤维的形成,从而促进了脑血管的生成,加速了侧枝循环的建立,使海马区脑供血量增多。HBO 对髓鞘可能有某种程度的修复作用,使神经功能得以恢复。本实验治疗组大鼠经高压氧治疗后,空间记忆能力较对照组明显提高。

有研究表明,VD 额叶皮层及海马胆碱能神经元的损伤可能是认知功能受损害的形态学基础^[6]。乙酰胆碱合成减少,胆碱乙酰转移酶的活性明显降低,其降低幅度与痴呆严重程度呈正相关。HBO 可减轻海马神经细胞凋亡^[9],调节细胞内一氧化氮(NO)的生成。NO 是一种非经典的神经递质,在突触可塑性和神经细胞间信息传递过程中发挥特殊的作用。研究显示,在损伤基底前脑胆碱能神经元以后,皮质中 nNOS 神经元数目明显减少,细胞突发生扭曲、断裂,胞质浓缩^[10]。本实验中治疗组大鼠 ChAT 神经元较对照组明显增多,可能是由于 HBO 治疗促进脑中 nNOS 神经元增多,抑制 iNOS,减少 ChAT 神经元变性、丢失,使 ChAT 神经元恢复,从而改善 VD 大鼠的空间记忆能力。

[参考文献]

- [1] Ohta H, Matsumoto K, Watanabe H. Progressive cognitive impairment following chronic cerebral hypoperfusion induced by permanent occlusion of bilateral carotid arteries in rats[J]. Brain Res, 1994, 653(1): 231 - 234.
- [2] 赵小贞, 王玮, 康仲涵, 等. 血管性痴呆大鼠学习记忆障碍与海马突触界面结构参数改变的相关性研究[J]. 现代康复, 2001, 5(6): 54 - 55.
- [3] Pulsinelli WA, Brierley JB. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat[J]. Stroke, 1979, 10(3): 267.
- [4] Smith ML, Bendek G, Dahlgren N, et al. Models for studying long-term recovery following forebrain ischemia in the rat: 2. A 2-vessel occlusion model[J]. Acta Neurol Scand, 1984, 69(5): 385.
- [5] 陈俊抛, 田时周, 于薇薇, 等. 多发性脑梗塞痴呆动物模型的研究[J]. 中华神经精神科杂志, 1994, 27(5): 311.
- [6] Tamura A, Graham DI, McCulloch J, et al. Focal cerebral ischemia in the rat: Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion[J]. Cereb Blood Flow Metab, 1981, 1(1): 53.
- [7] Chen ST, Hsu CY, Hogan EL, et al. A model of focal ischemia stroke in the rat: Reproducible extensive cortical infarction[J]. Stroke, 1986, 17(4): 738.
- [8] 范文辉, 刘之荣, 李露斯. 血管性痴呆的动物模型及其胆碱能机制研究[J]. 第三军医大学学报, 2000, 22(4): 314 - 317.
- [9] 卢晓欣, 洪新如, 汤永建. 高压氧、脑源性神经营养因子联合治疗新生大鼠缺血缺氧性脑损伤[J]. 中华航海医学与高压医学杂志, 2003, 10(3): 169 - 172.
- [10] 唐湘祁, 金丽娟, 刘正清, 等. 阿尔茨海默病大鼠模型脑内 nNOS 神经元的变化[J]. 中华神经科杂志, 2001, 34(4): 217.

(收稿日期: 2004-03-22)

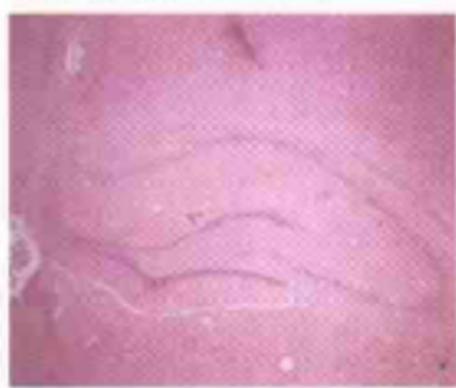


图 3.1 术后 38 d 大鼠海马结构 (× 25)

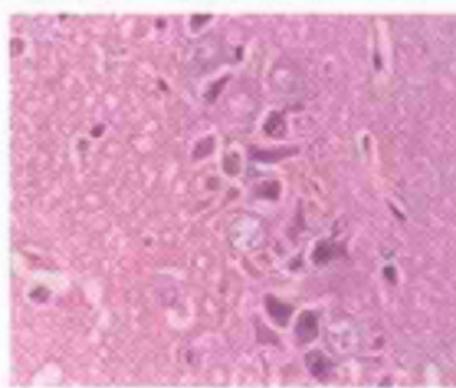


图 3.2 术后 38 d 大鼠海马 CA1 区锥体细胞 (× 400)

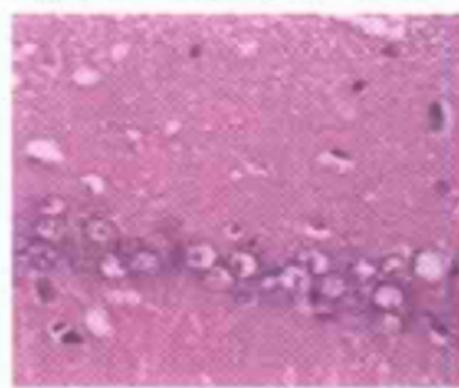


图 3.3 假手术组术后 38 d 海马 CA1 区锥体细胞 (× 400)

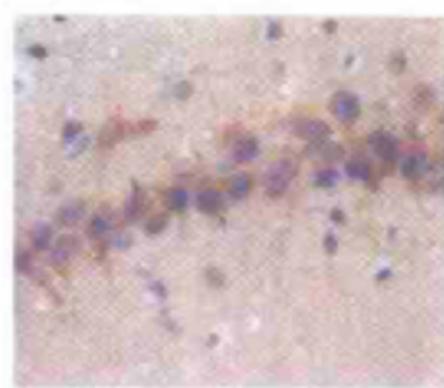


图 3.4 治疗组海马 CA1 区 ChAT 免疫反应阳性细胞 (× 400)

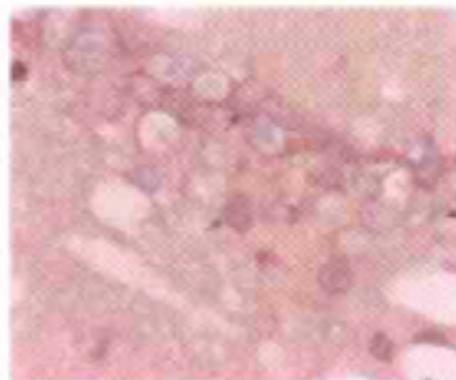


图 3.5 对照组海马 CA1 区 ChAT 免疫反应阳性细胞 (× 400)



图 3.6 假手术组海马 CA1 区 ChAT 免疫反应阳性细胞 (× 400)

图 1.1 —— 图 1.10 正文见 P514

图 2.1 —— 图 2.6 正文见 P521

图 3.1 —— 图 3.6 正文见 P530—531