

• 基础研究 •

高压氧治疗对血管性痴呆大鼠学习记忆能力及海马锥体细胞的影响

叶建新^{1a}, 林航^{1a}, 穆军山^{1a}, 姚丽青^{1b}

[摘要] 目的 研究高压氧治疗对血管性痴呆大鼠学习记忆能力及海马锥体细胞的影响。方法 制作血管性痴呆大鼠模型,随机分成对照组、假手术组及治疗组,高压氧治疗 30 d 后,用 Morris 水迷宫检测大鼠学习记忆能力,HE 染色观察海马锥体细胞的变化。结果 与对照组比较,治疗组大鼠空间记忆能力明显提高,海马锥体细胞数目明显增多。结论 高压氧对血管性痴呆大鼠有明显治疗作用。

[关键词] 血管性痴呆;高压氧;海马;锥体细胞;学习记忆能力

Effect of Hyperbaric Oxygen Therapy on Abilities of Learning and Memory and Hippocampal Pyramidal Cell in Vascular Dementia Rats
YE Jian-xin, LIN Hang, MU Jun-shan, et al. Department of Neurology, Fuzhou Military General Hospital of Nanking Army Area, Clinical Medical College of Fujian Medical University, Fuzhou 350025, Fujian, China

Abstract: **Objective** To study the effect of hyperbaric oxygen (HBO) therapy on abilities of learning and memory and hippocampal pyramidal cell in vascular dementia rats. **Methods** The vascular dementia model was reproduced and divided into control, sham and treatment groups. After 30 d of HBO therapy, the rats were assessed with the Morris water maze, and their hippocampal pyramidal cells were observed after HE staining. **Results** Compared with the control group, the ability of learning and memory of rats in treatment group increased, as well as the hippocampal pyramidal cells did. **Conclusion** Hyperbaric oxygen therapy can be used to treat vascular dementia.

Key words: vascular dementia; hyperbaric oxygen therapy; hippocampus; pyramidal cell; ability of learning and memory

[中图分类号] R743 [文献标识码] A [文章编号] 1006-9771(2007)11-1032-02

[本文著录格式] 叶建新,林航,穆军山,等.高压氧治疗对血管性痴呆大鼠学习记忆能力及海马锥体细胞的影响[J].中国康复理论与实践,2007,13(11):1032-1033.

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,血管性痴呆的防治越来越被人们所重视。本文观察高压氧治疗对血管性痴呆模型大鼠学习记忆能力的影响及其机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 12~14 个月龄 SD 大鼠 30 只(由福州总医院实验动物中心提供),体重(500±50)g,雄性。以用 MG-2 Y 型电迷宫实验^[1]筛选学习记忆良好的大鼠 29 只。选择标准: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 次出现正确反应为学会,且学会的大鼠 TRT ≤160 s, EN ≤8 次,其中 1 项超过者排除。随机分为:治疗组 12 只、对照组 10 只、假手术组 7 只。

1.2 方法

1.2.1 模型制作 参照 Ohta 等^[2]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。两组大鼠术后送至有通风条件的饲养房饲养 30 d。

1.2.2 治疗方法 术后 38 d,将治疗组大鼠置于 40×40×20 cm 特制木箱内,木箱两侧各有 1 个直径 2.0

cm 的圆孔,一孔(箱下方)为进气孔与输氧管连接,另一孔(箱上方)为出气孔与排气孔相接。木箱置加压舱内,给氧 5 min 后测排气孔处氧浓度为 99.0%。按 6 L/min 速率通入医用纯氧(氧浓度为 99.5%),采用空气加压舱,舱内温度(24±2)℃。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。10 次为 1 个疗程。连续治疗 3 个疗程。

1.2.3 Morris 水迷宫 高压氧治疗结束后,所有动物进行 Morris 水迷宫测试。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。

1.2.3.1 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 60 s 内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,逃避潜伏期记为 60 s。将大鼠从平台上拿下休息 60 s 后,再按序由下一入水点入水进行下一次实验。

1.2.3.2 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。

1.2.4 组织学观察 治疗前随机取治疗组、对照组、假手术组大鼠各 3 只,均为手术后 30 d 并经水迷宫检

作者单位:1.南京军区福州总医院,福建医科大学福总临床医学院, a.神经内科; b.病理科,福建福州市 350025。作者简介:叶建新(1969-),女,福建福州市人,硕士,主治医师,主要研究方向:血管性痴呆临床及基础研究。

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,迅速取出脑,平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。治疗后,取治疗组 7 只,对照组 6 只,假手术组 4 只同法取脑行 HE 染色。

光镜下(400×)对海马 CA1 区锥体细胞进行盲法计数。每张切片取连续的两个视野计数锥体细胞数,取两视野的平均值为该切片锥体细胞数计数,4 张切片的平均值为该样本的锥体细胞计数。

1.3 统计学方法 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。

2 结果

2.1 一般情况 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,大鼠首先出现短暂惊厥,体温降低,呼吸减慢,翻正反射消失,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。假手术组无明显的运动障碍。术后 7 d 治疗组运动功能基本恢复。

2.2 Morris 水迷宫 对照组逃避潜伏期较假手术组明显增加($P < 0.01$),治疗组平均逃避潜伏期比对照组明显减少($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 各组大鼠逃避潜伏期比较(s)

时间	对照组	治疗组	假手术组
第 1 天	53.80±6.72	48.78±7.58	45.83±8.82
第 2 天	39.88±8.24	34.63±8.92	29.13±12.52
第 3 天	29.03±8.54	22.36±7.38	21.39±6.54
第 4 天	26.03±7.95	8.82±6.68	5.17±5.58
第 5 天	20.60±7.85	8.56±5.02	7.58±4.36
第 6 天	19.11±6.37	7.05±4.48	6.03±3.11
第 7 天	19.04±8.56	6.48±3.34	5.13±2.16

注:对照组与假手术组比较, $P < 0.01$;治疗组与对照组比较, $P < 0.01$ 。

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,对照组较治疗组滞留时间明显缩短($P < 0.01$)。

2.3 组织学观察 假手术组大鼠海马 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。对照组大鼠海马 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。治疗组大鼠海马 CA1 区形态正常锥体细胞数量增多(封三彩图 3.1~3.3)。治疗前后海马锥体细胞计数见表 2。

3 讨论

血管性痴呆(vascular dementia, VD)多源于大脑特定部位,如额叶、颞叶及边缘系统的血管源性损害,特别是动脉粥样硬化、动脉狭窄、脑梗死等缺血性病变。血管性痴呆的动物造模包括四血管阻断法(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的方法、颈内动脉注射微小栓子模型^[5]、大脑中动脉(MCA)凝闭及再灌注模型^[6-7]等,大多数模型缺血时间短暂或仅模拟了单一部位(额部)的缺血梗死,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。

表 2 各组大鼠治疗前后海马锥体细胞计数

组别	治疗前	治疗后
假手术组	80.15±11.15	81.20±12.14
对照组	45.17±4.23	
治疗组	43.21±3.28	59.25±2.36

注:治疗组治疗前后比较, $P < 0.05$;治疗后假手术组与治疗组比较, $P > 0.05$ 。

2-VO 法持久性双侧颈总动脉结扎可造成稳定的不完全性前脑缺血,造成脑供血大幅度下降,更接近慢性脑灌注不足时脑组织病理生理过程,脑的幕上部分血流减少,而脑干灌注良好^[8],维持生命中枢的基本功能,适用于慢性研究。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以代偿,术后 12 周脑血流量趋于稳定,但海马区达不到正常脑供血量。

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,与以前的研究^[1]一致。

高压氧可减轻海马神经细胞凋亡^[9],抑制脑组织损伤后内源性毒性产物的生成,避免或减轻了自由基对神经细胞膜及其他生物膜的损害^[10];能减轻缺血细胞膜的离子泵损伤,使细胞内外的离子分布趋于正常,保持细胞膜的稳定^[11]。本实验表明,高压氧治疗能促进海马锥体细胞增殖,改善 VD 大鼠的学习记忆能力。

[参考文献]

[1] 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.
[2] 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.
[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].中华航海医学与高气压医学杂志,2003,10(3):169-172.
[10] Neubauer RA, Cottlieb SF. Hyperbaric oxygen for brain injury[J]. J Neurosurg, 1993, 78:687-688.
[11] Takahashi M, Iwatsuki N, Ono K, et al. Hyperbaric oxygen therapy accelerates neurologic recovery after 15-minute complete global cerebral ischemia in dogs[J]. Crit Care Med, 1992, 20:1588-1594.
(收稿日期:2007-01-13)

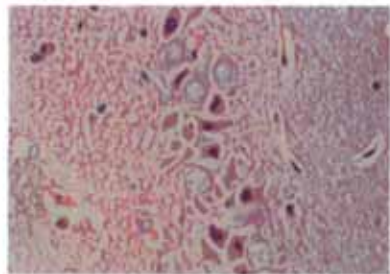


图3.1 对照组大鼠海马CA1区锥体细胞
(HE, 400 ×)

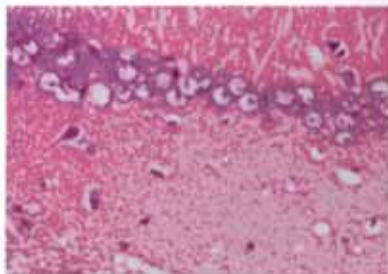


图3.2 假手术组大鼠海马CA1区锥体细胞
(HE, 400 ×)

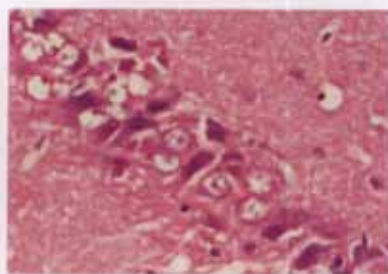


图3.3 治疗组大鼠海马CA1区锥体细胞
(HE, 400 ×)

图1.1~1.6 正文见P1027; 图2.1~2.6 正文见P1030; 图3.1~3.3 正文见P1033。