

· 基础研究 ·

电针结合经颅磁刺激对脑缺血大鼠学习记忆功能的影响*

韩肖华¹ 黄晓琳^{1,2} 王熠钊¹ 陈红¹ 陆敏¹ 许涛¹

摘要 目的:研究电针结合重复经颅磁刺激对脑缺血大鼠学习记忆功能的影响并从突触形态结构可塑性角度探讨其机制。方法:40只Wistar大鼠随机分为正常组、模型组、电针组、磁刺激组和电针结合磁刺激组,复制大脑中动脉栓塞模型,3个组别分别给予电针、经颅磁刺激和电针结合经颅磁刺激干预,评估学习记忆功能的变化并观察缺血侧海马CA3区突触形态结构的变化。结果:各治疗组大鼠的学习记忆功能明显提高,海马CA3区突触界面曲率、突触后致密物质厚度和穿孔性突触百分率明显增加,尤其是电针结合经颅磁刺激组改善更加明显。结论:三种干预方法都能改善脑缺血大鼠的学习和记忆功能。其中电针结合重复经颅磁刺激效果更加显著,其机制可能与脑缺血大鼠海马CA3区突触超微结构的改变有关。

关键词 电针;经颅磁刺激;脑缺血;突触;学习

中图分类号:R743.3,R493 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2009)-06-0494-04

Effect of electroacupuncture combined with repetitive transcranial magnetic stimulation on learning and memory in rats with cerebral ischemia/HAN Xiaohua, HUANG Xiaolin, WANG Yizhao, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2009, 24(6):494—497

Abstract Objective: To investigate the effect of electroacupuncture (EA) combined with repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) on learning and memory function and alterations in synaptic ultrastructure in rats with cerebral ischemia. **Method:** Forty healthy male Wistar rats were divided into normal, model, EA, rTMS and EA + rTMS groups randomly. Model of middle cerebral artery occlusion (MCAO) was established, followed by EA, rTMS and EA + rTMS treatment, and then, Morris water maze task and the ultrastructure of the synapses in CA3 area of hippocampus of ischemic cerebral hemisphere were investigated. **Result:** The maze performance in three intervention groups was significantly better than that in model group, especially in EA+rTMS group. In CA3 area of hippocampus of ischemic cerebral hemisphere, there was no significant difference in the average width of the synaptic interspace among five groups. After any kind of three interventions postsynaptic density, average curvature of synaptic interface and percentages of perforated synapses all increased significantly compared with model group. The EA+rTMS group was superior to EA and rTMS groups in terms of average curvature of synaptic interface. **Conclusion:** All three interventions can enhance learning or memory and improve synaptic ultrastructure in rats. The finding that EA+rTMS is superior to either EA and rTMS alone in terms of some indexes provides evidence supporting its clinical application.

Author's address Dept. of Rehabilitation Medicine, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, 430030

Key words electroacupuncture; transcranial magnetic stimulation; cerebral ischemia; synapses; learning

学习记忆功能障碍是临床脑梗死患者常见的认知功能障碍,严重影响患者的康复治疗效果和生存质量,国内外的研究已经证实了电针(electroacupuncture, EA)、经颅磁刺激(transcranial magnetic stimulation, TMS)和两者结合能改善脑梗死神经功能^[1-3]。但是联合运用EA和TMS对其学习记忆功能的改善还未见报道,本文运用EA结合TMS干预大脑中动脉栓塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型,采用透射电镜观察缺血侧海马CA3区突触形态结构的变化并通过Morris水

迷宫评估学习记忆功能,观察EA结合TMS改善脑梗死患者学习记忆功能的疗效,探讨其可能的机制。

1 材料与方法

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(30672216/C030320);华中科技大学同济医学院附属同济医院科研基金(2008)

1 华中科技同济医学院附属同济医院康复医学科,武汉,430030

2 通讯作者

作者简介:韩肖华,男,主治医师,博士在读

收稿日期:2008-09-16

1.1 实验动物分组

40 只健康雄性 Wistar 大鼠(同济医学院实验动物中心), 体重(200 ± 20)g, 随机分成 5 组, 即正常组、模型组、EA 组、TMS 组、EA+TMS 组, 每组 8 只。

1.2 实验动物造模

参照廖维靖等^[4]和 Zea Longa 等^[5]的大鼠大脑中动脉缺血模型造模方法, 腹腔注射 6% 的水合氯醛(剂量为 350mg/kg 体重), 颈部正中切口, 长约 2cm, 暴露右侧颈总动脉和颈外动脉, 0 号丝线结扎颈外动脉。分离与颈总动脉伴行的迷走神经, 在距颈总动脉分叉处近端 0.5—0.6cm 处结扎颈总动脉。在结扎线的远端置丝线备用。用微小动脉夹夹闭备用线远端的颈总动脉, 在备用线的近端用眼科剪剪一小切口, 将黑色 5/0 尼龙线线栓送进切口, 向上推至动脉夹处, 将备用线稍微扎紧, 随即松开动脉夹。将线栓沿颈总动脉、颈内动脉顺行向上插入至大脑中动脉起始部, 遇阻力时停止, 从颈总动脉分叉处计算插入深度为(1.9 ± 0.2)cm, 造成大脑中动脉供血阻断。正常组不作特殊处理。观察大鼠清醒后行为学改变, 分为 5 级。1 级: 行为无明显变化; 2 级: 左前肢屈曲, 左后肢伸展; 3 级: 有左侧追尾现象, 左转圈; 4 级: 行走困难, 摇摆不定; 5 级: 意识不清。将第 2、3、4 级动物定为模型成功大鼠。

1.3 治疗方法

1.3.1 EA 方法: 参照《实验针灸学》中大鼠的常用针灸穴位定位方法^[6], 选取督脉经穴“百会”、“大椎”。以 30 号 1 寸毫针斜刺入“百会”10mm, 直刺入“大椎”5mm。将针柄分别连接至 G6805-Ⅱ型电针仪上, 选取连续波, 频率为 20Hz, 强度为 1—2mA。每次治疗 30min, 每天 1 次。

1.3.2 TMS 方法: 采用 Mag Lite 磁刺激仪(DANTEC Corp. Ltd, Denmark), 圆形刺激线圈直径为 12cm, 刺激频率为 0.5Hz, 强度为 70% 最大输出强度。刺激时固定大鼠头部, 线圈紧贴头皮, 与大鼠右侧大脑半球相切, 连续刺激 20 次为 1 组, 每日 2 组。

1.3.3 EA+TMS 方法: 于电针治疗结束后进行磁刺激, 方法及参数分别同电针组、rTMS 组。

以上治疗均在大鼠造模成功后当天即开始, 共治疗 28d。

1.3.4 模型组和正常组动物自然饲养, 不做特殊处理。

以上所有操作均在室温为 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 环境中进行。

1.4 Morris 水迷宫测试

本实验采用的水迷宫圆形水池直径 120cm, 高 60cm。圆柱形有机玻璃平台直径 10cm, 高 40cm, 水

面离平台约 1—2cm, 平台用黑色塑料袋覆盖扎紧后置于某一象限的中心位置。室温和水温均保持在 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 。水池内水以碳素墨水搅拌, 使整个背景为黑色, 与大鼠白色毛发形成反差。大鼠游泳图像经水面上方 1.5m 处的摄像机拍摄并连接于路径追踪系统(Ethovision; Noldus Information Technology, The Netherlands) 采集, 最后通过微机分析。

定位航行实验(place navigation): 从实验的第 23 天开始每天训练 4 次, 共训练 5d。每次实验将大鼠从不同象限 1/2 弧度处头面向池壁轻放入水中, 记录其寻找到平台的时间(逃避潜伏期, escape latency) 和游泳路径。如果大鼠在 60s 内未找到平台, 潜伏期记为 60s, 并由实验者将其牵引至平台上, 停留 30s, 再放回笼中。定位航行实验通过对训练大鼠游泳逃避潜伏期长短反映动物的学习能力。

空间探索实验(spatial probe): 实验第 28 天进行空间探索实验, 撤除平台, 任意选一个入水点将大鼠放入水中, 记录其在 60s 内跨越平台次数, 计算出平台象限游泳时间与总游泳时间的比值(tP/tT) 和平台象限游泳距离与总游泳距离的比值(dP/dT), 此实验可反映大鼠的空间记忆能力。

1.5 透射电镜观察

每组随机取 4 只大鼠深度麻醉后用生理盐水 200ml 快速左心室灌注冲洗, 再用 4% 多聚甲醛 500ml 先快后慢灌注固定, 恒定灌注时间 45—60min。灌注完毕立即断头取海马 CA3 区 $1\text{mm} \times 1\text{mm} \times 1\text{mm}$ 大小的脑组织块, 固定于 3% 戊二醛和 4% 多聚甲醛固定液中。行常规电镜包埋、醋酸铀和枸橼酸铅双染, 用超薄切片机切片。采用 Tecnai G2 12 型透射电镜(FEI Company, The Netherlands) 随机摄取突触图像。采用图像分析系统测量突触界面曲率、突触后致密物质(post-synaptic density, PSD) 厚度和突触间隙, 统计穿孔突触占所测定突触的百分比。其中 PSD 厚度参考 Guldner^[7]方法测量; 突触界面曲率的测量参数参照 Jones 等^[8]的方法进行; 突触间隙宽度用多点平均法测定。每组测定 32 个突触的电镜照片。

1.6 统计学分析

所有数据以均数 $\pm$ 标准差表示, 采用 SPSS10.0 统计软件对数据进行单因素方差分析(Student-Newman-Keuls 检验), $P < 0.05$ 表示差异具有显著性意义。

2 结果

2.1 Morris 水迷宫测试

模型组大鼠的逃避潜伏期为 $31.63 \pm 9.96s$, 与正常组比较明显延长; 在空间探索实验中, 60s 内跨越平台次数减少, tP/tT 和 dP/dT 下降, 均提示模型组大鼠存在一定的学习记忆功能障碍。通过电针、磁刺激和电针结合磁刺激治疗后, 大鼠的逃避潜伏期缩短; 空间探索实验中 60s 内跨越平台次数增加, tP/tT 和 dP/dT 上升, 与模型组比较差异有显著性意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 提示经过康复干预之后, 脑缺血大鼠的学习记忆功能有明显改善。3 个康复干预组间比较, 电针结合磁刺激组大鼠的逃避潜伏期显著低于电针组和磁刺激组, 在 60s 内跨越平台次数也显著多于电针组和磁刺激组, 而 3 个干预组之间的 tP/tT 和 dP/dT 比较无明显差异, 见表 1, 图 1—2 (见彩色插页)。

2.2 透射电镜观察

表 1 各组大鼠 Morris 水迷宫测试比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	逃避潜伏期 (s)	60s 内跨越平台次数	tP/tT	dP/dT
正常组	8	9.88 ± 2.53	3.50 ± 0.93	0.349 ± 0.044	0.351 ± 0.050
模型组	8	31.63 ± 9.96	1.13 ± 0.83	0.234 ± 0.051	0.235 ± 0.047
EA 组	8	19.00 ± 6.37^{①③}	2.00 ± 0.76^{①③}	0.297 ± 0.038^{①}	0.297 ± 0.044^{①}
rTMS 组	8	19.63 ± 6.43^{①③}	2.13 ± 0.83^{①③}	0.282 ± 0.041^{①}	0.289 ± 0.037^{①}
EA+rTMS 组	8	11.88 ± 3.14^{②}	3.00 ± 0.53^{②}	0.299 ± 0.045^{①}	0.291 ± 0.045^{①}

与模型组比较: ① $P < 0.05$, ② $P < 0.01$; 与电针结合磁刺激组比较: ③ $P < 0.05$

大鼠缺血侧海马 CA3 区突触图像具有典型的不对称界面, 突触小泡呈圆形, 突触后膜比突触前膜明显增厚。模型组突触多为平直型突触, 少数突触的前后膜轻度弯曲形成微凹型或微凸型, 突触小泡明显减少, 线粒体变性明显。电针组、磁刺激组和电针结合磁刺激组突触多表现为凹型或凸型突触, 突触小泡明显增多 (见图 3)。突触形态图像分析统计结果显示: 3 个康复干预组海马 CA3 区突触界面曲率、PSD 厚度和穿孔性突触百分率明显增加, 与模型组比较有显著性意义, 尤其是突触界面曲率和穿孔性突触比率差异有非常显著性意义。3 个康复干预组间比较, 电针结合磁刺激组大鼠的突触界面曲率显著高于其他两个治疗组, 而各组间突触间隙宽度比较无显著性差异。见表 2。

表 2 各组大鼠缺血侧海马 CA3 区突触结构参数比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	突触间隙宽度 (nm)	PSD 厚度 (nm)	突触界面曲率	穿孔性突触比率 (%)
正常组	32	19.35 ± 2.30	63.31 ± 4.94	1.026 ± 0.037	8.88 ± 1.81
模型组	32	20.92 ± 2.31	50.19 ± 6.09	1.023 ± 0.032	10.13 ± 2.10
EA 组	32	19.67 ± 2.03	56.66 ± 5.53^{①}	1.033 ± 0.041^{②③}	21.25 ± 3.77^{②}
rTMS 组	32	19.97 ± 1.64	56.55 ± 5.13^{①}	1.036 ± 0.042^{②③}	20.13 ± 3.48^{②}
EA+rTMS 组	32	19.55 ± 1.32	59.24 ± 4.70^{①}	1.041 ± 0.042^{②}	20.63 ± 3.77^{②}

与模型组比较: ① $P < 0.05$, ② $P < 0.01$; 与电针结合磁刺激组比较: ③ $P < 0.05$



图 3 电镜下突触小泡和凹型或凸型突触的典型特征

(Scale bar=200nm)

a 为模型组, b 为电针组, c 为电针结合磁刺激组。b 图中白色箭头为突触小泡, c 图中黑色箭头为 PSD。

3 讨论

近年来, 有研究报道于卒中急性期给予大脑经颅磁刺激可以改善患者的治疗结局^[29]。rTMS 技术是近年来新开展的一项无痛无创的检测和治疗新技术, 它利用一定强度的时变磁场在脑内诱发电场并产生感应电流, 刺激可兴奋组织并影响脑内诸多代谢过程及电活动。rTMS 可以在皮质产生可传导性的感生电流, 从而对刺激位点或有突触联系的远处皮质兴奋性产生抑制或易化。作为一种传统医学与现代技术相结合的治疗方法, EA 通过穴位的特异性作用以及经络传导促进脑梗死神经功能的改善。EA 和 rTMS 均可作为卒中后神经功能康复的一种方法, 而且我们前期的研究还证实了 EA 结合 rTMS 可明显

影响梗死灶周围血管内皮生长因子、碱性纤维细胞生长因子和血管紧张素等的表达^[10-11]。但是综合运用这两种干预手段观察脑缺血大鼠突触结构和学习记忆功能的研究还未见报道。

中枢神经系统突触功能和结构的可塑性变化是神经康复的基础。突触结构和突触数量的变化都会影响脑传递的功能。实验证明脑缺血大鼠随缺血时间的延长, 会出现突触结构异常, 突触密度下降^[12]。PSD 是突触后膜内侧胞质面的一种均质性的致密物, 含有多种蛋白和酶, 易受影响而发生数量与构象变化, 它的变化反映突触后膜上受体与离子通道的变化。PSD 厚度是中枢突触结构可塑性的重要参数, 研究表明, PSD 厚度与学习记忆的训练与学习记忆

的保持能力密切相关。在缺血状态下, PSD 厚度是减少的。PSD 增厚和增长可能是突触功效增强的物质基础。突触界面曲率是突触结构可塑性的一个重要参数, 脑缺血发生以后, 突触界面曲率减小, 从而减少了神经元接触面, 降低了神经信息。研究发现弯曲型突触比平直型突触内有更多的线粒体, 也即弯曲型突触处于更活跃的状态^[13]。突触穿孔现象可能是突触分裂的中间步骤, 而且突触穿孔后 PSD 变为节段性, 出现多个活性区, 使得不同受体簇的不同活性区传递功能大大加强, 进一步增强了突触传递功效。近年来的研究结果证实: 海马脑区与认知功能密切相关, 海马损伤可以导致学习与记忆功能障碍^[14-16], 所以, 我们的研究选择观察大鼠海马脑区突触超微结构的变化。我们的研究发现: 分别运用电针、磁刺激或两者结合使用可明显影响脑缺血大鼠海马 CA3 区突触的超微结构, 增加 PSD 的厚度, 提高突触界面曲率和穿孔性突触比率。上述超微结构的改变有利于突触结构和功能的重建, 从而可能改善大鼠的学习记忆功能。

目前 Morris 水迷宫已广泛应用于记忆行为学的检测^[17-18]。Morris 水迷宫分两部分, 一是定位航行实验, 通过记录大鼠每次的逃避潜伏期反映大鼠对平台空间位置的记忆来评价大鼠的空间学习记忆能力。逃避潜伏期越短则说明大鼠对平台的空间位置记忆越好。二是空间探索实验, 撤除水迷宫中平台后观察各组大鼠在一定时间内在水迷宫中运动轨迹。通过分析其在水迷宫中的运动方式以及 tP/tT 值和 dP/dT 值来反映大鼠前期游泳训练对平台的空间记忆能力。tP/tT 值和 dP/dT 值越高, 穿越平台的次数越多, 说明大鼠对平台的空间位置记忆保存越好, 也正反映大鼠的学习记忆能力越强^[19]。因此, 可以依据这些指标参数客观地评价模型大鼠的空间学习记忆能力强弱。我们在实验中发现: 康复治疗可以缩短脑缺血大鼠的逃避潜伏期, 增加穿越平台的次数和在平台象限游泳的时间和距离, 其中尤其以电针结合磁刺激组明显, 提示康复治疗可显著改善脑缺血大鼠的学习记忆功能。

综上所述, EA 结合 rTMS 可以明显改善脑缺血大鼠的学习和记忆功能, 而这种功能的改善很可能与 PSD 厚度的增加, 突触界面曲率和穿孔性突触比率等的提高等突触超微结构的改变有关, 因此, 我们推测: EA 结合 rTMS 促进了海马突触结构和功能的可塑性变化, 影响脑传递的功能, 从而改善脑缺血大鼠的学习记忆功能。

参考文献

- [1] Lo YL, Cui SL, Fook Chong S. The effect of acupuncture on motor cortex excitability and plasticity [J]. *Neuroscience Letter*, 2005, 384(1-2): 145—149.
- [2] Khedr EM, Ahmed MA, Fathy N, et al. Therapeutic trial of repetitive transcranial magnetic stimulation after acute ischemic stroke [J]. *Neurology*, 2005, 65(3): 466—468.
- [3] 彭力, 黄晓琳, 韩肖华, 等. 电针结合经颅磁刺激对脑缺血大鼠神经干细胞增殖和电跳台的影响 [J]. *中国中医急症*, 2008, 17(2): 206—208.
- [4] 廖维靖, 刘淑红, 范明, 等. 线栓阻断大鼠脑中动脉制作缺血性脑损伤模型的改良 [J]. *中华物理医学与康复杂志*, 2002, 24(6): 349—352.
- [5] Zea Longa E, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84—91.
- [6] 李忠仁. 实验针灸学 [M]. 第 1 版. 北京: 中国中医药出版社, 2003. 327—329.
- [7] Guldner FH, Ingham CA. Increase in postsynaptic density material in optic target neurons of the rat suprachiasmatic nucleus after bilateral enucleation [J]. *Neurosci Lett*, 1980, 17(1-2): 27—31.
- [8] Jones DG. Synaptic plasticity and perforated synapses: their relevance for an understanding of abnormal synaptic organization [J]. *APMIS Suppl*, 1993, 40: 25—34.
- [9] Mansur CG, Fregni F, Boggio PS, et al. A sham stimulation-controlled trial of rTMS of the unaffected hemisphere in stroke patients [J]. *Neurology*, 2005, 64(10): 1802—1804.
- [10] 黄晓琳, 韩肖华. 电针结合经颅磁刺激对脑缺血大鼠 VEGF164mRNA 和 CD31 表达的影响 [J]. *中华物理医学与康复杂志*, 2006, 28(1): 10—13.
- [11] 韩肖华, 黄晓琳, 郭铁成, 等. 电针对脑缺血大鼠碱性成纤维细胞生长因子和血管生成素及其受体表达的影响 [J]. *中华物理医学与康复杂志*, 2006, 28(9): 581—583.
- [12] 王慧鹃, 李陈莉, 赵秀丽, 等. 大鼠脑缺血后突触超微结构的变化 [J]. *解剖学杂志*, 2003, 26(6): 587—590.
- [13] Dyson SE, Jones DG. Quantitation of terminal parameters and their inter-relationships in maturing central synapses: A perspective for experimental studies [J]. *Brain Res*, 1980, 183(1): 43—59.
- [14] Milner B, Squire LR, Kandel ER. Cognitive neuroscience and the study of memory [J]. *Neuron*, 1998, 20(3): 445—468.
- [15] Wood ER, Dudchenko PA, Eichenbaum H. The global record of memory in hippocampal neuronal activity [J]. *Nature*, 1999, 397(6720): 613—616.
- [16] Schendan HE, Searl MM, Melrose RJ, et al. An FMRI study of the role of the medial temporal lobe in implicit and explicit sequence learning [J]. *Neuron*, 2003, 37(6): 1013—1025.
- [17] Yun YJ, Lee B, Hahm DH, et al. Neuroprotective effect of palmul-chongmyeong-tang on ischemia-induced learning and memory deficits in the rat [J]. *Biol Pharm Bull*, 2007, 30(2): 337—342.
- [18] 孙玉华, 贺维亚. 金纳多对血管性痴呆大鼠认知功能及生长抑素表达的影响 [J]. *中国神经免疫学和神经病学杂志*, 2008, 15(1): 35—38.
- [19] 尹军祥, 田金洲, 程龙, 等. MCAO 模型大鼠学习记忆特征 [J]. *中国行为医学科学*, 2006, 15(3): 197—199.