

迷迭香吸嗅对血管性痴呆大鼠学习记忆及海马内5-羟色胺含量的影响

窦云龙¹ 高晓平^{1,3} 李光武²

血管性痴呆(vascular dementia, VD)是脑血管疾病导致的认知功能障碍临床综合征,我国VD占痴呆的比例较高,患病率仅次于阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD),是导致痴呆的第2位病因^[1]。患者的认知功能呈进行性下降,伴记忆功能、定向力、注意力、语言功能、视空间功能等认知域的缺损,影响日常生活活动。但VD也是迄今为止唯一可防治的痴呆,如果早期治疗具有可逆性。由于缺乏理想的治疗药物,芳香疗法已被试用于VD的治疗,研究表明吸入特定的芳香物质可改善痴呆患者的认知功能^[2-3]。

迷迭香属于芳香开窍类药物,有激励情绪、提神醒脑、强化记忆等功效。多项研究表明迷迭香可提高受试者的认知功能。如Moss M等^[4]通过认知药物研究(cognitive drug research, CDR)计算机评定系统对迷迭香刺激嗅觉在认知方面的影响进行了评估,发现迷迭香会使受试者变得更加机敏,并提高受试者的长期记忆力。基于此研究背景,笔者进行了迷迭香吸嗅治疗VD的动物实验。本实验选择血管性痴呆大鼠为研究对象,探讨迷迭香对VD大鼠学习记忆能力和脑内5-羟色胺(5-HT)的影响作用,以期迷迭香吸嗅治疗VD提供新的科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康雄性SD大鼠,体重(200±20)g,由安徽医科大学实验动物中心提供。经水迷宫训练3d,组间逃避潜伏期无显著性差异,实验条件下自然饮食。

1.2 主要试剂与器材

迷迭香(安徽奥德瑞生物科技公司提供,批号:1600881),奥拉西坦针(广东世信药业有限公司,5ml:1g/支),兔抗5-HT抗体试剂盒(北京博士德生物工程有限公司),SABC试剂盒、浓缩型DAB试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司)。分析天平(上海精科,JA2003),Morris水迷宫(中国医学科学院药物研究所生产),生物组织石蜡包埋机(湖北亚光医用电子仪器厂),Leica石蜡切片机(型号

RM2135,德国),倒置相差显微镜(德国OLYMPUS BX60)。

1.3 动物模型制备与分组

采用不同时点分别结扎双侧颈总动脉法建立大鼠血管性痴呆模型^[5]。造模成功的标志是术后动物出现同侧Horner征,术后4周水迷宫测试大鼠的逃避潜伏期较空白组明显延长。将造模成功的大鼠随机分成迷迭香组、奥拉西坦组和模型组,另设正常组和假手术组对照,每组8只。正常组不作手术处理,假手术组分离出2侧颈总动脉但不结扎。

1.4 给药方式

①迷迭香吸嗅组:在相对较密闭的试验盒内(60cm×60cm×20cm),将迷迭香溶剂均匀洒在盒底部,上面铺上一层薄筛盘。给药时先让试验盒内的药物充分挥发弥漫在整个试验盒内,之后将实验动物放置薄筛盘上,将试验盒盖盖上。药物作用30min后,将实验动物取出。②奥拉西坦组:腹腔注射给药,100mg/(kg·d)。③模型组、正常组和假手术组:使用蒸馏水替代奥拉西坦,其他同奥拉西坦组。

1.5 神经行为学观察

Morris水迷宫实验:Morris水迷宫主要由一个直径120cm不锈钢圆柱形水池和一个可移动隐匿玻璃平台(直径为9cm,高29cm)组成,与计算机相连的摄像监视器位于迷宫正上方。水池被等分为4个象限,在目标象限(设为第3象限)中心放置平台,没入水下2.0—3.0cm;实验时水温控制在20—22℃,水中加入墨汁染成黑色以避免白色大鼠发现水下平台且形成鲜明对比。

1.5.1 定位航行试验:将受试大鼠依次从Morris水迷宫的4个象限的固定位置面向池壁投入水池中。记录2min内寻找平台的时间(逃避潜伏期)。如果大鼠在2min内找到平台,记录其实际逃避潜伏期;如果大鼠在2min内未找到平台,由测试者将其引上平台并停留10s,逃避潜伏期记录为2min。历时6d,1次/d。

1.5.2 空间探索试验:定位航行试验结束后撤出平台,然后任选一相同入水点将大鼠放入水中,测其2min内穿越原平台所在位置的次数。

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2013.07.016

1 安徽医科大学第一附属医院康复医学科,安徽合肥,230022; 2 安徽医科大学神经生物学研究所; 3 通讯作者
作者简介:窦云龙,男,在读研究生; 收稿日期:2012-08-17

1.6 免疫组化检测

常规灌注固定各组大鼠,断头取脑,选择前皮质及海马等层面做连续冠状冰冻切片,片厚 15 μ m。用预涂铬矾明胶的载玻片直接贴片,58℃温箱烤片,48h后收储备用。再进行 HE 染色和 SABC 法染色(5-HT 一抗抗体稀释度为 1:100),经二甲苯透明,中性树胶封片,OLYMPUS 显微镜观察并摄片。

1.7 统计学分析

采用 SPSS13.0 软件,各组均数间比较采用单因素方差分析、各组间比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 水迷宫实验结果

Morris 水迷宫实验结果见表 1,在定位航行实验中,模型组的逃避潜伏期最长,明显长于正常组($P < 0.05$);而迷迭香嗅组的逃避潜伏期短于模型组,差异有显著性意义($P < 0.05$);在空间探索实验中,模型组的动物存在明显记忆障碍,每分钟穿越隐匿平台位置平均次数最少,并且常有朝向错误,与正常组比较差异有显著性意义($P < 0.05$);迷迭香嗅

组的平均探索次数明显多于模型组,两者比较差异有显著性意义($P < 0.05$)。迷迭香组和奥拉西坦组比较,逃避潜伏期和穿台次数均无显著性意义($P > 0.05$)。

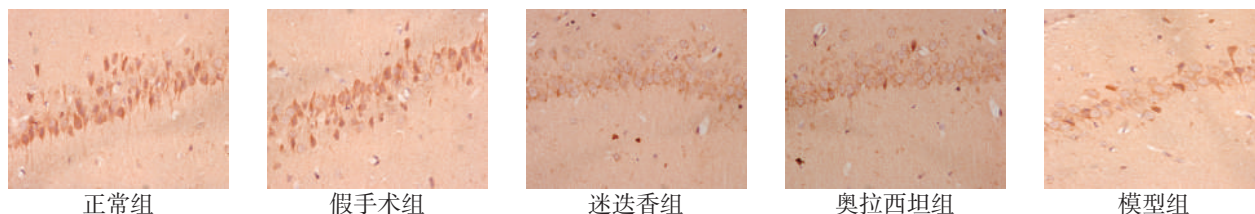
表 1 水迷宫实验结果 ($\bar{x} \pm s$)			
组别	动物数(只)	逃避潜伏期(s)	穿台次数(次)
模型组	8	32.61 $\pm$ 5.82	4.88 $\pm$ 2.9
迷迭香嗅组	8	24.36 $\pm$ 3.35	7.63 $\pm$ 2.88
奥拉西坦组	8	20.67 $\pm$ 5.02	8.8 $\pm$ 2.49
空白组	8	14.02 $\pm$ 3.23	12.25 $\pm$ 3.62
假手术组	8	12.67 $\pm$ 2.68	11.63 $\pm$ 3.58

2.2 免疫组化结果

5-HT 的免疫反应阳性产物位于神经元胞浆中,阳性反应呈棕黄色者颗粒,阴性对照切片未见阳性表达。在大脑皮质和海马区,模型组的 5-HT 阳性神经元较正常组和假手术组减少且染色浅,排列稀疏;与模型组比较,迷迭香嗅组和奥拉西坦组的阳性细胞数量增多明显,细胞着色加深,排列较紧凑。见图 1。

图 1 各组海马 5-HT 免疫组化结果

(SABC 法染色, $\times 400$)



3 讨论

芳香疗法中的植物精油嗅吸是通过精油刺激嗅觉来达到强化生理和心理功能的目的;疾病在一定程度上是身心失衡的结果,而芳香疗法可以恢复身心的平衡。植物精油是从植物中提取的分子量很小的植物活性分子混合物,具有高生物活性,高浓缩和高挥发性。其中高挥发性使其易与嗅觉感受器神经元进行特异性受体结合,并产生神经电信号,该信号藉由嗅觉通路传导至脑的嗅觉中枢及广泛区域,其中与控制学习记忆的海马联系可参与调节学习记忆能力。

迷迭香为常见的芳香开窍类物质,刺激嗅觉可提高正常受试者的学习记忆能力^[6],所以我们推测迷迭香也可用于脑血管疾病学习记忆障碍的治疗。Morris 水迷宫包括定位航行试验和空间探索试验是检测大鼠学习记忆功能的经典行为学实验。本研究通过建立 VD 大鼠模型,使用迷迭香精油挥发物刺激 VD 大鼠嗅觉发现迷迭香嗅组的水迷宫实验结果明显优于模型组,而和奥拉西坦组的结果无明显差异,说明迷迭香嗅对血管性痴呆大鼠的学习记忆障碍有治疗作用。

中枢神经递质与学习记忆密切联系的主要是乙酰胆碱,

5-羟色胺, γ -氨基丁酸和谷氨酸^[7]。5-HT 是脑内一种重要单胺类神经递质,胞体主要位于脑干的中缝核群,它发出的纤维广泛投射于脑的各部。海马也有 5-HT 能神经元存在,通过 5-HT 的受体中介调控靶细胞的兴奋或者抑制,进而调节学习记忆功能^[8-9]。已有研究发现芳香物质经嗅球通路改善大鼠学习记忆的机制,与皮质和海马内的乙酰胆碱和谷氨酸含量改变有关^[10]。但尚未搜到文献显示芳香物质是否会通过同样的途径改善脑中的 5-HT 含量。

本实验的行为学研究表明迷迭香对血管性痴呆大鼠学习记忆功能有改善作用;进一步神经形态学研究发现迷迭香改善 VD 大鼠学习记忆与海马 5-HT 的改变有关。结合已有的研究成果,我们认为迷迭香嗅可通过嗅觉通路直接入脑,提高海马内 5-HT 的含量和活性,进而改善血管性痴呆的学习记忆功能。

参考文献

- [1] 王维治,罗祖明,丁新生,等.神经病学[M].北京:人民卫生出版社,2006. 270.

[2] Jimbo D, Kimura Y, Taniguchi M, et al. Effect of aromatherapy on patients with Alzheimer's disease[J]. Psychogeriatrics, 2009, 9: 173—179.

[3] Akhondzadeh S, Noroozian M, Mohammadi M,et al. Melissa officinalis extract in the treatment of patients with mild to moderate Alzheimer's disease: a double blind, randomized, placebo controlled trial[J]. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2003, 74:863—866.

[4] Moss M, Hewitt S, Moss L, et al. Modulation of cognitive performance and mood by aromas of peppermint and ylang-ylang[J]. Int J Neurosci,2008, 118(1):59—77.

[5] 黄新武,李华,秦大莲,等.不同时间点分别结扎左、右颈总动脉建立大鼠血管性痴呆模型[J]. 中国老年学杂志,2010,30(14):2006—2007.

[6] Degel J, Piper D, Koster EP. Implicit learning and implicit memory for odours: The influence of odour identification and retention time [J]. Chemical Senses,2001, 26, 267—280.

[7] 文春晓,闫玉仙.神经递质在学习记忆中的作用[J].武警医学院学报, 2009,18(1)65—67.

[8] Perez-Garcia G, Meneses A. Memory time-course: mRNA 5-HT 1A and 5-HT 7 receptors [J]. Behav Brain Res, 2009, 202: 102—113.

[9] Sarkisyan G, Hedlund PB. The 5-HT 7 receptor is involved in allocentric spatial memory information processing [J]. Behav Brain Res, 2009, 202: 26—31.

[10] 杨天鹏,唐敏,刘巧琼,等.丁香酚通过嗅觉通路改善昆明鼠学习记忆的机制[J].中国康复医学杂志,2007,22(6):487—489,508.

·短篇论著·

腓神经松动术加丘墟穴按压对改善偏瘫踝关节背屈功能的疗效观察

刘 鹏¹

正常的行走功能需要躯干、髋、膝、踝功能协调一致,而偏瘫恢复一般遵循从近端到远端的规律,踝关节恢复一般较差,许多患者形成足内翻下垂,不得不佩戴踝足矫形器,而踝关节运动功能的改善对患者站立平衡及行走功能将产生积极的影响,本研究采用腓神经松动术加中医手法丘墟穴按压结合治疗以改善偏瘫踝关节背屈功能。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选2007年5月—2012年10月来我科治疗的脑卒中偏瘫患者80例。纳入标准:①符合1995年全国第四届脑血管病

的诊断标准^[1],经颅脑CT或MRI确诊为初次发病者;②格拉斯哥昏迷量表评分>8分,神志清楚;③生命体征稳定;④病程<3个月;⑤均存在下肢运动功能障碍及严重踝关节运动功能障碍;⑥患踝关节被动关节活动度正常。排除标准:①有明显的认知障碍不能配合康复训练者;②心肺功能不全、有严重并发症者;③格拉斯哥昏迷量表评分<8分。④患者既往有患踝骨关节病及患踝骨折史者。将80例患者随机分为治疗组和对照组,每组40例。两组患者均签署康复治疗《知情同意书》。两组患者一般资料比较差异无显著性意义($P>0.05$),具有可比性,见表1。

1.2 治疗方法

表1 两组患者一般资料比较

组别	例数	性别(例)		病变性质(例)		偏瘫侧别(例)		年龄(岁)	病程(d)
		男	女	脑梗死	脑出血	左	右		
治疗组	40	26	14	32	8	24	16	64.9±6.78	57.9±7.28
对照组	40	24	16	30	10	22	18	65.3±7.23	58.3±7.63

两组偏瘫患者均采用Bobath技术康复,每次45min,每日2次^[3]。对照组不行腓神经松动术加丘墟穴按压治疗。

治疗组患者接受腓神经松动术加丘墟穴按压治疗,具体操作为:用手指触摸腓骨头下面的腓神经,然后沿着其向足

延伸的路径做周围组织的两侧松动,连续做横向运动,当位于足侧面的腓神经末梢处呈环状松动,直接松动神经之后,患者能够主动伸脚趾,足也能有一点背屈,此阶段约2min^[2]。足稍有一点背屈时大拇指按压丘墟穴至踝关节明显背屈出

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2013.07.017

1 北京朝阳区八里庄第二社区卫生服务中心康复医学科,100025

作者简介:刘鹏,男,主治医师;收稿日期:2012-10-28