·基础研究·

电针对血管性痴呆模型大鼠记忆能力的影响*

梁慧英[1,2] 林阳阳[1] 燕铁斌[1,3] 廖 琳[2] 董军涛[1]

摘要

目的:观察电针(EA)对血管性痴呆(VD)大鼠记忆能力的影响。

方法:将Wistar大鼠随机分为假手术组、模型组和电针组,每组8只。假手术组暴露双侧颈总动脉,但不结扎;模型组和电针组采用双侧颈总动脉永久性结扎法建立VD大鼠模型。三组大鼠均采用柔软型大鼠固定器固定。电针组选取百会、足三里穴,接通电流,1次/d,每次留针30min,连续治疗14d;模型组与假手术组只给予固定。治疗结束后采用新事物识别实验评估大鼠的记忆能力。

结果:与假手术组比较,模型组大鼠对新事物的探索指数(RI)、识别指数(DI)均降低,差异有显著性意义($P<0.05$)。与模型组比较,电针组大鼠对新事物的RI、DI均升高,差异有显著性意义($P<0.05$)。

结论:电针可有效改善VD模型大鼠记忆能力。

关键词 血管性痴呆;新事物识别实验;电针;记忆

中图分类号:R749.1, R245 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2015)-06-0527-05

A study on the effect of electroacupuncture on the memory of rats with vascular dementia/LIANG Huiying, LIN Yangyang, YAN Tiebin, et al.//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2015, 30(6): 527—531

Abstract

Objective: To observe effects of electroacupuncture (EA) on the memory of rats with vascular dementia (VD).

Method: Twenty-four Wistar rats were randomly divided into a sham-operation group, a model group and an EA group (8 in each group). The VD rat model were performed with permanent bilateral common carotid artery occlusion in the model group and the EA group, while no occlusion of bilateral common carotid was operated in the sham-operation group. All the rats were kept in immobilization apparatus while receiving treatments. EA was applied onto "Baihui" (DU20) and "Zusanli" (ST36) acupoints in EA group for 30 min, once a day for 14 days. The sham-operation group and model group were only immobilized. After 14 days treatment, memory of the rats were evaluated by the novel object recognition test.

Result: Compared with sham-operation group, recognition index (RI) and discrimination index (DI) of model group decreased with significant difference ($P<0.05$). Compared with model group, the RI and DI of EA group increased with significant difference ($P<0.05$).

Conclusion: EA was helpful for improving the memory of rats with VD.

Author's address Department of Rehabilitation Medicine, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou, 510120

Key word vascular dementia; novel object recognition test; electroacupuncture; memory

血管性痴呆(vascular dementia, VD)是由脑缺血引起的学习、记忆障碍综合征,是一种慢性进行性疾病。我国VD的发病率达1.1%—3.0%[1],不仅给患者带来巨大的痛苦,同时也给家庭和社会带来沉

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2015.06.002

*基金项目:国家自然科学基金资助项目(81171863)

1 中山大学孙逸仙纪念医院康复医学科,广州,510120; 2 中山市人民医院康复医学科; 3 通讯作者

作者简介:梁慧英,女,主治医师; 收稿日期:2014-08-25

重的经济负担。Gorelick[2]研究认为VD是可以防治的痴呆症，如早期治疗具有可逆性。临床工作及研究显示电针治疗可有效增强VD患者的学习和记忆能力[3—4]。通过采用Morris水迷宫[5—8]、被动躲避试验[6]、主动躲避试验[6]、跳台试验[9—10]等行为学方法，显示电针可有效改善VD大鼠的学习和记忆能力。本研究采用新事物识别试验观察电针对VD大鼠记忆能力的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

选用广东省医学实验动物中心提供的健康Wistar大鼠24只，雄性，体重（240±20）g，SPF级，动物质量合格证明编号：44008500004013，饲养于中山大学实验动物中心屏障环境中，动物实验设施使用证明编号：0042618。动物经适应性喂养1周后，按随机数字表法分为3组，即假手术组、模型组、电针组，每组8只。

1.2 主要仪器

G6805电针仪（上海华谊仪器制造厂生产），柔软型大鼠固定器（原上草医疗科技有限公司）。

1.3 血管性痴呆大鼠模型的制作

模型组、电针组采用双侧颈总动脉永久性结扎法造模[11]。大鼠术前12h禁食，不禁水，用10%水合氯醛（0.35g/kg体重）腹腔注射麻醉大鼠，仰卧位固定于手术台上，碘酒消毒，取颈前正中切口，分离暴露左、右两侧颈总动脉，以“0”号线结扎双侧颈总动脉的近端及远端，从中间剪断，阻断双侧颈总动脉的血流。最后逐层缝合伤口。术后大鼠在屏障环境中继续饲养、观察。假手术组麻醉及手术过程同上，但不阻断颈总动脉。

1.4 治疗方法

造模完成后第7天开始，将大鼠放入柔软型大鼠固定器，电针组参照《大鼠穴位图谱的研制》[12]中穴位定位方法选取百会穴及足三里穴进针，选用28号1寸华佗牌无菌毫针，于头部百会穴（顶骨正中）向前斜刺2mm，足三里穴（膝关节后外侧，在腓骨小头下约5mm处）直刺7mm，连接电针治疗仪，选用2Hz连续波，强度以大鼠能耐受为度（大约为2mA）。1次/d，每次30min，连续治疗14d。假手术组与模型组均同时以柔软型大鼠固定器固定30min，1次/d，连续14d。

1.5 行为学检测

1.5.1 敞箱及供识别物体[13]：新事物识别实验在一个敞箱内进行。敞箱由黑色不反光的有机材料制作（长、宽、高为80cm×80cm×80cm）。敞箱放置在一个固定日光灯光源下方，实验过程中保持位置及光源不变；减少室内各种声源，实验过程保持安静。供动物识别的物体由塑料、玻璃、金属制成，其实验时重量必须保证不被大鼠推动；识别的物体共分为两组记为A、B，每组两个（A1、A2，B1、B2），组间形态相似，有颜色及大小差别；组内必须保持形态、其上图案无差异；这些物体必须保证大鼠在生活环境中从没有接触及见过。敞箱正上方安放摄像机记录动物在敞箱内的运动。

1.5.2 行为学测试[13]：在正式实验的前两天，大鼠1次/d在固定时间放入空敞箱内适应，自由活动，每次10min；最后一次放入空敞箱24h后进行实验。实验分为两个阶段，训练阶段（familiar phase）及测试阶段（test phase）。训练阶段开始前在敞箱一边的两个角的固定位置（分别距边缘10cm）各放置一个供动物识别的物体，记A1和A2，动物分别由正对识别物体的面，背对识别物体放入敞箱内，开始计时共计5min，时间到后将动物提出放入原笼饲养等待测试阶段，每只大鼠实验结束后清洁敞箱内动物粪便、尿，用5%乙酸擦拭识别物体避免气味对下只动物产生影响；测试阶段开始时将一个识别物体A1或A2换成另一个识别物体B1或B2，动物由正对识别物体的面，背对着识别物体放入敞箱内，开始计时共计5min。为保证识别物体A、B及测试阶段左右侧对大鼠探索行为的影响，在每组实验过程中，随机更换识别物体A或B作为训练阶段的物体，同时在测试阶段随机更换A或B的位置。训练阶段和测试阶段的时间间隔为1h。

大鼠探索识别物体行为的判断标准：大鼠直接用鼻子或胡须触碰识别物体，或鼻子或胡须与识别物体的间隔≤2cm为探索行为；动物爬在识别物体上向四周空间探索或在识别物体附近转身、蹲，均不作为探索行为。实验结束后由其他实验人员根据录像分析大鼠探索物体的行为，使用秒表分别记录探

索左右物体的时间。

1.6 数据记录

在适应阶段大鼠探索物体A1、A2的时间记录为TA1、TA2,测试阶段大鼠探索物体A、B的时间记录为TF、TN。分析大鼠对新事物的探索指数(recognition index, RI)及识别指数(discrimination index, DI)。

1.7 统计学分析

采用SPSS 16.0统计软件包进行统计学处理,所有数据均用均数±标准差表示。各组间比较采用单因素方差分析,每两组间比较用LSD检验。

2 结果

2.1 训练阶段各组大鼠对左右物体的探索指数

训练阶段各组大鼠依次放入敞箱中,记录大鼠对两个相同形态、重量、朝向的物体A1、A2,分别记录A1、A2的探寻时间,比较各组大鼠对左右物体的探索指数[A1或A2/(A1+A2)]。比较各组大鼠对左右物体的探索指数[RI=TA1或TA2/(TA1+TA2)]。结果显示熟悉阶段假手术组大鼠对左右物体的探索指数(0.482±0.024 *vs* 0.518±0.027)差异无显著性意义,模型组的两个探索指数(0.506±0.031 *vs* 0.494±0.023)差异无显著性意义,电针组的探索指数(0.498±0.029 *vs* 0.502±0.033)差异无显著性意义(P>0.05)。提示实验过程中各组大鼠没有明显的左侧或右侧偏向性(图1)。

2.2 测试阶段各组大鼠对新物体的探索指数RI

测试阶段各组大鼠对新出现的物体探索时间TN与总探索时间(TF+TN)的比值为探索指数(TN/(TF+TN))。研究结果显示模型组对新物体的探索指数显著低于假手术组(0.522±0.089 *vs* 0.785±0.106),差异有显著性意义(P<0.05)。电针组对新物体的探索指数显著高于模型组大鼠(0.667±0.097 *vs* 0.522±0.089),差异有显著性意义(P<0.05),见图2。

2.3 测试阶段各组大鼠的识别指数DI

测试阶段各组大鼠对新旧两个物体的探索时间差(TN-TF)与总探索时间(TN+TF)的比值为识别指数(DI=(TN-TF)/(TN+TF))。研究结果显示模型组的DI值显著低于假手术组的DI值(0.064±0.027 *vs* 0.593±0.118),电针组DI值高于模型组DI值(0.478±0.096 *vs* 0.064±0.027),差异有显著性意义(P<0.05),见图2。

3 讨论

虽然目前常采用Morris水迷宫、放射状迷宫、T-迷宫、Y-迷宫、Barnes迷宫、跳台试验等行为学方法研究动物的空间学习和记忆能力,但都存在不同程度的强迫性行为,有可能产生应激反应,对结果形成干扰。本研究所采用的新事物识别实验(novel object recognition test, NORT),没有强迫性或诱导性刺激,完全依赖于大鼠自身对新事物的探索天性[14],因此能较好地反映大鼠的记忆能力。

Berlyne等[15]报道大鼠探寻新出现的事物所花费的时间较熟悉的事物明显增多,提示大鼠对熟悉的事物产生记忆。Ennaceur等[16]据此设计了"新事物识别实验",首先将大鼠接触物体A,间隔一定的时间后再次放入物体A和一个不熟悉的物体B,大鼠主要花费大量的时间探寻先前没有见过的物体B,而对于熟悉的物体A较少探寻;通过比较物体B的探寻时间在整个探寻时间的比值(探索指数),用以判断动物的记忆能力,如果大鼠对两个物体的探

图1 训练阶段各组大鼠对左右两物体的探索指数

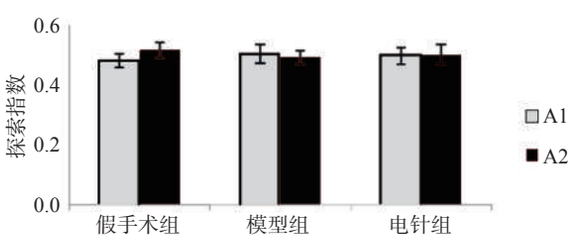
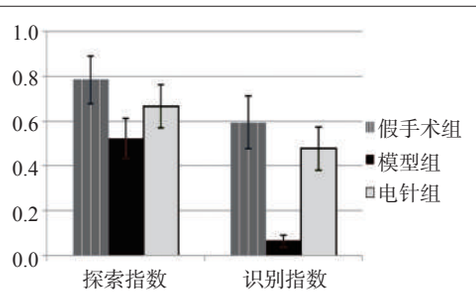


图2 测试阶段各组大鼠对新物体的探索指数及识别指数



寻指数无显著差异，表明大鼠的记忆能力减弱。

新事物识别实验包括三个阶段：适应阶段、训练阶段和测试阶段。前面简述的方法即是NORT的基本步骤，然而根据不同的实验目的，不同研究都对NORT的步骤作相应的调整。有研究设计了3个探索物体，如Sarkisyan等[17]训练阶段和测试阶段均放置3个探索物体，而在测试阶段其中一个物体挪动至新的空间位置，Benice等[18]则在测试阶段将其中一个物体更换为新物体。Hale等[19]甚至设计了4个探索物体的NORT。有的研究适应阶段仅1d，分别持续3min、5min、10min，也有的是2—5d，分别持续5min、10min、30min等；训练阶段及测试阶段的天数及持续时间也是各有不同。每一个阶段之间间隔的时间有10s、5min、10min、1h、24h等[13]。有文献报告大鼠对物体的探索大多集中在接触物体最初的两分钟[20]。本研究拟研究电针对大鼠短期记忆的影响，最终选择探索相同空间位置下的两个物体，训练阶段及测试阶段各持续5min，间隔1h。

NORT的评价指标有多个。Ennaceur等[16]以测试过程中大鼠对新事物的探索时间（T_N）与对熟悉事物的探索时间（T_F）差（D1=T_N-T_F）作为评价指标。有学者[16,21—23]用识别指数评估大鼠的记忆能力，DI结果介于+1和-1之间，阳性结果表明大鼠探索新事物所花费的时间多于熟悉的事物，而负数则表明大鼠探索熟悉的事物所费的时间更多。Broadbent等[24]、Botton等[25]、Gaskin等[26]采用探索新事物所花费的时间与总探索时间的比值作为评价指标。Wang等[27]以偏好指数（preference index, PI）作为评价认知功能的指标，大鼠对A事物T_A或B事物T_B的探索时间或对新事物TN的探索时间，与适应阶段总探索时间或测试阶段总探索时间的比值，即T_A或T_B/（T_A+T_B）×100%、T_B或T_N/（T_B+T_N）×100%，PI > 50%提示对新事物的偏好，PI < 50%提示对熟悉事物的偏好，PI=50%为无明显偏好[28]。本研究选用了RI以及DI作为评价大鼠记忆及工作能力的指标。结果显示，与假手术组比较，模型组大鼠RI值、DI值均降低，表明新事物识别实验能反映双侧颈总动脉结扎致痴呆模型大鼠的认知能力。电针组大鼠与模型组大鼠比较，电针组大鼠RI值、DI值都明显升高，表明电针能有效地提高痴呆模型大鼠的记忆及工作能力，能改善海马损伤所致的认知障碍。

参考文献

[1] Chen LP, Wang FW, Zuo F, et al. Clinical research on comprehensive treatment of senile vascular dementia[J]. J Tradit Chin Med, 2011, 31(3):178—181.

[2] Gorelick PB. Status of risk factors for dementia associated with stroke[J]. Stroke, 1997, 28(2):459—463.

[3] Huang Fan, Kuang Wei-chuan, Zhou Fei-xiong, et al. Therapeutic efficacy observation on acupuncture treatment for vascular cognitive disorder following a cerebral infarction[J]. J Acupunct Tuina Sci，2012, 10(1): 29—33.

[4] 石景洋,张彦丽,唐学敏.电针对血管性痴呆患者认知功能及行为能力的影响[J].中医杂志,2012,53(8):697—699.

[5] Meng PY, Sun GJ, Mao JJ, et al. Effect of electroacupuncture on learning and memory in rats with vascular dementia [J]. J Acupunct Tuina Sci，2012,10(2):67—71.

[6] Jing XH, Chen SL, Shi H, et al. Electroacupuncture restores learning and memory impairment induced by both diabetes mellitus and cerebral ischemia in rats[J]. Neurosci Lett, 2008, 443(3):193—198.

[7] 韦登明,贾学敏,尹向旭,等.电针改善血管性痴呆大鼠学习记忆及其与海马神经细胞蛋白激酶C表达的关系[J].中国老年学杂志,2013,33(2):328—330.

[8] 刘佩,刘喆,魏居瑞,等.电针对血管性痴呆大鼠海马脑源性神经营养因子mRNA表达及学习记忆的影响[J]. 中国康复医学杂志,2013,28(9):822—825.

[9] 高康,李飞,张庆萍,等.电针对血管性痴呆大鼠血清、脑组织中乙酰胆碱酯酶活性及学习记忆能力的影响[J].辽宁中医杂志,2013,40(11):2367—2368.

[10] 杨春壮,马英,王莹,等.电针对血管性痴呆大鼠行为学及组织内胆碱乙酰转移酶含量的影响[J].浙江中医药大学学报,2011,35(4):584—586.

[11] Farkas E, Luiten PG, Bari F. Permanent, bilateral common carotid artery occlusion in the rat: a model for chronic cerebral hypoperfusion- related neurodegenerative diseases[J]. Brain Res Rev, 2007, 54(1):162—180.

[12] 华兴邦,李辞蓉,周浩良,等.大鼠穴位图谱的研制[J].实验动物与动物实验,1991,(1):1—5.

[13] Antunes M, Biala G. The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications[J]. Cogn Process, 2012, 13(2):93—110.

[14] Baxter MG. "I've seen it all before": explaining age-related impairments in object recognition. Theoretical comment on Burke et al. (2010)[J]. Behav Neurosci, 2010, 124(5):706—709.

[15] Berlyne DE. The arousal and satiation of perceptual curiosi-

ty in the rat[J]. J Comp Physiol Psychol, 1955, 48(4):238—246.

[16] Ennaceur A, Delacour J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data[J]. Behav Brain Res, 1988, 31(1):47—59.

[17] Sarkisyan G, Hedlund PB. The 5-HT7 receptor is involved in allocentric spatial memory information processing[J]. Behav Brain Res, 2009, 202(1):26—31.

[18] Benice TS, Raber J. Object recognition analysis in mice using nose-point digital video tracking[J]. J Neurosci Methods, 2008, 168(2):422—430.

[19] Hale G, Good M. Impaired visuospatial recognition memory but normal object novelty detection and relative familiarity judgments in adult mice expressing the APPswe Alzheimer's disease mutation[J]. Behav Neurosci, 2005, 119(4):884—891.

[20] Dix SL, Aggleton JP. Extending the spontaneous preference test of recognition: evidence of object-location and object-context recognition[J]. Behav Brain Res, 1999, 99(2):191—200.

[21] Aggleton JP, Albasser MM, Aggleton DJ, et al. Lesions of the rat perirhinal cortex spare the acquisition of a complex configural visual discrimination yet impair object recognition [J]. Behav Neurosci, 2010, 124(1):55—68.

[22] Burke SN, Wallace JL, Nematollahi S, et al. Pattern separation deficits may contribute to age-associated recognition impairments[J]. Behav Neurosci, 2010, 124(5):559—573.

[23] Oliveira AM, Hawk JD, Abel T, et al. Post-training reversible inactivation of the hippocampus enhances novel object recognition memory[J]. Learn Mem, 2010, 17(3):155—160.

[24] Broadbent NJ, Gaskin S, Squire LR, et al. Object recognition memory and the rodent hippocampus[J]. Learn Mem, 2009, 17(1):5—11.

[25] Botton PH, Costa MS, Ardais AP, et al. Caffeine prevents disruption of memory consolidation in the inhibitory avoidance and novel object recognition tasks by scopolamine in adult mice[J]. Behav Brain Res, 2010, 214(2):254—259.

[26] Gaskin S, Tardif M, Cole E, et al. Object familiarization and novel-object preference in rats[J]. Behav Processes, 2010, 83(1):61—71.

[27] Wang D, Noda Y, Zhou Y, et al. The allosteric potentiation of nicotinic acetylcholine receptors by galantamine ameliorates the cognitive dysfunction in beta amyloid25-35 i.c.v.-injected mice: involvement of dopaminergic systems[J]. Neuropsychopharmacology,2007,32(6):1261—1271..

[28] Hammond RS, Tull LE, Stackman RW. On the delay-dependent involvement of the hippocampus in object recognition memory[J]. Neurobiol Learn Mem, 2004, 82(1):26—34.

北京大学第十二届全国肌电图与临床神经生理学习班招生通知

北京大学第三医院神经内科主办的“北京大学第十二届全国肌电图与临床神经生理学习班”拟定于2015年8月10—14日在北京举办。本届学习班集中了北京大学临床电生理学领域雄厚的师资力量,并邀请国内知名专家共同参与授课。学习班内容包括肌电图、神经传导测定、诱发电位等技术在神经系统疾病诊断治疗中的应用,以及在骨科、手外科、神经外科、运动医学、康复等相关疾病的术中监护与应用。国家级继续医学教育Ⅰ类8学分。

E-mail:bssn1108@sina.com,联系电话:010-82264446,15901312366,张华纲。

北京大学第三医院神经内科