

# 电针对脑梗死大鼠学习记忆能力和梗死侧海马 CA3 区突触结构的影响

段小东 余茜 覃波 张雷 杨敏 刘曦

**【摘要】目的** 研究电针对脑梗死大鼠学习记忆能力和梗死侧海马 CA3 区突触结构的影响。**方法** 48 只 Wistar 雄性成年大鼠制成右侧大脑中动脉脑梗死模型后分为对照组和电针组, 每组 24 只, 2 组又分别分为 1, 2, 3 周 3 个时段进行观察, 每个时段 8 只。电针组于术后 24 h 开始进行电针治疗, 对照组置于普通笼中正常喂养, 不给予任何治疗。采用 Morris 水迷宫进行学习记忆能力评定, 并观察梗死侧海马 CA3 区突触结构参数的变化。**结果** 电镜下观察到电针组各时段梗死侧海马 CA3 区突触后致密物厚度、活性区宽度及突触后膜曲率均较对照组明显增加, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。学习记忆能力测评: 对照组大鼠表现明显的学习记忆障碍, 电针组在 Morris 水迷宫定位航行试验中和空间探索试验中均明显优于对照组 ( $P < 0.05$ )。**结论** 电针可通过改变脑梗死大鼠梗死侧海马 CA3 区突触结构参数而改善脑梗死大鼠的学习记忆能力。

**【关键词】** 电针; 脑梗死; 学习记忆; 突触结构参数; 大鼠

**The effects of electroacupuncture on the synaptic structure of hippocampal CA3 neurons and learning and memory ability after cerebral infarct** DUAN Xiao-dong\*, YU Qian, QIN Bo, ZHANG Lei, YANG Min, LIU Xi. \* Department of Rehabilitation Medicine, Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000, China  
Corresponding author: YU Qian, Email: yqswc11@163.com

**【Abstract】Objective** To evaluate the effects of electroacupuncture (EA) on synaptic interface structures around a cerebral infarct and evaluate how learning and memory relate to synaptic structure. **Methods** Forty-eight male, adult Wistar rats were divided randomly and equally into an EA group and a control group after models of ischemic brain injury had been established. Each group was then divided into 1 week, 2 week and 3 week sub-groups. In the EA group EA was started 24 hours after the operation at the Baihui (DU20) and Da Zhui (BU14) points and continued for one week, two weeks or three weeks. The control group was fed in normal cages and had no special treatment. Synaptic substructures in the hippocampal CA3 area of the ischemic side were assessed morphologically and quantitatively. **Results** The synaptic curvatures and postsynaptic density (PSD) as well as the width of the active area increased significantly in the EA group compared with the control group. Morris water maze learning ability in the EA group exceeded that in the control group. Spatial probe test results also significantly improved in the EA groups compared with the control groups. **Conclusions** Learning and memory improved in the injured rats following EA, and this is likely to be related to synaptic changes and synaptic plasticity increasing.

**【Key words】** Electroacupuncture; Cerebral infarction; Learning and memory; Synaptic substructures; Rats

脑梗死是危害人类健康的常见病、多发病, 有发病率逐年增高、发病群体逐渐年轻化的趋势, 而其后遗症障碍十分广泛, 其中以学习记忆障碍与运动功能障碍最为常见, 对患者生存质量的影响也最大。怎样促进学习记忆功能的恢复已成为现代康复医学研究的重点课题之一。以往对脑梗死后运动功能的恢复较为重视, 研究较多, 而对学习记忆的研究相对薄弱, 电针对

脑梗死大鼠学习记忆功能的影响及机制研究较少。为此, 本研究采用大鼠右侧大脑中动脉缺血性梗死模型, 观察电针后梗死侧海马 CA3 区突触结构参数的变化, 从突触机制上探讨电针治疗改善脑梗死大鼠学习记忆能力的机制。

## 材料与方法

### 一、实验动物与分组

健康雄性 Wistar 大鼠 60 只 (造模成功 48 只), 清洁级, 体重 ( $250 \pm 50$ ) g, 周龄 8 周, 由第三军医大学动物实验中心提供。造模成功的 48 只大鼠分为脑梗死自由活动组 (对照组) 和脑梗死电针治疗组 (电针组),

DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 0254-1424. 2010. 04. 006

作者单位: 646000 泸州, 泸州医学院附属医院康复医学科 (段小东、覃波、杨敏、刘曦); 四川省人民医院康复医学科 (余茜); 泸州医学院药学院 (张雷)

通信作者: 余茜, Email: yqswc11@163.com

每组 24 只。2 组又分别分为 1, 2, 3 周 3 个时段进行观察, 每个时段 8 只。

## 二、模型制作

参照廖维靖等<sup>[1]</sup>和 Longa 等<sup>[2]</sup>的大鼠大脑中动脉缺血模型造模方法制成右侧大脑中动脉梗死模型。造模成功标准: 大鼠苏醒后提尾时左侧肢体屈曲; 同侧 Hornor 氏征; 爬行时向左划圈; 站立时向左侧倾倒。凡具有以上 4 项体征中任何一项者均纳入研究对象。大鼠死亡时及时补充, 保证每组动物数量。

## 三、治疗方法

2 组大鼠在造模成功后置于普通笼中正常喂养。电针组于术后休息 1 天, 从第 2 天起开始电针治疗; 对照组只在同等条件下饲养, 不做任何治疗。

电针治疗方法: 用 28 号 1 寸毫针对大鼠头部百会穴(顶骨正中)斜刺 0.5 寸, 大椎穴(第 7 颈椎与第 1 胸椎间背部正中)正刺 0.5 寸, 以上穴位均参考《实验针灸学》<sup>[3]</sup>取穴, 然后连接电针仪, 施以疏密波, 频率 16 Hz, 强度以大鼠安静耐受为度(约 1 mA), 留针 15 min, 每天 1 次, 均在下午进行, 分别连续治疗 1, 2, 3 周。

## 四、学习记忆行为学评测方法

电针组与对照组分别在电针组大鼠经电针治疗 1, 2, 3 周后(实际为术后第 8, 15, 22 天)进行学习记忆能力行为学测试。

Morris 水迷宫学习记忆行为测试: Morris 水迷宫选用大鼠通用型, 圆桶形, 水池直径 120 cm, 高 55 cm, 实验时放入的水深 22 cm, 水中加入奶粉, 使其呈乳白色不透明状, 水温为 22 ℃。在水池壁的边沿均匀分布 4 个不同形状的标记, 由此将水池等分为 4 个象限, 选第三象限正中放置平台(平台高 21 cm, 平台直径 10 cm), 没于水下 1 cm, 根据计算机中的分析软件进行调整位置。试验包括: ①定位航行试验, 将受试大鼠按顺时针方向依次由第一象限、第二象限、第三象限、第四象限入水点顺序面向池壁放入水中。记录 2 min 内寻找平台的时间(逃避潜伏期)。如果大鼠在 2 min 内找到平台, 记录 2 min 中内实际逃避潜伏期; 如果在 2 min 内未找到平台, 由实验者将其引上平台并停留 10 s, 逃避潜伏期记录为 2 min。历时 5 d, 1 次/d; ②空间搜索试验, 定位航行试验全部结束后, 次日进行空间搜索试验。撤去平台, 然后选第一象限相同的人水点将大鼠面向池壁放入水中, 测其 2 min 内跨越原平台位置的次数和大鼠在原平台象限停留的时间比。

## 五、电镜样品的制备

对照组和电针组在各时段进行水迷宫测试后分别取材(实际取材时间分别为 2 组大鼠术后第 14, 21, 28 天), 每时段每组各取材 8 只。以 1% 的戊巴比妥钠腹

腔注射麻醉, 固定于操作台上, 迅速开胸, 先以 250 ml 生理盐水快速将左心室灌流大鼠体内血液冲净, 再以 4% 多聚甲醛 200 ml 行心脏灌注固定(大约持续 15 min), 灌注完成后断头取脑, 分离海马组织, 参照大鼠脑立体定位图<sup>[4]</sup>定位取海马 CA3 区, 取 1 mm × 1 mm × 2 mm 组织 3 块, 固定于 3% 戊二醛 + 4% 多聚甲醛固定液中。行常规电镜标本包埋、醋酸铀和枸橼酸铅双染。每份标本制作 2 张铜网, 铜网由左上角至右上角的斜线上移动, 每份标本随机摄取突触像 5 张, 15 000 倍显微照片(日本 JEM-1400 型透射电子显微镜), 再光学放大至 50 000 倍。

## 六、突触形态学参数的定量分析

用 SIS 图像采集分析系统以及 Image-Pro Plus 6.0 专业图像分析软件测量突触间隙宽度、突触后致密物(postsynaptic density, PSD)的厚度、突触后膜的弦长和弧长及突触活性区的长度。其中活性区长度与突触后膜致密物的厚度参考 Guldner 和 Ingham<sup>[5]</sup>的方法测量; 突触界面曲率的测量参数参照 Jones<sup>[6]</sup>的方法, 即突触后膜的弦长与相应的弧长之比等于界面曲率; 突触间隙宽度用多点平均法测定。每组测定 40 镜照片, 结果用( $\bar{x} \pm s$ )表示。

## 七、统计学分析

用 SPSS 13.0 版软件进行整理及统计学分析。数据均用( $\bar{x} \pm s$ )表示,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。对统计数据均采用两因素方差分析, 两两比较采用 LSD-t 法。

## 结 果

### 一、学习记忆能力测评

1. 定位航行试验: 2 组大鼠逃避潜伏期都呈逐渐缩短趋势, 对照组逃避潜伏期均较同期电针组明显延长( $P < 0.01$ ), 见表 1。

表 1 2 组大鼠不同时段 Morris 水迷宫逃避潜伏期、原平台象限游泳时间及游经原平台次数比较( $\bar{x} \pm s$ )

组 别	只数	逃避潜伏期 (s)	原平台象限游泳时间比 (%)	游经原平台次数(次)
电针组	24			
1 周	8	89.68 ± 1.70 <sup>ac</sup>	25.38 ± 6.84	3.13 ± 1.96 <sup>b</sup>
2 周	8	81.57 ± 1.10 <sup>ac</sup>	28.05 ± 3.34 <sup>a</sup>	3.88 ± 1.46 <sup>b</sup>
3 周	8	79.31 ± 0.84 <sup>ac</sup>	34.68 ± 6.10 <sup>ac</sup>	4.63 ± 1.69 <sup>bd</sup>
对照组	24			
1 周	8	101.40 ± 1.73 <sup>d</sup>	22.14 ± 5.04	1.13 ± 0.64
2 周	8	96.68 ± 2.04 <sup>d</sup>	20.70 ± 3.86	1.50 ± 1.41
3 周	8	95.07 ± 1.49 <sup>d</sup>	19.00 ± 3.34	1.88 ± 1.25

注: 与对照组同期比较, <sup>a</sup> $P < 0.01$ , <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; 组内两两比较, <sup>c</sup> $P < 0.01$ , <sup>d</sup> $P < 0.05$

2. 空间搜索试验: 2 组大鼠 1 周时段在原平台象限游泳时间百分比比较差异无统计学意义( $P >$

0.05), 2 周时段比较差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ), 3 周时段比较差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ), 见表 1。2 组大鼠同时段经过原平台的次数比较, 差异均具有统计学意义 ( $P < 0.01$ ), 见表 1。以上结果表明, 电针组大鼠记忆力明显优于对照组。

二、突触界面参数检测

拍摄的 2 组脑梗死大鼠梗死侧海马 CA3 区突触 GrayI 型突触图像均符合兴奋性突触形态特征, 具有不典型的不对称界面, 突触前膜和突触后膜较模糊, 突触后膜有浓密的电子致密物, 突触前终末聚集有较多呈圆形的突触囊泡, 突触后膜比突触前膜明显增厚。对照组突触多为平直型突触, 即突触前、后膜近于直线且平行, 少数突触的后膜轻度弯曲形成微凹型或微凸型, 一般只有一个活性区域, 见图 1。电针组突触多表现为凹型和凸型突触, 多数为凹性突触, 其形态在纵切面上呈一“U”型; 突触的体积比较大, 大多有两个或以上的活性区域, 见图 1。

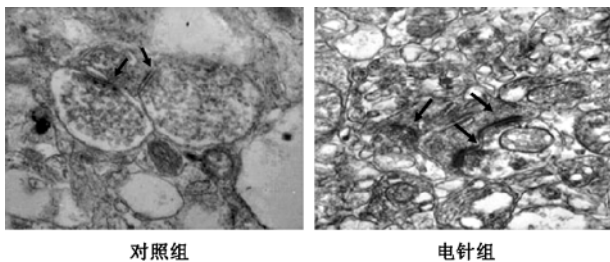


图 1 海马 CA3 区突触形态(醋酸铀和枸橼酸铅双染,  $\times 50\ 000$ )

2 组脑梗死大鼠梗死侧海马 CA3 区参数结构见表 2, 从表 2 可以看出, 电针组 PSD 厚度、活性区长度、突触界面曲率均增加, 与对照组同期比较差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 2 组大鼠梗死侧海马 CA3 区突触间隙宽度同期两两比较差异无统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

表 2 2 组大鼠梗死侧海马 CA3 区突触结构参数比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	只数	突触间隙宽度 (nm)	PSD 厚度 (nm)	后膜活性区长度 (nm)	突触界面曲率
电针组	24				
1 周	8	20.71 $\pm$ 1.40	56.23 $\pm$ 3.13 <sup>ab</sup>	316.22 $\pm$ 8.72 <sup>ab</sup>	1.019 $\pm$ 0.004 <sup>b</sup>
2 周	8	20.71 $\pm$ 1.01	65.33 $\pm$ 2.51 <sup>a</sup>	325.32 $\pm$ 8.28 <sup>ab</sup>	1.031 $\pm$ 0.007 <sup>ab</sup>
3 周	8	19.46 $\pm$ 1.85	66.44 $\pm$ 2.70 <sup>a</sup>	337.16 $\pm$ 6.72 <sup>ab</sup>	1.042 $\pm$ 0.008 <sup>ab</sup>
对照组	24				
1 周	8	20.44 $\pm$ 1.45	49.00 $\pm$ 5.01 <sup>b</sup>	295.92 $\pm$ 8.44 <sup>b</sup>	1.017 $\pm$ 0.101
2 周	8	21.47 $\pm$ 1.08	57.06 $\pm$ 3.33	306.44 $\pm$ 8.09	1.018 $\pm$ 0.007
3 周	8	19.96 $\pm$ 1.37	58.68 $\pm$ 3.56	310.53 $\pm$ 2.65	1.028 $\pm$ 0.109 <sup>b</sup>

注: 与对照组同期比较, <sup>a</sup> $P < 0.01$ ; 组内两两比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$

讨 论

海马属边缘系统, 在进化上是脑的古老部分。经典的海马结构包括海马本体、齿状回、下托和内嗅皮质

四部分<sup>[7]</sup>。海马与学习、记忆的关系密切, 对梗死/缺氧等许多致病因素较为敏感, 再加上其结构和功能具有明显的可塑性, 因此常作为学习记忆的研究对象。Morris 水迷宫实验通过定位航线试验测量大鼠获取经验(学习)的能力, 以潜伏期表示; 通过空间搜索试验, 测量大鼠保存经验(记忆)的能力, 以跨越原平台次数及平台象限游泳距离表示。本研究中两试验结果为电针组大鼠的学习记忆能力明显优于同期对照组, 表明电针治疗可以有效地改善脑梗死大鼠的学习记忆能力。

研究表明, 电针能通过促进中枢神经系统的神经再生、修复和突触的可塑性而改善机体的功能<sup>[8-10]</sup>。突触是神经元之间传递信息的重要结构, 可塑性是神经元和神经网络发生的适应性变化, 在高级神经中枢的脑内, 每一个神经元在整个生命活动过程中都具备可持续形成突触连接的潜在能力, 这种能力是神经网络可塑性的基础。突触间隙是一个神经元与另一个神经元信息沟通的部位, 位于突触前、后膜之间的细胞外间隙, 其中糖胺多糖和糖蛋白等可促进递质由前膜移向后膜, 其大小和形态对突触活动的动力学有重要影响。有研究表明, 学习记忆减退时突触间隙增大<sup>[11]</sup>。本研究通过电镜观察发现电针治疗使梗死侧海马 CA3 区突触间隙宽度缩窄, 原因可能为 PSD 增厚、活性区长度和界面曲率的增加相对挤占了突触间隙的空间, 也加强了神经元之间信息的传递效率, 可见 2 组比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。PSD 厚度是中枢突触结构可塑性的重要参数。研究表明, PSD 厚度与神经运动功能和学习记忆的保持能力密切相关<sup>[12]</sup>, PSD 增厚和增长可能是突触功效增强的物质基础。突触界面曲率的改变是突触可塑性的另一个形态学特征, 有可能作为神经递质释放状况的标志<sup>[13]</sup>。脑梗死发生以后, 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。而弯曲型突触比平直型突触有更多的线粒体, 即弯曲型突触处于更活跃的状态<sup>[14]</sup>。电针治疗扩大突触界面曲率导致接触面积的增大, 由于弯曲度大的界面呈“袋状”, 减少向周围间隙扩散, 有利于递质与受体更有效的结合以及递质作用后被重新摄取, 从而提高神经信息传递的有效性。因此推测突触界面曲率的增大可以作为一种代偿机制<sup>[15-16]</sup>。突触活性区长度也是突触形态学的特征性参数之一。突触前膜与聚集成簇的突触小泡相接触形成突触活性区, 突触活性区与突触吐泡作用的时效密切相关<sup>[17]</sup>, 其长度反映神经递质释放的有效面积。脑梗死发生后突触活性区长度变短, 而电针使梗死侧海马 CA3 区突触活性区长度增加, 有利于递质与受体的结合以及作用后的重摄取。

本研究发现,对照组大鼠梗死侧海马 CA3 区突触形态多为平直型,PSD 厚度较薄,活性区长度短;电针组大鼠以凹型突触增加为主,在纵切面上呈一“U”型,PSD 厚度大,活性区长度长。电针组大鼠 PSD 厚度、突触活性区长度、突触界面曲率与同期对照组比较差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。结合学习记忆行为检测结果,可见电针治疗可使电针组大鼠各项突触结构参数发生改变,增强了突触的传递功能,在行为上表现为其学习记忆能力优于对照组。总之,电针促使脑梗死大鼠梗死侧海马 CA3 区突触结构参数的改变,使突触界面曲率、PSD 厚度、后膜活性区长度均增加而增强了梗死侧海马 CA3 区突触传递效率,表明电针百会和大椎穴能促进脑梗死大鼠梗死侧海马 CA3 区神经元对学习记忆的代偿作用。

百会和大椎是 2 个益智要穴,位于督脉之上。中医认为督脉为阳脉之海,元神之府,行于脊里,上行入脑。其中,百会位居巅顶,为三阳五会,取该穴可振奋人身之正气,醒脑开窍;大椎为三阳督脉之会,以上两穴位在治疗健忘和痴呆方面已有悠久历史。

综上所述,电针治疗促进了脑梗死大鼠梗死侧海马 CA3 区突触结构的可塑性,从而提高脑梗死大鼠学习记忆能力。本研究因时间关系仅仅研究了大鼠分别进行电针治疗 1,2,3 周后电针对脑梗死大鼠梗死侧海马 CA3 区突触结构变化的影响,关于电针治疗介入时间的早晚和最佳的治疗天数以及针刺穴位的不同对脑梗死大鼠梗死侧海马 CA3 区突触结构参数的影响还有待于进一步研究。

#### 参 考 文 献

- [1] 廖维靖,刘淑红,范明,等. 线栓阻断大鼠大脑中动脉制作梗死性脑损伤模型的改良. 中华物理医学与康复杂志,2002,24:349-352.
- [2] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. Stroke,1989,20:84-91.
- [3] 李忠仁. 实用针灸学. 北京:中国中医药出版社,2003:327-329.
- [4] 包新民,舒斯云. 大鼠脑立体图谱. 北京:人民出版社,1999:17-83.
- [5] Guldner FH, Ingham CA. Increase in postsynaptic density material in optic target neuron of the rat suprachiasmatic nucleus after bilateral enucleation. Neurosci Lett,1980,17:27-32.
- [6] Jones DG. Synaptic plasticity perforated synapses: their relevance for all under-standing of abnormal synaptic organization. APMIS-Suppl, 1993,40:25-34.
- [7] 李东亮,张朝. 基础神经生物学. 北京:人民军医出版社,2006:291.
- [8] 许能贵,易玮,马勤耘,等. 电针对大鼠局灶性脑缺血后神经损伤保护作用的研究. 中国针灸,2000,20:237-239.
- [9] 罗松,余曙光. 电针对阿尔茨海默病模型大鼠海马神经元突触形态可塑性的影响机制. 中国临床康复,2006,10:189.
- [10] 易玮,许能贵,汪帼斌,等. 电针对局灶性脑梗死大鼠突触可塑性促进作用的实验研究. 中国中西医结合杂志,2006,26:710.
- [11] Wilson MA, Tonegawa S. Synaptic plasticity, place cells and spatial memory: study with second generation knockouts. Trends Neurosci, 1997,20:102-106.
- [12] Guldner FH, Bahar E, Young CA, et al. Structural plasticity of optic synapses in the rat suprachiasmatic nucleus: adaptation to long-term influence of light and darkness. Cell Tissue Res,1997,287:43-60.
- [13] Week AC, Ivanco TL, Leboutillier jc, et al. Sequential changes in the synaptic structural profile following long term potentiation in the rat dendrite gyrus, Induction/early maintenance phase. Synapse,2000,36:286-289.
- [14] Dyson SE, Jones DG. Quantitation of terminal parameters and their inter relationships in maturing central synapses: A perspective for experimental studies. Brain Res,1980,183:43-59.
- [15] Liepert J. Transcranial magnetic stimulation in neurorehabilitation. Acta Neurochir Suppl,2005,93:71-74.
- [16] Ogiue-Ikeda M, Kawato S, Ueno S. Acquisition of ischemic tolerance by repetitive transcranial magnetic stimulation in the rat hippocampus. Brain Res,2005,1037:7-11.
- [17] Rosenmund C, Rettig J, Brose N. Molecular mechanisms of active zone function. Curr Opin Neurobiol,2003,13:509-519.

(修回日期:2009-07-21)

(本文编辑:松 明)

本刊办刊方向:

立足现实; ; 关注前沿; ; 贴近读者; ; 追求卓越