

电针对血管性痴呆大鼠学习记忆能力及脑组织中 自由基生成系统的影响

王黎* 唐纯志* 指导:赖新生*

摘要 目的:观察电针对实验性血管性痴呆(VD)大鼠学习记忆能力和自由基生成系统的调节作用。方法:选用 4-VO 模型,用 Morris 水迷宫测定大鼠学习记忆能力,并检测脑组织一氧化氮(NO)、一氧化氮合酶(NOS)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)及谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的含量或活性。结果:模型大鼠表现出明显的学习记忆障碍,在定位航行实验中,与假手术组相比,逃避潜伏期显著延长;在空间探索试验中,在原平台象限跨越平台次数明显高于其余 3 个象限。电针组能显著缩短逃避潜伏期,在原平台象限跨越平台次数显著多于其余 3 个象限,与假手术组无显著差异。模型大鼠脑组织内 NOS 活性及 NO、MDA 含量明显升高, SOD、GSH-Px 活性显著降低,与假手术组、电针组及尼莫通组相比均差异显著($P < 0.05$)或非常显著($P < 0.01$);这说明电针组与尼莫通组不同程度地降低了脑组织中 NOS、NO、MDA 含量,提高了 SOD、GSH-Px 活性。结论:电针对自由基产生与清除的平衡有调控作用,能减轻缺血对脑神经细胞的损害,从而改善 VD 大鼠学习记忆能力。

关键词 痴呆,血管性/针灸疗法 电针 记忆/针灸效应

自由基的连锁反应是脑缺血损伤的核心病理环节,自由基清除系统功能下降使脑组织受损,造成严重的神经功能损害,从而影响学习记忆等脑功能。因此,抑制自由基的生成,增强对自由基的清除能力,是治疗血管性痴呆(Vascular Dementia, VD)的重要环节。本研究旨在观察电针对 VD 模型大鼠一氧化氮(NO)、一氧化氮合酶(NOS)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)及谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的影响,探讨电针治疗 VD 的作用机制。

1 材料和方法

1.1 主要仪器及试剂:SDQ-30 双极射频电凝器(上海手术器械厂),Morris 水迷宫,G-6805 电针仪(上海),惠普上分 6010 紫外分光光度计,NO、NOS、SOD、MDA 及 GSH-Px 检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所;尼莫通由德国拜耳公司提供,批号 CAGFT3。

1.2 实验动物:选用健康成年 SD 大鼠 60 只,2~3 月龄,体重 200~250g,雌雄各半,由河南省实验动物中

心提供(动物实验合格证书:河南医动字第 99011 号)。

1.3 造模及分组:随机抽取 10 只作假手术对照组,其余 50 只制造缺血模型。动物采用国际公认的四血管阻断(4-Vessel occlusion, 4-VO)方法制作模型。用 10%水合氯醛(0.3ml/100g 体重)腹腔麻醉大鼠,背侧颈正中切口暴露双侧第一颈椎横突翼小孔,用直径 0.5mm 电凝针插入双侧翼小孔烧灼双侧椎动脉,造成永久性闭塞。然后,腹侧颈正中切口,分离双侧颈总动脉,穿线备用,用微动脉夹可逆性夹闭双侧颈总动脉 5min,共夹闭 3 次,每次间隔 1 小时,然后缝合,常规饲养、观察。假手术组手术程序同上,仅暴露 4 条血管,不发生脑缺血。

1.4 处置方法:术后 10 天,刀口完全愈合,饮食正常,无肢体残疾,体重恢复后开始给予电针及西药尼莫通治疗。电针组用 28 号 1 寸毫针,于模型大鼠头部“百会”斜刺 0.5 寸,“大椎”穴直刺 0.5 寸^[1],连接电针仪,施以连续波,频率 150Hz,强度以大鼠安静耐受为度(约 2.0mA),每天电针 1 次,留针 20min,连续刺激 15 天。尼莫通组给予尼莫通 12mg/kg,按 20ml/kg 体重灌胃,每日 1 次,连续 15 天。假手术组和模型组只在同等条件下饲养,未予任何处置。

1.5 检测方法

1.5.1 Morris 水迷宫学习记忆行为测试:水迷宫为一不锈钢圆形水池,直径 150cm,高 60cm,内置一无色有机玻璃平台,平台高 40cm,底面为 6cm×10cm,水深 41cm,水温 22~26℃。在水池壁标明 4 个入水点,由此将水池等分为 4 个象限,任选 1 个象限正中放置平台,没于水下 1cm,水面覆盖泡沫塑料,于处置结束后(术后第 26 天)即开始水迷宫试验。程序包括:(1)定位航行试验(place test):历时 6 天,每天上下午各 4 次。将受试大鼠按顺时针方向顺序面向池壁放入水中,记录

表 1 各组大鼠平均逃避潜伏期比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	逃避潜伏期(s)
模型组	13	58.08±38.77
假手术组	10	26.50±29.4*
针刺组	14	29.89±32.62*
尼莫通组	13	30.25±31.57*

与模型组相比较, * $P < 0.01$

基金项目:教育部高等院校骨干教师资助计划项目(51)

* 广州中医药大学针灸推拿学院,广州市机场路 12 号(510405)

收稿日期:2002-03-31;修回日期:2002-05-25

表2 4组大鼠跨原平台及其余3个象限相应平台位置的次数(次, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	原平台(T)	右侧平台(R)	对侧平台(O)	左侧平台(L)
假手术组	10	6.30±1.77*	2.30±1.77	1.10±1.10*	0.90±1.29
电针组	14	5.93±2.13*	1.14±1.29	0.71±0.91*	1.21±1.05
尼莫通组	13	5.15±1.34*	1.15±1.34	0.69±0.85*	1.38±1.12
模型组	13	2.31±1.84	2.38±1.85	3.00±1.58	1.69±1.55

与模型组比较, * $P < 0.01$

表3 电针对脑组织内 NOS、SOD、GSH-Px 活力及 NO、MDA 含量的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	NOS(U/mg prot)	NO(μ mol/g prot)	SOD(NU/mg prot)	MDA(μ mol/mg prot)	GSH-Px(U/mg prot)
假手术组	8	1.50±0.29**	3.41±0.65**	7.33±0.51**	1.79±0.59**	1.14±0.11**
电针组	8	1.71±0.33*	3.66±0.66**	7.11±0.33*	2.74±1.03* Δ	1.09±0.11*
尼莫通组	8	1.87±0.56	3.89±0.96**	7.03±0.39*	2.96±0.97* Δ	1.04±0.06* Δ
模型组	8	2.68±1.06	6.38±1.97	6.57±0.41	4.13±0.94	0.90±0.16

与假手术组比较, $\Delta P < 0.05$; 与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2min 内寻找平台的时间,即逃避潜伏期(escape latency)。(2)空间探索试验(spatial probe test):定位航行试验结束后撤除平台,然后任选一相同入水点将大鼠放入水中,测其 2min 内跨原平台及其余 3 个象限相应平台位置的次数和大鼠在水迷宫外环停留的时间。

1.5.2 NO、NOS、SOD、MDA 及 GSH-Px 检测:在水迷宫测试完后第 2 天,每组各取大鼠 8 只,脱椎法处死,快速断头取脑,在冰盘上剥除脑膜,右侧大脑分离合并皮质和海马,称重,加入 9 倍体积的预冷生理盐水制成 1:10(W/V)的匀浆,冷冻离心机中 3000r/min 离心 10min,取上清液。NO、NOS、SOD、MDA 及 GSH-Px 的测定采用分光光度法,检测步骤按试剂盒说明进行,样品蛋白定量采用双缩脲法。

2 结果

2.1 定位航行试验:从表 1 可以看到,假手术组、电针组、尼莫通组 6 天平均逃避潜伏期明显短于模型组。将 4 组大鼠平均潜伏期进行组间比较差异有显著性($P < 0.01$),并做组间两两比较,结果显示,电针组大鼠平均潜伏期明显短于模型组($P < 0.01$),而假手术组和尼莫通组与电针组之间的差异无显著性($P > 0.05$)。这表明模型组大鼠学习获取能力较差,电针则改善了模型大鼠的学习巩固和再现能力。

2.2 空间探索试验:撤除平台,4 组大鼠 2min 内跨越原平台及其余 3 个象限相应平台位置次数。从表 2 可知,假手术组、电针组、尼莫通组大鼠在原平台象限跨相应平台次数明显多于左右两侧平台。模型组在原平台象限跨越相应平台次数与另外 3 个象限的跨越次数无显著差异($P > 0.05$)。将 4 组大鼠在原平台和对侧平台象限跨越相应平台次数做比较,电针组与尼莫通组和假手术组明显多于模型组($P < 0.01$),而此 3 组间差异无显著性($P > 0.05$)。在水迷宫外环逗留时间假手

术组平均为 40.3s,电针组为 40.4s,尼莫通组为 47.5s,模型组 75.8s,模型组逗留时间比其它 3 组明显延长($P < 0.05$)。

2.3 NOS、SOD、GSH-Px 活力及 NO、MDA 含量:如表 3 所示,VD 模型大鼠脑组织内 NOS 活性及 NO、MDA 含量明显升高,SOD、GSH-Px 活性显著降低,与假手术组相比均差异非常显著($P < 0.01$);模型组 NOS、NO、SOD、MDA 和 GSH-Px 活性与电针组比较差异亦非常显著($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),尼莫通组 NO、SOD、MDA 和 GSH-Px 与模型组比较差异显著($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);而电针组和尼莫通组 MDA 含量、尼莫通组 GSH-Px 含量与假手术组比较有显著性差异($P < 0.05$),其余指标与假手术组均无显著差异。这说明电针组与尼莫通组不同程度地降低了脑组织中 NOS、NO、MDA 含量,增加了 SOD、GSH-Px 活性。

3 讨论

机体在生理代谢过程中存在自由基产生与清除的动态平衡。生理情况下,体内存在自由基防御系统,即自由基生成抑制剂(如 SOD、过氧化氢酶、GSH-Px)和抗氧化剂(如维生素 C 和维生素 E)。SOD 和 GSH-Px 为机体直接清除自由基的重要酶类,是机体防御新陈代谢及其他生命活动中氧自由基损伤和破坏的抗氧化酶。而在病理过程中这种平衡受到破坏,自由基的生成超过机体的清除能力,未被清除的自由基可诱发一系列连锁反应导致细胞损伤。自由基生成系统对学习记忆亦有明显的损害作用。它对智力的损害主要由于脑缺血时自由基生成增加,防御机制活性降低,自由基及其代谢产物(MDA)等作用于多价不饱和脂肪酸,发生氧化反应,诱导 DNA、RNA、蛋白质的交联和氧化反应,促使多糖分子聚合,从而损伤脑组织,出现结构及功能的改变^[2~5]。

一氧化氮(NO)是目前公认的一种细胞信息传递分子,是一种血管、神经活性物质,具有调节脑血流、促进或抑制递质释放、参与突触可塑性、神经元兴奋毒性及炎症性损害等多种作用,且与学习记忆有关^[6]。有关 NO 的大量研究表明,NO 在脑缺血或脑缺血再灌注损伤中具有神经保护和神经毒性二种不同作用。在 NO 神经毒性中,当脑缺血时,NO⁻(含有一个未配对电子)浓度升高,与 O₂⁻(超氧阴离子)反应生成具有很强细胞毒性的过氧化亚硝基阴离子(ONOO⁻),并进一步降解成具有更强毒性作用的羟自由基(OH·)及二氧化氮自由基。ONOO⁻、OH·等可使细胞膜脂质过氧化,还能使含巯基基因的酶或蛋白质氧化,破坏酶的活性。ONOO⁻还可抑制线粒体呼吸酶复合物,导致细胞呼吸抑制,同时也能抑制 DNA 复制的限速酶核苷酸还原酶,导致 DNA 合成抑制^[7],致脑细胞损伤而发生智力障碍。

本实验结果表明,VD 模型大鼠脑组织内 NOS 活性增加、NO 及 MDA 含量明显增多,而 SOD、GSH-Px 活性下降,与假手术组、电针组及尼莫通组均有显著性差异,说明在全脑缺血再灌注损伤后 1 个月,大鼠脑组织内自由基生成明显增加,清除自由基的能力下降,引起脑细胞损伤而致学习记忆功能障碍,因而模型组大鼠在定位航行试验和空间探索试验中与假手术组比较有明显差异,表现为学习巩固和再现能力下降。

本实验结果亦表明,电针“大椎”、“百会”穴能在脑缺血损伤状态下,增加 SOD 及 GSH-Px 酶活性,减少自由基形成,通过抑制 NOS 减少 NO 的过量生成,从而减轻其神经毒性,因而电针组的学习记忆能力明显改善,与模型组比较有显著差异。自由基对脑缺血损伤的病理过程有作用,因此,如何调控自由基产生与清除的动态平衡将为治疗 VD 的学习记忆功能缺损提供一个重要方向。我们选取“百会”、“大椎”二穴。百会位于头部正中,属督脉穴位,是手足三阳经、督脉经、足厥阴肝经诸经交会之处,为“三阳五会”,能医百病,并能补神益智、醒脑开窍、协调百脉。大椎亦属督脉穴位,是手足六阳经的交会穴,为“诸阳之会”,可通调诸经,增强各脏腑经络之功效,促使阴阳平衡、气血调和。督脉与脑密切相关,《难经·二十八难》:“督脉者,……并于脊里,上至风府,入属于脑”。督脉通于脑,病变在脑,首取督脉。现代研究证实,督脉位居身体的正中线上,可以通过双侧神经司控的特性,促进脑功能的代偿和重建作用。VD 的直接成因是气血逆乱,瘀血阻络,脑脉不通。“经脉所过,主治所及”,电针属于督脉的百会、大椎,能疏通气血、通调督脉、醒脑开窍、益智复聪之效。

实验结果提示,电针对 VD 模型大鼠脑组织损伤有保护作用,从而可改善学习记忆等脑功能。这表明在实施脑保护措施的过程中具有双向良性调节作用的针刺疗法具有调节自由基产生与清除的动态平衡的作用,能改善模型大鼠的学习记忆能力,这为针灸临床治疗 VD 的疗效机制提供了重要的动物实验依据。

统计结果显示,电针组与尼莫通组比较无显著差异。尼莫通是钙通道阻滞剂,能阻止细胞内钙超载,解除血管痉挛,增加血流量,改善微循环。也有人认为^[8],自由基和兴奋性氨基酸在脑缺血性损伤中有协同作用,钙离子在两者之间起介导作用,即钙离子通过激活磷酸酯酶生成自由基,同时钙离子的积聚又促进兴奋性氨基酸释放。提示电针和尼莫通对自由基产生与清除的平衡有调控作用,能使痴呆大鼠记忆障碍有显著改善,电针对自由基的调节是否与抑制钙离子的超载有关,具体机制有待进一步研究。

参考文献

- 1 林文注,王佩. 实验针灸学. 上海:上海科技出版社,1994:286.
- 2 Sen CK, Packer L. Antioxidant redox regulation of gene transcription. *FASEB J*, 1996, 10 (7): 709-720.
- 3 Ferris DC, Kume-Kick J, Russo-Menna I, et al. Gender differences in cerebral ascorbate levels and ascorbate loss in ischemia. *Neuroreport*, 1995, 6 (11): 1485-1489.
- 4 Siesjo BK, Zhao Q, Pahlmark K, et al. Glutamate, calcium, and free radicals as mediators of ischemia brain damage. *Ann Thorac Surg*, 1995, 59 (5): 1316-1320.
- 5 Chan PH. Oxygen radicals in focal cerebral ischemia. *Brain Pathol*, 1994, 4 (1): 59-65.
- 6 Kato K, Zorumski CF. Nitric oxide inhibitors facilitate the induction of hippocampal long-term potentiation by modulation NMDA responses. *J Neurophysiol*, 1993, 70 (3): 1260-1263.
- 7 刘小光, 刘耕陶. 一氧化氮与脑缺血. *中国药理学通报*, 1998, 14 (1): 4-7.
- 8 刘宏, 吴平生. 全脑缺血再灌注后发生迟发性神经元死亡的机制. *国外医学生理病理科学与临床分册*, 1999, 19(5): 379-382.

本刊启事

凡未能在邮局订到本刊的读者,可直接在本社邮购。1997 年每期 3.50 元;现有第 2~6、8~10 期,共 28 元;1998 年、1999 年每期 4.00 元,1998 年现有第 2~6、8~10 期,共 32 元;2000 年每期 5.80 元;2001 年每期 6.50 元,2002 年、2003 年每期 6.80 元。以上均免费邮寄,如欲挂号每件请另加 2 元。

1997 年合订本每本 54 元;1998、1999 年合订本每本 60 元;2000 年合订本每本 80 元;2001 年合订本每本 90 元;2002 年合订本每本 100 元。

欲购者请汇款至北京市东直门内南小街 16 号中医杂志社邮购部,邮编:100700,电话:(010)64014411-3036。请在汇款单附言栏中注明购买何年、何期及数量。

本刊由北京印刷一厂负责印刷、装订,凡有缺页、倒页等质量问题,请与该厂质检科联系调换,地址:北京市西便门内大街 53 号,邮编:100053。

ABSTRACTS FROM ORIGINAL ARTICLES

Effects of electroacupuncture on learning and memory and the producing system of free radicals in brain tissue in the rat of vascular dementia

Wang Li, Tang Chunzhi

Objective: To observe regulative action of electroacupuncture (EA) on learning and memory and the producing system of free radicals in the rat of experimental vascular dementia (VD). **Methods:** In the 4-VO model rat of vascular dementia (VD), learning and memory were detected by morris's water maze, and nitric oxide (NO), malondialdehyde (MDA) contents, nitric oxide synthase (NOS), superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) activities in the brain were determined. **Results:** The model rat had obvious learning and memory disorder, and had significantly longer escape latency in the orientation navigation experiment as compared with that of false operation group; and the running over platform times in the original platform quadrant were not significantly higher than other 3 quadrants in the space exploration test. While in the EA group, the escape latency was shortened; the running over platform times in the original platform quadrant were significantly more than other 3 quadrants, with no significant difference to the false operation group. NOS activity, NO and MDA contents in the brain tissue in the model group increased significantly, SOD, GSH-Px activities decreased significantly with significant differences as compared with that of the false operation group, EA group and Nimotop group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). It is indicated that NO, MDA contents and NOS activity decrease in the EA group and the Nimotop group, and SOD and GSH-Px activities increase in varying degrees in the brain tissue. **Conclusion:** EA can regulate the balance of production and elimination of free radicals, and can relieve lesion of nervous cells of the brain due to ischemia, so as to improve learning and memory in the rat of VD.

Authors' address: College of Acupuncture & Massage, Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510405

Key words: Dementia, vascular/acup - moxibustion therapy electroacupuncture memory/acup eff

(Original article on page 25)

Clinical study on combination of Dan Zhi Xiao Yao Powder with ear point taping and pressing therapy for treatment of 51 cases of optic nerve atrophy

Yang Haiyan

Objective: To observe clinical therapeutic effect of combination of Dan Zhi Xiao Yao Powder with ear point taping and pressing therapy on optic nerve atrophy. **Methods:** In the treatment group (51 cases, 58 eyes) treated with combination of Dan Zhi

Xiao Yao Powder with ear point taping and pressing therapy, and in the control group treated with simple Western medicine (43 cases, 49 eyes), vision and visual field were observed for 3 therapeutic courses. **Results:** The effective rate for vision was 79.3% in the treatment group, and 44.89% in the control group; and the effective rate for visual field was 59.2% in the treatment group and 22.6% in the control group, the therapeutic effect in the treatment group being superior to that of the control group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Combination of Dan Zhi Xiao Yao powder with ear point taping and pressing therapy can increase vision and improve optic function for optic nerve atrophy.

Author's address: Xuzhuo Municipal Hospital of TCM, Jiangsu 221003

Key words: Optic nerve atrophy/acupoint therapy optic nerve atrophy/TCM therapy: Dan Zhi Xiao Yao Powder/treatment application

(Original article on page 28)

Effects of Da Huang Zhe Chong Pill on VII factor correlative antigen and fibrinogen in the patient of non-insulin dependent diabetic nephropathy at stage IV

Wei Lianbo, Li Delin, Ye Rengao, et al.

Objective: To probe into the action of Da Huang Zhe Chong Pill on VII factor correlative antigen (vWF:Ag) and fibrinogen (Fbg) in the patient of non-insulin dependent diabetic nephropathy (DN) at stage IV. **Methods:** 60 cases of DN at stage IV were randomly divided into treatment group and control group, and vWF:Ag and Fbg changes were detected with automatic coagulation instrument. The treatment group were treated with Da Huang Zhe Chong Pill and the control group with persantine. The effects of Da Huang Zhe Chong Pill on vWF:Ag and Fbg in the patient of DN at stage IV were investigated. **Results:** The blood vWF:Ag, Fbg contents in the patient of DN at stage IV increased as compared with that of the normal control group ($P < 0.01$); after treatment with Da Huang Zhe Chong Pill, vWF:Ag and Fbg contents decreased significantly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), superior to that of the persantine. **Conclusion:** Da Huang Zhe Chong Pill can significantly decrease blood vWF:Ag and Fbg contents and improve hypercoagulable state in the patient of DN at stage IV.

Authors' address: Nanfang Hospital of The First Military Medical University, Guangzhou 510515;

Key words: Diabetes, non-insulin dependence/TCM therapy Da Huang Zhe Cong/treatment application diabetic nephropathy/blood

(Original article on page 30)