

·基础研究·

双侧前额叶中度损伤大鼠执行控制和空间学习与记忆功能的研究*

梁爱萍¹ 韩梦琪² 张小年^{3,4}

摘要

目的:通过控制性皮质撞击法,制作双侧前额叶中度损伤模型并观察其对大鼠的执行控制功能和空间学习与记忆功能的影响。

方法:40只雄性SD大鼠随机分成3组:正常对照组(n=10)、假手术组(n=10)、控制性皮质撞击(CCI)组(n=20)。CCI组大鼠应用控制性皮质撞击法制作双侧额叶打击颅脑创伤模型,其中打击速度:3.5m/s,打击深度:1.5mm,停留时间:400ms。于CCI后第4周末及第8周末分别进行GO/NO GO任务测试及水迷宫测试。

结果:造模前各组各测试均无显著差异。造模后第4周CCI组GO/NO GO任务测试可见正确率显著下降($P < 0.01$),造模后第8周,各组的正确率下降和造模前比均有显著性差异($P < 0.05$)。造模后定位航行实验可见各组潜伏期均有下降,对照组和假手术组下降有显著性差异($P < 0.05$),但CCI组无显著性差异;第4、8周,与对照组相比,CCI组则均有显著性差异($P < 0.01$)。造模后第4周空间探索实验可见,对照组和假手术组与造模前相比无显著性差异($P > 0.05$),CCI组则有显著下降($P < 0.01$);造模后第8周,假手术组和CCI组与造模前相比差异有显著性意义($P > 0.05$),CCI组则与第4周相比也有显著差异($P < 0.01$)。

结论:应用CCI方法进行双侧前额叶撞击制备大鼠中度颅脑创伤模型,可以造成大鼠执行控制能力的显著下降,并对大鼠的空间学习和记忆能力均有严重影响。在伤后一定时间内,执行控制能力可能会有部分的自然恢复,但空间学习和记忆能力损害则可能进行性加重。

关键词 颅脑创伤;控制性皮质挫伤;前额叶;执行控制;空间学习;空间记忆

中图分类号:R493 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2014)-09-0806-05

A study on executive control and spatial learning/memory function after bilateral prefrontal lobe moderate injury in rats/LIANG Aiping, HAN Mengqi, ZHANG Xiaonian//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2014, 29(9): 806—809

Abstract

Objective: To investigate the changes of executive control function and spatial learning/memory function after moderate traumatic brain injury (TBI) induced by controlled cortical impact (CCI) in bilateral prefrontal lobe.

Method: Forty male SD rats were randomly divided into three groups: control group (n=10), sham group (n=10), CCI group (n=20). CCI was used to make the bilateral frontal lobe injury model (depth: 1.5mm, velocity: 3.5m/s, dwell time: 400ms). GO/NO GO tasks test and Morris water maze test were measured at 4 and 8 weeks after CCI.

Result: Before modeling the test showed no significant difference in three groups. In the 4th week after modeling the accuracy of GO/NO GO test decreased significantly($P < 0.01$), but in the 8th week after modeling all

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2014.09.002

*基金项目:中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金课题(2012CZ-19)

1 安阳市人民医院康复科,河南安阳,455000; 2 北京积水潭医院康复科; 3 中国康复研究中心神经康复科,首都医科大学康复医学院; 4 通讯作者

作者简介:梁爱萍,女,副主任医师; 收稿日期:2013-10-30

groups decreased had significant difference compared to the initial. In navigation test the escape latency in of each group decreased, the control group and sham group decreased significantly ($P < 0.05$), but not in CCI group; In the 4th and 8th week, CCI group had significantly difference compared with the control group ($P < 0.01$). Compared with before CCI, in the 4th week after CCI space exploration experiment showed no significant difference ($P > 0.05$) in control group and sham group, CCI group decreased significantly ($P < 0.01$); in the 8 weeks after CCI, sham group and CCI group had significant difference ($P > 0.05$) compared with before CCI, and CCI group had significant difference ($P < 0.01$) in the 4th week after CCI.

Conclusion: Bilateral frontal lobe moderate TBI caused by CCI could declined the executive control function significantly and affected spatial learning/memory function seriously. Within a certain time after CCI, executive control function might be have natural recovery partly, but the spatial learning and memory might be have aggravated damages.

Author's address Dept. of Rehabilitation, the People's Hospital of Anyang City, Anyang, Henan, 455000

Key word traumatic brain injury; controlled cortical impact; prefrontal lobe; executive control; spatial learning; spatial memory

颅脑创伤(trumatic brain injury, TBI)在全世界范围内属于多发性疾病,其致死率和致残率居于创伤的首位^[1]。虽然TBI的总体死亡率由30年前的50%降低至目前的30%左右,但是存活的患者中,轻度损伤患者10%会遗留永久残疾,而中重度患者这一比例可达到60%—100%^[2]。

大规模的流行病学研究发现,TBI患者额叶受损的发生率是最高的,尤其是前额叶,因此执行功能障碍在TBI患者上尤为突出。即使在轻度TBI后,仍会出现执行功能的异常,而额叶损伤的严重程度与执行功能障碍之间存在正相关^[3]。我们曾对125例重度TBI患者的认知障碍特点进行了分析,65%患者累及一侧或双侧额叶,而执行功能障碍的发生率在80%以上^[4]。

本研究选择成年雄性SD大鼠,通过控制性皮质挫伤(controlled cortical impact, CCI)造模方法,制作双侧前额叶中度损伤模型,通过GO/NO GO任务测试和水迷宫测试,观察其对大鼠的执行控制功能和空间学习与记忆功能的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

选取3月龄、体重(275±25)g的健康清洁级雄性SD大鼠(购于中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心)60只。饲养条件:温度(21±1)℃,光/暗周期为12h/12h,光照时间为7:00—19:00,术前、术后均每日给予充足的水分及食物,术前禁食8h。

按简单随机原则分为3组:正常对照组(n=10)、假手术组(n=10)、CCI组(n=20)。

1.2 制作颅脑创伤模型

应用eCCI-6.3装置按Dixon CE等学者描述的程序进行造模^[8]。大鼠用10%水合氯醛(0.3ml/100g)腹腔麻醉后进行双侧额叶开颅手术,在前凶门及人字缝之间距中线3mm进行去骨瓣手术,骨瓣直径≥5mm,利用CCI打击器进行皮质撞击,打击参数为:打击速度:3.5m/s,打击深度:1.5mm,停留时间:400ms^[9]。正常对照组不做任何处理。假手术组只做开颅去骨瓣手术,不进行打击。

1.3 水迷宫测试

水温控制在(28±1)℃,水中加入黑色素以免看清水下平台,并减少水底结构的定位影响^[6]。①定位航行实验:平台置于其中一个象限中央并低于水面2cm。将大鼠头朝池壁放入水中,放入位置随机取除平台放置象限的其余三个象限之一,每日放入象限的顺序是随机的。如果大鼠超过60s仍找不到隐藏的平台,则由实验者将其引导到平台上,并停留10s。连续3d对每只大鼠每天训练4次,两次训练间隔15—20min,记录逃避潜伏期^[7]。②空间探索实验:定位航行实验次日,将大鼠由原先平台象限的对侧放入水中,记录60s内大鼠在原先放置平台的象限所花的时间占总时间的百分比。各组大鼠均在CCI前1天进行水迷宫基线测定,并于CCI后第4周末及CCI后第8周末分别再次进行水迷宫测试。

1.4 GO/NO GO任务测试

测试方法同训练方法,每只大鼠共进行20次测试(包括10次GO任务和10次NO GO任务),记录正确率,以百分比表示。各组大鼠均在CCI前1天进行GO/NO GO任务测试,并要求正确率达到85%以上(执行控制功能良好),并于CCI后第4周末及CCI后第8周末分别再次进行GO/NO GO任务测试。

1.5 执行控制训练

动物先进行爬杆训练,学会后进行执行控制训练,大鼠能对连续两次灯光刺激(间隔5s)进行爬杆反应为GO反应(若不爬杆则在第二次灯光出现15s后给予电击);对一次持续灯光刺激(20s)则不爬杆为NO GO反应(若爬杆则用环钳夹痛尾巴并将其拉下杆)。每天训练两次,每次30min,共训练4周^[5]。

1.6 统计学分析

数据采用SPSS 16.0进行分析。计数资料以绝对值和百分比表示,计量数据以平均值±标准差的形式表示。各时间点水迷宫测试结果进行重复测量方差分析,相同时间点各组间采用单因素方差分析,采用post hoc中LSD检验进行组间比较。空间探索试验在目标象限所用时间各组间采用单因素方差分析,各组间比较应用LSD检验。

2 结果

2.1 GO/NO GO任务测试结果

造模前各组无显著差异;造模后第4周对照组和假手术组的正确率有下降,但与造模前相比无显著性差异($P > 0.05$),CCI组则有显著下降($P < 0.01$);造模后第8周,各组的正确率下降和造模前比均有显著性差异($P < 0.05$),而与第4周比,CCI组的正确率有上升,但无显著性差异。见表1。

2.2 水迷宫空间学习测试结果

造模前各组无显著差异;造模后各组潜伏期均有下降,对照组和假手术组下降有显著性差异($P < 0.05$),但CCI组无显著性差异;第4、8周,与对照组相比,CCI组则均有显著性差异($P < 0.01$)。见表2。

2.3 水迷宫空间记忆测试结果

造模前各组无显著差异;造模后第4周,对照组和假手术组与造模前相比无显著性差异($P > 0.05$),

CCI组则有显著下降($P < 0.01$);造模后第8周,假手术组和CCI组与造模前相比差异有显著性意义($P > 0.05$),CCI组则与第4周相比也有显著差异($P < 0.01$)。见表3。

表1 各组大鼠GO/NO GO任务测试正确率 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	例数	造模前	第4周	第8周
对照组	10	92.4±4.5	87.2±7.2	80.2±8.6 ^①
假手术组	10	91.5±4.8	85.3±5.5	81.2±7.5 ^①
CCI组	20	92.1±3.6	63.2±7.4 ^②	70.4±6.6 ^②

与造模前相比:① $P < 0.05$;与对照组相比:② $P < 0.01$

表2 各组水迷宫测试潜伏期变化 ($\bar{x} \pm s, s$)

组别	例数	造模前	第4周	第8周
对照组	10	28.12±5.65	22.24±4.90 ^①	20.23±2.56 ^①
假手术组	10	26.55±3.11	21.40±4.36 ^①	20.86±2.88 ^①
CCI组	20	26.66±3.51	25.35±4.27 ^②	23.92±6.85 ^②

与造模前相比:① $P < 0.05$;与对照组相比:② $P < 0.05$

表3 各组水迷宫空间记忆测试目标象限停留时间占总时间百分比 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	例数	造模前	第4周	第8周
对照组	10	58±5	54±4	50±7
假手术组	10	56±4	49±8	47±6 ^①
CCI组	20	56±5	42±8 ^①	30±6 ^{①②}

与造模前相比:① $P < 0.05$;与第4周相比:② $P < 0.01$

3 讨论

3.1 TBI造模方法的选择

TBI造模方法有液压损伤法、压缩气击法、落体撞击法、打击损伤法等,这些方法在一定程度上都模拟了人类头部外伤的受力过程和病理表现,而且不需开颅,操作简便,但是均存在实验结果受动物头颅发育差异的影响,重复性差的问题^[10]。本研究使用的控制性皮质损伤模型是通过电子脑皮质挫伤撞击仪控制打击的方向、力度、速度等参数实现的,而且开颅后进行打击,去除了颅骨的影响,因而具有部位精确、参数可控、重复性高等特点^[8]。目前是国际公认和常用的大鼠TBI造模方法。

3.2 执行控制及空间学习和记忆功能的评价方法

认知障碍是中重度TBI患者最为常见的症状之一,TBI后认知障碍可以表现为记忆障碍、注意障碍、执行功能障碍、思维障碍等多种形式。执行功能是指个体在实施目的行为过程中以动态、灵活的方式协调多个认知子系统活动的复杂认知过程;是在

实现某一特定目标时,个体所使用的灵活而优化的认知和神经机制,包括计划、工作记忆、控制冲动、抑制、定势转移或心理灵活性以及动作产生和监控等一系列功能。研究表明,与执行功能相关的脑结构包括额叶-纹状体环路和小脑等,额叶-纹状体环路包括背外侧前额叶、眶额叶、前扣带回和基底神经节等^[11]。作为大脑进化中最高级的部分,额叶处于额叶-纹状体环路的中心。额叶损伤患者在许多执行功能任务中的成绩都较差,但是他们的其他认知功能,如记忆和智能等可以表现正常^[12]。

目前测定人类的执行功能的方法有^[13]:①注意和抑制,是将注意力集中于相关的信息和加工过程,抑制无关信息,常用的测验有 Stroop 测验、Go/No Go 任务;②工作记忆,是指在短时间内贮存和保持信息的能力,常用的测验有双任务法、自我组织的工作记忆;③计划某一任务,常用瑞文推理测验测定;④决定和监控,常用的测验有河内塔测验等。而测定动物(恒河猴或大鼠)执行控制功能的主要方法为 Go/No Go 测验^[14]。

Morris 水迷宫实验是由美国科学家 Richard GM Morris 建立,是一种通过寻找水池中隐藏平台来进行自救的行为能力来测定记忆功能的方法,最初用于研究脑内结构对学习及记忆的调节作用,后来逐步发展成为目前最为常用的在神经行为学及神经药理学中评价动物空间学习与记忆的模式。Crabbe 比较了水迷宫实验各项指标,认为潜伏期是最少受到外界环境影响的指标,并且不受动物年龄、品系等影响,故潜伏期是评价水迷宫表现的最佳指标^[15]。故本实验选用潜伏期作为最主要评价空间学习的指标;空间探索实验中目标象限停留时间作为空间记忆的检测指标。

3.3 大鼠双侧前额叶损伤对执行控制及空间学习和记忆功能的影响

本研究发现,随着时间的延长,各组大鼠的执行控制能力均呈下降趋势,说明不经过反复的强化训练,执行控制能力会逐渐减弱,尤其在第8周更为明显;而 CCI 组则在第4周下降最为明显,第8周对照组稍有改善,说明双侧额叶损伤对执行控制功能有严重影响,但可能会有部分的自然恢复过程。假手术组在饲养4周、8周后潜伏期有显著减少,说明正

常大鼠的空间学习能力良好;而 CCI 组潜伏期虽有减少,但均长于对照组及假手术组,说明 CCI 损害了大鼠的空间学习能力。空间探索实验中 CCI 组在造模后第4、8周的目标象限停留时间百分比均少于对照组及假手术组,说明造模后空间记忆功能也明显受损,而第8周较第4周相比下降更明显,说明随着时间延长,空间记忆功能受损可能会逐渐加重。

本实验证实,应用 CCI 方法进行双侧额叶撞击制备大鼠中度 TBI 模型,可以造成大鼠执行控制能力的显著下降,并对大鼠的空间学习和记忆能力均有严重影响。在伤后一定时间内,执行控制能力可能会有部分的自然恢复,但空间学习和记忆能力则可能进行性加重。

参考文献

- [1] 刘波,刘诗翔.中国人脑外伤的流行病学研究现状[J].神经病学与神经康复学杂志,2005,2(3):179—181.
- [2] 张小年,张皓.创伤性颅脑损伤国内研究进展[J].中国康复理论与实践,2008,14(2):101—104.
- [3] Proctor A, Wilson B, Sanchez C, et al. Executive function and verbal working memory in adolescents with closed head injury (CHI)[J]. Brain Inj, 2000, 14(7):633—647.
- [4] 张皓,张小年,山磊,等.脑外伤患者认知障碍的特点及康复疗效分析[J].中国康复,2010,25(2):90—92.
- [5] 李敏,黎海蒂,汪涛,等.GABA 及 GABA α 受体在大鼠前额叶执行控制中的作用机制研究[J].中国行为医学科学,2004,13(6):626—627.
- [6] D'Hooge R, De Deyn PP. Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory[J]. Brain Res Brain Res Rev, 2001, 36(1):60—90.
- [7] Kwak MJ, Park HJ, Nam MH, et al. Comparative study of the effects of different growth hormone doses on growth and spatial performance of hypophysectomized rats[J]. J Korean Med Sci, 2009, 24(4):729—736.
- [8] Dixon CE, Clifton GL, Lighthall JW, et al. A controlled cortical impact model of traumatic brain injury in the rat[J]. J Neurosci Methods, 1991, 39(3):253—262.
- [9] Guseva MV, Hopkins DM, Scheff SW, et al. Dietary choline supplementation improves behavioral, histological, and neurochemical outcomes in a rat model of traumatic brain injury[J]. J Neurotrauma, 2008, 25(8):975—983.
- [10] 尹延庆,陈兵.创伤性脑损伤模型的研究进展[J].广东医学院学报,2008,(26):648—651.
- [11] Bradshaw JL, Sheppard DM. The neurodevelopmental frontostriatal disorders: evolutionary adaptiveness and anomalous lateralization[J]. Brain Lang, 2000, 73(2):297—320.
- [12] 杨炯炯,周晓林,陈焯之.大脑执行功能障碍与相关疾病[J].中华精神科杂志,2002,(35):122—124.
- [13] Smith EE, Jonides J. Storage and executive processes in the frontal lobes[J]. Science, 1999, 283(5408):1657—1661.
- [14] 李敏.恒河猴及大鼠前额叶在执行控制中的作用及机制研究[D].重庆:第三军医大学.2002年博士学位论文
- [15] Crabbe JC, Wahlsten D, Dudek BC. Genetics of mouse behavior: interactions with laboratory environment[J]. Science, 1999, 284(5420):1670—1672.