DOI:10.16016/j.1000-5404.201408206

论著

重复经颅直流电刺激对阿尔茨海默大鼠学习记忆能力的影响

俞雪鸿[1],温惠中[2],张运明[1],黄晓倩[1],唐媛恬[1],田学隆[1] (400030 重庆,重庆大学生物工程学院[1];400038 重庆,第三军医大学基础医学部神经生物学教研室,重庆市神经科学研究所[2])

[摘要] **目的** 观察重复阳极经颅直流电刺激(transcranial direct current stimulation,tDCS)对阿尔茨海默病(Alzheimer's disease,AD)大鼠学习记忆能力的影响。**方法** 将36只SD大鼠分为假手术组、AD组、20 μA刺激组、60 μA刺激组、100 μA刺激组和200 μA刺激组,每组6只。AD组和刺激组的海马注射$A\beta_{1-40}$制作AD模型。术后2周,刺激组接受重复阳极tDCS,而AD组和假手术组接受假刺激。tDCS后,用Morris水迷宫和Y迷宫检测大鼠学习记忆能力,尼氏染色观察大鼠海马神经元形态变化。**结果** Morris水迷宫结果显示,60、100、200 μA刺激组的潜伏期均较AD组明显降低($P<0.05$)。大鼠经过原平台的次数和原平台象限游泳时间各组间差异并没有统计学意义($P>0.05$)。Y迷宫结果显示100 μA和200 μA刺激后,大鼠学习记忆成绩较AD组均有明显改善($P<0.05$)。尼氏染色显示tDCS后大鼠海马神经元胞质中尼氏体数量增加,染色加深。**结论** 重复阳极tDCS能改善AD大鼠学习记忆功能障碍。

[关键词] 经颅直流电刺激;阿尔茨海默病;学习记忆;阳极
[中图法分类号] R338.64;R454.1;R745.7 [文献标志码] A

Effect of repeated transcranial direct current stimulation on learning and memory ability in rat models of Alzheimer's disease

Yu Xuehong[1], Wen Huizhong[2], Zhang Yunming[1], Huang Xiaoqian[1], Tang Yuantian[1], Tian Xuelong[1] ([1]College of Bioengineering, Chongqing University, Chongqing, 400030; [2]Department of Neurobiology, College of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of repeated anodal transcranial direct current stimulation (tDCS) on the learning and memories abilities in rat model of Alzheimer's disease (AD). **Methods** Sprague-Dawley rats were randomly allocated to a sham group, an AD group, a 20 μA tDCS group, a 60 μA tDCS group, a 100 μA tDCS group and a 200 μA tDCS group. The hippocampi of the rats in the AD group and the tDCS groups was subjected to $A\beta_{1-40}$ injection to establish AD models. In postoperative 2 weeks, repeated anodal tDCS was applied to the frontal cortex of the rats in the tDCS groups, while the rats in the AD group and the sham group received sham stimulation. After tDCS, the learning and memory abilities of the rats was assessed by Morris water maze and Y-maze tests, and Nissl staining was performed to reveal morphological changes of hippocampus neurons. **Results** The Morris water maze test results showed that, compared with the AD group, the 60 μA tDCS group, 100 μA tDCS group and 200 μA tDCS group showed significant decrease of the escape latency ($P<0.05$), but there were no significant changes in the platform-crossing times and swimming time in platform quadrant ($P>0.05$). The Y-maze test results showed that, tDCS with current intensity of 100 μA and 200 μA significantly improved the learning and memory performance of the AD rats ($P<0.05$). tDCS could increase the Nissl body number and deepen staining.

[基金项目] 重庆市科技攻关项目(CSTC2010AA5049);重庆大学中央高校基本科研业务费"研究生科技创新基金"(CDJXS12231104)
[通信作者] 田学隆,E-mail:xltian@cqu.edu.cn
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20141205.1534.113.html(2014-12-03)

Conclusion Repeated anodal tDCS may alleviate learning and memory dysfunction in the rat models of AD.

[**Key words**] transcranial direct current stimulation; Alzheimer's disease; learning and memory; anode

Supported by the Tackling Project of Sci & Tech Research of Chongqing (CSTC2010AA5049) and the Postgraduate Sci&Tech Innovative Foundation of Central Universities Fundamental Research Funds of Chongqing University(CDJXS12231104). Corresponding author: Tian Xuelong, E-mail: xltian@cqu.edu.cn

经颅直流电刺激(transcranial direct current stimulation, tDCS)以微弱直流电流刺激大脑皮层,诱导神经元兴奋性可逆的改变[1]。目前研究tDCS对阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)疗效的实验只有数例。Ferrucci等[2]研究用tDCS刺激AD患者的颞顶区,发现阳极tDCS可以提高患者词语识别记忆准确度,阴极tDCS起到了相反的作用,且tDCS对视觉注意力没有作用。Boggio等[3]报道连续5 d的阳极tDCS可提高AD患者视觉识别能力,后效至少能维持4周。虽然tDCS对AD具有潜在的治疗作用,但tDCS对学习记忆功能的改善机制还尚不清楚,而且没有分析影响tDCS疗效的因素。影响tDCS疗效的因素诸多,包括刺激强度、刺激时间、刺激极性和刺激位置等,其中刺激强度对疗效的影响最大[4]。本实验运用不同强度的重复阳极tDCS刺激AD大鼠模型的额叶区,通过观察分析大鼠学习记忆行为,以期证实重复tDCS可显著改善AD大鼠学习记忆行为。

1 材料与方法

1.1 动物、主要试剂及仪器

健康雌性SD大鼠36只,月龄4个月,体质量250~320 g,由第三军医大学实验动物中心提供,适应性饲养1周后开始实验。$A\beta_{1-40}$(No. SCP0037),Sigma公司提供;经颅直流电刺激仪,由重庆大学提供。

1.2 方法

1.2.1 $A\beta_{1-40}$的孵育 将$A\beta_{1-40}$用无菌生理盐水稀释为2 μg/μL,37 ℃下孵育1周,形成聚集态后放入4 ℃冰箱中保存。

1.2.2 动物分组 将36只大鼠分为假手术组、AD组、20 μA刺激组、60 μA刺激组、100 μA刺激组、200 μA刺激组,每组6只。

1.2.3 模型制备 采用双侧海马注射$A\beta_{1-40}$法制作AD模型[5]。对AD组和刺激组大鼠腹腔注射10%水合氯醛(4 mL/kg)麻醉后,进行头部固定和毛皮准备。根据《大鼠脑立体定位图谱》[6]确定海马位置。左右海马注射点坐标:前囟后3.4 mm,中线左右各旁开2 mm,颅骨表面下3.5 mm。5 μL $A\beta_{1-40}$在5 min内匀速注入海马注射点,留针5~10 min,按1.0 mm/min速度缓慢拔针,缝合皮肤筋膜并消毒。假手术组海马注入等量生理盐水。

1.2.4 经颅直流电刺激 造模2周后,用牙科水泥将刺激电极固定于大鼠的右侧额叶区,矩形参考电极固定于胸腹部[7]。刺激时需用生理盐水浸湿电极以保证其良好的导电性[8]。电极安装后次日开始给予电刺激。对各刺激组大鼠给予重复的阳极tDCS,刺激强度分别为20、60、100、200 μA,单次刺激时间为20 min,每天1次,连续刺激4 d为1个疗程,连续2个疗程,疗程间隔2 d。假手术组和AD组则接受相同条件下的10 s的直流刺激(假刺激)。

1.2.5 行为学测试 tDCS结束后引入Morris水迷宫和Y迷宫测试大鼠的空间学习记忆能力。

1.2.5.1 Morris水迷宫[9] 将水迷宫边缘等距离分为E、S、W、N 4个方向,迷宫被平分为4个象限。平台置于ES象限中央,低于水面1.0~2.0 cm。实验过程中保持周围环境安静,各参照物位置不变。

定向导航实验:实验前1 d,大鼠在迷宫中熟悉环境2 min(不放平台)。实验时,逐一将大鼠放入水中,记录大鼠在120 s内找到平台所需的时间,即潜伏期。若120 s内未找到平台,引导大鼠到平台上并停留10 s,潜伏期记为120 s;若120 s内找到平台,也让其在平台上停留10 s,以巩固记忆。每天训练大鼠4次,两次训练间隔15~20 min,连续训练4 d。

空间搜索实验:第5天,随机选一象限将大鼠放入水中(不放平台),观察大鼠在120 s内的经过原平台的次数和原平台象限游泳时间。

1.2.5.2 Y迷宫 学习能力测试:采用不固定次数随机法测试大鼠学习记忆能力[10]。将大鼠放入Y迷宫中适应5 min后再施加电刺激(设置刺激参数为:电压60 V,延时5 s)。训练时,随机变换安全区,规定大鼠受到电击后一次性逃往安全区为正确反应,并让其在安全区停留30 s,以巩固记忆。当大鼠连续10次训练中有9次正确反应(9/10),则表示学习合格。记录大鼠达到9/10标准前所需的训练次数,以定量表征其学习合格时的成绩。

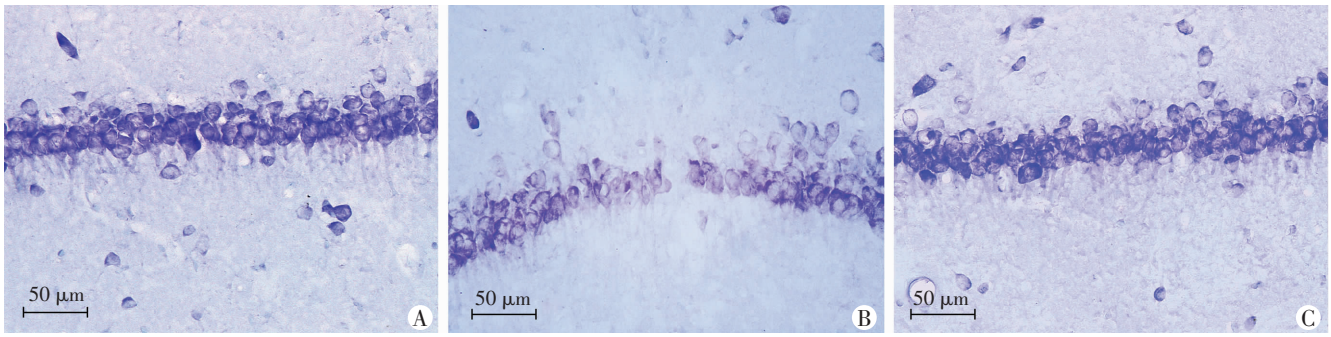
记忆能力测试:训练结束后24 h,按上述方法训练大鼠10次,记录正确反应次数作为记忆成绩,以表征记忆能力的高低。

1.2.6 病理形态学观察 待行为测试完成后,对各组大鼠脑组织进行灌注固定,制成25 μm厚冰冻切片,并行尼氏染色。

表 1　重复经颅直流电刺激不同时间点各组大鼠潜伏期的比较（t/s，$n=6$，$\bar{x}\pm s$）

组别	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天
假手术组	37.83 ± 15.86[a]	27.75 ± 6.22[a]	12.54 ± 3.76[a]	9.38 ± 3.18[a]
AD 组	81.00 ± 20.77	62.71 ± 17.78	48.04 ± 16.52	40.58 ± 20.36
20 μA 刺激组	64.54 ± 11.87	50.88 ± 16.71	43.42 ± 8.25	32.04 ± 18.08
60 μA 刺激组	55.71 ± 10.42[a]	47.54 ± 18.10[a]	39.13 ± 13.74[a]	24.42 ± 8.30[a]
100 μA 刺激组	48.54 ± 15.84[a]	35.00 ± 14.65[a]	16.04 ± 7.94[a]	18.83 ± 4.13[a]
200 μA 刺激组	45.33 ± 15.26[a]	21.67 ± 12.08[a]	19.71 ± 6.65[a]	13.58 ± 5.66[a]

a：$P<0.05$，与 AD 组比较



A：假手术组；B：AD 组；C：200 μA 刺激组

图 1　重复经颅直流电刺激后各组大鼠海马 CA1 区尼氏染色观察

1.3　统计学处理

数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示，应用 SPSS 19.0 分析处理。Morris 水迷宫中定向导航实验潜伏期采用重复测量单因素方差分析，空间搜索实验和 Y 迷宫数据采用单因素方差分析。若比较有统计学意义，则组间用 Bonferroni 进行 post hoc 比较。

2　结果

2.1　经颅直流电刺激后各组 Morris 水迷宫行为的比较

2.1.1　定位导航实验　与假手术组相比，AD 组各时间点的潜伏期明显延长（$P<0.05$），提示 AD 大鼠学习记忆能力减退。在 60、100、200 μA 的直流刺激后，大鼠的潜伏期与 AD 组相比得到大幅度的下降（$P<0.05$）。而 20 μA 的刺激虽然也能减小 AD 大鼠潜伏期，但与 AD 组相比却无统计学差异（$P>0.05$，表 1）。

2.1.2　空间搜索实验　虽然 tDCS 可增加 AD 大鼠经过原平台次数和原平台象限游泳时间，但增加作用均不显著（$P>0.05$，表 2）。

2.2　经颅直流电刺激后各组 Y 迷宫行为的比较

与假手术组相比，AD 组达到 9/10 标准所需的训练次数明显增加，记忆成绩明显下降（$P<0.05$）。100 μA 组和 200 μA 组的学习、记忆成绩较 AD 组均有明显改善（$P<0.05$），20 μA 和 60 μA 的电刺激对 AD 大鼠 Y 迷宫行为无显著影响（$P>0.05$，表 3）。

表 2　重复经颅直流电刺激后各组大鼠空间搜索实验行为的比较（$n=6$，$\bar{x}\pm s$）

组别	经过原平台次数（次）	原平台象限游泳时间（t/s）
假手术组	8.67 ± 3.33	52.00 ± 14.90
AD 组	4.33 ± 1.86	37.83 ± 10.46
20 μA 刺激组	4.67 ± 2.73	46.17 ± 13.60
60 μA 刺激组	6.83 ± 2.99	49.50 ± 7.26
100 μA 刺激组	8.17 ± 1.83	50.17 ± 19.32
200 μA 刺激组	9.33 ± 3.83	51.67 ± 7.87

a：$P<0.05$，与 AD 组比较

表 3　重复经颅直流电刺激后各组大鼠 Y 迷宫行为的比较（次，$n=6$，$\bar{x}\pm s$）

组别	学习成绩	记忆成绩
假手术组	32.50 ± 7.92[a]	8.17 ± 1.17[a]
AD 组	67.17 ± 19.79	3.50 ± 2.59
20 μA 刺激组	58.00 ± 10.79	3.83 ± 1.72
60 μA 刺激组	49.83 ± 10.65	5.17 ± 2.40
100 μA 刺激组	42.33 ± 5.57[a]	6.33 ± 2.07[a]
200 μA 刺激组	38.67 ± 12.61[a]	7.83 ± 0.75[a]

a：$P<0.05$，与 AD 组比较

2.3　尼氏染色结果

与假手术组相比，AD 组大鼠海马 CA1 区神经元排列稀疏紊乱，尼氏体染色较浅，数量减少。而阳极 tDCS 后，大鼠海马 CA1 区神经元较 AD 组形态规则，胞质内尼氏体染色深，数量明显增加（图 1）。

3 讨论

AD是一种进行性发展的神经退行性疾病。临床上多表现为记忆力和认知功能的减退,到AD中后期,甚至并发各种精神病症状(如失语、失认和抑郁等)和行为障碍[11]。据统计,2006年总共2 660万人患有AD,随着社会的老龄化,AD患者数目在2050年预估会增长4倍[3]。目前,可用的AD治疗方式不但价格昂贵,疗效不理想,甚至还会引入副作用。tDCS的出现无疑为AD的治疗提供了一种新的思路。研究结果一致表明tDCS具备改善AD患者认知能力的可能性,但并未分析影响tDCS疗效的因素,尤其是刺激强度对疗效的影响。

因此本实验对AD大鼠右侧额叶区重复施加不同强度的阳极tDCS,结果显示与假手术组相比,AD组大鼠在Morris迷宫和Y迷宫中出现明显学习记忆功能障碍,海马神经元尼氏体数量减少,着色变浅。100 μA和200 μA的重复阳极tDCS可显著性提高大鼠Morris迷宫和Y迷宫学习记忆水平,尼氏体数目增加,染色加深。而20 μA和60 μA的tDCS对AD大鼠的作用不显著,表明tDCS疗效具有刺激强度依赖特点。当tDCS作用时,阳极和阴极之间微弱的直流电流在大脑内诱发静电场,在电势差的驱动下,神经元膜内外Na^+和Ca^{2+}发生迁移,从而起到调节神经元静息膜电位的作用[12]。阳极tDCS通过膜电位的去极化以增加靶区域的兴奋性,阴极tDCS则超极化膜电位以抑制靶区域的兴奋[13]。如果刺激电流过小,那么由于头皮和颅骨对电流的分流,电流不足以极化靶区域,引起兴奋性的改变。只有应用足够强的刺激电流(本实验为100 μA和200 μA)才可穿透障碍,以调节额叶皮层以及与学习记忆相关的神经回路的兴奋性。

不同于人体实验中安放电极的模式,本实验中选择非对称式安放电极:刺激电极固定于右侧额叶皮层,参考电极固定于胸腹部。这种电极安放模式有4个优点:①通过使用面积较小的刺激电极和面积较大的参考电极,可补偿tDCS较差的空间聚焦性[14]。②相距较远的两个电极可减少电流在头皮和颅骨的分流,最大限度提高刺激位置下皮层的电流密度[15]。③如果将参考电极放置在左侧额叶皮层,则刺激疗效可能是因为阳极tDCS诱发的右侧皮层兴奋性的增强,还需考虑因阴极tDCS对经胼胝体抑制的减弱作用而引起的右侧皮层兴奋性的增强。如此就无法单一分析阳极tDCS的影响。因此放置在胸腹部的参考电极,仅为了实现闭合的刺激回路,不会叠加对右侧皮层兴奋性的影响[16]。④经测试,固定于头部的刺激电极十分的牢固,可防止刺激过程被大鼠打断。

我们选择额叶皮层作为刺激的靶位置,而不是常用的M1区。因为在Boggio等[17]研究阳极tDCS对帕金森病患者的工作记忆能力的影响的实验中,发现用阳极tDCS刺激患者左前额叶皮层背外侧区(DLPFC),工作记忆明显提升。而阳极刺激M1区和假刺激对工作记忆都没有产生明显的改变。其研究表明在改进工作记忆方面,刺激DLPFC区比刺激M1区所得到的效果更明显。

一般认为tDCS的安全性取决于刺激电流密度(电流强度/电极面积)。Liebetanz等[15]发现:将500 μA电流(电流密度为142.9 A/m^2)作用于大鼠M1区不到10 min,便可观察到明显的脑组织损伤,故规定动物实验中使用tDCS的电流密度安全阈值为142.9 A/m^2。本实验中最大tDCS电流密度为63.69 A/m^2(200 μA/3.14 mm^2),没有超过安全阈值。

本研究结果证实重复阳极tDCS可显著性改善AD大鼠学习记忆功能障碍,旨在为tDCS在AD临床中的应用提供必要的支持。但是本研究也存在一些不足:没有检测重复tDCS后效的持续情况,没有检测阴极tDCS对AD的作用,tDCS与运动训练以及药物治疗相结合是否能产生更显著的疗效等,在后续实验中有必要对上述问题进行探讨。

参考文献:

[1] Hummel F C, Cohen L G. Non-invasive brain stimulation: a new strategy to improve neurorehabilitation after stroke? [J]. Lancet Neurol, 2006, 5(8): 708-712.

[2] Ferrucci R, Mameli F, Guidi I, *et al*. Transcranial direct current stimulation improves recognition memory in Alzheimer disease [J]. Neurology, 2008, 71(7): 493-498.

[3] Boggio P S, Ferrucci R, Mameli F, *et al*. Prolonged visual memory enhancement after direct current stimulation in Alzheimer disease [J]. Brain Stimul, 2012, 5(3): 223-230.

[4] Nitsche M A, Cohen L G, Wassermann E M, *et al*. Transcranial direct current stimulation: State of the art 2008 [J]. Brain Stimul, 2008, 1(3): 206-223.

[5] 姜礼红, 张一娜, 宋芳芳, 等. 凝聚态$A\beta_{1-40}$海马内注射致AD大鼠在体神经毒性作用[J]. 南京医科大学学报:自然科学版, 2007, 27(12): 1373-1376, 插1.

[6] Paxinos G, Watson C. 大鼠脑立体定位图谱[M]. 诸葛启钏, 译. 3版. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 30-36.
[7] 李一言, 田学隆, 蒋巍巍, 等. 不同强度经颅直流电刺激对帕金森大鼠旋转行为学的影响[J]. 第三军医大学学报, 2012, 34(4): 363-366.
[8] Dundas J E, Thickbroom G W, Mastaglia F L. Perception of comfort during transcranial DC stimulation: effect of NaCl solution concentration applied to sponge electrodes [J]. Clin Neurophysiol, 2007, 118 (5): 1166-1170.
[9] 徐世军, 马涛, 张文生, 等. 解毒益智胶囊对慢性脑缺血性学习记忆障碍大鼠学习记忆和海马突触素表达的影响[J]. 中药药理与临床, 2011, 27(3): 93-96.
[10] 王跃春. 大鼠Y-型迷宫测试法的筛选与优化[J]. 中国行为医学科学, 2005, 14(1): 50-52.
[11] Stuchbury G, Munch G. Alzheimer's associated inflammation, potential drug targets and future therapie [J]. J Neural Transm, 2005, 112(3): 429-453.
[12] Liebetanz D, Nitsche M A, Tergau F, *et al*. Pharmacological approach to the mechanisms of transcranial DC-stimulation-induced after-effects of human motor cortex excitability [J]. Brain, 2002, 125(Pt 10): 2238-2247.
[13] Cambiaghi M, Velikova S, Gonzalez-Rosa J J, *et al*. Brain transcranial direct current stimulation modulates motor excitability in mice[J]. Eur J Neurosci, 2010, 31(4): 704-709.
[14] Nitsche M A, Doemkes S, Karakose T, *et al*. Shaping the effects of transcranial direct current stimulation of the human motor cortex[J]. J Neurophysiol, 2007, 97(4): 3109-3117.
[15] Liebetanz D, Koch R, Mayenfels S, *et al*. Safety limits of cathodal transcranial direct current stimulation in rats [J]. Clin Neurophysiol, 2009, 120(6): 1161-1167.
[16] Hummel F, Celnik P, Giraux P, *et al*. Effects of non-invasive cortical stimulation on skilled motor function in chronic stroke [J]. Brain, 2005, 128(Pt 3): 490-499.
[17] Boggio P S, Ferrucci R, Rigonatti S P, *et al*. Effects of transcranial direct current stimulation on working memory in patients with Parkinson's disease [J]. J Neurol Sci, 2006, 249(1): 31-38.

(**收稿**:2014-08-29;**修回**:2014-10-20)
(编辑 王小寒)

关于计量单位的使用

在医学领域中几乎时时处处都离不开计量单位。国务院于1984-02-27公布了《关于在我国统一实行法定计量单位的命令》和《中华人民共和国法定计量单位》。1993-12-27国家技术监督局发布了《量和单位》国家强制标准,全国必须统一采用的计量单位。

我国的法定计量单位包括:①国际单位制的基本单位,如长度(m)、质量(kg)、时间(s)等;②国际单位制的辅助单位;③国际单位制中具有专门名称的导出单位,如频率(Hz)、压力(Pa)、能量(J);④国家选定的非国际单位制单位,如时间(min、h、d)、转速(r/min);⑤由以上单位构成的组合形式单位,如速度(m/s)、浓度(mol/L);⑥由词头和以上单位所构成的倍数和分数单位,如μm、kPa、mL等。在医学写作时必须严格执行国务院的命令和有关的国家标准。

各种单位除在无数值的叙述性文字中和科普读物中可使用中文名称或中文符号外,均应使用符号。单位符号都是正体拉丁和希腊字母,无复数形式,符号后不附加圆点(正常语法名字尾标点符号除外)。来源于人名的单位,例如:Pa、Gy、W等和10^6以上的词头,例如:M、G、T等的首字母大写以外均为小写,容积"升"的符号可用大写(L)也可用小写(l),一般在单独使用不加词头时用大写。数值与单位符号之间、单位符号与相邻的其他符号(例如:化学元素符号)之间应留半个阿伯数字空隙,词头与其所组合的单位符号之间不需空隙。词头不能单独使用,也不能重叠使用(例如:"mμm"应为"nm")。

本刊编辑部