

自发性高血压大鼠肝火亢盛证的认知功能变化

王 田 赵慧辉 邓 冬 王宏亮 李雪丽 刘婧玮 商晓迪 蔡榕琪 马雪玲 王 伟

(北京中医药大学,北京,100029)

摘要 目的:评估自发性高血压大鼠(SHR)肝火亢盛证的认知功能变化,为进一步深入研究高血压认知功能改变的机制及中医药防治奠定基础。方法:采用经典 Morris 水迷宫和跳台实验,评估肝火亢盛证 SHR 大鼠的认知功能变化,对照组采用 WKY 大鼠和 Wistar 大鼠 2 种。结果:Morris 水迷宫空间探索实验中,穿越平台次数肝火亢盛证 SHR 大鼠明显少于 Wistar 组($P < 0.05$)。跳台实验中,肝火亢盛证 SHR 大鼠跳上时间明显较 WKY 组延长($P < 0.05$),潜伏期则较 WKY 对照组明显缩短($P < 0.05$),错误次数较 WKY 组及 Wistar 显著增多($P < 0.05$)。结论:肝火亢盛证 SHR 大鼠的学习认知功能较 WKY 及 Wistar 对照组下降,主要表现为注意力和学习效率下降,受到紧张、愤怒等情绪刺激时判断力下降,且注意力和学习效率下降更为明显。

关键词 自发性高血压大鼠;肝火亢盛证;认知功能;情绪

Research on the Cognitive Function of Spontaneously Hypertensive Rats of Liver-fire Hyperactivity Type

Wang Tian, Zhao Huihui, Deng Dong, Wang Hongliang, Li Xueli, Liu Jingwei, Shang Xiaodi, Cai Rongqi, Ma Xueling, Wang Wei
(Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

Abstract Objective: To evaluate the cognitive function of spontaneously hypertensive rats (SHR) of liver-fire hyperactivity type, thus laying the foundation for further research on the mechanism of the cognitive function changes as well as the prevention and treatment of traditional Chinese medicine. **Methods:** Using the method of classical Morris water maze and step-down test to evaluate the changes of cognitive function of liver-fire hyperactivity SHR rats. The control group use WKY and Wistar rats. **Results:** In the morris water maze spatial probe test, the time of crossing the platform of liver-fire hyperactivity SHR rats was significantly reduced than that of the control group (Wistar $P < 0.05$). In the step-down test, the reaction time of liver-fire hyperactivity in SHR rats was significantly longer than that of WKY control group ($P < 0.05$), and the latency of liver-fire hyperactivity SHR is significantly shortened than that of WKY control group ($P < 0.05$). Besides, the frequency of mistakes of liver-fire hyperactivity SHR were significantly increased than that of WKY and Wistar control group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Cognitive function of liver-fire hyperactivity in SHR decreased compared with WKY and Wistar control group, mainly manifested as decreased of attention and learning efficiency. When SHR rats were affected by emotions such as tension and anger, the judgment of SHR decreased significantly, and the decrease of attention and learning efficiency was more obvious.

Key Words Spontaneously hypertensive rats; Liver-fire hyperactivity syndrome; Cognitive function; Emotion

中图分类号:R285.5 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2017.07.038

高血压是目前临床最为常见的慢性病之一,与心脑血管疾病显著相关,并与认知功能存在密切相关^[1]。有研究表明^[2],中年期高血压与认知功能障碍存在关系,而中年期高血压及病程 5 年以下的高血压患者中医证型以肝火亢盛为主^[2],肝火亢盛作为高血压早期最常见的证型^[3],研究其认知功能变化对于早期防治高血压患者认知功能减退具有重要意义。病证结合动物模型是临床研究与基础研究的重要桥梁,课题组前期研究显示,14~18 周龄的自

发性高血压大鼠(SHR)表现为稳定的肝火亢盛证^[4]。因此本研究采用高血压肝火亢盛证大鼠模型评估高血压对认知功能的影响,为今后进一步深入研究高血压肝火亢盛证认知功能改变的机制及中医药防治奠定基础。

1 材料与方法

1.1 动物与分组 14 周龄,雄性,清洁级(北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证编号:SCXK(京)2012-0001)SHR 大鼠 20 只作为观察组,适应性

基金项目:国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目资助(2011CB505106);国家自然科学基金青年项目(81503382);国家自然科学基金面上项目(81473521);北京中医药大学青年教师项目(面上项目)(2015-JYB-JSMS036)

作者简介:王田(1991.03—),女,硕士,研究方向:心血管病症结合动物模型,E-mail:wagtinna@bucm.edu.cn

通信作者:王伟(1964.09—),男,博士,研究员,博士研究生导师,研究方向:心血管方向,E-mail:wangwei@bucm.edu.cn;马雪玲(1983.11—),女,博士,讲师,研究方向:心血管应用基础及中医护理,E-mail:maxueling@126.com

喂养 1 周后,于 15 周龄测量血压基线、采集宏观表征和行为学试验,根据课题前期实验确立的证候属性判别方法^[5],进行证候属性辨识,筛选符合肝火亢盛证诊断标准的 SHR 大鼠 15 只,作为肝火亢盛证模型组。同周龄 WKY 和 Wistar 大鼠各 15 只作为正常对照组,饲养于北京中医药大学科研中心动物室,12 h 光照与黑暗交替,定期进行紫外消毒排风,自由饮水摄食,常规饲料喂养。

1.2 仪器 SoftronBP-98A 大鼠无创尾动脉测压仪(北京软隆科技有限责任公司),Morris 水迷宫及鼠博士 RD1101-MWM Morris 水迷宫视频分析系统(上海移数信息科技有限公司),跳台记录仪 YLS-3TB(北京冀诺泰科技发展有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 尾动脉收缩压测量 采用 Softron 大鼠无创尾动脉测压仪测量安静状态下大鼠血压。测量前将仪器连接好,开启热泵,温度控制在 38~40℃,大鼠用固定器固定好并置于仪器中,平均每只预热 5~10 min,严格按照仪器操作说明书规范操作,准确测量大鼠安静清醒状态尾压,连续测量多次,取其中 3 次上下差值小于 5 的结果,求均值。

1.3.2 易激惹程度分级及评分 参照文献[6]分级方法:Ⅰ级:指捉持颈部时出现尖叫、惊跳(记 1 分);Ⅱ级:指捉持颈部时欲咬人或咬人(记 2 分);Ⅲ级:指提拿尾部时即出现尖叫、惊跳甚至咬人或与同笼大鼠频繁打斗(记 3 分);无上述情况者为 0 级(记 0 分)。

1.3.3 Morris 水迷宫实验 水迷宫实验装置为一个直径 120 cm,高 50 cm 的圆形水池,分成 4 个象限,分别标记 4 个不同的入水点。实验室保持室内参照物环境不变,通过自动图像拍摄系统记录游泳轨迹。

1.3.4 定位航行实验 在其中一个象限放置一个高 30 cm,直径 10 cm 的透明圆形平台,水池中添加 25℃左右的温水直至高于平台 2 cm。先把大鼠放在平台上停留 30 s 熟悉环境,然后每次随机从其中一个入水点面朝池壁放入水池中。计算机自动跟踪大鼠游泳轨迹并记录找到平台的时间,即逃避潜伏期,训练时间为 60 s,如在记录时间内大鼠未能找到平台,则协助大鼠找到平台并允许其在平台上停留 30 s 以建立空间记忆,然后将动物移开,擦干,减少寒冷对大鼠的刺激以减少对证候表征的影响。每天测试 4 次,分别从 4 个不同入水点放入水中,取其平均值,连续训练 4 d。

1.3.5 空间探索实验 最后一次定位航行实验结束后第 2 天,将平台撤除,开始 60 s 的探查训练,将动物由原先平台象限的对侧放入水中,记录动物在目标象限停留的时间和穿过平台的次数,以此作为空间记忆的检测指标。实验原始录像数据应用水迷宫自带软件进行分析整理。

1.3.6 跳台实验 跳台实验装置为一长方形反射箱,其长径被黑色塑料板隔为若干区间,底部铺以间距为 5 mm 的铜栅,可通适当的电流;每个小的区间有一个高 3 cm 和直径为 10 cm 的小平台。实验时,将大鼠放入反射箱内适应环境 30 s,然后通以交流电,受到电击后,其正常反应是躲避电击跳上平台,大多鼠有可能再次或多次跳下平台受到电击,受到电击时又会迅速跳回平台。如此训练 5 min,并记录每只大鼠第 1 次跳上平台的时间和受到电击的次数(错误次数),以此为学习成绩。24 h 后重新测验,此次测验时,首先将鼠放在平台上,记录第 1 次跳下的时间(潜伏期)和 3 min 内的错误次数,测验时若大鼠停留在平台的时间超过 3 min,其潜伏期以 3 min 计,以此反映记忆保持情况。记录、比较不同组间大鼠记忆成绩的差异。

1.4 统计学方法 使用 SPSS 22.0 统计软件,采用($\bar{x} \pm s$)表示,多个样本均数比较采用单因素方差分析,若方差齐性采用 LSD 法进行组间比较,若方差不齐则采用 Dunnett's T3 法进行组间比较。不符合正态分布的数据使用 Wilcoxon 秩和检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 尾动脉收缩压的测量结果 肝火亢盛证 SHR 组大鼠血压明显升高,血压显著高与 WKY 组和 Wistar 组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),WKY 组与 Wistar 组血压则差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 1 3 组大鼠血压结果(mmHg, $\bar{x} \pm s$)				
组别	只数	尾动脉收缩压	<i>F</i>	<i>P</i>
肝火亢盛 SHR 组	15	181.7 ± 4.4 * [△]	219.18	0.00
WKY 组	15	128.7 ± 8.3		
Wistar 组	15	128.7 ± 7.8		

注:与 WKY 组比较,* $P < 0.05$;与 Wistar 组比较,[△] $P < 0.05$ 。

2.2 易激惹程度评分结果 肝火亢盛证 SHR 大鼠易激惹评分明显升高,显著高于 WKY 对照组和 Wistar 对照组($P < 0.05$),Wistar 大鼠评分略低于 WKY 大鼠,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.3 水迷宫实验结果

表 2 各组大鼠易激惹程度评分结果(分, $\bar{x} \pm s$)

组别	只数	易激惹程度	<i>F</i>	<i>P</i>
肝火亢盛 SHR 组	15	1.87 ± 0.83 * [△]	4.217	0.22
WKY 组	15	1.27 ± 0.60		
Wistar 组	15	1.20 ± 0.42		

注:与 WKY 组比较, * $P < 0.05$; 与 Wistar 组比较, [△] $P < 0.05$ 。

2.3.1 逃避潜伏期结果 前两天逃避潜伏期结果, SHR 肝火亢盛证的逃避潜伏期明显短于 Wistar 组 ($P < 0.05$), 但随着训练次数增加, 第 3、4 天两者差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。在水迷宫实验中, WKY 对照组表现出了明显的漂浮倾向, 潜伏期随训练次数呈增长趋势, 逃避潜伏期明显较 SHR 组及 Wistar 组大鼠延长 ($P < 0.05$)。见表 3。

2.3.2 目标象限停留时间和穿越平台次数结果 肝火亢盛证 SHR 组大鼠较 Wistar 组目标象限停留时间较短, 但两者差异并无统计学意义 ($P > 0.05$), 而 WKY 组的目标象限停留时间明显短于肝火亢盛证 SHR 组大鼠和 Wistar 组 ($P < 0.05$)。肝火亢盛证 SHR 组大鼠及 WKY 组的穿越平台次数明显少于 Wistar 组 ($P < 0.05$), WKY 组略少于肝火亢盛证 SHR 组大鼠, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 3。

2.4 跳台实验结果 与 WKY 组大鼠比较, SHR 组大鼠跳上时间明显延长、潜伏期明显缩短、错误次数明显增加 ($P < 0.05$); 与 Wistar 大鼠比较, SHR 肝火亢盛证大鼠跳上时间延长、错误次数增加 ($P < 0.05$), 而 WKY 组与 Wistar 组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 4。

3 讨论

肝火亢盛证主要由于肝失疏泄, 气郁化火, 阳亢火升, 上扰头窍所致, 高血压肝火亢盛证多表现于高血压的早期和中期, 多分布在高血压分期 I 期、II

期^[7-9], 且多发生于 55 岁以下患者^[3,7], 且多表现出急躁、易怒等肝火旺盛之相。肝火亢盛证 SHR 大鼠与肝火亢盛证高血压患者相似, 表现出急躁、易怒等特征, 易激惹评分明显升高 ($P < 0.05$)。在被电击的跳台实验中, 第 1 次跳上时间显著长于 WKY 对照组, 可能由于收到电击产生紧张、愤怒情绪, 判断力下降, 学习效率降低, 难以找到平台以及学会利用平台躲避点击, 与 Wistar 大鼠比较虽然时间更长但差异无统计学意义, 原因考虑样本量不足或学习能力虽有下降但不严重。第 2 天测试期错误次数明显多于两对照组, 可能说明记忆略差于正常对照组或注意力下降、耐心不足, 潜伏期也较 WKY 对照组明显缩短, 虽然与 Wistar 对照组差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 但数值差异巨大, 导致这种情况的原因我们认为: 1) 是大鼠个体差异较大, 样本量不足; 2) 是测试时间可以延长至 5 min, 这样组间差异能体现的更明显。

目前 Morris 水迷宫实验在国内外已得到普遍认可, 成为应用最广泛的研究和评价动物空间学习记忆能力的经典行为学实验^[10]。目前在高血压动物实验中, 主要以 WKY 大鼠作为 SHR 大鼠的对照组, 但在 Morris 水迷宫实验中, 许多研究表明 WKY 大鼠有一定的抑郁症倾向, 现已被作为难治性抑郁症的动物模型^[11], 会表现出明显的漂浮倾向, 我们的实验中也说明了这一点, 第 1 天实验时 WKY 训练潜伏期明显短于 Wistar 大鼠, 但 SHR 与 Wistar 大鼠随训练次数增加, 建立了空间记忆, 训练潜伏期日渐缩短, 而 WKY 大鼠则漂浮倾向日益严重, 潜伏期呈上升趋势, 故不适宜作为水迷宫实验的对照组。由于肝火亢盛证 SHR 大鼠的急躁、多动、活动性增加等特征, 在水迷宫实验的前两天, 找到平台的时间(潜伏期)明显短于 Wistar 大鼠 ($P < 0.05$), 第 3、第 4 天

表 3 2 组大鼠水迷宫训练潜伏期、目标象限停留时间和穿越平台次数 ($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	潜伏期(s)				目标象限停留(s)	穿越平台(次)
		第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天		
肝火亢盛 SHR 组	15	27.6 ± 14.1 [△]	22.3 ± 8.7 * [△]	21.1 ± 9.9	14.9 ± 4.4	10.7 ± 3.8	1.3 ± 0.9 * [△]
WKY 组	15	30.6 ± 12.8 [△]	38.3 ± 15.6	44.1 ± 10.3 [△]	45.5 ± 12.9 [△]	5.7 ± 9.2 [△]	0.8 ± 1.1 [△]
Wistar 组	15	47.1 ± 10.7 *	42.6 ± 12.5	26.2 ± 12.5 *	20.6 ± 13.1 *	11.6 ± 4.2 *	2.2 ± 1.2 *

注:与 WKY 组比较, * $P < 0.05$; 与 Wistar 组比较, [△] $P < 0.05$ 。

表 4 2 组大鼠跳上时间、基础错误次数、潜伏期和错误次数 ($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	跳上时间(s)	基础错误(次)	潜伏期(s)	错误(次)
肝火亢盛 SHR 组	15	89.7 ± 36.7 * [△]	2.0 ± 2.0	51.6 ± 74.2 * [△]	2.4 ± 2.0 * [△]
WKY 组	15	36.2 ± 23.9	1.8 ± 1.6	128.7 ± 76.3	0.6 ± 0.9
Wistar 组	15	61.0 ± 20.5	1.6 ± 1.3	109.3 ± 88.2	0.7 ± 0.9 *

注:与 WKY 组比较, * $P < 0.05$; 与 Wistar 组比较, [△] $P < 0.05$ 。

则差异无统计学意义($P > 0.05$)。且 Wistar 大鼠潜伏期明显缩短是在训练期的第3天,而肝火亢盛证 SHR 大鼠潜伏期明显缩短则在训练期的第四天,说明肝火亢盛证 SHR 大鼠的学习效率略低于 Wistar 组。穿越平台次数 Wistar 大鼠显著多于肝火亢盛证 SHR 大鼠($P < 0.05$),可能说明肝火亢盛证 SHR 大鼠的空间记忆略差于 Wistar 大鼠。以上结果说明,在避免了电击这种较易引起紧张、愤怒等情绪变化的刺激时,SHR 大鼠的记忆表现在潜伏期、目标象限停留时间等方面与对照组差异并不大,说明早期高血压肝火亢盛证对学习记忆影响虽有但比较小,结合跳台实验结果,说明肝火亢盛证高血压引起的认知功能变化以注意力下降和学习效率降低为主,在受到紧张、易怒等情绪影响时则出现判断力下降,且注意力和学习效率下降更为明显。

而近年来研究表明,高血压患者在合并脑卒中之前就可能有一定程度的认知损害,且有研究表明^[11],中年期高血压患者就已经出现认知功能减退,且与收缩压呈正相关性。Stewart 等^[12]的研究发现,中年期的血压会对老年期的认知功能有不利影响。Suhr 等^[13]对 20~59 岁人群的血压与认知功能的关系进行研究,结果显示收缩压与注意力和学习效率呈负相关,且对于 <40 岁的研究对象,血压升高与认知得分减低的相关性更为明显。赵君玫等^[14]则发现,单纯愤怒应激即可使大鼠的认知功能下降。

本研究发现在自发性高血压大鼠早期的肝火亢盛证时期,发生认知功能的下降,与上述研究结果基本一致,且肝火亢盛证高血压大鼠认知功能的下降更易受愤怒等情绪的影响,关于其认知功能下降的机制有待今后进一步深入研究,积极探索高血压认知功能改变的早期预防和治疗方法。

参考文献

[1]王平,曾慧. 高血压与认知功能关系研究进展[J]. 中国全科医

学,2011,14(6):677-679.

[2]Qiu C,Winblad B,Fratiglioni L. The age-dependent relation of blood pressure to cognitive function and dementia[J]. Lancet Neurol,2005,4(8):487-499.

[3]张荣珍,陈志祥,胡素颖,等. 3578 例高血压中医证型构成临床调查研究[J]. 中医药临床杂志,2007,19(4):360-364.

[4]马雪玲,李玉波,陈建新,等. 自发性高血压大鼠中医证候及其理化指标相关性研究[J]. 世界中医药,2013,8(2):134-137.

[5]马雪玲. 高血压病证结合动物模型及其肝火亢盛证的生物学基础研究[D]. 北京:北京中医药大学,2013.

[6]Ma XL,Chen JX,Li YB,et al. Study on the syndrome biological basis of essential hypertension based on literature mining[J]. Heart,2012,98(Suppl 2):E91-E91.

[7]熊兴江,王阶. 经方在高血压病治疗中的运用[J]. 中国中药杂志,2013,38(11):1836-1839.

[8]李玉洁,杨庆,翁小刚,等. 天钩降压胶囊对自发性高血压大鼠血压的影响[J]. 中国中药杂志,2011,36(23):3353.

[9]武海霞,吴志刚,刘红彬,等. Morris 水迷宫实验在空间学习记忆研究中的应用[J]. 神经药理学报,2014,4(5):30-35.

[10]王雀良,潘集阳,刘亚平,等. 抑郁症动物模型的回顾与展望[J]. 广东医学,2011,32(7):932-935.

[11]Knecht S,Wersching H,Lohmann H,et al. High-normal blood pressure is associated with poor cognitive performance[J]. Hypertension,2008,51(3):663-668.

[12]Stewart R,Xue QL,Masaki K,et al. Change in blood pressure and incident dementia;a 32-year prospective study. [J]. Hypertension,2009,54(2):233-40.

[13]Suhr JA,Stewart JC,France CR. The relationship between blood pressure and cognitive performance in the Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III) [J]. Psychosom Med,2004,66(3):291-297.

[14]赵君玫,詹向红,张娜,等. 愤怒应激对衰老大鼠认知功能的影响及机制分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(19):137-140.

(2017-05-03 收稿 责任编辑:杨觉雄)