

间歇性禁食对血管性痴呆大鼠记忆功能的影响机制

陈守涛¹, 沈天天¹, 樊婷伟¹, 查曹兵¹, 刘改玲¹, 张燕²

1. 上海电力医院神经内科, 上海 200050; 2. 上海百汇医院放射介入科, 上海 201107

[摘要] **目的** 探讨间歇性禁食(IF)对血管性痴呆(VD)大鼠记忆功能的影响机制。**方法** 将24只雄性SD大鼠随机均分为随意喂养对照组(Con-AL组)、随意喂养VD组(VD-AL组)和IF喂养VD组(VD-IF组)。Con-AL组行假手术并自由摄食,VD-AL组、VD-IF组通过手术建立VD模型后分别自由摄食和接受IF干预。术后5周,比较各组大鼠体质量;采用Morris水迷宫实验评估各组大鼠记忆功能;采用尼氏染色评估各组大鼠海马神经元缺失情况;采用LFB染色评估各组大鼠胼胝体白质损伤情况;采用免疫组化评估各组大鼠海马星形胶质细胞活化情况。**结果** 术后5周,各组大鼠体质量为VD-IF组<VD-AL组<Con-AL组($P<0.05$)。与Con-AL组比较,VD-AL组大鼠目标象限停留时间和平台穿越次数减少($P<0.05$),神经元缺失增加($P<0.05$);VD-IF组逆转VD-AL组上述指标水平($P<0.05$)。与Con-AL组比较,VD-AL组、VD-IF组大鼠白质损伤加重($P<0.05$)。海马阳性星形胶质细胞数量为Con-AL组<VD-AL组<VD-IF组($P<0.05$)。Pearson相关分析显示,VD-IF组大鼠海马CA1区神经元数量与目标象限停留时间、平台穿越次数呈正相关($P<0.05$)。**结论** IF干预可以改善VD大鼠记忆功能,可能与抑制大鼠海马神经元缺失,并增加星形胶质细胞活化有关。

[关键词] 血管性痴呆; 间歇性禁食; 水迷宫; 尼氏染色; 免疫组化; 大鼠; 记忆功能

[中图分类号] R743.9

[文献标识码] A

Influential mechanism of intermittent fasting on memory function in vascular dementia rats

CHEN Shoutao¹, SHEN Tiantian¹, FAN Tingwei¹, CHA Caobing¹, LIU Gailing¹, ZHANG Yan²

1. Department of Neurology, Shanghai Electric Power Hospital, Shanghai 200050, China; 2. Department of Radiology Intervention, Shanghai Baihui Hospital, Shanghai 201107, China

[ABSTRACT] **Aim** To explore the influential mechanism of intermittent fasting (IF) on memory function in vascular dementia (VD) rats. **Methods** Twenty four male SD rats were randomly divided into the the random feeding control group (Con-AL group), the random feeding of VD group (VD-AL group), and the IF feeding VD group(VD-IF group). The Con-AL group underwent sham surgery and had free feeding, whereas the VD-AL group, and VD-IF group as VD models through surgery received free feeding and IF intervention, respectively. Five weeks after surgery, the body weight of rats in each group were compared, the memory function of rats in each group was evaluated by Morris water maze, the hippocampal neuron loss was evaluated by Nissl staining, the white matter injury of corpus callosum was evaluated by LFB staining, and the hippocampal glial cell activation was evaluated by immunohistochemistry. **Results** Five weeks after surgery, the body mass of rats in each group was in an order of VD-IF group<VD-AL group<Con-AL group ($P<0.05$). Compared with the Con-AL group, the target quadrant dwell time and platform crossing frequency of VD-AL group rats were reduced ($P<0.05$), while neuronal loss were increased ($P<0.05$). The VD-IF group reversed the levels of the above indicators in the VD-AL group ($P<0.05$). Compared with the Con-AL group, the VD-AL group and VD-IF group showed aggravated white matter damage in rats($P<0.05$). The number of positive astrocytes in the hippocampus was in an order of the Con-AL group<VD-AL group<VD-IF group ($P<0.05$). Pearson correlation analysis showed that the number of neurons in the hippocampal CA1 region of VD-IF group rats was positively correlated with target quadrant dwell time and platform crossing frequency ($P<0.05$). **Conclusion** IF can improve the memory function of VD rats, which may be related to the inhibition of loss of hippocampal neurons and increase of activation of hippocampal astrocytes in rats.

[KEY WORDS] VD; IF; water maze; Nissl staining; immunohistochemistry; rats; memory function

[收稿日期] 2024-12-20

[修回日期] 2025-07-12

[基金项目] “十四五”国家重点研发计划项目(2021YFC2500103);国网上海市电力公司科技项目(SGTYHT/23-JS-001)

[作者简介] 陈守涛,主治医师,研究方向为脑血管病的诊治,E-mail为 chenshoutao2022@163.com。通信作者张燕,硕士,副主任医师,研究方向为脑血管病的放射介入治疗,E-mail为 gulian1982@163.com。

血管性痴呆 (vascular dementia, VD) 是一种常见的痴呆类型, 主要由慢性脑灌注不足引发。其典型病理特征包括脑白质损伤、腔隙性梗死及微血管病变^[1], 进而导致步态障碍、执行功能障碍和记忆丧失等多种神经症状^[2], 但目前缺乏有效治疗手段。间歇性禁食 (intermittent fasting, IF) 作为一种非药物性饮食干预策略, 近年来受到关注, 其在优化大脑功能及增强大脑对损伤的恢复潜力方面展现出良好前景^[3]。研究表明, IF 能保护神经元完整性^[4], 对阿尔茨海默病和脑卒中等神经系统疾病的动物模型具有神经保护作用^[5], 其潜在机制涉及减轻神经元炎症和改善氧化应激反应。然而, 这些研究大多将 IF 作为一种“预处理”干预手段, 应用于疾病发生之前或进展过程中。鉴于患者通常在确诊后才寻求干预, 因此, 进一步评估 IF 对已确诊 VD 的疗效至关重要。本研究旨在探讨 IF 能否改善 VD 大鼠模型的记忆功能及其潜在作用机制。

1 材料和方法

1.1 主要材料

24 只 SPF 级雄性 SD 大鼠 [北京维通利华实验动物技术有限公司 (动物许可证号: SCXK(京)2019-0011)]; Morris 水迷宫 (北京友诚嘉业生物科技有限公司); 光学显微镜 (德国莱卡公司); 尼氏染料 (美国 Siam 公司); LFB 染色液 (北京金克隆生物技术有限公司); 神经胶质纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP) 抗体 (武汉华美生物工程有限公司)。

1.2 动物处理及分组

将 24 只大鼠 [(200±10) g] 饲养于 (21±2) °C、湿度 (55±5)% 的特定无病原体动物的设施中, 12 h 光/暗循环。将大鼠随机分为随意喂养对照组 (Con-AL 组)、随意喂养 VD 组 (VD-AL 组) 和 IF 喂养 VD 组 (VD-IF 组), 每组 8 只。Con-AL 组行假手术 (无微线圈植入) 并自由摄食; VD-AL 组通过微线圈诱导双侧颈总动脉狭窄建立 VD 模型^[6] 后自由摄食; VD-IF 组建立 VD 模型后接受 IF 干预^[7]。IF 干预于术后 1 周开始, 持续 4 周, 方案为每日仅在 12 h 暗期的 6 h 内提供食物。为防止禁食期 (18 h) 觅食及食粪, 大鼠每日在水粮笼与纯水笼间轮换。术后 5 周进行行为学测试后, 各组大鼠经腹腔注射戊巴比妥钠 (50 mg/kg) 麻醉, 取脑组织置于 -20 °C 冰箱中保存待用。

1.3 Morris 水迷宫实验检测大鼠记忆能力

水迷宫为直径 120 cm、深 50 cm 的黑色圆形水池, 分为四个象限。第二象限中央放置一直径 10 cm 的圆形平台 (下沉 2 cm), 池壁固定不同颜色形状的参考物。术后 5 周进行 Morris 水迷宫实验。训练结束后移除平台, 将大鼠从东北象限释放入水, 记录其在目标象限停留时间、平台穿越次数、游泳速度及游泳距离。目标象限停留时间缩短和穿越次数减少表明大鼠空间探索及学习记忆能力下降。虽然游泳速度与距离同空间学习记忆关联较弱, 但分析二者可排除其他因素对结果的干扰。

1.4 尼氏染色

取 1.2 海马组织固定, 经 20% 及 30% 蔗糖快速脱水、石蜡包埋、冰冻切片 (20 μm)。染色步骤按尼氏染色试剂盒说明书进行。采用光学显微镜评估海马 CA1 区神经元数量 (每只大鼠选 5 张切片, 每张切片选 3 个视野)。

1.5 LFB 染色

取 1.2 脑组织胼胝体固定, 石蜡包埋, 切片 (厚 20 μm)。参照 LFB 染色试剂盒说明书操作。光学显微镜下观察, Image J 软件分析图像。脑白质病变严重程度及损伤评分参照文献^[8] 评定, 评分越高损伤越严重。

1.6 免疫组化法检测海马星形胶质细胞

取 1.2 海马组织固定, 石蜡包埋并冠状切片 (4 μm)。阻断内源性过氧化物酶后, 切片与 GFAP 抗体 (1:400) 于 4 °C 湿盒中孵育过夜。室温下与偶联二抗孵育 1 h。3,3'-二氨基联苯胺显色, 苏木精复染。显微镜下观察, 每只大鼠取 5 张冠状切片, 每片随机选 3 个区域, 计算 GFAP 阳性星形胶质细胞数量。

1.7 统计学处理

采用 SPSS 21.0 统计软件分析数据。多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 Turkey 检验。采用 Pearson 相关分析 VD-IF 组大鼠认知功能障碍与神经元损伤的相关性。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 IF 对 VD 大鼠体质量的影响

术后 5 周, 各组大鼠体质量增加 (P<0.05); 且 VD-IF 组<VD-AL 组<Con-AL 组 (P<0.05; 表 1)。

2.2 IF 对 VD 大鼠记忆功能的影响

VD-AL 组大鼠目标象限停留时间和平台穿越次数较 Con-AL 组减少 (P<0.05), VD-IF 组大鼠目

标象限停留时间和平台穿越次数较 VD-AL 组增加 ($P < 0.05$; 表 2)。

表 1 IF 对 VD 大鼠体质量的影响 ($n=8$) g

| 分组 | 术前 | 术后 5 周 |
|----------|------------|---------------------------|
| Con-AL 组 | 205.0±24.8 | 260.4±29.1 ^a |
| VD-AL 组 | 203.9±22.5 | 247.3±25.2 ^{ab} |
| VD-IF 组 | 207.4±21.6 | 210.5±20.9 ^{abc} |

注:a 为 $P < 0.05$, 与本组术前比较;b 为 $P < 0.05$, 与 Con-AL 组术后 5 周比较;c 为 $P < 0.05$, 与 VD-AL 组术后 5 周比较。

表 2 IF 对 VD 大鼠记忆功能的影响 ($n=8$)

| 分组 | 目标象限停留时间/s | 平台穿越次数/次 | 游泳速度/(cm/s) | 游泳距离/cm |
|----------|------------------------|-----------------------|-------------|---------------|
| Con-AL 组 | 43.0±5.2 | 6.0±0.7 | 26.4±3.2 | 3 015.3±287.6 |
| VD-AL 组 | 21.4±2.6 ^a | 2.0±0.3 ^a | 25.1±3.1 | 3 008.0±294.7 |
| VD-IF 组 | 36.3±4.1 ^{ab} | 4.5±0.5 ^{ab} | 24.7±3.0 | 2 993.2±301.3 |

注:a 为 $P < 0.05$, 与 Con-AL 组比较;b 为 $P < 0.05$, 与 VD-AL 组比较。

2.3 IF 对 VD 大鼠海马 CA1 区神经元的影响

Con-AL 组、VD-AL 组、VD-IF 组海马 CA1 区存活神经元数量分别为 (209.4±21.5)、(138.6±15.7)、(159.3±17.4) 个/ mm^2 。VD-AL 组大鼠神经元缺失较 Con-AL 组增加 ($P < 0.05$), VD-IF 组大鼠神经元缺失较 VD-AL 组减少 ($P < 0.05$; 图 1)。

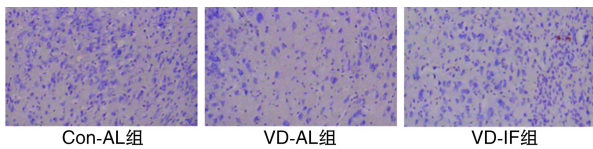


图 1 IF 对 VD 大鼠海马 CA1 区神经元的影响 (100×)

2.4 VD-IF 组大鼠认知功能障碍与神经元损伤的相关性

Pearson 相关分析结果显示, VD-IF 组大鼠海马 CA1 区神经元数量与目标象限停留时间 ($r=1.021$, $P=0.032$) 和平台穿越次数 ($r=2.183$, $P=0.014$) 呈正相关。

2.5 IF 对 VD 大鼠脑白质损伤的影响

VD-AL 组大鼠白质损伤较 Con-AL 组加重 ($P < 0.05$), 而 VD-AL 组与 VD-IF 组大鼠白质损伤差异无统计学意义 (图 2)。

2.6 IF 对 VD 大鼠星形胶质细胞活化的影响

大鼠海马阳性星形胶质细胞数量, Con-AL 组 [(19.0±2.1) 个/ mm^2] < VD-AL 组 [(42.3±4.8) 个/ mm^2] < VD-IF 组 [(51.2±5.7) 个/ mm^2] ($P < 0.05$; 图 3)。

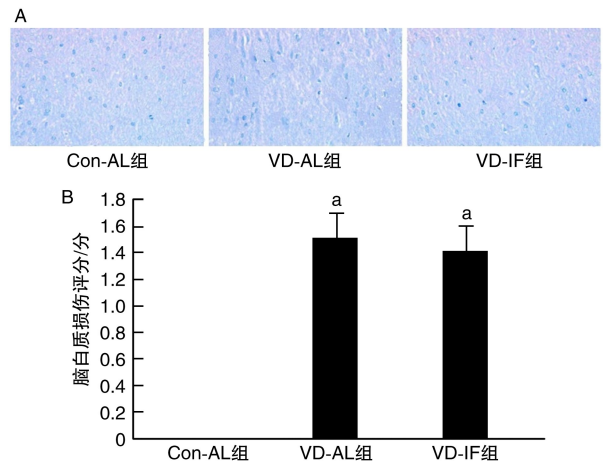


图 2 IF 对 VD 大鼠脑白质损伤的影响

A 为各组大鼠胼胝体 LFB 染色结果 (100×); B 为各组大鼠脑白质损伤评分比较 ($n=8$)。a 为 $P < 0.05$, 与 Con-AL 组比较。

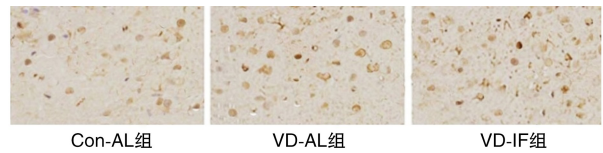


图 3 各组大鼠海马免疫组化染色结果 (200×)

3 讨论

本研究探讨了 IF 在已建立的 VD 大鼠模型中的治疗潜力。本研究结果表明, IF 干预能显著改善 VD 模型大鼠的认知功能障碍, 并减轻海马神经元的缺失, 这为 IF 作为 VD 潜在治疗策略提供了实验依据。然而, IF 对 VD 伴随的脑白质损伤未显示出改善作用, 并且观察到了海马星形胶质细胞反应的意外增强现象。

本研究采用 Morris 水迷宫评估大鼠的空间学习和记忆能力, 结果显示, VD-AL 组大鼠的目标象限停留时间及平台穿越次数均低于 Con-AL 组, 证实了 VD 模型成功诱导了空间记忆障碍。VD-IF 组大鼠的上述两项指标均较 VD-AL 组显著增加 ($P < 0.05$), 表明 IF 能有效改善 VD 大鼠受损的空间记忆功能。这一发现与既往研究报道一致^[9]。

与行为学改善相伴随的是海马神经元病理变化的减轻。VD-AL 组大鼠海马 CA1 区神经元缺失数量多于 Con-AL 组, 而 VD-IF 组神经元缺失数量较 VD-AL 组显著减少 ($P < 0.05$), 这与以往文献 [10] 结果一致。Pearson 相关分析结果揭示了 VD-IF 组大鼠海马 CA1 区神经元数量与目标象限停留时间、平台穿越次数呈正相关。这一相关性具有重要的生物学意义, 因为海马 CA1 区是空间记忆形成

和巩固的关键脑区,其神经元数量与功能的维持直接关系到记忆表现。因此,本研究结果有力地支持了IF改善VD大鼠记忆功能的机制。值得注意的是,并非所有VD相关的病理改变均对IF干预有响应。尽管VD-AL组大鼠表现出较Con-AL组加重的脑白质损伤($P < 0.05$),但VD-AL组与VD-IF组之间的脑白质损伤程度差异无统计学意义。这表明,IF在本研究设定的方案下,未能有效逆转VD模型中已发生的脑白质病理改变。这一结果提示,IF对VD的保护作用可能具有选择性,主要作用于神经元层面而非脑白质微结构。因此,推断IF改善认知功能的机制更可能直接或间接地与神经元存活和功能维持相关。

星形胶质细胞增多症表现为脑内GFAP阳性细胞数量增加,在VD条件下显著上升^[11-12]。这可能提示炎症性星形胶质细胞活化增强,加剧VD的病理生理特征。然而,IF干预后,VD大鼠海马GFAP表达进一步上调。这或是IF诱导神经病理学恶化的迹象,但尚不确定星形胶质细胞增多反映的是炎症性还是促神经元存活的星形胶质细胞增加^[13-14]。GFAP过度表达是反应性星形胶质细胞的显著特征,其对脑损伤或疾病呈现异质性反应。研究表明,反应性星形胶质细胞对疾病进展的影响取决于其确切触发因素^[15]。因此,需进一步研究IF后星形胶质细胞增多是否代表某种防御机制。最新研究显示,活化星形胶质细胞可极化为神经营养或神经毒性状态,其刺激因素至关重要^[16]。本研究观察到IF显著减少神经元缺失并增加星形胶质细胞,推测两者在IF改善VD机制中扮演重要角色,但未能确定IF减少神经元缺失是抑制神经元死亡还是促进海马神经发生所致。鉴于IF后VD大鼠记忆改善与海马神经元缺失减少相关,推测IF更可能促进神经元发生,而非抑制神经元死亡。研究还发现IF可上调成年海马神经发生标记物^[17],并增加促进神经元增殖的神经营养因子^[18]。

总之,VD后IF干预能有效抑制海马神经元缺失,增强星形胶质细胞激活,从而改善记忆功能。结果提示,IF可作为确诊VD患者减缓疾病进展的潜在手段。然而,IF终止后其持续有益作用的程度仍需进一步研究,以确保其在脑损伤治疗中的有效性。

[参考文献]

[1] 赵师德, 鲜利群, 崔鹤. 缺血性脑卒中患者外周血 TREM-1、MCP-1 水平与血管性痴呆的相关性[J]. 中南医学科学杂志,

2022, 50(4): 576-579.

- [2] PRAJJWAL P, MARSOOL M D M, INBAN P, et al. Vascular dementia subtypes, pathophysiology, genetics, neuroimaging, biomarkers, and treatment updates along with its association with Alzheimer's dementia and diabetes mellitus[J]. Dis Mon, 2023, 69(5): 101557.
- [3] 于婷婷, 吕文齐, 况伟宏. 间歇性禁食对认知功能影响的研究进展[J]. 四川医学, 2022, 43(3): 308-311.
- [4] MISHRA A, SOBHA D, PATEL D, et al. Intermittent fasting in health and disease[J]. Arch Physiol Biochem, 2024, 130(6): 755-767.
- [5] 王芳芳, 崔艳如, 李加钰, 等. 基于线粒体探讨间歇性禁食改善神经退行性疾病的可能机制[J]. 中国全科医学, 2023, 26(12): 1530-1536.
- [6] LEE E S, YOON J H, CHOI J, et al. A mouse model of subcortical vascular dementia reflecting degeneration of cerebral white matter and microcirculation[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2019, 39(1): 44-57.
- [7] WANG H B, LOH D H, WHITTAKER D S, et al. Time-restricted feeding improves circadian dysfunction as well as motor symptoms in the Q175 mouse model of huntington's disease[J]. eNeuro, 2018, 5(1): ENEURO.0431-ENEU17.2017.
- [8] 马红芳, 薛江, 梁爽. 胰岛素样生长因子-1 对早产儿脑白质损伤的保护作用及其机制[J]. 中国儿童保健杂志, 2023, 31(11): 1219-1224.
- [9] HANSEN B, ROOMP K, EBID H, et al. Perspective: the impact of fasting and caloric restriction on neurodegenerative diseases in humans[J]. Adv Nutr, 2024, 15(4): 100197.
- [10] KAKAE M, KAWASHITA A, ONOGI H, et al. Bilateral common carotid artery stenosis in mice: a model of chronic cerebral hypoperfusion-induced vascular cognitive impairment[J]. Bio Protoc, 2024, 4(13): e5022.
- [11] CHIN K S. Pathophysiology of dementia[J]. Aust J Gen Pract, 2023, 52(8): 516-521.
- [12] 林璐, 周甜甜, 郝赤子, 等. 丰富环境对血管性痴呆大鼠神经炎症和反应性星形胶质细胞的影响[J]. 中国康复, 2021, 36(11): 643-648.
- [13] 刘可心, 宋丽娟, 韩光远, 等. 星形胶质细胞和小胶质细胞交互作用在缺血性脑血管病中研究进展[J]. 中国老年学杂志, 2024, 44(3): 723-729.
- [14] CLARKE L E, LIDDELOW S A, CHAKRABORTY C, et al. Normal aging induces A1-like astrocyte reactivity[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2018, 115(8): E1896-E1905.
- [15] ESCARTIN C, GUILLEMAUD O, CARRILLO-DE SAUVAGE M A. Questions and (some) answers on reactive astrocytes[J]. Glia, 2019, 67(12): 2221-2247.
- [16] CHUN H, AN H, LIM J, et al. Astrocytic proBDNF and tonic GABA distinguish active versus reactive astrocytes in hippocampus[J]. Exp Neurol, 2018, 27(3): 155-170.
- [17] BAIK S H, RAJEEV V, FANN D Y, et al. Intermittent fasting increases adult hippocampal neurogenesis[J]. Brain Behav, 2020, 10(1): e01444.
- [18] GABARRÓ-SOLANAS R, DAVAATSEREN A, KLEIFELD J, et al. Adult neural stem cells and neurogenesis are resilient to intermittent fasting[J]. EMBO Rep, 2023, 24(12): e57268.

(此文编辑 蒋湘莲)