

· 基础研究 ·

丰富环境刺激对快速老化小鼠精神行为学的影响

吴冰洁 刘敏 岳巍 杨蕊 王红莲 牛彦平 刘春辉 王铭维

【摘要】目的 观察丰富环境刺激对快速老化小鼠(SAMP8)精神行为学及促肾上腺皮质激素(ACTH)和皮质醇(Cor)水平的影响。**方法** 共选取雄性3月龄SAMP8小鼠20只,采用随机数字表法将其分为丰富环境组 and 标准环境组,每组10只;同时选取雄性3月龄抗快速老化(SAMR1)小鼠5只纳入对照组。标准环境组及对照组小鼠均给予标准环境饲养,丰富环境组小鼠在饲养过程中给予丰富环境刺激。于饲养2个月后采用自主活动仪和高架十字迷宫检测各组小鼠精神行为学变化情况,同时采用放射免疫方法检测各组小鼠体内ACTH及Cor含量。**结果** 与对照组比较,5月龄SAMP8小鼠自主活动次数及高架十字迷宫中开放臂停留时间均显著减少($P < 0.05$);与标准环境组比较,丰富环境组SAMP8小鼠自主活动次数显著增多($P < 0.05$),高架十字迷宫测试时开放臂停留时间延长,但与标准环境组间差异无统计学意义($P > 0.05$);放射免疫检测结果显示,与对照组比较,5月龄SAMP8小鼠体内ACTH及Cor水平均显著降低($P < 0.05$);与标准环境组比较,丰富环境组SAMP8小鼠ACTH水平显著提高($P < 0.05$),Cor水平与标准环境组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 5月龄SAMP8小鼠已出现明显精神行为学异常,体内ACTH及Cor含量均较正常水平降低;丰富环境刺激可提高SAMP8小鼠ACTH含量,对减轻精神行为异常具有重要作用。

【关键词】 老年性痴呆; 丰富环境; 精神行为; 促肾上腺皮质激素; 皮质醇; 快速老化小鼠

The effects of an enriched environment on psychological and behavioral symptoms of senescence WU Bing-jie, LIU Min, YUE Wei, YANG Rui, WANG Hong-lian, NIU Yan-ping, LIU Chun-hui, WANG Ming-wei. Department of Rehabilitation Medicine, The 2nd Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China
Corresponding author: WANG Ming-wei, Email: wmw@jyyy.com.cn

【Abstract】 Objective To investigate the effects of an enriched environment (EE) on the psychological and behavioral symptoms of senescence and on the level of plasmic adrenocorticotrophic hormone (ACTH) and serum corticosteroid (Cor). **Methods** Twenty male senescence-prone SAMP8 mice of 3 months old were divided randomly into an enriched environment (EE) group and a standard environment (SE) group. Five male senescence-resistant SAMR1 mice of the same age served as the control group. Behavioral symptoms were assessed after 2 months using autonomic activity and elevated-plus maze (EPM) test performance. Plasma ACTH and serum Cor were detected using radio-immunologic methods. **Results** Average autonomic activity frequency and EPM open-arm times were significantly lower with the SAMP8 mice than among the control group, and the autonomic activity frequency was significantly higher in the EE group than in the SE group of SAMP8 mice. The average EPM open-arm times of the EE group and the SE were not significantly different. Average ACTH and Cor levels were both significantly lower in the SAMP8 mice, and the level of ACTH was significantly higher in the EE group than in the SE group. There was no significant difference in these groups' average Cor levels. **Conclusions** The SAMP8 mice of 5 months demonstrated significant mental and behavioral abnormalities, as well as down-regulated plasma levels of ACTH and Cor. EE An enhanced environment can reduce behavioral disturbance through up-regulating ACTH.

【Key words】 Senile dementia; Enriched environments; Behavior; Adrenocorticotrophic hormone; Corticosteroids; Senescence-accelerated mice

快速老化小鼠(senescence accelerated-prone mouse, SAMP)是目前研究快速衰老的唯一哺乳类动物模型,其中SAMP8小鼠呈增龄性学习记忆功能减退。

Chen等^[1]发现SAMP8小鼠在3月龄时出现空间学习缺陷,在5月龄时出现空间记忆缺陷。自1947年美国Hebb提出丰富环境(enriched environment, EE)概念以来,丰富环境刺激对实验动物行为及智力功能的影响日益受到重视。相关研究发现,暴露于丰富环境中的动物对外来危险记忆力提高,攻击性行为减少,觅食活动增加,并且可以缓解脑损伤导致的情绪行为异常

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2012.05.002

基金项目:河北省卫生厅医学科学研究重点课题(20090092)

作者单位:050000 石家庄,河北医科大学第二医院康复科

通信作者:王铭维,Email: wmw@jyyy.com.cn

和发育过程中的情感紊乱,延长动物寿命^[24]。目前报道多着眼于丰富环境对正常动物情绪行为的影响,而关于丰富环境对 SAMP8 小鼠精神行为的影响及其作用机制鲜见报道。本研究选取 3 月龄 SAMP8 小鼠为研究对象,以同龄抗快速老化小鼠 (senescence accelerated-resistant mouse, SAMR) 为正常对照,观察 SAMP8 小鼠精神行为改变以及丰富环境对 SAMP8 小鼠精神行为的影响,同时检测其体内肾上腺皮质激素 (adrenocorticotrophic hormone, ACTH) 及皮质醇 (cortisol, Cor) 含量变化情况,旨在探讨丰富环境刺激对 SAMP8 小鼠精神行为的影响及其可能作用机制。

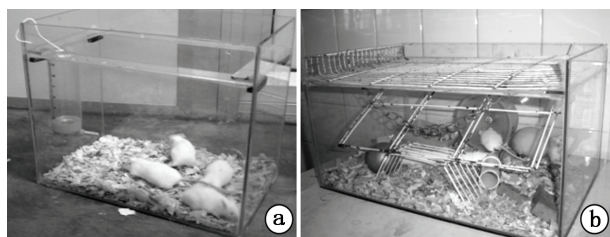
材料与方法

一、实验动物及分组

共选取雄性 3 月龄 SAMP8 小鼠 20 只,同龄雄性 SAMR1 小鼠 5 只,均由香港中文大学解剖系姚大卫教授赠送。入选小鼠经过预选,发现有明显缺陷 (如外部肿瘤、运动能力受限等) 的小鼠则被剔除。实验前 SAMP8 小鼠平均体质量为 (25.24 ± 0.28) g, SAMR1 小鼠平均体质量为 (24.23 ± 0.27) g,采用随机数字表法将 SAMP8 小鼠分为标准环境组和丰富环境组,每组 10 只;5 只 SAMR1 小鼠则归为对照组,其饲养环境与标准环境组一致。

二、饲养环境设置

各组小鼠饲养环境参照文献^[5]进行设置,其中标准环境组及对照组小鼠饲养于 $30\text{ cm} \times 18\text{ cm} \times 25\text{ cm}$ (长 $\times$ 宽 $\times$ 高) 透明玻璃笼内,每笼 5 只,笼内只有垫料 (图 1a)。丰富环境组小鼠则饲养于 $45\text{ cm} \times 28\text{ cm} \times 25\text{ cm}$ (长 $\times$ 宽 $\times$ 高) 透明玻璃笼内,每笼 5 只;笼内设有金属制小桥、斜架、直径 3 cm PVC 隧道、塑料跑笼、金属链条、各种形状及颜色的塑料玩具 (球、盒、铃铛等)、木制积木等 (图 1b)。上述饲养环境每 2~3 d 清洁并更换 1 次,保持饲养室内温度 $23 \sim 25\text{ }^{\circ}\text{C}$,自然昼夜节律。饲养期间所有小鼠均自由摄食、进水。



注:a 为标准环境组饲养笼;b 为丰富环境组饲养笼

图 1 标准环境组与丰富环境组小鼠饲养环境比较

三、精神行为学测试

于饲养 2 个月后进行精神行为学测试,其中

ZH-YLS-2A 型自主活动仪 (图 2) 由 4 个直径 25 cm、高 14 cm 的圆形黑色活动箱组成,小鼠经适应 3 min 后,由计算机记录其 6 min 内活动次数^[6]。ZH-DSG 型高架十字迷宫 (图 3) 包括两条开放臂 ($42\text{ cm} \times 15\text{ cm}$) 和闭合臂 ($42\text{ cm} \times 15\text{ cm} \times 20\text{ cm}$),由中央区 ($15\text{ cm} \times 15\text{ cm}$) 连接,闭合臂顶部为透明树脂材料,周围为灰色不透明树脂材料,迷宫底板距地面 60 cm。将小鼠面向开放臂放入中央区任其自由活动,研究人员在 1.5 m 距离外观察并记录小鼠活动情况,记录其 5 min 内在开放臂停留时间 (以小鼠双前肢进入开放臂作为计时起点)。该测试结束后采用酒精擦拭迷宫、清除粪便,以尽量减少对下一只小鼠测试结果的影响^[7]。进行上述精神行为学测试时室内保持暗光,室温控制在 $(21 \pm 2)\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

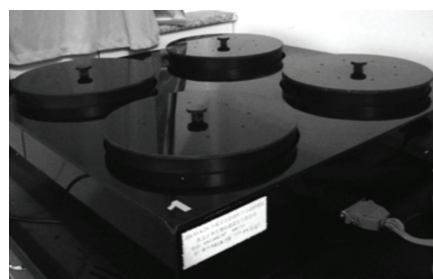


图 2 ZH-YLS-2A 型小鼠自主活动仪结构图



图 3 ZH-DSG 型高架十字迷宫结构图

四、放射免疫测定

ACTH 及 Cor 放射免疫分析药盒均购于北京北方生物技术研究所。待精神行为学测试结束后将各组小鼠固定,采用止血钳快速摘除眼球后取血,分装于 2 个 EP 管中 (一个抗凝,另一个不抗凝) 备用。抗凝管加入 10% EDTA 二钠 $30\text{ }\mu\text{l}$ 和抑肽酶 $20\text{ }\mu\text{l}$ 抗凝,混匀后在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 环境下以 3000 rpm/min (离心半径 6 cm) 离心 10 min,取上清液分别置于对应 EP 管中冻存 ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) 备用。放射免疫测定按试剂盒常规检测方法加样,离心后弃上清液,采用 GC-1200 γ 型放射免疫计数器检测各管沉淀的放射性计数率并根据公式计算样品含量。

五、统计学分析

采用 SPSS 10.0 版统计学软件包进行数据分析,统计学方法选用秩和检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

结 果

一、各组小鼠行为学测试结果比较

标准环境组小鼠 6 min 内自主活动次数(平均秩次 6.00)较对照组(平均秩次为 12.00)显著减少($P < 0.05$);丰富环境组自主活动次数较标准环境组显著增多($P < 0.05$)。在高架十字迷宫测试中,标准环境组小鼠开放臂停留时间(平均秩次 5.70)较对照组(平均秩次为 12.60)显著缩短($P < 0.01$);丰富环境组开放臂停留时间较标准环境组延长,但组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。详见表 1。

表 1 各组小鼠精神行为学测试结果比较

组别	只数	6 min 内自主活动次数(次)	开放臂停留时间(s)
标准环境组	10	104.4 ± 33.3	157.1 ± 44.9 ^b
丰富环境组	10	142.4 ± 88.5 ^a	185.3 ± 48.3
对照组	5	149.1 ± 58.4 ^a	211.0 ± 32.5 ^a

注:与标准环境组比较,^a $P < 0.05$

二、各组小鼠体内 ACTH 及 Cor 水平比较

标准环境组小鼠体内 ACTH 及 Cor 水平均较对照组显著降低($P < 0.05$);丰富环境组体内 ACTH 水平较标准环境组显著增高($P < 0.05$),Cor 水平与标准环境组间差异无统计学意义($P > 0.05$),具体数据见表 2。

表 2 各组小鼠体内 ACTH 与 Cor 水平比较

组别	只数	ACTH(pg/ml)	Cor(ng/ml)
标准环境组	10	28.49 ± 8.24	3.19 ± 0.88
丰富环境组	10	48.98 ± 15.30 ^a	4.09 ± 0.92
对照组	5	48.04 ± 13.35 ^a	5.53 ± 1.44 ^a

注:与标准环境组比较,^a $P < 0.05$

讨 论

SAM 是日本京都大学 Takeda 教授经 20 多年精心培育的一种近交系衰老模型鼠,包括快速老化小鼠(SAMP)和抗快速老化小鼠(SAMR)两种品系。SAMP8 小鼠显示出早期老化及加速老化等特点,既有自然衰老小鼠特征,又有类似老年性痴呆的脑部病理特征(如淀粉样蛋白沉积、老年斑等),早在 2 月龄就开始出现学习记忆功能衰退,并随鼠龄增加而加重^[8]。此外 SAMP8 小鼠在生长过程中还可能出现昼夜节律紊乱、情感障碍等改变^[9],与人类衰老及痴呆的临床特征非常类似^[10],因此 SAMP8 小鼠作为一种

比较理想的 AD 模型正被临床科研广泛应用^[11-12]。SAMR1 小鼠平均生存期及多项生理指标均与正常小鼠类似,目前多以 SAMR1 作为 SAMP8 的正常对照。

丰富环境包括社会交往和生存环境两方面因素。丰富环境是相对于标准环境而言,通常指拥有更大的活动空间、新鲜多变的环境以及动物间更多的交往。相关研究证实,丰富环境通过多种感官刺激,能促使动物学习记忆和认知功能增强^[13];丰富环境还可以减弱动物亲子分离所造成的不良影响^[14]。本课题前期研究也证实丰富环境能提高 SAMP8 小鼠学习及记忆能力^[15]。国外学者研究发现,丰富环境能明显降低小鼠焦虑程度,并认为可能与丰富环境提高了自然杀伤细胞活力有关^[16]。Friske 等^[17]报道丰富环境干预能明显增加小鼠在高架十字迷宫测试时进入开放臂的次数及持续时间。

本研究通过观察小鼠进入封闭环境后的自主活动行为判断其抑郁情绪,通过观察小鼠在高架十字迷宫开放臂中的停留时间来判断其焦虑程度^[6-7],结果发现在标准环境饲养下的 SAMP8 小鼠其自主活动次数及开放臂停留时间均较同龄 SAMR1 小鼠显著减少。由此说明 5 月龄 SAMP8 小鼠就已表现出精神行为异常,主要为抑郁及焦虑情绪。另外本研究同时发现丰富环境组小鼠自主活动次数较标准环境组显著增多($P < 0.05$);而开放臂停留时间虽较标准环境组延长,但组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。上述结果提示,丰富环境刺激能在一定程度上改善 SAMP8 小鼠精神行为异常,其中以对小鼠抑郁情绪的改善作用较显著,推测其原因包括,一方面 5 月龄 SAMP8 小鼠虽已表现抑郁与焦虑情绪,但程度相对较轻,所以丰富环境的干预作用尚不显著;其次是 5 月龄 SAMP8 小鼠精神行为异常可能以抑郁情绪为主,故丰富环境刺激对抑郁情绪的改善作用相对较显著。

下丘脑-垂体-肾上腺皮质轴(hypothalamic-pituitary-adrenal cortex axis,HPA)对许多脑功能(包括学习记忆、进食、情感等)都具有重要调节作用,主要涉及体内促肾上腺皮质激素释放激素、ACTH、糖皮质激素(Cor 和皮质酮)的合成及释放等。相关临床研究表明,ACTH 有促进老年人记忆力恢复、减少精神紊乱、缓解抑郁等作用^[18];如阿尔茨海默病患者脑脊液中 ACTH 水平显著下降,Cor 水平则明显增高,且其含量与痴呆严重程度间具有相关性^[19];同时血液中 Cor 含量升高,可抑制 HPA 轴功能,从而进一步加重痴呆病情。目前国内、外鲜见关于 SAMP8 小鼠血中 ACTH 及 Cor 含量的报道,本研究结果显示,5 月龄 SAMP8 小鼠体内 ACTH 及 Cor 含量均显著低于在同样环境下饲养的 SAMR1 小鼠($P < 0.05$),推测体内 ACTH 降低与

SAMP8 小鼠海马损伤、HPA 轴功能失调、学习记忆功能衰退有关;而 Cor 水平下降是否与 SAMP8 小鼠记忆功能减退或精神行为异常有关还有待进一步证实。

综上所述,本研究结果发现 5 月龄 SAMP8 小鼠已表现出一定的精神行为异常,给予丰富环境刺激可改善 SAMP8 小鼠抑郁及焦虑情绪,并且以抑郁情绪改善作用较显著;丰富环境刺激可提高 SAMP8 小鼠 ACTH 水平,推测这可能是丰富环境刺激改善 SAMP8 小鼠精神行为异常的重要机制之一。

参 考 文 献

- [1] Chen GH, Wang YJ, Wang XM, et al. Accelerated senescence prone mouse-8 shows early onset of deficits in spatial learning and memory in the radial six-arm water maze. *Physiol Behav*, 2004, 82:883-890.
- [2] Frick KM, Fernandez SM. Enrichment enhances spatial memory and increases synaptophysin levels in aged female mice. *Neurobiol Aging*, 2003, 24:615-626.
- [3] Arranz L, Nuria M. Environmental enrichment improves age-related immune system impairment; long-term exposure since adulthood increases life span in mice. *Rejuvenation Res*, 2010, 13:415-428.
- [4] Cui M, Yang Y, Yang J, et al. Enriched environment experience overcomes the memory deficits and depressive-like behavior induced by early life stress. *Neurosci Lett*, 2006, 404:208-212.
- [5] Lambert TJ, Fernandez SM, Frick KM. Different types of environmental enrichment have discrepant effects on spatial memory and synaptophysin levels in female mice. *Neurobiol Learn Mem*, 2005, 83:206-216.
- [6] Pellow S, Chopin P, File SE, et al. Validation of open; closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods*, 1985, 14:149-167.
- [7] Holmes A, Parmigiani S, Ferrari P F, et al. Behavioral profile of wild mice in the elevated plus-maze test for anxiety. *Physiol Behav*, 2000, 71: 509-516.
- [8] Flood JF, Morley JE. Learning and memory in the SAMP8 mouse. *Neurosci Biobehav Rev*, 1998, 22:1-20.
- [9] Chen GH, Wang C, Yang HY, et al. Age-related changes in anxiety are task-specific in the senescence-accelerated prone mouse 8. *Physiol Behav*, 2007, 91:644-651.
- [10] Colas D, Gharib A, Bezin L, et al. Regional age-related changes in neuronal nitric oxide synthase (nNOS), messenger RNA levels and activity in SAMP8 brain. *BMC Neurosci*, 2006, 21:81.
- [11] Hosokawa M. A higher oxidative status accelerates senescence and aggravates age-dependent disorders in SAMP strains of mice. *Mech Aging Dev*, 2002, 123:1553-1561.
- [12] Pallas M, Camins A, Smith MA, et al. From aging to Alzheimer's disease: unveiling "the switch" with the senescence-accelerated mouse model (SAMP8). *J Alzheimer's Dis*, 2008, 15:615-624.
- [13] Rodgers RJ, Johnson NJ. Behaviorally selective effects of neuroactive steroids on plus-maze anxiety in mice. *Pharmacol Biochem Behav*, 1998, 59:221-232.
- [14] Bredy TW, Humpartzoomian RA, Cain DP, et al. Partial reversal of the effect of maternal care on cognitive function through environmental enrichment. *Neuroscience*, 2003, 118:571-576.
- [15] 吴冰洁, 顾平, 王铭维, 等. 丰富环境对快速老化小鼠 SAMP8 学习记忆能力的影响. *第二军医大学学报*, 2007, 28: 964-967.
- [16] Benaroya MN, Hollander N, Apter A. Environmental enrichment in mice decreases anxiety, attenuates stress responses and enhances natural killer cell activity. *Eur J Neurosci*, 2004, 20:1341-1347.
- [17] Friske JE, Gammie SC. Environmental enrichment alters plus-maze, but not maternal defense performance in mice. *Physiol Behav*, 2005, 85:187-194.
- [18] Stefan R, William C, Monika EB, et al. Dissociation of ACTH and glucocorticoids. *Trends Endocrinol Metab*, 2008, 19:175-180.
- [19] Umegaki H, Ikari H, Nakahata H, et al. Plasma cortisol levels in elderly female subjects with Alzheimer's disease: a cross-sectional and longitudinal study. *Brain Research*, 2000, 881:241-243.

(修回日期:2012-02-20)

(本文编辑:易 浩)

· 国外书刊摘译 ·

肿瘤的物理治疗

一、内脏器官肿瘤的物理治疗

(一) 毁坏法

1. 光动力学疗法 采用卟啉类染料使肿瘤细胞光敏化,然后用激光照射,激光被肿瘤细胞选择性吸收而产生氧的毒性代谢物引起出血性坏死,肿瘤细胞被毁坏、死亡。方法:采用可见光波段($\lambda = 0.630 \sim 0.732 \mu\text{m}$)的单色辐射,引起肿瘤细胞死亡的致死量为 10^{10} 量子,脉冲功率 $1 \sim 5 \text{ W}$,脉冲频率 $10 \sim 15$ 个脉冲/s,每次 30 min,每日 1 次,10 次为一个疗程。

2. 高强度激光疗法 采用高强度 ($> 0.5 \text{ W/cm}^2$) 的中波段红外激光,连续波或脉冲波,可被水分子选择性吸收。有助于消除照射部位表面的新生物,边缘部位的微生物死亡,凝固的组织脱水凝集,血管通透性降低,由于微循环反应

不明显,没有白细胞浸润,迅速出现结缔组织增生成熟(抗炎效应)。肿瘤消除后形成平整的术后瘢痕。方法:采用波长 $0.8 \sim 1.2 \mu\text{m}$ 红外激光,脉冲频率 15 个脉冲/s,稳定法,照射的持续时间个别化。

3. 高强度分米波疗法 高热疗法与放射疗法相结合最好。特高频电高热疗法结合应用环磷酸胺抑制肿瘤生长的速度比单用环磷酸胺快 4 倍。方法:采用分米波,频率 460 MHz,功率 60 W,持续 10 min,每日 1 次,10 次为一个疗程。

4. 高强度超声疗法与声泳疗法 高强度超声治疗并应用细胞抑制剂可破坏皮下肿瘤。超声强度达 2 W/cm^2 时可使含有防瘤转移物质的接触环境溶解。多次声泳可使某些表浅的实验性新生物生长抑制,此时化疗对机体全身的作用