

· 基础研究 ·

早期环境对新生大鼠学习记忆能力与脑红蛋白的影响

王婷婷 陈燕惠

【摘要】 目的 观察早期不同环境养育对大鼠学习记忆能力及脑红蛋白(Ngb)的影响。**方法** 将 45 只新生雄性 SD 大鼠按随机数字表法分为丰富环境组、隔离环境组和正常对照组,每组大鼠 15 只。丰富环境组和隔离环境组于生后第 1~28 天分别接受早期丰富环境和隔离环境刺激,正常对照组常规饲养,3 组大鼠均于生后第 29 天采用跳台试验评价大鼠学习记忆能力,并采用免疫组织化学方法测定大鼠 Ngb 表达情况。**结果** 跳台试验结果显示,丰富环境组大鼠学习成绩和记忆成绩分别为(9.67±0.49)分和(9.80±0.56)分,明显高于正常对照组的(8.67±0.72)分和(8.93±1.10)分,而隔离环境组学习记忆成绩最低分别为(7.07±1.98)分和(7.67±0.98)分,3 组大鼠各项评分组间比较,差异均有统计学意义($P<0.05$);丰富环境组大鼠触电潜伏期为(166.33±36.08)s,与正常对照组(108.93±73.26)s 比较,差异有统计学意义($P<0.05$),而隔离环境组大鼠触电潜伏期为(44.93±45.03)s,与丰富环境组和正常对照组比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)。丰富环境组额叶皮质和海马 Ngb 的积分光密度(IOD)值分别为(224.56±89.09)和(127.70±28.16);高于正常对照组的(141.33±45.10)和(92.69±28.52),差异有统计学意义($P<0.05$),而隔离环境组大鼠额叶皮质及海马 Ngb 的 IOD 值分别为(88.78±18.84)和(63.42±16.41),与丰富环境组和正常对照组比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 早期丰富环境刺激可提高大鼠的学习记忆能力,增加 Ngb 的表达;而隔离环境可减少 Ngb 的表达,使大鼠学习记忆能力受损。

【关键词】 早期环境; 脑红蛋白; 学习记忆; 大鼠

The influence of early environment on neuroglobin levels, learning and memory WANG Ting-ting, CHEN Yan-hui. Department of Pediatrics, Union Hospital, Fujian Medical University, Fujian 350001, China
Corresponding author: CHEN Yan-hui, Email: yanhui_0655@126.com

【Abstract】 Objective To explore the influence of environment early in life on learning and memory abilities and neuroglobin (Ngb) expression. **Methods** Forty-five newborn, male, Sprague-Dawley rats were randomly divided into an EE (enriched environment) group, an EI (isolated environment) group and a normal control group, with 15 rats in each group. The EE and EI group rats lived in those environments for their first 28 days of life. The step-down test was used to measure the rats' learning and memory abilities on the 29th day. Ngb expression was examined using immunohistochemical methods. **Results** The step-down test showed learning and memory scores for the EE group rats of (9.67±0.49) and (9.80±0.56) respectively, significantly higher than those of the control group, (8.67±0.72) and (8.93±1.10). The learning and memory abilities of the EI group were the lowest among the three groups, with scores of only (7.07±1.98) and (7.67±0.98), respectively. The latency of the first electric shock was (166.33±36.08)s in the EE group and significantly shorter than that in the control group (108.93±73.26)s. The EI group showed the longest average latency (44.93±45.03)s. Average Ngb expression as reflected by the integrated optical density in the EE group was (224.56±89.09) in the frontal cortex and (127.70±28.16) in the hippocampus, a significant increase over expression in the control group. The Ngb expressions of the EI group were the lowest among the 3 groups-(88.78±18.84) and (63.42±16.41) in the frontal cortex and hippocampus respectively. **Conclusions** Early exposure to an enriched environment can increase Ngb expression and improve learning and memory ability, but early isolation will reduce Ngb expression and learning and memory function.

【Key words】 Early environment; Neuroglobin; Learning; Memory

脑的结构和功能很大程度地受到环境因素的影响。脑红蛋白(neuroglobin, Ngb)是近期发现的一种携

氧球蛋白,是继血红蛋白(hemoglobin, Hb)和肌红蛋白(myoglobin, Mb)之后的第三种携氧球蛋白,主要存在于人和脊椎动物脑内,能够可逆地结合氧。近年来,大量的研究发现, Ngb 参与缺血缺氧、氧化应激、创伤性脑损伤、惊厥等介导的脑损伤修复,具有内源性神经保

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2012.04.004

作者单位:350001 福州,福建医科大学附属协和医院儿科

通信作者:陈燕惠, Email: yanhui_0655@126.com

护作用。关于 Ngb 是否参与早期环境对脑发育的影响,目前鲜见报道。本研究通过观察早期环境对大鼠不同脑区 Ngb 及脑最重要的功能之一学习记忆行为的影响,旨在探讨早期环境对脑发育的影响以及可能的调控机制。

材料与方法

一、实验动物和分组

取新生健康雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 45 只(由福州吴氏实验动物中心提供),体重 10 ~ 15 g,按随机字母表法随机分为丰富环境组、隔离环境组和正常对照组,每组 15 只。

二、干预方法

1. 隔离环境组:参照文献[1]的方法。隔离环境为笼内不放置任何物体的单调笼。将出生 1 ~ 21 d 的大鼠从与母鼠同笼的笼子中分别独自置于隔离环境中,每日 3 h(上午 9:00 ~ 12:00),自出生 21 d 后断奶,将大鼠全天放入隔离环境中,持续至第 28 天。

2. 丰富环境组:丰富环境为一大笼(42 cm × 26 cm × 21 cm)^[2],内放置不同颜色及形状的物体,包括管道、秋千、斜坡和玩具等,每周定期更换笼中物体 2 次。早期刺激:于出生 24 h 后开始,每日上午用红色灯光明暗交替刺激 15 min,下午用软毛刷从头部到尾部慢慢轻刷刺激 15 min,连续刺激 14 d。丰富环境干预参照 Fernandez 等^[3]的方法,从大鼠睁眼起(约 14 ~ 15 日龄),每日上午 9:00 ~ 12:00 从与母鼠同笼的笼子中转移至丰富环境大笼中,自出生 21 d 后断奶,全天放在丰富环境中,持续至第 28 天。

3. 正常对照组:普通饲养笼为无特殊刺激的标准环境。大鼠置于普通环境下饲养,即出生 1 ~ 21 d,每日将母鼠移出普通饲养笼 3 h(上午 9:00 ~ 12:00);自出生 21 d 后断奶,将母鼠全天移出,被试大鼠与其它同窝生大鼠原笼饲养,持续至第 28 天。

三、评定标准

1. 跳台实验:大鼠于出生 29 d 后采用跳台试验评价学习记忆能力^[4]。跳台仪为左右各一方形透明有机玻璃箱,规格 12 cm × 12 cm × 55 cm,箱底铺直径 2 mm 的铜栅,与可调变压器相连,箱内有一跳台(橡皮垫),作为动物回避电击的安全区。将大鼠放入跳台仪内,先适应环境 3 min,调控电压为 36 V,然后通电,大鼠受电击后可跳上跳台逃避电击。跳下时以大鼠双足同时接触铜栅为触电,并视为错误反应,训练 5 min,并记录 5 min 内触电次数,满分为 10 分,被电击一次扣 1 分,所得分数为学习成绩。4 h 后重复测试。重复测试时,先将大鼠放于跳台上,同时秒表记录大鼠第一次跳下时间,为触电潜伏期,并记录 3 min 内大鼠跳下的

次数(错误数),满分为 10 分,每跳下 1 次扣 1 分,所得成绩为记忆成绩。

2. 大鼠脑组织标本采集:将出生 30 d 大鼠以 10% 水合氯醛(3 ml/kg 体重)麻醉后,剪开腹腔及膈肌,暴露心脏,用 20 ml 生理盐水经升主动脉快速冲洗,再灌注 40 g/L 多聚甲醛磷酸缓冲液 100 ml,维持 30 min。开颅取脑,按大鼠脑解剖图谱切取海马及额叶组织,放于 40 g/L 多聚甲醛外固定,石蜡包埋,4 μm 厚切片。

3. SP 二步法免疫组织化学染色:4 μm 厚切片常规脱蜡脱水,0.01 mol/L 枸橼酸盐缓冲液中进行高压抗原修复,3% 过氧化氢室温孵育 10 min;正常山羊血清 37 °C 封闭 20 min,滴加兔抗大鼠 Ngb 多克隆抗体(1:400, SigmaN7162),4 °C 湿盒内孵育 18 ~ 24 h;滴加二抗辅助试剂室温孵育 10 min,滴加山羊二抗 37 °C 孵育 30 min;二胺基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)显色 2 min,苏木素复染 1 min。阴性对照用磷酸盐缓冲液(phosphate-buffered saline, PBS)代替一抗。

4. 图像分析:光镜 20 × 10 倍下定位海马 CA3 区及额叶,然后每张切片 40 × 10 倍下随机选取不重叠的 3 个视野,采用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析系统,分析在海马 CA3 区及额叶每个高倍镜(×400)视野 Ngb 的免疫组织化学染色的积分光密度(integrated optical density, IOD),并取平均值。

四、统计学分析

应用 SPSS 17.0 版统计学软件进行数据处理,多样本比较采用单因素方差分析;各组两两比较采用 Dunnett's T3 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

跳台试验结果显示,丰富环境组大鼠学习成绩和记忆成绩分别为(9.67 ± 0.49)分和(9.80 ± 0.56)分,明显高于正常对照组的(8.67 ± 0.72)分和(8.93 ± 1.10)分,而隔离环境组学习记忆成绩最低分别为(7.07 ± 1.98)分和(7.67 ± 0.98)分,3 组大鼠各项评分组间比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$);丰富环境组大鼠触电潜伏期为(166.33 ± 36.08)s,与正常对照组(108.93 ± 73.26)s 比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),而隔离环境组大鼠触电潜伏期为(44.93 ± 45.03)s,与丰富环境组和正常对照组比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。详见表 1。

表 1 3 组大鼠跳台实验结果比较($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	学习成绩 (分)	触电潜伏期 (s)	记忆成绩 (分)
丰富环境组	15	9.67 ± 0.49 ^a	166.33 ± 36.08 ^a	9.80 ± 0.56 ^a
隔离环境组	15	7.07 ± 1.98 ^{ab}	44.93 ± 45.03 ^{ab}	7.67 ± 0.98 ^b
正常对照组	15	8.67 ± 0.72	108.93 ± 73.26	8.93 ± 1.10

注:与正常对照组比较,^a $P < 0.05$;与丰富环境组比较,^b $P < 0.05$

丰富环境组额叶皮质和海马 NgB 的 IOD 值分别为 (224.56 ± 89.09) 和 (127.70 ± 28.16); 高于正常对照组的 (141.33 ± 45.10) 和 (92.69 ± 28.52), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 而隔离环境组大鼠额叶皮质及海马 NgB 的 IOD 值分别为 (88.78 ± 18.84) 和 (63.42 ± 16.41), 与丰富环境组和正常对照组比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。详见表 2 和图 1、2。

表 2 3 组大鼠额叶皮质及海马 NgB 的 IOD 值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	额叶皮质	海马
丰富环境组	15	224.56 ± 89.09^a	127.70 ± 28.16^a
隔离环境组	15	88.78 ± 18.84^{ab}	63.42 ± 16.41^{ab}
正常对照组	15	141.33 ± 45.10	92.69 ± 28.52

注: 与正常对照组相比, $^a P < 0.05$; 与丰富环境组相比, $^b P < 0.05$

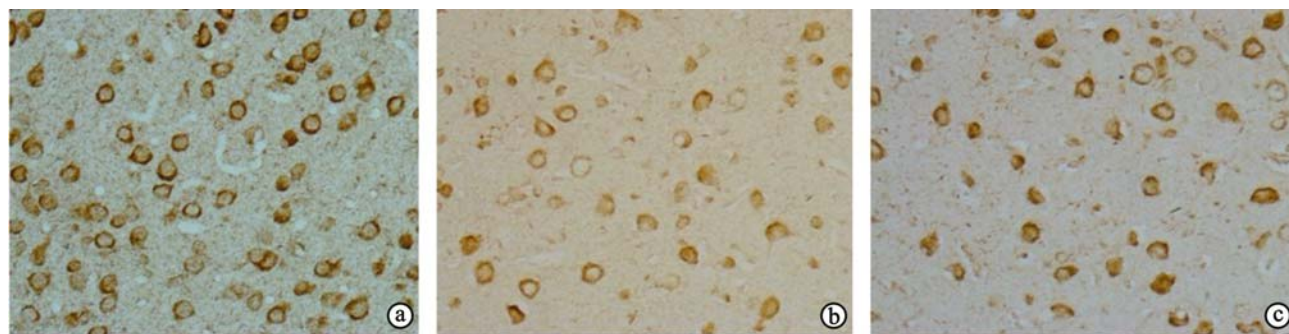
讨 论

近年来, 国内外报道均证实早期环境对正常脑发育有十分重要的作用^[5-7]。早期有组织、有目的丰富环境活动可促使探究行为和记忆能力提高^[4]。而早期单调的隔离环境则可引起成年后的抑郁和焦虑样行为, 并对成年后学习记忆能力有不利的影响^[6]。研究还显示, 早期丰富的环境和有目的的刺激还可作为有效的干预手段显著降低早期脑损伤所致的神经系统伤残发生率。

早期环境及刺激干预对脑发育影响的机制涉及到

神经解剖、神经生化等多方面。研究认为, 丰富环境下饲养并接受早期刺激干预的动物大脑的体积和重量增加, 皮质的重量和厚度增加, 皮质中神经细胞体(核周体)和细胞核的大小增加; 轴突分支增加, 突触化生、血管发生较对照组动物更多; 树突棘的密度增加, 树突各级分支增多, 每个神经元的突触数目增加, 神经递质活动增强。这些变化可能与丰富环境干预可增加脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 和神经生长相关蛋白 (neuronal growth associated protein, GAP-43), 并使酪氨酸激酶 A (tyrosine kinase A, TrkA) 受体表达增加、海马糖皮质激素受体数量表达下调等机制有关^[2,7,9]。脑组织细胞缺氧、能量代谢障碍被认为是各种脑损伤导致神经细胞凋亡的共同途径。

NgB 是一种新发现的主要位于神经元内、能够可逆性结合氧的球蛋白。NgB mRNA 广泛表达于脑组织中, 其阳性产物主要集中于神经元的细胞质, 染色强度不等, 但在不同的脑区分布不同, 并且在不同部位的表达程度与该区域对氧的敏感性呈负相关。其中大脑皮质, 尤以颞叶、扣带皮质、梨状皮质 NgB mRNA 表达水平较高, 其阳性细胞较为密集^[10]。大量研究认为, NgB 与神经元的氧代谢有密切关系, 其可增加神经细胞氧储备, 协助氧在细胞内向线粒体扩散; 清除活性氧自由基和氮自由基; 作为氧化应激感受器, 调节 G 蛋白



注: a 为丰富环境组; b 为隔离环境组; c 为正常对照组

图 1 3 组大鼠额叶皮质中 NgB 的表达 (SP 二步法染色, $\times 400$)



注: a 为丰富环境组; b 为隔离环境组; c 为正常对照组

图 2 3 组大鼠海马组织中 NgB 的表达 (SP 二步法染色, $\times 200$)

偶联的信号转导通路,起到抗氧化应激作用。在缺血缺氧、氧化应激、创伤性脑损伤、惊厥等介导的脑损伤中, Ngb 可能参与上述途径介导的内源性神经损伤保护作用^[11-13]。

Schmidt 等^[14] 观察发现, Ngb 有倾向性地存在于新陈代谢活跃的细胞和亚细胞隔室,其研究显示氧分压低的组织通常没有或者很少有 Ngb 表达。研究还发现, Ngb 只局限于那些氧供应充足,并消耗氧,氧分压高的部位,并且 Ngb 的浓度紧紧地跟细胞线粒体分布联系在一起^[15]。

海马及额皮质是哺乳动物学习记忆相关的重要部位。研究显示,在学习记忆活跃时,相关脑区神经细胞新陈代谢活跃,耗氧量增加。大脑某一部位功能越活跃,该部位葡萄糖代谢越高,相反,该部位功能越差,葡萄糖代谢越低;脑组织代谢、脑血流及结构发生改变,可影响动物的感觉运动功能、学习记忆能力及认知发育^[16]。

本研究根据大鼠昼夜习性、环境温度、摄食习惯等因素,设计丰富环境和单调隔离环境。研究发现,早期不同环境对大鼠 Ngb 表达的影响也不同。在丰富环境及早期刺激下成长的大鼠前额皮质、海马 Ngb 表达明显高于正常对照组;而在隔离环境下成长的大鼠前额皮质、海马 Ngb 表达明显低于正常对照组($P < 0.05$)。

跳台试验是衡量受试大鼠通过条件刺激而学到对自己有害刺激的被动回避,是检测大鼠学习记忆能力的经典方法,主要反映空间学习记忆及记忆巩固能力,反应敏感,个体差异小,操作简便,指标明确,便于观察记录。本研究通过对 5 min 内受到电击的次数、4 h 后第一次跳下平台的潜伏期、3 min 内的错误次数这几个参数比较,发现与正常对照组相比,丰富环境组大鼠学习成绩、记忆成绩显著提高,且触电潜伏期明显延长;隔离环境组大鼠学习成绩、记忆成绩明显减退,触电潜伏期明显缩短($P < 0.05$)。再次验证了早期有组织、有目的的丰富化环境可促进大鼠脑发育,提高认知功能;而单调的隔离环境影响脑发育,并损伤大鼠远期学习记忆功能。

综上所述,① Ngb 与细胞的能量代谢和氧耗量密切相关,而能量代谢和脑组织需氧量对脑的发育具有至关重要的作用;② 早期环境可通过改善脑区 Ngb 的表达,从而影响脑组织的携氧能力和学习记忆能力,我们认为,早期丰富环境对新生大鼠发育期的脑保护有重要意义。

参 考 文 献

- [1] Jones NC, Kumar G, O'Brien TJ, et al. Anxiolytic effects of rapid amygdala kindling, and the influence of early life experience in rats. *Behav Brain Res*, 2009, 203: 81-87.
- [2] 马良,陈燕惠,韦立新. 早期丰富环境对大鼠远期行为发育及血清皮质酮的影响. *中国当代儿科杂志*, 2011, 7: 586-589.
- [3] Fernández V, Adaro L, Sanhueza-Tsutsumi M, et al. Early-life polysensory stimulation and nutrition: topographic levels of susceptibility in the rat visual cortex. *Biol Neonate*, 1997, 71: 265-276.
- [4] Sale A, Berardi N, Maffei L. Enrich the environment to empower the brain. *Trends Neurosci*, 2009, 32: 233-239.
- [5] Kazlauskas V, Pagnussat N, Mioranza S, et al. Enriched environment effects on behavior, memory and BDNF in low and high exploratory mice. *Physiol Behav*, 2011, 102: 475-480.
- [6] Lambas-Senas L, Mnie-Filali O, Certin V, et al. Functional correlates for 5-HT(1A) receptors in maternally deprived rats displaying anxiety and depression-like behaviors. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2009, 33: 262-268.
- [7] 刘玲,陈达光,陈燕惠,等. 早期干预对宫内缺氧、缺血大鼠脑功能及神经生长相关蛋白表达的影响. *中华物理医学与康复杂志*, 2005, 27: 20-23.
- [8] Guzzetta A, Baldini S, Bancale A, et al. Massage accelerates brain development and the maturation of visual function. *J Neurosci*, 2009, 29: 6042-6051.
- [9] Bakos J, Hlavacova N, Rajman M, et al. Enriched environment influences hormonal status and hippocampal brain derived neurotrophic factor in a sex dependent manner. *Neuroscience*, 2009, 164: 788-797.
- [10] 邓美玉,张成岗,王航雁,等. 脑红蛋白 mRNA 在大鼠脑内的定位. *解剖学报*, 2003, 34: 85-89.
- [11] Jin K, Mao Y, Mao X, et al. Neuroglobin expression in ischemic stroke. *Stroke*, 2010, 41: 557-559.
- [12] Li RC, Guo SZ, Lee SK, et al. Neuroglobin protects neurons against oxidative stress in global ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2010, 30: 1874-1882.
- [13] 林欣,李敏,胡亚卓,等. 颅脑创伤后脑红蛋白表达变化的实验研究. *中华神经外科杂志*, 2010, 26: 4-7.
- [14] Schmidt M, Giessel A, Laufs T, et al. How does the eye breathe? Evidence for neuroglobin-mediated oxygen supply in the mammalian retina. *J Biol Chem*, 2003, 278: 1932-1935.
- [15] Antao ST, Duong TT, Aran R, et al. Neuroglobin overexpression in cultured human neuronal cells protects against hydrogen peroxide insult via activating phosphoinositide-3 kinase and opening the mitochondrial K(ATP) channel. *Antioxid Redox Signal*, 2010, 13: 769-781.
- [16] Hosokai Y, Nishio Y, Hirayama K, et al. Distinct patterns of regional cerebral glucose metabolism in Parkinson's disease with and without mild cognitive impairment. *Mov Disord*, 2009, 24: 854-862.

(修回日期: 2012-02-15)

(本文编辑: 阮仕衡)