

· 基础研究 ·

康复训练对脑梗死大鼠学习记忆与健侧
海马突触体胞浆游离 Ca^{2+} 浓度的影响

余茜 李晓红 何成松 余柯 吴士明

【摘要】 目的 探讨康复训练影响脑梗死大鼠学习记忆能力与健侧海马突触体胞浆游离钙离子浓度 $\text{SCF}[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的关系。方法 24 只 Wistar 大鼠分为正常组、康复组和模型组,每组 8 只,应用 Fura-2 荧光探针测定健侧海马神经元 $\text{SCF}[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的变化。结果 康复组、模型组和正常组在静息状态下 $\text{SCF}[\text{Ca}^{2+}]_i$ 比较,差异无显著性意义 ($P > 0.05$);在 KCl 去极化状态下,康复组 $\text{SCF}[\text{Ca}^{2+}]_i$ 明显高于模型组和正常组 ($P < 0.05$)。相应的 Y 迷宫分辨学习的习得和反映记忆能力的一次性被动回避反应测试能力均优于模型组 ($P < 0.05$)。结论 康复训练改善脑梗死大鼠学习记忆与海马神经元 $\text{SCF}[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的变化密切相关。

【关键词】 康复训练; 脑梗死; 学习记忆; 钙离子; 突触体

Effects of rehabilitation training on learning and memory and intrasynaptosomal (Ca^{2+})_i in hippocampus of rats with cerebral infarction YU Qian*, LI Xiao-hong, HE Cheng-song, YU Ke, WU Shi-ming. * Department of Rehabilitation, Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000, China

【Abstract】 Objective To explore the effects of rehabilitation training on the learning and memory, as well as intrasynaptosomal free (Ca^{2+})_i in neurons of the hippocampus in rats with cerebral infarction. Methods Twenty-four Wistar rats were randomly and equally divided into 3 groups: a normal group, a rehabilitation group and a model group. The intrasynaptosomal free (Ca^{2+})_i was assayed by use of Fura-2 as a fluorescent probe. Results No significant difference was found among the 3 groups ($P > 0.05$), with regard to the concentration of the free (Ca^{2+})_i in hippocampus in quiescent state. However, in the state of KCl depolarization, the intrasynaptosomal free (Ca^{2+})_i in the hippocampus of rehabilitation group was found significantly higher than that of the model group and the normal group ($P < 0.05$). The Y labyrinth test revealed better ability of learning and memory in the rehabilitation group comparing with the model group, as indicated by the one-off passive elusion reaction test for the learning and memory ability. Conclusion The improvement of learning ability and memory of the rats with cerebral infarction caused by rehabilitation training might be closely associated with the changes of the intrasynaptosomal free (Ca^{2+})_i in hippocampus neurons.

【Key words】 Rehabilitation training; Cerebral infarction; Learning and memory; (Ca^{2+})_i; Synaptosome

脑梗死急性期 Ca^{2+} 超载可导致细胞代谢障碍或细胞死亡,而 Ca^{2+} 是神经细胞信息传递的重要第二信使,也是哺乳动物长时程增强 (long-term potentiation, LTP) 和长时程抑制 (long-term depression, LTD) 形成必不可少的因素,后两者与学习记忆密切相关^[1]。康复训练可明显加快脑梗死大鼠健侧海马习得性 LTP 的形成速度^[2],因此研究康复训练后健侧海马突触体 Ca^{2+} 浓度的变化具有重要意义。本实验通过 Fura-2 荧光探针测定 Ca^{2+} 的技术,研究脑梗死大鼠康复训练后健侧海马突触体胞浆游离 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的动态变化,以探讨健侧大脑在康复训练后的变化。

材料与方法

一、模型制作

Wistar 雄性大鼠 24 只,体重 (250 ± 50) g,鼠龄 8 周。参照小泉线栓法制成右侧大脑中动脉闭塞局灶性脑缺血模型^[3]。

二、动物选择及分组

大鼠苏醒后凡具有提尾时左侧前肢内收屈曲、同侧 Horner 征、爬行时向左划圈及站立时左侧倾倒 4 项体征者列入研究对象。将成活的 16 只大鼠随机分为康复组 (8 只) 与模型组 (8 只)。另有 8 只正常大鼠作为正常组。模型组关在较宽的笼中不给予任何训练,康复组术后休息 4 d,于第 5 天开始训练。

三、康复训练

将康复组大鼠放于长 100 cm、直径 60 cm 的圆柱

基金项目:泸州市科学技术基金资助项目 (No. 02-007)

作者单位:646000 泸州,四川泸州医学院附属医院康复医学科 (余茜、何成松),神经内科 (李晓红),科研科 (余柯);第三军医大学新桥医院康复医学科 (吴士明)

形网状仪中,手摇转动,每分钟 25 圈,让其被动跑笼,训练大鼠的抓握和行走能力。训练 10 min 后,再将大鼠放于距地面 5 cm 的长 150 cm、宽 2 cm 的方木棒上,用食物诱导其行走,以训练大鼠的平衡能力。每次训练 10 min,每天 1 次^[4]。

2 周后应用 Morris 水迷宫法^[5],采用划分 4 个象限(按顺时针方向定为 A、B、C、D)的自制圆桶,其直径 1.2 m、高 0.5 m,盛水后按 0.5% ~ 1.5% 的比例加入奶粉,使水呈不透明乳白色,水温控制在 22 ~ 23℃,将一直径为 11 cm 的平台固定于 A 象限水面下 1 cm 处。随即将大鼠从另外 3 个象限放入桶中,如 3 min 内找不到平台,则将其在平台上放置 15 s。每天训练 3 次,每次间隔 5 min,每周训练 6 d,共计 4 周。主要训练大鼠的空间学习和记忆能力。

四、学习记忆的行为研究方法

术后 35 d,康复组 7 只大鼠(死亡 1 只),模型组 6 只大鼠(死亡 2 只)与正常组的 8 只大鼠分别进行迷宫分辨学习和一次性被动回避反应记忆能力的行为学测定。

1. Y-迷宫分辨学习测定:将大鼠放于一三等臂式 Y-迷宫中,底部为可通电的铜棒,通道顶部有信号灯,电击(参数 0.5 mA)大鼠足部,引起逃避反应,以熄灯后立即逃至另一灯光安全区作为一次正确反应。1 d 内连续分段训练大鼠,每 10 次为一段,两段间大鼠休息 2 min。记录大鼠学会正确反应(连续 10 次训练中正确率达 90%)所需的训练次数^[6]。

2. 一次性被动回避反应:多功能条件反应箱测试大鼠的记忆保持力。实验时将大鼠尾对门洞平放在离地面 60 cm 的多功能条件反应箱的跳板上,它很快找到并穿过门洞进入反应箱,这段时间记为电击前步入潜伏期(step-through latency, STL);关闭门洞,并电击前爪 5 ~ 10 s。如此反复 3 次,24 h 后重复测定大鼠在跳板上停留的潜伏期,记为电击后步入潜伏期,最长观察时间为 300 s。STL 越长,说明大鼠记忆保持越好。所得数据以中位数按 Mann 和 Whitney 法进行非参数统计的等级检验,比较组间差异^[7]。

五、突触体 Ca^{2+} 的测定

行为训练测定完毕后,将大鼠断头处死,迅速取出健侧海马,置于匀浆器中称重,按 1:10 (W/V) 加入冰浴的 0.32 mol/L 等渗蔗糖液中,以 1 000 r/min 匀浆 3 次,每次 25 s;再经 1 100 × g 离心 10 min,匀浆液中线粒体、小片的髓鞘及自发形成的突触体留在上清液中。上清液再经 12 000 × g 离心 20 min,线粒体、髓鞘和突触体形成沉淀。将沉淀液用 0.32 mol/L 蔗糖液混悬后,小心铺在 0.8 mol/L 和 1.2 mol/L 蔗糖液形成的密度梯度蔗糖液表面,100 000 × g 离心 1 h。收集

0.8 mol/L 与 1.2 mol/L 界面液体悬浮在 0.32 mol/L 蔗糖液中,15 000 × g 离心 30 min,取沉淀加入人工脑脊液(artificial cerebrospinal fluid, ACSF),5 500 × g 离心 20 min,沉淀悬浮在 ACSF 中,用 Lowry 法测定蛋白。最后调蛋白浓度至 1.5 ~ 2.5 mg/ml。取 1 ml 上述突触体悬液,加入 1 ml Fura-2/AM(终浓度为 5 μmol/L),通 95% O_2 + 5% CO_2 的混合气体,并加入 2 ml 牛血清蛋白(终浓度 0.1%)。37℃ 恒温震荡 20 min 后,加入 9 ml ACSF,继续温孵 15 min,从负载 Fura-2/AM 管中取 6 ml,分为 6 管(1 ml/管),离心(12 300 × g, 5 min),沉淀悬浮在 1 ml ACSF 中,测定前各管再离心 1 次(12 000 × g, 30 s),沉淀悬浮在 2.5 ml ACSF 中。采用 Hitachi-4010 荧光分光光度计,测得标准液、负载液以及细胞内 Fura-2 激发波长为 340 nm 和 380 nm,发射波长为 500 nm。实验时,分别测量静息期和加入激动剂后的荧光强度以及最大荧光比值($R_{\max}$)、最小荧光比值($R_{\min}$)。根据公式 $[\text{Ca}^{2+}]_i = kd(R - R_{\min}) / (R_{\max} - R) \times F_0 / F_s$ (nmol/L) 算出 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 。其中 R 是观察到的荧光比值(F_{340} / F_{380}), kd 是 Fura-2 与 Ca^{2+} 反应的解离常数, $kd = 224$; F_0 和 F_s 分别为零 Ca^{2+} 和 Ca^{2+} 饱和时 380 nm 激发光产生的荧光强度。

六、统计学分析

实验数据以双样本 t 检验进行统计学分析,结果用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示^[8]。

结 果

一、学习记忆行为测试

比较 Y-迷宫分辨学习测试结果发现,康复组达到掌握标准需训练 (63.11 ± 10.03) 次,与正常组的 (58.72 ± 9.67) 次比较,差异无显著性意义 ($P > 0.05$);模型组需要 (107.07 ± 16.32) 次,与康复组和正常组比较,差异有显著性意义 ($P < 0.05$)。大鼠一次性被动回避反应的记忆保持力的测试结果显示,康复组 STL 中位数为 286.7 s,与正常组 (300 s) 比较,差异无显著性意义 ($P > 0.05$);模型组 STL 中位数为 126.7 s,与前 2 组比较,差异有显著性意义 ($P < 0.05$),表明模型组大鼠记忆明显衰退。

二、健侧海马突触体 Ca^{2+} 测定

梗死第 3 天测定其静息突触体胞浆游离钙离子浓度 ($\text{SCF}[\text{Ca}^{2+}]_i$) 为 (907.85 ± 79.74) nmol/L。35 d 后康复组、模型组和正常组大鼠静息 $\text{SCF}[\text{Ca}^{2+}]_i$ 分别为 (303.6 ± 40.4) nmol/L, (316.1 ± 47.3) nmol/L, (309.4 ± 43.1) nmol/L,3 组相比,差异无显著性意义 ($P > 0.05$)。静息 $\text{SCF}[\text{Ca}^{2+}]_i$ 测定后,加入 30 mmol/L KCl 时,康复组 $\text{SCF}[\text{Ca}^{2+}]_i$ 明显升高 (639.6 ± 82.4) ,与模型组 (506.3 ± 58.6) 和正常组

(522.4 ± 76.3) 比较, 差异有显著性意义 ($P < 0.01$); 模型组与正常组相比, 差异无显著性意义 ($P > 0.05$)。在含 1 mmol/L 钙螯合计 EGTA 的 ACSF 中 (使胞外 Ca^{2+} 为 0), 加入 30 mmol/L KCl, 3 组 SCF [Ca^{2+}]i 都升高, 但三者之间差异无显著性意义 ($P > 0.05$), 提示学习记忆获得后胞内钙池释放的量没有变化。

讨 论

研究表明, 处于不同环境的脑梗死大鼠可在某些行为实验中表现出不同的学习记忆能力。经康复训练的脑梗死大鼠 Y 迷宫分辨学习能力明显高于未经训练的脑梗死大鼠; 在一次性被动回避反应记忆测试中, 康复组大鼠的记忆保持能力明显好于模型组, 说明康复训练可促进脑梗死大鼠学习记忆能力的恢复。

Ca^{2+} 是突触化学传递的重要信使, 在细胞的多种生理生化反应过程中起着重要的偶联作用, 与学习记忆的关系极为密切^[9]。正常胞内游离的 [Ca^{2+}]i 变化是胞外 Ca^{2+} 跨膜转运以及胞内钙池摄取、释放 Ca^{2+} 的结果。 Ca^{2+} 通过电压依赖性钙通道 (VOCs)、受体活化钙通道 (ROCs)、第二信使活化钙通道 (SMOCs)、漏流钙通道等内流; 胞内钙池释放 Ca^{2+} 主要通过 Ryanodine 敏感的钙释放通道 (RyR) 和 IP3 受体通道^[11]。用激活剂 KCl 升高细胞外 K^+ 浓度使细胞膜去极化, 一方面导致 VOCs 和 SMOCs 开放使 Ca^{2+} 内流, 另一方面也使胞内 RyR 和 IP3 受体通道开放使 Ca^{2+} 外流, 两者共同作用, 以前者的作用为主, 使细胞内 [Ca^{2+}]i 升高^[12]。脊椎动物记忆形成后, Ca^{2+} 代谢通路的某些环节发生适应性的改变^[10]。本实验发现在 KCl 去极化作用下, 模型组和正常组 SCF [Ca^{2+}]i 比较, 差异无显著性意义, 而康复组大鼠 SCF [Ca^{2+}]i 升高值明显高于其他两组, 但并未达到使细胞损伤的程度, 表明康复训练可能使健侧海马神经元 VOCs 和 SMOCs 发生了某种形式的可塑性变化, 使 Ca^{2+} 内流发生易化。 Ca^{2+} 内流引起细胞兴奋有利于激活更多蛋白的表达, 在引发细胞瞬时反应的同时, 也可激活第三信使引起基因和神经元蛋白合成的变化。在形态上表现为健侧海马突触后致密物和穿孔性突触百分率增加而引发多重生理生化效应^[13], 使其 LTP 的形成速度明显加快, 平均峰潜伏期缩短^[2], 记忆痕迹比模型组更巩固。

静息时细胞内 [Ca^{2+}]i 维持在低水平状态下对于信息传导非常重要。本实验还发现静息状态下各组 SCF [Ca^{2+}]i 差异无显著性意义, 表明康复训练并没有改变静息状态下细胞内的 [Ca^{2+}]i, 可能与康复训练后 Ca^{2+} 外运系统和钙池摄取 Ca^{2+} 能力适应性发生改变有关。鉴于海马是学习记忆的关键脑区, 由此推测, 康复训练后健侧海马突触体游离钙离子浓度变化可影响信息处理过程, 最终表现在学习记忆行为上。大鼠患侧大脑是否也有相应的变化? 二者是否共同促进学习记忆的脑功能恢复尚有待进一步研究。

参 考 文 献

- Huang CC, Hsu KS. Progress in understanding the factors regulating reversibility of long-term potentiation. *Rev Neurosci*, 2001, 12: 51-68.
- 余茜, 李晓红, 吴士明, 等. 运动康复对脑梗死大鼠学习记忆能力和 LTP 的影响. *中华物理医学与康复杂志*, 2002, 24: 141-144.
- 屈秋民, 曹振玲, 杨剑波. 线栓法大鼠大脑中动脉闭塞局灶性脑缺血模型 Longa 法和小泉法的比较. *中华神经科杂志*, 2000, 33: 289.
- 李玲, 袁华, 徐莉, 等. 康复训练对脑梗死大鼠中枢神经系统 Fos 表达的影响. *中华物理医学与康复杂志*, 2001, 23: 7-10.
- 郭昌茂, 徐小虎, 马光瑜. 脑震荡对大鼠学习记忆的近、中期影响. *中国行为医学科学*, 2003, 12: 9-11.
- 赵崇侃, 程光, 陈启盛. 一种智能化的 Y 迷宫. *中国应用生理学杂志*, 1997, 13: 363-365.
- 隋建峰, 熊鹰, 张长城. 一种用于大鼠被动回避行为训练的多功能条件反射箱. *第三军医大学学报*, 1994, 16: 363-365.
- Palotas A, Kalman J, Laskay G, et al. Comparative studies on [Ca^{2+}]i-level of fibroblasts from Alzheimer patients and control individuals. *Neurochem Res*, 2001, 26: 817-820.
- Biessels GJ, ter Laak MP, Hamers FP, et al. Neuronal Ca^{2+} dysregulation in diabetes mellitus. *Eur J Pharmacol*, 2002, 447: 201-209.
- Usherwood PN. Memories are made of this. *Trends Neurosci*, 1993, 16: 427-429.
- Tsien RW, Tsien RY. Calcium channels, stores and oscillations. *Annu Rev Cell Biol*, 1990, 6: 715-760.
- Blaustein MP. Calcium transport and buffering in neurons. *Trends Neurosci*, 1988, 11: 438-443.
- 余茜, 李晓红, 吴士明, 等. 运动康复对脑缺血大鼠学习记忆能力和健侧脑突触结构参数的影响. *中华物理医学与康复杂志*, 2002, 24: 399-402.

(修回日期: 2003-09-10)

(本文编辑: 郭正成)