

· 基础研究 ·

次声对大鼠学习记忆行为及海马和颞叶皮层 Ryanodine 受体的影响

谭永霞 李玲 陈景藻

【摘要】目的 探讨 8 Hz 次声对 SD 大鼠空间学习记忆行为的影响及其作用机制。**方法** 40 只雄性 SD 大鼠随机分为正常对照组、90 dB、100 dB 及 130 dB 组。各试验组分别暴露于 8 Hz 次声的 90 dB、100 dB 或 130 dB 次声舱中;对照组每日置次声舱,但不给予次声作用。2 组均每天 2 h。大鼠每日从次声舱中取出后进行 Morris 水迷宫训练,记录其找到隐匿站台的时间,第 6 天训练结束后立即取大脑组织,并进行免疫组织化学染色,光学显微镜下分析其海马及颞叶皮层 Ryanodine 受体(RyR)含量的变化。**结果** 90 dB、100 dB 及 130 dB 组大鼠在水迷宫中找到隐匿站台的时间均比对照组延长($P=0.010, 0.001, 0.000$)。90 dB、100 dB 及 130 dB 组大鼠海马及颞叶皮层 RyR 含量均比对照组减少(均 $P=0.000$)。大鼠在水迷宫中找到隐匿站台的时间与其海马及颞叶皮层 RyR 含量呈负相关。**结论** 90 dB、100 dB 及 130 dB 次声可使大鼠空间学习记忆能力降低,其作用机制可能与海马及颞叶皮层 RyR 的减少有关。

【关键词】 次声; RyR; 学习记忆; 水迷宫; 大鼠

Effects of infrasound on learning and memory and the expression of ryanodine receptor in hippocampi and temporal cortex of rats TAN Yong-xia, LI Ling, CHEN Jing-zao. Department of Rehabilitation Medicine, Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China

【Abstract】Objective To investigate the effects of 8Hz infrasound on spatial learning ability of rats and its underlying mechanism. **Methods** Forty male SD rats were randomly divided into a control group and an experiment group (consisting of the 8Hz, 90dB, 100dB and 130dB subgroups). The experimental subgroups were exposed to 8Hz, 90dB, 100dB or 130dB infrasound for 2 hours daily, respectively, for a total of 6 days. All of the rats were taken out of the infrasonic depot once a day and given Morris maze training. And at last the brain of the rats were harvested and treated with immunohistochemical staining for detection of ryanodine receptor (RyR). The content of RyR in hippocampi and temporal cortex were detected under an optical microscope. **Results** The rats in the 8Hz, 90dB, 100dB and 130dB subgroups showed prolonged latency in Morris training ($P=0.010, P=0.001$ and $P=0.000$). The hippocampi and temporal cortex of rats in 8Hz, 90dB, 100dB and 130dB subgroups showed less positive neurons of RyR ($P=0.000$). There was a negative correlation between the latency period of rats finding the hidden platform and the content of RyR in hippocampus and temporal cortex. **Conclusion** Infrasound of 8Hz, 90dB, 100dB and 130dB could decrease the spatial learning ability of rats, and this was possibly related to the reduce of RyR in hippocampus and temporal cortex.

【Key words】 Infrasound; RyR; Learning and memory; Water maze training; Rats

次声是频率 0.0001 ~ 20 Hz 的声波。不易被人耳听到,却广泛存在于自然界中,并且对人和动物有广泛的作用。有资料表明中枢神经系统是次声的敏感器官之一^[1]。刮大风时,高层建筑的振动可以产生 1 ~ 10 Hz 的次声,使住在楼房内的人感到头晕、恶心、厌倦和心神不安等精神反应^[2]。而学习记忆功能是脑的重要功能。本研究拟通过动物试验探讨次声对大鼠空间学习能力的影响及其作用机制。

材料和方法

一、材料

1. 动物:一级雄性 SD 大鼠,由第四军医大学实验动物中心提供,6 ~ 7 周龄,体重 190 ~ 210 g,实验前 1 周领回,分笼饲养于安静环境中。动物室温度控制在 20 ~ 24℃,湿度控制在 50% 左右,动物自由进食、饮水,自然日光周期。

2. 仪器及设备:次声声源及检测系统采用本校在中国科学院声学研究所和航天工业总公司第 41 所的指导和协作下建成的次声压力舱系统及检测系统,其声源为电动扬声器。

基金项目:全军医学科学技术研究“十五”计划指令性课题(N0. 011L071)

作者单位:710032 西安,第四军医大学西京医院康复理疗科

3. Morris 水迷宫的组成:采用改良 Morris 水迷宫,具体参见韩太真等的详细描述^[3]。

二、方法

1. 试验方法:40 只 SD 大鼠随机分为对照组,8 Hz、90 dB 组,8 Hz、100 dB 组及 8 Hz、130 dB 组,每组 10 只。实验组动物每天于固定时间分别暴露于 8 Hz、90 dB、100 dB 及 130 dB 的次声舱中 2 h,对照组动物每天于固定时间置于次声舱中 2 h,但不予次声作用。每天动物从次声舱中取出后,在 Morris 水迷宫中训练。训练其在水迷宫寻找隐匿在水下的站台,180 s 内未找到站台者,将其放置于站台 15 s,若经反复提示仍无法在 180 s 内找到站台者则淘汰。学习训练共 6 日,每日每只鼠训练 6 次,每 2 次训练间隔 15 min。记录大鼠每次找到站台的时间,取 6 次的平均成绩作为其当天的成绩。

2. 取材方法:所有动物在第 6 天训练结束后,立即按以下程序取材。1%戊巴比妥钠(按 40 mg/kg 体重)进行腹腔麻醉→打开胸腔→拨开心包膜→暴露心脏→剪开右心房→将灌注针经左心室插入主动脉→用 100 ml 生理盐水冲洗血管内血细胞→4%多聚甲醛 400 ml 灌注固定,先快后慢,约 1.5 h 灌完→打开颅腔,取脑组织置 4%多聚甲醛中后固定 4 h(4℃冰箱)→入 20%蔗糖磷酸缓冲液直至沉底(4℃冰箱)→切片,染色。

3. 试剂及免疫组织化学染色方法:兔抗 RyR 抗体为 Santa Cruze 公司生产(1:200),生物素化羊抗兔 IgG 为 Sigma 公司产品(1:500),ABC 复合物为 Sigma 公司产品(1:500)。

4. 染色及计数方法:大鼠脑组织在 Leica 恒冷冰冻切片机中,取冠状切面连续切片,片厚 35 μm,隔 5 片取 1 片。采用抗生物素蛋白-生物素-过氧化物酶复合法(ABC 法)染色。DAB 显色(蓝色反应)。每例动物随机取经结节、乳头体交界的平面切片 3 张。在 10×40 倍光镜下,取海马及颞叶皮层彩图,用 MIAS-2000 图文分析系统进行图像分析,用灰度值比较其阳性结果。

三、统计学分析

所得数据以均数及标准差表示,用 SPSS 10.0 软件计算相关系数,并进行单因素方差分析,组间差异采用 LSD 检验。学习训练过程数据采用重复测量方差分析。

结 果

一、4 组大鼠学习记忆行为的变化

90 dB 组、100 dB 组及 130 dB 组大鼠在水迷宫训练中找到隐匿站台的时间比对照组长($P=0.000$);90 dB 组与 100 dB 组比较,差异无显著性意义($P=0.433$);90 dB 组与 130 dB 组比较,差异有显著

性意义($P=0.011$);100 dB 组与 130 dB 组比较,差异无显著性意义($P=0.070$) (表 1)。次声各组学习记忆过程与对照组比较,差异均有显著性意义($P=0.000$),详见图 1。

表 1 8 Hz 次声对大鼠学习记忆成绩的影响

组 别	n	学习记忆成绩 (s, $\bar{x} \pm s$)	95% 可信区间	P (与对照组比较)
对照组	10	10.25 ± 1.78	8.96 ~ 11.57	—
90 dB 组	10	12.90 ± 2.69	11.53 ~ 14.27	0.010
100 dB 组	10	13.85 ± 2.78	12.53 ~ 14.87	0.001
130 dB 组	10	15.50 ± 2.12	13.98 ~ 17.02	0.000

注:总 $P=0.000$;90 dB:100 dB, $P=0.433$;90 dB:130 dB, $P=0.011$;100 dB:130 dB, $P=0.070$

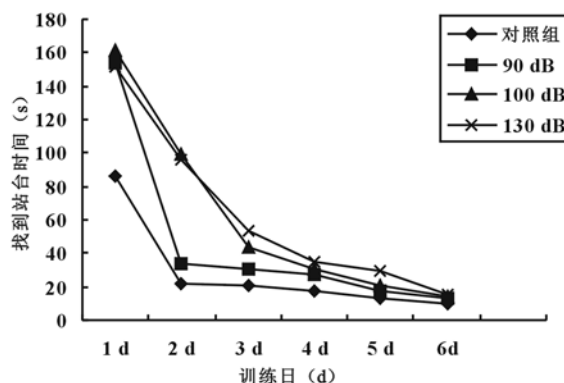


图 1 8 Hz 次声对大鼠学习记忆过程的影响

二、大鼠海马 RyR 染色结果

4 组大鼠在海马部位均见呈胞浆染色的阳性神经元,高倍镜下呈蓝色颗粒状,胞核区淡染,阳性神经元主要集中于锥体层,分子层散在。对照组阳性神经元多,染色深,胞核不明显,试验组阳性神经元少,染色较淡,胞核清晰可见。各组间差异有显著性意义(表 2、图 2 和图 3)。

表 2 8 Hz 次声对大鼠海马 RyR 表达的影响(个)

组 别	n	RyR 表达($\bar{x} \pm s$)	95% 可信区间
对照组	30	146.70 ± 9.79	139.70 ~ 153.72
90 dB 组	30	121.40 ± 13.48	111.76 ~ 131.04
100 dB 组	30	91.80 ± 6.78	86.95 ~ 96.65
130 dB 组	30	47.70 ± 6.34	43.16 ~ 52.24

注:90 dB、100 dB 和 130 dB 组之间相互比较,均 $P=0.000$;90 dB、100 dB 和 130 dB 组分别与对照组比较,均 $P=0.000$

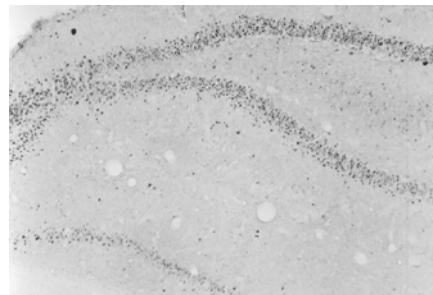


图 2 对照组海马 RyR 染色结果(×100)



图 3 8 Hz、130 dB 组海马 RyR 染色结果(×100)

三、大鼠颞叶皮层 RyR 染色结果

4 组大鼠在颞叶皮层全层均见呈胞浆染色的阳性神经元表达,皮层浅层比深层多见,阳性物质于高倍镜下呈颗粒状。对照组阳性神经元多,染色深,胞核不清晰,试验组的阳性神经元数量少,染色淡,胞核清晰可见。各组间差异有显著性意义(表 3、图 4 和图 5)。

表 3 8 Hz 次声对大鼠颞叶皮层 RyR 表达的影响(个)

组 别	n	RyR 表达($\bar{x} \pm s$)	95% 可信区间
对照组	30	176.10 ± 13.30	166.58 ~ 185.62
90 dB 组	30	144.70 ± 9.64	137.81 ~ 151.59
100 dB 组	30	125.50 ± 9.45	118.88 ~ 132.12
130 dB 组	30	69.30 ± 7.29	64.09 ~ 75.51

注:90 dB、100 dB 和 130 dB 组之间相互比较,均 $P=0.000$;90 dB、100 dB 和 130 dB 组分别与对照组比较,均 $P=0.000$

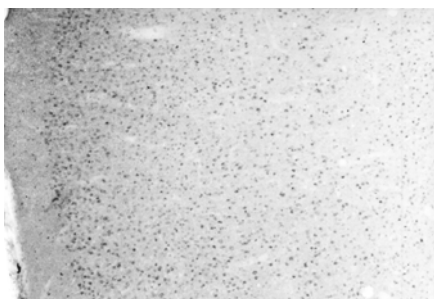


图 4 对照组颞叶皮层 RyR 染色结果(×100)



图 5 8 Hz、130 dB 组颞叶皮层 RyR 染色结果(×100)

四、学习记忆功能与海马及颞叶皮层 RyR 阳性神经元数量的相关性

大鼠在水迷宫中找到隐匿站台时间与海马 RyR 阳性神经元数呈负相关, $r = -0.745$; 与颞叶皮层 RyR 阳性神经元数亦呈负相关, $r = -0.755$ 。

讨 论

学习记忆是一个复杂的神经过程,不同的学习记忆有不同的神经生物学基础。空间学习记忆是检测空间定向、反应时间、视知觉和结构应用等能力,从而评价动物认知水平的一种行为模式,是一种关于场景和事件的学习记忆。Morris 水迷宫是常用的检测空间学习记忆的装置,其原理是让动物利用空间信息对行为做出正确选择。

为确定空间学习记忆的中枢, Morris^[4] 曾观察海马损伤的大鼠在水迷宫训练中的成绩,结果显示,在定向航行中海马损伤组的潜伏期明显长于对照组。Bec-ker 等^[5] 用损毁的方法观察不同脑区在空间学习记忆中的作用,发现只要海马系统完好,大鼠就可以精确地完成空间迷宫任务。Miller 等^[6] 用电生理学方法证实,猴的空间学习记忆的中枢定位在下颞叶皮层。因此可以认为海马和颞叶皮层在空间学习记忆中起重要作用。

RyR 是存在于细胞内质网、肌浆网上的一种钙通道受体,激活后可将钙库内钙释放入胞浆,引起细胞内 Ca^{2+} 浓度增加, Ca^{2+} 参加多种细胞活动的调节。体内 RyR 有三型: RyR1、RyR2 和 RyR3, 其中 RyR1 主要存在于骨骼肌细胞, RyR2 主要分布于心肌细胞, RyR3 则主要在脑内表达。这种钙通道引起的细胞内钙释放,参与神经系统的可塑性改变,对联想、学习记忆及经典条件反射是必需的。细胞内 Ca^{2+} 浓度增加,通过 3 条途径调节 K^+ 电流: (1) Ca^{2+} 直接激活蛋白激酶 C (PKC), PKC 使底物蛋白磷酸化,进而改变有电压依赖性的 K^+ 通道,使 K^+ 电流减少,增加膜的兴奋性; (2) 激活 Ca^{2+} 依赖的磷脂酶 A_2 , 从而使花生四烯酸释放,进一步又激活 PKC; (3) Ca^{2+} 内流启动了 Ca^{2+} /钙调蛋白依赖的过程,直接使 K^+ 通道磷酸化,改变 K^+ 电流^[7]。 K^+ 的减少可以引起兴奋性突触后电位 (EPSP) 长时程增强, EPSP 是学习记忆的神经基础。空间学习 - 水迷宫训练后,可观察到大鼠海马 CA1 区 RyR2 mRNA 及 RyR2 明显增多^[8], 提示 RyR2 调节的钙信号在空间学习记忆中起重要作用。在缺乏 RyR3 受体即 RyR3(-) 的变异大鼠模型中,可观察到海马突触发生可塑性改变,空间学习能力降低,在水迷宫实验中找到平台的时间延长^[9]。但亦有资料显示, RyR3(-) 大鼠在水迷宫实验中成绩提高,并能记录到海马 CA1 区易化了的长时程增强 (LTP)^[10]。可见,脑组织 RyR 与大鼠空间学习记忆关系密切。

由于动物器官存在固有频率,如人体头部为 8 ~ 12 Hz, 次声可以通过共振引起动物产生一系列生物效应。同时,次声引起的躯体反应也会投射到中枢神经

系统,引起中枢神经系统复杂的生物学效应。一项对瑞士 40 名飞行员(主要暴露于 14~16 Hz,125 dB 的次声环境)的研究表明,受试者血压降低,从而引起重要器官血供减少,并可引起飞行员反应迟钝,皮肤电阻降低较快,听域增高^[11]。本实验室以往研究表明 16 Hz、130 dB 的次声作用于小鼠,每天 2 h,可发现下丘脑、海马、大脑皮层出现胶质纤维酸性蛋白表达,并且表达量随着作用时间的延长而增多^[12]。90 dB、120 dB 的 8 Hz 次声可引起额叶、颞叶、海马等学习记忆相关脑区出现 HSP70 的表达,并且 120 dB 组比 90 dB 组阳性反应出现早,阳性神经元数目多^[13]。16 Hz、130 dB 次声可使大鼠一次性回避反应的潜伏期变短,并伴有隔内侧核、斜角带核胆碱能神经元表达的减少^[14]。8 Hz 次声可使小鼠在 Y 迷宫中的学习能力降低,伴脑组织胆碱、谷氨酸、乳酸、乙酰冬氨酸含量的改变^[15]。

本试验结果表明 90 dB、100 dB 及 130 dB 的 8 Hz 次声可使 SD 大鼠在 Morris 水迷宫中找到隐匿站台、逃避水难的时间延长。还发现,大鼠海马及颞叶皮层 RyR 阳性神经元数量在次声作用组均较对照组减少,并且随着次声声压级的增加,其减少愈加明显。此外大鼠在水迷宫中找到站台时间与海马及颞叶皮层 RyR 阳性神经元数量呈负相关。因此可以认为次声对动物的生物效应与其作用参数有关,一定参数的次声可影响动物的多种学习能力,其作用机制较复杂,涉及多种神经递质含量的改变。次声对空间学习记忆影响的作用机制与其对海马及颞叶皮层 RyR 含量的影响有关。

参 考 文 献

- Kuralesin NA. Health related and medico-biological aspects of the infrasound. Noise Vib Bull, 1997, 5:221-226.
- 陈景藻. 次声的产生及生物效应. 见:中国人民解放军总后勤部,编. 医药卫生科学技术进展. 北京:军事医学科学出版社,1997. 194-197.
- 韩太真,吴馥梅,主编. 学习记忆的神经生物学. 北京:北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社,1998. 89.
- Morris R. Development of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rats. J Neurosci Meth, 1984, 11:47-60.
- Becker JT, Walker JA, Olton DS. Neuroanatomical base of special memory. Brain Res, 1980, 200:307-320.
- Miller EK, Li L, Desimone R. A neural mechanism of working and recognition memory in inferior temporal cortex. Science, 1991, 254:1377-1379.
- 韩太真,吴馥梅,主编. 学习记忆的神经生物学. 北京:北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社,1998. 254-258.
- Zhao W, Meiri N, Xu H, et al. Spatial learning induced changes in the expression of the ryanodine type II receptor in the rat hippocampus, FASEB J, 2000, 14:290-300.
- Balschun D, Wolfer DP, Bertocchini F, et al. Deletion of the ryanodine receptor type 3 impairs forms of synaptic plasticity and spatial learning. EMBO J, 1999, 18:5264-5273.
- Futatsugi A, Kato K, Ogura H, et al. Facilitation of NMDAR-independent LTP and spatial learning in mutant mice lacking ryanodine receptor type 3. Neuron, 1999, 24:701-713.
- Lidstrom IM. The effects of infrasound on humans. Invest Rep, 33:1-42.
- 牟翔,陈景藻,李玲,等. 次声作用对小鼠脑中胶质纤维酸性蛋白表达和分布的影响. 中华物理医学与康复杂志, 2001, 23:76-78.
- 袁华,陈景藻,李玲,8 Hz 次声作用后大鼠脑热休克蛋白 70 的表达. 中华物理医学与康复杂志, 1999, 21:94-96.
- 魏智钧,李玲,陈景藻,等. 次声作用对大鼠记忆功能及隔内侧核和斜角带核胆碱能神经元表达的影响. 中华物理医学与康复杂志, 2001, 23:79-82.
- 王斌,陈景藻,易南. 不同声强 8 Hz 次声对小鼠学习能力的影响. 第四军医大学学报, 1997, 18:442-445.

(修回日期:2003-09-29)

(本文编辑:熊芝兰)

· 短篇论著 ·

跟腱断裂修复术后的康复治疗

吴卫青 杨蓉 张雯 陶杰

跟腱断裂多为直接或间接暴力所致,轻微损伤后跟腱断裂的患者正日益受到重视,但其真实病因尚不明确。虽早在 1888 年就有法国学者提出采用手术修复跟腱,但由于跟腱本身存在病理改变,术后可能再次断裂。本研究结合我院临床病例,同时讨论暴力和轻微损伤所致的完全性跟腱断裂的修复和康复,报道如下。

作者单位:200080 上海,上海市第一人民医院康复医学科(吴卫青、杨蓉、张雯),骨科(陶杰)

一、资料与方法

1. 一般资料:选择 1999 年 1 月~2003 年 2 月于我院行常规手术治疗跟腱完全断裂患者 37 例,其中男 25 例,女 12 例;年龄 18~68 岁,平均 41.0 岁;因剧烈运动使跟腱猛烈收缩致跟腱断裂者 12 例,跌倒受伤者 16 例,轻微扭伤者 9 例。其中 2 例患者于急性损伤后误诊为跟腱部分损伤,经保守治疗 3 周,确诊跟腱完全断裂后再次入院。

2. 手术方法:跟腱修复在局部麻醉或连续硬脊膜外麻醉下进行,将严重的犬齿样撕裂的跟腱修平整后,缝合修复跟腱。9