

·基础研究·

运动训练对亚硝酸钠致记忆障碍模型小鼠学习记忆能力的影响*

赵燕燕^{1,2,3} 陈春生² 刘新霞³ 田芳露³ 崔彦龙³ 仇 鹏³

摘要 目的:考察运动训练对亚硝酸钠致记忆障碍模型小鼠学习记忆能力的影响,并探讨其作用机制。方法:昆明种小鼠采用被动跑轮法进行运动训练。训练6周后,采用小鼠 Morris 水迷宫法测试小鼠学习记忆能力;比色法检测大脑组织中超氧化物歧化酶(SOD)活性及丙二醛(MDA)含量,HE 染色观察海马组织形态学改变。结果:与空白对照组比较,模型对照组小鼠定向游泳实验潜伏期显著延长($P<0.05$),SOD 活力显著降低($P<0.05$),MDA 含量显著升高($P<0.05$),海马神经元变性、脱落;与模型对照组比较,运动组小鼠游泳潜伏期显著缩短($P<0.05$),SOD 活力显著增强($P<0.05$),MDA 含量显著降低($P<0.05$),海马神经元的变性、脱落显著改善。结论:运动训练能显著改善亚硝酸钠所致小鼠学习记忆障碍,其作用机制可能与提高小鼠自由基清除能力有关。

关键词 运动训练;亚硝酸钠;学习记忆;学习记忆障碍

中图分类号:R493 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2009)-02-0110-03

Effects of exercises on learning and memory deficit induced by sodium nitrite in mice/ZHAO Yanyan, CHEN Chunsheng, LIU Xinxia, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2009, 24(2):110—112

Abstract Objective: To investigate the effects of exercises on learning and memory deficit induced by sodium nitrite in mice and determine the mechanism preliminarily. **Method:** After 6 weeks of exercise with the running wheels water maze task was used to evaluate learning and memory function of mice. The activity of SOD and content of MDA were measured with colorimetry. The morphology alterations in hippocampus slices were assessed under microscope. **Result:** As compared with control group, in model group the escape latency in directional swimming prolonged and SOD activity decreased and content of MDA increased. Compared with model group, in exercise group, the escape latency shortened, SOD activity increased, the content of MDA decreased, neuro degenerative changes improved and the death of neuron in hippocampus slices reduced. **Conclusion:** These results suggest that exercises has improving effects on learning and memory deficit induced by sodium nitrite in mice. The mechanism may be related to decreasing of free radical.

Author's address Medical Experimental Center of Hebei University, Baoding, 071000

Key words exercises; sodium nitrite; learning and memory; learning and memory deficit

随着社会人口的老龄化,老年痴呆的发病率逐年上升,老年痴呆的核心症状是记忆力、认知力等方面的障碍,不仅影响患者的生存质量,而且给家庭和社会带来沉重的负担。因其发病机制尚未完全阐明,临床尚缺乏理想的防治药物。文献报道,运动训练能增强机体免疫功能^[1]、延缓衰老^[2]、促进小鼠脑局灶缺血后功能恢复^[3]。但运动训练对亚硝酸钠模型小鼠学习记忆能力的影响未见报道,本实验就运动训练对亚硝酸钠模型小鼠学习记忆能力的影响进行研究,并探讨其作用机制,为进一步研究适宜运动对学习记忆障碍的改善作用有重要指导意义。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

尼莫地平(天津);亚硝酸钠(北京)。SOD/MDA

测试盒(南京)。

小鼠 Morris 水迷宫装置及跟踪系统(成都泰盟公司);X-15R 低温离心机(美国贝克曼有限公司);RM2135 组织切片机(德国徕卡公司);BMJ-1 石蜡包埋机(天津航空机电公司);UV-2550PC 可见-紫外分光光度计(日本岛津公司);CKX41 倒置生物显微镜(日本奥林巴斯);BS244S 电子分析天平(德国

* 基金项目:河北省科技攻关资助项目(05276101D-88,42761220);河北省卫生厅资助项目(05015);中医药管理局资助项目(05015);河北大学人才引进项目(y2004039);河北大学自然科学基金项目(2005408);河北大学首批大学生科技创新项目(STCP)

1 河北大学医学实验中心,保定,071000

2 河北大学化学与环境科学学院

3 河北大学医学部

作者简介:赵燕燕,女,教授,博士

收稿日期:2008-06-06

赛多利斯);转笼,河北大学医学实验中心自制。

1.2 动物及分组

昆明种小鼠 60 只,体重 18—22g,雌雄各半,由河北省实验动物中心提供,合格证号:DK0704-128。将小鼠按体重随机分为 6 组,即空白对照组、模型对照组、尼莫地平组、高运动量组、中运动量组、低运动量组,每组 10 只。

1.3 实验方法

1.3.1 运动训练过程^[4]:分别将高、中、低运动量组小鼠放进转速为 9 转/min,直径为 17cm 的带轴承转笼,让其被动跑笼。高运动量组小鼠第 1d 跑 30min,每天增加 20min,直至每天跑 2h;中运动量组小鼠第 1 天跑 20min,每天增加 15min,直至每天跑 80min,低运动量组小鼠第 1 天跑 10min,每天增加 10min,直至每天跑 40min。共训练 6 周,每周跑 5 天,周四、周日休息,每周日记录各组小鼠体重。空白对照组、模型对照组、尼莫地平组每次置于转笼中,但转笼不转动。第 5 周开始,尼莫地平组小鼠灌胃给予尼莫地平 30mg/kg,1 次/d。所有运动训练均在动物暗周期 6pm—10pm 完成。

1.3.2 亚硝酸钠致小鼠记忆障碍模型的制备:按文献方法^[5],每天在小鼠游泳训练后立即腹腔注射 NaNO_2 $125\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,制作学习记忆障碍模型。

1.3.3 小鼠水迷宫法^[6]:实验装置主要由一只圆形水池、一个可移动位置的透明有机玻璃安全台和摄像机组成。圆池的直径为 80cm,高为 44cm,安全台高为 20cm,顶端为圆形,直径为 8cm。水池分成均等的 4 个象限。按实验要求,可任意地将安全台设置于某一象限的中间。定向游泳实验的具体方法如下:

安全台固定在 4 个象限中的任意一个位置不变。将小鼠头朝池壁轻轻地放入水中,让动物寻找安全台,小鼠爬上安全台后使其停留 15s,然后放入笼中。每天 2 次,共训练 4d,摄像机拍摄实验全过程,记录动物游泳轨迹,并输入计算机,经软件分析计算动物总游泳时间和总轨迹长度。动物总游泳时间为逃避潜伏期 (escape latency),总轨迹长度为游泳路程。

1.3.4 小鼠脑组织中 SOD/MDA 的测定^[7-8]:Morris 水

迷宫测试结束后,断头取大脑,用预冷生理盐水冲洗表面血液,滤纸擦干,取一半脑组织,以重量/体积比 1:9 加入 4℃生理盐水,制成 10%的匀浆,3000r/min 低温离心 15min,取上清液,按试剂盒说明,用可见-紫外分光光度计测定大脑组织 SOD 活性及 MDA 含量,另一半脑组织留做石蜡切片。

1.3.5 小鼠脑组织石蜡切片的制备及 HE 染色^[9]:Morris 水迷宫测试结束后,断头取大脑,用预冷生理盐水冲洗表面血液,滤纸擦干,取一半脑组织,10% 甲醛溶液固定,常规石蜡切片,HE 染色,显微镜下观察海马形态学改变。

1.4 统计学分析

实验数据用均数±标准差表示。采用 SPSS11.0 软件进行分析,Morris 水迷宫 1—4d 定向游泳实验中找到安全台的潜伏期 (escape latency) 进行两因素方差分析,应用 Bonferroni/Dunn 检验对每次训练的组间差异进行单因素方差分析。SOD 活性及 MDA 含量组间均数比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 运动训练对亚硝酸钠致记忆障碍模型小鼠 Morris 水迷宫定向游泳实验潜伏期的影响

见表 1。与空白对照组比较,模型对照组小鼠第 3、4、5、7 次训练,逃避潜伏期均显著延长 ($P<0.05$)。与模型对照组比较,高运动量组小鼠第 3、4、7 次训练的逃避潜伏期均显著缩短 ($P<0.05$),中运动量组小鼠第 4、5 次训练的逃避潜伏期均显著缩短 ($P<0.05$);低运动量组小鼠第 4 次训练的逃避潜伏期显著缩短 ($P<0.05$);各组小鼠在其他次数训练时,逃避潜伏期均有缩短趋势,但差异无显著性意义 ($P>0.05$)。实验结果表明,运动训练能显著缩短亚硝酸钠模型小鼠 Morris 水迷宫定向游泳实验潜伏期,改善亚硝酸钠模型小鼠空间学习记忆能力,且与运动量呈正相关。

2.2 运动训练对亚硝酸钠致记忆障碍模型小鼠脑组织中 SOD 活力和 MDA 含量的影响

见表 2。与空白对照组比较,模型对照组小鼠脑组织中 SOD 活力显著降低 ($P<0.01$),MDA 含量显著

表 1 运动训练对亚硝酸钠致记忆障碍模型小鼠 Morris 水迷宫潜伏期的影响

($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	第 1 次游泳 潜伏期(s)	第 2 次游泳 潜伏期(s)	第 3 次游泳 潜伏期(s)	第 4 次游泳 潜伏期(s)	第 5 次游泳 潜伏期(s)	第 6 次游泳 潜伏期(s)	第 7 次游泳 潜伏期(s)	第 8 次游泳 潜伏期(s)
空白对照组	89.8±0.4	64.0±16.9	46.6±19.6	50.6±20.8	32.6±15.2	29.2±11.8	15.8±11.1	10.8±7.3
模型对照组	89.7±0.7	79.7±15.3	71.3±21.6 ^①	83.7±9.8 ^②	58.0±20.9 ^①	55.7±19.2	44.6±16.3 ^②	33.7±27.2
尼莫地平组	87.2±5.2	80.6±14.5	63.2±26.9	47.6±29.3 ^③	32.2±13.5	45.6±37.3	31.2±9.3	23.6±19.2
高运动量组	89.4±1.3	72.2±32.5	48.6±13.6 ^③	50.4±14.9 ^⑤	40.6±16.3	45.4±27.5	25.0±10.6 ^③	23.4±10.1
中运动量组	89.6±0.9	68.8±36.0	56.6±23.1	34.8±20.6 ^⑤	27.8±15.5 ^③	32.4±20.2	28.2±11.1	22±8.6
低运动量组	88.4±3.6	50.8±35.2	57.8±24.7	41.6±27.4 ^④	46.8±41.9	34.8±21.9	31.4±28.1	24.8±6.8

与空白对照组比较:① $P<0.05$,② $P<0.01$;与模型对照组比较:③ $P<0.05$,④ $P<0.01$,⑤ $P<0.001$

升高($P<0.01$);与模型对照组比较,尼莫地平组、高、中、低运动量组小鼠脑组织中 SOD 活力均显著升高($P<0.01$),MDA 含量显著降低($P<0.05$)。实验结果表明,运动训练能显著提高亚硝酸钠模型小鼠脑组织中 SOD 活力,降低 MDA 含量,提高小鼠清除自由基的能力。

表 2 运动训练对亚硝酸钠致记忆障碍模型小鼠脑组织中 SOD 活力及 MDA 含量的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	SOD 活力(U/ml)	MDA 含量(nmol/mgprot)
空白对照组	95.3±24.2	28.5±5.8
模型对照组	37.4±9.1 ^①	47.9±3.2 ^①
尼莫地平组	86.4±32.6 ^②	39.6±12.9
高运动量组	83.1±16.1 ^④	29.9±8.1 ^②
中运动量组	81.4±22.2 ^③	27.0±5.3 ^③
低运动量组	94.6±14.1 ^④	26.0±2.5 ^③

与空白对照组比较,① $P<0.01$;与模型对照组比较,② $P<0.05$,③ $P<0.01$,④ $P<0.001$

2.3 运动训练对亚硝酸钠致记忆障碍模型小鼠海马组织形态的影响

见图 1(见前置彩色插页)。实验结果表明,与空白对照组比较,模型对照组海马 CA3 区神经细胞变性坏死,表现为轴突消失、胞浆深染、空泡样变,核固缩、胞膜核膜界限不清。高、中、低运动训练不同程度改善了 CA3 区神经细胞病理改变。

3 讨论

随着老龄人口的日益增多,老年痴呆等老年性记忆功能障碍的发病率逐年增加,患者主要表现为近期和远期记忆、认知、言语、行为障碍和人格改变等临床综合征^[10]。从其原因和病理学分析,临床常见 4 种类型。①阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD);②血管性痴呆(vascular dementia, VD);③同时具有 AD 和 VD 特征的混合性痴呆;④其他原因引起的痴呆,如帕金森病、脑外伤等^[11-12]。AD 和 VD 是临床上最常见的老年痴呆,近年研究表明,这两种痴呆的发病均与脑缺血缺氧有关^[13]。一次性腹腔注射亚硝酸钠 120mg/kg 是制造小鼠记忆巩固障碍模型的常用方法^[14],亚硝酸钠大量进入机体后,可使正常的血红蛋白变为高铁血红蛋白,失去携氧功能,引起组织缺氧^[15],我们根据实验条件加大亚硝酸钠剂量(125mg/kg),可引起记忆巩固障碍。

运动作为抗衰老的重要手段之一,已有 100 多年的研究历史。多数研究结果表明,合理安排的运动

训练能够促进新陈代谢,增强活力,改善心血管功能。本实验结果显示,运动训练能显著缩短亚硝酸钠模型小鼠定向游泳实验潜伏期,提高脑组织中 SOD 活力,降低 MDA 含量,改善亚硝酸钠所致海马区组织形态的改变。结果表明,运动训练对亚硝酸钠所致学习记忆障碍有改善作用,其作用机制可能与提高机体自由基清除能力,降低自由基水平有关。

参考文献

- [1] 邵邻相,巩菊芳,洪华嫦.急性游泳后小鼠学习记忆和自由基反应的动态观察[J].中国运动医学杂志,2002,21(6):613—616.
- [2] 孙国欣,田振军.有氧训练及大强度疲劳训练对小鼠学习记忆能力的影响[J].西安体育学院学报,2002,19(4):45—47.
- [3] 贾子善,张淑琴,国雪,等.运动训练对脑梗死大鼠功能恢复的影响[J].中国临床康复,2002,6(23):3498—3499.
- [4] 王炳高,王守彪,郭云良,等.早期康复训练对脑缺血后行为恢复的影响及其分子机理[J].中国康复医学杂志,2004,19(3):196—199.
- [5] 刘新霞,纪雪飞,陆玲玲,等.文冠果壳乙醇提取物对大鼠学习记忆障碍的改善作用[J].中草药,2007,38(12):1859—1863.
- [6] 慈春增,王鲁娟,王凤斌,等.植物性雌激素三羟异黄酮对脑缺血大鼠学习记忆的影响[J].中国康复医学杂志,2005,20(8):579—605.
- [7] 刘新霞,纪雪飞,陆玲玲,等.文冠果壳提取物对学习记忆障碍的改善作用[J].中药新药与临床药理,2007,18(1):23—25.
- [8] 刘霞,路新国.茶多酚对运动小鼠心肌钙离子、ATP 酶及自由基代谢的影响[J].中国康复医学杂志,2007,22(12):1062—1086.
- [9] 张彦,朱凤莲,郭学鹏.神经生长因子和托吡酯对红藻氨酸致痫大鼠海马神经细胞 caspase-3 表达的影响[J].中国康复医学杂志,2007,22(2):109—111.
- [10] 罗任,闫兵,何利雷.电针刺激对血管性痴呆大鼠学习记忆能力及大脑 NO 含量的影响[J].中国康复医学杂志,2007,22(6):500—502.
- [11] Zhang J, Zhang JY, Dong SS, et al. Review of the Status on Medication of Alzheimer Disease [J]. Chinese Journal of Integrative Medicine on Cardio-/Cerebrovascular Disease, 2005, 3(4): 343—344.
- [12] 穆敬雯,呼晓.补气活血方对改善痴呆小鼠记忆功能的作用[J].中国康复医学杂志,2007,26(2):512—513.
- [13] Zlokovic BC. Neurovascular mechanisms of Alzheimer's neurodegeneration[J]. Trends Neurosci, 2005,28(4): 202—208.
- [14] 侯悦,吴春福,何祥,等.氟哌啶醇对小鼠在避暗实验中学习记忆获得、巩固和再现过程的影响[J].中国临床康复,2006, 10(34): 99—102.
- [15] Slater TF. Free-radical mechanisms in tissue injury[J]. Biochem J, 1984, 222(1):1—15.