

丰富环境及居住方式对快速老化小鼠认知功能和海马CA1区N-甲基-D-天门冬氨酸受体1的影响

赵燕¹ 胡洁¹ 康林³ 谷岩梅¹ 于虹¹ 李妍¹ 陈海英^{1,4}

摘要

目的:观察不同环境和居住方式对快速老化(SAMP8)小鼠认知功能和海马CA1区N-甲基-D-天门冬氨酸受体1(NMDAR1)的影响,探讨环境及社会支持系统提高认知功能延缓衰老的可能机制。

方法:健康雄性6月龄SAMP8小鼠32只,随机分为丰富环境+群居组(A组)、丰富环境+独居组(B组)、普通环境+群居组(C组)和普通环境+独居组(D组)。环境和居住方式干预2个月通过Morris水迷宫实验测定小鼠的认知功能,免疫组织化学方法测定海马CA1区NMDAR1免疫反应性的表达。

结果:Morris水迷宫结果:随训练天数增加,各组潜伏期均有缩短;A组潜伏期明显短于其他各组($P < 0.05$),空间探索试验中跨越平台次数最多($P < 0.05$)。B组和C组两者相比无明显差异,但都优于D组($P < 0.05$)。抗NMDAR1免疫组化染色结果:D组免疫反应产物表达最少,染色最淡;A组可见NMDAR1蛋白免疫反应产物表达较多,细胞排列紧密,染色较深。光密度值分析显示A组光密度值最高,D组光密度值最低。

结论:丰富环境和群居能改善SAMP8小鼠的学习记忆及认知功能;增加海马CA1区NMDAR1的蛋白含量;但环境和居住方式是SAMP8小鼠认知功能和海马的独立性保护因素,二者无交互作用。

关键词 丰富环境;居住方式;快速老化;小鼠;认知功能;N-甲基-D-天门冬氨酸受体1

中图分类号:R749, R493 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2015)-04-0329-05

Effects of enriched environment and way of living on cognitive function and NMDAR1 expression in hippocampal CA1 area of SAMP8 mice/ZHAO Yan, HU Jie, KANG Lin, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2015, 30(4): 329—333

Abstract

Objective: To observe the influence of different environment and way of living on cognitive function and N-methyl-D-aspartate-receptor 1 (NMDAR1) in hippocampal CA1 area of senescence accelerated mouse prone 8 (SAMP8) mice, and to discuss the possible mechanisms of environment and social support systems to improve cognitive function and anti-aging.

Method: Thirty-two 6-month-old male SAMP8 were randomly divided into enriched environment and living in groups group (A), enriched environment and living alone group (B), general environment and living in groups group (C), general environment and living alone group (D). After 2 months intervention, measure the cognitive function by Morris water maze (Mwm) test, and determine the expression of NMDAR1 immune reactivity in hippocampal CA1 area by immunohistochemical method.

Result: In the MWM test, the escape latency of group A was significantly shorter than that in the other groups ($P < 0.05$), and the times of span flat roof was the most ($P < 0.05$). There was no obvious difference between groups B and C, both better than that of group D ($P < 0.05$). With anti-NMDAR immunohistochemistry, the expressions of immune reaction products were the least in group D, neurons arranged loosely, and lightly

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2015.04.004

1 河北医科大学护理学院,石家庄,050017; 2 哈励逊国际和平医院; 3 河北医科大学解剖教研室; 4 通讯作者
作者简介:赵燕,女,硕士研究生,助教; 收稿日期:2014-06-13

died; while the expression products in group A were much more than other groups, neurons arranged closely and were deeply dyed. Analysis of optical density value showed the optical density value in group A was the highest, while in group D, it showed a minimum set of optical density value.

Conclusion: Rich environment and social could improve the cognitive function of SAMP8 mice, increase NMDAR1 protein expression in hippocampal CA1 area. The effects of rich environment and social (increase social interaction) on protecting hippocampal neurons and improving the cognitive functions of SAMP8 mice were independent, no interaction between them.

Author's address School of Nursing, Hebei Medical University, Shijiazhuang, 050017

Key word enriched environment; way of living; senescence accelerated; mouse prone 8; mouse; cognitive function; N-methyl-D-aspartate receptor 1

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是以记忆和认知功能障碍为主要表现的一种慢性中枢神经系统退化性疾病^[1]。其发病机制不清,使临床治疗及护理受到限制。有研究表明,长期的独居、信息的闭塞以及与外界联系的减少,会导致老年人出现一系列生理和心理问题,包括抑郁症、空巢综合征、脑衰弱综合征等^[2]。

近年来,丰富环境(enriched environment, EE)对实验动物行为及脑功能的研究越来越受到重视。而有关丰富环境对阿尔茨海默病认知功能影响的研究鲜有报道。N-甲基-D-天门冬氨酸受体(N-methyl-D-aspartate receptor, NMDAR)是哺乳动物中枢神经系统主要的兴奋性氨基酸受体,在中枢神经系统许多重要的病理生理过程中都起着关键作用^[3]。研究表明,核心亚基NMDAR1在新事物探悉实验和空间学习认知过程中有重要作用。本实验以快速老化小鼠(senescence accelerated mouse prone 8, SAMP8)为研究对象,采用环境和居住方式两种干预方法,探讨不同环境和居住方式对SAMP8小鼠认知功能和海马NMDAR1表达的影响。为临床AD的预防及康复护理提供科学客观的实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物和分组

选用清洁级健康雄性6月龄快速老化SAMP8小鼠32只,体质量28—32g,由香港中文大学解剖系姚大卫教授赠送。按随机数字表法分为丰富环境+群居组(A组)、丰富环境+独居组(B组)、普通环境+群居组(C组)、普通环境+独居组(D组),每组8只小鼠饲养于正常温控、光照、自由饮水摄食条件

下,小鼠可自由活动并摄取标准饲料。分别在各组干预条件下饲养2个月。

1.2 干预方法

1.2.1 丰富环境:根据小鼠的活动嗜好,丰富环境组小鼠饲养于长×宽×高为52cm×37cm×32cm的鼠笼中,笼中放入灭菌垫料,垫料中掺杂不同目数的砂纸、形状、大小各异的树叶,1个转轮(15cm直径),1个小房子(微型鼠笼),2个隧道(4cm直径),以及各种形状和颜色的木质积木和小球。小房子与管道保持通道畅通以适宜小鼠的钻洞习性,其他玩具每周清洁更换两次,并重新摆放。

1.2.2 普通环境:小鼠饲养于长×宽×高为32cm×20cm×15cm的鼠笼中,笼中只放入灭菌垫料。

1.2.3 群居:对组内8只小鼠进行群养,为其提供相互交往的机会。

1.2.4 独居:对组内小鼠进行单独饲养,不提供社会交往的机会。

1.3 主要试剂与仪器

1.3.1 试剂:兔抗鼠NMDAR1抗体(武汉博士德公司),兔Streptavidin-HRP试剂盒(带DAB显色液)(北京康为世纪生物科技有限公司),多聚甲醛(天津市化学试剂研究所)。

1.3.2 仪器:Morris水迷宫(安徽淮北正华生物仪器设备有限公司),RM2145型组织切片仪(德国Leica公司),恒温水浴箱(北京医疗设备总厂),世泰黏附载玻片(江苏世泰实验器材有限公司),光学显微镜(日本Nikon公司),HPIAS-1000高清晰度彩色病理图文分析系统(西安华海医疗信息技术股份有限公司),Olympus BX61+DP71万能显微镜(日本奥林巴斯光学仪器有限公司)。

1.4 Morris水迷宫实验

Morris水迷宫实验系统由圆形水池、图像自动采集和处理系统组成。圆形水池均分为4个象限,圆形黑色平台放入西南象限的正中(在训练的5d中位置保持不变),距水面1—2cm,水温20℃—22℃。圆形池的周围挂上布帘,布帘内悬挂不同形状和颜色的标志物。每天上午8:00—12:00间进行水迷宫实验训练。

①定位航行实验:小鼠自各象限中点面向池壁入水,视频采集系统跟踪并记录小鼠找到平台所需时间(逃避潜伏期)。允许小鼠在120s内找到平台,找到后在平台上保持10s。若在120s内找不到,则将小鼠人为引导到平台上并保持10s,将其潜伏期记为120s。按照上述方法每天每只小鼠在4个象限依次训练1次,训练共进行5d。②空间探索实验:训练结束后撤掉水下平台,小鼠自距平台最远的入水点面向池壁入水,观察小鼠的游泳轨迹并记录小鼠120s内跨越原平台位置的次数。

1.5 免疫组织化学染色

1.5.1 切片制备:水迷宫实验完成后,每组取5只小鼠,麻醉,开胸,灌注。将鼠脑固定于4%多聚甲醛(4℃)中,24h后经常规梯度乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡包埋。连续切片,片厚5μm。每隔50μm连续取5张切片,分别裱于黏附载玻片上。

1.5.2 染色:切片常规脱蜡至水,高压锅抗原修复1—2min,冷却至室温。滴加适量内源性过氧化物酶封闭液,室温孵育10min。山羊血清工作液室温孵育10min。滤纸吸去多余血清,加入一抗(兔抗鼠NMDAR1抗体)(1:50),4℃过夜。滴加适量生物素标记羊抗兔二抗工作液,室温孵育10min。滴加适量HRP标记的链霉亲和素,室温孵育10min。DAB显色1—5min,自来水冲洗,终止显色,中性树脂封片。

1.5.3 观察分析:选海马解剖结构明显的切片,各组NMDAR1免疫组化染色在海马CA1区相同区域选取相同大小面积进行图像分析,统计NMDAR1阳性

细胞数量及其吸光度值(integrated optical density, IOD)(每张切片以不着色纤维处的吸光度值作为背景值,测量区的吸光度值减去背景值作为平均吸光度值)。每例动物鼠共分析6张切片。主要观察海马神经元染色的变化。

1.6 统计学分析

采用SPSS 13.0统计软件包对实验所得数据进行统计分析,数据以均数±标准差表示,各组均数的比较采用两因素析因设计的方差分析进行检验。

2 结果

2.1 Morris水迷宫实验

2.1.1 定位航行实验:观察分析5d的训练情况,4组的空间学习成绩均有提高,平均逃避潜伏期均日渐缩短,其中A组(图1A)的这种现象最明显。随训练天数的增加,大部分A组小鼠可以在很短时间内找到平台,其他三组找到平台时间也随训练天数的增加而缩短,但均不及A组明显,其中D组(图1D)最少,其成绩虽有提高,但其逃避潜伏期始终维持在较高水平,而且高于其他各组($P < 0.05$)。C组(图1C)潜伏期高于B组(图1B),二者比较,差异无显著性意义($P > 0.05$)。见表1。

2.1.2 空间探索实验:D组小鼠的游泳轨迹多为绕水池做环池游泳,无目的性,且少有在水池中作穿梭样游泳。丰富环境、群居小鼠能依靠空间记忆进行探索,其运动轨迹最多位于原平台所在象限,其次是原平台象限相邻的左右两侧象限(图2)。A组小鼠跨越平台次数为 3.50 ± 2.39 ,明显多于其他组($P < 0.05$);D组跨越平台次数为 0.38 ± 0.52 ,少于B组 1.63 ± 1.30 ($P < 0.05$)和C组 1.00 ± 0.76 ($P < 0.05$);B组和C组相比,差异无显著性意义($P > 0.05$)。见表1。

2.2 NMDAR1免疫组化染色

SAMP8小鼠的海马锥体细胞和颗粒细胞均有NMDAR1免疫反应阳性神经元(DAB显色呈棕黄

表1 各组小鼠的平均逃避潜伏期和空间探索实验中跨越平台次数 ($\bar{x} \pm s$)

组别	定位航行第1天(s)	定位航行第3天(s)	定位航行第5天(s)	平均潜伏期(s)	空间探索跨越原平台次数
A组	53.50±8.75	43.13±9.73	32.13±7.06	42.92±12.12	3.50±2.39
B组	56.63±4.78	48.25±5.34	40.88±7.61	48.58±8.74 ^①	1.63±1.30 ^①
C组	56.38±4.03	48.75±6.80	41.00±9.17	48.71±9.26 ^{①②}	1.00±0.76 ^{①②}
D组	59.00±2.83	53.50±3.46	46.63±14.07	53.04±9.65 ^{①③④}	0.38±0.52 ^{①③④}

与A组相比:① $P < 0.05$;与B组相比:② $P > 0.05$;③ $P < 0.05$;与C组相比:④ $P < 0.05$

色),胞膜着色较深,胞浆淡染,有少量胞核染色(图3)。对各组 SAMP8 小鼠海马 CA1、CA3 区的 NMDAR1 免疫染色进行阳性细胞计数和平均吸光度测定的统计学分析。

2.2.1 阳性细胞计数:D组NMDAR1阳性细胞数为 11.125 ± 3.357 ,免疫反应产物表达最少,排列松散,染色最淡(图3D);C组阳性细胞数为 14.875 ± 2.900 ,免疫反应产物表达较D组增多,排列变整齐,染色变深(图3C)。A组可见NMDAR1蛋白免疫反应产物表达较多,阳性细胞数为 26.625 ± 5.370 ,排列紧密,染色较深(图3A);B组免疫阳性细胞减少,阳性细胞数 18.750 ± 1.982 ,染色稍淡(图3B)。经统计分析得出:环境不同的差异显著($F=57.26, P < 0.05$);生活方式不同的差异显著($F=20.61, P < 0.05$);环境和生活方式二者之间无交互作用($F=2.60, P > 0.05$)。

2.2.2 光密度值分析结果:A组光密度值(0.339 ± 0.045)最高,D组光密度值(0.161 ± 0.027)最低,B组

光密度值(0.251 ± 0.039)高于C组(0.205 ± 0.024)。其中环境不同的差异显著($F=80.89, P < 0.05$);生活方式不同的差异显著($F=27.83, P < 0.05$);环境和生活方式二者之间无交互作用($F=3.09, P > 0.05$)。

图1 第5天的游泳轨迹

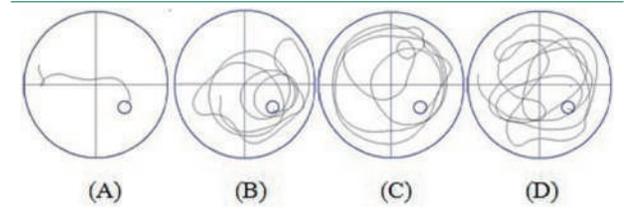


图2 第6天的游泳轨迹

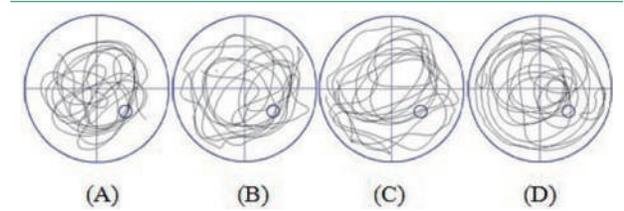
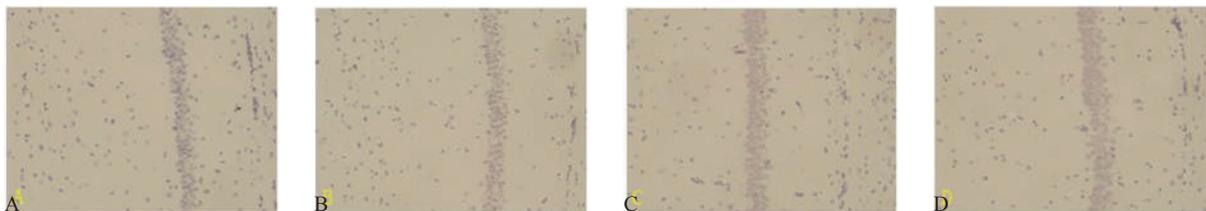


图3 免疫组织化学染色

($\times 400$)



(A)NMDAR1免疫阳性细胞数量和光密度值明显增高;(B)NMDAR1免疫阳性细胞数量和光密度值明显低于A组;(C)观察到少量NMDAR1免疫阳性细胞;(D)观察到些许NMDAR1免疫阳性细胞

3 讨论

丰富环境在1978年首次被定义为:存在多个干预因子的环境,是复杂的无生命物与社会刺激的复合体。即动物的饲养环境空间大,设施丰富新奇,成员多,不仅提供了多感官刺激和运动的机会,而且赋予了相互间社交行为的可能^[4]。本实验将丰富环境与居住方式相结合,观察其对SAMP8小鼠的海马神经元及其认知功能的影响。

已有研究把记忆训练,心理和思维训练、色彩、声、光等动态刺激作为丰富环境^[5]。也有研究显示,将丰富环境和多种康复训练方法相结合,可以使大脑达到最佳的功能恢复^[6]。但有关丰富环境对大脑神经元保护作用及其认知功能改善作用方面的基础

实验研究报道较少,尤其是丰富环境与居住方式相结合所发挥的作用暂无报道。

该实验以雄性SAMP8小鼠为研究对象,采用经典的Morris水迷宫实验,从行为学角度来观察丰富环境干预对学习记忆及认知功能的影响。从小鼠的运动轨迹基本上可看出:独居组的空间记忆能力减退明显,对平台位置不能产生认知记忆,盲目寻找逃生途径,其游泳轨迹主要在平台的外环,多属随机型或边缘型,逃避潜伏期明显高于群居组,这提示相对于独居而言,群居能显著提高SAMP8小鼠的学习认知能力。而“丰富环境”相对于普通环境而言,逃避潜伏期缩短,多采用趋向型游泳策略,提示学习认知能力进一步改善,自然衰老过程对学习认知功能的

损害有所减轻。在探索试验过程中,独居组小鼠的游泳轨迹多为绕池边作环池游泳,少有在池中作穿梭样游泳,且无目的性。增加“社会交往”(群居)因素后,小鼠跨越原平台位置次数增加,提示社会交往明显改善了其缺乏而导致的空间认知记忆保持能力的下降。这与“缺少认知方面刺激是AD发病危险因素”的意见相一致^[7];也与国外“和阿尔茨海默病相似病理改变的小鼠在暴露于丰富环境后其认知功能得到改善”的报道相一致^[8-9]。

流行病学的调查结果在理论上也与本研究结果一致:张新凯等^[10]通过统计上海市社区中AD发病率,分析心理社会因素对发生AD的影响,发现蓝领职业或无业、不参加社团活动、无园艺劳作、不阅读书写、低教育和心理健康感差等7项AD的心理社会危险因素;这些在AD的发生和发展中都起着重要的影响作用。刘光等^[11]调查发现,无配偶和有配偶的不同人群患AD病的严重程度差异显著;无配偶独居者多为重度和极重度AD患者,其严重程度显著高于大家庭生活和与配偶同住者;而核心家庭和单纯独居者的病情以中度以上为主。

这也提示人们通过有意识的改善环境和居住方式,缓解压力来预防或延缓AD的发生。护理人员在常规医疗支持外,也应重视心理和社会支持,同时调动患者的亲戚朋友、邻居、同事等社会支持系统,鼓励家属探视,增加探视时间,给予患者更多关爱和帮助。多组织患者的团体活动,根据患者的文化程度教他们一些游戏,如下象棋或打扑克,促进互相交流以提高患者的沟通能力,培养乐观情绪延缓疾病的发展^[12]。此外,病房或家中摆放患者熟悉和喜欢的物品,如家人照片、书、画、日历等,使患者感到家庭的温馨,排除心中的苦闷与孤独,从而有更多的倾诉和求助渠道,获得更多的情感支持。

研究表明,谷氨酸是一种兴奋性氨基酸,是脊椎动物中枢神经系统中主要的兴奋性神经递质,而NMDAR为其最重要的受体,它与学习记忆和认知过程、突触发育的可塑性、脑缺血缺氧损伤以及早老性痴呆等神经退化性疾病密切相关^[13]。NMDAR具有NMDAR1和NMDAR2两个亚基,其中NMDAR1在兴奋性突触活动传递过程中起重要作用,是该受体的功能单位。因此以NMDAR1为研究对象,观察

并分析老年痴呆早期SAMP8小鼠海马区NMDAR1的表达与认知功能的变化。NMDAR是海马、皮质长时程增强(long-term potentiation, LTP)形成和维持的关键,而LTP是记忆形成和巩固过程中神经活动的客观过程和指标^[14],是中枢神经系统可塑性的一种模式。NMDAR通过与LTP的配体谷氨酸结合,引起Ca²⁺内流、激活蛋白激酶C(protein kinase C, PKC)、酪氨酸激酶(protein tyrosine kinase, PTK)和钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶通路等,从而产生LTP,尤其是NMDAR调节的钙离子内流对Ca²⁺的通透性,相当于Na⁺、K⁺的10倍^[15],从而诱导和维持LTP形成空间记忆以及新记忆向长时记忆的转化^[16],保持了神经元的正常生理功能。本实验中丰富环境群居组NMDAR1有较高水平的表达,这是其维持正常的学习和认知记忆功能的基础。经析因设计方差分析得出:不同环境、居住方式对NMDAR1的阳性细胞数及平均光密度均具有显著差异性,但是二者之间并无交互作用。

Takai H等^[17]研究发现:NMDAR活化及表达数量的增加与神经元凋亡密切相关。本实验表明丰富环境干预的NMDAR1含量变化趋势和老年痴呆认知功能的发生发展之间具有良好的关联性。对此问题的进一步研究将为NMDAR在老年痴呆后认知障碍方面的作用提供更多的实验依据,并为临床丰富环境干预改善老年痴呆认知功能障碍、促进其康复提供参考和护理干预的理论依据。

参考文献

- [1] Tsuang DW, Bird TD. Genetics of dementia[J]. *Medicine Clinics of North America*, 2002, 86(3):591—614.
- [2] 谭红专. 现代流行病学[M]. 北京:人民卫生出版社,2001.629—655.
- [3] Yamakura T, Shimoji K. Subunit- and site-specific pharmacology of the NMDA receptor channel[J]. *Prog Neurobiol*, 1999, 59(3):279—298.
- [4] Will B, Galani R, Kelche C, et al. Recovery from brain injury in animals: relative efficacy of environmental enrichment, physical exercise or formal training (1990-2002)[J]. *Progress in Neurobiol*, 2004, 72(3):167—182.
- [5] 李平均,李化玲. 作业疗法改善颅脑损伤患者的记忆功能[J]. *中国临床康复*, 2003, 7(16):2322—2323.
- [6] 孙咏虹. 丰富康复训练与神经可塑性[J]. *中国康复理论与实践*, 2010, 7(16):635—637.
- [7] Terry RD. Alzheimer's disease and the aging brain[J]. *J Geriatr Psychiatry Neurol*, 2006, 19(3):125—128.

(下转第343页)