文章编号:1000-5404(2009)12-1161-03

论著

慢性间歇性缺氧对大鼠学习记忆及海马CA3区GFAP表达的影响

张 峰[1],姚红兵[1],李 兵[2],李 敏[3] (重庆医科大学:[1]附属儿童医院耳鼻咽喉科,重庆 400014,[2]附属第一医院耳鼻咽喉科,重庆 400016;[3]第三军医大学护理系心理学教研室,重庆 400038)

摘 要:目的 探讨慢性间歇性缺氧以及复氧对大鼠学习记忆功能及海马CA3区胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)表达的影响。**方法** 24只SD大鼠,分为空白组(UC组)、慢性间歇性缺氧组(CIH组)和复氧组(RH组),CIH组建立慢性间歇性缺氧模型,RH组前4周同CIH组,后4周正常饲养,所有大鼠在模型建立后进行Morris水迷宫测试后检测大鼠海马CA3区GFAP的表达。**结果** ①Morris水迷宫逃避潜伏期成绩:CIH组>RH组>UC组($P<0.01$,$P<0.05$);②穿越平台次数及跨越目标象限时间占整个游泳的时间百分率的比较:UC组>RH组>CIH组($P<0.01$,$P<0.05$);③海马CA3区GFAP阳性产物COD值比较:CIH组>RH组>UC组($P<0.01$)。**结论** ①慢性间歇性缺氧可引起大鼠学习记忆功能的下降,复氧后大鼠学习记忆功能有所提高;②大鼠学习记忆功能的下降可能与海马CA3区GFAP的变化有关。

关键词: 慢性间歇性缺氧; 学习记忆;海马
中图法分类号: R338.26;R338.64;R364.4 **文献标识码:** A

Effects of chronic intermittent hypoxia on learning and memory ability and GFAP expression in CA3 region of hippocampus in rats

ZHANG Feng[1], YAO Hong-bing[1], LI Bing[2], LI Min[3] ([1]Department of Otorhinolaryngology, Children's Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, [2]Department of Otorhinolaryngology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400014; [3]Department of Psychology, College of Nursing, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the effects of chronic intermittent hypoxia and removal of hypoxia on learning and memory ability and glial fibrillary acidic protein (GFAP) expression in CA3 region of hippocampus in Sprague-Dawley rats. **Methods** A total of 24 Sprague-Dawley rats were randomly assigned to three experimental groups: unhandled control group (UC), chronic intermittent hypoxia group (CIH), and removal of hypoxia group (RH). Rats in CIH group and RH group underwent intermittent hypoxia for 8 h everyday. The duration of experiment was 4 weeks, and then those in RH group were fed normally in 4 more weeks. The learning and memory ability of rats in each group was assessed with the Morris water maze test. GFAP expression in CA3 region of hippocampus was also investigated. **Results** ① Morris water maze test learning scores: CIH group > RH group > UC group ($P<0.01$, $P<0.05$); ② Morris water maze test memory scores: The number of times of crossing the platform and the percentage of time spent on crossing the target quadrant to the total swimming time: UC group > RH group > CIH group ($P<0.01$, $P<0.05$); ③ GFAP expression in CA3 region of hippocampus: CIH group > RH group > UC group ($P<0.01$). **Conclusion** Chronic intermittent hypoxia can attenuate the function of learning and memory in rats, but the function of learning and memory can be partly improved after removal of hypoxia, suggesting that the attenuated learning and memory in rats may be associated with the changes in GFAP expression in CA3 region of hippocampus in rats.

Key words: chronic intermittent hypoxia; function of learning and memory; hippocampus

基金项目: 重庆市卫生局科研项目(2008-2-38)
Supported by the Program of Chongqing Municipal Health Bureau (2008-2-38)

作者简介: 张 峰,男,山西省定襄县人,硕士,医师,主要从事阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征的基础与临床方面的研究。电话:(023)63621980, E-mail:fzhangltt@163.com
通信作者: 李 兵,电话:(023)89011020,E-mail:dclibing@sina.com.cn

收稿日期: 2008-10-21;**修回日期:** 2008-12-08

大量研究表明,慢性间歇性缺氧在阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征(obstructive sleep apnea-hypopnoea syndrome,OSAHS)患者学习记忆功能下降的发生、发展中起重要作用[1]。杨宇等[2]通过建立动物模型证明了慢性间歇性缺氧可使学习记忆功能下降。有研究表明,海马 CA3 区的星形胶质细胞也参与学习记忆过程。胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)是星形胶质细胞的一种标志蛋白,GFAP 的表达可以间接的反映学习记忆的情况[3]。本课题通过慢性间歇性缺氧以及复氧对大鼠学习记忆功能及海马 CA3 区 GFAP 表达的研究,以期为临床持续正压通气(continuous positive airway pressure, CPAP)、腭咽成型手术等解除慢性间歇性缺氧的 OSAHS 患者提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物分组与模型的建立

24 只 SD 大鼠随机分为 3 组:空白组(unhandled control group,UC)、慢性间歇性缺氧组(chronic intermittent hypoxia group,CIH)和慢性间歇性缺氧后复氧组(Removal of hypoxia group,RH),每组 8 只。参照 Fagan[4]、王璋等[5]的方法并加以改进建立间歇缺氧动物模型,实验期间,CIH 组和 RH 组每天 9:00~17:00 放入间歇缺氧舱内,关闭舱门,向间歇缺氧舱循环充入氮气和压缩空气,每一循环为 60 s,即 30 s 充入氮气,随之 30 s 充入压缩空气,使每一循环通风橱内的最低氧浓度达到 4%~6%,然后再逐渐恢复至 21%,大鼠动脉最低血氧饱和度值为 60%~80%[1]。缺氧共持续 4 周。4 周结束时的最后 5 d,UC 组和 CIH 组进行水迷宫训练,RH 组缺氧结束后常规饲养(复氧)4 周结束时的最后 5 d 进行水迷宫训练。

1.2 Morris 水迷宫实验

动物模型建立后,应用 Morris 水迷宫系统测定大鼠空间学习记忆能力,参考马原野等[6]的方法。①定位航行实验(place navigation):用 60 s 内寻找到隐藏在水面下平台的时间(逃避潜伏期,escape latency)表示,反应大鼠的学习能力。②空间探索实验(spatial probe):记录大鼠在 2 min 中内的游泳轨迹,分别计算其跨越目标象限内的游泳时间占整个游泳时间的百分率、跨越平台次数,反应大鼠的空间记忆能力。

1.3 标本制作及观察

行为实验结束后,用 20% 乌拉坦(10 ml/kg)将动物麻醉,先用 200 ml 左右的生理盐水冲洗快灌,再用 4% 多聚甲醛灌注,取脑,后固定沉底后切片,片厚 30 μm,用于海马突触素免疫组化染色。小鼠抗-GFAP 抗体(武汉博士德公司)按 1∶300 稀释,其余步骤按 S-P9002 试剂盒(北京中杉公司)说明书操作。以 PBS 代替一抗做阴性对照。然后用彩色病理图像分析系统测量切片海马 CA3 区 GFAP 光密度值(average optical denstities, OD)。每只鼠 3 张切片,每张切片测 2 次,每次所测面积 > 50% 海马 CA3 区,取其平均值作为 GFAP 的 OD 值,GFAP 的背景值为阴性对照片海马 CA3 区的 OD 值。实测值减去背景值行矫正光密度值(corrected optical denstities, COD),用 COD 值进行比较和分析。

1.4 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件进行方差分析。

2 结果

2.1 Morris 水迷宫测试

2.1.1 Morris 水迷宫学习成绩(定位航行实验) 与 UC 组相比,在各时间点,CIH 组和 RH 组的逃避潜伏期均明显延长,CIH 组逃避潜伏期最长($P<0.01$,$P<0.05$);随着训练的进行,UC 组和 RH 组的逃避潜伏期明显缩短($P<0.05$);CIH 组前 3 d 逃避潜伏期没有明显改变($P>0.05$)。见表 1。

表 1 3 组大鼠平均潜伏期的比较(s, $\bar{x} \pm s$, $n=8$)

时间	UC 组	CIH 组	RH 组
第 1 天	41.39 ± 4.15	57.86 ± 3.33[a]	48.61 ± 3.30[ab]
第 2 天	30.89 ± 5.29[c]	55.31 ± 3.82[a]	42.77 ± 3.22[abc]
第 3 天	24.70 ± 2.61[c]	51.35 ± 4.75[a]	36.67 ± 2.51[abc]
第 4 天	21.03 ± 3.89[c]	44.06 ± 5.25[ac]	30.91 ± 4.14[abc]
第 5 天	18.93 ± 2.21[c]	41.25 ± 3.88[ac]	26.85 ± 3.91[abc]

a:$P<0.05$,与 UC 组比较;b:$P<0.05$,与 CIH 组比较;c:$P<0.05$,与前 1 d 比较

2.1.2 Morris 水迷宫记忆成绩 与 UC 组相比,CIH 组和 RH 组穿越平台次数显著减少,CIH 组穿越平台次数最少;各组在跨越目标象限时间占整个游泳的时间百分率的比较:CIH 组较 UC 组显著减少($P<0.01$),而 RH 组较 CIH 组明显增多($P<0.05$),较 UC 组仍显著减少($P<0.05$)。见表 2。

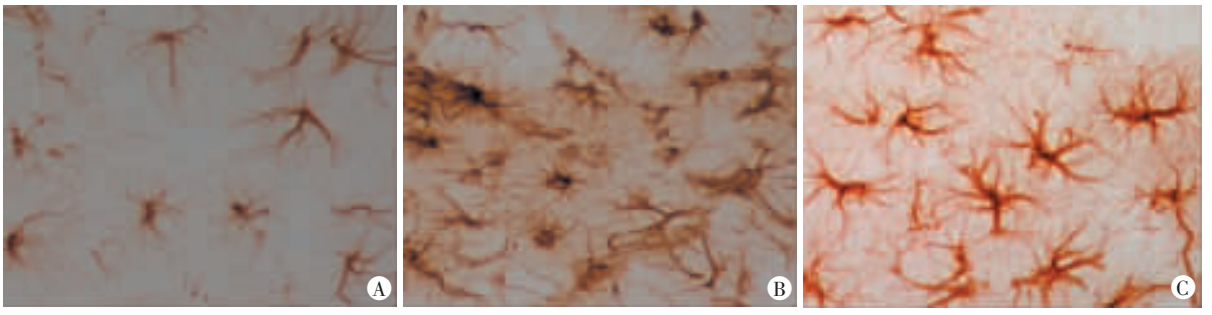
表 2 3 组大鼠记忆能力测定($\bar{x} \pm s$,$n=8$)

组别	穿越平台次数	跨越目标象限时间占整个游泳的时间百分率(%)
UC 组	11.88 ± 2.23	48.60 ± 6.87
CIH 组	5.75 ± 2.71[b]	32.35 ± 4.51[b]
RH 组	9.00 ± 2.45[ac]	41.56 ± 5.56[ad]

a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与 UC 组比较;c:$P<0.05$,d:$P<0.01$,与 CIH 组比较

2.2 GFAP 免疫组化结果

UC 组海马 CA3 区内 GFAP 阳性细胞细胞质呈棕黄色,胞体较小,周围有放射状突起,突起细、短,形态大致如蜘蛛状(图 1A);CIH 组海马 CA3 区内 GFAP 表达较 UC 组明显多、粗、深染,细胞突起变长、增粗和分支增多(图 1B)。RH 组海马 CA3 区 GFAP 表达较 UC 组稍多、突起较粗、染色稍深(图 1C)。各组海马 CA3 区 GFAP 表达水平的比较显示,CIH 组 17.69 ± 0.40 和 RH 组 16.78 ± 0.21 GFAP 阳性产物 COD 值均低于 UC 组 15.44 ± 0.53($P<0.01$);RH 组的 COD 值较 CIH 组升高,差异有显著性($P<0.01$)。



A:UC 组; B:CIH 组; C:RH 组

图 1　胶质纤维酸性蛋白在各组海马 CA3 区的表达　(S-P ×400)

3　讨论

OSAHS 是一种常见的慢性睡眠疾病,由其导致的学习记忆能力下降严重影响了患者的生活和工作,但其机制尚不十分清楚。我们通过建立慢性间歇性缺氧大鼠模型,观察慢性间歇性缺氧以及复氧后对大鼠学习记忆能力的影响,以揭示 OSAHS 患者出现学习记忆障碍的可能机制。

本实验选用 Morris 水迷宫实验检测慢性间歇性缺氧对大鼠海马空间学习记忆能力的影响。本实验结果显示,在定位航行实验中,CIH 组大鼠通过训练获得有效经验的能力下降,即学习能力下降; RH 组的学习能力有所改善,但仍比 UC 组差。在空间探索实验中,UC 组大鼠游泳轨迹主要分布于平台所在的象限,且多次跨过平台位置;而 CIH 组和 RH 组大鼠由于空间记忆的减退,对平台位置不能产生记忆,故游泳轨迹分布于平台象限较少,提示 CIH 组大鼠空间定位记忆能力受到严重损害,RH 组的空间定位记忆能力有所改善,但低于 UC 组。我们研究结果显示复氧的 RH 组大鼠学习记忆能力有部分改善,与国内外学者临床研究结果相一致[1]。

GFAP 存在于星形胶质细胞中,是该类细胞的特异性蛋白,可作为星形胶质细胞敏感的标记物。星形胶质细胞参与神经递质的代谢,通过众多包绕在突触周围的突起,摄取和调节释放至突触间隙的神经递质的量,以保证突触传递的敏感性,确保突触可塑性的实现[7]。GFAP 的变化可影响突触可塑性,发挥其对神经信息的调节作用,进而影响学习记忆过程[3]。本实验结果显示 GFAP 在 CIH 组大鼠海马 CA3 区表达较 UC 组明显升高,RH 组介于 CIH 组和 UC 组之间。说明慢性间歇性缺氧可能使大鼠海马 CA3 区星形胶质细胞活化,细胞肿胀、肥大、突起增多和延长,可能引起胶质瘢痕的形成,影响神经纤维的传导和突触的构建,进而使大鼠的学习记忆功能下降;复氧 4 周后,RH 组大鼠海马 CA3 区星形胶质细胞肿胀、肥大减轻,突起也接近正常,对神经纤维的传导和突触的构建的影响减弱,可能使大鼠的学习记忆功能部分恢复。这些结果均与 Morris 水迷宫实验检测结果一致。

综上所述,慢性间歇性缺氧可引起星形胶质细胞活化,进而影响突触可塑性,导致大鼠学习记忆功能下降,复氧后学习记忆能力有部分改善。由此推测,长期慢性间歇性缺氧引起星形胶质细胞形态和功能改变可能是 OSAHS 患者学习记忆功能下降的重要机制之一。因此,对 OSAHS 患者,越早解除缺氧则海马等重要缺氧敏感区损害越轻,损害越容易恢复。反之,病程越长治疗效果也越差。

参考文献:

[1] Alchanatis M, Zias N, Deligiorgis N, *et al*. Sleep apnea-related cognitive deficits and intelligence: an implication of cognitive reserve theory [J]. J Sleep Res, 2005, 14(1): 69 - 75.

[2] 杨　宇, 谭胜玉, 张新民, 等. 慢性间歇性缺氧对认知功能及海马 CA1 区 IGF-1 表达的影响[J]. 中国临床心理学杂志, 2007, 15(1): 85 - 87, 80.

[3] Philips M F, Mattiasson G, Wieloch T, *et al*. Neuroprotective and behavioral efficacy of nerve growth factor-transfected hippocampal progenitor cell transplants after experimental traumatic brain injury[J]. J Neurosurg, 2001, 94(5): 765 - 774.

[4] Fagan K A. Selected Contribution: Pulmonary hypertension in mice following intermittent hypoxia[J]. J Appl Physiol, 2001, 90(6): 2502 - 2507.

[5] 王　璋, 司良毅, 廖友斌. 大鼠睡眠呼吸暂停综合征动物模型的建立[J]. 中国实验动物学报, 2006, 14(1): 40 - 43.

[6] 马原野, 王建红. 认知神经科学原理和方法[M]. 重庆: 重庆出版社, 2003: 250 - 253.

[7] Pekny M, Johansson C B, Eliasson C, *et al*. Abnormal reaction to central nervous system injury in mice lacking glial fibrillary acidic protein and vimentin [J]. J Cell Biol, 1999, 145(3): 503 - 514

(编辑　邓强庭)