文章编号:1000-5404(2012)19-1981-04

论著

围生期营养不良对仔鼠学习记忆功能的影响

康卓君,王永红,罗 强,王小林,董为伟 (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院神经内科,重庆市神经病学重点实验室)

[摘要] **目的** 研究围生期营养不良对仔鼠学习记忆的影响,探讨其可能的机制。**方法** 怀孕14 d的SD大鼠分为实验组(半量饮食组)与对照组(正常饮食组),至哺乳期结束(仔鼠出生21 d)后实验组和对照组的仔鼠均正常饮食。测量仔鼠出生时和成年时的体质量。采用Morris水迷宫测试仔鼠的学习、记忆功能。免疫组化检测DNA氧化损伤(8-OhdG)和Western blot检测DNA氧化损伤修复(OGG1)指标。**结果** 实验组仔鼠出生和成年后体质量均小于对照组[(4.66±0.28) g *vs* (6.59±0.16) g,(187.66±22.67) g *vs* (279.50±18.73) g,$P<0.01$];Morris水迷宫实验中,空间探索实验实验组较对照组潜伏时间长[(37.21±4.93) s *vs* (16.41±5.21) s,$P<0.05$],穿越平台次数较少[(6.57±1.22) *vs* (13.12±2.34),$P<0.05$],跨越目标象限时间占整个游泳的时间百分率低[(32.75±4.58)% *vs* (60.31±6.74)%,$P<0.01$],Morris水迷宫实验表明实验组学习记忆功能均比对照组下降;8-OHdG的表达在幼年期(22 d)和成年期(90 d)实验组均比较高,与对照组相比具有统计学意义[(18.01±0.05) *vs* (5.77±0.03),(21.15±0.10) *vs* (10.81±0.08),$P<0.05$];OGG1的表达在幼年期(22 d)和成年期(90 d)实验组均比较低,与对照组相比差异具有统计学意义[(0.32±0.08) *vs* (0.81±0.06), (1.57±0.10) *vs* (2.78±0.53),$P<0.05$]。**结论** 围生期营养不良对仔鼠成年期的学习记忆功能产生影响,其机制可能与DNA氧化损伤、修复调节的障碍有关。

[关键词] 围生期营养不良;学习;记忆;DNA损伤; DNA修复; 大鼠
[中图法分类号] R151.41; R338.64; R715.3 [文献标志码] A

Effect of perinatal malnutrition on learning and memory function of newborn rats

Kang Zhuojun, Wang Yonghong, Luo Qiang, Wang Xiaolin, Dong Weiwei (Department of Neurology, Chongqing Key Laboratory of Neurology, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To study the effect of perinatal malnutrition on learning and memory function of newborn rats and its possible mechanism. **Methods** Fourteen-day pregnant SD rats were divided into experimental group (half amount diet group) and control group (normal diet group). The newborn rats were divided into experimental group and control group on day 21 after birth and fed with normal diet. BMI of newborn and adult rats were weighed. Learning and memory function of newborn rats were assayed by Morris water maze behavioral test. DNA oxidative damage (8-OhdG) and its repair index (OGG1) were detected by immunohistochemistry and Western blotting, respectively. **Results** The BMI of newborn and adult rats was significantly lower in experimental group than in control group (4.66±0.28 *vs* 6.59±0.16, 187.66±22.67 *vs* 279.50±18.73 g, $P<0.01$). Space exploration experiments showed that the latent time was significantly longer, the crossing platform frequency was significantly less, and the percentage of crossing target quadrant time to total swimming time was significantly shorter in experimental group than in control group [37.21±4.93 *vs* 16.41±5.21 s, 6.57±1.22 *vs* 13.12±2.34, (32.75±4.58)% *vs* (60.31±6.74)%, $P<0.05$ or $P<0.01$]. Morris water maze behavioral test showed that the learning and memory function were lower, the 8-OHdG expression level was significantly higher whereas the OGG1 expression level was significantly lower in experimental group than in control group (18.01±0.05 *vs* 5.77±0.03, 21.15±0.10 *vs* 10.81±0.08, 0.32±0.08 *vs* 0.81±0.06, 1.57±0.10 *vs* 2.78±0.53, $P<0.05$). **Conclusion** Perinatal malnutrition impairs the learning and memory function of newborn rats, which may be related with DNA oxidative damage and its repair disturbance.

[**Key words**] perinatal malnutrition; learning; memory; DNA damage; DNA repair; rats

Corresponding author: Wang Yonghong, E-mail: wyh0231029@yahoo.com.cn

[通信作者] 王永红,E-mail:wyh0231029@yahoo.com.cn

围生期营养不良在发展中国家特别是经济落后地区还十分普遍。围生期是胎儿生长、发育的关键时期，负面的宫内环境对胎儿生长发育将产生深远影响[1]，如学习记忆功能减退、成人疾病的发生等。围生期营养不良导致成年子代学习记忆功能下降的机制尚不明确，有研究提出围生期营养不良可以编程氧化应激的学说[2]，还有神经营养因子学说[3]、胆碱能神经学说[4]等。本实验以DNA氧化损伤、修复平衡失调为切入点，通过研究仔鼠幼年和成年期DNA氧化损伤产物8-羟基脱氧鸟苷（8-Hydroxy-2-deoxyguanosine，8-OHdG）、DNA氧化损伤修复酶8-羟基鸟嘌呤DNA糖苷酶（8-oxoguanine DNA glycosylase，OGG1）表达量变化和其关系，探究围生期营养不良与学习记忆功能的关系和可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物分组和模型建立 重庆医科大学实验动物中心提供的清洁级健康怀孕的雌性SD大鼠12只，体质量200～220 g，与6只健康成年雄性SD大鼠按雌雄比例为2∶1合笼喂养在恒温（20±2）℃和12 h∶12 h明暗交替的动物房进行交配，以发现阴栓时记为怀孕0 d，正常饲养14 d后，将受孕雌鼠编号，使用随机数字表分为2组，每组6只母鼠，每只1笼。①怀孕期间：实验组的母鼠于怀孕第14天开始半量饮食，12 g/d。对照组不限量饮食（22±3）g/d。②哺乳期间：实验组产仔第0～7天饮食量12～21 g/d，第8～14天饮食量24～36 g/d，第15～21天饮食量38～42 g/d。对照组不限量饮食（通过计量基本是实验组2倍）。通过怀孕和哺乳期实验组的限量饮食造成早期营养不良模型[5]。仔鼠21 d断乳后实验组与对照组均正常饮食，饲养至成年90 d。动物饲料由重庆医科大学实验动物中心提供，分别含16%蛋白质、3%脂肪、60%碳水化合物，维生素适量。每只孕鼠哺乳相同数量的仔鼠（8只）以保证每只仔鼠哺乳均衡。

1.1.2 主要试剂 兔抗8-OhdG（北京博奥森公司），OGG1/2（H-300）（美国Santa Cruz公司），EnVision两步法试剂盒、全蛋白提取试剂盒、Bradford法蛋白浓度测定试剂盒、辣根酶标记山羊抗兔lgG（H+L）（北京中杉公司），ECL化学发光试剂盒（江苏碧云天公司）等。

1.2 方法

1.2.1 仔鼠的Morris水迷宫实验 动物模型建立后到成年（3月龄），应用Morris水迷宫实验测定大鼠空间学习记忆能力[6-7]。①定位航行实验：用60 s内找到隐藏在水面下平台的时间（逃避潜伏期）表示，反应大鼠的学习能力。②空间探索实验：记录大鼠在2 min内游泳轨迹，分别计算其跨越目标象限内的游泳时间占游泳时间的百分率、跨越平台次数，反应大鼠的空间记忆能力。

1.2.2 8-OHdG的免疫组化染色 取幼年期（22 d）、成年期（90 d）仔鼠，3.5%水合氯醛（按0.01 ml/kg，腹腔麻醉）将动物麻醉，先用生理盐水冲洗快灌，再用4%多聚甲醛溶液灌注，取脑，固定，石蜡包埋，制作石蜡切片。免疫组织化学采用EnVision两步法。石蜡组织切片二甲苯2次逐级脱蜡，梯度乙醇至水，3% H_2O_2溶液封闭内源性过氧化物酶，放入柠檬酸钠（pH=6.0）微波修复，然后山羊封闭血清封闭。加一抗兔抗-8-OHdG，4 ℃湿盒内孵育过夜，第2天37 ℃复温。PBS缓冲液冲洗，滴加二抗，湿盒内37℃孵育。PBS冲洗，DAB显色，显微镜下观察，自来水冲洗终止显色。苏木精对比染色，1%盐酸乙醇风化，氨水返蓝。脱水、透明、中性树胶封片。以PBS代替一抗做阴性对照。每只仔鼠选取3张切片，使用IPP 6.0软件分析平均光密度值（IOD值）。

1.2.3 OGG1的Western blot检测 取幼年期（22 d）、成年期（90 d）仔鼠大脑海马的100 mg组织，液氮低温研磨，加裂解液50～80 μl，冰上作用30 min，离心（4 ℃，12 000 r/min，5 min），吸取上清，Bradford法测蛋白浓度。配10%的分离胶和5%的积层胶，蛋白上样50 μg，SDS-PAGE垂直电泳，PVDF膜转膜90 min，5%脱脂牛奶封闭60 min；加一抗OGG1/2（H-300）（美国Santa Cruz公司）和兔抗鼠β-actin单克隆抗体（1∶2 000），4 ℃过夜，第2天室温孵育60 min，洗膜；HRP标记山羊抗兔IgG二抗（1∶5 000）室温孵育60 min，洗膜；加ECL显影液，曝光，显影。由于目标蛋白与内参相对分子质量接近，操作中先将1个抗体显完影，再使用碧云天抗原抗体洗脱液洗脱后，重新封闭，敷抗，显影，曝光。实验重复5次。使用Quantity One软件测定各条带的平均光密度值，分别将OGG1与对应β-actin蛋白显色条带的光密度值的比值标示OGG1蛋白的相对表达量。

1.3 统计学分析

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用SPSS 17.0统计软件，两组间的比较采用单因素方差分析的方法，水迷宫数据采用重复测量方差分析。

2 结果

2.1 仔鼠体质量

体质量是衡量个体营养发育是否充分的一项简单有效的指标，以出生时（0 d）和成年后（90 d）体质量来判断仔鼠是否有早期营养不良。结果实验组仔鼠出生和成年后体质量均低于对照组。见表1。

表1 仔鼠出生和成年后体质量比较（g，$n=12$，$\bar{x}\pm s$）

组别	出生时体质量	成年后体质量
对照组	6.59±0.16	279.50±18.73
实验组	4.66±0.28[a]	187.66±22.67[a]

a：$P<0.05$，与对照组比较

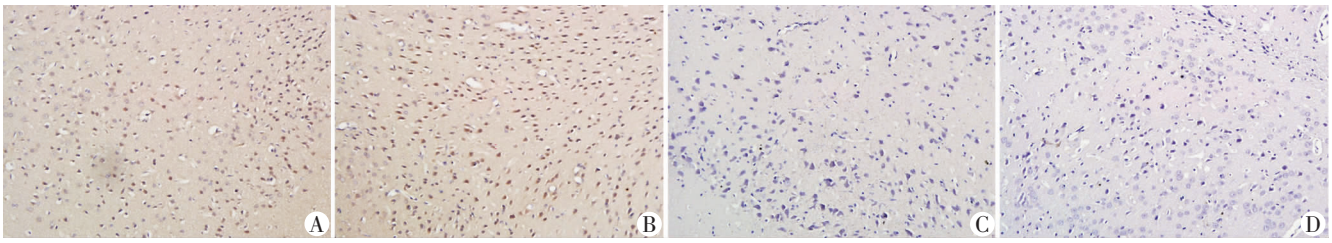
2.2 Morris水迷宫实验

2.2.1 Morris水迷宫学习成绩（定位航行实验） 与对照组相比，在各时间点，实验组逃避潜伏期均明显延长（$P<0.01$）。随着训练的进行，实验组和对照组的逃避潜伏期逐渐缩短（$P<0.05$），对照组第4天逃避潜伏期较前1 d没有明显改变（$P>0.05$）。见表2。

表2 实验组和对照组逃避潜伏期的比较（s，$n=12$，$\bar{x}\pm s$）

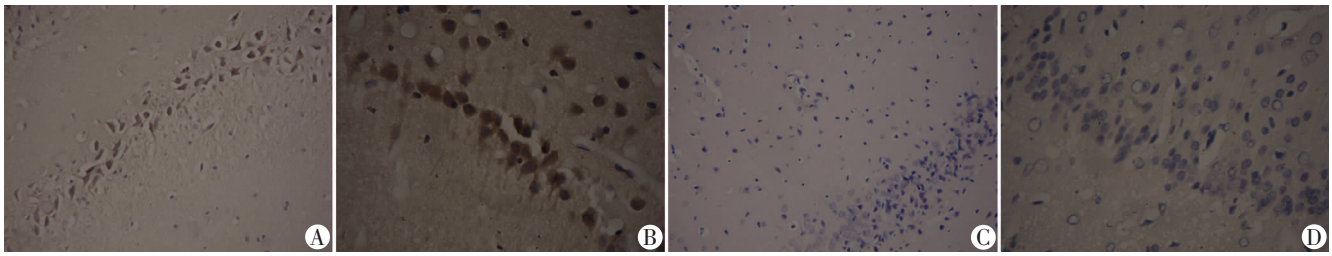
组别	第1天	第2天	第3天	第4天	第5天
对照组	48.60±5.30	30.98±5.43[a]	24.77±4.65[a]	21.51±7.38	16.41±5.21[a]
实验组	58.86±4.25[b]	55.33±5.62[b]	51.94±3.46[b]	44.36±5.72[ab]	37.21±4.93[ab]

a：$P<0.05$，与同组前1 d比较；b：$P<0.01$，与对照组相应时间点比较



A:幼年期实验组;B:成年期实验组;C:幼年期对照组;D:成年期对照组

图 1 8-OHdG 在不同时期 2 组实验鼠海马区的表达 (EnVision ×200)



A:幼年期实验组;B:成年期实验组;C:幼年期对照组;D:成年期对照组

图 2 8-OHdG 在不同时期 2 组实验鼠海马 CA3 区的表达 (EnVision ×400)

2.2.2 Morris 水迷宫记忆成绩(空间探索实验) 与对照组相比,实验组穿越平台次数减少($P<0.05$),实验组较对照组跨越目标象限时间占整个游泳的时间百分率显著减小($P<0.01$)。见表 3。

表 3 穿越平台次数和跨越目标象限时间百分率的比较($n=12$, $\bar{x}\pm s$)

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(%)
对照组	13.12±2.34	60.31±6.74
实验组	6.57±1.22[a]	32.75±4.58[b]

a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与对照组比较

2.3 免疫组化检测 8-OHdG 表达

8-OHdG 的表达在幼年期(22 d)和成年期(90 d)实验组与对照组间均具有差异。幼年期仔鼠海马 CA3 区,实验组比对照组的细胞层数和数目都明显减少,比较海马 CA3 区的 IOD 值,实验组 8-OHdG 的表达较对照组差异有显著性[(18.01±0.05) *vs* (5.77±0.03),$P<0.01$]。成年期组织切片,仔鼠海马 CA3 区实验组比对照组的细胞层数和数目也明显减少,实验组海马 CA3 区 8-OHdG 表达的 IOD 值较对照组有统计学差异[(21.15±0.10) *vs* (10.81±0.08),$P<0.05$]。见图 1、2。

2.4 Western blot 检测 OGG1 蛋白的表达

OGG1 在幼年期和成年期表达实验组(0.32±0.08)、(1.57±0.10)均比较低,与对照组(0.81±0.06)、(2.78±0.53)相比差异具有统计学意义($P<0.05$)。见图 3。



1:实验组;2:对照组

A:幼年期;B:成年期

图 3 Western blot 检测 2 组各时期 OGG1 蛋白的表达

3 讨论

围生期胎儿生长、发育迅速,器官发育不成熟,胃肠道功能不全,营养物质体内储备少,因而对母体营养供给的需求量大。围生期营养直接影响到胎儿脑细胞的增殖,可以造成大脑、小脑萎缩,海马体积变小[8],严重营养不良时,新生儿脑细胞可减少 20%[9]。本研究的实验组在怀孕和哺乳期均限量饮食,造成早期营养不良的模型,出生时和成年期体质量均比对照组轻,海马 CA3 区形态学观察,幼年期和成年期脑组织的细胞层数都减少,神经元数目也减少。

围生期的营养状况,不仅影响胎儿的生长,而且决定了胎儿的氧化应激水平。首先,蛋白质的缺乏会使谷胱甘肽(GSH)或含硫氨基酸减少,抗氧化酶合成减少或活性下降[9]。其次,微量营养素如硒、铜、锌、锰、维生素 C 是抗氧化剂必不可少的辅助因子,微量营养素缺乏时,抗氧化剂活性会降低[10]。而脑组织含有丰富的多不饱和脂肪酸,消耗全身 20% 的氧,抗氧化剂活性又比较低,这就使大脑更易于受氧化应激的侵袭[11],因此脑组织中的 DNA 大分子在氧化应激水平较高的情况下易于发生氧化应激损伤。8-OHdG 目前已成为 DNA 氧化损伤中最常采用的生物标志物,而 OGG1 是一个带有 AP 裂解酶活性的双功能 DNA 糖苷酶,主要识别和切除 DNA 双链中的 8-OHdG,其功能具有特异性[12]。DNA 氧化损伤修复酶的减少,DNA 氧化损伤产物的堆积,使机体长期处于高氧化应激状态,这种内环境的改变和 DNA 的破坏导致仔鼠脑组织中神经元凋亡、神经纤维消失、突触减少,特别是胆碱能

神经突触的减少,将形成学习记忆能力和认知功能的降低[13-15]。本实验通过 Morris 水迷宫实验表明实验组的成年仔鼠学习记忆功能明显下降,幼年期和成年期的仔鼠实验组 8-OHdG 比对照组升高,OGG1 比对照组降低,这可能是围生期营养不良引起仔鼠学习记忆功能障碍的机制之一。

围生期营养对子代生存和健康具有非常重要的意义,为母体提供足够的营养,不仅满足胎儿的生长,而且降低胎儿的氧化应激水平、保障子代的学习和记忆能力。为了提高人口素质,减少成人疾病发生,需要从胎儿期、婴幼儿期就开始预防。要保证母婴良好的营养,需要社会、政府、妇幼及儿科医务工作者们做出有效而长期的努力。

参考文献:

[1] Calkins K, Devaskar S U. Fetal origins of adult disease[J]. Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care, 2011, 41(6): 158-176.

[2] Luo Z C, Fraser W D, Julien P, *et al*. Tracing the origins of "fetal origins" of adult diseases: programming by oxidative stress? [J]. Med Hypotheses, 2006, 66(1): 38-44.

[3] Wang L, Xu R J. The effects of perinatal protein malnutrition on spatial learning and memory behaviour and brain-derived neurotrophic factor concentration in the brain tissue in young rats[J]. Asia Pac J Clin Nutr, 2007, 16(Suppl 1): 467-472.

[4] Mellott T J, Kowall N W, Lopez-Coviella I, *et al*. Prenatal choline deficiency increases choline transporter expression in the septum and hippocampus during postnatal development and in adulthood in rats[J]. Brain Res, 2007, 1151: 1-11.

[5] Coupe B, Dutriez-Casteloot I, Breton C, *et al*. Perinatal undernutrition modifies cell proliferation and brain-derived neurotrophic factor levels during critical time-windows for hypothalamic and hippocampal development in the male rat[J]. J Neuroendocrinol, 2009, 21(1): 40-48.

[6] 张峰, 姚红兵, 李兵, 等. 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[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(12): 1161-1163.

[7] Vorhees C V, Williams M T. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory[J]. Nat Protoc, 2006, 1(2): 848-858.

[8] Matos R J, Orozco-Solis R, Lopes-de-Souza S, *et al*. Nutrient restriction during early life reduces cell proliferation in the hippocampus at adulthood but does not impair the neuronal differentiation process of the new generated cells[J]. Neuroscience, 2011, 196: 16-24.

[9] Bonatto F, Polydoro M, Andrades M E, *et al*. Effect of protein malnutrition on redox state of the hippocampus of rat[J]. Brain Res, 2005, 1042(1): 17-22.

[10] Mistry H D, Williams P J. The importance of antioxidant micronutrients in pregnancy[J]. Oxid Med Cell Longev, 2011, 2011: 841749.

[11] Migliore L, Coppede F. Environmental-induced oxidative stress in neurodegenerative disorders and aging[J]. Mutat Res, 2009, 674(1/2): 73-84.

[12] Dezor M, Dorszewska J, Florczak J, *et al*. Expression of 8-oxoguanine DNA glycosylase 1 (OGG1) and the level of p53 and TNF-alpha proteins in peripheral lymphocytes of patients with Alzheimer's disease[J]. Folia Neuropathol, 2011, 49(2): 123-131.

[13] Chen L, Lee H M, Greeley G H Jr, *et al*. Accumulation of oxidatively generated DNA damage in the brain: a mechanism of neurotoxicity[J]. Free Radic Biol Med, 2007, 42(3): 385-393.

[14] Jeppesen D K, Bohr V A, Stevnsner T. DNA repair deficiency in neurodegeneration[J]. Prog Neurobiol, 2011, 94(2): 166-200.

[15] Harrison J F, Hollensworth S B, Spitz D R, *et al*. Oxidative stress-induced apoptosis in neurons correlates with mitochondrial DNA base excision repair pathway imbalance[J]. Nucleic Acids Res, 2005, 33(14): 4660-4671.

(收稿:2012-04-19;修回:2012-05-17)

(编辑 王小寒)

(上接1964页)

解毒药物,同时给予合理的药物加物理降温处理,全部患儿治愈或好转出院。平均退热时间5.4 d,47例治愈,9例好转出院,平均住院时间14 d。

2 讨论

症状及X线胸片表现较重而体征较轻是支原体肺炎的临床特点[3-4]。近年来,由于阿奇霉素的应用较广泛,退热药物的应用标准把握不严,部分患儿的临床表现不典型,如体温升高的程度下降,病程时间较长,部分患儿继发有其他细菌感染等。本组患儿大部分有高热(62.5%)、咳嗽(100%)症状,体征多不明显,X线胸片表现较重,大多病程较长,部分患儿有肺外表现。X线胸片多为一侧或两侧肺野弥漫性肺纹理增多和增粗,部分为肺段或肺叶的间质性高密度影,呈云絮状、网格状。本组患儿冷凝集及支原体抗体的阳性率不高,分别为35.7%和57.1%,这可能与院外不适当的干预治疗有关。咽拭子支原体病原检查是近年来临床上应用的快速检测支原体病原的方法,本组患儿咽拭子支原体病原检测46例阳性,阳性率(82.1%)较高,对诊断支原体感染的临床意义较大,适用于基层医院开展。因此,对于高热、干咳较重的患儿应及时结合临床表现及X线胸片的特点,进行冷凝集及支原体抗体的检查,结合咽拭子支原体病原检测,以期及早明确病原诊断,合理应用抗生素,指导临床治疗。

参考文献:

[1] 李昌崇, 张维溪. 2009年我国儿科临床医学研究进展——儿童呼吸系统疾病研究进展[J]. 中国实用儿科杂志, 2010, 25(5): 321-325.

[2] 宋丽君, 彭丽, 邢娜, 等. X线胸片呈大叶性肺炎改变的儿童肺炎支原体肺炎409例临床分析[J]. 中国实用儿科杂志, 2010, 25(11): 882-883.

[3] 胡亚美, 江载芳. 诸福棠实用儿科学[M]. 7版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 1204-1205.

[4] 陈秋芳, 余刚, 张海邻, 等. 小儿支原体肺炎的临床、影像学及内镜特点[J]. 临床儿科杂志, 2009, 27(1): 42-45.

(收稿:2012-07-09;修回:2012-08-16)

(编辑 王 红)