基础研究 文章编号:0253-3626(2010)03-0342-04

脑发育不同阶段甲醛暴露对大鼠学习记忆能力及海马 CA3 区 CaMK Ⅱ表达的影响

廖 双,蒋 莉,张晓萍
(重庆医科大学附属儿童医院神经内科,重庆 400014)

【摘 要】目的:研究低浓度甲醛吸入对脑发育不同阶段大鼠空间学习记忆能力、生长发育及海马 CA3 区 CaMK Ⅱ表达的影响。方法:选择生后 3 d、14 d、60 d(相当于新生儿期、幼年期、成年期)Wistar 大鼠,每年龄段随机分为对照组和染毒组各 8 只,采用吸入方式染毒(甲醛浓度为 0.5 mg/m³),2 h/d,连续 28 d;监测大鼠体重,用 Morris 水迷宫检测其空间学习记忆能力,免疫组织化学方法检测海马 CA3 区 CaMK Ⅱ表达。结果:所有染毒组大鼠较同龄对照组均出现体重增长落后($P<0.05$);新生鼠染毒组和幼年鼠染毒组在 Morris 水迷宫中定位航行实验逃避潜伏期比同龄对照组明显延长($P<0.05$);空间探索试验穿越平台次数也明显少于同龄对照组($P<0.05$);免疫组织化学检测海马 CA3 区 CaMK Ⅱ表达较同龄对照组下降($P<0.05$);而成年组除染毒组体重增长落后外,水迷宫逃避潜伏期、穿越平台次数及海马 CA3 区 CaMK Ⅱ表达两组均无显著性差异($P>0.05$)。结论:甲醛吸入染毒可能影响 Wistar 大鼠学习记忆能力,脑发育早期(新生儿期和婴幼儿期)对甲醛的神经毒性更为敏感;海马 CA3 区 CaMK Ⅱ表达下降可能是甲醛影响大鼠学习记忆的机制之一。

【关键词】甲醛;学习记忆;钙调蛋白依赖性蛋白激酶;发育期
【中国图书分类法分类号】R126.8 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-11-23

Effects of inhaled formaldehyde on learning and memory and expression of CaMK Ⅱ in hippocampus of Wistar rats of different ages

LIAO Shuang, et al
(*Department of Neurology, the Children's Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effects of inhaled low level formaldehyde on learning and memory, the body weight, and the expression of CaMK Ⅱ in hippocampus of Wistar rats of different ages. *Methods*: 48 Wistar rats including 16 neonatal rats (P3), 16 childhood rats (P14) and 16 adult rats (P60) were divided into control groups and formaldehyde exposure groups randomly according to their age. During 28 consecutive days, the experimental groups were exposed to the gaseous formaldehyde (0.5mg/m³) for 2 h/d. The Morris water maze test was conducted to investigate the spatial learning and memory of the rats. The expressions of CaMK Ⅱ were assayed by immunohistochemical techniques. *Results*: The body

作者介绍:廖 双(1980-),男,硕士,
研究方向:儿童脑发育与脑损伤。
通讯作者:蒋 莉,女,教授,E-mail:dr_jiangli@126.com。

血缺氧导致的神经细胞凋亡可能起着积极的作用;其机制可能与上调 Bcl-2、下调 Bax 有关,作者对其确切机制的研究仍在进行当中,随着研究的不断深入,细胞色素 C 有望成为治疗 SAS 的重要手段。

参 考 文 献

[1] Fagan K A.Selected contribution:Pulmonary hypertension in mice following intermittent hypoxia[J].J Appl physiol,2001,90(2):2502-2507.
[2] 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.
[3] Banerjee Partha P,Banerjee Subhadra, Brown Terry R. Bcl-2 protein expression correlates with cell survival and androgen independence in rat prostatic lobe [J]. Endocrinology, 2002,143(5):1825-1832.
[4] Yang J,Liu X,Bhalla K,et al.Prevention of apoptosis by Bcl-2:release of cytochrome C from mitochondria blocked[J].Science,1997,275(5303):1129-1133.
[5] Scorrano L, Petronilli V, Di Lisa F, et al.Commitment to apoptosis by GD3 ganglioside depends on opening of the mitochondrial permeability transition pore[J]. J Biol Chem, 1999, 274(32):22581-22585.
[6] Kubli D A,Ycaza J E,Gustafsson AB.Bnip3 mediates mitochondrial dysfunction and cell death through Bax and Bak[J]. Biochem J,2007,405(3):407-415.
[7] Scorrano L,Oakes S A,Opferman J T,et al.BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca^{2+}: a control point for apoptosis[J].Science, 2003,300(5616):135-139.

(责任编辑:关蕴良)

weight of all the experimental groups were less than that of control groups ($P<0.05$). In neonatal and childhood rats groups, the escape latency in experimental groups were significantly longer than that of control groups ($P<0.05$), while the frequency of stepping over the platform location were significantly less than that of control groups ($P<0.05$), and the expression of CaMK Ⅱ in hippocampus in experimental groups showed a significant decrease compared with control groups ($P<0.05$). But in adult groups there were no significant difference between experimental groups and the control groups ($P>0.05$), except with the body weight. *Conclusion*: Inhaled formaldehyde has a negative effect on learning and memory of Wistar rats; the developing brain appears far more vulnerable than the mature brain. Changes of CaMK Ⅱ in hippocampus may be one of the mechanisms of the effects on learning and memory.

【Key words】Formaldehyde; Learning and memory; Calmodulin-dependent protein kinase Ⅱ; Developing period

随着人们生活水平的不断提高，居住条件的改善，建筑装饰材料引起的室内空气污染对人类身体健康的危害日益受到关注。调查显示甲醛已成为中国新装修家庭的主要室内污染物，甲醛吸入后可引起疲劳、头晕、轻度头痛，睡眠障碍，记忆困难、反应变慢等神经系统损害的症状[1]。但其神经毒性机制如何，目前仍不明确。与成人相比，婴幼儿在室内滞留的时间更长，更容易受到超标甲醛的污染，而未成熟脑尚在发育过程中，可能对甲醛具有不同的敏感性[2,3]，但这些差异性目前鲜有报道。因此，本实验模拟室内甲醛释放方式，观察甲醛吸入对不同发育期 Wistar 大鼠学习记忆能力的影响，检测与学习记忆相关的钙调蛋白依赖性蛋白激酶Ⅱ(Calmodulin dependent protein kinase Ⅱ，CaMK Ⅱ)表达，探讨甲醛吸入所致神经毒性的年龄差异性及可能的分子机制。

1 材料和方法

1.1 仪器与试剂

60 L 有机玻璃染毒柜(自制)，便携式室内甲醛浓度监测专用仪器(天津富士佳环境净化有限公司)，37%～40%甲醛分析纯溶液(成都科龙化学试剂有限公司)，甲醛检测试剂(北京陆桥商检新技术公司)，CaMK Ⅱ单克隆抗体(美国CELL SIGNALING 公司)，水迷宫(重庆医科大学附属儿童医院)。

1.2 实验动物

健康 Wistar 大鼠 48 只，由重庆儿童医院动物中心提供[实验动物许可证 syxk(渝)20040001]其中成年鼠(生后 60 d)、幼年鼠(生后 14 d)、新生鼠(生后 3 d)各 16 只，雌雄各半。饲养条件：温度(24 ± 2)℃，相对湿度(55 ± 10)%。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组与染毒 48 只大鼠按年龄性别随机分为对照组和染毒组，即成年对照组、成年干预组；幼年对照组、幼年染毒组；新生对照组和新生染毒组，每组 8 只。WHO 的室内环境甲醛标准为 0.1mg/m³[4]，从动物实验推导到人用 5～10 倍的安全系数设定浓度为 0.5 mg/m³，大鼠置于染毒柜采用静式吸入染毒，每天 2 h，连续 28 d，对照组吸入清洁空气。染毒期间动物禁食禁水，其他时间自由进食和饮水。采用便携式室内甲醛浓度监测专用仪器检测染毒柜中甲醛浓度，于染毒开始后、染毒中间及染毒结束前各测定 1 次，其结果为(0.5 ± 0.1)mg/m³。每周监测大鼠体重。

1.3.2 水迷宫试验 定位航行试验：记录每组 8 只大鼠在 60 s 内从 4 个不同象限入水至发现并爬上平台的时间(以 s 记)作为训练潜伏期，即逃避潜伏期。将每 4 次训练潜伏期的均值作为 1 次平均训练潜伏期，每天训练 2 次，连续 5 d，作为空间学习能力的评价指标。

空间探索试验 在定位航行试验后，即实验的第 6 d，撤除平台，然后任选 1 个入水点，所有大鼠在相同的入水点，将其面向池壁放入水池中，记录其在 60 s 内的跨越原平台所在位置的次数即穿越平台次数，以此考察大鼠对原平台的记忆能力。

1.3.3 CaMK Ⅱ免疫组织化学染色的测定 水迷宫实验结束后将各组大鼠先以生理盐水经主动脉灌流冲洗血液，再用 4%多聚甲醛 200 ml 灌注固定，取脑组织石蜡包埋，切片机行冠状连续切片，采用 SP 染色法检测脑组织 CaMK Ⅱ的表达，一抗(工作浓度 1:200)为小鼠抗大鼠 CaMK Ⅱ单克隆抗体(美国 CELL SIGNALING)4℃孵育过夜，ABC 试剂盒(北京中山公司)，DAB 显色系统闭光显色后光镜观察，细胞胞浆及胞膜上呈棕黄色为阳性表达。

1.4 图像分析

在 400 倍光学显微镜下观察各组大鼠海马 CA3 区，选择 5 个不重复视野用 Image—pro plus 5.0 图像分析软件测出每平方微米组织切片平均光密度值。

1.5 统计学分析

数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示，用 SPSS11.0 统计分析程序，采用单因素方差分析和 LSD 法进行统计分析，以 $P<0.05$ 作为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 实验动物一般状况

染毒组大鼠早期均出现喷嚏、抹鼻、鼻部充血、兴奋不安、四处逃窜、呼吸增快；然后逐渐转变为少动、堆积成簇的现象，毛发潮湿，毛色发黄无光泽，5 只老鼠出现腹胀并随着染毒时间的延长这一现象逐渐加重。对照组大鼠无此现象。

2.2 大鼠体重增长情况

与同龄对照组相比各染毒组体重增长均明显落后，有显

表 1　不同年龄大鼠随染毒时间体重变化的比较（n=8，$\bar{x} \pm s$，g）

组别		初始	1 周	2 周	3 周	4 周
新生鼠	对照组	7.46 ± 0.43	18.34 ± 0.65	35.50 ± 2.07	51.85 ± 2.42	69.36 ± 3.08
	实验组	7.57 ± 0.52	17.76 ± 0.19*	30.15 ± 2.13*	36.47 ± 3.46*	47.15 ± 5.48*
幼年鼠	对照组	35.50 ± 2.07	54.35 ± 2.46	90.76 ± 4.08	131.70 ± 2.90	177.31 ± 7.29
	实验组	35.65 ± 2.03	51.60 ± 2.49*	88.18 ± 3.54*	112.52 ± 7.16*	148.00 ± 6.18*
成年鼠	对照组	283.07 ± 28.52	315.56 ± 27.76	362.52 ± 31.07	404.14 ± 28.82	450.40 ± 22.79
	实验组	*289.31 ± 29.76*	*281.81 ± 32.65**	*310.97 ± 38.37**	*343.14 ± 40.15**	*378.31 ± 40.73**

注：* 与同龄对照组比较 P< 0.05

表 2　不同年龄组大鼠在 Morris 水迷宫逃避潜伏期比较（n=8，$\bar{x} \pm s$，s）

组别		第 1 d	第 2 d	第 3 d	第 4 d	第 5 d
新生鼠	对照组	55.90 ± 12.34	39.10 ± 17.41	18.09 ± 13.77	11.89 ± 4.82	7.12 ± 2.20
	实验组	57.74 ± 6.53	54.89 ± 13.27*	35.46 ± 16.4*[1]	25.79 ± 10.96*	16.24 ± 5.70*
幼年鼠	对照组	53.41 ± 12.45	29.85 ± 15.96	16.57 ± 12.96	9.03 ± 4.15	7.74 ± 2.49
	实验组	56.70 ± 8.11	50.18 ± 11.97*△	32.03 ± 18.11*△	20.87 ± 10.80*△	12.61 ± 4.49*△
成年鼠	对照组	45.31 ± 13.34	32.29 ± 10.78	16.56 ± 7.37	9.35 ± 3.12	6.98 ± 2.14
	实验组	*48.12 ± 11.67*	*30.94 ± 12.33*	*17.29 ± 6.63*	*9.54 ± 3.01*	*7.05 ± 2.33*

注：* 与同龄对照组比较 P<0.05，△与新生鼠实验组比较 P<0.05

表 3　不同年龄组大鼠在 Morris 水迷宫穿越平台次数比较（n=8，$\bar{x} \pm s$，次）

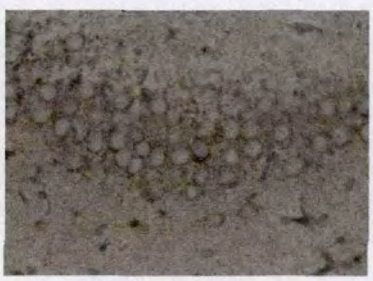
组别		穿越平台次数
新生鼠	对照组	7.37 ± 1.20
	实验组	3.41 ± 1.07 *
幼年鼠	对照组	6.75 ± 2.25
	实验组	4.60 ± 1.06 *△
成年鼠	对照组	*6.88 ± 2.01*
	实验组	6.35 ± 1.43

注：* 与同龄对照组比较 P< 0.05，△与新生鼠实验组比较 P<0.05

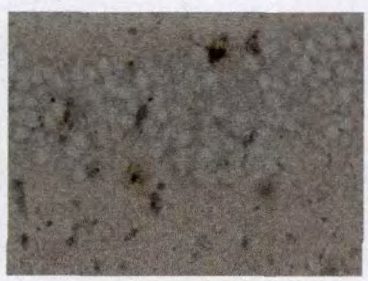
表 4　不同年龄组大鼠海马 CA3 区 CaMKⅡ免疫阳性细胞平均光密度值比较

组别		平均光密度值
新生鼠	对照组	0.2511 ± 0.1097
	实验组	0.2139 ± 0.1125*
幼年鼠	对照组	0.2447 ± 0.1317
	实验组	0.2354 ± 0.1252*△
成年鼠	*对照组*	*0.2621 ± 0.1113*
	实验组	0.2598 ± 0.0130

注：* 与同龄对照组比较 P<0.05，△与新生鼠实验组比较 P<0.05



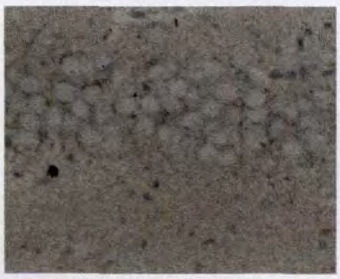
A . 对照组新生大鼠海马 CA3 区



B. 实验组新生大鼠海马 CA3 区



C. 对照组幼年大鼠海马 CA3 区



D. 实验组幼年大鼠海马 CA3 区



E. 对照组成年大鼠海马 CA3 区



F. 实验组成年大鼠海马 CA3 区

图 1　不同年龄组大鼠海马 CA3 区 CaMKⅡ表达（x 400）

著性差异($P<0.05$),见表 1。

2.3 Morris 水迷宫实验结果

在 Morris 水迷宫试验中,与同龄对照组比较,新生鼠实验组和幼年实鼠验组的逃避潜伏期明显延长($P<0.05$);穿越平台次数也明显减少($P<0.05$);且新生鼠实验组与幼年鼠实验组比较也有显著性差异($P<0.05$);但成年鼠实验组的水迷宫试验与其对照组比较无统计学差异($P>0.05$)。结果见表 2、表 3。

2.4 甲醛对大鼠脑海马 CA3 区 CaMKⅡ表达的影响

平均光密度统计结果显示:幼年鼠染毒组 CaMKⅡ免疫阳性细胞平均光密度值显著低于同龄对照($P<0.05$);在新生鼠组这种差异更加明显($P<0.01$),且新生鼠染毒组海马 CaMKⅡ阳性细胞平均光密度值亦小于幼年染毒组($P<0.05$)。而成年鼠实验组和对照组 CaMKⅡ阳性细胞平均光密度值无统计学差($P>0.05$)。结果见表 4、图 1。

3 讨 论

如前所述,大量流行病学调查发现从事甲醛作业的工人可出现疲劳、头晕、轻度头痛,睡眠障碍,回忆功能及近时、远时记忆力下降等认知功能损害[1];Malek[5]采用 5.4 ppm 浓度的甲醛予以成年大鼠吸入后发现在没有引起明显组织病理学改变的情况下,大鼠在水迷宫中的学习行为也受到影响。甲醛对成年大鼠脑的神经毒性具有剂量效应关系,浓度越高毒性越大[6,7]。而未成熟脑处于快速发育阶段,更易受毒性化学物质的影响;且易受影响的时间从胎儿发育开始一直持续到青春期。不同发育阶段的脑对甲醛的危害是否具有不同的敏感性呢? 为了较好模拟居住环境的甲醛污染状况,本实验采用 0.5 mg/m^3 的低剂量甲醛吸入染毒,结果成年 Wistar 大鼠的水迷宫试验并无明显异常,考虑与染毒剂量较低有关。然而在此染毒剂量下,无论是相当于人类幼年期的生后 14 d 龄大鼠还是相当于新生儿期的生后 3 d 龄大鼠均出现显著的学习记忆障碍,表现为大鼠在水迷宫试验中逃避潜伏期明显延长,空间探索能力降低,穿越平台次数明显减少。与生后 14 d 龄大鼠相比,生后 3 d 龄大鼠的学习记忆能力降低更加明显。提示甲醛染毒可降低大鼠的学习记忆能力,不同发育期大脑对甲醛染毒具有不同敏感性,年龄越小对甲醛的敏感性越高,这与其他学者在铅染毒、二甲苯染毒实验中的结果相似[2,3]。

迄今为止,甲醛染毒如何影响认知功能仍不明确。作为学习记忆关键部位,海马一直受到人们的关注。海马内的 CaMKⅡ在脑发育过程中有着重要作用,是神经系统信号转导通路"钙离子 - 钙调蛋白 - 钙离子 / 钙调蛋白依赖性蛋白激酶Ⅱ(Ca^{2+}-CaM-CaMKⅡ)"中的重要物质,是空间学习和记忆的分子基础[8],在 LTP 诱导过程中必须有 CaMKⅡ参与和活化[9]。有研究报道大鼠海马内的 CaMKⅡ的活性与大鼠空间记忆的表现呈正相关[10]。因此,本实验采用免疫组化方法在不同年龄大鼠中对比观察染毒大鼠海马 CA3 区 CaMKⅡ表达。结果发现,未成熟大鼠染毒组无论是生后 14 d 还是生后 3 d 的大鼠,其海马 CA3 区 CaMKⅡ表达均显著降低,其表达也与年龄相关,新生期染毒组降低最显著。可见海马 CA3 区 CaMKⅡ表达的改变与未成熟大鼠神经行为学检测结果一致。而在成年大鼠低剂量染毒后海马 CA3 区 CaMKⅡ表达与对照组无显著差别,其行为学检查结果也与此相符。由此推测,尽管影响学习记忆的机制有多种,但甲醛吸入可能影响未发育成熟大鼠海马 CA3 区 CaMKⅡ表达,导致其空间学习记忆能力降低。这可能是甲醛影响大鼠学习记忆的机制之一。

本研究提示甲醛染毒后可能通过影响海马 CA3 区 CaMKⅡ表达,降低大鼠学习记忆能力。未成熟期大脑对慢性甲醛吸入染毒具有更高的敏感性,且年龄越小越明显。鉴于小儿在室内停留时间多于成人,且儿童呼吸量按体重比较成人高近 50%,因此如何严格控制室内装修标准避免和减少室内甲醛污染,保证有利于儿童智力发育的生活空间,是仍需重视的问题。

参 考 文 献

[1] Kilburn K H. Indoor air effects after building renovation and in manufactured homes [J].Am J Med Sci,2000, 320(4):249-254.

[2] Brown D R.Neonatal lead exposure in the rat: decreased learning as a function of age and blood lead concentrations[J].Toxicol Appl Pharmacol,1975,32(3),628-637.

[3] 王秀玲,金锡鹏,丁保卿. 二甲苯对不同年龄大鼠脑组织形态学及神经细胞凋亡的影响[J].中华劳动卫生职业病杂志,1999,17(4):208-210.

[4] WHO.Concise International Chemical Assessment Document 40: Formaldehyde[R].World Health Organization,Geneva,2002:12-16.

[5] Malek F A,Mvritz K U,Fanghdnel J.A study on the effect of inhalative formaldehyde exposure on water labyrinth test performance in rats[J]. Ann Anat,2003,185(3):277-285.

[6] Lu Z, Li C M, Qiao Y, et al.Effect of inhaled formaldehyde on learning and memory of mice[J].Indoor Air,2008,18(2):77-83.

[7] 王小玲,原福胜,张志红,等.甲醛吸入对小鼠学习记忆能力的影响[J].环境与健康杂志,2008,25(5):400-402.

[8] Pastalkova E,Serrano P,Pinkhasova D,et al. Storage of spatial information by the maintenance mechanism of LTP[J]. Science,2006,313 (5790):1141-1144.

[9] Whitlock J R,Heynen A J,Shuler M G,et al. Learning induces long-term potentiation in the hippocampus[J].Science,2006,313(5790): 1093-1097.

[10] Tan S E,Liang K C.Spatial learning alters hippocampal calcium/calmodulin-dependent protein kinase II activity in rats[J].Brain Research,1996,711(1-2):234-240.

(责任编辑:冉明会)