DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.03.019
第25卷第3期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 3
230 2003年2月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Feb. 2003

论著

文章编号:1000-5404(2003)03-0230-04

小剂量梭曼对大鼠学习记忆和海马脑片LTP的影响

康健捷,黎海蒂,徐海伟,罗 峻,唐 军 (第三军医大学基础医学部生理学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 研究长期给予小剂量梭曼(Soman)对大鼠空间学习记忆和大鼠海马脑片LTP的影响。方法 采用连续14 d皮下注射小剂量梭曼(6~10 $\mu g \cdot kg^{-1}$, s.c, sig×14)为慢性中毒模型,Morris水迷宫试验进行行为检测,电生理学方法研究大鼠海马脑片CA1区长时程增强现象(long-term potentiation, LTP)的变化。结果 Morris水迷宫试验中大鼠的逃避潜伏期延长,穿过原平台位置次数和在原平台象限探索时间百分率下降;大鼠海马脑片LTP诱出率、PS幅值增加百分率均明显低于生理盐水对照组。结论 长期给予小剂量梭曼可降低大鼠的空间学习记忆能力,降低海马突触可塑性。

关键词:梭曼;学习;记忆;Morris水迷宫;LTP
中图法分类号:R338.26;R338.64;R595 文献标识码:A

Effect of low dose soman on learning and memory and long-term potentiation of hippocampal slices in rats

KANG Jian-jie, LI Hai-di, XU Hai-wei, Luo Jun, TANG Jun (Department of Physiology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the effect of chronic low dose soman on learning and memory and long-term potentiation (LTP) of hippocampal slices. Methods Rat model was established by consecutive subcutaneous injection of soman (6—10 $\mu g \cdot kg^{-1}$, s.c, sig×14) for 14 days for Morris water maze test. Long-term potential of synaptic transmission was observed in CA1 region by tetanization of the Schaffer-commissural pathway in rat hippocampal slices. Results In the Morris water maze, latency to find a hidden platform was longer and the times of crossing the situation of platform and the time percent of swimming in northeast obviously decreased. In the experiment on hippocampal slice of rats *in vitro* by microelectrode method, the generation of long-term potentiation was inhibited. Conclusion Chronic low dose soman may cause an evident learning and memory disturbance and decrease hippocampal synaptic plasticity.

Key words: soman; learning; memory; Morris water maze test; long-term potentiation

多年流行病学研究证实[1,2]:长期接触小剂量有机磷化合物可导致人学习记忆、认知功能下降,这部分人群包括在海湾战争等战争中接触化学战剂的军人、长期从事于有机磷杀虫剂和神经毒剂生产的工人、长期接触有机磷杀虫剂的农业和畜牧业的工人以及治疗有机磷急性中毒病人的医务人员等。近年来,对慢性小剂量有机磷化合物致学习记忆障碍及其神经机制的研究正越来越受到重视。梭曼(Soman, O-1, 2, 2-trimethylpropyl methylphosphonofluoridate)为剧毒的有机磷衍生物,以梭曼为代表的神经毒剂,有与敌敌畏等有机磷杀虫剂相似的结构母核,故作用机制有相似之处。但梭曼作为一类乙酰胆碱酯酶(AChE)的强抑制剂,具有难防难治的特点,常被用作军用化学战剂。该毒剂可经胃肠道、呼吸道、皮肤、注射等多种途径造成全身中毒。大剂量急性中毒表现为中枢和外周胆碱能神经过度兴奋继而转为抑制的一系列临床反应症状[3],单次小剂量梭曼中毒可在无躯体胆碱能过度兴奋症状的情况下,导致学习记忆能力下降[4],但对于慢性小剂量梭曼中毒的研究报道较为少见,尤其是有关对海马突触可塑性影响的研究。本实验采用Morris水迷宫研究方法观察慢性小剂量梭曼中毒对大鼠空间学习记忆能力的影响,应用离体脑片电生理技术观测海马长时程增强(Long-term potentiation, LTP)现象的变化。

1 材料与方法

1.1 药品

梭曼(Soman):纯度94.6%(军事医学科学院),本校毒理教研室惠赠。将梭曼溶于丙二醇中配制成1%的溶液,置于

基金项目:全军"十五"医药卫生科研基金资助项目(01MA169)
作者简介:康健捷(1976—),女,河南省新乡市人,硕士研究生,主要从事有机磷致学习记忆障碍机制等方面的研究。电话:(023)68752254
收稿日期:2002-10-08;修回日期:2002-12-20

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

－20 ℃环境保存, 实验时用灭菌双蒸水稀释成所需浓度注射液。

1.2　实验动物分组与模型制备

健康成年雄性 Wistar 大鼠 30 只(本校实验动物中心提供), 体重(180±30) g。分为生理盐水对照组(n＝10)、6 μg/kg 组(n＝10)和 10 μg/kg 组(n＝10), 后两组按每 kg 体重给药剂量分组, 给药剂量分别为半数致死量(LD_{50})的 1/16.7 和 1/10。每天上午背部皮下注射 1 次, 共 14 d, 对照组注射相同体积的生理盐水。各组均自由摄食饮水, 温度(20±3) ℃条件下饲养。末次给药后第 2 天每组大鼠随机取 6 只进行 Morris 水迷宫实验, 4 只进行 LTP 实验。

1.3　空间学习记忆实验

采用 Morris 水迷宫实验检测大鼠的空间学习记忆能力。水迷宫为直径 94 cm, 高 55 cm 的圆形水池, 水深 40 cm, 水温保持(25±1) ℃, 水面均匀覆盖一层大小相似的泡沫颗粒。池壁上标有东南西北四个入水点, 它们将水池等分为四个象限, 分别称 SW、NW、SE 及 NE 象限, 在 NE 象限正中离池壁 20 cm 处放一个面积为 6 cm× 10 cm, 高 38 cm 的长方形透明平台, 平台顶低于水面 2 cm。训练期间迷宫外参照物保持不变。① 定位航行实验(Place navigation test): 实验前 1 d 下午将大鼠放入水中自由游泳 2 min, 观察其游泳姿势并使其熟悉实验环境。实验历时 4 天半, 每天上、下午两个时间段(Block), 每个时间段训练 4 次(trial)。每只大鼠在训练前放于平台 2 min 以熟悉水迷宫环境。每次训练随机选择一个入水点将大鼠面向池壁放入水池, 同一次训练所有大鼠入水点相同。记录大鼠找到平台的时间, 即逃逸潜伏期(Escape latency)。至 120 s 找不到平台, 即将其引上平台, 潜伏期记为 120 s, 大鼠每次爬上平台或被引上平台后, 让其在平台上休息 60 s。每一时间段内四次潜伏期的算术平均值作为这一时间段的学习成绩。② 空间探索实验(Spatial probe test): 训练完毕当天下午进行空间探索实验, 撤除平台, 记录大鼠 2 min 内穿过原平台位置的次数和在原平台象限即 NE 象限探索时间占总时间(2 min)的百分比。

1.4　海马脑片制备与孵育

将大鼠断头处死, 立即取出全脑置于人工脑脊液(ACSF, 4 ℃)中, 游离出海马, 取中间 1/3 段, 用脑片切片机沿海马槽方向, 连续切成 350～500 μm 厚的脑片, 将其移入脑片浴槽的尼龙网上孵育, 整个脑片的制备过程不超过 3 min, 并注意使脑组织降温。脑片通过尼龙网眼与槽内 ACSF 接触, 混和气 95%O_2＋5%CO_2 均匀弥散到脑片周围, 持续灌流 ACSF 速度为 1～1.5 ml/min, 温度维持在(34±1) ℃, 孵育时间 60 min。

1.5　电极安放及实验程序

在解剖显微镜直视下, 将尖端直径约 0.1 μm 的钨丝双极刺激电极置于 CA3 区的 Schaffer 侧支处, 将电阻 3～8 MΩ、内充以 2 mol/L NaCl 的玻璃记录微电极置于 CA1 区锥体层。由刺激器提供单通道脉冲刺激以顺向激活 CA1 区锥体细胞传入纤维所诱发的群峰电位(Population spike, PS), 经微电极放大器, 输入记忆示波器, 用示波照相记录电位。脑片电反应恢复后开始实验, 由电子刺激器输出波宽 0.2 ms 的单个脉冲测试刺激, 用引出群峰电位 60%最大反应的强度作为刺激强度。引导 PS15 min, 每隔 5 min 记录一次群峰电位幅值(Population spike amplitude, PSA), 取 3 次 PSA 平均值作为基线值(100%), 然后施加频率 100 Hz、100 个脉冲的强直刺激, 刺激强度和波宽同测试刺激。之后再以测试刺激所用参数施加刺激, 以 PSA 增加 20%以上, 持续超过 30 min 作为 LTP 形成的指标。

1.6　统计学处理

行为学指标和 PSA 增加率数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示, LTP 诱出率的差别用 χ^2 检验, 采用 SPSS11.0 统计软件进行方差分析。

2　结果

2.1　对大鼠行为学的影响

本实验中, 在 14 d 给药期间各组大鼠均未发现有肌肉震颤、惊厥、死亡现象。在末次给药当日下午, 将各组大鼠放入水中自由游泳 2 min, 观察其游泳姿势并使其熟悉实验环境。所有大鼠游泳姿势无异常并在池中积极探索。定位航行实验中所有大鼠逃逸潜伏期均随训练次数增加而下降, 但下降的速率不一致, 给药组大鼠平均逃逸潜伏期在每个时间段均长于生理盐水对照组, 见图 1, 说明大鼠学习能力有差异。经组间比较发现, 6 μg/kg 组和 10 μg/kg 组后 3 d 平均逃逸潜伏期分别为(5.90±1.07) s 和(9.74±1.08) s, 均明显高于生理盐水对照组(3.44±0.49) s(P＜0.05), 且呈剂量依赖性。空间探索实验中, 大鼠在原平台象限探索时间百分率明显小于对照组(P＜0.05); 10 μg/kg 组大鼠穿过原平台位置次数明显少于对照组(P＜0.05), 6 μg/kg 组与对照组无显著差异, 见表 1。

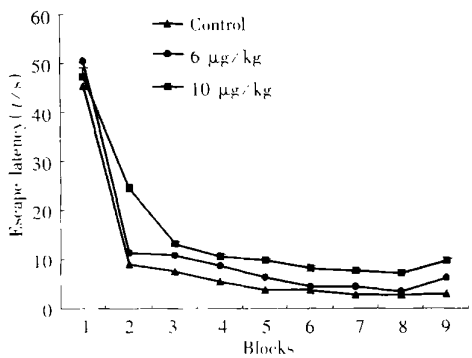


图 1　9 个训练期逃逸潜伏期的变化

Fig 1　Changes of escape latency in 9 blocks

表 1　撤除平台后 120 s 内穿过原平台位置次数及在 NE 象限探索时间百分比　(n＝6, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1　The times of crossing the situation of platform and the percentage of time in northeast of the Morris water-maze measured over 120 s after platform removed from the pool　(n＝6, $\bar{x}\pm s$)

Group	Times	Percentage of time (%)
Control	11±1.82	52.24±3.38
6 μg/kg	9.80±1.64	44.17±3.30 *
10 μg/kg	7.20±1.48 *	45.15±3.00 *

*: P＜0.05 *vs* Control

2.2　对海马 CA1 区 LTP 的影响

在强直刺激后, 对照组 8 例脑片中有 7 例 PSA 增加大于

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

60%，提示其产生 LTP，并维持 1 h 以上无衰减，LTP 诱出率达 87.5%(7/8)。6 μg/kg 组有 4 例脑片 PSA 增加超过 20%并稳定维持 1 h 以上，LTP 诱出率为 50%(4/8)，与对照组相比有显著差别($P<0.05$)。10 μg/kg 组大鼠离体海马脑片只有 3 例 PSA 增加超过 20%，未产生 LTP 的脑片中有一例在强直刺激后 10 min 其PSA 增加超过 20%，但随后便迅速衰减，LTP 诱出率为 37.5%(3/8)，显著低于对照组($P<0.05$)。由此说明，大鼠海马脑片 CA1 区 LTP 的产生被明显抑制。6 μg/kg 组和 10 μg/kg 组大鼠脑片 PSA 分别是基线值的 125%±13%和 116%±10%，显著低于对照组 173%±11%($P<0.05$)。提示连续 14 d 皮下注射小剂量梭曼损害大鼠脑片 CA1 区 LTP 的诱导和维持，见图 2。

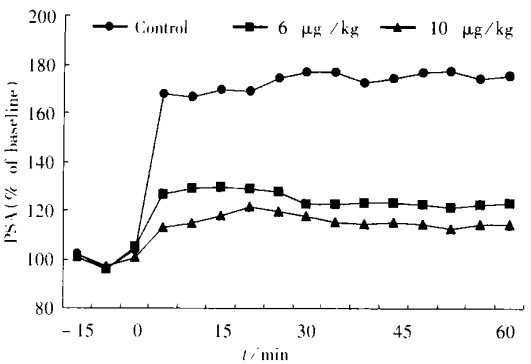


图 2 皮下注射 14 d Soman 对大鼠海马脑片强直刺激后 PSA 的影响

Fig 2 Effects of soman (6~10 μg/kg s.c. sig×14) on PSA of hippocampal slices after titanic stimulation

3 讨论

以往关于梭曼对动物行为学影响的研究多集中于亚致死剂量、惊厥剂量和亚惊厥剂量的急性作用，但对于慢性小剂量梭曼中毒的研究报道较为少见。本实验观察到所有大鼠在定位航行实验中逃逸潜伏期均随训练次数增加而下降，但 6 μg/kg 组和 10 μg/kg 组大鼠后 3 d 平均逃逸潜伏期显著长于生理盐水对照组，提示其学习和记忆的获得与巩固过程受到抑制；在空间探索实验中，大鼠在原平台象限探索时间百分率明显少于生理盐水对照组，10 μg/kg 组大鼠穿过原平台位置次数明显少于生理盐水对照组，表明梭曼对大鼠已储存记忆的读出或提取能力有抑制作用。

关于慢性小剂量梭曼中毒的神经化学机制目前尚不甚清楚。已知单次给予小于惊厥剂量的梭曼在 7 d 之内，均不会引起动物脑组织明显的组织病理学改变[5]。所以，明确形态改变之前的神经功能障碍是了解梭曼作用机制的前提。学习记忆是脑的高级功能之一，其基础是中枢神经系统的可塑性，海马 LTP 作为神经系统可塑性的一种电生理指标，可被视为学习记忆路径形成的神经模式，很可能是学习记忆在细胞水平上的模型。一些损害学习记忆的因素可减低或阻断 LTP 的形成，而易化 LTP 的因素或药物能提高动物的学习记忆能力[6]，因此，从学习记忆和突触可塑性变化的关系出发，用此模型观察梭曼对学习记忆的影响比整体动物模型更快速方便，也更直观可靠。Armstrong[7] 曾报道皮下注射亚惊厥剂量(40~60 $\mu g \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$)梭曼，持续 3~5 d 致大鼠出现震颤而无惊厥症状，可导致其记忆功能下降并明显阻断在体 LTP。我们的实验显示：经 14 d 皮下注射小剂量梭曼(6~10 $\mu g \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$)处理后，大鼠海马脑片 LTP 诱出率、PS 幅值增加率均明显低于生理盐水对照组，即长期给予小剂量梭曼可损害 LTP 的产生和维持，海马突触可塑性降低。我室薛毅珑等[8] 采用离体脑片灌流技术曾观察到，灌流 60 min 7 种浓度梭曼(相当于 0.016~16 LD_{50} 量)后改用 ACSF 灌流，在不同时相各种浓度梭曼均可不同程度地抑制大鼠海马 CA1 区顺向诱发场电位的 PS 和 EPSP，这种抑制效应具有明显的剂量依赖关系。梭曼能迅速抑制突触后电位，提示梭曼对海马脑片的突触传递过程具有抑制作用。

实验证实慢性小剂量有机磷中毒可导致皮质、海马和纹状体等脑区胆碱能 M 受体和 N 受体适应性下调[9,10]。神经毒剂梭曼可能通过直接干扰蛋白磷酸化，致使 M 受体合成受阻[11]。我们认为连续 14 d 皮下注射小剂量梭曼长期抑制胆碱酯酶致使乙酰胆碱堆积，可能继发机体神经中枢 M 受体和 N 受体下调。此外梭曼还可通过包括 NMDA 受体在内的非胆碱能机制损害学习记忆功能[12]。在行为学实验中我们观察到，长期给予小剂量梭曼可降低大鼠的空间学习记忆能力，海马脑片 LTP 实验也证实小剂量梭曼可导致海马突触可塑性降低，可作为行为学结果的佐证之一。关于长期给予小剂量梭曼致学习记忆障碍的具体机制目前还不清楚，尚需进行更细致深入的实验研究。

参考文献：

[1] Metcalf D R, Holmes J H. EEG, psychological and neurological alterations in humans with organophosphorus exposure[J]. Ann N Y Acad Sci, 1969, 160(1): 357-365.

[2] Stephens R, Spurgeon A, Calvert I A, *et al*. Neuropsychological effects of long-term exposure to organophosphates in sheep dip[J]. Lancet, 1995, 345(8965): 1135-1139.

[3] Black R M, Clarke R J, Read R W, *et al*. Application of gas chromatography mass spectteometry and gas chromatography tandem mass spectrometry to the chemical warfare samples, found to contain residues of the nerve agents sarin, sulphur mustard and their degradation products [J]. J Chromatogr A, 1994, 662(2): 301-321.

[4] Wolthuis O L, Vanwersch R A. Behavioral changes in the rat after low doses of cholinesterase inhibitors[J]. Fundam Appl Toxicol, 1984, 4(2pt2): s195-208.

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

[5] Baille V, Dorendeu F, Carpentier P, *et al*. Acute exposure to a low or mild dose of soman: Biochemical, behavioral and histopathological effects [J]. Pharmacol Biochem Behav, 2001, (69): 561—569.
[6] Bliss T V P, Collingridge G L. Asynaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus[J]. Nature, 1993, 361(6407): 31—39.
[7] Armstrong D L, Osaka T, Murphy M R, *et al*. Blockade of hippocampal long-term potentiation following soman pretreatment in the rat[J]. Brain Res Bull, 1997, 43(1): 117—120.
[8] 薛毅珑, 刘祚周, 李希成. 梭曼对大鼠离体海马脑片 CA1 区锥体层诱发场电位的影响[J]. 中国应用生理杂志, 1988, 4(2): 156—160.
[9] Brian E M, Lucio G G, Sheldon D M. Spatial memory impairment and central muscarinic receptor loss following prolonged treatment with organophosphates[J]. Toxicol Lett, 1988, 40(1): 42—56.
[10] Derek-Stong J, Alvin V, Terry J, *et al*. Protractive effects of chronic treatment with an acutely sub-toxic regimen of diisopropylflurophosphate on the expression of cholinergic receptor densities in rats[J]. Brain Res, 2000, 882(1-2): 9—18.
[11] Viana G B, Davis L H, Kauffman F C. Effects of organophosphates and nerve growth factor on muscarinic receptor binding number in rat pheochromocytoma PC12 cells[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 1988, 93(2): 257—266.
[12] Hai W T, Gudrun C. Inhibition by soman of NMDA-stimulated [^{3}H] norepinephrine release from rat cortical slices, studies of non-cholinergic effect[J]. Brain Res, 1998, 787(1): 123—131.

(编辑 汪勤俭)

文章编号: 1000-5404(2003)03-0233-01

个案与短篇

高压氧治疗急性砷中毒的周围神经损伤 1 例

A case of treatment of nervous system damage from acute arsenic poisoning with HBO

徐晓青 (第三军医大学附属新桥医院高压氧治疗中心, 重庆 400037)

患者, 女, 25 岁, 有癫痫病史 5 年, 偶有小发作, 于 2000 年 4 月初开始自行服中药治疗, 药物中含有砒霜。约 10 d 后出现恶心、呕吐、腹痛腹泻, 同时出现四肢自发性烧灼感样疼痛伴麻木无力, 轻度视觉模糊, 渐加重, 5 d 后到我院就医。查体: 急性病容, 面色苍白, 生命征平稳, 四肢肘膝以远感觉减退明显, 病理征均为(—); 经询问病史, 了解患者用药情况后, 行血液、尿砷浓度检测, 证实为砷中毒, 立即停用中药, 行解毒治疗, 同时加强肝、肾功能的保护以及对症支持治疗。患者病情开始好转, 但神经损害症状消失缓慢。

常规治疗 3 d 后, 到我科行高压氧治疗, 治疗方案为 2 个大气压, 每次 60 min, 每日 1 次, 疗程 7 d。治疗 2 d 后, 自觉四肢疼痛、麻木症状明显缓解、头痛头昏情况好转, 查体痛觉减退区位于腕踝关节以远, 治疗 5 d 后, 肢体疼痛完全消失, 感觉恢复正常, 头部不适感消失。7 d 后, 完全恢复正常。

讨论

急性砷中毒在临床上并不少见, 主要由其砷化物所致。砒霜含有部分的三氧化二砷(As_2O_3), 经消化道中毒吸收很快, 进入人体后 95%~97%迅速与血红蛋白的珠蛋白结合, 于 24 h 内分布至全身各系统。对于神经系统, 主要引起中毒性神经和精神症状。中毒后 1~2 d 就可表现出症状, 1~3 周可出现脑炎、脊髓炎、多发性神经炎和神经根炎[1], 具体机制尚不清楚。有报道过量的砷摄入体内可导致脊髓神经元的结构和功能损伤, 并可造成周围神经细胞代谢和蛋白合成功能障碍, 或干扰轴突的轴浆运输系统。病理表现为脊髓前角细胞萎缩, 神经干及周围神经轴突崩解和脱髓鞘、神经细胞变性等改变[2]。此外, 砷毒性具有蓄积现象, 少数重症患者神经功能恢复较差[3]。

高压氧治疗对清除体内的砷无直接作用, 但对于砷中毒引起的神经损伤却有一定的治疗作用, 可能机制有下几个方面: ①高压氧具有增强组织细胞酶的活性的作用, 从一定程度上有利于细胞内未与砷结合的酶的活性, 保证了细胞代谢的功能的维持; ②高压氧对中枢神经具有防止细胞水肿变性、改善缺氧状态的作用, 防止神经元的死亡, 在外周神经则对神经轴突脱髓鞘的过程有抑制作用, 并能加速损伤的髓鞘修复。因此对砷中毒的患者, 应早期行高压氧治疗防止神经损伤的出现或加重, 最大限度的减少神经系统的后遗症。

关键词: 高压氧; 砷中毒
中图法分类号: R459.6; R745.05 文献标识码: B

参考文献:

[1] 郭德玉, 张 伟, 蒋泽生, 等. 急性三氧化二砷中毒 59 例神经精神障碍分析[J]. 人民军医, 1997, 40(10): 566—567.
[2] 刘锡国, 慕晓玲, 李 锋. 慢性砷中毒大鼠脊髓神经元蛋白免疫组织化学研究[J]. 新疆医学院学报, 1998, 21(4): 277—279.
[3] Goebel H H, Schmidt P F, Bohl J, *et al*. Polyneuropathy due to acute arsenic intoxication: biopsy studies[J]. J Neuropathol Exp Neurol, 1990, 49(2): 137—149.

(编辑 陈聪连)

作者简介: 徐晓青(1975—), 女, 江苏省宿迁县人, 护师, 主要从事高压氧治疗的临床方面的研究。电话: (023)68755645

收稿日期: 2002-04-15; 修回日期: 2002-06-31

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net