

短期酒精染毒对大鼠学习记忆及脑组织神经生长因子表达的影响

朱旭阳 许亚军 吴茂旺 陈宗云

【摘要】 目的 探讨短期酒精染毒对大鼠学习记忆的影响,通过免疫组织化学方法检测大鼠大脑皮层、海马和丘脑神经生长因子(NGF)的分布与表达,探讨其意义。方法 63 只成年雄性 SD 大鼠随机平均分为 3 组:对照组,低浓度染毒组(LAA 组),高浓度染毒组(HAA 组)。对照组以生理盐水灌胃,LAA 组和 HAA 组分别以每天每只 5 ml/kg 和 10 ml/kg 标准用 55% 酒精灌胃。酒精灌胃 3,7 和 14 d 后行 Morris 水迷宫实验检测大鼠学习记忆变化,取脑,采用免疫组织化学 SABC 染色法检测 NGF 分布及表达。在 Olympus 显微镜及图像分析系统下测定 NGF 阳性细胞数。结果 LAA 组染毒 14 d 后, Morris 水迷宫实验显示大鼠学习记忆功能损伤, HAA 组染毒 3,7 和 14 d 后, Morris 水迷宫实验显示不同程度学习记忆功能损伤; LAA 组染毒 3 d 大脑皮层、海马 CA3 区和丘脑 NGF 免疫阳性细胞数[分别为(15.26 ± 3.38)个, (5.88 ± 1.76)个, (16.34 ± 4.05)个],与对照组生理盐水灌胃 3 d 大脑皮层、海马 CA3 区和丘脑 NGF 免疫阳性细胞数[(14.45 ± 3.09)个, (5.37 ± 1.65)个, (15.76 ± 4.09)个]比差异无显著性($P > 0.05$), LAA 组酒精染毒 7、14 d 脑组织 NGF 免疫阳性细胞数[分别为(19.35 ± 3.76)个, (10.36 ± 2.08)个, (21.66 ± 4.34)个和 (23.65 ± 3.87)个, (15.54 ± 2.11)个, (24.43 ± 4.45)个]和 HAA 组 3,7 和 14 d 脑组织 NGF 免疫阳性细胞数[分别为(23.68 ± 3.76)个, (14.87 ± 2.09)个, (24.21 ± 4.07)个; (26.64 ± 4.46)个, (19.76 ± 2.90)个, (28.71 ± 4.93)个和 (27.12 ± 3.81)个, (19.27 ± 2.38)个, (29.75 ± 3.52)个]增加,与对照组生理盐水灌胃 3 d 相比差异有显著性($P < 0.05$)。结论 短期酒精染毒可致大鼠学习记忆功能损伤,损伤程度与染毒的量和时间相关,其机制可能与短期酒精染毒改变大鼠脑 NGF 表达相关。

【关键词】 酒精; 学习记忆; 神经生长因子; 时间量效

Effects of short-term alcohol intragastric administration on rat learning and memory and the expression of NGF in brain ZHU Xu-yang, XU Ya-jun, WU Mao-wang, et al. Department of Forensic Medicine, Wannan Medical College, Wuhu 241001, China

【Abstract】 Objective To explore the effects of short-term alcohol intragastric administration on learning and memory and the distribution and expression of NGF through immunohistochemistry method in cerebral cortex, hippocampus and cerebral ganglion of rat. **Methods** 63 adult male SD rats were randomly divided to 3 groups: control group, low alcohol administration group (LAA group) and high alcohol administration group (HAA group). control group were administrated by normal saline, different dosage of 55% alcohol (5ml · kg⁻¹ · d⁻¹ and 10ml · kg⁻¹ · d⁻¹) were respectively administrated to LAA and HAA group daily. After 3, 7 and 14 days, Morris water maze was used to detect the changes of learning and memory. Distribution and expression of NGF were observed with immunohistochemical SABC staining. The NGF-immunoreactive cells numbers were detected by Olympus microscope and image analysis system. **Results** The impairments of learning and memory detected by Morris water maze trail were observed after alcohol intragastric administration 14 days of LAA group, while different impairments of learning and memory were observed after alcohol intragastric administration 3, 7 and 14 days of MAA group. The numbers of NGF-immunoreactive cells in cerebral cortex, hippocampus and cerebral ganglion increased obviously after alcohol intragastric administration 7 and 14 days of LAA group [7d: 19.35 ± 3.76, 10.36 ± 2.08, 21.66 ± 4.34; 14d: 23.65 ± 3.87, 15.54 ± 2.11, 24.43 ± 4.45] and alcohol intragastric administration 3, 7 and 14 days of HAA group [3d: 23.68 ± 3.76, 14.87 ± 2.09, 24.21 ± 4.07; 7d: 26.64 ± 4.46, 19.76 ± 2.90, 28.71 ± 4.93; 14d: 27.12 ± 3.81, 19.27 ± 2.38, 29.75 ± 3.52] compared with control group which alcohol intragastric administration 3 days [3d: 14.45 ± 3.09, 5.37 ± 1.65, 15.76 ± 4.09] ($P < 0.05$), while it didn't change much after alcohol intragastric administration 3 days of LAA group [3d: 15.26 ± 3.38, 5.88 ± 1.76, 16.34 ± 4.05] compared with control group which alcohol intragastric administration 3 days ($P > 0.05$). **Conclusion** Short-term alcohol intragastric administration may induce the impairments of learning and memory, which may be related to the changes of NGF expression in brain.

【Key words】 Alcohol; Learning and memory; Nerve growth factor; Time and quantity

作者单位: 241002 芜湖, 皖南医学院法医学系(朱旭阳、吴茂旺、陈宗云); 皖南医学院心理学系(许亚军)

通讯作者: 许亚军, Email: xuyajun1980@163.com

酒精易通过血脑屏障,引起颅脑损伤,前期实验发现大鼠酒精灌胃 6 周可以制备大鼠慢性酒精中毒致学

习记忆障碍模型^[1],但酒精灌胃的剂量和时间与染毒引起的学习记忆功能损伤程度关系(即时间量效关系)并不明确,尤其是短期酒精染毒对大鼠学习记忆功能的影响。神经生长因子(nerve growth factor, NGF)具有多种神经营养作用,能促进中枢和外周神经元分化、生长和存活、促进轴突的生长和修复、调节神经丝的合成、自身受体以及促进神经递质合成等,在维持大脑正常的生理功能以及学习记忆功能、神经细胞损伤后的恢复中起重要的调节作用^[2,3]。NGF 在短期酒精染毒引起的颅脑损伤中作用尚不清楚,本研究运用 Morris 水迷宫观察短期酒精染毒对大鼠学习记忆的影响,应用免疫组织化学技术检测大鼠脑 NGF 的分布与表达,探讨其意义。

材料与方法

一、材料

成年雄性 SD 大鼠 63 只,体质量 200 ~ 250 g,鼠龄 (56 ± 3) days,大鼠随机平均分为 3 组:对照组,低浓度染毒组(LAA 组),高浓度染毒组(HAA 组)。实验室适应性饲养 7 d 后进行以下实验。

二、方法

1. 酒精染毒:对照组以生理盐水 5 ml 灌胃, LAA 和 HAA 组分别按照每只大鼠 5 ml · kg⁻¹ · d⁻¹ 和 10 ml · kg⁻¹ · d⁻¹ 标准用 55% 的北京红星二锅头灌胃,三组每次灌胃容量用生理盐水兑至 5 ml。造模每天灌胃 1 次,每 3 d 间隔 1 d。于酒精灌胃 3, 7 和 14 d 后间隔 24 h 行 Morris 水迷宫试验。

2. Morris 水迷宫试验:实验历时 5 d,第 1 天让大鼠自由游泳 2 min。从第 2 天起,每天分上、下午两段,每段训练 4 次,训练时随机选择一个入水点,将大鼠面向池壁放入水中,4 次训练大鼠分别随机从 4 个象限的入水点入水,当所有的大鼠都完成一次训练后,再进行下一次训练,每次训练相隔 20 min。如果大鼠在 120 s 内未找到平台,将其引至平台上放置 20 s,这时潜伏期记为 120 s。探索实验检测动物空间记忆的获得情况:撤去平台后观察动物的探索策略次数,计 2 min 内其经过原平台位置上方水域的次数,取其 1/2 值作为 1 min 内成绩进行统计。记录在第二象限入水点入水时逃避潜伏期和探索策略次数。以此结果判断学习获得能力和短时程记忆能力。

3. NGF 免疫组织化学实验:酒精染毒大鼠用戊巴比妥腹腔麻醉,经心脏快速灌注冲洗生理盐水约 250 ml,再用 40 g/L 多聚甲醛约 500 ml 灌注冲洗固定,取全脑,然后标本在 40 g/L 多聚甲醛中固定 20 h,脱水,包埋,切片,然后按照 NGF 蛋白免疫组织化学染色试剂盒说明进行免疫组化染色操作(SABC 法)。

4. 图像分析和统计学处理:采用 Olympus 显微镜和计算机影像分析系统进行图像分析,从每只大鼠脑中随机选择 3 张切片检测大脑皮层,海马 CA3 区和

丘脑的 NGF 免疫反应阳性细胞数。每一解剖结构随机测 3 个视野,每个视野测量的像素量(即被测量面积)保持一致。以上测量值与相应阴性对照切片测量值相减后的平均值为各区域的最终阳性细胞数,数据以均数 ± 标准差表示。实验数据均用 SPSS 13.0 统计软件包重复进行方差分析,总体方差检验差异有显著性时,用 SNK 方法进行两两比较。

结 果

一、各组大鼠水迷宫实验逃避潜伏期和探索策略次数的比较

以逃避潜伏期和探索策略次数为指标,各组间的差异有显著性(F 值分别为 12.70 和 11.36, P < 0.01);LAA 组酒精灌胃 14 d 及 HAA 组酒精灌胃 3, 7 和 14 d 与对照组比差异有显著性(P < 0.05)。HAA 组酒精灌胃 3, 7 和 14 d 的逃避潜伏期和探索策略次数在明显的量效关系(P < 0.05)。见表 1。

表 1 各组大鼠水迷宫实验逃避潜伏期和探索策略次数的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	逃避潜伏期(s)	探索策略次数(次/分)
对照组(3d)	7	18.43 ± 2.65 ^a	4.43 ± 0.30 ^a
对照组(7d)	7	20.17 ± 3.01 ^a	4.40 ± 0.34 ^a
对照组(14d)	7	18.65 ± 2.98 ^a	4.37 ± 0.29 ^a
LAA 组(3d)	7	22.23 ± 3.38 ^a	4.22 ± 0.31 ^a
LAA 组(7d)	7	22.59 ± 3.30 ^a	4.20 ± 0.30 ^a
LAA 组(14d)	7	29.92 ± 4.18 ^b	3.81 ± 0.28 ^b
HAA 组(3d)	7	28.17 ± 4.37 ^c	3.77 ± 0.27 ^c
HAA 组(7d)	7	33.76 ± 4.64 ^d	3.21 ± 0.29 ^d
HAA 组(14d)	7	40.45 ± 4.76 ^e	2.87 ± 0.28 ^e
F 值		12.70	11.36
P 值		<0.01	<0.01

注:字母不同者表示 SNK 法比较 P < 0.05,字母相同者表示 SNK 法比较 P > 0.05

二、各组大鼠大脑皮层、海马 CA3 区和丘脑 NGF 阳性细胞数比较

对照组 NGF 免疫反应阳性细胞在大脑皮层、海马和丘脑均有分布,排列较疏松,呈中等强度染色;大脑皮层胞膜和胞浆有着色,胞核无着色,海马 CA3 区和丘脑胞膜、胞浆及多数胞核有着色,且海马 CA3 区突起着色明显。LAA 组酒精染毒 3 d NGF 免疫阳性细胞分布与对照组相似,差异无显著性(P > 0.05);LAA 组酒精染毒 7, 14 d 和 HAA 组 NGF 免疫阳性细胞数量增加,与对照组比差异有显著性(P < 0.05),大脑皮层为胞膜和胞浆着色,胞核无着色,海马 CA3 区和丘脑胞膜、胞浆及胞核均有着色,海马 CA3 区突起着色明显,NGF 免疫阳性细胞数量显著增加。见表 2。

讨 论

酒精对颅脑系统的损伤较早的表现为学习记忆功能的损伤,Morris 水迷宫在检测大鼠酒精染毒导致的学习记忆功能损伤时能够较多的提供实验参数,将实验动物的学习记忆障碍和感觉运动缺陷等分离开来,

表 2 各组大鼠大脑皮层、海马 CA3 区和丘脑 NGF 阳性细胞数比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	大脑皮层	海马 CA3 区	丘脑
对照组(3d)	7	14.45 ± 3.09 ^a	5.37 ± 1.65 ^a	15.76 ± 4.09 ^a
对照组(7d)	7	13.43 ± 2.98 ^a	5.02 ± 1.28 ^a	14.72 ± 3.87 ^a
对照组(14d)	7	13.98 ± 2.76 ^a	5.61 ± 1.30 ^a	15.14 ± 3.90 ^a
LAA 组(3d)	7	15.26 ± 3.38 ^a	5.88 ± 1.76 ^a	16.34 ± 4.05 ^a
LAA 组(7d)	7	19.35 ± 3.76 ^b	10.36 ± 2.08 ^b	21.66 ± 4.34 ^b
LAA 组(14d)	7	23.65 ± 3.87 ^c	15.54 ± 2.11 ^c	24.43 ± 4.45 ^c
HAA 组(3d)	7	23.68 ± 3.76 ^c	14.87 ± 2.09 ^c	24.21 ± 4.07 ^c
HAA 组(7d)	7	26.64 ± 4.46 ^d	19.76 ± 2.90 ^d	28.71 ± 4.93 ^d
HAA 组(14d)	7	27.12 ± 3.81 ^d	19.27 ± 2.38 ^d	29.75 ± 3.52 ^d
F 值		4.24	6.87	4.17
P 值		<0.01	<0.01	<0.01

注:字母不同者表示 SNK 法比较 $P < 0.05$,字母相同者表示 SNK 法比较 $P > 0.05$

减少对学习记忆过程检测的干扰^[4]。Prediger 等^[5]和刘丹等^[6]研究发现给予低浓度酒精摄取可促进大鼠的记忆,其机制可能与低浓度酒精摄取对多巴胺受体和 BDNF 的影响有关。本实验发现,大鼠以 $5 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 酒精灌胃 14 d 后 Morris 水迷宫实验逃避潜伏期和探索策略次数与对照组比差异显著,却表现为学习记忆功能下调,这可能与 $5 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 酒精灌胃是被动染毒,且一次性染毒的量较大,对大鼠颅脑系统的损伤较重,低浓度酒精摄取则是主动染毒,大鼠酒精摄取量和时间的选择性较宽,机体的代偿有利于发挥,更多的表现为酒精对大鼠的成瘾和营养作用。LAA 组酒精灌胃 14 d 及 HAA 组酒精灌胃 3, 7 和 14 d Morris 水迷宫实验逃避潜伏期和探索策略次数与对照组比差异显著,且 HAA 组酒精灌胃 3, 7 和 14 d Morris 水迷宫实验逃避潜伏期和探索策略次数存在明显的量效关系,提示以 10 ml/kg 酒精灌胃,大鼠较早表现为学习记忆功能的损伤,且学习记忆功能损伤随灌胃时间的延长而加重。

NGF 与许多中枢和周围神经系统病变密切相关,在学习、记忆、神经细胞损伤后的恢复中起重要的调节作用^[2],但酒精对大鼠脑 NGF 分布与表达的影响以及 NGF 在酒精染毒引起的颅脑损伤过程中的保护作用目前仍不清楚。本研究发现,以 $5 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 酒精灌胃 7 d,大鼠大脑皮层、海马和丘脑 NGF 表达开始上调,而此时 Morris 水迷宫实验并没有检测出大鼠学习记忆功能的损伤,因而可以推测 NGF 反映出的脑损伤(包括学习记忆功能损伤)较 Morris 水迷宫检测出的学习记忆功能损伤早。Jockers-Scherübl 等^[7]研究发现酒精依赖患者血清中 NGF 水平较正常人上升,但其认

知功能检测正常,也说明 NGF 反映出的神经功能损伤较器质性损伤早。

以 $5 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 酒精灌胃 14 d 和 $10 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 酒精灌胃 3, 7 和 14 d 后,大鼠大脑皮层、海马和丘脑 NGF 表达较以 $5 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 酒精灌胃 7 d 继续逐渐同步上调,说明大鼠大脑皮层、海马和丘脑 NGF 表达是随酒精灌胃的量和时间增加而逐渐同步增加的,这种增加可能是对酒精染毒引起的学习记忆功能损伤的一种代偿性增加^[8]或为应激表现,其可能的代偿与失代偿具体时量效关系有待进一步研究。NGF 在酒精染毒引起的学习记忆功能损伤过程中的保护作用应当是大脑皮层、丘脑和海马等多个脑区共同作用的,其保护机制可能与 NGF 作用于 NMDA 受体,使 Ca^{2+} 进入细胞,通过 NO-cGMP-PKG 通路而对中枢神经细胞提供保护作用,通路的许多物质对学习记忆都有重要影响^[9-11],具体作用机制有待进一步研究。

参 考 文 献

- 1 许亚军,吴鉴明,李永宏. 慢性酒精中毒致大鼠学习记忆障碍模型. 皖南医学院学报,2007,26:222-225.
- 2 Kaplan D, Zirrgiebel U, Atwal J. Center stage for NGF in peripheral (but not central) sensory neuron outgrowth. *Neuron*, 2000, 25:253.
- 3 Lee TH, Kato H, Chen ST, et al. Expression of nerve growth factor and trkA after transient focal cerebral ischemia in rats. *Stroke*, 1998, 29:1687-1697.
- 4 胡镜清,温泽淮,赖世龙. Morris 水迷宫检测的记忆属性与方法学初探. 广州中医药大学学报,2000, 17: 117-119.
- 5 Prediger RD, Batista LC, Miyoshi E, et al. Facilitation of short-term social memory by ethanol in rats is mediated by dopaminergic receptors. *Behav Brain Res*, 2004, 153:149-157.
- 6 刘丹,李昌其,卢大华. 低浓度酒精对成年大鼠空间位置的记忆及海马 CA1 区 BDNF 表达的影响. 中国行为医学科学,2006, 15: 676-778.
- 7 Jockers-Scherübl MC, Bauer A, Kuhn S, et al. Nerve growth factor in serum is a marker of the stage of alcohol disease. *Neurosci Lett*, 2007, 419: 78-82.
- 8 Paula-Barbosa MM, Silva SM, Andrade JP, et al. Nerve growth factor restores mRNA levels and the expression of neuropeptides in the supra-chiasmatic nucleus of rats submitted to chronic ethanol treatment and withdrawal. *Journal of Neurocytology*, 2001, 30: 195-207.
- 9 Bonthius DJ, Karacay B, Dai D, et al. FGF-2, NGF and IGF-1, but not BDNF, utilize a nitric oxide pathway to signal neurotrophic and neuroprotective effects against alcohol toxicity in cerebellar granule cell cultures. *Brain Res Dev Brain Res*, 2003, 140: 15-28.
- 10 Miller R, King MA, Heaton MB, et al. The effects of chronic ethanol consumption on neurotrophins and their receptors in the rat hippocampus and basal forebrain. *Brain Res*, 2002, 950: 137-147.
- 11 戴德. 一氧化氮-环鸟苷酸通路神经生长因子拮抗酒精神经毒性作用的关系. 贵州医药, 2002, 26:699-701.

(收稿日期:2007-08-06)

(本文编辑:冯学泉)