



低G预适应对高G暴露致大鼠学习记忆功能受损的影响

缺血预适应(ischemic preconditioning, IP)是指某一组织一次或多次短暂性缺血再灌注后,该组织对以后较长时间的缺血性损伤产生显著的耐受性。IP现象最初见于心脏,随后在脑等器官中也发现了类似现象[1]。经过对脑缺血预适应(brain ischemic preconditioning, BIP)现象10多年的研究,目前认为,脑组织在短暂缺血再灌注24 h后出现保护作用,持续约7 d后消失[2]。军事航空飞行中产生的持续性正加速度(+Gz)作用对人体的影响是目前航空医学界的研究热点,+Gz暴露对脑功能的影响主要是脑部出现的缺血缺氧现象所致。若采用较低G值暴露脑部将出现比较轻微的缺血缺氧过程。那么,这种较轻的脑缺血过程能否减轻其后高G暴露导致的严重脑缺血损伤?其作用是否与BIP相似呢?为此,我们参考文献[3]设计了本实验,即首先采用+4 Gz/3 min的+Gz暴露,反复多次(每天1次,连续3 d),然后再进行+10 Gz/3 min暴露,之后采用行为学的方法观察和比较采取低G预适应措施大鼠与单纯+10 Gz/3 min暴露大鼠在1周内的学习训练中的表现,以探讨低G预适应能否减轻或改善高G暴露对大鼠学习记忆能力的损害程度。

1 材料和方法

1.1 动物

清洁级雄性SD大鼠28只,体质量160~180 g,由第四军医大学实验动物中心提供。先在实验室内饲养1周使大鼠适应实验环境,排除惊吓、异常环境因素等对大鼠学习记忆和行为的影响。实验前采用旷场反应淘汰过分活跃和过分呆滞大鼠4只,后将剩余24只大鼠随机分为3组:对照组、+10 Gz/3 min暴露组和低G预适应组,每组8只。

1.2 方法

1.2.1 G暴露及检测方法 采用动物离心机模拟+Gz暴露,离心机半径为2 m,可模拟的正加速度范围为0~+12Gz,由计算机进行程序控制。利用自制的有机玻璃盒(内径为15 cm×5 cm×3 cm)承载大鼠,并水平固定于离心机的转臂上,大鼠头部朝向离心机旋转轴心。低G预适应组大鼠先进行+4 Gz/3 min锻炼,1次/d,在锻炼3 d再进行+10 Gz/3 min暴露,加速度增长率为1 G/s。+10 Gz组大鼠直接进行单次+10 Gz/3 min暴露,加速度增长率亦为1 G/s。对照组大鼠仅放置于有机玻璃盒中,处于实验组相同的离心机噪声环境中3 min,不进行+Gz暴露。+10 Gz/3 min暴露组和低G预适应组在+10 Gz暴露恢复期开始学习训练,检测时间点为暴露后0、2、4和6 d。对照组在相应时间点检测学习情况。为保证实验结果的可靠性,实验在安静、光线较暗的同一相似环境中进行,实验时间均为每天上午8:00~11:00。

1.2.2 行为学观察 采用旷场反应观察大鼠兴奋性的变化。旷场反应箱的构造及使用方法见文献[4]。实验时,将大鼠放入旷场反应箱正中格中,观察3 min内大鼠的活动情况。观察指标包括中央格停留时间和总得分,即跨格次数(三爪以上跨入邻格的次数)和站立次数(两前肢离地1 cm以上)的和。每次试验后,清洗旷场周壁及底面。测量+10 Gz/3 min组、低G预适应组和对照组在G暴露恢复期相应时间点的变化情况。

1.2.3 辨别性学习能力观察 采用Y-型迷宫实验。参照文献[3]使用自制的Y-型迷宫控制器进行实

验。Y-型迷宫由三个支臂(A, B和C)和一个连接区组成,三臂相互间夹角为 120° ,每臂长40 cm,宽15 cm,底部铺以直径为5 mm,间距为6 mm的铜棒。各臂末端装有信号灯,信号灯打开指示该臂为安全区,即该臂底部不通电。当某臂为安全区时,另两臂和连接区均带有刺激电压,安全区按照顺时针方向转换。实验在安静、光线较暗的环境中进行。实验开始时,将大鼠放入迷宫,使其适应环境1 min。然后通电,A灯亮,经过5 s的延时后,不亮灯的两臂及连接区开始通电(40 V直流电),大鼠逃往安全臂。此时灯光仍持续60 s,然后A熄灯,即完成1次测试,同时B灯亮,下次测试开始。考察大鼠学习记忆能力的改变,采用每时间点固定学习测试次数(15次)的方法记录正确反应次数和总反应时。测量+10 Gz/3 min组、低G预适应组和对照组在G暴露恢复期相应时间点的变化情况。

1.2.4 被动回避反应观察 采用明暗箱进行实验。实验箱组成见文献[5]。首先将大鼠放入明箱中,由于其钻洞及趋黑本性,则钻入暗箱中,大鼠因遭受电击而逃回明箱中,此即为1次学习。以大鼠在明箱中停留时间超过5 min为学会。记录+10 Gz/3 min组、低G预适应组和对照组大鼠在G暴露恢复期的0 d达到学会标准所用的总时间、潜伏期和错误次数以及各组的6 d潜伏期。

1.3 统计学处理

所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用SPSS 11.0统计软件进行统计分析,采用重复测量方差分析检验行为学观察和辨别性学习能力实验结果,采用非参数检验比较被动回避反应实验结果。

2 结果

2.1 旷场反应

对照组大鼠中央格停留时间随学习次数的增加呈逐渐缩短趋势,总得分也逐渐降低。和对照组比较,+10 Gz/3 min组大鼠中央格停留时间在0 d,2 d较对照组显著延长($P < 0.05$),总得分在0 d显著降低($P < 0.01$);低G预适应组中央格停留时间在0 d显著延长($P < 0.01$),总得分在0 d显著降低($P < 0.01$)。与+10 Gz组比较,低G预适应组中央格停留时间从2 d开始有缩短趋势,在6 d达到显著水平($P < 0.05$),各时间点的总得分均无显著差异(表1)。

表1 +Gz 暴露后大鼠中央格停留时间和总得分的变化

$$(\bar{x} \pm s, n=8)$$

Tab.1 Changes of the time length of stay in the central square, total square-crossing and rearing after + Gz exposures in rats (*Mean*±*SD*, *n*=8)

Time (d)	Group	TSC (s)	SCR
0	Control	3.18±2.08	59.75±32.29
	+10 Gz	91.14±76.29*	5.38±3.11**
	anti-G	135.80±81.85**	2.75±2.66**
2	Control	2.26±1.12	26.50±23.38
	+10 Gz	5.59±3.53*	22.25±16.86
	anti-G	3.14±2.61	36.50±21.92
4	Control	2.10±1.50	15.50±13.88
	+10 Gz	3.30±4.01	21.88±21.32
	anti-G	1.79±0.79	8.38±2.45
6	Control	1.99±0.72	22.38±20.13
	+10 Gz	5.61±6.31	18.88±28.65
	anti-G	1.71±0.74 ^{&}	7.13±7.77

+10 Gz: +10 Gz/3 min group; anti-G: Low gravity preconditioning group; TSC: Time of stay in the central square; SCR: Total square-crossing and rearing; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs the control group; [&] $P < 0.05$ vs +10Gz group

2.2 辨别性学习能力

各实验组在Y-型迷宫中的成绩随学习次数的增加均逐渐提高，正确反应次数随重复学习次数的增加而增多，反应时逐渐缩短。比较同一时间点各组差异，+10 Gz/3 min组正确反应次数在各时间点均较对照组显著下降，反应时在各时间点均较对照组显著延长($P < 0.01$)；低G预适应组正确反应次数和反应时在各时间点均与对照组无明显差别；与+10 Gz/3 min组比较，低G预适应组正确反应次数在各时间点均显著增加，反应时在各时间点均显著缩短($P < 0.01$)，见图1、2。

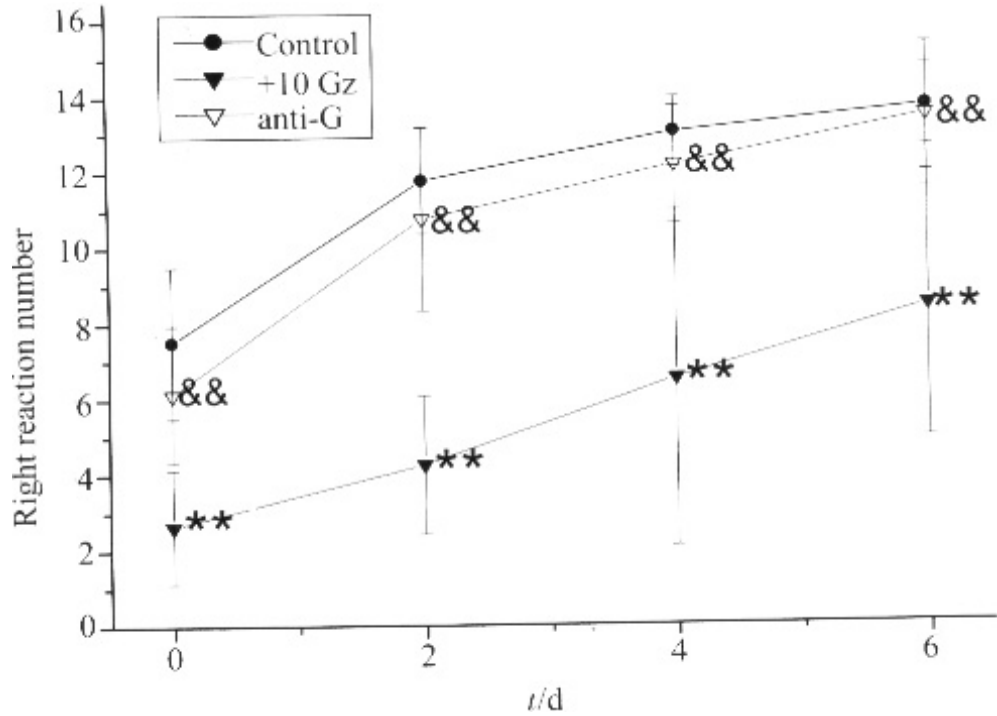


图1 +Gz暴露后大鼠正确反应次数的变化 ($\bar{x} \pm s$, n=8)

Fig. 1 Changes of the number of times of right reaction after +Gz exposure in rats (Mean \pm SD, n=8)

**P<0.01 vs control; &&P<0.01 vs +10 Gz

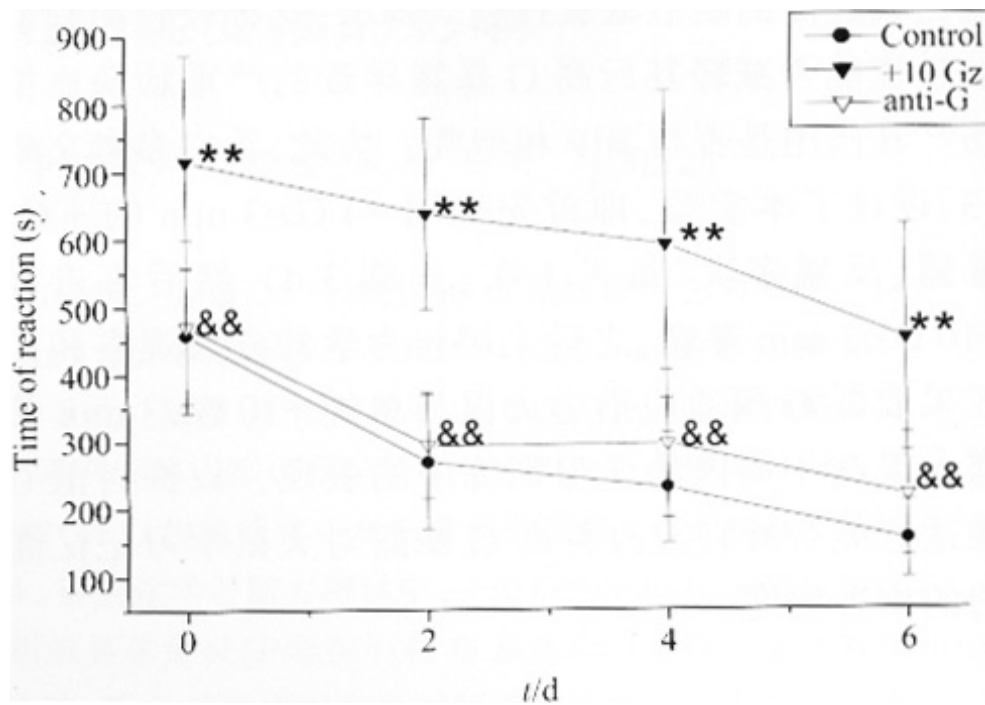


图2 +Gz暴露后大鼠反应时间的变化 ($\bar{x} \pm s$, n=8)

Fig. 2 Changes of reaction time after +Gz exposure in rats (Mean \pm SD, n=8)

2.3 被动回避反应

与对照组比较, +10 Gz/3 min组大鼠的0 d潜伏期显著延长(P<0.05), 6 d潜伏期显著缩短(P<0.01), 学习所用总时间与错误数无显著性改变; 低G预适应组各项检测项目均无明显改变; 与+10 Gz/3 min组比较, 低G预适应组大鼠的6 d潜伏期显著延长(P<0.01), 见表2。

表2 +Gz 暴露后大鼠学习所用总时间、潜伏期、错误数的变化($\bar{x}\pm s, n=8$)

Tab.2 Changes of total time, latent time and number of errors in rats after +Gz exposure
(*Mean* \pm *SD, n=8*)

Group	TT	LT	NE	D6-LT
Control	396.50 \pm 110.55	21.60 \pm 20.71	2.00 \pm 1.07	35.38 \pm 20.19
+10 Gz	344.50 \pm 15.32	31.33 \pm 23.43*	1.25 \pm 0.71	4.93 \pm 3.55**
Anti-G	379.50 \pm 131.38	29.49 \pm 27.48	2.13 \pm 2.42	39.45 \pm 28.48 ^{&&}

TT: Total time; LT: Latent time; NE: Number of errors; * $P<0.05$,

** $P<0.01$ vs control; ^{&&} $P<0.01$ vs +10Gz

3 讨论

本实验旨在探讨低G预适应能否减轻高G暴露致大鼠学习记忆能力的损害。结果发现，旷场反应中低G预适应组仅在0 d出现暂时性兴奋性降低，其余各时间点与对照组无明显差别；与+10 Gz/3 min组比较，低G预适应组兴奋性明显增加，表现为中央格停留时间的缩短。辨别性学习能力检测中也发现低G预适应组正确反应次数和反应时间两项指标在各时间点均与对照组处于同一水平，并且在各时间点均较+10 Gz/3 min组差别显著($P<0.01$)。提示采用低G对抗措施后大鼠的学习能力损伤程度得到保护。被动回避反应测试中低G预适应组的6 d潜伏期较+10 Gz/3 min组显著延长，表明低G预适应组大鼠的记忆保持能力得到显著恢复。以上结果提示，采用低G预适应措施后，能够显著改善高G暴露导致的大鼠学习能力受损和记忆保持能力的减退。

低G预适应对高G致大鼠学习记忆功能损害的保护作用可能与低G值暴露后产生的BIP现象有关。研究表明，采取BIP措施后，可以减轻严重脑缺血对神经细胞的损害。BIP现象首先由Kitagawa等在1990年发现。Kitagawa等[6]观察了轻度短暂性脑缺血是否能够通过改变神经细胞的代谢而对之后进行的严重脑缺血造成的细胞损害提供保护作用。进一步的研究发现，10 min全脑缺血引起沙鼠海马各区，大脑皮层 III/IV层，尾状核背外侧和丘脑腹外侧出现神经的细胞死亡。而采取2 min脑缺血预处理2 d后再进行10 min全脑缺血，则显著改善了上述部位的神经细胞死亡现象[7]。Nakagomi等[8]也观察到沙鼠经过缺血预处理后1、2、4 d再次进行5 min脑缺血后，其海马锥体细胞层单位长度细胞数量较单纯5 min脑缺血组显著增多，表明BIP显著减轻了严重脑缺血对海马神经元的损伤程度。通过对脑梗死患者的临床研究也发现，发病前1周内有无短暂性脑缺血发作的脑梗死患者和无短暂性脑缺血发作的脑梗死患者相比，前者大面积脑梗死的发生率低，治疗显效率高，恶化、病死率低[9]。行为学观察也发现，采用BIP措施后，脑缺血导致的大鼠的学习记忆能力损害得到了改善。Ohno 等[10]对脑缺血对大鼠学习记忆功能的影响进行了研究，结果发现，4-V0(阻断双侧颈总动脉和双侧椎动脉)法制造全脑缺血10 min后，对大鼠再进行Y迷宫训练，结果大鼠的错误数较对照组显著增多。如果大鼠5 min全脑缺血2 d后，再进行10 min全脑缺血，结果大鼠在Y迷宫中的表现与对照组大鼠无明显区别。魏秀娥等[11]也观察了给予3 min全脑缺血，48 h后再给予15 min全脑缺血，发现缺血预处理能明显增加海马CA1区存活神经元数目，改善大鼠的记忆能力。

+Gz作用下，血液重量增加，血液柱流体静压增大，血液向下半身转移。进而引起心水平以上动脉血压降低，尤以头(眼)水平动脉血压降低最为严重。头(眼)水平动脉血压的降低，直接导致脑循环血量降低。采用低G预适应措施后也出现了类似BIP效应的保护作用。李金声等[12]发现，+10 Gz/5 min单次暴露后皮层、海

马、丘脑等部位均可见到变性的神经元,个别脑区出现神经细胞凝固性坏死。经过+4 Gz/3 min锻炼3次后再暴露于+10 Gz/5 min,变性神经元的数目在顶叶皮层、梨状皮层、海马和丘脑下部等部位明显减少。提示采用低G预适应措施后脑部可能出现了缺血耐受现象。在大鼠单纯记忆功能在+Gz暴露后的变化的研究中发现[4],单次+10 Gz/5 min暴露可引起大鼠严重的持续性的记忆功能障碍,+4 Gz/3 min锻炼3 d或锻炼5 d后再进行+10 Gz/5 min暴露,可明显减轻+10 Gz/5 min暴露所致的大鼠记忆功能损害。

本实验采用了类似的较低G值水平进行预适应锻炼,结果与+10 Gz/3 min组比较,低G预适应组对新环境的认知能力有了很大程度的提高,空间学习能力显著改善,长时间记忆能力得到了较好的保持。综合行为学的检测结果,我们认为采用低G预适应方式能够显著改善大鼠在高G暴露恢复期内的学习记忆能力的受损。

参考文献:

[1] Ishida T, Yarimizu K, Gute DC, et al. Mechanisms of ischemic pre-conditioning[J]. Shock, 1997, 8(2): 86-94.

[2] Hawaleshka A, Jacobsohn E. Ischaemic preconditioning: mechanisms and potential clinical applications[J]. Can J Anaesth, 1998, 45(7): 670-82.

[3] 曹新生, 孙喜庆, 韦应波, 等. 低G锻炼对高G致大鼠记忆功能和平衡能力变化的影响[J]. 航天医学与医学工程, 2004, 17(1): 16-9.

Cao XS, Sun XQ, Wei YB, et al. Effects of repeated lower g exposures on high-G induced memory and balance changes in rats [J]. Space Med Med Eng, 2004, 17(1): 16-9.

[4] Vecsi L. Effects of cyteamine and pantethin on open-field behavior hypothalamic catecholamine concentrations, and somatostatin-induced barrel retention in rats[J]. Pharmacol Biochem Behav, 1989, 32(3): 629-35.

[5] 任榕娜, 陈新民, 孔祥英, 等. 锌缺乏及锌过量对大鼠学习记忆的影响[J]. 中国行为医学科学, 1996, 5(4): 182-4.

Ren RN, Chen XM, Kong XY, et al. Effect of the zinc deficiency and zinc excess on the learning and memory of rat[J]. Chin J Behav Sci, 1996, 5(4): 182-4.

[6] Kitagawa K, Matsumoto M, Tagaya M, et al. 'Ischemic tolerance' phenomenon found in the brain[J]. Brain Res, 1990, 528(1): 21-4.

[7] Kitagawa K, Matsumoto M, Kuwabara K, et al. 'Ischemic tolerance' phenomenon detected in various brain regions[J]. Brain Res, 1991, 561(2): 203-11.

[8] Nakagomi T, Kirino T, Kanemitsu H, et al. Early recovery of protein synthesis following ischemia in hippocampal neurons with induced tolerance in the gerbil[J]. Acta Neuropathol (Berl), 1993, 86(1): 10-5.

[9] 安孔君, 张永雪. 脑缺血预适应对脑梗死患者病情及预后的影响[J]. 山东医药(Shandong Med), 2001, 41(11): 42.

[10] Ohno M, Watanabe S. Ischemic tolerance to memory impairment associated with hippocampal neuronal damage after transient cerebral ischemia in rats[J]. Brain Res Bull, 1996, 40(3): 229-36.

[11] 魏秀娥, 刘永海, 耿德勤, 等. 缺血预处理对大鼠学习、记忆功能影响的实验研究[J]. 徐州医学院学报(J Xuzhou Med Coll), 2003, 23(4): 283-4.

[12] 李金声, 孙喜庆, 吴兴裕, 等. 低G重复暴露对大鼠脑热休克蛋白70表达水平的影响[J]. 中华航空航天医学杂志, 2002, 13(3): 152-5.

Li JS, Sun XQ, Wu XY, et al. The influence of repeated +Gz exposures on HSP70 expression in rat brain[J]. Chin J Aerosp Med, 2002, 13(3): 152-5.

参考文献:

- [1] Ishida T, Yarimizu K, Gute DC, et al. Mechanisms of ischemic pre-conditioning[J]. Shock, 1997, 8(2): 86-94.
- [2] Hawaleshka A, Jacobsohn E. Ischaemic preconditioning: mechanisms and potential clinical applications[J]. Can J Anaesth, 1998, 45(7): 670-82.
- [3] 曹新生, 孙喜庆, 韦应波, 等. 低G锻炼对高G致大鼠记忆功能和平衡能力变化的影响[J]. 航天医学与医学工程, 2004, 17(1): 16-9.
- Cao XS, Sun XQ, Wei YB, et al. Effects of repeated lower g exposures on high-G induced memory and balance changes in rats [J]. Space Med Med Eng, 2004, 17(1): 16-9.
- [4] Vecsi L. Effects of cyteamine and pantethin on open-field behavior hypothalamic catecholamine concentrations, and somatostatin-induced barrel retention in rats[J]. Pharmacol Biochem Behav, 1989, 32(3): 629-35.
- [5] 任榕娜, 陈新民, 孔祥英, 等. 锌缺乏及锌过量对大鼠学习记忆的影响[J]. 中国行为医学科学, 1996, 5(4): 182-4.
- Ren RN, Chen XM, Kong XY, et al. Effect of the zinc deficiency and zinc excess on the learning and memory of rat[J]. Chin J Behav Sci, 1996, 5(4): 182-4.
- [6] Kitagawa K, Matsumoto M, Tagaya M, et al. 'Ischemic tolerance' phenomenon found in the brain[J]. Brain Res, 1990, 528(1): 21-4.
- [7] Kitagawa K, Matsumoto M, Kuwabara K, et al. 'Ischemic tolerance' phenomenon detected in various brain regions[J]. Brain Res, 1991, 561(2): 203-11.
- [8] Nakagomi T, Kirino T, Kanemitsu H, et al. Early recovery of protein synthesis following ischemia in hippocampal neurons with induced tolerance in the gerbil[J]. Acta Neuropathol (Berl), 1993, 86(1): 10-5.
- [9] 安孔君, 张永雪. 脑缺血预适应对脑梗死患者病情及预后的影响[J]. 山东医药(Shandong Med), 2001, 41(11): 42.
- [10] Ohno M, Watanabe S. Ischemic tolerance to memory impairment associated with hippocampal neuronal damage after transient cerebral ischemia in rats[J]. Brain Res Bull, 1996, 40(3): 229-36.
- [11] 魏秀娥, 刘永海, 耿德勤, 等. 缺血预处理对大鼠学习、记忆功能影响的实验研究[J]. 徐州医学院学报(J Xuzhou Med Coll), 2003, 23(4): 283-4.
- [12] 李金声, 孙喜庆, 吴兴裕, 等. 低G重复暴露对大鼠脑热休克蛋白70表达水平的影响[J]. 中华航空航天医学杂志, 2002, 13(3): 152-5.
- Li JS, Sun XQ, Wu XY, et al. The influence of repeated +Gz exposures on HSP70 expression in rat brain[J]. Chin J Aerosp Med, 2002, 13(3): 152-5.