

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2004)24-2237-04

音乐对大鼠学习和记忆以及海马 NMDA 受体表达的影响

王增贤¹, 王晓亚¹, 王怀经², 李振中², 王越², 邢子英²(¹泰山医学院基础医学研究所, 山东 泰安 271000, ²山东大学医学院解剖学教研室, 山东 济南 250012)

Effect of music on learning and memory and expression of NMDA receptor in hippocampus of rat

WANG Zeng-Xian¹, WANG Xiao-Ya¹, WANG Huai-Jing², LI Zhen-Zhong², WANG Yue², XING Zi-Ying²¹Institute of Basic Medicine, Taishan Medical College, Taian 271000, China, ²Department of Anatomy, Medical College, Shandong University, Jinan 250012, China

【Abstract】AIM: To study the effect of music on the spatial learning and memory and the expression of NMDA receptor in hippocampus of rats. **METHODS:** The non-matched position task in the Morris' water maze was used to examine the behavior changes of learning and memory, and immunohistochemistry and PCR techniques were employed to measure the expression of NMDA receptor and its mRNA in hippocampus in Wistar rats after music stimulation. **RESULTS:** After music exposure, the spatial memory of rat improved, the avoiding latency of information swim and choice swim shortened, and the choice accuracy in choice swim increased. The strongest effect of music was demonstrated in persistent music exposure group, moderate in the postnatal music exposure group, and the least in control groups. The expression of NMDA receptor and its mRNA in hippocampus strengthened. **CONCLUSION:** Music can improve the spatial memory of rats and increase the expression of NMDA receptor and its mRNA in hippocampus.

【Keywords】 learning; memory; receptors, N-Methyl-D-Aspartate; music; rats

【摘要】目的: 研究音乐对大鼠空间学习和记忆及海马内 NMDA 受体表达的影响。方法: 用 Morris 水迷宫行为检测法, 检测音乐刺激后大鼠学习和记忆能力的变化; 免疫组化和 PCR 技术检测海马 NMDA 受体及编码 NMDA 受体 mRNA 的表达。结果: 音乐刺激后, 大鼠信息游泳和选择游泳的逃避潜伏期缩短, 选择游泳选择正确率提高, 其变化以持续音乐刺激

组最明显, 生后音乐组次之, 对照组最小, 音乐刺激后海马神经元 NMDA 受体及其 mRNA 表达增加。结论: 音乐刺激能提高大鼠空间记忆能力, 增强海马神经元 NMDA 受体及编码 NMDA 受体的 mRNA 表达。

【关键词】 学习; 记忆; 受体; N-甲基-D-天冬氨酸; 音乐; 大鼠

【中图分类号】 Q426

【文献标识码】 A

0 引言

学习和记忆是哺乳类动物生存的重要基础。参与学习和记忆的脑结构因学习和记忆的类型不同, 呈现出复杂的多样性。关于化学物质, 如药物、神经活性物质等对学习和记忆的作用研究, 已经取得了大量的资料, 但是环境对学习和记忆影响的研究资料尚少见报道。本研究中我们用 Wistar 大鼠, 在不同的发育时期给予音乐刺激后, 用位置非匹配作业在 Morris 水迷宫中对大鼠进行行为学检测, 并对大鼠海马、杏仁核和中脑中央灰质等处 NMDA 受体的免疫组织化学反应强度和海马组织编码 NMDA 受体的 mRNA 表达进行定量检测, 以探索音乐刺激对大鼠学习和记忆以及与学习和记忆相关的脑区 NMDA 受体表达的影响, 为环境因素干预学习和记忆能力的机制研究提供资料。

1 材料和方法

1.1 材料 取定时妊娠 Wistar 大鼠 2 只, 妊娠期间 1 只于给予音乐刺激, 另 1 只不予音乐处理。2 只大鼠分娩后, 得到 2 窝大鼠崽各 15 只, 分别随机分为 2 组: 1 组给予音乐刺激, 另 1 组不予音乐处理。胎期接受音乐刺激, 生后继续音乐刺激的, 为持续音乐组(组 1) 7 只, 另一组生后中断音乐刺激, 为生前音乐组(组 3) 6 只, 仅生后接受刺激的为生后音乐组(组 2) 7 只, 另一组从未接受音乐刺激的为对照组(组 4) 7 只。前 3 组实验中各剔除 1 只, 各组雌雄不计。

1.2 方法

1.2.1 音乐刺激方案 用立体声收录机播放中国民间音乐小提琴协奏曲《梁山伯与祝英台》, 每次 45 min, 2 次/d, 每周播放音乐 5 d, 休息 2 d。为避免环境无关声音影响, 播放地点选在比较安静的实验室, 并在每日实验室无人员进出的早 6:30 和晚 7:00 进

收稿日期 2004-04-15; 修回日期 2004-06-05

作者简介: 王增贤(1960-) 男(汉族), 陕西省高陵县人, 博士, 研究生部副主任。Tel. (0538) 6222218 Email. albertwang029@hotmail.com 或 zzwang@tsmc.edu.cn

行。音乐播放期间,录音机和大鼠的位置、音乐的强度保持恒定。孕鼠音乐刺激从妊娠第8日开始,鼠崽音乐刺激从出生当天开始,直到生后70 d。

1.2.2 学习和记忆的行为训练和检测 用 Morris 氏水迷宫 (Morris water maze) 进行大鼠学习和记忆的行为学训练和检测^[1,2]。训练方案为,预训练3 d,学习训练9 d,休息2 wk,检测3 d。训练和检测时,每只大鼠游泳9次/d。

1.2.3 免疫组织化学染色及图像分析 用兔抗 NMDA 受体 α_1 亚单位多克隆抗体 (Santa Cruz 公司, 1:300 稀释) 对切片做 SABC 漂浮片方法染色标记。方法步骤概要: 0.1 mL/L H_2O_2 室温 15 min, 抗原封闭液室温 1 h, 一抗湿盒内 4℃ 过夜, 羊抗兔 IgG 室温 2 h, SABC 室温 2 h, DAB 显色 10 min。上述步骤中除加一抗前一步骤外, 第一步和以后各步骤后都用 0.01 mol/L PBS 冲 3 次, 每次 10 min。染色完成后, 常规脱水、透明、封片, 观察照相。对照组用血清代替一抗, 其余步骤相同。

图像分析: 在每组所做的切片中, 选取 5 张切片用 Pro plus 图像分析仪分析处理。对海马组织 CA1、CA3 和齿状回神经元 NMDA 受体的免疫染色强度进行分析。各片上均以其胼胝体染色作为参照, 求得目标区和胼胝体光密度差值后, 进行统计学分析处理。

1.2.4 海马组织 NMDA 受体 mRNA 的 PCR 分析 取各组大鼠海马组织, 2.5 mg/L 胰蛋白酶消化方法分离细胞后, 以 cacaggagcgggtaacaacagc 作为上游引物, gcttcagtccttggccgattc 作为下游引物。提取总

mRNA, 进行反转录。加入上游、下游引物、 β -actin 和 Taq 酶等, 94℃ 40 s, 55℃ 40 s, 72℃ 50 s, 循环 35 次。用 1.5 mL/L 琼脂糖凝胶电泳检测, SmartView 生物电泳图像分析系统 (上海复日生物技术研究所) 进行光密度分析, 得出 mRNA 表达的相对值。

统计学处理: 除选择游泳中的选择正确率用 χ^2 检验外, 其余各参数组间比较用方差分析进行统计学处理。

2 结果

2.1 大鼠的一般行为学观察 在音乐播放过程中, 鼠崽活动减少, 安静地聚集在一起。当被放回动物房后, 鼠崽活动活跃, 打斗频繁, 对人的触抓逃避反应敏感。未接受音乐刺激的鼠崽, 活动、打斗较少, 对触抓反应不很敏感。在训练过程中, 起初大鼠游泳时沿着迷宫和隔板贴壁游动, 随着训练的进行, 大鼠通过观察后或直接游到平台所在位置, 所用时间逐渐缩短, 选择正确率不断提高。

2.2 训练过程中大鼠学习和记忆能力的变化

2.2.1 信息游泳 (information swim, IS) 逃避潜伏期

训练初期和训练后期, 各组 IS 逃避潜伏期以组 1 最短, 以后依次为组 2、组 3 与组 4。其中组 1 与组 2 之间没有显著性差别 ($P > 0.05$), 组 3 与组 4 组之间具有显著性差别 ($P < 0.01$), 而组 1、2 与组 3、4 之间具有明显的差异 ($P < 0.01$, Tab 1)。表明音乐刺激对大鼠的空间记忆有促进作用, 而且呈现刺激时间长, 则作用明显的倾向。

表 1 训练过程中大鼠 IS 逃避潜伏期

Tab 1 Avoiding latency of IS during training

(t/s, $\bar{x} \pm s$)

Group	n	1st day	3rd day	1st three days	Last three days
1	7	17.6 ± 16.5	6.9 ± 6.9 ^b	10.2 ± 5.4	5.3 ± 2.6 ^d
2	7	18.3 ± 15.5	8.1 ± 9.1 ^b	11.8 ± 4.3	6.2 ± 2.8 ^{ad}
3	6	20.9 ± 15.3 ^c	10.7 ± 10.6 ^{bc}	13.2 ± 6.2 ^c	7.4 ± 3.0 ^{cd}
4	7	22.9 ± 17.6 ^{ce}	12.4 ± 12.3 ^{bce}	14.9 ± 5.8 ^{ce}	8.7 ± 6.7 ^{cde}

^b $P < 0.01$ vs the first day; ^d $P < 0.01$ vs group 1 and 2; ^f $P < 0.01$ vs the first three days; ^e $P < 0.01$ vs group 3. Group 1: Persistent music exposure; Group 2: Postnatal music exposure; Group 3: Prenatal music exposure; Group 4: Control. IS: information swim.

2.2.2 选择游泳 (choice swim, CS) 逃避潜伏期 训练初期各组的 CS 逃避潜伏期从短到长依次为: 组 1、2、3 和组 4, 其中组 1、2 之间没有显著性差异 ($P > 0.05$), 组 3、4 之间也没有显著性差异 ($P > 0.05$), 而组 1、2 与组 3、4 之间具有显著性差异 ($P < 0.01$, Tab 2), CS 选择正确率, 初期从高到低依次为组 1、2、3 和

组 4, 组 1 与组 2 之间没有显著性差别 ($P > 0.05$), 组 3 与组 4 之间具有显著性差别 ($P < 0.01$), 组 1、2 与组 3、4 之间具有显著性差别 ($P < 0.01$)。后期结果与初期类似 (Tab 3)。表明, 音乐刺激可以促进工作记忆的形成和提高, 而且呈现刺激时间依赖性, 即刺激时间长, 则促进作用明显。

表2 训练过程中大鼠 CS 逃避潜伏期

Tab 2 Avoiding latency of CS during training

(t/s, $\bar{x} \pm s$)

Group	n	1st day	3rd day	1st three days	Last three days
1	7	15.5 ± 12.8	9.5 ± 8.5 ^b	12.7 ± 6.3	7.3 ± 5.1 ^f
2	7	17.6 ± 12.4	10.2 ± 7.9 ^b	12.7 ± 4.2	7.2 ± 5.3 ^f
3	6	19.8 ± 14.8 ^d	12.4 ± 6.8 ^{bd}	14.7 ± 5.3 ^d	8.1 ± 4.9 ^{df}
4	7	22.2 ± 15.7 ^{dh}	13.0 ± 6.3 ^{bh}	14.8 ± 4.5 ^{dh}	9.6 ± 7.3 ^{dh}

^bP < 0.01 vs the first day; ^dP < 0.01 vs group 1 and 2; ^fP < 0.01 vs the first three days; ^bP < 0.01 vs group 3. CS: choice swim.

表3 训练过程中大鼠 CS 选择正确率

Tab 3 Choice accuracy rate of CS during training (%)

Group	n	1st day	3rd day	1st three days	Last three days
1	7	61.90	79.37 ^e	71.31	89.12 ^g
2	7	41.62 ^a	71.77 ^e	65.12	83.24 ^g
3	6	38.89 ^a	63.49 ^e	55.73 ^a	71.35 ^{ag}
4	7	27.46 ^{aei}	52.38 ^{aei}	48.49 ^{ae}	66.14 ^{ag}

^aP < 0.05 vs group 1; ^eP < 0.05 vs the first day; ^eP < 0.05 vs group 2; ^gP < 0.05 vs the first three days; ⁱP < 0.05 vs group 3. CS: choice swim.

2.3 大鼠学习和记忆训练的检测结果 训练后大鼠经过 1 wk 的休息再行 3 d 的检测。

2.3.1 IS 逃避潜伏期 检测期间大鼠的 IS 逃避潜伏期依次为 (6.05 ± 4.51) s (组 1)、(6.16 ± 3.38) s (组 2)、(8.18 ± 5.03) s (组 3)、(9.72 ± 7.25) s (组 4), 与训练末期相比都有所延长, 但不具有显著性差异。其中前两组间没有显著性差异 ($P > 0.05$), 后两组间具有显著性差异 ($P < 0.01$), 前两组与后两组间具有显著性差异 ($P < 0.01$)。表明大鼠经过训练已经学会了 IS, 且音乐刺激对大鼠空间记忆能力的影响作用依然存在。

2.3.2 CS 逃避潜伏期 检测期间各组大鼠的 CS 逃避潜伏期为 (8.37 ± 5.03) s (组 1)、(8.30 ± 3.38) s (组 2)、(9.82 ± 5.51) s (组 3)、(10.13 ± 7.25) s (组 4), 与训练末期相比, 无明显差异, 检测期间各组间仍是前两组和后两组之间具有显著性差异。表明音乐刺激引起的大鼠学习和记忆能力的差别仍然存在。CS 选择正确率在检测期间分别为 85.75% (组 1)、81.46% (组 2)、68.74% (组 3)、62.36% (组 4), 与训练末期没有显著增减, 但前两组和后两组间仍然具有显著性差异。

2.4 大鼠脑组织 NMDA 受体表达 音乐刺激后大鼠海马 NMDA 受体免疫反应强度以音乐组最强, 其次为产后音乐组, 再次为胎期音乐组和对照组 (Tab 4)。并且, 音乐组和产后音乐组显著地高于胎期音乐组和对照组, 而音乐组和产后音乐组之间、胎期音乐组和

对照组之间均没有显著差异。表明音乐刺激能提高海马 NMDA 受体的表达 (Fig 1, 2), 并且只有在产后进行音乐刺激才能起作用, 胎期刺激没有作用。

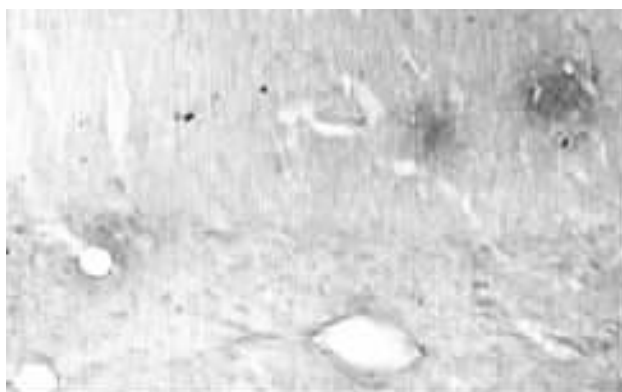


Fig 1 Immunocytochemical reactivity of NMDA receptor in the hippocampus of the rats from control group SABC × 10
图 1 对照组大鼠海马组织 NMDA 受体免疫反应活性



Fig 2 Immunocytochemical reactivity of NMDA receptor in the hippocampus of the rats from the persistent music treatment group SABC × 10
图 2 持续音乐刺激组大鼠海马组织 NMDA 受体免疫反应活性

2.5 大鼠海马组织 NMDA 受体 mRNA 表达 NMDA 受体 mRNA 在大鼠海马组织表达强度从强到弱依次为: 音乐组、产后音乐组、胎期音乐组和对照组, 与 NMDA 受体免疫反应强度变化顺序相似 (Tab 4, Fig 3) 表

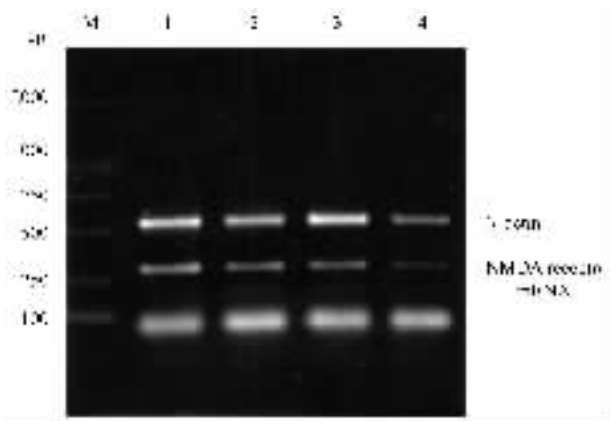
达的峰值时间前移,并且也是音乐组和生后音乐组显著地高于胎期音乐组和对照组,音乐组和生后音乐组之间、胎期音乐组和对照组之间均没有显著差异。

表4 海马组织 NMDA 受体免疫反应强度光密度及其 mRNA 表达的半定量结果

Tab 4 Optic density of NMDA receptor immunoreactivity (NMDA-ir) and its mRNA expression in hippocampus of the rats ($n=5 \bar{x} \pm s$)

Group	NMDA	mRNA
1 ^a	40.78 ± 5.37	0.95 ± 0.33
2 ^a	41.28 ± 4.91	0.98 ± 0.31
3	30.38 ± 3.43	0.73 ± 0.27
4	31.28 ± 4.03	0.69 ± 0.25

^aP < 0.01 vs group 3 and 4.



The columns present the marker, the electropherogram of the persistent music groups, the postnatal, the fatal and the control from right through left. The upper lane shows the β -actin and the lower lane indicates the mRNA coding the NMDA receptor.

Fig 3 Electropherogram of mRNA encoding NMDA receptor in hippocampal neurons of rats in different strategic music stimulation groups

图3 不同音乐刺激方案作用后,各组大鼠海马编码 NMDA 受体 mRNA 电泳图

3 讨论

学习和记忆是一个非常复杂的神经过程,脑内许多结构参与学习的不同过程,并与不同的学习方式相关联。海马被认为是人和高等动物学习和记忆不可缺少的神经结构之一。在啮齿类动物,海马是空间位置关系的重要“编码器”,编码位置和时间之间的联系,在空间航行探索中发挥重要作用^[3,4]。在人类的学习和记忆过程中,海马参与记忆的编码和再现的加工过程^[5],且海马不同部位所发挥的作用不同。音乐对中枢神经系统高级功能活动的影响通过多种不同的机

制实现。首先,音乐刺激能扩大脑内相关功能代表区,提高神经功能活动。长期音乐训练引起大脑皮质体感和听觉皮质代表区扩大,而且这种影响是音乐刺激特异性的,正弦声波刺激并不引起这种变化^[5];其次,音乐刺激可改变脑电活动,从而影响脑的高级功能活动。深部脑电图研究显示,人海马对不同音乐刺激有不同反应^[6];音乐刺激还通过改变神经活动发挥作用。研究显示,少年时期接受音乐刺激者,其单词的记忆能力比没有接受过训练者显著增强^[7],同时聆听歌曲可以增强健忘症患者的学习和记忆能力^[8];第四,音乐刺激可以调节神经系统某些物质的表达状态,改变神经系统的功能。生前给予音乐刺激的小鸡,其脑内嘴内侧纹状体/下丘脑腹下区钙结合蛋白小清蛋白(PV)和 CaBP 在神经元内表达增加,同时核内表达该两种物质的神经元比例增加^[8]。

我们观察到,音乐刺激可以提高大鼠的空间参考记忆和工作记忆能力,音乐对大鼠学习和记忆能力的提高依赖于音乐刺激的作用时间,音乐刺激作用时间长则提高明显。反复训练也可以提高大鼠的空间参考记忆和工作记忆能力,并具有时间依赖性。音乐刺激引起海马 NMDA 受体及编码该受体的 mRNA 表达增加,表明海马参与了音乐促进大鼠学习和记忆能力提高的过程,而这种能力提高与 NMDA 受体表达上调有关。

【参考文献】

- [1] Frick KM, Price DL, Koliatsos VE, et al. The effects of nerve growth factor on spatial recent memory in aged rats persist after discontinuation of treatment [J]. *Neuroscience*, 1997, 17(7): 2543-2550.
- [2] Markowska AL, Price D, Koliatsos VE. Selective effects of nerve growth factor on spatial recent memory as assessed by a delayed non-matching-to-position task in the water maze [J]. *Neuroscience*, 1996; 16(10): 3541-3548.
- [3] Buzsaki G, Chen LS, Goge FH. Spatial organization of physiological activity in the hippocampal region: Relevance to memory formation [J]. *Prog Brain Res*, 1990, 83: 257-268.
- [4] Treves A, Rolls ET. Computational analysis of the role of the hippocampus in memory [J]. *Hippocampus*, 1994, 4(3): 374-391.
- [5] Panten C. Representational cortex in musicians: Plastic alterations in response to musical practice [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2001; 930: 300-314.
- [6] Wieser HG, Mazzola G. Musical consonances and dissonances: Are they distinguished independently by the right and left hippocampus [J]. *Neuropsychologia*, 1986, 24(6): 805-812.
- [7] Chan AS, Ho YC, Cheung MC. Music training improves verbal memory [J]. *Nature*, 1998, 396: 128.
- [8] Haslam C, Cook M. Striking a chord with amnesic patients: Evidence that song facilitates memory [J]. *Neurocase*, 2002; 8(6): 453-465.