

· 论 著 ·

# 间断性缺氧致大鼠认知功能障碍与脑 nAChR $\alpha$ 4 表达的关系

陈 燕, 赵春玲<sup>△</sup>, 张春来, 徐 倩

(泸州医学院生理教研室, 四川泸州 646000)

**摘要:**目的 探讨间断性缺氧(IH)致大鼠认知功能障碍与脑烟碱型乙酰胆碱受体  $\alpha$ 4(nAChR $\alpha$ 4)表达的关系。方法 将成年雄性 Sprague-Dawley(SD)大鼠 40 只随机分为对照组、IH 1 周组、IH 3 周组及 IH 5 周组。采用 Morris 水迷宫检测认知功能的改变,免疫组化法检测前额叶皮层和海马神经元 nAChR $\alpha$ 4 蛋白的表达。结果 定位航行实验中,与对照组及 IH 1 周组比较,IH 5 周组大鼠逃避潜伏期明显延长( $P < 0.05$ )。空间搜索实验中,与对照组比较,IH 5 周组大鼠原平台所在象限停留时间百分率明显减少( $P = 0.047$ )。大鼠前额叶皮层和海马神经元 nAChR $\alpha$ 4 蛋白的表达随缺氧时间延长呈下降趋势。结论 间断性缺氧致大鼠认知功能障碍可能与前额叶皮层和海马神经元 nAChR $\alpha$ 4 表达降低有关。

**关键词:**缺氧;脑;认知障碍;烟碱型乙酰胆碱受体  $\alpha$ 4;大鼠

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.17.004

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)17-1675-02

## Relationship between cognition disorders caused by intermittent hypoxia and expression of nicotinic acetylcholine receptor alpha4 in brain in rats

Chen Yan, Zhao Chunling<sup>△</sup>, Zhang Chunlai, Xu Qian

(Department of Physiology, Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan 646000, China)

**Abstract: Objective** To explore relationship between cognition disorders caused by intermittent hypoxia and expression of nicotinic acetylcholine receptor alpha4 (nAChR $\alpha$ 4) in brain in rats. **Methods** Forty adult male Sprague-Dawley(SD) rats were randomly divided into four groups: control group, IH one week group, IH three weeks group and IH five weeks group. Changes of cognitive function were assessed by Morris Water Maze and protein expression of nAChR $\alpha$ 4 in neurons of prefrontal cortex and hippocampus were detected by immunohistochemical staining. **Results** Compared with control group and IH one week group, the escape latency of rats in IH five weeks group were significantly prolonged ( $P < 0.05$ ) in place navigation tests, and the percentage of time spent in the quadrant where the original platform had been were markedly decreased compared with control group in spatial probe tests ( $P = 0.047$ ). Protein expression of nAChR $\alpha$ 4 in neurons of prefrontal cortex and hippocampus of rats decreased with hypoxia duration increasing. **Conclusion** Cognition disorders induced by intermittent hypoxia in rats probably correlated with decreased expression of nAChR $\alpha$ 4 in neurons of prefrontal cortex and hippocampus.

**Key words:** hypoxia; brain; cognition disorders; nicotinic acetylcholine receptor alpha4 subunit; rats

阻塞性睡眠呼吸暂停综合征(Obstructive sleep apnea syndrome, OSAS)可引起认知功能障碍,其具体机制尚不明确,但多数学者认为间断性缺氧(intermittent hypoxia, IH)是 OSAS 导致认知功能障碍极为重要的环节。IH 造成循环血液中氧分压或氧含量周期性下降与恢复,导致机体多系统尤其是对缺氧敏感的中枢神经系统受损。IH 所致的脑损害常表现为认知功能的下降<sup>[1]</sup>。目前的研究表明, IH 致实验动物学习、记忆功能下降与相关脑区神经元乙酰胆碱表达的下调有关<sup>[2-4]</sup>。乙酰胆碱是迄今发现的与学习、记忆关系最为密切的一种神经递质<sup>[5]</sup>, 通过与其受体结合发挥生物学效应。乙酰胆碱受体有两种:毒蕈碱型乙酰胆碱受体和烟碱型乙酰胆碱受体(nicotinic acetylcholine receptor, nAChR)。毒蕈碱型受体与认知功能的关系在早期研究中已得到证实,近年来研究表明, nAChR 在认知功能中同样发挥重要的作用。然而,在 IH 脑损伤所致的认知功能障碍发生过程中,脑组织 nAChR 的表达会发生怎样的改变,目前尚未见相关报道。本研究通过检测 IH 大鼠的前额叶皮层和海马神经元 nAChR $\alpha$ 4 的表达水平,探讨 IH 脑损伤导致认知功能障碍的可能机制。

### 1 材料与与方法

**1.1 主要材料与仪器** Sprague-Dawley(SD) 雄性大鼠 40 只[平均体质量(250±20)g]由泸州医学院动物科提供,兔抗

nAChR $\alpha$ 4 多克隆抗体购自武汉博士德生物工程有限公司,即用型二步法(非生物素)检测试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司, Morris 水迷宫购自成都泰盟科技有限公司。

**1.2 动物分组与模型建立** 按缺氧时间将 40 只 SD 大鼠随机均分为 4 组:对照组、IH 1 周组、IH 3 周组和 IH 5 周组。各组大鼠均自由饮水与摄食,生活环境及饲养条件相同。参照薛全福等<sup>[6]</sup>和杨宇等<sup>[7]</sup>方法,将大鼠置于自制的有机玻璃舱内,舱内放入大量碱石灰和硅胶以吸收 CO<sub>2</sub> 和水蒸气。舱壁留有小缝隙与舱外相通,使舱内气压与大气压平衡。向有机玻璃舱内充入氮气,用数字测氧仪监测舱内氧的体积分数。每次缺氧开始时氧体积分数从 23% 降至(8±1)%,耗时 10 min。缺氧舱内 CO<sub>2</sub> 体积分数始终小于 3%,温度保持(22±2)℃,每天缺氧 8 h。进行 1、3、5 周,缺氧期间大鼠常规饮水与摄食。

**1.3 Morris 水迷宫测试** 对各组大鼠的学习记忆能力分别进行 Morris 水迷宫测试,共 7 d。定位航行实验分为两个阶段:水下平台 5 d,水上平台 2 d,训练并记录大鼠从不同象限入水直至找到平台所用时间(即逃避潜伏期)。水上平台测试结束后进行空间探索实验,记录大鼠在原有平台所在象限的活动时间,计算其占总活动时间的百分率。

**1.4 标本制备** Morris 水迷宫测试结束后,乙醚麻醉大鼠,打开胸腔,从左心室插管至升主动脉,同时剪开右心耳,用生理

盐水快速灌注,冲洗至右心耳流出液澄清,然后用 4℃、4%(质量浓度)多聚甲醛灌注固定。灌注完成后取出脑组织,在脑前额叶皮层、海马(齿状回、CA1、CA2、CA3 和 CA4 区)取材,用 4%多聚甲醛继续固定 8~12 h,石蜡包埋。

**1.5 免疫组化检测** 石蜡切片常规脱蜡至水,予 3%过氧化氢阻断内源性过氧化物酶,枸橼酸钠缓冲液水浴修复,正常山羊血清封闭 30 min,加入兔抗 nAChR $\alpha$ 4 多克隆抗体 4℃孵过夜,按照非生物素检测试剂盒说明书加入二抗,DAB 显色、脱水、透明、封片。PBS 液代替一抗作为阴性对照。

**1.6 图像分析** 显微镜照相系统拍摄前额叶皮层和海马神经元 nAChR $\alpha$ 4 表达情况,随机选取 3 个高倍视野( $\times 400$ ),测定其阳性染色的平均光密度值(optical density,OD),采用 Image-Pro Plus6.0 图像分析软件进行分析。

**1.7 统计学处理** 采用 SPSS13.0 统计软件进行分析,所有计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示。Morris 水迷宫定位航行实验逃避潜伏期比较采用重复测量方差分析(Repeated Measures, RANOVA);多元方差分析法对组间进行两两比较<sup>[8]</sup>;其余计量资料均采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 IH 对学习、记忆能力的影响** 定位航行实验中,各组逃避潜伏期有所不同( $F = 3.218, P = 0.000$ )。与对照组比较,IH 5 周组大鼠逃避潜伏期明显延长( $P < 0.05$ ),其余 IH 各组逃避潜伏期随着缺氧时间延长呈逐渐延长趋势,但与对照组比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ );组间比较,IH 1 周组与 IH 5 周组大鼠逃避潜伏期差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),其他各组之间差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),见图 1。空间搜索实验中,与对照组比较,IH 5 周组大鼠原平台所在象限停留时间百分率明显减少( $P = 0.047$ ),其余各组停留时间百分率随着缺氧时间延长而逐渐减少,但与对照组比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ );组间比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),见图 2。

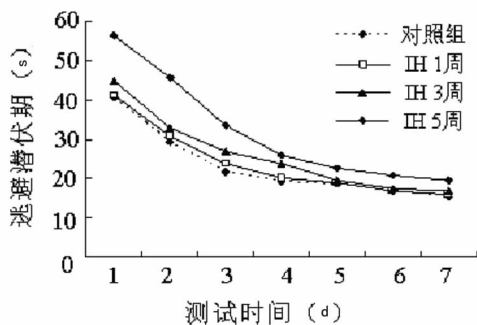


图 1 定位航行实验检测大鼠的逃避潜伏期

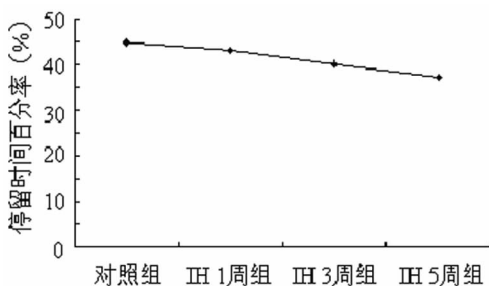


图 2 空间搜索实验检测大鼠原平台所在象限停留时间百分率

## 2.2 IH 对前额叶皮层和海马神经元 nAChR $\alpha$ 4 表达的影响

nAChR $\alpha$ 4 反应产物主要位于细胞膜上,呈棕黄色,胞浆中也有少量表达,细胞核经苏木素复染为蓝色。阴性对照组未见着色。与对照组比较,IH 5 周组前额叶皮层和海马神经元 nAChR $\alpha$ 4 的表达明显减少( $P = 0.005$ ),而 IH 1 周组和 IH 3 周组 nAChR $\alpha$ 4 的表达虽有所减少,但差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),见图 2 图 3、表 1。

表 1 IH 对大鼠前额叶皮层及海马神经元 nAChR $\alpha$ 4 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, OD$ )

组别	n	前额叶皮层	海马
对照组	10	0.432 ± 0.068	0.432 ± 0.051
IH 1 周组	10	0.395 ± 0.110*	0.398 ± 0.110*
IH 3 周组	10	0.366 ± 0.060*	0.375 ± 0.052*
IH 5 周组	10	0.327 ± 0.068 $\Delta$	0.335 ± 0.070 $\Delta$

\*:  $P > 0.05$ ,  $\Delta$ :  $P = 0.005$ , 与对照组比较。

## 3 讨 论

IH 是引起 OSAS 患者认知功能障碍的主要原因之一,但其确切机制尚不十分清楚。中枢神经系统内 nAChR 与神经元保护、学习、记忆等功能有关<sup>[9]</sup>。近年来越来越多的学者通过哺乳动物行为学研究,探讨脑内 nAChR 与认知功能的关系<sup>[10-11]</sup>。 $\alpha$ 4 是脑内 nAChR 的主要亚单位之一,主要分布于海马、大脑皮层等与学习、记忆密切相关的脑区<sup>[12]</sup>,在体内具有多种生物学活性。研究表明 nAChR $\alpha$ 4 在脑中含量的减少与阿尔茨海默病、帕金森病等认知功能障碍性疾病的发生机制有关<sup>[11,13]</sup>,提示 nAChR $\alpha$ 4 受体亚单位在认知功能中发挥了重要作用。本实验利用 Morris 水迷宫对 IH 大鼠进行认知功能评价,结果显示在定位航行实验中,随缺氧时间延长,IH 各组大鼠逃避潜伏期逐渐延长;空间探索实验中,IH 各组大鼠在原平台所在象限停留时间百分率逐渐减少,提示随着缺氧时间延长,大鼠学习和空间记忆能力逐渐下降,在 IH 5 周后大鼠出现明显学习、记忆功能障碍。同时,与对照组比较,IH 各组大鼠前额叶皮层和海马神经元中 nAChR $\alpha$ 4 表达随缺氧时间延长而呈下降趋势,IH 5 周组尤为明显。IH 各组 nAChR $\alpha$ 4 表达的下降趋势与 Morris 水迷宫认知功能检测结果一致,提示 IH 所致的认知功能障碍可能与前额叶皮层、海马神经元 nAChR $\alpha$ 4 表达降低有关。分析 IH 致大鼠认知功能障碍出现前额叶皮层、海马 nAChR $\alpha$ 4 蛋白表达降低的现象,其原因一方面可能是 IH 导致脑神经元受损,影响 nAChR $\alpha$ 4 蛋白的表达;另一方面,前期的研究发现,IH 可导致大鼠前额叶皮层、海马神经元乙酰胆碱数量减少,认为这可能对 nAChR $\alpha$ 4 的营养支持作用降低,从而影响 nAChR $\alpha$ 4 的表达。但是,nAChR 的调节是一个十分复杂的过程,多种因素,如脱敏、受体功能失活以及胆碱能传入纤维丧失等情况均可使 nAChR 的数量发生改变<sup>[14-15]</sup>。至于本研究中 IH 后 nAChR $\alpha$ 4 减少的原因及详细机制还有待进一步研究。

## 参考文献:

- [1] Kheirandish L, Row BW, Li RC, et al. Apolipoprotein E-deficient mice exhibit increased vulnerability to intermittent hypoxia-induced spatial learning deficits[J]. Sleep, 2005, 28(11): 1412-1417.
- [2] Geula C, Mesulam MM. Cortical cholinergic fibers in aging and Alzheimer's disease: a morphometric study[J]. Neuroscience, 1989, 33(3): 469-481. (下转第 1679 页)

加重老年人的孤独、焦虑和忧郁等不良的心理情绪。因此,增强移民迁移后对得到的社会支持的主观满意度是不可忽视的问题。

对移民组及对对照组精神症状(M-R)因子分析显示,抑郁因子在两组老年人中贡献率均排在第 1 位,老人们均面对社会与躯体功能退化,逐渐产生无用感。一些老年人反映,自己从家庭的主角逐渐退居为家庭的从属地位,一方面担心拖累子女;另一方面又担忧受到歧视。同时敏感、紧张及情绪不稳因子也发挥一定的作用。由此看来,抑郁作为一种常见的情绪问题在三峡库区老年移民与非移民中是普遍存在的现象<sup>[13]</sup>,有学者提出,抑郁不但影响老年人的生活质量,也将增加老年人患躯体疾病的风险<sup>[14-16]</sup>。老年人的身心健康状况是值得社会关注的重要问题。

#### 参考文献:

- [1] 庄立辉,郭继志,汪洋,等. 水库移民心理问题研究现状及展望[J]. 中国社会医学杂志,2006,23(4):224-227.
- [2] 刘琴,汪洋,李革,等. 三峡库区就地后靠移民心理特征及问题分析[J]. 现代预防医学,2008,35(2):280-282.
- [3] 杨辉,胡华,蒙华庆,等. 三峡库区就地后靠移民心理健康及社会支持、应付方式研究[J]. 重庆医科大学学报,2010,35(2):289-292.
- [4] 沈渔村. 精神病学[M]. 4 版. 北京:人民卫生出版社,2005:212-213.
- [5] 汪向东,王希林,马弘. 心理卫生评定量表手册[M]. 增订版. 北京:中国心理卫生杂志社,1999:23-31.
- [6] Brodam K, Erdmann AJ, Lorge I, et al. The Cornell medical index; a adjunct to medical interview[J]. J Am Med Assoc, 1949, 140(6):530-534.
- [7] Johns MW. Symptoms of neurotic illness in general hospi-

tal patients. Use of the Cornell Medical Index[J]. Med J Aust, 1972, 2(1):41-44.

- [8] 彭伟,李天霖,梁浩材. 康乃尔健康指数问卷[J]. 国外医学社会医学分册,1992,9(4):145-148.
- [9] 王扬,徐德忠,何耀. 康奈尔健康量表评价新入伍飞行员精神健康状况[J]. 中华航空航天医学杂志,1994,5(2):104-107.
- [10] 姜良美,郭继志,吴炳义,等. 三峡外迁移民心理社会应激状况调查与分析[J]. 中国社会医学杂志,2008,25(5):298-300.
- [11] 庄立辉,郭继志,汪洋,等. 三峡库区农村外迁移民心理健康状况及相关因素分析[J]. 中国自然医学杂志,2008,10(3):183-186.
- [12] Phillips DR, Siu OL, Yeh AG, et al. Informal social support and older persons' psychological well-being in Hong Kong[J]. J Cross Cult Gerontol, 2008, 23(1):39-55.
- [13] Unützer J. Diagnosis and treatment of older adults with depression in primary care[J]. Biol Psychiatry, 2002, 52(3):285-292.
- [14] 彭慧,傅华. 社会支持对上海市老年人抑郁症状的影响研究[J]. 中国健康教育,2009,25(2):92-94.
- [15] Chan SW, Chiu HF, Chien WT, et al. Quality of life in Chinese elderly people with depression[J]. Int J Geriatr Psychiatry, 2006, 21(4):312-318.
- [16] Katon WJ, Lin E, Russo J, et al. Increased medical costs of a population-based sample of depressed elderly patients[J]. Arch Gen Psychiatry, 2003, 60(9):897-903.

(收稿日期:2011-03-30 修回日期:2011-04-20)

(上接第 1676 页)

- [3] 田金洲,尹军祥,时晶,等. 大脑中动脉阻塞模型大鼠海马胆碱乙酰转移酶和突触素蛋白表达变化[J]. 中国临床康复,2006,10(20):54-56.
- [4] Terry AV Jr, Buccafusco JJ. The cholinergic hypothesis of age and Alzheimer's disease-related cognitive deficits: recent challenges and their implications for novel drug development[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2003, 306(3):821-827.
- [5] 王振江,殷兆花,沈维高,等. 大鼠在学习记忆时海马 ACh 和 ACh 能纤维的变化[J]. 北华大学学报:自然科学版,2008,9(3):236-238.
- [6] 薛全福,谢剑鸣,胡长贵,等. 常压缺氧性大鼠肺动脉高压模型的建立[J]. 中华结核和呼吸杂志,1989,12(6):350-351.
- [7] 杨宇,谭胜玉,张新民,等. 间歇性缺氧对大鼠认知功能和海马 CA1 区超微结构的影响[J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志,2007,3(14):157-163.
- [8] 邱宏,金围琴,金如锋,等. 水迷宫重复测量数据的方差分析及其在 SPSS 中的实现[J]. 中西医结合学报,2007,5(1):101-105.
- [9] 严家川,周华东,蒋晓江,等. 烟碱对 AD 大鼠海马  $\alpha$ nAChR 的影响及意义[J]. 重庆医学,2008,37(4):385-

387.

- [10] Fernandes C, Hoyle E, Dempster E, et al. Performance deficit of alpha7 nicotinic receptor knockout mice in a delayed matching-to-place task suggests a mild impairment of working/episodic-like memory[J]. Genes Brain Behav, 2006, 5(6):433-440.
- [11] Pocivavsek A, Icenogle L, Levin ED. Ventral hippocampal alpha7 and alpha4beta2 nicotinic receptor blockade and clozapine effects on memory in female rats[J]. Psychopharmacology (Berl), 2006, 188(4):597-604.
- [12] 陈燕,赵春玲. 烟碱型乙酰胆碱受体在认知功能中的作用[J]. 国际病理科学与临床杂志,2008,28(2):142-146.
- [13] 刘如玉,顾然,齐晓岚,等.  $\beta$ -淀粉样蛋白和胆固醇对大鼠大脑类似阿尔茨海默病病理学进程和尼古丁受体的影响[J]. 中华病理学杂志,2007,36(3):184-189.
- [14] Sallette J, Pons S, Devillers-Thierry A, et al. Nicotine up-regulates its own receptors through enhanced intracellular maturation[J]. Neuron, 2005, 46(4):595-607.
- [15] Slotkin TA, Seidler FJ. Cholinergic receptor subtypes in the olfactory bulbectomy model of depression[J]. Brain Res Bull, 2006, 68(5):341-345.

(收稿日期:2010-12-13 修回日期:2011-01-18)