

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.02.005

大量失血对老年大鼠空间学习记忆能力的影响*

吕一冬¹, 刘秀珍^{2△}, 王宏月¹, 魏昌伟², 王卓强², 陈剑²

(1. 江苏省麻醉学重点实验室, 江苏徐州 221004; 2. 解放军第 309 医院麻醉科, 北京 100091)

摘要:目的 探讨大量失血对 SD 老年大鼠空间学习记忆能力的影响。方法 将 56 只 SD 老年大鼠分为空白组(B 组, $n=8$)、对照组(C 组, $n=24$)和大量失血组(H 组, $n=24$)。B 组不做任何处理, C 组对老年大鼠麻醉后, 游离股动脉并结扎、缝合。H 组对老年大鼠麻醉后, 先游离股动脉然后行股动脉穿刺、放血, 再行股动脉结扎、缝合。用 Morris 水迷宫检测 3 组老年大鼠不同时段的空间学习记忆能力。结果 H 组术后 1、3、7 d 的逃避潜伏期分别为: (29.93 ± 7.93) 、 (34.56 ± 6.74) 、 (15.47 ± 6.42) s。与 B 组逃避潜伏期 (12.56 ± 3.08) s 比较, H 组老年大鼠的逃避潜伏期在大量失血后 1、3 d 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 大量失血后 7 d 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。C 组老年大鼠在术后 1、3、7 d 的逃避潜伏期分别为: (15.74 ± 5.86) 、 (15.61 ± 2.56) 、 (13.56 ± 4.61) s, 与 B 组逃避潜伏期 (12.56 ± 3.08) s 比较, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论 大量失血导致了老年大鼠空间学习记忆能力的损害。

关键词: 出血; 记忆; 老年大鼠; Morris 水迷宫

中图分类号: R614.2

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2015)02-0158-03

The influences of massive hemorrhage on spatial learning and memory in aged rats*

Lv Yidong¹, Liu Xiuzhen^{2△}, Wang Hongyue¹, Wei Changwei², Wang Zhuoqiang², Chen Jian²

(1. Jiangsu Province Key Laboratory of Anesthesiology, Xuzhou, Jiangsu 221004, China;

2. Department of Anesthesiology, the 309th Hospital of Chinese People's Liberation Army, Beijing 100091, China)

Abstract: Objective To research the influences of massive hemorrhage on spatial learning and memory ability in elderly SD rats. Methods Fifty six aged SD rats were randomly divided into 3 groups: blank group (B group, $n=8$), control group (C group, $n=24$), and hemorrhage group (H group, $n=24$). B group was not given any intervention, C group received femoral artery ligation and was sutured under general anesthesia, H group underwent femoral artery puncture phlebotomy, and then the rats were sutured. Morris water maze was used to test the spatial working ability. Results The escape latency of H group on postoperative day 1, 3 and 7 were (29.93 ± 7.93) s, (34.56 ± 6.74) s and (15.47 ± 6.42) s respectively. Compared with B group (12.56 ± 3.08) s, these results indicated the spatial learning and memory of H group was destroyed after surgery 1 d and 3 d ($P < 0.05$), but no significant difference between H group and B group on postoperative day 7 ($P > 0.05$). The escape latent periods to platform observed in C group rats on day 1, 3 and 7 after operation were (15.74 ± 5.86) s, (15.61 ± 2.56) s and (13.56 ± 4.61) s. Compared with B group (12.56 ± 3.08) s, these results indicated that there was no significant difference 7 ($P > 0.05$). Conclusion The findings of this study indicate that massive hemorrhage of old rats may destroy the spatial learning and memory.

Key words: hemorrhage; memory; aged rats; Morris water maze

Morris 水迷宫为实验动物对空间学习和记忆的过程提供了客观准确的评价指标, 全面记录实验动物的学习记忆过程, 客观地反映其认知水平^[1]。本实验参照 Melgar 等^[2]的模型, 实验动物以股动脉穿刺大量放血模拟外科手术中的大量失血, 探讨老年大鼠大量失血后空间学习记忆能力是否受到影响, 并通过 Morris 水迷宫对老年大鼠的空间学习记忆能力进行评估。

1 材料与方 法

1.1 实验动物 SD 老年大鼠 56 只(18 月龄, 雄性)来自军事医学科学院实验动物中心, 分为空白组(B 组, $n=8$)、对照组(C 组, $n=24$)、大量失血组(H 组, $n=24$)。其中 C 组、H 组再分别分为术后 1 d 组(C1 组, $n=8$; H1 组, $n=8$), 术后 3 d 组(C3 组, $n=8$; H3 组, $n=8$), 术后 7 d 组(C7 组, $n=8$; H7 组, $n=8$)。

1.2 方法

1.2.1 动物处理 所有实验动物放入独立通气笼内饲养, 在湿度 55%~58%, 温度 20~25℃ 的环境中给予充足的食物和水, 适应 1 周。B 组不做任何处理。C 组和 H 组用 2% 的戊巴比妥钠(50 mg/kg, 腹腔注射)麻醉后, C 组先分离股动脉, 然后进行结扎缝合, H 组先行股动脉穿刺, 然后行股动脉放血, 最后结扎缝合(具体操作: 老年大鼠麻醉后备皮消毒, 于右侧腹股沟动脉搏动最明显处剪开皮肤, 股动脉位置较深, 充分暴露后分离股动脉并在近、远侧端穿线备用。用 4.5 号头皮针连接肝素化的注射器穿刺放血)。参照 Peng 等^[3]对老年大鼠失血性休克生理变化的研究, 综合考虑失血后老年大鼠的生存率, 确定放血量为老年大鼠总血容量(按 65 mL/kg 计算)的 25%, 放血时间维持 5 min 以上。

1.2.2 Morris 水迷宫实验 Morris 水迷宫为直径 1.6 m 的圆形水槽(水温 24~25℃), 分为 4 个象限, 四周环境各不相同。其中 1 个象限在水下 0.5 cm 处放置一个圆形平台。老年

* 基金项目: 总参军事医学和老年病科基金项目(ZCWS14C20)。 作者简介: 吕一冬(1988—), 在读硕士, 主要从事重要脏器功能衰竭机制及其防治方向研究。△ 通讯作者, Tel: (010)66775185 / 13501298678; E-mail: xiuzhen_liu@sina.com。

大鼠在术前进行连续 5 d 的训练,每天 3 次。每次训练前让其在平台上适应 30 s,熟悉、记忆周围环境,然后在对侧象限将其背对水槽壁放入自由游泳 60 s,找到平台后在平台上停留 30 s,若在 60 s 内未能到达平台则引导老年大鼠找到平台停留 30 s。老年大鼠全部训练 1 次结束后重复第 2、3 次训练,不同的是分别从平台相邻的 2 个象限放入。C 组, H 组分别在术后 1、3、7 d 应用 Morris 水迷宫检测老年大鼠的空间学习记忆能力。不同的是将平台放至对侧象限,观察其是否能通过学习和记忆迅速找到平台位置^[4]。记录老年大鼠游行过程中的游行距离、时间(逃避潜伏期)和速度。

1.3 统计学处理 采用 SPSS16.0 进行处理,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,术前数据采用重复测量方差分析,术后所得数据总体比较用单因素方差分析,组间比较用 LSD-*t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 老年大鼠不同时段 Morris 水迷宫轨迹图 平台放于第 3 象限,老年大鼠入水点为第 1 象限。

2.1.1 术前老年大鼠 Morris 水迷宫训练图 见图 1。

2.1.2 术后 1 d 老年大鼠 Morris 水迷宫轨迹图 见图 2。

2.1.3 术后 3 d 老年大鼠 Morris 水迷宫轨迹图 见图 3。

2.1.4 术后 7 d 老年大鼠 Morris 水迷宫轨迹图 见图 4。

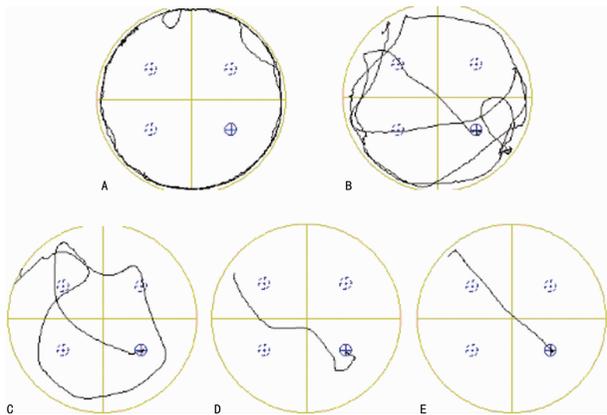


图 1 术前老年大鼠游行轨迹图

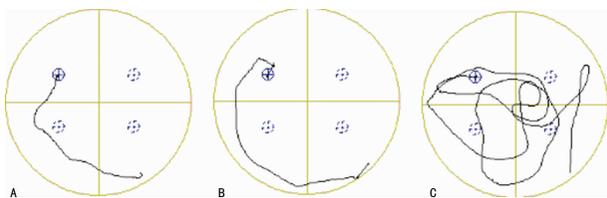


图 2 术后 1 d 3 组老年大鼠游行轨迹图

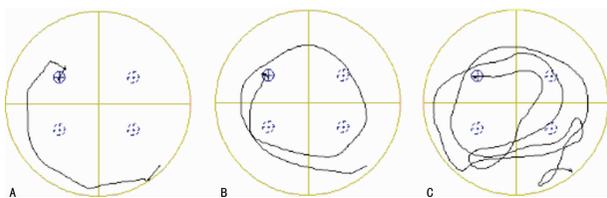


图 3 术后 3 d 3 组老年大鼠游行轨迹图

2.2 老年大鼠不同时段游行过程中的逃避潜伏期和游行速度

2.2.1 术前训练结果 经重复测量方差分析计算时间因素效

应: $F = 233.194, P = 0.000$, 分组因素效应: $F = 0.453, P = 0.838$ 。结果表明,随着训练次数的增多,老年大鼠能通过对空间记忆的学习迅速找到平台。分组效应的结果提示术前各组之间老年大鼠的空间记忆学习能力差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 详见表 1。

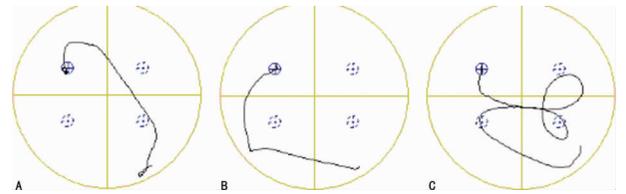


图 4 术后 7 d 3 组老年大鼠游行轨迹图

表 1 术前训练各组的平均逃避潜伏期 ($\bar{x} \pm s, s$)

组别	n	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d
B 组	8	59.7±0.06	44.44±16.62	20.99±9.70	13.93±6.03	10.17±3.60
C1 组	8	59.77±0.25	35.05±11.01	20.95±13.34	16.02±6.84	10.93±3.96
H1 组	8	59.67±0.06	41.16±12.34	20.11±10.13	17.01±9.32	11.41±3.71
C3 组	8	59.67±0.07	40.12±9.46	23.18±12.57	15.39±7.68	9.83±3.01
H3 组	8	59.69±0.07	42.92±8.49	25.89±9.66	18.09±11.96	11.30±4.16
C7 组	8	59.69±0.06	37.43±14.49	30.48±8.02	19.61±10.09	9.86±3.55
H7 组	8	59.72±0.07	41.44±13.07	25.37±11.58	12.91±6.36	13.86±7.45

2.2.2 术后不同时段各组间逃避潜伏期和游行速度 与 B 组比较, C 组和 H 组术后 1、3 d 的游行速度差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与 B 组比较, C 组术后 1、3 d 的逃避潜伏期无明显变化, 而 H 组术后 1、3 d 的逃避潜伏期明显增加 ($P < 0.05$), 差异有统计学意义。然而 B 组分别与术后 7 d C 组和 H 组比较逃避潜伏期和游行速度差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 详见表 2。

表 2 术后 1、3、7 d 各组间逃避潜伏期和游行速度 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	逃避潜伏期(s)	游行速度(m/s)
B 组	8	12.56±3.08	27.68±3.27
C1 组	8	15.74±5.86	25.92±3.81
H1 组	8	29.93±7.93 ^a	26.33±3.88
C3 组	8	15.61±2.56	25.76±3.20
H3 组	8	34.56±6.74 ^a	28.98±5.11
C7 组	8	13.56±4.61	27.23±5.05
H7 组	8	15.47±6.42	26.01±4.96

^a: $P < 0.05$, 与 B 组比较。

3 讨 论

Morris 水迷宫是评估空间学习记忆能力的一种常用实验方法, 其原理是经过反复多次训练使实验动物学会寻找隐蔽的平台, 通过学习和记忆形成稳定的空间认知能力^[5]。通过 Morris 水迷宫术前 5 d 的训练证明, 随着训练时间的增多, 老年大鼠空间学习记忆能力得到了提高。

本研究主要从记忆力方面对老年大鼠的认知功能进行研究, 即通过老年大鼠对某种任务的学习记忆、巩固和再现来评估其认知功能。通过对术后老年大鼠逃避潜伏期及游行速度统计分析发现 C1、C3、C7 组与 B 组比较差异没有统计学意义, 表明手术创伤及股动脉结扎并未影响大鼠的运动能力, 也没有对老年大鼠的空间学习记忆能力产生影响。然而 H1 和 H3 组老年大鼠的逃避潜伏期与 B 组比较差异有统计学意义。说明老年大鼠的空间学习记忆能力在大量失血后第 1 天遭到损害, 并且第 3 天损害更为严重, 在第 7 天时恢复。结果提示老

年大鼠急性大量失血后在未能及时补充血容量的情况下,可以导致其发生以空间学习记忆能力受损为主要表现的认知功能障碍,与曹学照等^[4]的研究结果相一致。

Cao 等^[6]对老年大鼠行肝部分切除术并在术后应用 Morris 水迷宫评估其空间学习记忆能力,证实了中等大小手术创伤可影响实验大鼠的空间学习记忆能力。刘汉兴等^[7]对大鼠进行双侧颈总动脉结扎致大鼠慢性脑缺血来研究,证实慢性脑缺血造成了大鼠的空间学习记忆能力的损害。

目前大量失血导致老年大鼠空间学习记忆能力损害的机制是否与手术创伤或者慢性脑缺血引起其损害的机制相同尚不明确。有文献报道急性大量失血后体循环血容量减少、全脑血流量减少、脑灌注压下降,同时急性贫血导致血液系统携氧能力降低,可使局部组织缺氧^[8-9]。还可能直接影响中枢神经细胞功能,导致海马、前脑室白质及基底神经节等敏感性区域发生缺血缺氧性损害,进而失血后认知功能、记忆能力受到影响^[10-11]。

Paul 等^[12]研究发现空间学习记忆能力依赖于完整的海马结构,但是也有研究发现空间学习记忆功能的障碍也可发生在无海马结构破坏但是有慢性脑血流低灌注导致的脑白质损伤的大鼠^[13]。尚游等^[14]通过对兔失血性休克的研究发现,失血性休克发生时实验兔血浆中的肾上腺素等激素水平明显升高,证实失血性休克引发了严重的应激反应。同时有文献报道,肾上腺皮质激素受体存在于与认知功能密切相关的海马区,应激时糖皮质激素分泌增加,长时间高水平的糖皮质激素可造成海马神经元的损害,这种损害长期存在导致海马区糖皮质激素受体减少,减弱了对肾上腺皮质的反馈抑制作用,进而使糖皮质激素处于高分泌状态,最终使海马神经元发生永久性损害,造成其学习与记忆能力受损^[15]。因此老年大鼠急性大量失血后认知功能障碍发生可能与应激及脑组织缺血缺氧有关,其发生机制还有待于进一步研究。

参考文献:

- Brandeis R, Brandys Y, Yehuda S. The use of the Morris Water Maze in the study of memory and learning[J]. *Int J Neurosci*, 1989, 48(1/2): 29-69.
- Melgar MA, Park H, Rafols JA. A model of global fore-brain ischemia/reperfusion in the awake rat[J]. *Neurol Res*, 2002, 24(1): 97-106.
- Peng TC, Liao KW, Lai HL, et al. The physiological changes of cumulative hemorrhagic shock in conscious rats[J]. *J Biomed Sci*, 2006, 13(3): 385-394.
- 曹学照, 郭丽丽, 马虹, 等. 手术创伤对老年鼠和成年鼠术后空间学习记忆能力的影响[J]. *中国医科大学学报*, 2012, 41(9): 809-812.
- D'Hooge R, De Deyn PP. Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory[J]. *Brain Res Rev*, 2001, 36(1): 60-90.
- Cao XZ, Ma H, Wang JK, et al. Postoperative cognitive deficits and neuroinflammation in the hippocampus triggered by surgical trauma are exacerbated in aged rats[J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2010, 34(8): 1426-1432.
- 刘汉兴, 章建军, 张磊, 等. Tempol 对慢性脑缺血大鼠脑白质损伤及认知功能的影响[J]. *中华医学杂志*, 2013, 93(17): 1330-1334.
- Karkouti K, Beattie WS, Wijeyesundera DN, et al. Hemodilution during cardiopulmonary bypass is an independent risk factor for acute renal failure in adult cardiac surgery[J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2005, 129(2): 391-400.
- Tsui AK, Dattani ND, Marsden PA, et al. Reassessing the risk of hemodilutional anemia: some new pieces to an old puzzle[J]. *Can J Anaesth*, 2010, 57(8): 779-791.
- Dodds C, Allison J. Postoperative cognitive deficit in the elderly surgical patient[J]. *Br J Anaesth*, 1998, 81(3): 499.
- Bekker AY, Weeks EJ. Cognitive function after anaesthesia in the elderly[J]. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*, 2003, 17(2): 259-272.
- Paul CM, Magda G, Abel S. Spatial memory: Theoretical basis and comparative review on experimental methods in rodents[J]. *Behav Brain Res*, 2009, 203(2): 151-164.
- Miki K, Ishibashi S, Sun L, et al. Intensity of chronic cerebral hypoperfusion determines white/gray matter injury and cognitive/motor dysfunction in mice[J]. *J Neurosci Res*, 2009, 87(5): 1270-1281.
- 尚游, 袁世荣, 姚尚龙. 高渗氯化钠羟乙基淀粉溶液对失血性休克兔应激反应的影响[J]. *中华麻醉学杂志*, 2005, 25(1): 37-39.
- 沈丽娟. 老年人术后认知功能障碍的相关因素[J]. *医学信息*, 2009, 1(6): 1-3.
- Brandeis R, Brandys Y, Yehuda S. The use of the Morris Water Maze in the study of memory and learning[J]. *Int J Neurosci*, 1989, 48(1/2): 29-69.
- Melgar MA, Park H, Rafols JA. A model of global fore-brain ischemia/reperfusion in the awake rat[J]. *Neurol Res*, 2002, 24(1): 97-106.
- Peng TC, Liao KW, Lai HL, et al. The physiological changes of cumulative hemorrhagic shock in conscious rats[J]. *J Biomed Sci*, 2006, 13(3): 385-394.
- Solanum nigrum Linn. water extract inhibits metastasis in mouse melanoma cells in vitro and in vivo[J]. *Agric Food Chem*, 2010, 58(22): 11913-11923.
- 季宇彬, 高世勇. 龙葵碱诱导 HepG2 细胞凋亡的线粒体通路研究[J]. *中国药理学杂志*, 2008, 43(4): 272-275.
- 季宇彬, 刘家源, 高世勇. 龙葵碱对乳腺癌 MCF-7 细胞微管系统的影响[J]. *中草药*, 2012, 43(1): 111-114.
- 常乐, 刘艺. 龙葵多糖对人胃癌 MGC-803 细胞增殖的影响[J]. *牡丹江医学院学报*, 2012, 33(4): 24-26.
- 聂巧珍, 韩伊林, 苏秀兰. 激光照射联合龙葵多糖对荷瘤小鼠肿瘤增殖的影响[J]. *内蒙古中医药*, 2007, 26(10): 37-38.
- Weidner N, Folkman J, Pozza F, et al. Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early stage breast carcinoma[J]. *J Natl Cancer Inst*, 1992, 84(24): 1875-1887.
- 王玉环, 王春, 孙振柱. Her-2、P-53 和 Ki-67 在结直肠癌中的表达及意义[J]. *临床荟萃*, 2011, 26(14): 1228-1232.

(收稿日期: 2014-09-14 修回日期: 2014-10-14)

(上接第 157 页)

- Solanum nigrum Linn. water extract inhibits metastasis in mouse melanoma cells in vitro and in vivo[J]. *Agric Food Chem*, 2010, 58(22): 11913-11923.
- 季宇彬, 高世勇. 龙葵碱诱导 HepG2 细胞凋亡的线粒体通路研究[J]. *中国药理学杂志*, 2008, 43(4): 272-275.
- 季宇彬, 刘家源, 高世勇. 龙葵碱对乳腺癌 MCF-7 细胞微管系统的影响[J]. *中草药*, 2012, 43(1): 111-114.
- 常乐, 刘艺. 龙葵多糖对人胃癌 MGC-803 细胞增殖的影响[J]. *牡丹江医学院学报*, 2012, 33(4): 24-26.
- 聂巧珍, 韩伊林, 苏秀兰. 激光照射联合龙葵多糖对荷瘤

(收稿日期: 2014-09-11 修回日期: 2014-10-22)