

· 药理 ·

愤怒应激对衰老大鼠认知功能的影响及机制分析

赵君玫, 詹向红*, 张娜, 杨雪, 李伟
(河南中医学院, 郑州 450008)

[摘要] 目的:研究愤怒应激对 *D*-半乳糖(*D*-gal)诱导的脑老化模型大鼠认知功能的影响及机制。方法:将 Wistar 大鼠随机分成正常对照组、愤怒模型组、*D*-gal 模型组、愤怒 + *D*-gal 模型组及攻击鼠,颈后部 sc 1% *D*-gal 生理盐水溶液,注射容量为 10 mL·kg⁻¹·d⁻¹,正常对照组注射同体积生理盐水,连续注射 6 周。愤怒组、愤怒 *D*-gal 组,从第三周始进行愤怒刺激实验,把愤怒模型组大鼠单独放入鼠笼中,随机放进一只入侵鼠,用纱布包裹止血钳钳夹入侵鼠尾,入侵鼠对模型组大鼠发起攻击,双方互相撕咬对峙,每天刺激时间为 20 min,连续 4 周。第 37 天开始 Morris 水迷宫实验测试,6 d 后处死解剖大鼠,收集脑组织进行超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、脂褐素(LPF)检测;同时对大脑皮质及海马区进行病理学观察。结果:与正常对照组相比,愤怒模型组、*D*-gal 模型组、愤怒 + *D*-gal 模型组脑 SOD 活性明显降低($P < 0.01$),MDA,LPF 含量明显升高($P < 0.01$),空间学习记忆能力明显降低($P < 0.05$);行为活动和学习记忆功能减退差异显著($P < 0.05$, $P < 0.01$);病理学检测结果显示,与正常对照组相比,愤怒模型组、*D*-gal 模型组、愤怒 + *D*-gal 模型组大脑皮质和海马区均出现不同程度的病理变化,其中愤怒 + *D*-gal 模型组病变最为明显。结论:愤怒应激对 *D*-gal 诱导的脑老化模型大鼠的行为活动和认知功能具有减退作用。

[关键词] 愤怒; *D*-半乳糖; 脑老化; 认知功能

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)19-0137-04

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120731.1110.010.html>

[网络出版时间] 2012-07-31 11:10

Effect of Anger Stress on the Learning Behaviour and Mechanism Investigation in Aging Model Rats

ZHAO Jun-mei, ZHAN Xiang-hong*, ZHANG Na, YANG Xue, LI Wei
(Traditional Chinese Medicine College of Henan, Zhengzhou 450008, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects and mechanism of anger stress on behavior and memory in the *D*-gal induced brain aging model rats. **Method:** Wistar rats were randomly divided into control group, anger model group, *D*-gal group, anger + *D*-gal group, and attack rats. The *D*-gal group and anger + *D*-gal group were administered ip 1% *D*-gal physiological saline solution (PSS) 10 mL·kg⁻¹·d⁻¹. The control group and anger model group were ip given the same volume of PSS for 6 weeks. From the third weeks, the anger model group and anger + *D*-gal group accepted the anger stimulation test for 4 weeks. Each rat in anger model group was placed into one cage and accepted the attack from the invade rat, the tail of invade rat was clamped by using haemostat packed with bandage, two rats bite each other 20 min per day. Morris water maze test was carried out in the 37 days. Six days later all rats were executed and the brain tissue was collected for measurement of superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), lipofuscin (LPF), meanwhile, pathological changes were observed on cerebral cortex and seahorse. **Result:** Compared with control group, the behavior and memory significantly decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), the brain tissue SOD activity was significantly reduced ($P < 0.01$) and MDA,

[收稿日期] 20111231(011)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30973695,30772686);河南省自然科学基金项目(0511044400,411045500)

[第一作者] 赵君玫,副教授,从事情志与衰老相关疾病的研究,Tel:13623858181,E-mail:zhyyzm@163.com

[通讯作者] *詹向红,教授,博士生导师,从事情志与衰老相关疾病的研究,Tel:0371-65962406,E-mail:zxh@163.com

LPF content were obviously increased ($P < 0.01$) in the anger model group, *D*-gal group and anger + *D*-gal group. Furthermore, pathological study showed that the cerebral cortex and seahorse in the anger model group, *D*-gal group and anger + *D*-gal group appeared pathological changes compared with control group, the pathological changes in anger + *D*-gal group were most obvious. **Conclusion:** The anger stress has the negatively effects on behavior and memory in the *D*-gal induced brain aging model rats.

[**Key words**] anger stress; *D*-gal; brain aging; behavior and memory

脑老化是指脑生长、发育、成熟到衰老过程中的后一阶段,包括一系列生理的、心理的、形态结构和功能的变化,以脑部功能的降低、减弱和消失为特征。一般认为,脑老化是机体内环境共同作用的结果,是神经系统衰老的表现,严重影响思维,认知、记忆、定向等功能,其中学习记忆能力减退最为突出。就人类而言,随着社会的进步,生活节奏加快、社会竞争日益激烈,人们的心理波澜和情绪冲突越来越多,与社会心理因素有关的疾病逐渐成为加速衰老的重要因素。而情绪应激是心理应激的常见应激源。有研究显示持久的情绪应激导致机体神经内分泌免疫功能紊乱能够加速衰老过程^[1]。

D-半乳糖(*D*-gal)脑老化模型在一定程度上较好地模拟了自然衰老的改变,目前被广泛应用于衰老、脑老化和相关药物筛查的研究领域^[2]。本研究在(*D*-gal)脑老化模型的基础上,引入愤怒情绪刺激,以衰老自由基学说和脑老化学说为出发点,以*D*-gal诱导的脑老化大鼠为对象,探讨愤怒对脑老化模型大鼠行为活动和学习能力及抗氧化功能的影响,为愤怒诱导脑老化过速提供病因学实验依据。

1 材料

1.1 试剂 *D*-gal[分析纯,生工生物工程(上海)有限公司,批号 1884B11,使用时用生理盐水配成 1% 的生理盐水溶液],丙二醛(MDA)试剂盒(批号 20080308)、脂褐素(LPF)试剂盒(批号 20080310)、超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒(批号 20080308)均购自南京建成生物工程研究所。

1.2 动物 Wistar 大鼠,清洁级,体重(270 ± 10)g,雄性,3 月龄,由河北医科大学实验动物中心提供,实验动物生产许可证 SCXK(冀)2003-1-003。

1.3 仪器 Morris 水迷宫(自制),TU-1901 双光束紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司),F-4500 荧光分光光度计(日本日立),36012 型光学显微镜(日本奥林巴斯)

2 方法

2.1 动物分组和造模 取 Wistar 大鼠,随机分成 4 组,即正常对照组、愤怒模型组、*D*-gal 模型组、

愤怒 + *D*-gal 模型组及攻击鼠,每组 10 只。颈部皮下注射 1% *D*-gal 生理盐水溶液,注射容量为 10 mL·kg⁻¹·d⁻¹,空白对照组注射同体积生理盐水,连续注射 6 周。愤怒模型组和愤怒 + *D*-gal 模型组每天进行愤怒刺激试验,即采用夹尾间接激怒法引入愤怒刺激,从第 3 周始进行愤怒刺激实验,把愤怒模型组和愤怒 + *D*-gal 模型组大鼠单独放入鼠笼中,随机放进一只入侵鼠,用纱布包裹止血钳,钳夹入侵鼠尾,入侵鼠对模型组大鼠发起攻击,双方互相撕咬对峙,每天刺激时间为 20 min,连续 4 周。第 37 天进行 Morris 水迷宫实验,6 d 后处死大鼠,收集脑组织进行 SOD, MDA, LPF 检测;同时另取对侧大脑组织,用 10% 甲醛溶液固定,进行石蜡包埋切片。

2.2 Morris 水迷宫实验 Morris 水迷宫为直径 100 cm 圆形水池,高 60 cm,内置一无色有机玻璃平台,没于水面下 1~2 cm。水面上均匀地洒满白色塑料泡沫,水池等距离地分为 4 个象限,站台位于某一象限的中央。实验时,水迷宫周围参照物不变,水温 20~22 °C,记录大鼠寻台时间(searching platform latency, SPL);每天每只动物测 4 次:将大鼠面向池壁分别于 4 个不同的入水点放入水池,使其自由游泳,记录大鼠寻找平台的时间作为定位学习记忆成绩。60 s 内找不到平台,记为 60 s,并将动物放到平台上熟悉 10 s,休息 30 s,进行下一次测试,本实验为期 6 d。

2.3 生化指标检测 实验至第 7 周,冰台上快速取左半脑,冷生理盐水清洗,脑组织称重,制备 10% 脑组织生理盐水匀浆液,分别使用亚硝酸盐法、硫代巴比妥酸比色法、荧光法检测脑组织内 SOD, MDA, LPF 活性。

2.4 组织学检查 实验至第 7 周,取各组大鼠右大脑半球,置 10% 甲醛溶液固定,常规脱水、浸蜡、石蜡包埋、连续切片、HE 染色,随机选取切片,在光镜下对大脑皮层和海马区进行组织学观察。

2.5 统计学分析 各项数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,所有资料的统计分析均用 SPSS 16.0 软件包完成。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 对脑老化大鼠模型脑组织 SOD 活力, MDA, LPF 含量和游泳时间的影响 与正常对照组相比,愤怒模型组、*D*-gal 模型组、愤怒 + *D*-gal 模型组大脑 SOD 活性均明显降低 ($P < 0.01$), MDA, LPF 的含量均显著升高 ($P < 0.01$)。与正常对照组相比,愤怒模型组、*D*-gal 模型组、愤怒 + *D*-gal 模型组在 Morris 水迷宫游泳时间均明显延长 ($P < 0.05, P < 0.01$),

说明造模成功。与正常对照组相比,愤怒模型组、*D*-gal 模型组、愤怒 + *D*-gal 模型组空间学习行为差异显著 ($P < 0.05, P < 0.01$); 与 *D*-gal 模型组比较,愤怒 + *D*-gal 模型组空间学习行为显著降低 ($P < 0.05$), 见表 1。结果提示 *D*-gal、愤怒刺激均可引起机体脑部 SOD 活性, MDA 和 LPF 含量的改变。*D*-gal 可导致大鼠脑老化, 愤怒刺激也可引起脑老化, 同时采用愤怒 + *D*-gal 刺激可加速大鼠脑老化过程。

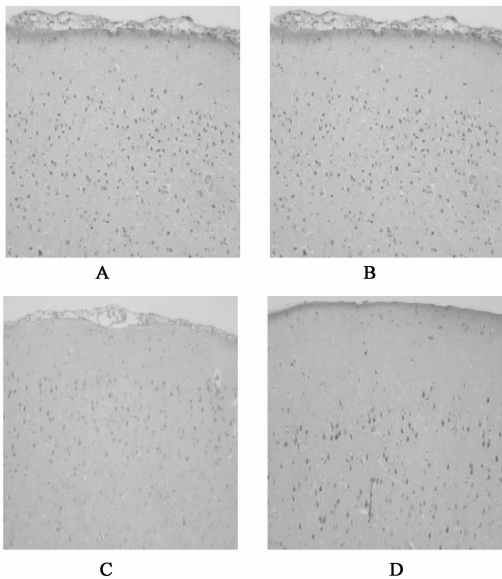
表 1 对脑老化模型大鼠脑组织 SOD 活性, MDA, LPF 含量、游泳时间的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	SOD/ $U \cdot mL^{-1}$	MDA/ $nmol \cdot mg^{-1}$	LPF/ $\mu g \cdot g^{-1}$	SPL/s
正常对照	78.67 ± 2.09	27.27 ± 1.74	21.70 ± 3.27	8.07 ± 2.28
愤怒模型	73.91 ± 1.62 ²⁾	46.29 ± 2.31 ²⁾	30.75 ± 5.66 ²⁾	15.09 ± 7.02 ¹⁾
<i>D</i> -gal 模型	74.23 ± 2.45 ²⁾	48.57 ± 3.81 ²⁾	31.37 ± 4.75 ²⁾	16.29 ± 6.03 ¹⁾
愤怒 + <i>D</i> -gal 模型	63.78 ± 3.04 ^{2,4)}	80.69 ± 5.36 ^{2,4)}	57.63 ± 3.79 ^{2,4)}	23.22 ± 9.46 ^{2,3)}

注: 与正常对照组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与 *D*-gal 模型组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ 。

3.2 对脑组织病理学的影响 光镜下可见正常对照组大鼠大脑皮质髓质分界清晰, 神经细胞形态正常; 愤怒模型组大脑皮质区中部分神经细胞轻度萎缩, 神经细胞周围有空泡形成; *D*-gal 模型组中大脑皮质层变薄, 其中以颗粒层、锥体细胞层萎缩较为明显, 正常神经细胞数量明显减少, 部分神经细胞周围可见空泡形成; 愤怒 + *D*-gal 模型组可见大脑皮质层明显变薄, 以颗粒层、锥体细胞层萎缩最为明显, 正常神经细胞数量大量减少, 神经胶质细胞轻度增生, 皮质血管数量减少。见图 1。

楚, 核仁明显; 愤怒模型组中海马 CA1 区神经细胞排列尚紧密、整齐; *D*-gal 模型组中海马 CA1 区神经细胞排列尚整齐, 细胞轻度减少; 愤怒 + *D*-gal 模型组大鼠海马 CA1 区病变显著, 光镜下可见神经细胞排列较为松散, 细胞结构模糊, 胞体肿胀, 部分细胞核固缩、深染。由此可见, 愤怒 + *D*-gal 模型组中大脑皮质区和海马 CA1 区的病理变化最显著, 见图 2。



A. 正常对照组; B. 愤怒模型组;

C. *D*-gal 模型组; D. 愤怒 + *D*-gal 模型组 (图 2 同)

图 1 各组大鼠脑组织染色 (HE, $\times 200$)

各组大鼠海马 CA1 区光镜下可见, 正常对照组中神经细胞排列紧密、均匀、整齐, 细胞丰富, 核膜清

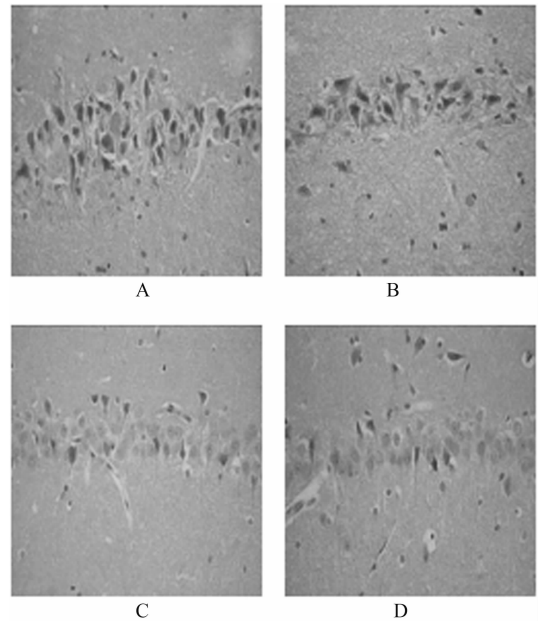


图 2 各组大鼠海马 CA1 区组织染色 (HE, $\times 400$)

4 讨论

中医学认为人的精神活动以五脏精气为物质基础, “人有五脏化五气, 以生喜怒悲忧恐” (《素问·阴阳应象大论篇》)。七情正常则五脏气血和利, 精气充沛, 功能正常。七情太过则会使脏腑气机升降失常, 气、血、精、津运行逆乱受阻, 从而使五脏功能异

常,加速衰老进程,本研究便是基于以上中医理论,探讨愤怒对脑衰老过程的影响的病因、病理、分子生物学机制。

Morris 水迷宫实验是检测大鼠认知水平的重要方法,大鼠经过训练后,学会寻找固定位置的隐蔽平台,形成稳定的空间位置认知记忆,其储存机制主要涉及边缘系统大脑皮层相关脑区,其中海马是认知记忆的关键部位,参与应激过程下丘脑-垂体-肾上腺(hypothalamic pituitary adrenal, HPA)轴的抑制性调节,促进应激状态下亢进的 HPA 轴恢复到基础水平,而且它不仅是 HPA 轴应激反应的高位调节中枢,更是受应激累及的最为敏感区域^[3]。在 Morris 水迷宫测试中,随训练时间的延长,大鼠寻台时间缩短,与正常对照组相比,愤怒 + *D-gal* 模型组寻台时间显著增加,提示愤怒可以导致海马神经细胞受损,使认知记忆能力下降,从病因学方面揭示了愤怒加快大脑老化的病理机制。

自由基是一类非常活跃的化学物质,其中最重要的是氧自由基,它可聚集体表、心脏、血管、肝脏和脑细胞中。如果沉积在脑细胞时,会引起老年人神经官能不全,导致记忆、智力障碍以及抑郁症,甚至老年性痴呆等,是造成人类衰老和疾病的元凶^[4]。衰老的自由基理论是 Dr. Harman 于 1955 年在美国的原子能委员会提出的,衰老是由于自由基对细胞成分的有害进攻造成的,这里所说的自由基,主要就是氧自由基,维持体内适当水平的抗氧化剂和自由基清除剂可以延长寿命和推迟衰老^[5]。SOD 是体内天然存在的超氧自由基清除因子,但是随着年龄的增长和某些体外因素会造成机体和脑组织自由基产生超过机体正常清除自由基的能力,从而使机体组织造成伤害,导致衰老。

MDA 是多不饱和脂肪酸过氧化物的降解产物,机体内 MDA 水平升高会引起蛋白质、核酸等生命大分子的交联聚合,且具有细胞毒性。形成黄褐色的色素颗粒。神经细胞中出现时可导致神经退行性变化。所以,测定 MDA 的量常常可反映机体内脂质过氧化的程度,间接反映出细胞损伤的程度。

LPF 是指细胞胞浆内出现的一种棕褐色色素颗粒,它是细胞器碎片中不饱和脂肪过氧化的产物。一旦聚集过多便影响脏器功能,使人渐渐衰老。出现在脑细胞上,便会引起智力和记忆力的减退;聚集在血管壁,则会发生血管纤维性病变,引起高血压、动脉硬化、心脏病。脂褐素沉积在人体各组织器官细胞中,导致细胞代谢减缓,活性下降,从而造成人

体器官功能衰退表现为衰老。

所以,选择测量 SOD 活性,MDA 和 LPF 的含量可以反映出机体的抗氧化能力,是公认评价衰老的生化指标^[6]。在本次实验中,愤怒 + *D-gal* 模型组 SOD 活性显著降低,MDA 和 LPF 含量显著升高,从氧化自由基水平的基础上证实了愤怒加重脑老化损伤的程度。

此外,对模型大鼠皮质区和海马组织学研究结果显示,与其余各组相比,愤怒 + *D-gal* 模型组出现了明显的皮质变薄、颗粒层、锥体细胞层萎缩,神经细胞被非神经细胞所替代的病变;同时,海马 CA1 区神经细胞排列紊乱,细胞结构模糊,胞体肿胀,胞核染色变浅等典型的病理改变。这些变化从病理学水平揭示了愤怒病因刺激加快了脑老化的速度。

脑为髓海,元神之府。其神明作用有赖于全身气机的通调。而气机的通调依赖于肝疏泄功能正常。肝又调畅情志,因而情志不畅,愤愤不平,必然影响全身气机的通调,伤及脏腑,脑失濡养,从而加速大脑老化。

我们的实验研究从认知能力、机体抗氧化能力以及脑细胞病变的水平上揭示出,愤怒情志长期积累和 *D-gal* 长期刺激均可造成机体认知能力的下降、体内自由基产生过多,甚至造成脑组织病变。反复愤怒刺激可加快 *D-gal* 大鼠的脑老化的进程,加重脑组织的病变:使脑组织 SOD 活性下降,脑组织 MDA,LPF 含量升高,导致脑组织中过氧化损伤与抗氧化系统之间的平衡失调;从而影响脑的功能活动;使大脑皮质和海马神经元结构出现拟老化改变。由此可见,舒缓情志,调养生机,是延缓衰老特别脑老化的一项重要措施。

[参考文献]

- [1] 詹向红,李伟,赵君玫,等. 慢性愤怒应激对大鼠衰老进程及其神经内分泌免疫机制的影响[J]. 中华中医药杂志,2010,25(1):111.
- [2] 王威,李崧,董会萍,等. 不同剂量 *D*-半乳糖致昆明小鼠脑老化模型实验的研究[J]. 中国老年学杂志,2009,29(3):260.
- [3] 陈淑媛,贺薇,石玉秀. 海马-HPA 轴-PTSD 的相关性[J]. 中外医疗,2010,25:187.
- [4] 刘磊,刘金钢. 氧自由基在胆管癌形成过程中的作用[J]. 解剖科学进展,2011,17(6):590.
- [5] 赵保路. 自由基、营养、天然抗氧化剂与衰老[J]. 生物物理学报,2010,26(1):26.
- [6] 栾增强,曹文富. 抗氧化延缓衰老中药研究进展[J]. 广东医学,2011,32(5):668.

[责任编辑 聂淑琴]