

铅暴露对大鼠学习和记忆的影响

杨新华¹, 周萍², 李勇辉*

(1.湖南农业大学心理健康教育中心, 湖南 长沙 410128; 2 湖南师范大学教育科学学院, 湖南 长沙 410081)

【摘要】 目的: 研究低水平铅暴露对大鼠学习和记忆的影响。方法: 0.05%水平醋酸铅污染大鼠饮用水 28 天, 用 Morris 水迷宫试验测定大鼠的学习记忆功能。结果: 在定位导航任务两组之间没有差异 ($P>0.05$); 在探索试验和工作记忆任务中, 铅暴露组和正常对照组大鼠成绩显著差异 ($P<0.01$)。结论: 铅暴露对大鼠空间参考记忆和工作记忆有明显损害作用, 对空间学习未见明显影响。

【关键词】 铅暴露; morris 水迷宫; 参考记忆; 工作记忆

中图分类号: R395.1 文献标识码: A 文章编号: 1005-3611(2007)01-0088-04

Effect of Lead Exposure on Reference Memory and Working Memory in Rats

YANG Xin-hua, ZHOU ping, LI Yong-hui

Mental Health Education Center, Hunan Agriculture University, Changsha 410128, China

【Abstract】 Objective: To develop a animal model of Pb-induced cognitive deficits for helping to further study of the underlying neural mechanisms after lead intoxication. Methods: An experiment was designed to investigate the effects of chronic low level lead exposure (0.05% of lead acetate to pollute their drinking water for 28 days) on the spatial learning and memory of rats by Morris water maze. Results: The results revealed low level Pb exposure significantly impaired spatial reference memory and spatial working memory of rats, but did not affect their spatial learning. Conclusion: The behavioral results revealed that lead intoxication does not affect the acquisition of a water maze task. However, there is a deficit in reference memory and working memory performance.

【Key words】 Lead; Spatial learning; Reference memory; Working memory

铅暴露是全球普遍关注的公共健康问题^[1-4]。许多实验研究证实出生前铅暴露引起婴儿期、幼儿期、儿童期、成年期持续性的认知功能和行为改变^[5-10]。尽管有许多人设法解释引起这些改变的原因, 如脑区的结构, 神经递质系统等, 但很难有一个统一的原因来解释铅毒性的多样性。因为许多研究都缺乏一致性, 大多数结果很难进行比较, 甚至有些结果相互矛盾, 如铅暴露对运动能力的影响, 有报道认为导致动物活动过度, 也有报道证明活动减少, 还有实验表明对其没有影响。从文献中可知铅暴露对人体的影响依靠不同的因素, 如铅暴露的水平、时程、摄入铅的方式(母乳、食物和水)、动物的种类和不同的年龄阶段。因此, 一致性的实验条件对不同研究的比较是非常重要的。在本实验中我们通过污染动物的饮用水使其暴露在低水平(0.05%)铅环境下 28 天, 观察是否会影响大鼠在 Morris 水迷宫任务中空间学习和记忆成绩。

1 材料与方法

1.1 实验动物

雄性 SD 大鼠 16 只, 初始体重 405-500g(2 月

龄), 动物在 25 cm × 22.5 cm × 30 cm 的不锈钢笼中群居饲养, 自由饮水、进食。光周期为 7:00-19:00, 实验在光周期完成(9:00-18:00); 实验室温度控制在 20-24℃, 相对湿度为 40-70%。整个实验在中科院心理研究所动物房内进行。

适应性饲养 5 天后动物随机分成两组, 每组 8 只, 正常对照组饮用蒸馏水; 铅暴露组动物饮用 0.05%的醋酸铅水溶液; 染毒 28 天后进行行为测试; 每周测动物体重。

1.2 实验装置

水迷宫由灰色圆柱形水池和一可移动位置和调节高度的透明有机玻璃站台组成。水池直径 180cm, 高 50cm, 池壁由灰色金属板组成。池内水深 30cm, 用一加热器使水温保持在 20 ± 2℃, 实验前用墨汁把水染成黑色, 以保证站台不可见。水池放在实验房间的中央, 左边墙壁上悬挂一壁画, 室内的门、窗、日光灯、电脑、摄像头, 电线等构成远距离线索。站台由透明的有机玻璃做成, 圆形, 直径 10cm, 高 28cm, 高度依不同的实验要求来定, 没于水下 2cm, 上面有划痕以提供动物容易站稳的表面。自动记录系统包括房顶的摄像头, 电脑。

1.3 Morris 水迷宫训练程序

* 中科院心理研究所

整个行为程序分为位置导航任务、探索任务、工作记忆任务和提示导航任务。在实验开始之前一个星期,每天将每个实验动物抓摸5分钟,以减少和消除动物被抓时产生的恐惧。

1.3.1 位置导航任务 具体的程序和方法参照以前的文献^[11],实验开始时,把站台放在东北象限的中间,并使其比水面低2cm,这样动物就无法看见它,东南西北四个入水点的次序先排好(伪随机方式),每个动物每天训练四次,保证四个入水点各有一次,实验操作时让大鼠头部对着池壁(但不接触池壁)轻轻放入水中,记录其逃避潜伏期和游泳路径,把从动物入水,找到站台至四肢全部爬上站台所需的时间作为逃避潜伏期。动物爬上站台后让其停留10秒钟,若动物在60秒未能找到并爬上站台,则人为的把它置于站台上停留10秒,并记录其潜伏期为60秒。随后,把动物从站台拿走,休息30秒,再进行下一次训练。实验组别和实验动物的顺序每天随机选择。此阶段在对照组找到站台<15秒后停止。

1.3.2 空间探索任务 位置导航实验结束后的第8天进行,把站台从水池中拿走,动物从南(距原站台位置最远象限)入水点入水,让大鼠在水迷宫内自由游泳120秒,记录其到达原来站台区域的时间、游泳路径及游泳速度(总距离/时间)。其目的是检测动物的空间参考记忆。

1.3.3 提示导航任务 探索实验结束后把站台置于西北象限的中间,站台上红色标志,并使其高出水面2cm,让大鼠能看到站台,四个入水点各做一次,每个动物四次训练,记录逃避潜伏期,把四次的潜伏期平均作为一次成绩。其目的是为了检测动物的运动能力,视觉,动机是否对实验结果有影响。

1.3.4 工作记忆任务 与定位导航任务不同的是在每个任务之间站台的位置不断的改变。即每天每个任务改变站台所在的象限及其水池边缘的距离(20cm, 30cm, 40cm, 50cm)。在每个任务(session)中每一只大鼠做两个训练(trail),训练1与位置导航实验相同,站台上停留10秒后立即进行训练2,让大鼠仍从训练1的入水位置放入,找相同的站台位置。休息15秒后再做下一个任务,站台的位置和入水点在每个任务之间都改变,保证大鼠能在每个方向的入水点都做到,但任务内部入水点和站台的位置是不变的。每个任务有两个训练,共4个任务,8个训练,第9次训练把站台拿走,观察动物在60秒内在各象限停留的时间,四个训练1和训练2的逃避潜伏期进行平均做为一次成绩。此阶段在对照组找到

站台<15秒后停止。

1.4 血铅浓度的测定

具体的方法参考以前文献^[12],将冷冻的待测血样于室温融化,混匀后取50.0ul加入含有50.0ul tritonox-100和400.0ul双蒸水的样品杯中,混匀后用石墨炉原子吸收分光光度计(美国PE公司)进行测定,测定过程中基体改进剂为25.0g/l的磷酸氢二胺,测定条件为波长283.3nm,狭缝宽度0.5nm,灯电流5.0mA。此过程由北京大学医学部分子检测中心完成。

2 结 果

2.1 位置导航任务

两组动物逃避潜伏期见表1,多因素重复测量方差分析(组别×训练日)表明两组在训练日之间有显著差异($P < 0.05$),提示两组动物随着训练的次数增加都学会了寻找站台,但两组之间成绩差异不显著 $[F(1,1)=0.579, P=0.459]$ 。

表1 定位航行任务中动物平均潜伏期($\bar{x} \pm s$)

	第一天	第二天	第三天	第四天
正常对照组	38.75 ± 4.47	22.28 ± 6.25	18.63 ± 6.11	13.38 ± 4.69
铅暴露组	37.13 ± 4.28	28.41 ± 3.58	14.78 ± 4.40	16.97 ± 3.41

2.2 空间探索任务

在探索任务中,记录动物第一次到达原站台位置的时间(正常对照组 19.4 ± 9.6 ; 铅暴露组 34.63 ± 6.99)。两组动物差异显著 $[F(1,1)=4.587, P=0.048]$ 。正常对照组和铅暴露组平均游泳速度分别是 $30.45 \pm 2; 29.11 \pm 1.50$,单因素方差分析组间无显著差异 $[F(1,1)=1.528, P=0.237]$ 。

2.3 提示导航任务

两组动物在第一个训练(trail)中入水后首先向水池中央游动,后四处搜索站台,一旦碰见站台马上爬上。接下来的第二,三,四各训练中,动物直接游向站台,迂回很少,未见刻板的游泳偏向,两组动物都能在短时间内(正常对照组 19.63 ± 1.35 ; 铅暴露组 20.16 ± 1.91)找到站台,单因素方差分析表明两组之间无显著差异 $[F(1,1)=0.129, P=0.725]$ 。

2.4 工作记忆任务

2.4.1 逃避潜伏期 动物在训练-1(trail one)和训练-2(trail two)的逃避潜伏期见表2,因在每个任务之间站台的位置和入水点不断的改变,两组动物在训练-1中的成绩是随机变动的,多因素重复测量方差分析(组间×训练日)结果表明四天的训练中组间无差异 $(F(1,1)=0.007, P=0.935)$,而在训练-2中两

组的逃避潜伏期明显的减少($P=0.028$), 两组之间没

有显著差异 $[F(1,5)=0.089, P=0.361]$ 。

表 2 工作记忆任务两组动物平均成绩($\bar{x}\pm s$)

	训练-1				训练-2			
	第一天	第二天	第三天	第四天	第一天	第二天	第三天	第四天
正常对照组	47.53±4.30	39.68±6.44	39.71±6.67	38.26±5.83	29.34±5.61	21.93±3.66	23±4.69	21.12±5.23
铅暴露组	48.68±5.77	39.15±6.13	43.81±5.82	39.33±5.64	30.65±4.68	27.46±6.29	23.43±3.77	21.68±4.81

2.4.2 工作记忆探索任务 工作记忆探索任务的结果两组之间的主效应不显著 ($F(1,1)=1.869, P=0.193$), 但在第四天铅暴露组和正常对照组之间差异极其显著 ($P<0.01$), 见表 3。进一步分析第四天铅暴露组和正常对照组动物在各象限停留的时间, 铅暴露在第四个任务(session)中的站台象限(象限 1)停留的时间 33.54%显著长于其它三象限(26.04%, 22.29%, 18.13%)。正常对照组在象限 1 的停留时间(17.08%)明显短于其它三个象限(28.95%, 32.96%, 20.97%)。

表 3 工作记忆探索任务中两组动物原象限停留时间(%)

	原目标象限停留时间			
	第一天	第二天	第三天	第四天
正常对照组	34.17	29.38	24.34	17.08
铅暴露组	31.88	24.17	29.56	33.54**

注:** $P<0.01$

2.5 体重和血铅的比较

两组动物的体重见表 4, 两组动物在实验期间体重(g)增加, 但多因素重复测量方差分析(组别 \times 时间)表明组间没有差异 $[F(1,1)=0.05, P=0.943]$ 。0.05%水平的铅暴露 28 天可导致成年动物血铅水平显著的升高, 铅暴露组 29.72ng/ml, 正常对照组 5.86ng/ml, t 检验表明两组之间极显著($P<0.01$)。

表 4 两组动物体重($\bar{x}\pm s$)

组别	初体重	第一星期	第二星期	第三星期	第四星期
铅暴露组	432.14±13.11	441.57±14.28	462.14±15.66	468.57±15.46	504.00±17.85
正常对照组	455.75±7.00	465.75±8.85	486.38±9.42	495.88±9.22	513.75±8.45

3 讨 论

本实验发现低水平铅暴露 28 天可使动物血铅浓度显著增高, Morris 水迷宫行为结果表明慢性低水平铅暴露可损害大鼠空间参考记忆和空间工作记忆, 对空间学习无明显影响。

在定位导航任务中, 随着训练次数的增加, 动物游泳路径越来越直, 潜伏期也越来越短, 因此是一种学习和记忆过程; 而在探索任务中, 动物下水后直接游向原站台象限, 然后在象限及周围游动, 这显然是一种记忆现象。在七天后的探索任务中, 铅暴露组

动物到达原站台区域的潜伏期明显延长, 这一结果不可能是因为两组之间的学习程度不同造成的。因为在定位航行任务最后一次训练中, 铅暴露组和正常组动物一样在 15 秒左右找到站台, 也就是说, 两组动物的学习程度是一致的, 而间隔 7 天后, 铅暴露组动物却不能和其它组动物一样有效的到达站台区域, 这说明铅暴露对空间参考记忆造成了损害。

在工作记忆任务中我们发现了一个有趣的结果, 在四天的工作任务训练中, 铅暴露组动物和正常组的成绩一样好, 随着训练的增加, 在训练-2 找到站台的时间也逐渐缩短, 一般来说, 训练-2 的成绩是衡量动物是否学会利用训练-1 中的线索和刺激来找站台, 是衡量工作记忆好坏的指标。实验中两组之间训练-2 的成绩无差异似乎表明铅暴露对空间工作记忆没有影响。但是, 在每天第九次探索任务中却可见到显著差异, 前两天的结果铅暴露组和正常组之间并没有差异, 两组动物入水后都游向第四个任务中的站台象限, 并且集中在这一象限搜寻。第三天正常对照组动物明显缩短在原站台象限的搜寻时间, 而是到其他三个象限寻找, 开始学会上次的信息只对随后一次新的条件下有用, 而不是在随后任务中一直有效, 只有到其它象限搜寻才有可能找到站台而逃避水难。所以减少了在原站台搜寻的时间, 而铅暴露组动物仍集中在原站台象限寻找。到了第四天, 这种差异更加显著, 正常对照组动物下水后不去原站台象限寻找或是直线式的游向原站台的区域如未找到, 马上去其它三个象限去寻找, 并且不会再返回原站台象限, 这说明动物已记住上次任务中的线索对下一次任务不再有用, 在新的任务中必须在其它象限寻找才能找到站台, 表现为良好的工作记忆。而铅暴露组动物却仍在原站台象限寻找并且停留时间增长, 这说明该组动物能完成工作记忆任务(找到变动的站台), 但却不能运用上次训练的线索只在本次任务中有用, 而在随后任务中必须找新的线索和信息这一规律。那么, 为什么训练-2 和探索任务的成绩会出现分离现象? 我们认为探索任务要比训练-2 更敏感, 因为探索任务中没有站台, 相当于每天对大鼠的成绩进行测试, 反应的是动物经过四个

任务训练后所获得的信息以及对这些信息的记忆,而训练-2只衡量了单个任务的的学习和记忆。Markowska^[13]等人在试验中也发现了这种现象,在定位导航任务中他们让动物每天训练结束后都加做探索任务,结果发现获得了一条特别好的学习曲线,他们认为这条曲线很好地说明了动物空间记忆动态形成的过程。因此得出结论:每天探索任务成绩是检测空间记忆一个极好的指标。因此,本实验中有理由相信铅暴露损害了动物的工作记忆。

参 考 文 献

- 1 Finkelstein Y, Markowitz ME, Rosen JF. Low-level lead-induced neurotoxicity in children: an update on central nervous system effects. *Brain Res Brain Res Rev*, 1998, 27: 168-176
- 2 Dykeman R, Aguilar-Madrid G, Smith Hernandez- Avila M. Lead exposure in Mexican radiator repair workers. *Am. J Ind. Med*, 2002, 41: 179-187
- 3 Gasana J, Chamorro A. Environmental lead contamination in Miami inner-city area. *J Expo Anal Environ Epidemiol*, 2002, 12: 265-272
- 4 Landrigan PJ, Schechter CB, Lipton JM, et al. Environmental pollutants and disease in American children: Estimates of morbidity, mortality, and costs for lead poisoning, asthma, cancer, and developmental disabilities. *Environ. Health Perspect*, 2002, 110: 721-728
- 5 Cory-Slechta DA, Pokora MJ, Widzowski DV. Postnatal lead exposure induces supersensitivity to the stimulus properties of a D2- D3 agonist. *Brain Res*, 1992, 598: 162-172
- 6 Ma T, Chen HH, Ho IK. Effects of chronic lead (Pb) exposure on neurobehavioral function and dopaminergic neurotransmitter receptors in rats. *Toxicol Lett*, 1999, 105: 111-121
- 7 Rice DC. Behavioral effects of lead: commonalities between experimental and epidemiologic data. *Environ Health Perspect*, 1996, 104(2): 337-351
- 8 Rodrigues AL, Rocha JBT, Mello CF, et al. Effect of perinatal lead exposure on rat behavior in open-field and two-way avoidance tasks. *Pharmacol Toxicol*, 1996, 79: 150-156
- 9 Alber SA, Strupp BJ. An in-depth analysis of lead effects in a delayed spatial alternation task: Assessment of mnemonic effects side bias, and proactive interference. *Neurotoxicol Teratol*, 1996, 18(1): 3-15
- 10 Cohn J, Cory-Slechta DA. Subsensitivity of lead-exposed rats to the accuracy-impairing and rate-altering effects of MK-801 on a multiple schedule of repeated learning and performance. *Brain Res*, 1993, 600(2): 208-218
- 11 Nerad L, Ramirez A, Ormsby CE, et al. Differential effects of anterior and posterior insular cortex lesions on the acquisition of conditioned taste aversion and spatial learning. *Neurobiol Learn Mem*, 1996, 66: 44-50
- 12 Hernandez A, Romieu I, Rios C, et al. Lead-glazed ceramics as major determinants of blood lead levels in Mexican women. *Environ Health Perspect*, 1991, 94: 117-20
- 13 Markowska A L, Long J M, Johnson C T, et al. Variable-interval probe test as a tool for repeated measurements of spatial memory in the water maze. *Behav Neurosci*, 1993, 107: 627-632

(收稿日期:2006-06-29)

(上接第98页)

- 22 Burger JM. 陈会昌译. 人格心理学. 北京: 中国轻工业出版社, 2004
- 23 Larson R. The emergence of solitude as a constructive domain of experience in early adolescence. *Child Development*, 1997, 68: 80-93
- 24 Burger JM. Individual differences in preference for solitude. *Journal of Research in Personality*, 1995, 29: 85-108
- 25 Andre R. Positive solitude: A practical program for mastering loneliness and achieving self-fulfillment. New York: HarperCollins, 1991
- 26 Dornic S, Ekehammar B. Extraversion, neuroticism, and noise sensitivity. *Personality and Individual Differences*, 1990, 11: 989-992
- 27 Asendorpf JB. Abnormal shyness in children. *Journal of Child Psychology and Psychiatry*, 1993, 34: 1069-1081
- 28 Warren H, Bruce N, Diana Q. Personality and Interpersonal Predictors of Loneliness in Two Cultures. *Journal of Personality and Social Psychology*, 1985, 48: 1503-1511
- 29 Ami R, Hasan B, Gina R. Coping with Loneliness: A Cross-Cultural Comparison. *European Psychologist*, 2000, 5: 302-311
- 30 Schneider KJ. Toward a science of the heart: Romanticism and the revival of psychology. *American Psychologist*, 1998, 53: 277-289
- 31 Kraut R, Patterson M, Lundmark B, et al. Internet paradox: A social technology that reduces social involvement and psychological well-being? *American Psychologist*, 1998, 53: 1017-1031
- 32 Mango A. Turkey: The challenge of a new role. Westport, CN: Praeger Publishers and the Center for Strategies and International Studies, Washington, DC, 1994

(收稿日期:2006-07-18)