

帕金森病模型大鼠空间学习记忆障碍与 SGK 表达水平的关系

王小川 张家兴 杨波 鲍远程

【摘要】 目的 观察 6-羟基多巴胺致帕金森病(PD)大鼠空间学习记忆能力变化及可能的发生机制。方法 6-羟基多巴胺双侧黑质致密部注射 4 周后进行 Morris 水迷宫测试;免疫荧光检测海马和前额叶皮质内血清糖皮质激素调节蛋白激酶(SGK)表达。结果 PD 大鼠在第 1 天水迷宫训练中潜伏期较假手术组($P < 0.05$)和正常组($P < 0.05$)显著延长。在探测实验中 PD 大鼠穿台次数[(6.08 ± 1.88)次],较假手术组[(8.33 ± 0.82)次]和正常组[(9.43 ± 2.57)次]显著减少,同时 PD 大鼠在站台周围游泳路程占总路程的百分比比正常组明显减少。PD 大鼠海马 CA1、CA3 和前额叶皮质内 SGK 表达较对照组、假手术组显著减少。结论 PD 大鼠存在空间学习记忆障碍,SGK 可能参与了大鼠空间记忆障碍的发生机制。

【关键词】 帕金森病; 学习记忆; 血清糖皮质激素调节蛋白激酶

The impaired learning and memory in rats of Parkinson's disease regulated by the serum and glucocorticoid-inducible kinase WANG Xiao-chuan, ZHANG Jia-xing, YANG Bo, et al. Department of Neurology, The Second People Hospital of Hangzhou, Hangzhou 310015, China

【Abstract】 Objective To assess the spatial cognitive ability of Parkinson's disease(PD) rats, using 6-hydroxydopamine administrated in the brain, and further explore the mechanism revolved in the performance. **Methods** The PD rats' learning and memory abilities in the Morris water maze were observed four weeks after 6-hydroxydopamine injected into the compact of Substantia Nigra bilaterally. Immunofluorescence technology was used to detect the ser/glucocorticoid-inducible kinase(SGK) in the hippocampus and prefrontal cortex. **Results** PD rats spent more time in finding the immersed platform in MWM task in the first training day than sham group ($P = 0.031$) and control group ($P = 0.019$). In the probe test, the numbers of PD rats crossing the former platform (6.08 ± 1.88) were significantly less than sham group (8.33 ± 0.82) and control group (9.43 ± 2.57) and the distance of rats swimming around the platform and total distance were significantly decreased compared with that of control group. Meanwhile, the expression of SGK in CA1 and CA3 of hippocampus and prefrontal cortex significantly decreased. **Conclusion** PD rats present a deficit in spatial learning and memory in water maze, and the decreased expression of SGK in the hippocampus and prefrontal cortex may be involved in the behaviors.

【Key words】 Parkinson's disease; Learning and memory; Ser/glucocorticoid-inducible kinase

近年来研究表明帕金森病(PD)患者有逐渐进展的认知功能下降,这种下降甚至在 PD 患者早期就出现^[1,2]。血清糖皮质激素调节蛋白激酶(SGK)是 Ser/Thr 蛋白激酶家族新成员,参与多种信号传导途径。新近研究发现 SGK 参与神经轴突的复性作用^[3],并对空间学习记忆的巩固有明显的易化作用^[4]。本实验采用 6-羟基多巴胺(6-OHDA)大鼠双侧黑质致密部(SNc)注射造 PD 模型,观察 PD 大鼠在水迷宫中的学习和记忆能力改变,并探讨 SGK 是否参与 PD 大鼠的学习记忆功能的下降。

材料与方法

一、动物及分组

雄性 Waster 大鼠 80 只(购于浙江省医学科学院)随机分为模型组 40 只,正常组 20 只,假手术组 20 只。

基金项目:中国博士后科学基金资助项目(20060390129)

作者单位:310015 杭州,杭州市第二人民医院神经内科(王小川);中国科学院心理研究所脑高级功能实验室(张家兴);安徽中医学附院神经内科(杨波、鲍远程)

体质量(200 ± 20)g,放置于饲养房内,温度控制在(23 ± 1) $^{\circ}\text{C}$,自由摄取食物和饮水。

二、PD 动物模型方法

大鼠经 1% 戊巴比妥(40 mg/kg ,皮下注射)麻醉后,参照图谱^[5],在立体定位仪下(前囟后 5.0 mm,中缝旁开 2.1 mm,硬膜下 7.7 mm)双侧 SNc 内注射 6-OHDA $6 \mu\text{g}$ (SIGMA 公司,溶于 $4 \mu\text{l}$ 含质量分数为 0.2% 抗坏血酸的生理盐水中, $0.40 \mu\text{l}/\text{min}$),注毕留针 10 min。假手术组注射 $4 \mu\text{l}$ 生理盐水。术后大鼠放置于饲养房内。

三、Morris 水迷宫测试

Morris 水迷宫为内面漆成黑色的铁制圆形水池,直径 1 m,水深 0.5 m。水中加入黑墨水,并使水温控制在(22 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 。一直径为 10 cm 的站台低于水面 1 cm 放在水池。实验时,水池放置隔音室内。室内设置的参照物有:一实验人员,门和日光灯。大鼠的游泳通过摄像头捕获进入计算机保存。训练的前一天让大鼠在水迷宫中适应 2 min。训练时,大鼠找到水下站台后,让其在站台上停留 15 s。如大鼠在 90 s 未找到站

台,由实验者引导到站台上。连续训练 4 d,每天 3 次,间隔 1 h。3 次不同象限(站台所在象限除外)把大鼠放入水迷宫中。第 5 天撤去站台后进行 90 s 的探测实验。大鼠在训练时找到站台所用的时间(潜伏期)、游泳速度及探测实验中大鼠穿过先前站台所在位置的次数和在站台周围游泳路程及总路程通过 DigBehv-MWM 软件分析(上海吉量生物软件公司)。

四、SGK 免疫测定和 DA 的测定

1. 尼氏染色:行为学测试 24 h 后,大鼠断头处死,快速取脑。全部一侧半脑经恒冷切片机切片(片厚 20 μm)后用于尼氏染色、免疫组织化学和免疫荧光检测,另一侧半脑用于 HPLC 分析。

2. 免疫组织化学检测:0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS)(含 0.3% H₂O₂,1% 牛血清白蛋白,20% 正常羊血清)室温下孵育 30 min 后,加入 0.01 mol/L PBS(含 0.3% Triton X-100,1% 牛血清白蛋白)稀释的兔抗大鼠酪氨酸羟化酶(TH)抗体(1:200),4℃ 过夜;PBS 冲洗后加入碱性磷酸酶标记的二抗,室温下孵育 2 h;BCIP/NBT 显色 20 min;依次脱水、透明、封片。

3. 免疫荧光检测:0.01 mol/L PBS(含 0.3% Triton-100,1% 牛血清白蛋白)稀释的 SGK 抗体(兔抗小鼠,1:1000,美国 Upstate 公司),4℃ 过夜;再经 PBS 冲洗后加入 0.01 mol/L PBS(含 0.2% 叠氮钠和 1% 牛血清白蛋白)稀释的罗丹明标记羊抗兔二抗(1:100),室温下孵育 1 h;PBS 冲洗;甘油封片,荧光显微镜(激发光波长为 488 nm)下摄片。

4. 高效液相色谱(HPLC)分析:全部大鼠另一侧半脑取出纹状体称湿重后,加入 5% 冰高氯酸(1 ml/0.1 g 湿脑组织)冰浴匀浆。13000 r/min,4℃ 离心 30 min,取上清进行多巴胺(DA)含量分析。

五、统计学方法

所有数据都用 SPSS 10.0 双因素方差、单因素方差进行分析。

结 果

一、黑质区 TH 阳性神经元数目及纹状体 DA 含量结合尼氏染色和 TH 免疫阳性细胞数以及 DA 含量(<50% 对照组)结果判断,侧脑室注射 6-OHDA 21 d 后成功制备 PD 模型大鼠。见表 1。

表 1 黑质区 TH 反应阳性神经元数目(个/每张切片)及纹状体 DA 含量(n=21,湿组织 ng/g, $\bar{x} \pm s$)

组别	TH 阳性细胞	DA 含量
对照组	82.4 ± 21.6	3058.2 ± 360.2
假手术组	78.6 ± 15.7	2985.4 ± 356.3
PD 组	31.4 ± 10.6 ^{***}	1275.2 ± 207.3 ^{***}

注:与对照组比较^{**}P<0.01;与假手术组比较^{*}P<0.05,^{###}P<0.01

二、水迷宫测试结果

PD 大鼠手术后 4 周进行行为学测试没有出现感觉运动迟钝紊乱表现,没有异常游泳姿势。训练的第

1 天后,各组大鼠寻找站台的潜伏期存在显著性差异 [$F_{(2,57)} = 4.329; P < 0.05$],PD 大鼠寻找站台的潜伏期[(46.62 ± 9.24) s]较正常组[(20.24 ± 8.60) s] ($P < 0.05$)明显延长,但在第 2,3,4 天各组之间没有差别(图 1)。各组大鼠在连续 4 d 的训练中,游泳速度没有显著差异。实验的第 5 天移走站台后进行探测实验。各组大鼠穿过先前站台位置的次数有显著性差异 [$F_{(2,57)} = 6.273; P < 0.05$],PD 大鼠穿台次数(图 2A)(6.08 ± 1.88)比正常对照组(9.43 ± 2.57)显著减少($P < 0.05$)。同时,PD 大鼠在原站台周围所走路程与总路程的百分比[(20.65 ± 1.78)%]也较正常对照组[(30.23 ± 3.46)%]明显减少($P < 0.05$)(图 2B)。

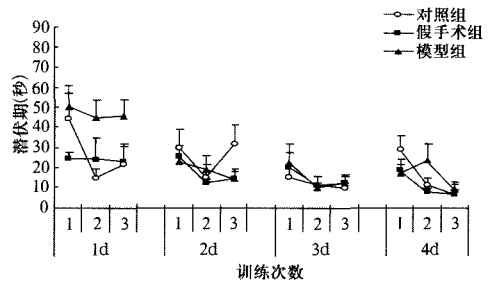
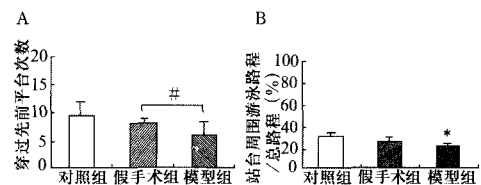


图 1 大鼠在第 1,2,3,4 天水迷宫训练中寻找站台的潜伏期($\bar{x} \pm s$)



与对照组比较,^{*}P<0.05;^{**}P<0.01;与假手术组比较,[#]P<0.05

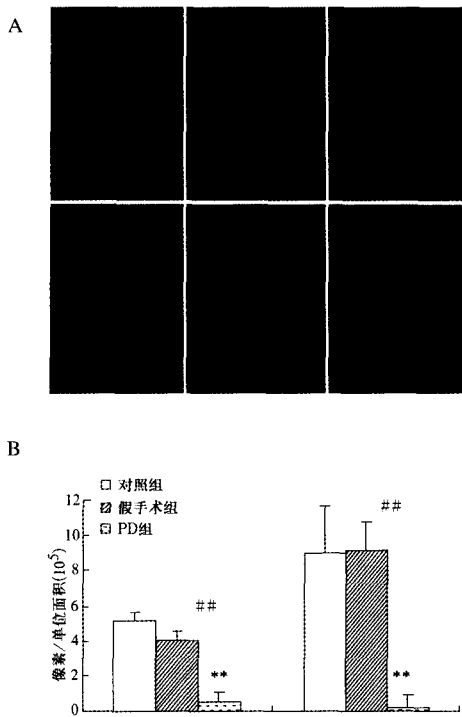
图 2 探测实验中大鼠在站台周围游泳路程/总路程(%)及穿过先前站台所在位置的次数

三、3 组 PD 大鼠海马 SGK 表达比较

在正常大鼠海马 CA1、CA3 区锥体细胞层可见 SGK 表达。但 SGK 在齿状回表达不明显(图 3A)。在 CA1 区,PD 模型大鼠海马内 SGK 表达(0.56 ± 0.43) × 10⁵ 像素/单位面积较对照组(5.67 ± 0.62) × 10⁵ 像素/单位面积 ($P < 0.01$)显著减少;在 CA3 区,PD 模型大鼠海马内 SGK 表达(0.28 ± 0.26) × 10⁵ 像素/单位面积也较对照组(9.21 ± 2.95) × 10⁵ 像素/单位面积 ($P < 0.01$)明显减少(图 3B)。皮层内,SGK 主要在内颗粒细胞层表达。PD 大鼠前额叶皮质内 SGK(3.30 ± 0.73) × 10⁵ 像素/单位面积表达较对照组(9.51 ± 1.63) × 10⁵ 像素/单位面积 ($P < 0.01$)明显减少(图 4)。

讨 论

本实验和以前作者的观察结果,提示黑质纹状体通路可能参与空间记忆的获得和巩固^[7]。黑质、纹状体通过丘脑与大脑皮质、海马的联系可能为其参与的

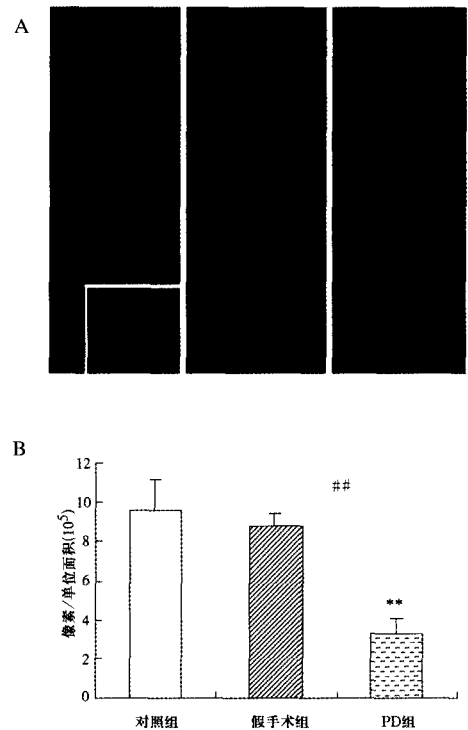


A.3 组大鼠海马 SGK 表达免疫荧光图。由左至右依次为：正常组、假手术组和 PD 组；由上而下依次为：CA1、CA3；
B.3 组大鼠海马 SGK 表达的统计直方图。

与对照组比较，** $P < 0.01$ ；与假手术组比较，## $P < 0.01$

图 3 3 组大鼠海马内 SGK 免疫荧光物质的表达 (x 200)

结构基础。本实验显示了双侧黑质内 6-OHDA 注射 PD 模型大鼠在水迷宫空间学习记忆能力降低。PD 大鼠在第 1 天的水迷宫训练中寻找站台的平均潜伏期比正常对照组和假手术组显著延长。但在随后连续 3d 的训练中，PD 大鼠获得与对照组大鼠相似的空间认知能力。本实验结果与对 MPTP 致 PD 大鼠在水迷宫学习的观察一致^[8]。本实验结果可能反映出在空间学习时，PD 大鼠掌握任务规则能力较差。在进行序列反应时任务测试时，Pascual-Leone 等^[9]和 Sommer 等^[10]发现，和正常人比较，帕金森病人反应时更长，因此需要多次训练才能掌握学习要领。Joosten 等^[11]发现 PD 病人在进行空间视觉“Shift task”学习任务时需要比正常人更多的训练才能得到解决问题的能力。Pascual-Leone 等^[9]认为上述学习能力障碍是由于帕金森病人储存视觉运动序列较慢的缘故。在探测实验中，当站台从水迷宫中被撤去后，PD 大鼠穿过先前站台次数和在站台周围游泳路程明显较对照组减少，表明 PD 大鼠对原站台所在位置记忆不牢固，存在显著的记忆障碍。Tsai 等^[4]在研究大鼠水迷宫学习记忆测试后发现，学习快的大鼠海马 CA1、CA3 和齿状回区 SGK 表达水平较学习慢的大鼠高达 4 倍多。证实了 SGK 特异性表达在记忆巩固中有着重要作用。SGK 是通过 AMPA 受体对空间学习记忆巩固产生易化作用^[4]。SGK 可直接与 CREB 结合并诱导 CREB 磷酸化。本实



A.3 组大鼠前额叶 SGK 表达免疫荧光图。由左至右依次为：正常组、假手术组和 PD 组。左图右下角为放大的 SGK 免疫反应阳性细胞 (x 2000)。

B.3 组大鼠前额叶 SGK 表达的统计直方图。

与对照组比较，** $P < 0.01$ ；与假手术组比较，## $P < 0.01$

图 4 3 组大鼠前额叶皮质内 SGK 免疫荧光物质的表达 (x 200)

验观察到，SGK 在 PD 模型大鼠海马 CA1、CA3 区及前额叶皮质内显著减少，而海马和前额叶皮质是空间学习记忆的重要结构，SGK 的减少可能减弱了 AMPA 受体诱导的 CREB 磷酸化，从而导致了 PD 大鼠空间记忆的损害。

参 考 文 献

- 程灶火, 王力. 老年痴呆、帕金森病和脑梗死患者的记忆损害特征. 中国行为医学科学, 2005, 14:610-612.
- 李玉梅, 刘琨, 王婷, 等. 不同类型帕金森病患者的记忆障碍及相关因素. 中国行为医学科学, 2005, 14:812-813.
- Lee EH, Hsu WL, Ma YL, et al. Enrichment enhance the expression of sgk, a glucocorticoid-induced gene, and facilitates spatial learning through glutamate AMPA receptor mediation. Eur Journal of Neurosci, 2003, 18:2842-2852.
- Tsai KJ, Chen SK, Ma YL, et al. SGK, a primary glucocorticoid-induced gene, facilitates memory consolidation of spatial learning in rats. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99:3990-3995.
- Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates (the second Ed.) San Diego: Academic Press, 1986.
- Zhang JX, Chen XQ, Du JZ, et al. Neonatal exposure to intermittent hypoxia enhances mice performance in water maze and 8-arm radial maze tasks. J Neurobiol, 2005, 65:72-84.
- Bellissimo MI, Kouzmine I, Ferro MM, et al. Is the unilateral lesion of the left substantia nigra pars compacta sufficient to induce working memory impairment in rat. Neurobiol Learn Mem, 2004, 82:150-158.
- Da Cunha C, Wietzikoski S, Wietzikoski EC, et al. Evidence for the substantia nigra pars compacta as an essential component of a memory

- system independent of the hippocampal memory system. *Neurobiol Learn Mem*, 2003, 79:236-242.
- 9 Pascual-Leone A, Grafman J, Clark K, et al. Procedural learning in Parkinson's disease and cerebellar degeneration. *Ann Neurol*, 1993, 34:594-602.
- 10 Sommer M, Grafman J, Clark K, et al. Learning in Parkinson's disease: eyeblink conditioning, declarative learning, and procedural learning. *J*

Neurol Neurosurg Psychiatry, 1999, 67:27-34.

- 11 Joosten JP, Coenders CJ, Eling P. Shifting behavior: an analysis of response patterns of Parkinson patients in discrimination learning. *Brain and Cognition*, 1995, 29:115-126.

(收稿日期:2006-10-06)

(本文编辑:冯学泉)

· 临床研究 ·

心理干预对电烧伤截肢患者抑郁焦虑情绪的影响

陈桂群 曾元临

随着医疗水平的提高,对大多数病人来说心理的障碍并不亚于躯体疾患,在就医过程中对情感的治疗并不亚于生理治疗^[1]。电烧伤导致截肢患者内心可有绝望、恐惧、自闭、抑郁、焦虑等多种复杂的心理反应。因此,了解和掌握此类人群的心理特点并运用适当的心理干预,对患者心理健康具有重要作用。

对象与方法

一、研究对象

电烧伤截肢患者 60 例,均为 2005 年 1 月至 2006 年 5 月在本院烧伤中心住院的电烧伤患者。患者因电烧伤致肢体成“缺血坏死型”^[2],被毁肢体被迫截肢。截肢范围:肢体远端的三分之一到肩关节(或髋关节)离断。60 例中,男 54 例,女 6 例。年龄 16~62 岁,平均年龄(27.20±1.35)岁。其中农民 27 例,工人 24 例,干部 4 例,学生 5 例。学历:专科及以上 8 例,中专(初中)36 例,小学 13 例,文盲 3 例。截肢原因:均为意外电击伤毁肢。治疗:消炎、止痛、换药等对症处理。

二、方法

按入院时间将 60 名患者从 1 始按自然数编号,单号入研究组(30 例),双号入对照组(30 例),2 组患者的性别、年龄、婚姻、职业、文化程度无显著性差异。均于截肢后第 1 周、第 3 周采用 Zung 抑郁自评量表(SDS)^[3],焦虑自评量表(SAS)^[4]调查评分。进行问卷测试时,要求患者独立填写。如填写有困难时,由相对固定的医务人员逐条解读,直至患者完全理解后,再让患者独立评定。同时强调你评定的是刚刚过去 1 周的心理状态。评分标准:将每卷总分,换算成标准分,先计算样本的均值和标准差。后行组内前后的比较和组间同时同种两样本均数比较,用 *t* 检验。

对照组给予常规一般护理(包括入院介绍、健康教育、疾病转归和各班护士非专程的心理疏导等)。研究组在截肢后第 1 周的调查评分后,在一般护理的基础上,有针对性的作心理干预,具体操作如下:1)每日 2 次安排有经验的专科护士,与患者交谈,每次 30~60 min,时间固定在上、下午下班前 1 h 左右。2)将历年同类患者取得成功的事例口述于患者,不涉及隐私时可告知电话,让其与类似患者直接沟通。3)用轮椅和家属一道送病人到康复病房参观义肢的安装和训练,使其实地感受。4)上网下载一些相关资料供其阅读,以提高患者自信心。5)了解患者伤前心理特征,实施个性化心理护理,因地制宜,使其快速从痛苦中解脱出来,积极应对现实。

结 果

研究组 SDS 得分,第 1 周(70.00±5.47)分、第 3 周(56.13±3.87)分,二者比较,差异具有显著性($t=8.57, P<0.01$),研究组 SAS 得分,第 1 周(54.93±4.41)分、第 3 周(49.73±4.77)分,二者比较差异具有显著性($t=5.17, P<0.01$)。对照组 SDS 得分,第 1 周(69.38±5.69)分、第 3 周(56.13±3.87)分,二者比较,差异具有显著性($t=6.12, P<0.01$),对照组 SAS 得分,第 1 周(54.30±4.69)分、第 3 周(49.73±4.77)分,二者比较差异具有显著性($t=3.13, P<0.01$)。第 1 周 SDS、SAS 得分,研究组与对照组间均差异无显著性;第 3 周研究组 SDS、SAS 得分均较对照组显著降低(t 值分别为 8.01, 3.06, 均 $P<0.01$)。

讨 论

电烧伤导致截肢是患者一生遭遇到的最痛苦的经历之一,其心理适应包含复杂的相互作用。而这相互作用是在患者伤前的心理特点、适应环境方面和烧伤本身的特点以及随后医疗两者之间发生的。本研究结果显示,电烧伤后截肢第 1 周的 SDS、SAS 标准分均值均高于一般人群^[5]。提示此类人群抑郁、焦虑、自责、绝望或自杀等负性情绪高于一般人群^[6],因此在临床护理和出院后延续照顾中应引起重视。从对照组第 3 周与第 1 周的 SDS、SAS 评分比较,抑郁、焦虑也有明显改善。说明人有自我的感觉与知觉能力、有解决自己困惑的能力,人自身拥有解决困难的资源和技巧,配上有效的一般护理和时间这副良药,亦能在一定程度上缓解自身的抑郁焦虑情绪。本研究结果说明在一般护理的基础上,针对性加强心理干预对患者的抑郁、焦虑等负性心理有比较明显改善作用,对促进这类群体的心理健康帮助较对照组大。

参 考 文 献

- 1 吴孟超. 为医重在德 重德贵创新. *中国医学伦理学*, 2006, 106:4.
- 2 娄季鹤,赵春安,牛希华,等. 烧伤截肢临床分型探讨. *河南医学研究*, 2004, 13:327.
- 3 张作记. 行为医学量表手册. *中国行为医学科学*, 2001, 特刊:124-125.
- 4 张作记. 行为医学量表手册. *中国行为医学科学*, 200, 特刊:131-132.
- 5 邹翘璇,田真,陈映琼,等. 个性化心理护理在截肢患者中的应用. *吉林医学*, 2006, 27:624-625.
- 6 刘洪宾,赵红伟,李娅. 截肢病人心理状况研究及干预. *中国行为医学科学*, 1998, 7:307.

(收稿日期:2006-11-23)

(本文编辑:林立)