

丰富环境对快速老化小鼠 SAMP8 学习记忆能力的影响

吴冰洁^{1,2}, 顾平^{2,3}, 崔冬生², 耿媛², 王铭维^{2,3*}

(1. 河北医科大学第二医院康复科, 石家庄 050000; 2. 河北省脑老化与认知神经科学实验室, 石家庄 050031; 3. 河北医科大学第一医院神经内科, 石家庄 050031)

[摘要] **目的:**探讨丰富环境对快速老化小鼠 SAMP8 学习记忆能力的影响。**方法:**选用雄性 3 月龄快速老化小鼠 SAMP8 与正常老化小鼠 SAMR1, 随机分为丰富环境组 (EE) 和标准环境组 (SE) 2 组, 分别在 EE 和 SE 条件下培养 8 周。采用跳台实验、Morris 水迷宫实验测试学习记忆能力。**结果:**跳台实验 SAMP8 和 SAMR1 小鼠学习成绩和记忆成绩 EE 组均优于 SE 组, 记忆成绩改善显著 ($P < 0.05$)。Morris 水迷宫定位航行实验中, SAMP8 和 SAMR1 小鼠 EE 组找到平台的平均潜伏期均较 SE 组缩短, 但 EE 对 SAMP8 小鼠的影响显著 ($P < 0.05$); 空间探索实验中, SAMP8 和 SAMR1 EE 组小鼠轨迹大部分位于原平台象限, 而 SE 组轨迹呈随机分布于各象限之中。**结论:**丰富环境刺激能有效地改善快速老化小鼠 SAMP8 的学习记忆能力, 尤其记忆能力改善显著。

[关键词] 丰富环境; 学习; 记忆; 阿尔茨海默病

[中图分类号] R 749.16 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)09-0964-04

Effects of enriched environment on learning and memory abilities in senescence accelerated-prone 8 mice

WU Bing-jie^{1,2}, GU Ping^{2,3}, CUI Dong-sheng², GENG Yuan², WANG Ming-wei^{2,3*} (1. Department of Rehabilitation, Second Affiliated Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China; 2. Brain Aging and Cognitive Neuroscience Laboratory, Shijiazhuang 050031; 3. Department of Neurology, First Affiliated Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050031)

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the effects of enriched environment on learning and memory abilities in senescence accelerated-prone 8 (SAMP8) mice. **Methods:** Twenty 3-month-old male SAMP8 mice and 20 male SAMR1 mice (normal aging) were randomly divided into 2 groups according to their body weight: enriched environment (EE) group and standard environment (SE) group. Animals in the 2 groups were subjected to different environments for 8 weeks. The learning and memory abilities of animals were evaluated by step-down avoidance test and Morris water maze test. **Results:** The learning and memory abilities of EE group were significantly better than those of SE group in step-down avoidance test ($P < 0.05$ for memory ability). The average latent period of animals in EE group was significantly shorter than that in SE group in Morris water maze test in both SAMP8 and SAMR1 mice ($P < 0.05$ for SAMP8 mice). Spatial probe test revealed that the ability to search for platform of EE group was better than that of SE group. **Conclusion:** Enriched environmental intervention can improve the learning and memory abilities in senescence SAMP8 mice, especially for memory ability.

[KEY WORDS] enriched environment; learning; memory; Alzheimer disease

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(9): 964-967]

脑老化是渐进的、不可逆的生理功能全面下降的过程, 其结果直接与多种老年性疾病如阿尔茨海默病 (AD)、帕金森病等密切相关, 极大的影响了老年人的生活质量, 给社会和家庭带来很大的负担。近年来, 丰富环境 (enriched environment, EE) 对实验动物行为和智力的影响越来越受到重视。如何改善环境, 提高老年人生活质量问题成为临床研究的热点。最新研究显示, EE 可促进脑损伤及神经变性疾病的恢复, 包括外伤性颅脑损伤、癫痫持续状态、帕金森病等^[1-4]。EE 干预被证实是一种简便有效的康复治疗手段, 因此探讨 EE 对于学习记忆能力的作用及机制, 对临床应用环境干预治疗 AD 非常必

要。本研究选用 3 月龄的快速老化小鼠 SAMP8, 与同龄的正常老化小鼠 SAMR1 作对照, 观察 SAMP8 小鼠学习记忆能力的变化, 旨在为应用丰富环境干预 AD 提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 动物分组 选用雄性快速老化小鼠 SAMP8 及其同源正常老化小鼠 SAMR1 各 20 只, 3 月龄, 平

[基金项目] 河北省自然科学基金 (C2007000842)。Supported by Natural Science Foundation of Hebei Province (C2007000842)。

[作者简介] 吴冰洁, 博士生, 副主任医师。E-mail: bjiewu@tom.com

* Corresponding author. E-mail: wmw@jyxy.com

均体质量(25.23±0.27) g,由香港中文大学解剖系姚大卫教授赠送。标准啮齿类动物饲料喂食,自由进食水,室温 23~25℃,保持 12 h 照明、12 h 黑暗的周期。SAMP8 及 SAMR1 按体质量采用随机数字法随机分为 EE 组和标准环境(standard environment, SE)组 2 组,每组各 10 只,分别在 EE 和 SE 条件下培养 8 周。

1.2 环境 EE 组小鼠饲养于 45 cm×28 cm×25 cm 的透明玻璃笼内,一笼 5 只。笼内设有金属制小桥、斜架, PVC 直径 3 cm 隧道,塑料跑笼,金属链条,各种形状及颜色的塑料玩具(球、盒、铃铛等),各种形状及颜色的木制积木。每 2~3 d 清洁并更换 1 次。SE 组小鼠饲养于 30 cm×18 cm×25 cm 的透明玻璃笼内,一笼 5 只,笼内只有垫料,见图 1。



图 1 SAM 小鼠的饲养环境

Fig 1 Living environment of SAM mice

A; Enriched environment; B; Standard environment

1.3 主要仪器 YLS-3T 跳台记录仪、SLY-WMS Morris 水迷宫分析系统均由安徽淮北正华生物仪器有限公司生产。

1.4 行为学检测

1.4.1 跳台实验 YLS-3T跳台记录仪由 5 室组成,每室 13 cm×13 cm×20 cm 大小。室底为直径 3 mm 铜栅,一角固定高 5 cm、直径 5 cm 圆柱状平台。将小鼠放入室内,适应 60 s 后通电(25 V),小鼠受到电击,其正常反应是跳到平台以躲避伤害性刺激。记录小鼠首次找到平台所需的时间(反应时间)和 300 s 内受到电击的次数(错误次数),作为学习成绩。24 h 后重复上述实验,记录小鼠第一次从平台上跳下的时间(潜伏期)和错误次数,作为记忆成绩。

1.4.2 Morris 水迷宫实验 迷宫主要由两部分组成,即内含平台的圆形水池和记录装置。水池直径 120 cm、高 50 cm。池壁上标有东、南、西、北 4 个人水点,将水池分为 4 个象限。内置直径 14 cm、高 20 cm 的平台,加水至超过平台高度 1~1.5 cm,为避免鼠直接看见平台,在水中加入墨水,水温保持在(22±2)℃。迷宫上方安置带有显示系统的摄像机,计算机自动跟踪计时并记录游泳轨迹。保持实验室内光线

良好,周围参照物固定不变。测试内容包括定位航行实验(place navigation)和空间探索实验(spatial probe test)。(1)定位航行实验:测试前,撤除平台让小鼠自由游泳 2 d 以熟悉环境。测试时,将平台随机置于圆池内某一象限并固定,小鼠每日分别从东、西、南、北 4 个象限面向池壁轻轻放入水中,记录该鼠自入水后至找到平台所需时间(逃避潜伏期)。4 次潜伏期成绩的平均值作为当日最终成绩进入最后统计。如小鼠在 120 s 内找不到平台,则由实验者将其引向平台,其潜伏期为 120 s。每次测试间隔 60 s,连续 3 d。(2)空间探索实验:定位航行实验结束后撤除平台,自任一入水点将小鼠面向池壁放入水中,观察小鼠 120 s 内寻找平台的游泳轨迹。

1.5 统计学处理 所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 Stata 8.0 软件进行 *t* 检验和方差分析。

2 结果

2.1 跳台实验

2.1.1 学习成绩 SAMP8 和 SAMR1 EE 小鼠反应时间较 SE 组缩短,有显著性差异($P < 0.05$);错误次数较 SE 组减少,但无显著性差异。SAMP8 EE 小鼠和 SE 小鼠与 SAMR1 比较,反应时间有显著性差异($P < 0.05$),但错误次数均无显著性差异。

2.1.2 记忆成绩 SAMP8 和 SAMR1 EE 小鼠潜伏期虽较 SE 组延长,但 SAMP8 小鼠有显著性差异($P < 0.05$),而 SAMR1 小鼠无显著性差异;SAMP8 和 SAMR1 EE 小鼠错误次数较 SE 组减少,有显著性差异($P < 0.05$)。SAMP8 与 SAMR1 小鼠比较,EE 组潜伏期和错误次数无显著性差异;SE 组潜伏期和错误次数均有显著性差异($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 Morris 水迷宫实验

2.2.1 定位航行实验 SAMP8 和 SAMR1 EE 小鼠找到平台的平均潜伏期较 SE 组缩短,SAMP8 小鼠 3 d 内均有显著性差异($P < 0.05$),SAMR1 小鼠第 1 日无显著性差异,第 2、3 日有显著性差异($P < 0.05$)。SAMP8 与 SAMR1 小鼠比较,SAMP8 小鼠平均潜伏期较 SAMR1 小鼠长,但 EE 组差异无显著性,SE 组第 1、2 日无显著性差异,第 3 日有显著性差异($P < 0.05$)。见表 2。

2.2.2 空间探索实验 第 4 日撤除平台后,观察小鼠的空间探索能力,小鼠寻找平台的轨迹经图形叠加(5 个图形叠加)处理后发现:EE 组 SAMP8 和 SAMR1 小鼠轨迹大部分位于原平台象限,其次较多地在原平台象限相邻的左右两侧象限寻找,SAMR1 小鼠更为显著;SE 组基本满池内寻找,其轨

迹呈随机分布于各象限之中,并且发现 SAMP8 小鼠有围绕池壁寻找现象(图 2)。

表 1 跳台实验的学习记忆成绩比较

Tab 1 Comparison of learning and memory abilities between EE and SE groups in step-down avoidance test

(n=10, $\bar{x}\pm s$)

Group		Learning ability		Memory ability	
		Reaction period(t/s)	Error time	Latent period(t/s)	Error time
SAMP8	EE	12.80±2.58* [△]	3.60±0.76	232.10±28.74*	1.00±0.33* [△]
	SE	31.10±5.46 [△]	4.70±1.11	127.70±20.31	2.90±0.66 [△]
SAMR1	EE	6.50±1.75*	1.80±0.47	240.60±18.72	0.70±0.26*
	SE	12.80±2.41	2.40±0.60	184.30±18.29	1.30±0.30

* P<0.05 vs SE group; [△]P<0.05 vs SAMR1 group

表 2 两组小鼠不同时间的 Morris 水迷宫平均潜伏期比较

Tab 2 Comparison of average latent period between EE and SE groups in Morris water maze test

(n=10, $\bar{x}\pm s$)

Group		Time		
		d1	d2	d3
SAMP8	EE	77.99±7.79*	48.76±2.89*	31.59±4.58*
	SE	97.43±5.42	75.08±6.52	50.02±5.05 [△]
SAMR1	EE	70.95±8.45	43.75±4.89*	22.63±2.21*
	SE	86.52±6.96	52.04±3.45	32.23±2.15

* P<0.05 vs SE group; [△]P<0.05 vs SAMR1 group

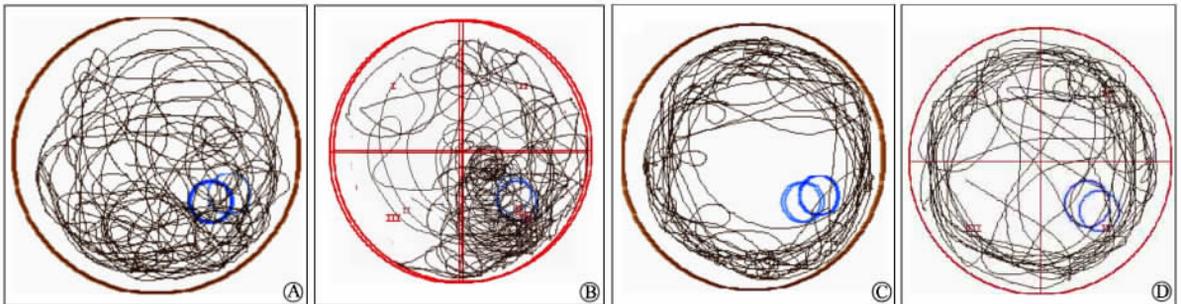


图 2 SAM 小鼠的空间探索实验轨迹

Fig 2 Routes of SAM mice in space navigation test

A; SAMP8 EE group; B; SAMR1 EE group; C; SAMP8 SE group; D; SAMR1 SE group

3 讨论

SAM(senescence accelerate mouse)小鼠是日本京都大学 Takeda 教授经 20 多年精心培育而得到的一种近交系衰老模型鼠,包括 SAMP(senescence accelerated-prone mouse, SAMP)和 SAMR(senescence accelerated-resistant mouse, SAMR)两种品系。SAMP8 小鼠通常在正常发育成熟后快速出现皮肤粗糙、毛发脱落、眼周皮损和脊柱脱位增加,平均寿命缩短。SAMR1 小鼠表现为正常衰老,一般作为 SAMP 小鼠的正常对照。SAMP8 小鼠是 SAMP 系中的一个亚系,具有典型的痴呆特征和脑部病理变化,被公认为是目前国内外进行 AD 研究中较为规范标准的动物实

验模型^[5-6]。SAMP8 小鼠在 2 月龄就开始出现学习记忆功能衰退,并随增龄而加重^[7-8]。AD 是一种以进行性记忆丧失为主要表现的大脑变性疾病,病因目前尚未明确,主要与脑衰老、遗传、自体免疫、营养缺乏、脑外伤等因素有关。在临床上,尚无有效的治疗方法。流行病学研究发现,单纯生活方式的改变可以影响 AD 的发生和进展^[9]。生活方式的选择,包括职业、闲暇活动以及体育运动都可延缓认知能力的衰退^[10]。

EE 是相对于 SE 而言,体现在空间和内部设置上。EE 生活空间大,内置物体丰富而新奇,不仅提供充分的多感官、运动刺激,还提供训练学习的机会。研究证实,暴露于 EE 的正常老年小鼠空间及非空间记忆能力提高,水迷宫实验成绩提高,对于外来危险

记忆力提高^[11]。EE 对于行为和记忆的作用具有神经解剖学和分子生物学基础。EE 可增加细胞体积,增加树突分枝及树突棘密度,增加单个神经元的突触数量。这些变化在海马齿状回最为明显^[12]。

国外文献报道,转基因 AD 模型小鼠饲养于 EE 环境中认知功能的改善是肯定的^[13-14]。目前尚未有关于 EE 对 SAM 小鼠学习记忆能力影响的研究。本实验采用 3 月龄 SAMP8 和 SAMR1 小鼠给予 EE 干预 8 周,采用跳台实验和 Morris 水迷宫进行行为学测试。跳台实验旨在考察动物在一次学习之后的记忆能力,结果发现,SAMP8 和 SAMR1 EE 小鼠在遭遇一次同等程度的电击之后,寻找安全平台的反应时间较 SE 组明显缩短($P < 0.05$),从平台跳下的错误次数减少;24 h 后再次给予电击,EE 组小鼠的潜伏期延长,错误次数显著减少。由此证实,EE 可改善 SAM 小鼠的学习和记忆能力,并且记忆能力的改善优于学习能力。Morris 水迷宫实验于 20 世纪 80 年代初由英国心理学家 Morris 设计,旨在用于检测动物空间探索和辨别的学习记忆能力,以动物找到平台的潜伏期作为评定学习记忆能力的指标。此实验结果显示,第 1~3 日各组 SAM 小鼠找到平台的潜伏期均呈下降趋势,并且 EE 组找到平台的潜伏期较 SE 组缩短。SAMP8 小鼠 3 d 内均有显著性差异($P < 0.05$),SAMR1 小鼠第 1 日无显著性差异,第 2、3 日有显著性差异($P < 0.05$)。SAMP8 小鼠潜伏期较 SAMR1 小鼠长,但 EE 组无显著性差异,SE 组第 1、2 日无显著性差异,第 3 日有显著性差异($P < 0.05$)。由此我们认为 EE 对 SAM 小鼠空间记忆能力的改善优于学习能力,尤以 SAMP8 小鼠改善明显。

目前,EE 对 AD 模型小鼠认知功能改善的机制尚有分歧。Lazarov 等^[15]、Joanna 等^[16]将转基因 AD 模型小鼠饲养于 EE 环境中发现,小鼠的认知及运动功能明显改善。由于实验小鼠的性别不同,大脑中 β 淀粉样蛋白的表达也不同。Lazarov 等认为 EE 可减少雄性小鼠脑中 β 淀粉样蛋白的沉积,从而改善认知功能;而 Joanna 等发现 EE 增强雌性小鼠脑中 β 淀粉样蛋白,推测 EE 是通过调动大脑中的认知储备而改善了认知功能。Oliver 等^[17]的最新研究发现,将雌性 TgCRND8 转基因 AD 小鼠在 EE 环境中饲养 4 个月后,免疫组化检测海马和皮质的 β 淀粉样蛋白显著减少。我们也将对 EE 是否影响雄性 SAMP8 小鼠 β 淀粉样蛋白的沉积进行更深入的研究。

[参考文献]

[1] van Praag H, Kempermann G, Gage F H. Neural consequences

of environmental enrichment[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2000, 1: 191-198.

- [2] Faverjon S, Silveira D C, Fu D D, et al. Beneficial effects of enriched environment following status epilepticus in immature rats[J]. *Neurology*, 2002, 59: 1356-1364.
- [3] Rutten A, van Albada M, Silveira D C, et al. Memory impairment following status epilepticus in immature rats: time-course and environmental effects[J]. *Eur J Neurosci*, 2002, 16: 501-513.
- [4] Faherty C J, Raviie Shepherd K, Herasimtschuk A, et al. Environmental enrichment in adulthood eliminates neuronal death in experimental Parkinsonism[J]. *Brain Res Mol Brain Res*, 2005, 134: 170-179.
- [5] Takeda T, Hosokawa M, Higuchi K. Senescence-accelerated mouse(SAM): a novel murine model of senescence[J]. *Exp Gerontol*, 1997, 32(1-2): 105-109.
- [6] Flood J F, Morley J E. Learning and memory in the SAMP8 mouse[J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 1998, 22: 1-20.
- [7] Miyamoto M. Characteristics of memory and behavioral disorders in SAMP8 mice[M]// Takeda T ed. *The SAM model of senescence*. Amsterdam: Excerpta Medica, Elsevier Science BV, 1994: 61-66.
- [8] 蔡剑平, 黑爱莲. 快速老化痴呆模型小鼠 SAMP8 学习记忆能力的增龄性变化[J]. *中国神经免疫学和神经病学杂志*, 2005, 12: 219-222.
- [9] Pope S K, Shue V M, Bech C. Will a healthy lifestyle help prevent Alzheimer's disease[J]? *Annu Rev Public Health*, 2003, 24: 111-132.
- [10] Friedland R P, Fritsch T, Smyth K A, et al. Patients with Alzheimer's disease have reduced activities in midlife compared with healthy control-group members[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 3440-3445.
- [11] Frick K M, Fernandez S M. Enrichment enhances spatial memory and increases synaptophysin levels in aged female mice[J]. *Neurobiol Aging*, 2003, 24: 615-626.
- [12] Kempermann G, Gast D, Gage F H. Neuroplasticity in old age Sustained fivefold induction of hippocampal neurogenesis by longterm environmental enrichment[J]. *Am Neurol*, 2002, 52(1): 135.
- [13] Arendash G, Garcia M, Costa D, et al. Environmental enrichment improves cognition in aged Alzheimer's transgenic mice despite stable beta-amyloid deposition[J]. *Neuroreport*, 2004, 15: 1751-1754.
- [14] Jankowsky J L, Melnikova T, Fadale D J, et al. Environmental enrichment mitigates cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease[J]. *J Neurosci*, 2005, 25: 5217-5224.
- [15] Lazarov O, Robinson J, Tang Y P, et al. Environmental enrichment reduces A levels and amyloid deposition in transgenic mice[J]. *Cell*, 2005, 120: 701-713.
- [16] Joanna L J, Tatiana M, Daniel J F, et al. Environmental enrichment mitigates cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease[J]. *J Neuroscience*, 2005, 25: 5217-5224.
- [17] Oliver A, Uwe L, Arne H, et al. Reduction of amyloid angiopathy and A β plaque burden after enriched housing in TgCRND8 mice[J]. *Am J Pathol*, 2006, 169: 544-552.

[收稿日期] 2007-05-29

[修回日期] 2007-07-14

[本文编辑] 曹 静