

丁香酚通过嗅觉通路改善昆明鼠学习记忆的机制*

杨天鹏¹ 唐敏¹ 刘巧琼² 李光武^{1,3}

摘要 目的:探讨丁香酚吸入引起昆明鼠学习记忆的行为学改变及其机制。方法:建立小鼠嗅球摘除模型,分组对小鼠进行水迷宫实验、嗅觉辨识记忆实验及免疫组化,观察各组小鼠海马、皮质等脑区的尼氏染色,以及 ChAT、GABA、Glu 等神经递质变化。结果:丁香酚吸入组的小鼠水迷宫实验、嗅觉辨识记忆实验结果明显优于其他组,免疫组化实验结果示丁香酚吸入小鼠的皮质、海马的 ChAT、Glu 等神经递质有明显增加,而 GABA 无明显改变。结论:丁香酚能通过嗅觉通路改善小鼠的学习记忆,其机制可能与嗅觉通路中多种神经递质的改变有关。

关键词 丁香酚;嗅觉通路;神经递质;学习记忆

中图分类号: R493 文献标识码: A 文章编号: 1001-1242(2007)-06-0487-03

Mechanisms of Eugenol improving learning and memory through olfactory pathway on Kunming mice/
YANG Tianpeng, TANG Min, LIU Qiaoqiong, et al//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2007, 22(6):
487—489

Abstract Objective: To study mechanisms of Eugenol improving learning and memory through olfactory pathway on Kunming (KM) mice. **Method:** We established olfactory bulbectomy models, divided different groups. The mice were detected with mouse water maze test and olfaction discrimination memory test. Then, each mouse was sacrificed and the brain was removed. The slices of hippocampus and cortex were stained with Nissl's staining and detected the expression of ChAT, GABA and Glu by immunohistochemistry. **Result:** Eugenol inhaling group can strengthen mouse water maze test, olfaction discrimination memory test compared to the other groups, and ChAT, Glu in hippocampus and cortex had significantly increased, but GABA had not. **Conclusion:** The effects of eugenol's improvement on learning and memory may act through olfactory pathway. The mechanisms is related to the changing of the brain's neurotransmitters.

Author's address Institute of Neurobiology, Anhui Medical University, Hefei, 230032

Key words eugenol; olfactory pathway; neurotransmitter; learning and memory

嗅觉是大脑直接与外部环境相联系的唯一感觉,嗅觉系统的脑通路可能成为中枢神经系统药物直接进入脑的一条新的途径。近年来有研究显示,嗅觉记忆可影响神经元突触的重塑而改变动物的神经行为表现^[1],嗅觉中枢本身也参与了学习记忆过程^[2-3]。Christen-Zaech 等^[4]研究阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)患者的中枢神经病理改变,结果示嗅觉系统的嗅球核嗅束内神经纤维网状或缠结改变是 AD 发病最早期表现之一。丁香酚属于芳香开窍类药物,有激励情绪、提神醒脑、强化记忆等功效^[5]。本实验通过嗅觉吸入丁香酚,结合小鼠嗅球摘除模型,采用水迷宫、嗅觉辨识记忆实验以及免疫组织化学检测海马、皮质等脑区的神经递质变化,探讨丁香酚嗅觉吸入对小鼠的学习记忆的影响及其神经行为学改变的可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

昆明种小白鼠,雌雄各半,2月龄,体重 20±2g

(购自安徽医科大学动物中心),分组前大笼饲养,分组后小笼饲养,水和食物自取,昼夜自然交替。实验前先用行为学方法进行筛选,包括自主活动及水迷宫训练。适应性喂养 1 周后,通过程控自主活动箱(型号 ZIL-2,中国医学科学院药物研究所制),训练 5d,记录 180s 小鼠自主活动次数,每天训练 1 次,自主活动训练结果应该呈现开始阶段轻度下降,第 4 次后基本无变化的规律,所以按第 5 次结果 90%区间去除两端极值,记录结果。再采用 Lashley III 水迷宫(型号 SMG-2,中国医学科学院药物研究所制)筛选学习记忆功能障碍小鼠。实验环境不变,参照系数不变,水温保持在 20—22℃,筛选共进行 5d,每天进

* 基金项目:国家自然科学基金(NO:30470904),安徽省教委自然科学基金(NO:2003KJ226)

1 安徽医科大学神经生物学研究所,合肥,230032

2 安徽医科大学生理学教研室

3 通讯作者:李光武(安徽医科大学神经生物学研究所,合肥,230032)

作者简介:杨天鹏,男,硕士研究生

收稿日期:2006-09-04

行 2 次测试(上、下午各 1 次), 每天的 2 次测试被平均先训练 4d, 实验第 5d, 剔除 3min 内不能到达平台的小鼠, 随机分为空白组、假手术组、模型组(或嗅球摘除组)、药物组(或丁香酚吸入组)、模型+药物组, 每组各 10 只。每次训练时间安排在 10:00AM—4:00PM, 先进行自主活动训练, 再进行水迷宫训练。

1.2 嗅球摘除模型的制作方法

除空白组和药物组外, 其他三组均在脑立体定位仪(型号 NARISHIGE, TYPE: SN-2, NO: 8208, 日本)下进行嗅球摘除。以 38g/L 水合氯醛 0.38g/kg 腹腔注射麻醉小鼠, 将头部固定于脑立体定位仪上, 暴露颅骨, 参考 The Mouse Brain 小鼠图谱(第 2 版, George Paxinos, Keith BJ Franklin), 用电钻在前囟 3.2mm 为后界开窗, 暴露双侧嗅球, 用厚度为 0.5mm 的刀片由后界垂直插入取出嗅球组织, 并将残余组织吸净, 创口用吸收性明胶海绵填塞止血, 骨蜡封闭。术后休息 1 周。

1.3 给药方法

在密闭的实验盒内(60cm×60cm×20cm, 大号塑料箱, 上海正卫日用品有限公司), 将丁香酚溶剂(江西省樟树市本草天然药用油厂, 批号 050921)均匀地洒在盒底部, 再在上面铺上一层带有许多孔的薄铁栏栅。给药时, 先让实验盒内的药物充分挥发弥漫在整个实验盒内, 之后将实验动物放置铁栏栅上, 将实验盒盖盖上, 药物作用 30min 后, 将实验动物取出。药物组和模型+药物组每天嗅觉吸入丁香酚 30min, 持续 14d。

1.4 神经行为学观察

1.4.1 Lashley III 水迷宫实验: Lashley III 水迷宫(型号 SMG-2, 中国医学科学院药物研究所制), 由 80cm×50cm×20cm 双层不透明有机玻璃箱构成, 是经典的观测小鼠空间学习记忆的神经行为学装置, 内设起始点、终点平台和四个盲端, 平台附近为安全区, 并放台灯标示, 动物只有通过台阶才可上岸躲避溺水的危险。实验环境不变, 参照系数不变, 水温保持在 20—22℃。正式实验前, 训练 4d, 每天进行 2 次测试(上、下午各 1 次)。第 1 次训练前先将每只小鼠放入迷宫中熟悉水环境数分钟, 训练时如小鼠在 180s 内未到达终点平台, 可帮助式地将小鼠赶至平台, 并将小鼠在平台上待 20s。第 5d 实验正式开始, 小鼠面向壁侧在起始点放入水中, 记录小鼠放入水中到达终点平台时间(潜伏期, escape latency), 实验记录单位(s), 在正式实验的第 1d、第 7d、第 14d 再次进行测试, 并记录结果。

1.4.2 嗅觉辨识记忆实验: 实验在木制旷场箱(80

cm×80cm×40cm, 自制)内进行, 四个角落放置玻璃器皿(高 2cm, 半径 3cm), 分装有四种不同气味的沙子: 酒精味、乙酸味、蒜味、胡椒味, 其中仅胡椒味的沙子内藏有巧克力, 四只器皿随机放置。训练前两天及实验期小鼠限食(正常量的 1/2), 训练第 1 天将小鼠放置于旷场箱中熟悉环境, 训练第 2 天巧克力先后放置的状态是完全暴露于沙子表面、半暴露于沙子表面、完全埋藏于沙子内, 以找到巧克力为一次训练终点, 每只训练 5 次, 每次间隔 20min, 相邻两次训练间胡椒味沙的位置要变动, 记录找到食物的时间作为学习成绩, 以潜伏期小于 1min 为训练标准。达标后器皿内不放置巧克力观察小鼠找到胡椒味沙的时间, 以排除巧克力本身气味的影响。正式实验的第 1d、第 7d、第 14d 再次进行嗅觉辨识记忆测试, 记录找到巧克力的时间为学习成绩, 3min 内找不到食物以 3min 计算, 记录结果。

1.5 免疫组化

38g/L 水合氯醛 0.38g/kg 腹腔麻醉小鼠, 产生麻醉效应后剪开其前胸壁, 纵行剪开心包, 充分暴露心脏。在心尖偏左处左心室插管至升主动脉, 止血钳将针头与心脏夹住固定, 剪开右心房, 快速滴入生理盐水约 50ml, 再滴入 4%多聚甲醛((0.1mol/L PB 配制, pH=7.4)灌注固定。迅速开颅取脑, 置入 4%多聚甲醛持续固定液 24h, 梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋。对照 The Mouse Brain 脑立体定位图谱, 用切片机(Leica 石蜡切片机, 型号 RM2135, 德国)在前皮质及海马等层面进行连续冠状切片, 片厚 6μm, 每 3 张取一张, 每层面切片 12 张, 用预涂铬矾明胶的载玻片直接贴片, 58℃温箱烤片, 48h 后收储备用。再进行尼氏染色和 SABC 法(SABC 试剂盒, 批号: SA1022, 武汉博士德生物工程有限公司)染色, 经二甲苯透明, 中性树胶封片, OLYMPUS 显微镜观察并摄片。

1.6 统计学分析

使用 SPSS10.0 统计软件进行分析, 实验数据用均数±标准差表示, 组间比较用 *t* 检验和单因素方差分析。

2 结果

2.1 水迷宫实验结果

经正态性检验, 空白组与药物组在实验第 7d 和第 14d 的数据满足正态性分布, 做各组样本的 *t* 检验, *P* 均<0.05。模型+药物组与模型组、假手术组的第 7d 和 14d 的结果比较, *P* 均>0.05。而模型组+药物组和药物组的第 7d 和 14d 的结果比较, *P* 均<

0.05。结果见表 1。

2.2 嗅觉辨识记忆实验结果

药物组实验第 7d 和 14d 的小鼠嗅觉辨识记忆实验结果与空白组比较, P 均 <0.05 。而模型+药物组、模型组、假手术组的 7d 和 14d 实验结果与空白组比较, P 均 >0.05 。结果见表 2。

表 1 水迷宫实验结果 ($\bar{x} \pm s$)

组别	1d	7d	14d
嗅球摘除组	57.82±12.45	46.91±8.37	71±12.44
嗅球摘除+药物组	50±13.24	49.00±8.01	79.42±21.50
药物组	62.70±9.8	26.30±5.12 ^①	28.60±6.14 ^②
假手术组	57.14±13.71	59.29±9.82	51±14.01
空白组	71.70±12.12	75.30±16.96	79.90±17.73

①与空白组比较 $P<0.05$, ②与嗅球摘除+药物组比较 $P<0.05$

表 2 嗅觉辨识记忆实验结果 ($\bar{x} \pm s$)

组别	1d	7d	14d
嗅球摘除组	30.42±23.25	28.56±15.74	30.63±17.58
嗅球摘除+药物组	42.81±29.07	37.05±22.63	40.86±25.07
药物组	47.95±27.73	25.76±21.96 ^①	23.20±13.96 ^①
假手术组	37.83±23.64	28.47±14.74	39.46±12.86
空白组	46.35±28.53	35.13±15.29	40.71±27.50

①与空白组比较 $P<0.05$

2.3 组织形态学改变

尼氏染色结果(Nissl's staining):空白组各脑区神经元形态正常,胞核膜和核仁清晰;嗅球摘除组小鼠的额叶皮质、梨状皮质、海马的尼氏体染色减弱,假手术组各脑区神经元尼氏体蓝染(图 1—2,见前置彩色插页 10)。

2.4 免疫组化结果

2.4.1 胆碱乙酰转移酶(ChAT):阳性细胞主要分布于大脑皮质、扣带、纹状皮质及海马,在乳头体内侧核及乳头体上核团中阳性细胞多,丘脑中也有少量分布。呈椭圆形或卵圆形,树突少,光滑,分支也少,黄褐色,主要位于神经元胞浆及近侧突起内,而胞核未着色或着色较淡。在大脑皮质和海马区,药物组阳性细胞数量增多明显,细胞着色加深,而其他组的 ChAT 阳性细胞表达未见明显变化(图 3—6,见前置彩色插页 10)。

2.4.2 谷氨酸(Glu):阳性细胞主要分布于胼胝体、扣带、丘脑及前连合前部,隔核及尾壳核中有少量分布,其胞体呈锥形、圆形、椭圆形,有一个或多个突起,其中胞核胞质均着深棕色的细胞为摄取 Glu 的胶质细胞。在前连合前部,药物组阳性细胞数量增多明显,着色加强。其他组阳性细胞表达未见明显变化(图 7—8,见前置彩色插页 10)。

2.4.3 γ -氨基丁酸(GABA):阳性细胞主要分布在扣带、中央前区及视区,脑干腹侧核团,皮质(以梨状前皮质为多)、海马及丘脑等部位,细胞呈圆形、卵圆形等,有的细胞有一至多个突起。各组阳性细胞表达

均未见明显变化(图 9—10,见前置彩色插页 10)。

3 讨论

与视觉、听觉相比,嗅觉是最古老、最原始的感觉,嗅觉中枢属于神经系统的古皮质,有较高的保守性^[6]。嗅觉通过感知外界环境的化学信号来辨别相关气味的方位、寻找食物、辨析安全与危险,参与情感交流;同时嗅觉与其他行为相互作用,构成嗅觉学习和记忆的复杂生理过程。有研究表示^[7],人脑中除了海马区与记忆功能有着直接关联外,另有一块控制嗅觉的功能区也与记忆密切相关。

学习记忆包括空间学习记忆和非空间学习记忆。小鼠 Lashley III 水迷宫是检测小鼠空间学习记忆的经典行为学实验,可反映小鼠的空间学习记忆能力,并初步了解海马等结构功能状态,嗅觉辨识记忆实验可通过检测小鼠对与食物相联系的气味辨识来分析小鼠对不同嗅质的辨识能力,属非空间学习记忆的行为学实验。本实验通过建立嗅球摘除模型并吸入丁香酚刺激嗅觉途径,发现药物组的水迷宫实验、嗅觉辨识记忆实验结果明显优于其他组,表明丁香酚吸入对于正常小鼠有改善其学习记忆的能力,而对于嗅球摘除后的小鼠并没有此能力,从而说明药物丁香酚可能是通过嗅球途径进入中枢神经系统发挥药效作用的。根据 Buck 和 Axel 对嗅觉系统工作方式的解释,嗅觉的产生藉由在鼻腔上部嗅觉区域分布着一个多基因家族,它们能对应着多种不同类型的气味感受器,每种气味感受器均对应一种特异组合的“感受器编码”。气味受体被气味分子激活后,气味受体细胞就会产生电信号,这些信号随后被传输到大脑嗅球的微小区域中,结合成特定模式,传至大脑其他区域,由大脑皮质进行更高级的分析和综合,最终产生认知、情感和身体上的反应^[8]。

嗅觉系统主要由嗅上皮、嗅球和嗅皮质三部分组成。气味受体在嗅上皮内被嗅觉神经元识别后,通过其轴突末端的嗅小球传递至嗅球,与嗅球内神经元建立突触联系,嗅球内神经元再与嗅觉皮质内神经元建立纤维联系,将传入的信号由嗅球传递到初级嗅皮质的嗅前核、梨状前皮质、下丘脑、杏仁核、内侧嗅皮质,再由嗅中枢的次级嗅皮质传至海马,这样嗅觉感受器、嗅球和大脑嗅觉中枢就三位一体地形成了嗅觉感受和传导路线^[9-10]。目前关于神经递质在嗅觉传导中的确切机制还不是很清楚,但有一些证据表明神经递质确实参与了嗅觉的形成及传导,如 Glu 在学习记忆、突触可塑性、神经元发育和退化

(下转 508 页)