

慢性束缚应激对 SD 和 Wistar 大鼠学习 记忆能力的影响

王逸¹, 卢聪¹, 宋广青¹, 陈怡西², 武宏伟¹, 王琼^{1,2}, 曲丽娜³, 李莹辉³, 刘新民¹

(1. 中国医学科学院 北京协和医学院 药用植物研究所, 北京 100193; 2. 泸州医学院, 泸州 646000;
3. 中国航天员科研训练中心航天医学基础与应用国家重点实验室, 北京 100094)

【摘要】 目的 探讨慢性束缚应激对 Wistar、SD 两种品系大鼠学习记忆能力的影响, 为应激模型中实验动物的选择提供依据。方法 对两种品系大鼠(Wistar、SD)采用每天束缚 10 h, 束缚 28 d 建立慢性应激模型。采用物体认知新物体识别实验和 Morris 水迷宫空间学习、工作记忆行为学检测方法, 观察束缚应激对两种品系实验动物学习记忆能力的影响。结果 束缚 28 d 后, 物体识别实验中, Wistar、SD 模型组的辨别指数(discrimination index, DI)均低于对照组, 但只有 SD 两组间差异存在显著性($P < 0.05$); 水迷宫空间学习阶段, SD 模型组潜伏期高于对照组, 第 5 天差异有显著性($P < 0.05$), 而 Wistar 模型组与对照组间的潜伏期没有差异; 水迷宫工作记忆阶段, SD 大鼠模型组与正常组比较, 潜伏期显著增加($P < 0.05$), Wistar 模型大鼠的潜伏期与对照组比较没有显著差异。结论 新物体识别实验和水迷宫实验, 这两种反应动物不同学习记忆能力的行为学实验结果都表明, 慢性束缚应激(10 h, 28 d)对 SD 大鼠学习记忆能力的损伤较 Wistar 大鼠明显。SD 大鼠可能更适合作为慢性应激所致学习记忆损伤动物模型。

【关键词】 Sprague-Dawley 大鼠; Wistar 大鼠; 束缚应激; 新物体识别; 水迷宫

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2014) 02-0040-05

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2014.02.009

Effects of chronic restraint stress on learning and memory in SD and Wistar rats

WANG Yi¹, LU Cong¹, SONG Guang-qing¹, CHEN Yi-xi¹, WU Hong-wei¹, WANG Qiong^{1,2}, QU Li-na³,
LI Ying-hui³, LIU Xin-min^{1*}

(1. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking
Union Medical College, Beijing 100193, China; 2. Luzhou Medical College, Luzhou 646000;
3. China Astronaut Research and Training Center, State Key Lab of Space Medicine Fundamentals and
Application, Beijing 100094)

【Abstract】 Objective To investigate the effects of chronic restraint stress on learning and memory in Wistar and Sprague-Dawley (SD) rats. **Methods** Healthy adult male Wistar rats ($n = 6$) and Sprague-Dawley rats ($n = 6$) were subjected to restraint stress 10 h daily for 28 days. After that, all rats were tested for recognition memory by novel object recognition test, and spatial memory and working memory by Morris water maze test. **Results** After restraint for 10 h daily for 28 days, the restraint rats of the two strains demonstrated lower discrimination index (DI) than the control group, but only SD rats showed significant difference ($P < 0.05$). The restraint SD rats showed higher escape latency than the control rats, and on the 5th day the difference became significant ($P < 0.05$), and there was no significant difference between Wistar restraint and control rats. The working memory test showed that restraint SD rats exhibited longer escape latency than

【基金项目】 人参益智药效与基因/蛋白表达谱关联规律合作研究(2011DFA32730), 模拟失重认知功能受损动物模型的建立(SMFA10K01), 中长期航天飞行所致应激损伤评价与防护关键技术研究(BWS11J052)

【作者简介】 王逸(1987-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 神经药理。E-mail: wangyi3394@126.com

【通讯作者】 刘新民, 博士生导师, E-mail: Liuxinmin@hotmail.com.

the control rats ($P < 0.05$), while Wistar rats didn't show significant difference between the two groups. **Conclusions** The results of this study demonstrate that the impairments of learning and memory in SD rats subjected to restraint 10 hour per day for 28 days are more serious than that in the Wistar rats. Therefore, SD rats may be a better choice as an animal model to study the effects of chronic restraint stress on learning and memory impairment.

【Key words】 Wistar rat; Sprague-Dawley rat; Restraint stress; Novel-object recognition test; Morris water maze test; Spatial memory; Working memory

应激是人类所处生活环境中普遍存在的一种外界因素^[1]。当今社会,生活节奏加快、工作压力增加,生活环境的改变,使人们暴露于应激事件的频率和时间都明显增加^[2]。长时间的慢性应激导致的情绪障碍和认知功能损伤,严重影响了人们的生活质量^[3-5]。本实验通过行为制动的束缚应激方法造模,选用国内常用的 SD、Wistar 大鼠为研究对象,采用不同的行为学方法评价动物的学习记忆能力,以期对应激认知损伤动物模型建立、机制研究以及防护药物的研发中实验动物品系的选择提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验仪器

大鼠行为限制器(北京鑫海华仪公司,中国)、大鼠水迷宫计算机监测分析系统(中国医学科学院药用植物研究所、中国航天员科研训练中心、北京三维拓盟数字影像技术有限公司)、物体识别检测箱(中国医学科学院药用植物研究所、北京鑫海华仪公司)。

1.1.2 实验动物

SPF 级 SD、Wistar 雄性大鼠,各 12 只,190 ~ 210 g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供【SCXK(京)2012-0001】。实验在中国医学科学院药用植物研究所进行【SYXK(京)2008-0019】,照明系统人工控制 12 h/12 h 明暗循环(亮灯 8:00 - 20:00,熄灯 20:00 - 次日 8:00),动物分笼饲养,每笼 2 ~ 4 只,适应期间自由饮食饮水。本实验遵循实验动物伦理原则。

1.2 方法

1.2.1 实验动物分组

适应性饲养 3d 后,随机分为 4 组,Wistar、SD 各 2 组,每组 6 只。分别为 Wistar 28 d 对照组、Wistar 28 d 模型组,SD 28 d 对照组、SD 28 d 模型组。

1.2.2 慢性束缚应激模型的建立

根据文献报道^[6-7],将造模大鼠置于长约 12 ~ 16 cm(可调节),内径约 6 cm 的聚酯透明圆柱管内,

四肢制动,只允许头部轻微活动,同时行为限制器顶部有 5 ~ 6 个直径 1 cm 左右的通气小孔供动物呼吸用,每天束缚 10 h(22:00 - 次日 8:00)。束缚期间各组禁食禁水,其余时间自由饮食饮水。连续束缚 28 d 后,进行行为学检测。

1.2.3 体重检测

大鼠于分组前称重一次。分组后,对 4 组动物进行体重的监测和记录,称重均在下午进行,每 7 d 称重一次并记录。

1.2.4 水迷宫空间记忆

水迷宫实验方法与文献报道相似^[7]。本实验中,圆形迷宫直径为 159 cm、高 50 cm,池中水深 25.5 cm 左右,内置平台直径 9 cm、高 24 cm,水温维持在 $(24 \pm 1)^\circ\text{C}$ 。将迷宫置于空间信息相对丰富的实验环境中,作为动物学习过程中的空间参照物,整个试验周期内保持环境信息固定不变。将迷宫均分为 4 个象限,将平台置于其中一个象限中央,作为实验中动物逃离水环境的唯一途径,空间记忆阶段保持平台位置固定不变。选择其余 3 个象限作为动物的入水点将动物面向池壁放入水中,每天训练 3 次,每次变换入水点位置(使动物可分别从 3 个象限入水),且每天所有动物入水点的顺序保持一致。每次训练前适应 10 s,使动物获取并学习空间环境信息。设置检测时间为 60s 后,将动物放入水中,若动物在 60 s 内找到平台,算作寻台成功并记录其潜伏期,并使其在平台上停留休息 10 s。若动物在 60 s 内未找到平台,结束此次训练并记录潜伏期为 60 s,并引导动物靠近平台使其在平台上停留 10 s。每只动物训练的时间间隔为 40 min。每天每只动物 3 次训练学习的潜伏期平均值,作为评价动物这一天学习能力的指标。

经过 5d 的训练学习后,第 6 天撤去平台,进行空间探索实验。将动物从原平台象限的对角象限面向池壁放入水中,检测其在 60s 内在原平台象限的游程比、时间比,以及穿过原平台所在位置的次数,作为评价空间记忆能力的指标。

1.2.5 水迷宫工作记忆

空间探索实验结束次日,开始工作记忆实验^[8]。工作记忆历时 3d,分别将平台置于其余 3 个不同象限中,每天变换平台位置,同一天内平台位置保持不变。每天训练 3 次,依次从其余 3 个非平台象限将动物面朝池壁放入水中。训练前不予适应,其余同空间训练阶段一致。计算 3 天中,第 2 次训练潜伏期的平均值,作为评价动物学习记忆能力的指标。

1.2.6 新物体识别实验^[9-10]

实验箱为黑色聚酯塑料材质构成的封闭箱,体积为 60 cm × 40 cm × 80 cm,箱体左右两侧各有两排 LED 灯条照明,既避免了强光直射对动物行为的干扰,又可以作为计算机对动物行为识别的背景光。顶部采用摄像头观察动物的活动情况及探索过程。实验过程分为 3 个阶段:适应期、熟悉期、测试期。适应期为 3d,每天将动物依次放入实验箱内,熟悉环境 10 min。适应期结束后,次日进行熟悉和测试。熟悉期时,将两个完全相同的物体放入实验箱内对称的位置处,此两物体距离侧箱壁、箱后壁的距离均为 10 cm。记录大鼠 5 min 内对两物体的探索总时间。间隔 30 min 后,进入测试期。测试期内,将其中一个熟悉物体换为另一个大小相近但形状和颜色不同的新颖物体,记录大鼠对新颖物体和熟悉物体的探索时间,用辨别指数 (discrimination index, DI) 来评价动物的学习记忆能力。辨别指数计算公式为 $DI = (N - F) / (N + F) \times 100\%$,其中 N (new) 为新颖物体探索时间, F (familiar) 为熟悉物

体探索时间。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 13.0 中的 *t* 检验和单因素方差分析对数据进行处理,水迷宫实验数据采用重复测量进行分析。实验结果以均值 ± 标准误 ($\bar{x} \pm s$) 表示, $P < 0.05$ 表示差异有显著性。

2 结果

2.1 体重的结果

如表 1 所示,慢性束缚应激(10 h/d, 28 d)能显著抑制两种品系大鼠体重的增加。其中,与对照组相比, Wistar 模型大鼠从束缚 7d 开始体重显著降低 ($P < 0.001$)。SD 模型组体重的变化趋势与 Wistar 相似,即与对照组相比,从第 7 天开始束缚应激对 SD 大鼠体重的增加具有显著抑制作用。直到束缚第 28 天,两种品系大鼠体重依旧显著低于各自对照组 ($P < 0.001$)。

2.2 新物体识别实验结果

如表 2 所示,在新物体识别实验中, Wistar 大鼠模型组与对照组在熟悉期的探索总时间没有显著差异;在检测期,模型组辨别指数 (DI) 为负值且低于对照组,但没有显著差异。慢性束缚应激对 SD 大鼠熟悉期的探索行为也没有产生显著影响^[11],即模型组与对照组探索总时间没有显著差异;而束缚应激使 SD 模型大鼠检测期的 DI 明显降低,且与对照组比差异性有显著 ($P < 0.05$)。

表 1 慢性束缚应激对两种品系大鼠体重的影响 ($n = 6, \bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Effects of chronic restraint stress on body weight of the Wistar and SD rats

组别 Groups		第 1 天 Day 1	第 7 天 Day 7	第 14 天 Day 14	第 21 天 Day 21	第 28 天 Day 28
Wistar	对照 Control	196.8 ± 2.9	251.0 ± 3.9	296.9 ± 6.0	332.8 ± 7.2	356.8 ± 8.7
	模型 model	203.0 ± 1.9	208.1 ± 4.8***	233.4 ± 7.3***	269.6 ± 9.7***	291.6 ± 9.9***
SD	对照 Control	193.0 ± 5.6	254.3 ± 6.1	319.5 ± 8.5	364.0 ± 9.3	386.9 ± 10.9
	模型 model	193.0 ± 3.6	210.4 ± 5.5***	238.1 ± 5.3***	280.1 ± 4.1***	303.1 ± 2.8***

注:与对照组比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

Note: Compared with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

表 2 慢性束缚应激对两种品系大鼠新物体识别实验的影响 ($n = 6, \bar{x} \pm s$)

Tab. 2 Effects of chronic restraint stress on the Wistar and SD rats in novel object recognition test.

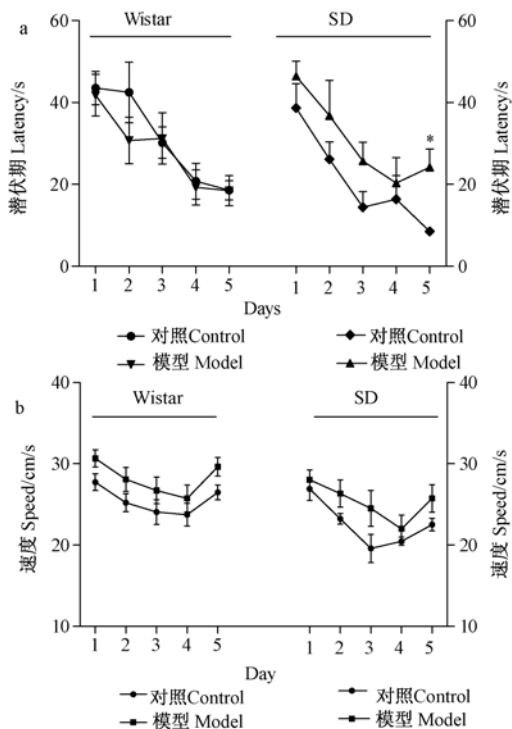
组别 Groups		探索总时间/s Total exploration time	辨别指数/% Discrimination index (DI)
Wistar	对照 Control	32.8 ± 3.3	8.4 ± 6.4
	模型 Model	31.1 ± 5.5	-7.5 ± 5.1
SD	对照 Control	40.8 ± 2.6	6.2 ± 7.3
	模型 Model	34.4 ± 6.4	-20.8 ± 7.3*

注:与对照组比, * $P < 0.05$ 。

Note: Compared with the control group, * $P < 0.05$.

2.3 水迷宫空间学习实验结果

慢性束缚 28d 后的空间学习能力检测表明, Wistar 模型组学习记忆能力改变不明显,其潜伏期与对照组比较差异无显著性(图 1a)。同时由图 1 可以看出,SD 模型组大鼠的潜伏期与对照组比,出现稳定性的增加,在空间学习最后一天(第 5 天)束缚组的潜伏期与对照组比差异有显著性 ($P < 0.05$)。而两种品系大鼠水迷宫空间学习阶段的游泳速度与各自模型组比差异无显著性(图 1b)。



注: a. 对潜伏期的影响, b. 对游泳速度的影响。* 表示与对照组比 $P < 0.05 (n = 6, \bar{x} \pm s)$ 。

图 1 慢性束缚应激对两品系大鼠水迷宫空间记忆的影响

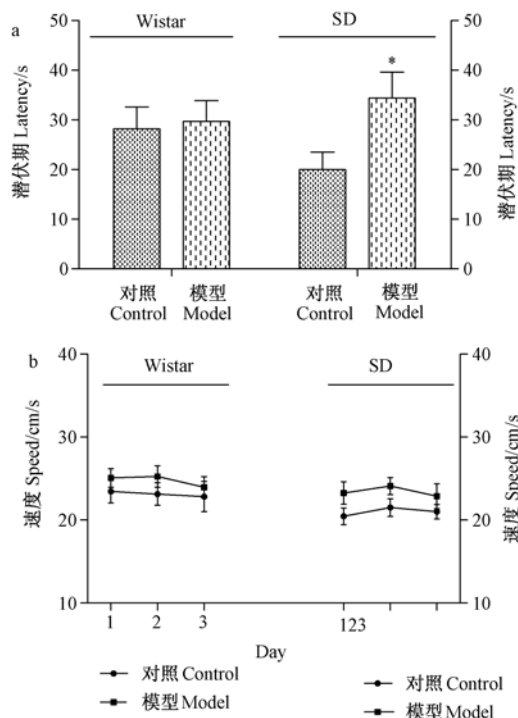
Fig. 1 Effect of chronic restraint stress on spatial learning of Wistar and SD rats assessed by Morris water maze test. Compared with the control group, * $P < 0.05$.

2.4 水迷宫工作记忆实验结果

在工作记忆检测中, 计算第 2 次训练潜伏期的平均值作为评价工作记忆能力指标^[8,12]。由图 2 a 可知, 每天束缚 10 h, 束缚 28 d 后, SD 模型组寻台时间延长, 潜伏期增加, 与其相应对照组比差异有显著性 ($P < 0.05$)。而束缚应激对 Wistar 大鼠工作记忆能力影响不显著。由图 2b 可知, 工作记忆阶段, 束缚应激对 Wistar、SD 两种大鼠游泳速度的影响不显著。

3 讨论

SD 和 Wistar 均属于远交系封闭群白色大鼠, 是国际和国内临床前实验研究、学习记忆损伤机制研究以及相关防护药物筛选中常用的动物品系。束缚, 是将动物置于无法逃脱的应激环境中, 通过行为制动的方式, 模拟人类社会无法避免的拥挤、压力性空间等应激因素, 造成动物心理应激的一种常用的造模方法。慢性束缚, 是持续时间较长的一种造模方式, 一般造模时间大于 1 d^[13]。更好的模拟了



注: a. 对潜伏期的影响, b. 对游泳速度的影响。* 表示与对照组比 $P < 0.05 (n = 6, \bar{x} \pm s)$ 。

图 2 慢性束缚应激对两品系大鼠水迷宫工作记忆的影响

Fig. 2 Effect of chronic restraint stress on the working memory of Wistar and SD rats assessed by Morris water maze test. Compared with the control group, * $P < 0.05$.

现代社会中, 人们面临的压力持续时间增加的情况。本实验首次通过两种不同的认知行为学评价方法考察束缚应激对这两品系大鼠学习记忆能力的影响。

水迷宫定位航行实验是考察动物空间学习记忆能力的一种常用方法^[8]。本实验的结果表明慢性束缚应激 (10 h, 28 d) 对 SD 大鼠空间学习记忆的损伤更明显 (见图 1)。这与两品系大鼠中枢神经系统中海马区神经元的数量及功能有关。应激特征性地对 HPA 轴 (下丘脑-垂体-肾上腺轴) 的激活, 最终会导致糖皮质激素 (大鼠主要为皮质酮, 人主要为皮质醇) 分泌的增加^[14]。糖皮质激素在中枢系统中, 主要通过海马神经元中丰富的糖皮质激素受体, 影响与海马密切相关的空间学习记忆^[15-16]。而 SD 大鼠较 Wistar 大鼠海马 CA1 区和 CA3 区含量更为丰富的锥体神经元细胞^[17], 可能是应激引起 SD 大鼠神经元损伤强度和波及范围更广, 进而导致空间学习记忆能力出现更为明显的损伤的重要原因。

新物体识别实验是评价动物识别记忆的简单、灵敏的方法^[10]。本研究中, 两品系模型大鼠在熟悉

期表现出与各自对照组相同的探索能力,但是检测期的辨别指数与对照组比出现差异。这排除了探索行为的改变对认知检测结果的干扰,同时表明束缚应激对大鼠的识别记忆能力产生损伤,且对 SD 大鼠的损伤更明显(见表 2)。

水迷宫工作记忆实验结果也表明,慢性束缚应激对 SD 大鼠的非空间学习记忆能力的损伤较 Wistar 大鼠更明显(见图 2)。

结果表明,慢性束缚应激引起的外周作用在两品系大鼠中表现一致^[18]。两种检测方法中,水迷宫对动物的体力要求较高,其具体体现在游泳速度上。而图 1,2 表明束缚应激在对速度的影响不显著的情况下,可引起空间学习能力、工作记忆的损伤。进而表明体重下降只是应激引起的外周作用的一种表现,与学习记忆能力并没有一定的相关性。

在慢性束缚应激模型建立过程中,根据所用束缚器的形状、规格不同,主要有以下的束缚方式^[19]:(1)将动物置于圆形或锥形透明树脂束缚器内;(2)将动物固定于平板或衬垫上;(3)将动物裹在毛巾中;(4)将动物置于金属铁丝束缚器中,等。本研究所用方式在不影响动物生理代谢的情况下,尽量避免了对动物的物理性伤害,产生单纯由压力性空间所导致的心理应激模型。符合动物伦理的要求,同时满足了心理应激的造模条件。

同时,本实验通过 2 种行为学方法(物体认知、水迷宫)中的 3 种模式(新物体识别模式、空间记忆模式、工作记忆模式),分别考察了所采用的慢性束缚应激(10 h,28 d)造模方式对 Wistar、SD 两品系大鼠空间、非空间学习记忆能力的影响。3 种模式的实验结果均表明本研究采用的束缚应激方式可对大鼠认知能力产生损伤,且 SD 大鼠的损伤更明显。因此,本方法可作为束缚应激造模的一种方法,用以研究心理应激对学习记忆能力的影响。且本实验研究结果表明,在束缚应激所致认知损伤机制研究以及防护药物的筛选中,选用 SD 大鼠作为实验动物更为适宜。

参 考 文 献

- [1] Bowman RE. Stress-induced changes in spatial memory are sexually differentiated and vary across the lifespan [J]. *J Neuroendocrinol*. 2005;17(8):526-535.
- [2] Bergdahl J, Larsson A, Nilsson LG, et al. Treatment of chronic stress in employees: subjective, cognitive and neural correlates [J]. *Scand J Psychol*, 2005, 46(5):395-402.
- [3] Staufenbiel SM, Penninx BW, Spijker AT, et al. Hair cortisol, stress exposure, and mental health in humans: a systematic review [J]. *Psychoneuroendocrinology*, 2013, 38(8):1220-1235.
- [4] McEwen BS, Morrison JH. The brain on stress: vulnerability and plasticity of the prefrontal cortex over the life course [J]. *Neuron*. 2013, 79(1):16-29.
- [5] Jin LE. Reducing the harm of stress: medications to rescue the prefrontal cortex and overcome bad habits: the science of stress: focus on the brain, breaking bad habits, and chronic disease [J]. *Yale J Biol Med*, 2011, 84(4):479-482.
- [6] 何怡然,马静遥,陈铃铃,等. DS-1226 对慢性限制活动大鼠的抗抑郁作用 [J]. *中国实验动物学报*, 2013, 21(3):42-47.
- [7] Trofimiuk E, Walesiuk A, Braszko JJ. St John's wort (*Hypericum perforatum*) diminishes cognitive impairment caused by the chronic restraint stress in rats [J]. *Pharmacol Res*, 2005, 51(3):239-246.
- [8] Vorhees CV, Williams MT. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory [J]. *Nat Protoc*, 2006, 1(2):848-858.
- [9] 王琳,田绍文,黄伏连,等. Neu-P11 与褪黑素增强大鼠物体识别记忆 [J]. *中南医学科学杂志*, 2012, 40(3):223-226.
- [10] 宋广青,孙秀萍,刘新民. 大鼠物体识别实验方法综述 [J]. *中国比较医学杂志*, 2013, 23(7):55-60, 67.
- [11] 宋广青,高莉,孙秀萍,等. 大鼠物体识别实验装置的研制 [J]. *中国比较医学杂志*, 2013, 23(8):80-86.
- [12] Liu P, Huang Z, Gu N. Exposure to silver nanoparticles does not affect cognitive outcome or hippocampal neurogenesis in adult mice [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2013, 87:124-130.
- [13] 谢兴振,迟晓丽,周文霞,等. 应激动物模型研究进展 [J]. *中国新药杂志*, 2008, (16).
- [14] Magarinos AM, McEwen BS. Stress-induced atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3c neurons: involvement of glucocorticoid secretion and excitatory amino acid receptors [J]. *Neuroscience*, 1995, 69:89-98.
- [15] Magariños AM, Verdugo JM, McEwen BS. Chronic stress alters synaptic terminal structure in hippocampus [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997, 94(25):14002-14008.
- [16] Conrad CD. What is the functional significance of chronic stress-induced CA3 dendritic retraction within the hippocampus? [J]. *Behav Cogn Neurosci Rev*. 2006, 5(1):41-60.
- [17] Boss BD, Turlejski K, Stanfield BB, et al. On the numbers of neurons in fields CA1 and CA3 of the hippocampus of Sprague-Dawley and Wistar rats [J]. *Brain Res*. 1987, 406(1-2):280-287.
- [18] 徐建芬. 慢性束缚应激损害小鼠学习记忆和抑制体重增加 [J]. *浙江教育学院学报*, 2004, (5):26-30.
- [19] Buynitsky T, Mostofsky DI. Restraint stress in biobehavioral research: Recent developments. *Neurosci Biobehav Rev*. 2009 Jul;33(7):1089-1098.