

听觉剥夺幼鼠学习记忆能力及听皮质超微结构研究

王淑玉¹ 李晓明² 赵 丽¹ 李建红² 路秀英²

摘要

目的:探讨听觉剥夺对幼鼠学习记忆的影响及听皮质细胞超微结构的变化。

方法:将36只SD幼鼠随机分为听觉剥夺组和正常对照组。听觉剥夺组在生后第7天用阿米卡星500mg/kg·d皮下注射,直到生后第16天,建立听觉剥夺模型。分别于生后第3周、5周、7周进行Morris水迷宫测试,检测各组幼鼠的学习记忆能力。行为学测试完毕后,观察听皮质超微结构的变化。对照组只进行等容量生理盐水皮下注射。

结果:①定位航行实验:3周龄听觉剥夺组和对照组每天逃避潜伏期差异均无显著性意义(P 值均 >0.05);5周龄听觉剥夺组幼鼠自第2天起,每天的逃避潜伏期均较同龄对照组延长,差异有显著性意义(P 值分别 $P<0.05$ 、 $P<0.01$ 、 $P<0.01$);7周龄听觉剥夺组幼鼠每天逃避潜伏期均较同龄正常鼠延长,差异有显著性意义(P 值分别 $P<0.05$ 、 $P<0.01$ 、 $P<0.01$ 、 $P<0.01$)。②空间探索实验:生后3周龄幼鼠听觉剥夺组及对照组在目标象限游泳时间及跨越平台次数差异无显著性意义($P>0.05$);5周龄、7周龄听觉剥夺组在目标象限的游泳时间均短于正常对照组($P<0.05$ 、 $P<0.01$),跨越平台次数较对照组减少,差异均有显著性意义(P 值均 <0.05)。③对照组神经元形态完整,结构清晰,细胞器丰富;突触丰富,突触前膜、后膜结构及突触间隙清晰,突触囊泡多。听觉剥夺组神经元肿胀,细胞器明显减少;突触囊泡数量减少,突触前、后膜结构模糊不清,突触间隙融合。

结论:听觉剥夺幼鼠学习记忆能力下降,并与听皮质神经元及突触超微结构改变密切相关。

关键词 听觉剥夺; 学习; 记忆; 听皮质

中图分类号:R764.43, R493 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2010)-11-1047-04

The effects of auditory deprivation on abilities of learning and memory and the changes of ultrastructure of auditory cortex in newborn rats/WANG Shuyu, LI Xiaoming, ZHAO Li, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2010, 25(11): 1047—1051

Abstract

Objective: To investigate the effects of auditory deprivation (AD) on abilities of learning and memory and the changes of ultrastructure of auditory cortex in newborn rats.

Method: Experiments were performed on 36 newborn Sprague-Dawley rats. Animals were randomly assigned to two experimental groups: AD group and normal control (NC) group. Newborn rats in AD group were given amikacin 500mg/kg·d subcutaneously from the 7th (P7) to the 16th (P16) postnatal d to establish auditory deprivation models. Newborn rats in NC group were given the same volume of normal saline subcutaneously only. The abilities of learning and memory were tested by Morris water maze at different time points. After behavior test, the ultrastructure of auditory cortex neurons were observed by electron microscope.

Result: ①Place navigation test: Comparisons were made among the mean escape latencies each d. At the P3week, comparisons between AD group and NC group showed no significant difference everyday ($P>0.05$). At the P5week, from the 2nd d on, the mean escape latencies of rats in AD group were much longer than those in NC group ($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.01$). At the P7 week, from the 1st d on, the mean escape latencies of rats in AD group were much longer than those in NC group ($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.01$, $P<0.01$). ②Spatial probe test (SPT): the time for

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2010.11.007

1 白求恩国际和平医院儿科,河北石家庄,050082; 2 白求恩国际和平医院耳鼻咽喉-头颈外科

作者简介:王淑玉,女,副主任医师; 收稿日期:2009-11-03

swimming in target quadrant in AD group decreased significantly compared with that in NC group after the P5 week ($P<0.01$ and $P<0.05$), the times of crossing the platform in AD group reduced significantly compared with that in NC rats after the P5 week ($P<0.01$ and $P<0.05$). ③In auditory cortex area of rats in NC group, there were intact neurons, distinct structure, abundant organellae. Synapses were abundant with distinct pre-and-post synaptic membranes and rich synaptic vesicles. The synaptic cleft was clear. In AD group, however, there were edematous neurons, mitochondria, Golgi apparatus and polyribosome reduced, synapses reduced with indistinct pre-and-post synaptic membranes, synaptic vesicles decreased. The synaptic cleft was unclear.

Conclusion: Auditory deprivation can decrease the abilities of learning and memory in newborn rats, which is correlated with the changes in the ultrastructure of auditory cortex neurons and synapses.

Author's address Department of Pediatric, Bethune International Peace Hospital, Shijiazhuang, Hebei, 050082

Key words auditory deprivation; learning; memory; auditory cortex

听力障碍是儿童期的主要残疾之一。按照平均每年出生 2000 万新生儿计算,我国每年将新增加听力障碍新生儿 2—4 万名。动物研究已经表明,长期听觉剥夺会引起中枢听觉系统广泛的退化性变化^[1],包括脑干核团间神经投射改变,皮质-皮质间、皮质-丘脑间突触活动联系减少等。本研究通过对实验性听觉幼鼠行为学检查及电镜检查听皮质超微结构,探讨听力障碍对幼鼠学习记忆能力的影响。为听力障碍儿童早期发现、早期干预及针对性康复教育提供理论依据。对提高听力障碍儿童生存质量,提高人口素质有着非常重要的意义。

1 材料与方法

1.1 材料

实验动物与分组:新生 Sprague Dawley(SD) 幼鼠,36 只,由河北医科大学实验动物中心提供,雌雄不拘,体重 9—14g。随机分为实验组(听觉剥夺组)和对照组,各 18 只。实验组在生后第 7 天开始用阿米卡星(amikacin)500mg/kg·d 皮下注射,直到生后第 16 天。听力损失每天通过大鼠的行为变化、耳廓反射来评估,最后通过听觉脑干反应(ABR)检测在 103dB nHL 无反应。对照组皮下注射相同次数、同等容量的生理盐水。每组分别按出生日龄不同分 3 个时相点,生后 3 周龄、5 周龄、7 周龄,每周龄组 6 只。

1.2 仪器

Morris 水迷宫,用来测定幼鼠的学习记忆能力^[2]。包括一个圆形不锈钢水池,直径 120cm,高 50cm。池壁上标有东西南北 4 个入水点,将水池等分为 4 个象限。目标象限的中央放置一直径为 9cm,

高 27cm 的隐藏平台,整个实验期间其位置保持不变,水池中水面高于平台 1cm。水中加入适量奶粉,温水冲开,以隐蔽平台,水温保持在 26℃左右。实验期间迷宫外参照物始终保持不变。

1.3 水迷宫行为测定

整个实验过程分为定位航行实验(place navigation test,PNT)和空间探索实验(spatial probe test,SPT)。

①定位航行实验:用于测量幼鼠在水迷宫中的学习和记忆能力。实验历时 4d。实验前幼鼠自由游泳 2min,熟悉环境。正式实验每天上午、下午固定时间各训练 4 次。每次每只幼鼠随机从每个象限的中点面壁式入水 1 次,记录自入水到找到并爬上平台的时间,即逃避潜伏期(escape latency,EL)。爬上平台后,让其停留 10s,然后再进行下一次训练。如 60s 仍未找到平台,由操作者将幼鼠引上平台休息 20s,并将逃避潜伏期记为 60s。计算每天各组 4 次逃避潜伏期的平均值。

②空间探索实验:用于测量幼鼠对平台空间位置的准确记忆,即记忆保持能力。第 5 天撤除平台,任选一个入水点将幼鼠放入水中,测量 60s 内:动物在目标象限(原平台所在象限)的游泳时间;跨越平台次数。

1.4 标本制备及取材方法

随机选取每组 3 只大鼠,10%水合氯醛(35 mg/kg)腹腔注射麻醉,开胸暴露心脏,经左心室快速灌入 37℃生理盐水约 40ml,肝脏变白后先快后慢滴注 0.1M 磷酸盐缓冲液(含 4%多聚甲醛,2.5%戊二醛,PH 值 7.2)约 100ml,开颅剥离大鼠脑组织,冰上取听皮质组织,按照大鼠脑立体定位图谱,在解剖镜下

切取 1mm³ 大小的听皮质组织块,放入 4%戊二醛固定液中固定。送河北医科大学电镜室,在 H-7500 透射电镜下观察并拍照。

1.5 统计学分析

实验数据以均数±标准差表示,采用两样本比较 *t* 检验,SPSS11.0 统计学软件进行统计学分析。

2 结果

2.1 定位航行实验

记录各组大鼠定位航行实验所测试的学习成绩,每日逃避潜伏期取其平均值进行比较。结果显示:经过 4d 的寻找隐藏平台的训练,幼鼠的逃避潜伏期迅速下降,到第 4 天达精准水平。3 周龄听觉剥夺组和对照组每天逃避潜伏期差异均无显著性意义 (*t* 值分别为:1.19、0.37、1.01、1.22, *P* 值均 >0.05); 5 周龄听觉剥夺组幼鼠第 1 天逃避潜伏期差异无显著性意义 (*t*=1.23, *P*>0.05),自第 2 天起,每天的逃避潜伏期均较同龄对照组延长,差异有显著性意义 (*t* 值分别为:2.53、3.74、3.89, *P* 值分别 *P*<0.05、*P*<0.01、*P*<0.01); 7 周龄听觉剥夺组幼鼠自第 1 天起,每天的逃避潜伏期均较同龄的正常鼠延长,差异有显著性意义 (*t* 值分别为:3.24、4.95、3.13、6.12, *P* 值分别 *P*<0.05、*P*<0.01、*P*<0.01、*P*<0.01)。见表 1。

2.2 空间探索实验站台区域的搜寻时间和穿过站台区域的次数

生后 3 周龄幼鼠听觉剥夺组及对照组在目标象限游泳时间及跨越平台次数差异无显著性意义 (分别为 *t*=1.24, *t*=0.98, *P*>0.05); 5 周龄、7 周龄听觉剥

夺组在目标象限的游泳时间均明显短于正常对照组 (*t*=3.27, *t*=4.13, *P*<0.05 和 *P*<0.01), 跨越平台的次数也较对照组明显减少, 差异均有显著性意义 (*t*=2.27, *t*=2.39, *P* 值均 <0.05)。说明听觉剥夺后幼鼠的空间记忆保持能力及空间定位的准确性下降(表 2)。

表 2 不同年龄幼鼠实验组与对照组水迷宫在目标象限的游泳时间及穿越平台次数比较 ($\bar{x}\pm s$)

	目标象限游泳时间(s)		跨台次数(次)	
	实验组	对照组	实验组	对照组
P3w	12.4±6.8	13.1±7.2	2.3±2.4	2.7±2.1
P5w	22.7±5.7 ^①	30.5±3.6	4.2±3.1 ^①	6.3±2.5
P7w	24.4±6.2 ^②	38.1±5.7	4.7±2.5 ^①	6.7±2.4

与实验组比较:①*P*<0.05, ②*P*<0.01

2.3 听觉剥夺幼鼠听皮质细胞超微结构的变化

正常对照组:突触丰富,突触前膜、后膜结构清晰,突触前终末靠近突触间隙一侧聚集许多圆形的突触囊泡,突触间隙清晰。神经元形态完整,结构清晰,双层核膜清晰、完整,细胞核为圆形,染色质均匀分布,胞质内细胞器丰富,可见线粒体、粗面内质网、滑面内质网和大量的核糖体。线粒体丰富,为圆形或椭圆形,嵴清晰可见。粗面内质网和高尔基体发达。大量核糖体聚集,呈花瓣状或环形。见图 1。

听觉剥夺组:突触前成分基质水肿,突触囊泡数量减少,突触前、后膜结构模糊不清,突触间隙融合,模糊不清。神经元细胞核肿胀,形态不规则,双层核膜融合,模糊不清。细胞质明显水肿,细胞器数量明显减少,线粒体大部或全部嵴或膜融合,模糊不清,空泡化。粗面内质网脱颗粒,游离核糖体减少(图 2)。

3 讨论

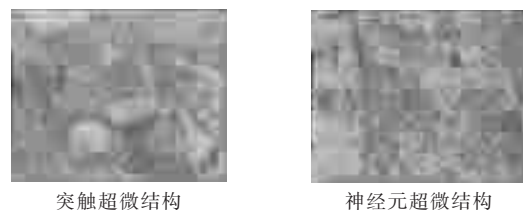
研究证实,听觉发育期内的听力剥夺导致神经髓鞘化进程的延迟,听觉系统结构萎缩或发育不全^[1]。听觉输入的阻断对认知、行为和社会发展产生复杂的连锁反应。听力障碍与认知功能损害的关系越来越受到人们的关注。

表 1 不同年龄幼鼠实验组与对照组水迷宫逃避潜伏期比较 ($\bar{x}\pm s$)

	3 周龄	5 周龄	7 周龄
第 1 天			
实验组	59.8±1.8	57.3±6.7	54.8±6.2 ^①
对照组	58.8±5.7	52.5±8.9	44.6±11.1
第 2 天			
实验组	55.6±7.4	48.3±9.9 ^①	37.8±8.8 ^②
对照组	54.3±9.1	31.2±9.8	20.4±4.9
第 3 天			
实验组	53.4±10.2	40.5±16.3 ^②	31.2±14.1 ^②
对照组	51.9±4.6	23.2±11.5	16.3±6.3
第 4 天			
实验组	53.1±10.1	31.2±13.2 ^②	22.3±9.7 ^②
对照组	52.2±9.6	16.2±4.6	12.6±5.9

与实验组比较:①*P*<0.05, ②*P*<0.01

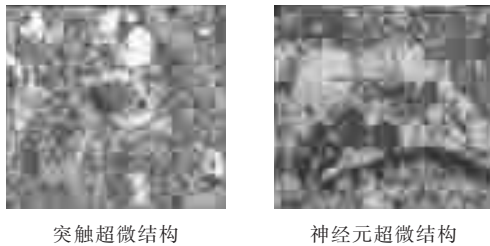
图 1 正常对照组听觉皮质超微结构



突触超微结构

神经元超微结构

图2 听觉剥夺组听觉皮质超微结构



学习与记忆是大脑的高级神经功能活动过程,是认知活动的组成部分,也是重要的智力因素。学习是指接受外界环境的信息而影响自身行为的过程。记忆是指对获得的信息在脑内进行储存、加工和提取的过程。感觉输入的剥夺会影响神经系统的发育,一个感觉通道的缺陷会对其他感觉通道产生不良影响^[3-4]。动物实验证实,早期听觉剥夺对听觉通路神经结构有显著的结构、代谢和功能影响,包括神经元萎缩、蛋白和神经递质合成和释放改变,以及生理学上发生异常变化,影响认知、行为和运动的发展。本研究采用行为学检查手段及电镜技术,观察了听觉剥夺幼鼠学习记忆能力的变化及听皮质超微结构变化。

大鼠生后第9天外耳道打开,之后外界声音信息传入听觉中枢,激活神经元突触连接和相关神经网络的快速发育。本研究在生后第7天开始用阿米卡星皮下注射致听觉损害,这与听觉功能开放的时间一致,也与耳毒性抗生素敏感的关键期一致^[5-6]。因此,幼鼠没有听觉经历,模拟了儿童重度语前聋。

Morris水迷宫是英国心理学家Morris于20世纪80年代初设计和使用的进行大鼠空间学习记忆研究的装置^[7]。幼鼠通过对环境标志物空间位置的比较和评价,学会寻找并爬上水下隐蔽平台以逃避溺死,这种获取经验的能力可以反映动物的空间学习记忆能力。记忆进入意识系统的储存机制主要涉及海马和大脑皮质的有关脑区^[8]。本研究显示,正常幼鼠及听觉剥夺幼鼠的学习、记忆能力随年龄增长有逐渐增强趋势。生后3周听觉剥夺组及对照组幼鼠迷宫逃避潜伏期及在目标象限游泳时间及跨越平台次数差异无显著性意义,表明幼鼠早期的学习记忆能力尚未发育完善,听觉缺乏对幼鼠空间学习记忆能力尚无影响。但随着听觉剥夺持续时间的延

长,致聋幼鼠逃避潜伏期明显长于正常同龄对照组,其在目标象限游泳时间及跨越平台次数也少于正常对照组,说明听觉缺乏对幼鼠学习记忆能力的影响日益显现。

行为依赖性突触可塑性是学习记忆的重要机制。本研究采用电镜对听皮质神经元及突触超微结构的观察,发现听觉剥夺后听皮质神经元胞质水肿,线粒体嵴和膜融合,核糖体等多种细胞器明显减少。突触结构发生异常,突触前囊泡数量明显减少,突触间隙模糊不清。突触后膜结构模糊,小泡数量明显减少。原因可能是听觉信息不足,使敏感细胞器如线粒体肿胀、空化,内质网扩张、脱颗粒,高尔基体扩张,细胞合成或分泌蛋白质的过程受阻,基因或基因产物的表达改变^[9],致使神经元代谢紊乱。对致聋的猫研究显示,在听觉神经纤维和耳蜗核神经元的突触连接界面发生结构异常。突触间隙消失,突触囊泡减少,突触后电子致密物曲率丢失。Kral^[10]研究表明,先天性聋的猫皮质突触活性显著降低。听觉剥夺导致内在的皮质微环路的功能不良,颗粒细胞层活化延迟,颗粒下层活性降低。说明听觉剥夺导致听皮质发育延迟以及突触电流改变^[11],神经元静息膜电位呈现去极化状态^[12],输入阻抗增加。此外,研究显示先天性聋的猫听皮质AI区初级树突和次级树突较正常听力的猫减少,这与突触电流的减弱有关^[13]。由此说明听觉剥夺后神经元之间的胞间联络减弱,导致不同传导回路的延迟,因此对刺激发生不同步的神经活动,这种同步化的丧失会反过来影响颞叶的信息处理,产生一系列相关的功能障碍,学习记忆能力下降。

综上所述,药物导致的耳毒性聋大鼠听皮质神经元与突触超微结构发生了一系列变化,进而影响了神经元与突触的功能,导致学习记忆障碍。说明听觉丧失对认知过程产生不利影响,因而为进一步研究听力障碍儿童的认知发育提供了理论基础。

参考文献

- [1] Dammeijer PF, Schlundt Bodien QC, Chenault MN, et al. Effects of early auditory deprivation and stimulation on auditory brainstem responses in the rat [J].Acta Otolaryngol, 2002,122(7):

(下转第1055页)