

丁酸钠对慢性应激模型大鼠空间学习记忆能力的影响

彭 静*(乐山职业技术学院康复基础教研室,四川 乐山 614000)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)16-2233-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.16.21

摘要 目的:研究丁酸钠对慢性应激模型大鼠空间学习和记忆能力的影响。方法:将SD大鼠随机分为对照组(生理盐水)、模型组(生理盐水)和丁酸钠低、中、高剂量组(50、100、200 mg/kg),每组14只。模型组和丁酸钠各剂量组大鼠给予21 d电击足底刺激,每日1次,每次2 h,以复制慢性应激模型;在刺激前0.5 h ip相应药物。采用Morris水迷宫试验测试各组大鼠的空间学习记忆能力(以逃避潜伏期为指标,连续测试5 d);Western blot法检测海马组织中乙酰化组蛋白H3(acH3)、acH4、磷酸化环磷酸腺苷(cAMP)反应元件结合蛋白(p-CREB)、脑源性神经营养因子(BDNF)的表达情况。结果:与对照组比较,模型组和丁酸钠各剂量组大鼠在测试第2天开始逃避潜伏期明显延长($P<0.05$),acH3、acH4、p-CREB、BDNF表达均降低($P<0.05$)。与模型组比较,丁酸钠各剂量组大鼠的逃避潜伏期缩短,其中高剂量组最明显(测试第2天开始差异有统计学意义)($P<0.05$);acH3、acH4、p-CREB、BDNF表达均增强($P<0.05$)。结论:丁酸钠可改善慢性应激造成的大鼠空间学习记忆能力下降,其机制可能是通过恢复大鼠海马区域的组蛋白乙酰化水平,进而上调认知相关蛋白p-CREB、BDNF的表达来实现。

关键词 丁酸钠;慢性应激;大鼠;学习;记忆;认知相关蛋白

Effects of Sodium Butyrate on Spatial Learning and Memory Ability in Chronic Stress Model Rats

PENG Jing(Rehabilitation Based Teaching and Research Section, Leshan Vocational and Technical College, Sichuan Leshan 614000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the effects of sodium butyrate on spatial learning and memory ability in chronic stress model rats. METHODS: SD rats were randomly divided into control group (normal saline), model group (normal saline) and sodium butyrate low-dose, medium-dose and high-dose groups (50, 100, 200 mg/kg) with 14 rats in each group. Model group and sodium butyrate groups received plantar stimulation by electric shock for 21 d, once a day, 2 h each time, to induce chronic stress model. They were given relevant medicine ip 0.5 h before stimulation. Morris water maze test was adopted to test spatial learning and memory ability of rats (using escape latency as index, for consecutive 5 d). Western blot assay was used to detect the expression of acH3, acH4, cAMP, p-CREB and BDNF in hippocampus. RESULTS: Compared with control group, escape latency of model group and sodium butyrate groups prolonged significantly on the second day ($P<0.05$), and the expression of acH3, acH4, p-CREB and BDNF decreased ($P<0.05$). Compared with model group, escape latency of sodium butyrate groups shortened, especially in high-dose group (there was statistical significance on the second day of test) ($P<0.05$); the expression of acH3, acH4, p-CREB, and BDNF enhanced ($P<0.05$). CONCLUSIONS: Sodium butyrate can improve chronic stress-induced the decrease of spatial learning and memory ability, the mechanism of which may be recovering histone acetylation level of chronic stress rat hippocampus, and increasing cognitive related proteins such as p-CREB and BDNF.

KEYWORDS Sodium butyrate; Chronic stress; Rat; Learning; Memory; Related protein of cognition

慢性应激以一系列神经内分泌反应及由此引起的各种机能和代谢的改变,是机体受到强烈刺激后产生的非特异性适应反应^[1]。长期应激会引起海马组织损伤,并进一步导致学习和记忆功能受损^[2]。多种神经递质及认知相关蛋白表达的改变参与了慢性应激所致认知功能损害进程,如糖皮质激素、5-羟色胺、磷酸化环磷酸腺苷(cAMP)反应元件结合蛋白(p-CREB)和脑源性神经营养因子(BDNF)等均在慢性应激所致认知功能损害过程中发挥了重要作用^[3]。此外,慢性应激也可以通过增强组蛋白去乙酰化酶的作用,引起海马组蛋白乙酰化水平下降,并减少认知相关蛋白的转录,导致神经突触结构和功能受损,使得认知功能受损^[4]。而相关研究表明,丁酸钠可作用于离体的大鼠脑组织,显著增加慢性不可预知应激模型大鼠海马区域的组蛋白乙酰化水平^[5]。因此,本研究拟建立大鼠慢性应激模型并给予丁酸钠,观察其对模型大鼠空间学习、记忆能力的影响并探讨相关机制,以期慢性应激所致

认知功能损害提供一种新的治疗手段。

1 材料

1.1 仪器

DYY-6C型电泳仪、DYCZ-24D型垂直电泳槽、DYCZ-40D型电转印系统(北京六一仪器厂)。

1.2 药品与试剂

丁酸钠原料药(美国Sigma公司,批号:20140810,纯度:≥98.5%);乙酰化组蛋白H3(acH3)、acH4、p-CREB、CREB、BDNF和甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)多克隆抗体(美国Millipore公司);其他试剂为国产分析纯。

1.3 动物

SPF级SD大鼠,♂,体质量(200±20)g,由四川大学动物实验中心提供,动物许可证号:SCXK(川)2008-119。大鼠饲养于SPF环境,室温为(22±2)℃,湿度为50%~55%,昼夜节律(12 h/12 h)。大鼠可自由饮食饮水,在适应环境1周后开始实验。

2 方法

2.1 分组与给药

* 讲师,硕士。研究方向:老年痴呆发病机制与治疗。E-mail: pengjings@126.com

将SD大鼠随机分为5组,每组14只,分别为对照组、模型组和丁酸钠低、中、高剂量组(50、100、200 mg/kg)。模型组和丁酸钠各剂量组大鼠给予电击足底刺激,电击参数为脉冲电压80 V,持续时间50 ms,每2~25 s之间随机发生1次;每日1次,每次2 h,共21 d。每次实施刺激前0.5 h,丁酸钠各剂量组大鼠ip相应剂量的丁酸钠,而模型组和对照组大鼠ip等体积的生理盐水。分别于给药前和给药后7、14、21 d称定各组大鼠体质量。

2.2 Morris水迷宫测试大鼠逃避潜伏期

每日给药完毕后,将大鼠由4个入水点分别放入水中1次,入水点的先后顺序随机产生。记录大鼠找到平台的时间,即逃避潜伏期,可作为大鼠学习水平的依据。大鼠每次寻找平台的时间设定为120 s,时间结束后用木棍引导尚未找到平台的大鼠到达平台,未找到平台的大鼠的逃避潜伏期记录为120 s。所有大鼠上平台后停留20 s,使其通过观察周围环境记住平台的位置,学习结束后放回笼中。本实验中定位导航试验共进行了5 d,所有测试在每日同一时间完成。

2.3 Western blot法检测大鼠神经递质及认知相关蛋白表达

采用10%水合氯醛ip麻醉大鼠(350 mg/kg),大鼠对疼痛刺激无反应后迅速断头,用小止血钳小心剥离颅骨,取出脑组织置于冰上,快速分离出大鼠双侧海马组织,分别置于标记好的冻存管后立即放入液氮中暂存,待所有组织取完后统一放入-80℃冰箱中保存。采用蛋白抽提试剂盒提取海马组织蛋白,采用二喹啉甲酸(BCA)法对蛋白浓度进行检测,进行12%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)及转膜;分别加入适量稀释过的acH3、acH4、p-CREB、CREB、BDNF和GAPDH多克隆抗体后,4℃孵育过夜;常温下加入二抗,继续孵育2 h;显影、曝光后,分析各条带光密度值。除p-CREB相关表达量以其与CREB的光密度比值表示外,其余均以目的蛋白与GAPDH光密度的比值表示。

2.4 统计学方法

所得数据均用SPSS 15.0软件进行分析。计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用LSD、SNK检验进行分析。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠体质量变化情况

各组大鼠在给药期间体质量均平稳增长。与对照组比较,模型组和丁酸钠低、中剂量组大鼠给药14、21 d的体质量明显减轻($P < 0.05$)。与模型组比较,丁酸钠中剂量组大鼠给药21 d的体质量明显增加,丁酸钠高剂量组大鼠给药14、21 d的体质量明显增加($P < 0.05$)。这提示模型组大鼠较对照组大鼠体质量增长缓慢,而丁酸钠各剂量组大鼠的体质量增长趋势介于对照组和模型组之间,且具有剂量依赖性。各组大鼠体质量变化情况见表1。

3.2 各组大鼠空间学习和记忆能力检测结果

定位导航实验第1天,各组大鼠逃避潜伏期差异无统计学意义($P > 0.05$)。从第2天开始,模型组大鼠逃避潜伏期明显长于对照组($P < 0.05$);与模型组比较,丁酸钠各剂量组大鼠逃避潜伏期均有一定程度的缩短,其中第2天的高剂量组,第3天的中、高剂量组及第4、5天的低、中、高剂量组大鼠逃避潜伏期均明显短于模型组($P < 0.05$)。这提示丁酸钠对慢性应激模型大鼠空间学习和记忆能力具有明显的改善作用。各组大鼠逃避潜伏期测试结果见表2。

表1 各组大鼠体质量变化情况($\bar{x} \pm s, n = 14, g$)

Tab 1 Changes of body weight of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 14, g$)

组别	给药时间			
	0 d	7 d	14 d	21 d
对照组	225.38 ± 30.49	260.23 ± 28.33	289.12 ± 33.76	317.38 ± 25.57
模型组	221.05 ± 28.20	238.43 ± 25.00	252.98 ± 29.30*	261.85 ± 28.33*
丁酸钠低剂量组	228.04 ± 27.25	239.98 ± 27.25	258.33 ± 28.15*	276.74 ± 29.83*
丁酸钠中剂量组	226.08 ± 26.31	242.97 ± 29.71	262.27 ± 31.36*	285.08 ± 30.28**
丁酸钠高剂量组	223.68 ± 24.82	247.62 ± 26.76	271.22 ± 29.82*	301.76 ± 27.24*

注:与对照组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,# $P < 0.05$

Note: vs. control group,* $P < 0.05$; vs. model group,# $P < 0.05$

表2 各组大鼠逃避潜伏期测试结果($\bar{x} \pm s, n = 14, s$)

Tab 2 Results of escape latent period in rats of each group ($\bar{x} \pm s, n = 14, s$)

组别	测试时间				
	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d
对照组	78.72 ± 11.65	44.73 ± 7.41	27.24 ± 3.15	20.42 ± 3.76	13.57 ± 2.78
模型组	82.76 ± 10.53	79.17 ± 8.32*	61.15 ± 8.71*	54.51 ± 6.42*	39.15 ± 3.24*
丁酸钠低剂量组	82.72 ± 9.52	76.27 ± 9.30*	60.19 ± 8.78*	38.73 ± 4.56**	28.43 ± 3.41**
丁酸钠中剂量组	81.17 ± 10.12	71.22 ± 8.85*	52.07 ± 6.36**	33.81 ± 4.26**	26.55 ± 4.83**
丁酸钠高剂量组	81.21 ± 8.36	65.06 ± 6.34**	44.42 ± 6.72**	28.24 ± 3.78**	19.76 ± 2.45**

注:与对照组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,# $P < 0.05$

Note: vs. control group,* $P < 0.05$; vs. model group,# $P < 0.05$

3.3 各组大鼠海马组织中acH3、acH4、p-CREB和BDNF含量检测结果

与对照组比较,模型组和丁酸钠各剂量组大鼠海马组织中acH3、acH4、p-CREB、BDNF(丁酸钠高剂量组除外)表达均降低($P < 0.05$)。与模型组比较,丁酸钠低、中、高剂量组大鼠海马组织中acH3、acH4、p-CREB、BDNF表达均增强($P < 0.05$)。各组大鼠海马组织中acH3、acH4、p-CREB和BDNF表达的电泳图见图1,检测结果见表3。

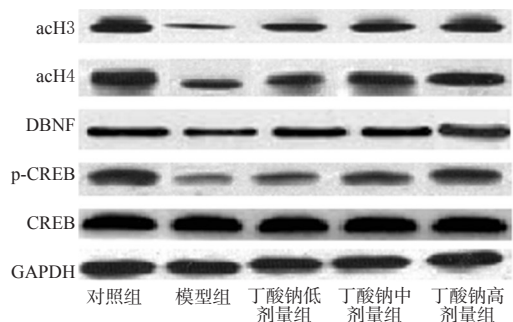


图1 各组大鼠海马组织中acH3、acH4、p-CREB和BDNF表达的电泳图

Fig 1 Electrophoretogram of the expression of acH3, acH4, p-CREB and BDNF in hippocampus of rats in each group

4 讨论

随着社会经济的快速发展及生活节奏的加快,紧急突发事件、心理紧张及各种压力所引起的机体应激反应逐渐增多^[6]。研究表明,当人们长期处于慢性应激状态时,其学习和记忆能力明显下降^[7]。海马是慢性应激致损的主要靶区,与学习及记忆功能密切相关,而Morris水迷宫是研究与海马相关的空间学习和记忆功能的经典模型^[8]。因此,本研究通过电击足底刺激的方式建立大鼠慢性应激模型,并采用Morris水迷宫试验

表3 各组大鼠海马组织中 acH3、acH4、p-CREB 和 BDNF 表达的检测结果($\bar{x} \pm s, n=14$)

Tab 3 The expression of acH3, acH4, p-CREB and BDNF in hippocampus of rats in each group($\bar{x} \pm s, n=14$)

组别	acH3/GAPDH	acH4/GAPDH	p-CREB/CREB	BDNF/GAPDH
对照组	0.82±0.13	1.21±0.15	1.03±0.08	0.76±0.05
模型组	0.24±0.03*	0.70±0.09*	0.42±0.05*	0.32±0.04*
丁酸钠低剂量组	0.43±0.06**	0.93±0.12**	0.57±0.07**	0.43±0.04**
丁酸钠中剂量组	0.51±0.08**	0.91±0.11**	0.75±0.09**	0.55±0.06**
丁酸钠高剂量组	0.66±0.11**	1.05±0.14**	0.83±0.06**	0.72±0.05*

注:与对照组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,** $P<0.05$

Note: vs. control group,* $P<0.05$; vs. model group,** $P<0.05$

评价丁酸钠对该模型大鼠的影响。研究结果表明,丁酸钠对慢性应激模型大鼠空间学习和记忆能力具有明显的改善作用。此外,通过对模型大鼠体质量的分析结果发现,模型组大鼠体质量增长明显低于对照组,提示慢性应激造成了大鼠的抑郁样行为,与文献[9]结果相一致,而丁酸钠各剂量组大鼠体质量的增长速度要快于模型组。

慢性应激可以引起海马组织中组蛋白乙酰化水平下降,从而减少认知相关蛋白的转录,最终导致神经功能受损和认知功能下降^[10]。免疫沉淀研究发现,影响多种基因转录启动子的组蛋白乙酰化部位在H3、H4位置,所以本文检测 acH3、acH4 的表达来反映组蛋白乙酰化的水平^[11]。丁酸钠属于非选择性组蛋白去乙酰化酶抑制剂,可以抑制 I 型和 II a 型组蛋白去乙酰化酶的活性^[12]。本研究发现,丁酸钠可以使慢性应激模型大鼠海马 acH3、acH4 蛋白水平均明显增加,这与 Barichello T 等^[13]的研究结果一致。此外,慢性应激所致学习及记忆功能受损与脑内营养因子的表达减少密切相关^[14]。BDNF 是维持神经元功能、再生修复及重塑的重要因子,当长期处于慢性应激状态时,大鼠海马区 BDNF 表达明显降低^[15]。本研究结果表明,模型组大鼠海马区 BDNF 水平明显低于对照组,与上述研究结果一致;而丁酸钠各剂量组大鼠海马区 BDNF 表达显著增加。Rosa E 等^[16]的研究表明,BDNF 表达的下调与 CREB 信号通路有关;只有当 CREB 在 Ser133 位点处被磷酸化后,才能与 cAMP 结合,从而诱导 BDNF 的转录。在本实验中发现,慢性应激可以使大鼠海马区 p-CREB 表达减少,而丁酸钠可以拮抗应激状态下 p-CREB 的减少,从而使 BDNF 表达增加。以上结果提示,丁酸钠对慢性应激模型大鼠空间学习和记忆能力的改善作用可能与增加 acH3、acH4、p-CREB 和 BDNF 的表达有关。

综上所述,丁酸钠对慢性应激模型大鼠的空间学习和记忆能力具有改善作用,其机制可能是通过恢复慢性应激大鼠海马区域的组蛋白乙酰化水平,进而上调认知相关蛋白如 p-CREB、BDNF 的表达来实现,其详细机制尚需进一步研究证实。

参考文献

[1] Radahmadi M, Alaei H, Sharifi MR, et al. Preventive and therapeutic effect of treadmill running on chronic stress-induced memory deficit in rats[J]. *J Bodyw Mov Ther*, 2015, 19(2):238.

[2] Alkadhi KA, Tran TT. Chronic stress decreases basal levels of memory-related signaling molecules in area CA1 of at-risk (subclinical) model of alzheimer's disease[J]. *Mol Neurobiol*, 2015, 52(1):93.

[3] Datson NA, Speksnijder N, Mayer JL, et al. The transcriptional response to chronic stress and glucocorticoid receptor blockade in the hippocampal dentate gyrus[J]. *Hippocampus*, 2012, 22(2):359.

[4] Day JJ, Sweatt JD. Epigenetic mechanisms in cognition[J]. *Neuron*, 2011, 70(5):813.

[5] Morgado-Bernal I. Learning and memory consolidation: linking molecular and behavioral data[J]. *Neuroscience*, 2011, 10(176):12.

[6] 张艳,雷莉,胡华,等.早年慢性应激对青春期病理性攻击大鼠空间学习记忆及海马脑源性神经营养因子、5-羟色胺的影响[J]. *第二军医大学学报*, 2013, 34(10):1 065.

[7] 李亚,陈亚静,史建勋,等.慢性应激对小鼠学习记忆功能影响及突触作用[J]. *中国公共卫生*, 2012, 28(12):1 602.

[8] 方松,余化霖. Morris 水迷宫实验中海马相关空间学习记忆的研究进展[J]. *国际病理科学与临床杂志*, 2010, 30(4):321.

[9] 吴枫,孔令韬,汤艳清. 氟西汀和碳酸锂对慢性应激抑郁模型大鼠海马脑源性神经营养因子表达的影响[J]. *中国全科医学*, 2012, 15(18):2 055.

[10] 杨鹏,李云,张志勇,等.神经节苷脂对弥散性脑损伤模型大鼠认知功能的改善作用研究[J]. *中国药房*, 2011, 22(45):4 248.

[11] Iordache F, Constantinescu A, Andrei E, et al. Histone acetylation regulates the expression of HoxD9 transcription factor in endothelial progenitor cells[J]. *Rom J Morphol Embryol*, 2015, 56(1):107.

[12] 侯娜丽,吴小凤,任兰,等. siCBP 慢病毒降低大鼠原代海马神经元乙酰化组蛋白表达[J]. *生物医学工程学杂志*, 2015, 32(4):838.

[13] Barichello T, Generoso JS, Simões LR, et al. Sodium butyrate prevents memory impairment by re-establishing BDNF and GDNF expression in experimental pneumococcal meningitis[J]. *Mol Neurobiol*, 2015, 52(1):734.

[14] 张印南,许崇涛,李慧,等.慢性应激大鼠海马区脑源性神经营养因子的表达[J]. *汕头大学医学院学报*, 2014, 27(3):139.

[15] 刘志娟,吕佩源.脑源性神经营养因子在突触可塑性中的作用[J]. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2015, 42(2):185.

[16] Rosa E, Fahnstock M. CREB expression mediates amyloid β -induced basal BDNF downregulation[J]. *Neurobiol Aging*, 2015, 36(8):2 406.

(收稿日期:2015-08-10 修回日期:2015-10-23)

(编辑:邹丽娟)