

急性甲醇中毒大鼠空间学习记忆功能改变的研究

童宗武¹⁾, 苏少明²⁾, 周卫敏³⁾, 杨崇猛¹⁾, 夏青青³⁾, 袁云³⁾, 杨力³⁾, 吴春云³⁾

(1) 玉溪市人民医院; 2) 玉溪市公安局, 云南 玉溪 653100; 3) 昆明医科大学组织胚胎学教研室, 云南昆明 650500)

[摘要] **目的** 探讨大鼠急性高剂量和低剂量甲醇中毒后空间学习记忆功能的改变. **方法** 复制急性高剂量和低剂量甲醇中毒大鼠各 10 只, 并设生理盐水对照组 ($n=10$), 给予各组大鼠灌胃相应剂量甲醇溶液或生理盐水, 并吸入等比 (1:1) 混合气体 (N_2O/O_2); 应用 Morris 水迷宫评价急性甲醇中毒大鼠的空间学习记忆功能. **结果** Morris 水迷宫结果显示: 与生理盐水对照组 (60.43 ± 7.13) s 相比, 低剂量组 (89.55 ± 7.98) s 和高剂量组 (98.77 ± 5.64) s 在 Morris 水迷宫水下隐匿平台实验第 1 天的逃避潜伏期显著延长 ($P < 0.05$); 第 2~5 天高剂量组逃避潜伏期较低剂量组和生理盐水对照组明显延长 ($P < 0.05$); 3 组在第 6~7 天的水上可见平台实验中的逃避潜伏期时间和无平台探测实验中第 III 象限的停留时间均无显著性差异 ($P > 0.05$). **结论** 急性甲醇中毒大鼠有空间学习记忆功能障碍, 程度与甲醇中毒剂量有关.

[关键词] 甲醇中毒; 大鼠; 空间学习记忆; Morris 水迷宫

[中图分类号] R994.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-4706 (2012) 08-0017-04

A Study on the Spatial Learning and Memory Ability after Acute Methanol Poisoning in Rats

TONG Zong-wu¹⁾, SU Shao-ming²⁾, ZHOU Wei-min³⁾, YANG Chong-meng¹⁾, XIA Qing-qing³⁾,
YUAN Yun³⁾, YANG Li³⁾, WU Chun-yun³⁾

(1) Yuxi People's Hospital; 2) Yuxi Public Security Bureau, Yuxi 653100; 3) Dept. of Histology and Embryology, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650500, China)

[Abstract] **Objective** To study the change of spatial learning and memory function in rats induced by acute methanol poisoning. **Methods** Animal model of methanol poisoning was made, and rats received normal saline were selected as control. The rats were placed in a plexiglas chamber that exposed to a mixture of N_2O/O_2 and gaved different dosage of methanol by gavage. The spatial learning and memory ability was assessed with Morris Water Maze. **Results** Compared with the control group (60.43 ± 7.13) s, the performance latency on the Morris Water Maze prolonged in low dosage group (89.55 ± 7.98) s and high dosage group (98.77 ± 5.64) s rats on the first day post-injury. The latency in high dosage group was much longer than that in low dosage group and control group on the 2nd~5th day post-injury ($P < 0.05$). There were no statistical differences among three groups during the visible platform tests and probe tests. **Conclusion** Rats subjected to acute methanol poisoning have spatial learning and memory function dysfunction and, in this connection, the degree of poisoning and the dose administered is apparently related.

[Key words] Methanol poisoning; Rat; Spatial learning and memory; Morris water maze

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (30900778); 云南省应用基础研究基金资助项目 (2009ZC097M)

[作者简介] 童宗武 (1962~), 男, 云南通海县人, 医学硕士, 教授, 主要从事肾内科临床工作.

[通讯作者] 吴春云. E-mail:wuchunyunkm@163.com

急性甲醇中毒事件在国内外时有发生, 其中常见的是误饮掺有工业酒精(即甲醇)的假酒所致。虽然假酒事件的发生率相对较低, 但多群体发病, 如 2011 年 12 月印度西孟加拉邦发生的假酒惨剧至少造成近 200 人死亡。而近年国内的急性甲醇中毒事件也是屡见不鲜, 如云南省元江县(2003 年 12 月)、广东省广州市(2004 年 5 月)、湖北省五峰土家族自治县(2009 年 3 月)等地也相继发生群体性假酒中毒事件, 其病情凶险、社会影响极大^[1-3]。患者急性甲醇中毒后常出现头晕头痛、意识障碍、认知行为异常等与认知功能脑区受损相关的临床表现。近年虽有学者对急性甲醇中毒患者进行研究报道, 但都局限于临床表现的观察以及脑部影像学改变的报道^[4-6], 并未见有学者对急性甲醇中毒后空间认知即空间学习记忆功能的研究报道。因此有必要复制急性甲醇中毒动物模型以探究中毒后空间学习记忆功能是否有障碍, 本实验采用通有等比(1:1)混合气体(N_2O/O_2)密闭有机玻璃箱和灌胃不同剂量甲醇溶液复制大鼠急性高剂量和低剂量甲醇中毒模型, 运用 Morris 水迷宫(morris water maze, MWM)实验评价急性甲醇中毒大鼠的空间学习记忆功能, 为临床判断急性甲醇中毒后空间学习记忆功能改变提供一定的实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

分析纯甲醇(天津市风船化学试剂科技有限公司), 以生理盐水稀释成质量浓度为 30%的甲醇溶液; N_2O/O_2 混合气(1:1, 广州盛盈气体有限公司)。

1.2 实验动物及分组

30 只健康成年 Sprague-Dawley (SD) 大鼠, 雌雄不限, 体重(280 ± 30) g (由昆明医科大学实验动物中心提供), 随机分为高剂量组、低剂量组和生理盐水对照组共 3 组, 每组 10 只。动物于实验前 3 d 运到实验室, 在安静环境下(明暗周期为 12 h)饲养, 定时供应食物及饮水。

1.3 甲醇中毒大鼠模型复制

将各组大鼠置于通有 N_2O/O_2 混合气的密闭有机玻璃箱中, 通气起始时记为 0 h, 通气总用时 60 h, 期间在第 4 h、24 h、48 h 给予大鼠 3 次灌胃。高剂量组大鼠灌胃首剂量为 4 g/kg、后 2 次剂量为 2 g/kg 的甲醇溶液; 甲醇低剂量组大鼠灌胃首剂量为 2 g/kg、后 2 次剂量为 1 g/kg 的甲醇溶液; 生理盐水对照组大鼠灌胃与高剂量组同剂量的生理盐

水。

1.4 行为学实验

急性甲醇中毒后(即模型复制完成后)连续 7 d 对各组大鼠进行 MWM 测试, 实验步骤参照于建云等^[7]的方法, Morris 水迷宫实验分为水下隐匿平台实验、水上可见平台实验和无平台探测实验: (1) 第 1~5 天水下隐匿平台实验: 通过调节水位使实验平台隐藏在水面下 2 cm, 平台放置在第 III 象限恒定位置, 实验室内灯光亮度恒定。随机按 4 个方向将大鼠放入水中, 监控系统同时开始记录大鼠游泳轨迹和找到平台的时间(即逃避潜伏期)。当大鼠一到达平台, 时间和轨迹记录就停止。大鼠在平台上停留 30 s 后放回温箱休息 4 min, 又开始另一轮试验, 直到 4 个象限都测试完毕。如果动物在 120 s 内找不到平台, 则将其放在平台上停留 30 s, 在实验记录表上记作 120 s。同样的实验连续测试 5 d; (2) 第 6~7 天水下可见平台实验: 将实验平台升高 4 cm, 让其暴露于迷宫水面上, 记录大鼠找到平台的时间。120 s 找不到平台的动物, 则将其放到平台上停留 30 s 然后重复下一轮实验。同样的实验连续测试 2 d; (3) 无平台探测实验: 该实验是在水上可见平台实验完成之后让动物休息 4 min 后立即实施, 记录大鼠在各象限停留的时间。把实验平台移出水池, 将大鼠从远离正常平台方向的象限放入水中, 测试 2 次, 记录大鼠在各个象限的时间, 实验时间为 60 s, 2 次实验间期的休息时间为 4 min。

1.5 统计学方法

所有统计资料均采用 SPSS 统计软件包处理, 所有结果均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。组间比较采用方差分析。

2 结果

2.1 甲醇中毒后 1~7 d 大鼠的空间学习记忆行为的变化

与生理盐水对照组相比, 甲醇低剂量组在 MWM 水下隐匿平台实验第 1~5 天的逃避潜伏期延长, 其中第 1 天具有显著差异($P < 0.05$); 而甲醇高剂量组第 1~5 天逃避潜伏期均显著延长($P < 0.05$)。

与甲醇低剂量组比较, 甲醇高剂量组第 1~5 天逃避潜伏期均延长, 其中第 2~4 天差异具有显著性($P < 0.05$)。

与生理盐水对照组相比, 甲醇低剂量组和甲醇高剂量组在第 6 天的水上可见平台实验中的逃避潜

伏期延长, 但差异无显著性 ($P > 0.05$); 各组在第 7 天的逃避潜伏期无显著差异 ($P > 0.05$), 见表 1.

2.2 无平台探测实验结果

各组大鼠在原有平台位置 (即第 III 象限) 停留时间较其他象限的时间长.

与生理盐水对照组相比, 甲醇低剂量组大鼠在原有平台位置 (即第 III 象限) 停留时间稍增加, 但无显著差异; 甲醇高剂量组大鼠在原有平台位置 (即第 III 象限) 停留时间虽有减少, 但差异无显著性 ($P > 0.05$), 见表 2.

表 1 生理盐水对照组与甲醇低剂量组、甲醇高剂量组 MWM 逃避潜伏期变化 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Comparison of MWM performance latency among three groups ($\bar{x} \pm s$)

组 别	n	MWM 测试时间						
		第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天	第 6 天	第 7 天
生理盐水对照组	10	60.43 ± 7.12	40.67 ± 8.85	21.51 ± 3.71	26.96 ± 7.01	18.93 ± 2.89	18.04 ± 4.03	16.48 ± 2.93
低剂量组	10	89.55 ± 7.98*	46.16 ± 7.76	23.57 ± 4.47	32.28 ± 4.71	22.23 ± 3.69	22.54 ± 4.59	14.95 ± 2.88
高剂量组	10	98.77 ± 5.64*	94.36 ± 7.68* [△]	70.93 ± 9.85* [△]	56.04 ± 9.39* [△]	43.60 ± 8.41* [△]	30.98 ± 8.12	19.08 ± 4.51

与同时段生理盐水对照组比较, * $P < 0.05$; 与同时段甲醇低剂量组比较, [△] $P < 0.05$.

表 2 生理盐水对照组与甲醇低剂量组、甲醇高剂量组无平台探测实验中各象限变化 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 2 Comparison of changes in each quadrant among three groups ($\bar{x} \pm s$)

组 别	n	迷宫象限			
		I	II	III	IV
生理盐水对照组	10	11.50 ± 0.70	11.85 ± 0.95	22.60 ± 1.72	14.06 ± 1.72
低剂量组	10	10.83 ± 0.65	12.72 ± 1.03	24.21 ± 2.48	12.24 ± 0.90
高剂量组	10	11.60 ± 0.71	14.80 ± 0.85	20.71 ± 2.34	12.89 ± 1.08

3 讨论

脑的功能主要是接受和处理来自体内外环境的信息, 并以此为依据来调节、控制机体的活动. 而脑功能的正常行使须有赖于相关结构基础的正常配合才能完成. 目前认为脑在认知行为活动中可分为 3 个基本机能联合区: 第一基本机能联合区是调节大脑觉醒水平使皮层维持适度紧张的联合区, 位于脑干网状结构、间脑和大脑皮层内侧, 由网状上行激活系统、下行系统组成, 神经元多呈辐射式排列, 将非特异性神经信号弥散性传导到大脑皮层, 使大脑皮层保持一定的兴奋程度和意识状态, 同时大脑皮层也可通过下行系统调节网状结构的活性; 第二基本机能联合区是接受、加工和保存来自外部世界信息的联合区, 主要指各感觉皮层区和有关联络皮层区, 它们分别接受来自各感觉器官传来的特异性信号, 然后加工并储存; 第三基本机能联合区是制定程序、调节和控制心理活动的联合区, 主要位于大脑额叶. 任何认知行为的实现都必须有赖于 3 个基本机能联合区的参与^[8,9]. 如果任一机能联合区的结构受损, 都会导致学习记忆功能障碍. 目前许多学者研究发现, 包括海马记忆系统、基底节、纹状体边缘区等在内的脑区均参与了学习记忆过

程, 而海马记忆系统与空间学习记忆功能密切相关, 影像学提示急性甲醇中毒患者多有脑海马区、基底节、黑质纹状体等脑组织损伤表现^[5,6], 提示急性甲醇中毒对于患者空间学习记忆可能有直接关系, 因此本研究针对急性甲醇中毒大鼠模型开展相关实验研究.

认知是大脑的重要功能之一, 广义的认知包括学习和记忆. 学习是指人或动物通过神经系统接受外界信息而影响自身行为的过程, 在行为学上的定义为引起个体对特殊环境条件所产生的适应性行为的全部过程; 记忆是获得的信息或经验在脑内储存和提取 (再现) 的神经活动过程. 学习和记忆的过程伴随有复杂的神经生理和生化活动, 目前随着人类对大脑学习记忆机制研究的不断深入, 客观准确地评价实验动物的空间学习记忆水平已经成为神经生物学等学科非常重要的研究内容^[10,11], 然而至今仍未有关于急性甲醇中毒大鼠空间学习记忆功能改变的研究报道. 本研究中笔者运用 Morris 水迷宫对急性甲醇中毒大鼠的空间学习记忆功能进行评估测试, 研究发现不同剂量甲醇中毒大鼠在伤后出现不同程度的空间学习记忆功能障碍, 且高剂量组较低剂量组严重, 提

示参与中毒大鼠的空间学习记忆功能的大脑机能联合区受到了损害,其空间学习记忆通路发生改变,同时也提示急性甲醇中毒可能使大鼠脑组织受损,而这与学者们对甲醇中毒患者临床表现及脑部影像学的观察研究结果相一致^[4,5,12]。

目前,对学习和记忆的研究多采用操作式条件反射原理建立起来的各种行为学实验,其中MWM被广泛应用于啮齿类动物空间学习记忆功能的研究^[13]。本实验采用国际标准制作的Morris水迷宫装置,以水上可见平台实验、水下隐匿平台实验和无平台探测实验三方面来检测不同剂量急性甲醇中毒大鼠的学习记忆能力在伤后不同时间段的变化情况。在本研究中大鼠被置于特定的水池,出于求生本能的驱动而迫使自身游动寻找救命的地方。水面下某一固定位置有个隐匿的平台,水池四周有帮助大鼠寻找平台的固定符号,大鼠只有找到平台才能获救。在这样一个逃避性学习过程中,如果受损伤动物找到水下隐匿平台的时间越长,说明其空间学习记忆缺陷越明显。在本研究的水下隐匿平台实验结果显示低剂量组的逃避潜伏期虽有增加,但差异不显著,而高剂量组在伤后早期第1~5天的逃避潜伏期时间增长明显。而在水上可见平台实验中,低剂量组和高剂量组的逃避潜伏期较生理盐水对照组延长,但差异不具有显著性,可见急性甲醇中毒大鼠的空间学习记忆能力在逐渐恢复。大鼠经过水下隐匿平台实验和水上可见平台实验的学习强化后,在无平台探测实验中去掉平台,如果大鼠有良好正常的学习记忆能力,则大鼠在原有平台即第Ⅲ象限区域停留时间较长。实验中发现各组大鼠在进行无平台探测实验时,在同一象限停留的时间并无显著差异,而各组大鼠在原有平台位置即第Ⅲ象限停留时间较其余3个象限更长,以上实验结果提示急性甲醇中毒大鼠伤后早期出现严重的空间学习记忆功能障碍且持续时间较长,其严重程度与甲醇剂量相关。笔者推测这可能与急性甲醇中毒后大鼠脑组织受损有关。然而大鼠急性甲醇中毒后脑组织的损伤部位、程度及受损机理和发病基础仍有待于从组织学、神经生物学、分子生物学等多方面进行研

究。

[参考文献]

- [1] 童宗武,陈晋,杨崇猛,等. 早期血液净化治疗44例急性甲醇中毒的临床研究[J]. 中国血液净化,2005,4(10):535-538.
- [2] 史晶,江朝强,杨志前,等. 急性甲醇中毒的神经系统损害-42例临床病例分析[J]. 中国职业医学,2009,36(6):478-481.
- [3] 陈幼菊,刘士玉. 急性重度甲醇中毒19例急救与护理[J]. 临床合理用药杂志,2009,2(17):107-108.
- [4] 柯贤胜,张雪刚,朱灿敏. 急性甲醇中毒的临床诊治体会[J]. 临床急诊杂志,2010,11(2):110-111.
- [5] TAHERI M S, MOGHADDAM H H, MOHARAMZAD Y, et al. The value of brain CT findings in acute methanol toxicity[J]. Eur J Radiol, 2010, 73(2):211-214.
- [6] 彭育立,刘红军,张忠林,等. 急性甲醇中毒性脑病的CT及MR表现[J]. 放射学实践,2005,20(4):327-329.
- [7] 于建云,林海英,吴春云,等. 大鼠脑震荡后8天不同损伤程度空间认知行为的变化[J]. 昆明医学院学报,2005,26(4):1-3.
- [8] 张富昌. 认知结构与脑结构在主体认识加工中的作用[J]. 西北大学学报(哲学社会科学版),1995,25(86):44-50.
- [9] SHAW N A. The neurophysiology of concussion[J]. Prog Neurobiol,2002,67(4):281-344.
- [10] UCAR T, TANRIOVER G, GURER I, et al. Modified experimental mild traumatic brain injury model[J]. Trauma, 2006, 60(3):558-565.
- [11] HENNINGER N, DUTZMANN S, SICARD K M, et al. Impaired spatial learning in a novel rat model of mild cerebral concussion injury [J]. Exp Neurol, 2005, 195(2):447-457.
- [12] 毛晓芬,杨波,叶更新,等. 急性口服甲醇中毒的脑部CT及MRI表现[J]. 影像诊断与介入放射学,2009,18(2):62-64.
- [13] BLOCK F. Global ischemia and behavioural deficits[J]. Prog Neurobiol, 1999, 58(3):279-295.

(2012-04-12 收稿)