

不同打击间隔的三重性脑震荡大鼠空间认知行为变化研究

徐林成¹⁾, 曹珍珍²⁾, 蔡永峰¹⁾, 江定港¹⁾, 于建云¹⁾, 杨瑞¹⁾, 张桓¹⁾

(1) 昆明医科大学法医学院; 2) 基础医学实验教学中心, 云南昆明 650500)

[摘要] **目的** 建立不同打击间隔的三重性脑震荡 (multiple cerebral concussion, 3MCC) 大鼠模型, 观察 3MCC 24 h、48 h 和 72 h 损伤大鼠水迷宫 (morris water maze, MWM) 学习记忆行为变化, 评估与比较其空间认知功能改变, 为临床脑震荡 (cerebral concussion, CC) 患者的诊治和预防提供实验依据. **方法** (1) 实验分组: 选取成年健康 SD 大鼠 40 只, 雌雄各半, 体重 260~280 g. 造模后随机分为 3MCC 24 h、3MCC 48 h 和 3MCC 72 h 损伤组 (每组 10 只), 另设对照组 (10 只); (2) 应用金属单摆闭合性脑损伤打击装置, 分别以打击间隔为 24 h、48 h 和 72 h, 连续打击 3 次, 形成 3MCC 24 h 组、3MCC 48 h 组和 3MCC 72 h 组损伤实验大鼠. (3) 应用 Morris 水迷宫实验评估各实验组大鼠空间认知功能. **结果** (1) 在水下平台实验中, 对照组大鼠表现为快速下降后趋于平稳; 而各损伤组大鼠逃避潜伏期呈不同程度的徐缓下降, 逐渐趋于平稳. 与对照组比: 3MCC 24 h、48 h 和 72 h 组大鼠逃避潜伏期的伤后恢复均明显延迟, 3MCC 24 h 组和 48 h 组在伤后第 1~14 天、3MCC 72 h 组除第 7 天、第 10 天外的其余 12 d 均具有统计学意义 ($P < 0.05$). 与 3MCC 24 h 组相比: 24 h 组大鼠逃避潜伏期较其它 2 个 3MCC 组明显延迟, 3MCC 48 h 组和 3MCC 72 h 组在伤后第 1~11 天均具有统计学意义 ($P < 0.05$). (2) 在水上平台实验中, 与对照组比, 3 个 3MCC 组大鼠找到水上平台的时间均明显延长, 具有统计学差异 ($P < 0.05$). (3) 在无平台实验中, 各损伤组大鼠在第 I 象限 (原平台所在象限) 停留的时间减少, 且由轻到重依次为 72 h 组、48 h 组、24 h 组; 与正常组相比, 各损伤组在第 I 象限 (原平台所在象限) 停留时间减少, 其中 3MCC 24 h 组、48 h 组减少具有统计学意义 ($P < 0.05$). **结论** (1) 不同打击间隔的多重性脑震荡大鼠的空间认知功能均有不同程度的损害, 至伤后第 14 天仍未恢复正常; (2) 在多重性脑震荡中, 打击间隔越长, 其空间认知功能的损害就越轻.

[关键词] 多重性脑震荡; Morris 水迷宫; 空间认知; 大鼠

[中图分类号] R322.81 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095-610X (2014) 10-0008-04

A Study on the Space Cognitive Behavior of Multiple Cerebral Concussion at Different Interval in Rats

XU Lin - cheng¹⁾, CAO Zhen - zhen²⁾, CAI Yong - feng¹⁾, JIANG Ding - gang¹⁾, YU Jian - yun¹⁾, YANG Rui¹⁾, ZHANG Huan¹⁾

(1) School of Forensic Medicine; 2) Dept. of Anatomy and Histology and Embryology, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650500, China)

[Abstract] **Objective** By establishing a special rats models of the multiple cerebral concussion (MCC) at different strike interval (that is, 24h, 48h and 72h), to observe the changes of space cognitive behavior by MWM (Morris water maze) after injury and to evaluate learning and memory function, so as to provide experimental data for clinic diagnosis and intervene. **Methods** (1) Groups: we selected 40 healthy adult SD rats, half male and half female, the average weight was 260-280g. The model rats were randomly divided into 3MCC 24 h, 3MCC 48 h, 3MCC 72 h (each group has 10 rats) after injury. And we set up a control group (10 rats). 2. The metal pendulum device was used at interval of 24 h, 48 h and 72 h to establish 3MCC 24 h, 3MCC 48 h and 3MCC 72 h injury group. (3) We evaluated the space cognitive function of the rats in each group through Morris water maze test. **Results** (1) In the underwater platform experiment, the escape latency (the time spent to find the platform)

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (81360467); 云南省应用基础研究 (联合专项) 重点项目 (2013FB104)

[作者简介] 徐林成 (1988~), 男, 江苏盐城市人, 硕士研究生, 主要从事脑损伤研究工作. 曹珍珍与徐林成对本文有同等贡献.

[通讯作者] 于建云.E-mail: jianyunnyu@sina.com.

of the Control group appeared a rapid decline at first, and then tended to a steady state; the escape latency of each injury group all appeared a slow decline before a steady state. Compared with the Control group, the recovery after injury of the escape latency in 3MCC 24 h, 3MCC 48 h and 3MCC 72h all had been prolonged significantly, and the 1-14 d of 3MCC 24 h and 3MCC 48 h group, the 12 days except the 7 d and 10 d of the 3MCC 72 h were statistically significant ($P < 0.05$). Compared with the 3MCC 24 h, other two 3MCC groups were no more delayed than the 3MCC 24 h, the 1-11d of the 3MCC 48 h and 3MCC 72 h were statistically significant ($P < 0.05$). (2) In the above water platform experiment, compared with the control group, the three 3MCC groups had been prolonged significantly, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). 3. In the no platform experiment, compared with the control group, the rats of the injury groups stayed less time in the first quadrant, and from light to heavy followed as 3MCC 72 h, 3MCC 48 h and 3MCC 24h group. And the different of 3MCC 24 h and 3MCC 48 h groups were statistically significantly ($P < 0.05$). **Conclusions** (1) All 3MCC injury groups at different interval have obvious damage on spatial cognitive function and can not recover 14 days after injury. (2) In three kinds of 3MCC, the longer of the interval and the less the damage on the space cognitive function.

[**Key words**] Multiple cerebral concussion; Morris water maze; Spatial cognition; Rats

脑震荡 (cerebral concussion, CC) 是创伤性脑损伤 (traumatic brain injury, TBI) 中的轻度损伤类型, 发生率高, 机制不明, 尤其在运动员紧密接触的拳击、跆拳道、橄榄球、足球、曲棍球、棒球等竞技激烈项目中, 运动相关性脑震荡 (sports-related cerebral concussion, SRCC) 的发病率高达 80 ~ 90%^[1-3]. SRCC 具有在同一运动参与者身上可发生多重性脑震荡 (multiple cerebral concussion, MCC) 的特点. 临床上有相当部分的 CC 患者会并发脑震荡后综合征 (post-concussional syndrome, PCS), 表现为一系列持久的认知与躯体行为症状, 如头痛、眩晕、焦虑、失眠、抑郁、注意力和记忆力下降、易激惹及对声、光敏感等^[4-5], 其中认知障碍是最常见、最持久的后遗症之一, 给患者的学习、生活带来严重困扰, 但其机制仍然不明. 本研究探讨不同打击间隔的三重性 MCC 大鼠伤后空间学习记忆能力的变化特点, 为临床 SRCC 患者的预防与康复干预提供实验依据.

1 材料与方法

1.1 动物

成年健康 SD 大鼠 40 只, 雌雄各半, 体质量 260 ~ 280 g, 购自简阳达硕动物科技有限公司. 大鼠于实验前 1 周运到实验室, 在安静环境下 (明/暗周期为 12 h) 分笼饲养, 自由摄食饮水. 大鼠在正式试验前 2 d, 将其放入水迷宫进行水环境适应训练 2 min.

1.2 脑震荡模型复制、判类标准与分组

采用先前于建云等^[6]金属单摆闭合性脑损伤打击装置, 给予 SD 大鼠额顶部 3 次钝性打击, 建立

3MCC 大鼠模型. 按照课题组先前建立的脑震荡大鼠判别标准与多元回归方程, 对符合标准的实验大鼠随机分为 3MCC 24 h 组、3MCC 48 h 组和 3MCC 72 h 组 ($n = 10$), 另设一正常对照组 ($n = 10$).

3 个不同打击间隔的 3MCC 大鼠模型复制: 分别按打击间隔 24 h/次、48 h/次和 72 h/次, 连续 3 次给实验大鼠额顶部钝性打击, 以建立 3MCC 24 h、3MCC 48 h 和 3MCC 72 h 大鼠多次脑震荡损伤模型. 每次打击后超出单纯性脑震荡损伤者, 将予以剔除该试验.

1.3 大鼠行为学测试

对上述各实验组大鼠进行连续 16 d 的水迷宫行为学测试, 包括 14 d 的水下平台实验、第 15 ~ 16 d 的水上平台实验及第 16 d 无平台实验.

1.3.1 水下平台实验 将水池等分为 4 个象限, 在第 I 象限内离池壁 33 cm 处放置一固定平台, 使平台顶部平面低于水面 2 cm. 按顺时针方向依次为第 II 象限、第 III 象限、第 IV 象限. 将大鼠面向池壁随机按 4 个方向放入水中, 以 120 s 为限, 记录大鼠逃避潜伏期 (从入水至找到平台的时间), 超过 120 s 仍未能找到平台者记录为 120 s, 并协助其找到平台. 到达平台的大鼠使其在平台上停留 30 s, 然后放入温箱中休息 4 min 后, 开始下一轮测试, 直至 4 个象限轮流测试完毕. 同样试验连续进行 14 d.

1.3.2 水上平台实验 伤后第 15 天、第 16 天进行. 将实验平台升高至水面上 2 cm, 并将平台边缘标记成白色, 用于加强大鼠的学习记忆能力. 将大鼠面向池壁随机按 4 个方向放入水中, 以 120 s 为限, 记录大鼠逃避潜伏期, 超过 120 s 仍未能找到平台者记录为 120 s, 并协助其找到平台. 到达

平台的大鼠使其在平台上停留 30 s, 然后放入温箱中休息 4 min 后, 开始新一轮测试, 直至 4 个象限都测试完毕。

1.3.3 无平台实验 用于评估大鼠的空间参考记忆能力及记忆保持情况, 本实验于第 16 天水上平台实验完成 4 min 后立即进行。撤去实验平台, 将大鼠从远离原平台位置的象限面向池壁放入水中, 以 60 s 为限, 分别记录大鼠在 4 个象限的停留时间, 重复测试 2 次, 2 次实验间隔仍为 4 min。

1.4 统计学处理

应用 SPSS 软件包对各组大鼠 MWM 实验行为学数据进行单因素方差分析及两两比较的 q 检验。数据采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 水下平台实验测试结果

在水下平台实验中, 对照组大鼠的逃避潜伏期(找到平台的时间)表现为 1~6 d 迅速下降, 然后趋于平稳; 3MCC 24 h 组大鼠表现为恢复缓慢, 而 3MCC 48 h 组和 3MCC 72 h 组大鼠的恢复趋势较为接近, 介于对照组与 3MCC 24 h 组之间(表 1)。

与对照组比: 3MCC 24 h、3MCC 48 h 和 3MCC 72 h 组大鼠逃避潜伏期的伤后恢复均明显延迟, 3MCC 24 h 组和 3MCC 48 h 组在伤后第 1~14 天均具有统计学意义 ($P < 0.05$); 而 3MCC 72 h 组除第 7 天、第 10 天外其余 12 d 也均具有统计学意义 ($P <$

0.05)。与 3MCC 24 h 组相比: 3MCC 24 h 组大鼠逃避潜伏期较其它两个 3MCC 组明显延迟, 而 3MCC 48 h 组和 3MCC 72 h 组的伤后恢复明显加快, 在第 1~11 天均具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.2 水上平台实验测试结果

与对照组相比, 3 个 3MCC 组大鼠找到水上平台的时间均明显延长, 并具有统计学差异 ($P < 0.05$)。但在 3 个 3MCC 组之间相比则无统计学差异 ($P > 0.05$), 见表 2。

2.3 无平台实验测试结果

在伤后第 16 天的无平台实验中, 各损伤组在第 I 象限(原平台所在象限)停留的时间的减少由轻到重依次为 3MCC 72 h 组、3MCC 48 h 组、3MCC 24 h 组。与正常组相比, 各损伤组在第 I 象限(原平台所在象限)停留时间均减少, 其中 3MCC 24 h 组、3MCC 48 h 组减少明显具有统计学意义 ($P < 0.05$)。3 个损伤组之间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 3。

3 讨论

Morris 水迷宫是一经典的空间学习记忆研究测试方法, 它能够准确地反应测试动物的空间参考记忆能力^[9]。大鼠在水迷宫中因本能寻找休息场所, 这一行为涉及到一个复杂的认知过程, 包括了收集与空间定位有关的一系列视觉信息, 并对这些信息做进一步的学习认知处理、记忆与存储信息的提取运用等。整个 MWM 实验可有效的评估大鼠的空间

表 1 MWM 水下平台实验逃避潜伏期实验数据 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 The experiment data of the escape latency in the underwater platform experiment ($\bar{x} \pm s$)

时间	n	对照组	3MCC 24 h	3MCC 48 h	3MCC 72 h
1 d	10	97.40 \pm 8.37	116.25 \pm 4.51*	103.47 \pm 13.73 [△]	108.73 \pm 7.03 [△]
2 d	10	55.83 \pm 13.50	113.33 \pm 7.66*	89.03 \pm 14.49 [△]	89.55 \pm 12.68 [△]
3 d	10	24.50 \pm 13.40	100.35 \pm 11.02*	57.22 \pm 18.70 [△]	68.83 \pm 17.43 [△]
4 d	10	25.48 \pm 15.17	81.75 \pm 9.61*	41.63 \pm 12.74 [△]	46.50 \pm 16.09 [△]
5 d	10	18.63 \pm 13.76	70.93 \pm 9.79*	37.16 \pm 13.28 [△]	35.75 \pm 23.81 [△]
6 d	10	9.73 \pm 2.66	53.59 \pm 3.13*	29.59 \pm 11.69 [△]	27.13 \pm 23.20 [△]
7 d	10	10.58 \pm 4.14	44.55 \pm 6.30*	22.56 \pm 11.57 [△]	23.18 \pm 23.02 [△]
8 d	10	8.13 \pm 3.09	48.25 \pm 10.03*	22.34 \pm 8.10 [△]	17.10 \pm 13.57 [△]
9 d	10	8.10 \pm 2.17	33.68 \pm 9.57*	19.75 \pm 8.81 [△]	18.60 \pm 19.96 [△]
10 d	10	6.98 \pm 1.39	25.38 \pm 4.95*	15.50 \pm 10.27 [△]	11.98 \pm 10.92 [△]
11 d	10	6.15 \pm 1.26	20.43 \pm 2.93*	13.75 \pm 5.26 [△]	13.98 \pm 11.28 [△]
12 d	10	4.78 \pm 0.69	14.78 \pm 2.55*	13.00 \pm 6.71*	8.50 \pm 3.60*
13 d	10	5.10 \pm 1.04	10.55 \pm 1.89*	10.22 \pm 2.88*	7.30 \pm 2.47*
14 d	10	5.20 \pm 0.65	9.15 \pm 2.41*	8.66 \pm 2.24*	6.93 \pm 1.49*

与对照组比较, * $P < 0.05$; 与 3MCC 24 h 组比较, [△] $P < 0.05$ 。

表 2 MWM 水上平台实验数据 ($\bar{x} \pm s$)
 Tab. 2 The experiment data in the above water platform experiment ($\bar{x} \pm s$)

时 间	<i>n</i>	对照组	3MCC 24 h	3MCC 48 h	3MCC 72 h
15 d	10	5.68 ± 0.94	7.03 ± 0.61*	7.19 ± 0.95*	7.25 ± 1.86*
16 d	10	4.90 ± 0.74	6.20 ± 0.45*	6.53 ± 0.90*	6.55 ± 1.32*

与对照组比较, * $P < 0.05$.

表 3 MWM 无平台实验数据 ($\bar{x} \pm s$)
 Tab. 3 The experiment data in the no platform experiment ($\bar{x} \pm s$)

象 限	<i>n</i>	对照组	3MCC 24 h	3MCC 48 h	3MCC 72 h
I 象限	10	41.55 ± 2.83	32.45 ± 2.31*	34.50 ± 2.58*	37.45 ± 4.90
II 象限	10	6.90 ± 1.54	10.75 ± 2.63	9.88 ± 2.94	7.45 ± 2.03
III 象限	10	3.95 ± 1.66	8.00 ± 1.25	8.38 ± 1.98	6.60 ± 2.32
IV 象限	10	7.60 ± 2.88	9.10 ± 2.50	7.25 ± 2.56	8.50 ± 1.65

与对照组比较, * $P < 0.05$.

认知功能, 如大鼠逃避潜伏期越短, 说明空间认知的学习记忆功能越好, 无平台实验则重点反映了大鼠对已经学习储存信息的提取应用。

国内外研究表明, CC 可导致大鼠空间认知行为障碍。国内郭昌茂等^[4]对 CC 大鼠进行了 MWM 行为学研究, 发现 CC 对大鼠近、中期记忆能力有损害作用。国外 DeRoss 等^[5]人采用液压冲击装置复制 MCC 大鼠模型, 发现 MCC 对大鼠的空间认知功能有明显损伤。本课题组前期研究^[6-8]发现, 单一打击间隔的三重性脑震荡大鼠的八臂迷宫参考记忆与工作记忆能力受损程度明显重于一次性 CC, 提出 MCC 具有损伤累计效应观点。但对于不同打击间隔的 MCC 大鼠空间认知行为变化究竟如何, 尚不得而知。

本次实验采用 24 h、48 h、72 h 3 个不同的打击间隔时间, 连续打击 3 次, 复制出 3 种不同打击间隔的 3MCC 损伤大鼠模型, 并动态观测了其最后一次打击后 1~16 d 的水迷宫行为变化。结果显示: 不论何种间隔的打击, 各损伤组大鼠的学习认知能力均出现了明显损害, 尤其是在伤后 1~14 d 具有一定难度的学习认知过程中, 其损害程度表现出随着打击间隔时间的缩短而递增, 即打击间隔时间越短的 3MCC 24 h 组大鼠的学习认知功能损害程度最严重, 恢复最慢; 而打击间隔时间越长的 3MCC 72 h 组大鼠的学习认知功能损害程度最轻, 恢复最快, 表现为 3MCC 损伤后, 大鼠空间认知功能的损伤程度与打击间隔时间呈负相关。

另一方面, 在伤后第 16 天的在无平台实验中, 重点检测损伤大鼠对其记忆信息的提取运用功能。本研究显示: 各损伤组大鼠在第 I 象限(即原平台所在象限)停留的时间都有减少, 而且由轻到重依次为 3MCC 72 h 组、3MCC 48 h 组和 3MCC 24 h 组, 但是只有 3MCC 24 h 组和 3MCC 48

h 组的损伤性减少具有统计学意义 ($P < 0.05$)。这也从另外一个角度再次证实了 3MCC 损伤后, 大鼠空间学习记忆功能的损伤程度具有 3MCC 24 h 组 > 48 h 组 > 72 h 组的特点。

综上所述, 不同打击间隔的多重性脑震荡大鼠的空间认知功能均有不同程度的损害, 至伤后第 16 天仍未恢复正常; 在多重性脑震荡中, 打击间隔越短, 其空间认知功能的损害就越重。因此, 在每一次脑震荡之后给以足够的时间休息, 避免再次损伤至关重要。

[参考文献]

- [1] 张小年, 张皓. 创伤性颅脑损伤后认知障碍临床治疗进展[J]. 中国康复医学杂志, 2014, 29(1): 86-89.
- [2] 李俊祥, 于建云, 许冰莹, 等. 运动相关性脑震荡研究现状 [J]. 中国运动医学杂志, 2006, 4 (25): 502-504.
- [3] BRANDEIS R, BRANDYS Y, YEBUDA S. The use of the morns water maze in the study of memory and learning [J]. Int J Neurosci, 1989, 48(1-2): 29-69.
- [4] 郭昌茂, 徐小虎, 马光瑜. 脑震荡对大鼠学习记忆的近、中期影响[J]. 中国行为医学科学, 2003, 12(1): 9-11.
- [5] DEROSS A L, ADAMS J E, VANE D W, et al. Multiple head injuries in rates: effects on behavior [J]. J Trauma, 2002, 23(6): 645-649.
- [6] 于建云, 李俊祥, 郭泽云, 等. 实验大鼠轻中型闭合脑损伤分级的昏迷指标与量化标准研究[J]. 法医学杂志, 2008, 1(24): 8-11.
- [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] 曹珍珍, 于建云, 朱乔, 等. 单重和多重脑震荡鼠八臂迷宫参考记忆与工作记忆动态变化研究[J]. 中国行为医学与脑科学杂志, 2010, 19(4): 296-299.

(2014-07-05 收稿)