

## 寰枢椎周围软组织损伤对小鼠记忆能力的影响

朱彤彤<sup>1a</sup>, 韩向北<sup>1b, 2</sup>, 郭亚雄<sup>1b</sup>, 李德龙<sup>1b</sup>, 赵丽娟<sup>1b</sup>

[摘要] 目的 观察寰枢椎周围软组织损伤对小鼠学习记忆能力的影响。方法 44 只小鼠随机分为模型组 and 对照组, 各 22 只。模型组小鼠利用手术方法破坏寰枢椎周围软组织建立颈椎稳定性异常病理模型; 采用水迷宫试验、跳台试验和洞板试验测试其学习、记忆能力; HE 染色观察脑海马细胞数量; 免疫组织化学染色观察脑海马 caspase-3 的表达。结果 与对照组相比, 模型组小鼠水迷宫试验中游全程时间和错误次数明显增加 ( $P < 0.01$ ); 跳台试验中模型组小鼠反应期明显延长, 潜伏期明显缩短, 错误次数明显增加 ( $P < 0.01$ ); 洞板试验中模型组小鼠潜伏期延长, 探洞次数明显减少 ( $P < 0.01$ )。HE 染色模型组小鼠脑海马可见明显散在的或连续的神经细胞变性、死亡; 免疫组织化学染色显示模型组小鼠脑海马 caspase-3 蛋白呈阳性表达。结论 寰枢椎周围软组织损伤可致颈椎稳定性异常而促进小鼠脑细胞凋亡, 导致学习、记忆功能明显减退。

[关键词] 软组织; 学习记忆; 寰枢椎关节

Effect of Soft Tissues Injury around Atlantoaxial Joint on Memory Abilities of Mice ZHU Tong-tong, HAN Xiang-bei, GUO Ya-xiong, et al. The Department of Pathophysiology, School of Bethune Medical Sciences, Jilin University, Changchun 130021, Jilin, China

**Abstract:** **Objective** To observe the effect of the soft tissues injury around atlantoaxial joint on memory abilities of mice. **Methods** 44 mice were divided into the model group and control group with 22 animals in each group. The soft tissues around atlantoaxial joint were injured in the model group by surgery between the first and the second cervical vertebrae. The changes of learning and memory of mice were observed with step down avoidance test, water maze test and hole-board test; the expression of caspase-3 in hippocampus was observed by immunohistochemical staining. **Results** Compared with the control group, escape latency was longer and wrong times were more in water maze test of the model group ( $P < 0.01$ ). In step down avoidance test of the model group, the reaction period prolonged and wrong times increased obviously ( $P < 0.01$ ). In hole-board test, the latency period prolonged and the times of extending the holes decreased significantly ( $P < 0.01$ ). Degenerated or dead neuron in hippocampus of surgery-treated mice was found scatteredly or continuously with HE staining, the expression of caspase-3 protein was showed positive with immunohistochemical staining. **Conclusion** The soft tissues injury around atlantoaxial joint can induce abnormality of the stability of cervical vertebra, which aggravated the aging process of the mice and decreased abilities of learning and memory.

**Key words:** soft tissue; learning and memory; atlantoaxial joint

[中图分类号] R681.5 [文献标识码] A [文章编号] 1006-9771(2008)10-0930-02

[本文著录格式] 朱彤彤, 韩向北, 郭亚雄, 等. 寰枢椎周围软组织损伤对小鼠记忆能力的影响[J]. 中国康复理论与实践, 2008, 14(10): 930-931.

本课题组在前期实验中曾利用化学方法复制颈椎稳定性异常病理模型, 得到了一些实验结果, 但该方法存在颈部反复注入药物后小鼠皮肤易溃烂、不易愈合等缺点, 因此本实验尝试利用手术的方法破坏第 1、第 2 颈椎周围肌肉、筋膜、韧带等软组织, 制备颈椎稳定性异常病理模型, 观察造模对小鼠一般状态和记忆能力的影响。

## 1 材料与方法

1.1 实验动物 健康雄性 6 月龄 ICR 种小鼠 44 只。

1.2 制备小鼠颈椎稳定性异常病理模型 将小鼠随机分为对照组和模型组, 各 22 只。模型组小鼠乙醚麻醉后腹卧位固定, 颈部消毒, 颈后正中切口, 用止血钳进行逐层分离, 用线作双结

扎后剪断颈后肌束, 暴露颈椎韧带及第 2 颈椎, 剪断棘突及颈椎间韧带, 再用直径 1.0 mm 的电凝针烧灼损伤侧韧带, 然后缝合肌肉、皮肤。对照组未经任何处理。造模后观察小鼠一般状态, 3 个月后采用水迷宫实验、跳台实验和洞板实验测试小鼠的记忆和智能, 测试后处死取脑进行 HE 染色和免疫组织化学染色。

1.3 水迷宫试验 水迷宫由黑色有机玻璃板制成, 分为 A、B、C、D 4 个区。终点区有一高出水面的安全平台。水深 18 cm, 水温 ( $23 \pm 1$ ) °C。各区至终点区为一阶段训练, 每一阶段训练 3 次, 记录小鼠 3 min 内从起点 A 区游至终点平台处的时间为游全程时间, 进入盲端次数为错误次数, 以此作为学习成绩。24 h 后复测, 作为记忆成绩。若动物 3 min 内未游到终点则以 3 min 计算。

1.4 跳台试验 跳台装置为 60 cm × 33 cm 的被动回避反应箱, 四周用黑色塑料板分隔, 箱底为可通电的铜栅, 反应箱的右后角放置一直径和高均为 4.5 cm 的绝缘橡皮垫, 作为小鼠回避电击的安全台。由一调压器调节电压, 提供交流电。实验

基金项目: 吉林省教育厅资助项目(No. 2005201)

作者单位: 1. 吉林大学白求恩医学院 a. 2006 级临床医学七年制; b. 病理生理教研室, 吉林长春市 130021; 2. 吉林省人民医院内分泌科, 吉林长春市 130021。作者简介: 朱彤彤(1987-), 男, 吉林长春市人, 吉林大学白求恩医学院 2006 级七年制学生。通讯作者: 赵丽娟。

时,将小鼠放入装置中适应 3 min,然后接通 40 V 交流电。动物受电击后,正常反应是跳到安全台躲避电击。记录通电后小鼠跳至安全台上的时间作为反应期,观察 3 min 内受电击的次数为错误次数。以反应期和错误次数作为学习成绩。24 h 后重复试验,以小鼠从台上跳至铜栅上的时间为潜伏期,受电击次数为错误次数,以潜伏期和错误次数为记忆成绩。

1.5 洞板试验 实验仪器为黑色有机玻璃板制成的箱式结构,上端有 30 个洞。以小鼠第 1 次探洞的时间作为潜伏期,记录 3 min 内的探洞次数。用潜伏期和探洞次数评价小鼠的自主活动能力。

1.6 脑海马形态学观察 用甲醛固定脑组织,行石蜡切片,分别进行 HE 染色和 caspase-3 免疫组织化学染色,镜下观察病理变化。

1.7 统计学处理 所得数据以( $\bar{x}\pm s$ )表示,采用 SPSS 11.5 统计软件进行完全随机设计的单因素方差分析和 *t* 检验。

2 结果

2.1 动物一般状况 与对照组相比,模型组小鼠均出现程度不同的摄食量减少、弓腰驼背、脱毛、外表脏乱、活动减少、步履蹒跚、反应迟钝、精神萎靡以及嗜睡等状况,出现衰老征象(见封三图 2.1)。

2.2 水迷宫试验 与对照组比较,模型组小鼠游全程时间和错误次数均明显增加( $P < 0.01$ ),见表 1。

表 1 水迷宫试验小鼠学习、记忆成绩( $\bar{x}\pm s$ )

组别	n	学习成绩		记忆成绩	
		游全程时间(s)	错误次数(n)	游全程时间(s)	错误次数(n)
对照组	22	27.500±9.182	2.000±1.414	9.000±2.191	0.667±0.816
模型组	22	50.667±3.559 <sup>a</sup>	6.167±1.169 <sup>a</sup>	56.833±21.217 <sup>b</sup>	7.667±2.805 <sup>b</sup>

注:a.与对照组比较, $P < 0.01$ ;b.与对照组比较, $P < 0.001$ 。

2.3 跳台试验 与对照组相比,模型组小鼠的反应期明显延长,潜伏期明显缩短,错误次数明显增加( $P < 0.01$ ),见表 2。

表 2 跳台试验小鼠学习、记忆成绩( $\bar{x}\pm s$ )

组别	n	学习成绩		记忆成绩	
		反应期(s)	错误次数(n)	潜伏期(s)	错误次数(n)
对照组	22	3.000±1.833	1.414±1.472	155.830±22.463	1.333±1.200
模型组	22	7.333±1.633 <sup>a</sup>	5.333±1.211 <sup>a</sup>	96.500±10.075 <sup>b</sup>	4.167±1.472 <sup>a</sup>

注:a.与对照组比较, $P < 0.01$ ;b.与对照组比较, $P < 0.001$ 。

2.4 洞板试验 与对照组相比,模型组小鼠探洞潜伏期明显延长,3 min 内的探索次数明显减少( $P < 0.01$ ),见表 3。

表 3 洞板试验小鼠自主活动能力( $\bar{x}\pm s$ )

组别	n	潜伏期(s)	探洞次数(n)
对照组	22	11.833±3.061	48.000±5.329
模型组	22	24.500±4.593 <sup>a</sup>	31.667±6.346 <sup>a</sup>

注:a.与对照组比较, $P < 0.01$ 。

2.5 脑组织 HE 染色 对照组海马神经细胞染色均一,结构完整,细胞膜、核膜清晰。模型组海马可见明显散在的或连续的神经细胞变性、死亡,表现为胞浆深染,核固缩,胞膜核膜界限不清,严重者出现点状中断(见封三图 2.2、图 2.3)。

2.6 脑组织免疫组化检测 海马锥细胞 caspase-3 蛋白表达对对照组呈阴性,模型组呈阳性(细胞内棕黄色颗粒明显增多,见封三图 2.4、图 2.5)。

3 讨论

脊柱是人体负重和运动的轴心部分,脊柱的稳定有赖于椎周软组织(肌肉、筋膜、韧带、关节囊等)和椎间盘的健全。段俊峰等研究发现,椎间和椎周软组织健全时颈部正常运动不会错位,而损坏脊柱周围重要组织,使关节囊、韧带松弛致颈椎失稳时,头颈部不同方向的运动容易导致颈椎错位<sup>[1]</sup>。由于颈背部软组织损害性病变所产生的异常应力可使颈椎力学平衡被破坏,引起椎间关节错位,椎间孔变形变窄使椎动脉血流减少,神经根受压,交感神经调节异常而引起相应疾病<sup>[1,2]</sup>。

本实验结果表明,与对照组相比,手术破坏寰枢椎周围软组织 3 个月后小鼠呈现弓腰驼背、摄食量减少、脱毛、外表脏乱、活动减少、白内障、反应迟钝及精神萎靡等明显衰老征象;水迷宫试验模型组小鼠游全程时间和错误次数均明显增加( $P < 0.01$ ),表明模型组小鼠发生了严重的空间分辨性障碍;跳台试验模型组小鼠反应期明显延长,潜伏期明显缩短,错误次数明显增加( $P < 0.01$ ),表明模型组小鼠学习、记忆功能明显下降;洞板试验模型组小鼠探洞潜伏期明显延长,3 min 内的探索次数明显减少( $P < 0.01$ ),表明小鼠的自主活动能力明显降低;HE 染色模型组小鼠海马区变性、死亡细胞明显增多;免疫组化染色模型组小鼠海马锥细胞 caspase-3 呈阳性表达,表明海马锥细胞凋亡可能是造成小鼠记忆功能障碍的主要原因之一,其机制可能是颈椎稳定性异常,使椎间关节发生微小错位,结果导致椎动脉扭曲、嵌压使血流减少,脑能量代谢障碍,加上交感神经受刺激,通过应激反应,氧自由基增多而损伤生物膜,引起钙超载,诱导细胞凋亡。

综上所述,利用手术方法破坏寰枢椎周围软组织同样得到前期应用化学方法复制颈椎稳定性异常的实验结果<sup>[3,4]</sup>,即该造模方法从整体水平促进了小鼠的衰老进程;行为学检测显示,小鼠的学习记忆能力明显下降;形态学检测可见,小鼠海马锥细胞因凋亡而明显减少,表明用物理方法同样可以复制颈椎稳定性异常病理模型。

[参考文献]

[1] 段俊峰,段昕,宁俊忠,等. 颈椎病及其相关疾病的解剖学研究[J]. 颈腰痛杂志,2006,27(2):93-94.  
[2] 张峻忠,杜朝香. 颈椎退变性失稳影响颈椎病中药疗效的原因探讨[J]. 山东中医药大学学报,2001,25(3):198-199.  
[3] 林桂渺,赵洪艳,范文静,等. 寰枢椎长期乳酸堆积对老年小鼠学习记忆能力的影响[J]. 吉林大学学报(医学版),2006,32(6):968-970.  
[4] 范文静,何静春,崔巍,等. 人参二醇皂苷对小鼠颈椎稳定性异常致脑功能损伤的影响[J]. 中国康复理论与实践,2007,13(4):346-347.

(收稿日期:2007-12-03)



图2.1 动物一般状态

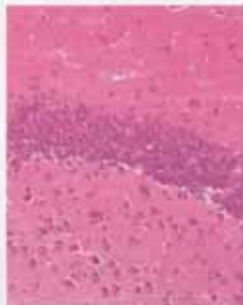


图2.2 对照组脑组织HE  
染色结果(400×)

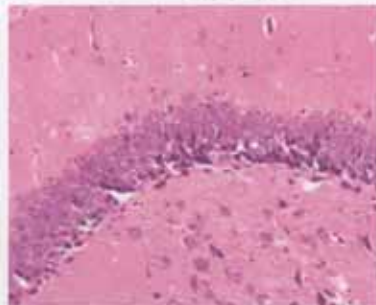


图2.3 模型组脑组织HE  
染色结果(400×)

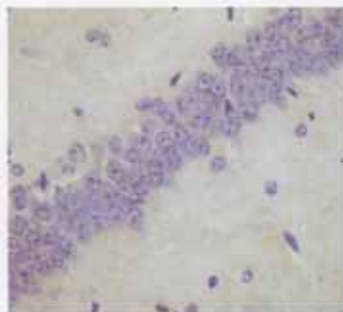


图2.4 对照组脑海马caspase-3  
免疫组织化学染色(400×)

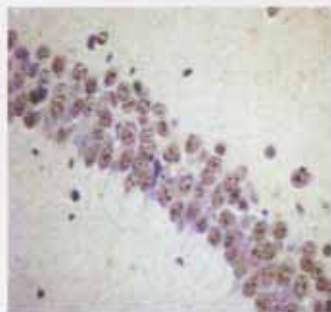


图2.5 模型组脑海马caspase-3  
免疫组织化学染色(400×)

图1.1-1.8 正文见P916-918,

图2.1-2.5 正文见P930-931.