ω-3 多不饱和脂肪酸对 PTSD-SPS 大鼠空间学习记忆和海马神经元溶酶体损伤的防护作用研究 *

王 彬[1] 朱 敏[1] 王 枫[1] 郑 刚[2] 谭庆荣[3] 张雪平[1△]

(1 第四军医大学军事预防医学院营养与食品卫生学教研室；2 第四军医大学军事预防医学院劳动卫生与环境卫生学教研室；3 第四军医大学西京医院脑科医院心身科 陕西 西安 710032)

摘要 目的：观察饲料中添加 ω-3 多不饱和脂肪酸对 PTSD-SPS 大鼠空间学习记忆能力及海马神经元溶酶体损伤的保护作用。**方法：**将 48 只健康成年雄性 SD 大鼠随机分为正常对照组、PTSD-SPS 模型组、30 % ω-3PUFAs +PTSD-SPS 模型组、60 % ω-3PUFAs + PTSD-SPS 模型组。采用 Morris 水迷宫测试方法，观察大鼠定位航行实验中逃避潜伏期及空间探索实验中靶象限活动时间的百分比及穿台次数。电子显微镜观察大鼠海马神经元超微结构变化。**结果：**与对照组相比，SPS 模型组大鼠逃避潜伏期延长，第 5 天达到 (39.12 ± 7.34) s (P<0.05)；第 6 天大鼠靶象限内活动时间百分比明显缩短及穿台次数减少，分别是 10.01 % ± 3.03 %及 (1.05 ± 0.13) 次；与 SPS 模型组对比，喂饲 60 % ω-3PUFAs 的 SPS 组大鼠逃避潜伏期为 (19.13 ± 4.26) s (P<0.05)，靶象限内活动时间百分比及穿台次数为 25.56 % ± 2.13 %、(2.36 ± 0.34) 次 (P<0.05)。电镜结果显示，喂饲 ω-3PUFAs 的 SPS 模型组大鼠海马神经元中溶酶体数量比 SPS 组明显减少，与对照组没有显著差异。**结论：**ω-3 多不饱和脂肪酸可能通过减少海马神经元溶酶体的数量对 PTSD-SPS 大鼠学习记忆损伤起到一定的防护作用。

关键词：PTSD；ω-3 多不饱和脂肪酸；学习记忆；海马；Morris 水迷宫

中图分类号：Q95-33，R338.64 **文献标识码：**A **文章编号：**1673-6273 (2012) 11-2010-04

Protective Effects of ω-3 Polyunsaturated Fatty Acids on PTSD-induced Impairment of Spatial Learning and Memory and the Lysosomes in Hippocampal Neurons*

WANG Bin[1], ZHU Min[1], WANG Feng[1], ZHENG Gang[2], TAN Qing-rong[3], ZHNAG Xue-ping[1△]

(1 Department of Nutrition and Food Hygiene; 2 Department of Occupational and Environmental Health; 3 Department of Psychosomatics, Institute of Clinic Neuroscience, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effects of ω-3 polyunsaturated fatty acids on PTSD-induced impairment of spatial learning and memory and the lysosomes in hippocampal neurons. Methods: Forty-eight male SD rats were randomly and equally divided into 4 groups: control group, PTSD-SPS group, 30 % ω-3PUFAs + PTSD-SPS group, 60 % ω-3PUFAs + PTSD-SPS group. The escape latency time was evaluated by using the navigation test in a Morris water maze, and the ratio of time spent in the target quadrant and the number crossing plate was evaluated by the probe test. Ultrastructural changes of hippocampal neurons were detected by transmission electron microscope. Results: Compared with the control group, the PTSD-SPS group had prolonged latency, (39.12 ± 7.34) s (P<0.05) in the fifth day, and had a decrease in the ratio of time spent in the target quadrant and the number of crossing plate in the sixth day, 10.01 % ± 3.03 % and (1.05 ± 0.13) times, respectively. The mean escape latency of the rats in 60 % ω-3PUFAs group was (19.13 ± 4.26) s (P<0.05), and the ratio of time spent in the target quadrant and the number of crossing plate was 25.56 % ± 2.13 %, (2.36 ± 0.34) times (P<0.05), respectively. Compared with the PTSD-SPS group, the number of lysosomes in the hippocampal neurons in 60 % ω-3PUFAs group was fewer than that in the SPS group by transmission electron microscope. There was no significance difference be- tween the ω-3PUFAs group and control group. Conclusion: Dietary Supplement of ω-3PUFAs may protect PTSD-induced impairment of spatial learning and memory by decreasing the number of lysosomes in hippocampal neurons.

Key words: PTSD; Learning and memory; ω-3 polyunsaturated fatty acids; Hippocampus; Morris Water Maze

Chinese Library Classification (CLC): Q95-33, R338.64 Document code: A

Article ID:1673-6273(2012)11-2010-04

---

*基金项目：国家自然科学基金(30972428)

作者简介：王彬(1985-)，男，硕士研究生，主要研究方向：主要从事营养素与精神应激研究。

Tel：13572131134，E-mail: zhangxp@fmmu.edu.cn

△通讯作者：张雪平，博士，E-mail: zxp20012004@yahoo.com.cn

(收稿日期：2012-01-06 接受日期：2012-01-31)

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

前言

创伤后应激障碍(PTSD)是由异乎寻常的威胁性或灾难心理创伤导致延迟出现和长期持续的精神障碍。PTSD是一种严重的应激疾病,由于中枢神经系统对应激信息的记忆过程出现障碍,引起海马等脑区出现神经可塑性改变,从而影响大脑学习记忆功能[1]。ω-3多不饱和脂肪酸(ω-3PUFAs)是人体必需的营养素,主要成分包括二十碳五烯酸(EPA)和二十二碳六烯酸(DHA),具有维持正常生长发育和提高脑记忆功能的作用,与学习记忆关系密切[2]。研究表明,饮食中添加ω-3PUFAs可逆转由于应激损伤引起的学习记忆,认知等功能障碍[3],其具体作用机制还不明确。本研究通过建立PTSD-SPS大鼠模型(SPS模型是目前研究PTSD的主要模型之一),观察PTSD-SPS模型大鼠空间学习记忆能力及海马神经元超微结构的改变,以及膳食补充ω-3PUFAs的保护作用,为研究ω-3PUFAs制剂对PTSD疾病引起的学习记忆损伤的预防及可能的机制提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物及分组

健康成年雄性SD大鼠48只,体质量(60±10)g,清洁级,购自第四军医大学实验动物中心。动物在光/暗周期为12 h/12 h、自然光照条件下饲养适应5天。大鼠被随机分为四组,正常对照组,PTSD-SPS模型组,30% ω-3PUFAs + PTSD-SPS模型组,60 % ω-3PUFAs + PTSD-SPS模型组,每组12只。对照组及SPS模型组以基础饲料喂养,ω-3 PUFAs组饲料中添加了占基础饲料中油料30 %及60 %鱼油(DHA +EPA),各组按配置好的饲料喂饲一个月后开始造模。

1.2 实验器材及材料

1.2.1 Morris水迷宫 水迷宫为一直径160 cm、高50 cm的圆形水池,水池内壁被漆为黑色,池内水深23 cm,水温保持在(21±2)℃,房间内光照恒定,无光线直射在水池内。池壁上以四个等距离点将水池分为四个象限,在靶象限内距离池壁35 cm处放有一个直径为12 cm、高21 cm的圆形黑色站台,站台位于水面下2 cm。池壁内贴有不同形状及颜色的标记物。迷宫上方安置连接显示系统的摄像机,同步记录大鼠运动轨迹。采用上海吉量软件科技有限公司研制开发的Morris水迷宫视频分析系统进行信息处理,该系统能动态记录大鼠在水迷宫中游泳的录像资料,设定分析参数,进行在线或离线数据分析,并提供大鼠上台潜伏期、靶象限活动时间百分比、穿台次数、游泳速度、游泳路程等多个指标。

1.2.2 ω-3多不饱和脂肪酸 ω-3PUFAs制剂为深海鱼油胶囊,主要成分为EPA≥ 170 mg、DHA≥ 110 mg。基础饲料购自第四军医大学实验动物中心,自行配置30 %和60 %的鱼油饲料。

1.3 实验方法

1.3.1 PTSD-SPS动物模型的制备 大鼠禁锢2 h,然后立即强迫其游泳(水深40 cm,水温25 ℃)20 min;经过15 min的恢复,密闭容器内乙醚麻醉至意识丧失,在笼中不经任何打扰持续至苏醒[4]。对照组动物无干扰喂养,常规饲养直至取材。

1.3.2 定位航行实验 实验前将大鼠置于站台上适应20 s,随后将大鼠随机从不同象限(靶象限除外)面壁置入池内,大鼠登上站台10 s后终止记录,最长记录时间为60 s,若大鼠在60 s内不能上台,引导其登上站台适应10 s,然后将大鼠拭干放入鼠笼。如此将大鼠置入游泳池,每天同一时间训练一次,定位航行训练需要5天完成。测量平均逃避潜伏期,以此评判大鼠的空间学习能力。

1.3.3 空间探索实验 定位航行训练结束后撤除水面下的站台,于实验第6天将大鼠随机从不同象限(靶象限除外)面壁置入池内,记录大鼠在60 s内的游泳轨迹并进行分析,最后将大鼠拭干放入鼠笼。观察第6天大鼠在靶象限活动时间的比率和穿台次数,以此评判大鼠的空间记忆能力。

1.3.4 海马神经元电镜观察 造模后1天,大鼠用1 %戊巴比妥钠麻醉,打开胸腔,用0.9 %的生理盐水200 ml冲血,4 %多聚甲醛灌注固定,断头后取出海马,在不同部位,切取约1 mm× 1 mm× 1 mm的海马组织10块,固定于4 %戊二醛溶液内,之后每组10块组织中随机选出3块组织,常规锇酸固定,逐级酒精脱水,E-pon812包埋,半薄切片定位,最后制成超微切片。经醋酸铀、柠檬酸铅双重染色后,在JEM-100CX2型透射镜下拍照。统计学处理应用SPSS13.0统计分析软件对数据进行统计分析,数据以均值± 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,进行t检验,P<0.05为具有统计学差异。

2 结果

2.1 ω-3PUFAs对造模后大鼠学习记忆的影响

2.1.1 ω-3PUFAs对造模后大鼠空间学习的影响 通过定位航行实验比较各组逃避潜伏期时间。与对照组相比,SPS模型组大鼠逃避潜伏期明显延长(Table 1,P<0.05),喂饲ω-3PUFAs的SPS组大鼠的逃避潜伏期没有明显的变化,无统计学差异;与SPS模型组相比,60 % ω-3PUFAs组大鼠的逃避潜伏期明显缩短,在第四天和第五天分别达到18.22 ± 5.07,19.13 ± 4.26(Table 1,P<0.05),具有显著统计学意义。

2.1.2 ω-3PUFAs对造模后大鼠空间记忆的影响 通过空间探

表1 定位航行实验中各组大鼠逃避潜伏期比较(s)($\bar{x}\pm s$,n=12)

Table 1 The escape latency time of rats in the navigation experiment (s) ($\bar{x}\pm s$,n=12)

Group	d1	d2	d3	d4	d5
Control	32.00± 6.89	28.23± 6.98	20.36± 7.92	17.21± 9.87	14.25± 6.35
SPS	58.14± 3.25△	53.26± 8.64△	43.12± 3.22△	38.23± 10.01△	39.12± 7.34△
30 % PUFAs	31.55± 2.61*	29.25± 6.35*	20.23± 4.59*	21.13± 3.66*	20.02± 4.30*
60 % PUFAs	30.21± 1.68**	28.30± 2.34**	21.00± 1.69**	18.22± 5.07**	19.13± 4.26**

注:△P<0.05与对照组比较;*P<0.05,**P<0.05与SPS模型组比较

Note: △P<0.05 compared with the control group; *P<0.05, **P<0.05 compared with the SPS model group

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

索实验的两个指标靶象限活动时间百分比及靶象限穿台次数评价大鼠空间记忆能力。本次实验中，SPS 模型组大鼠靶象限活动时间百分比及穿台次数较对照组减少（Fig. 1），分别为 10.01 % ± 3.03 %及（1.05 ± 0.13）次；喂饲 60 % ω-3PUFAs 的 SPS 模型组大鼠靶象限活动时间百分比及穿台次数较 SPS 模型组明显增加（Fig. 1），分别达到 25.56 % ± 2.13 %及 2.36 ± 0.34）次，P＜0.05，具有统计学意义。

2.2 ω-3PUFAs 对海马神经元超微结构的影响

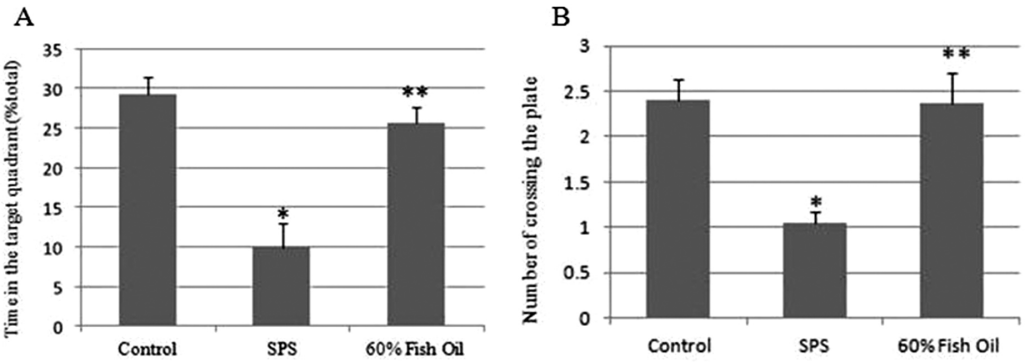

图 1 空间探索实验中各组大鼠靶象限活动时间百分比及穿台次数

Fig. 1 The rats' performance in the probe test. A: The ratios of time spent in the target quadrant; B: Number of crossing the plate

与正常对照组相比，SPS 模型组大鼠海马神经元中溶酶体明显增多（Fig. 2 B），在实验的过程中，同时观察到线粒体肿胀及神经元细胞突起改变；与 SPS 模型组相比，喂饲 60 % ω-3PUFAs 的 SPS 模型组大鼠海马神经元溶酶体的数量明显减少（Fig. 2 C），与对照组相比其数量没有显著差异。

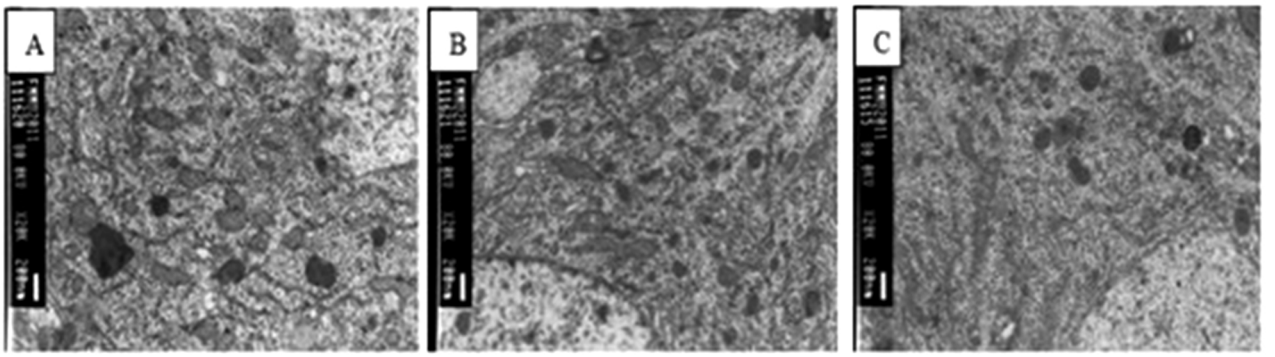

图 2 电镜观察大鼠海马神经元超微结构的变化（× 20K）：A 正常对照组 B PTSD-SPS 模型组 C 60 % ω-3PUFAs+ PTSD-SPS

Fig. 2 Ultrastructural changes of hippocampal neurons by transmission electron microscope（× 20K）:A. Control; B. PTSD-SPS model; C.60 % ω-3PUFAs+ PTSD-SPS

3 讨论

当今世界，自然灾害频发，交通事故、局部战争不断，这些均导致了 PTSD 的患病率居高不下。PTSD 病人会表现一系列的学习记忆、认知功能障碍、多种情感行为异常等症状[5-7]。研究发现，应激在多数情况下有损伤动物空间学习和记忆的作用[8]。海马是与学习记忆密切相关的脑区。在应激所致的精神障碍中，常应用 Morris 水迷宫测量动物的空间学习记忆能力[9]，而且 Morris 水迷宫是一种研究与海马功能直接相关的空间学习记忆模型[10]。定向航行实验反映动物对平台空间位置的记忆，评价动物的空间学习记忆能力；空间探索实验用于测试动物记忆保持的能力。本实验结果显示，SPS 模型组大鼠逃避潜伏期延长，提示其空间学习和记忆的获得与巩固过程受到影响，空间学习记忆能力下降；靶象限活动时间百分比及穿台次数的下降进一步提示 SPS 模型组大鼠空间记忆保持能力下降。

PTSD 可致海马神经元形态改变，加速部分海马神经元细胞的死亡，进而影响认知和学习过程，损害海马依赖性的记忆[11-13]。有研究表明，应激可引起海马神经元胞凋亡，与其细胞的溶酶体的表达和变化有关[14-16]。本实验中 SPS 模型组大鼠海马组织细胞溶酶体明显增多，实验中同时发现线粒体肿胀，神经元突起改变。本实验结果与文献报道一致，推测本研究中 SPS 模型大鼠的海马神经元有一定的损伤，海马神经元超微结构的改变可能是导致其损伤的原因之一。

ω-3PUFAs 对外伤性脑损伤导致的学习记忆能力起到保护作用[17,18]。近年来的研究表明，膳食添加 ω-3PUFAs 对于 PTSD、抑郁症和阿尔茨海默病等精神疾病的改善有一定效果[19-21]，这

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

其中的机制可能在于 ω-3PUFAs 不足会降低神经递质如 5-羟色胺的功能。5-羟色胺是一个关键的神经发育信号，如果其活性受损，会引起神经元组织持久损伤。而 ω-3PUFAs 可通过调节色氨酸羟化酶、5-羟色胺再摄取泵及其受体的活性而影响 5-羟色胺的代谢，从而促进神经向外生长，并抑制凋亡。本实验结果显示，SPS 模型组大鼠比对照组大鼠空间学习记忆能力明显下降，其海马神经元中溶酶体数量明显增加；添加 60 % ω-3PUFAs 的 SPS 模型组大鼠学习记忆能力与对照组无显著差异，并且海马神经元中溶酶体数量没有明显的变化，提示 ω-3PUFAs 可能通过预防海马神经元超微结构的损伤而对 SPS 大鼠的空间学习记忆能力下降起到一定的防护作用，而 ω-3PUFAs 对 PTSD 可能有一定的防护作用，具体机制将在今后的工作中进一步研究。

参考文献(References)

[1] Walker DL, Davis M. The role of amygdala glutamate receptors in fear learning, fear-potentiated startle, and extinction [J]. Pharmacol Biochem Behav, 2002, 71(3):379-392

[2] Innis SM. Dietary (n-3) fatty acids and brain development [J]. J Nutr, 2007, 137(4):855-859

[3] Ferraz AC, Delattre AM, Almendra RG, et al. Chronic ω-3 fatty acids supplementation promotes beneficial effects on anxiety, cognitive and depressive-like behaviors in rats subjected to a restraint stress protocol [J]. Behav Brain Res, 2011, 219(1):116-122

[4] Liberzon I, Krstov M, Young EA. Stress-restress: effects on ACTH and fast feedback [J]. Psychoneuroendocrinology, 1997, 22(6):443-453

[5] Samuelson KW. Post-traumatic stress disorder and declarative memory functioning: a review [J]. Dialogues Clin Neurosci, 2011, 13(3): 346-351

[6] Yehuda R. Risk and resilience in posttraumatic stress disorder [J]. J Clin Psychiatry, 2004, 65(1):29-36

[7] Marshall RD, Garakani A. Psychobiology of the acute stress response and its relationship to the psychobiology of posttraumatic stress disorder [J]. Psychiatr Clin North Am, 2002, 25(2):385-395

[8] Wright RL, Conrad CD. Chronic stress leaves novelty-seeking behavior intact while impairing spatial recognition memory in the Y-maze [J]. Stress, 2005, 8(2):151-154

[9] Engelmann M, Ebner K, Landgraf R, et al. Effects of Morris water maze testing on the neuroendocrine stress response and intrahypothalamic release of vasopressin and oxytocin in the rat [J]. Horm Behav, 2006, 50(3):496-501

[10] Gandhi CC, Kelly RM, Wiley RG, et al. Impaired acquisition of a Morris water maze task following selective destruction of cerebellar purkinje cells with OX7-saporin [J]. Behav Brain Res, 2000, 109(1): 37-47

[11] Diamond DM, Park CR. Predator exposure produces retrograde amnesia and blocks synaptic plasticity. Progress toward understanding how the hippocampus is affected by stress [J]. Ann N Y Acad Sci, 2000, 911:453-455

[12] Eckart C, Kaufmann J, Kanowski M, et al. Magnetic resonance volumetry and spectroscopy of hippocampus and insula in relation to severe exposure of traumatic stress [J]. Psychophysiology, 2012, 49(2): 261-270

[13] Woodward SH, Kaloupek DG, Grande LJ, et al. Hippocampal volume and declarative memory function in combat-related PTSD [J]. J Int Neuropsychol Soc, 2009, 15(6):830-839

[14] 袁辉, 韩芳, 石玉秀. PTSD 样大鼠海马神经元凋亡及其 ACP 变化的研究[J].中国组织化学与细胞化学杂志, 2008, 17(1):100-105
Yuan Hui, Han Fang, Shi Yu-xiu. Expression of ACP and Apoptosis in Hippocampal Neurons in Animal Model of PTSD [J]. Chinese Journal Of Histochemistry and Cytochemistry, 2008, 17(1):100-105

[15] 袁辉, 韩芳, 石玉秀. PTSD 样大鼠海马神经元溶酶体与线状溶酶体的观察[J].中国医科大学学报, 2008, 37(4):433-435
Yuan Hui, Han Fang, Shi Yu-xiu. Study on the Lysosomes and Nematolysosomes Expression in Hippocampal Neurons in SPS Rats of PTSD [J]. Journal of China Medical University, 2008, 37(4):433-435

[16] Li XM, Han F, Liu DJ, et al. Single-prolonged stress induced mitochondrial-dependent apoptosis in hippocampus in the rat model of post-traumatic stress disorder [J]. J Chem Neuroanat, 2010, 40(3): 248-255

[17] Wu A, Ying Z, Gomez-Pinilla F. Dietary omega-3 fatty acids normalize BDNF levels, reduce oxidative damage, and counteract learning disability after traumatic brain injury in rats [J]. J Neurotrauma, 2004, 21(10):1457-1467

[18] Su HM. Mechanisms of n-3 fatty acid-mediated development and maintenance of learning memory performance [J]. J Nutr Biochem, 2010, 21(5):364-373

[19] Matsuoka Y, Nishi D, Yonemoto N, et al. Potential role of brain-derived neurotrophic factor in omega-3 Fatty Acid supplementation to prevent posttraumatic distress after accidental injury: an open-label pilot study [J]. Psychother Psychosom, 2011, 80(5):310-312

[20] Puri BK, Richardson AJ, Horrobin DF, et al. Eicosapentaenoic acid treatment in schizophrenia associated with symptom remission, normalisation of blood fatty acids, reduced neuronal membrane phospholipid turnover and structural brain changes [J]. Int J Clin Pract, 2000, 54(1):57-63

[21] Gertsik L, Poland RE, Bresee C, et al. Omega-3 fatty acid augmentation of citalopram treatment for patients with major depressive disorder [J]. J Clin Psychopharmacol, 2012, 32(1):61-64

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net