

咖啡因对慢性刺激过程中小鼠行为和学习记忆的影响

夏 誉 武志伟 尉晓娜 蒋尚融 舒 丹 何金彩

摘 要 **目的** 探讨咖啡因对慢性刺激小鼠行为和学习记忆的影响。**方法** 选取 28 只 C57BL/6J 小鼠,随机分为正常组($n=10$):空白 + 0.15ml 生理盐水;刺激组($n=8$):慢性刺激 + 0.15ml 生理盐水;药物组($n=10$):慢性刺激 + 15mg/kg 咖啡因。刺激组和药物组分别孤养,并接受持续 10 周的慢性不可预知温和刺激。结合旷场实验和 Morris 水迷宫方法,评价小鼠的行为和学习记忆能力。**结果** 10 周后刺激组和药物组的水平穿越格子数[(118.50 ± 12.20)次,(80.10 ± 16.02)次]都明显高于正常组(49.00 ± 10.05)次($P < 0.01$);水迷宫测试中,药物组定位航行训练第 1 天的潜伏期明显短于正常组和刺激组[(13.12 ± 2.27)s,(27.34 ± 5.00)s,(30.62 ± 4.54)s]($P < 0.05$);药物组和正常组体重增加量[(3.40 ± 0.37)g,(5.40 ± 0.69)g]有明显差异($P < 0.05$),10 周后药物组和正常组体重[(24.60 ± 0.43)g,(26.60 ± 0.62)g]有明显差异($P < 0.05$)。**结论** 长期慢性低剂量咖啡因注射可以减缓慢性刺激下小鼠体重增加,同时还能加强刺激状态下小鼠的空间学习记忆能力;长期慢性刺激也能加强小鼠的探索行为。

关键词 咖啡因 慢性刺激 旷场实验 Morris 水迷宫 学习记忆

Effect of Caffeine on Learning and Memory Ability and Behavior of Mice in Chronic Stress. Xia Yu, Wu Zhiwei, Wei Xiaona, Jiang Shangrong, et al. The First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Department of Neurology, Zhejiang 325000, China

Abstract **Objective** To explore the effects of caffeine on learning and memory ability and behavior of mice in chronic stress. **Methods** Totally 28 mice were randomly divided into 3 group: Control group: vehicle + 0.15ml saline; Chronic stress group: chronic stress + 0.15ml saline; Drug group: chronic stress + 15mg/kg Caffeine. Chronic stress and drug group were received chronic unpredictable mild stress of ten weeks and single house. The learning and memory ability were measure by morris water maze and behavior was measured by open-field test. **Results** After 10 weeks, the activity in the open field test in both drug groups and chronic stress group [(118.50 ± 12.20) counts, (80.10 ± 16.02) counts] increased more than control group (49.00 ± 10.05) counts ($P < 0.01$). Compared to the control group and chronic stress group [(27.34 ± 5.00)s, (30.62 ± 4.54)s], the escape latency of drug group (13.12 ± 2.27) in the morris water maze was decreased ($P < 0.05$). After 10 weeks, the weight of drug group was more than control group [(24.60 ± 0.43)g, (26.60 ± 0.62)g] ($P < 0.05$), The increase of weight of drug group was slower than control group [(3.40 ± 0.37)g, (5.40 ± 0.69)g] ($P < 0.05$). **Conclusion** Long period consumption of caffeine could slower the weight increase and improve the learning and memory after chronic stress. Long period chronic stress could also enhance the explore ability.

Key words Caffeine; Chronic stress; Open field test; Morris water maze; Learning and memory

在现代社会激烈地竞争压力下,生活节奏明显加快,人们一直处在高度紧张状态之中。虽然无严重的躯体疾病,但精神状况堪忧,主要以失眠、兴趣减退、记忆力下降等形式出现。咖啡因是目前世界上使用最广泛的精神兴奋性类药物,普遍存在于茶和咖啡等软饮料中^[1]。其化学结构中含甲基嘌呤类活性成份,是腺苷受体非特异性拮抗剂,主要拮抗腺苷 A1 和 A2A 受体。近年来对咖啡因在学习记忆的研究逐渐受到关注。本研究主要采用 Morris 水迷宫和旷场

实验行为学评价方法,观察咖啡因对慢性刺激状态下小鼠的探索能力和空间学习记忆的影响。

对象与方法

1. 动物及分组:8~10 周龄,C57BL/6J 雄性小鼠,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,清洁级饲养,昼夜节律 12h/12h,动物可以自由获取食物和饮水。选择旷场实验得分相近的 28 只动物,按随机数表法分为正常组、刺激组和药物组,实验前适应 1 周。药物:咖啡因,购于日本和光纯药工业株式会社。临用前用生理盐水稀释。

2. 方法:(1)刺激过程:参考文献方法,接受 10 周的慢性刺激,包括:24h 禁食;24h 禁水;24h 昼夜颠倒;5min 10℃ 冰水游泳;8h 束缚;5min 夹尾;潮湿环境(8、16h);配对饲养(8、16h);12h 通宵照明;倾斜 45°鼠笼(8、16h)。实验过程中每天随机出现两种刺激,相同的刺激不连续出现^[2~4]。正常组:动物不接受任何刺激,饲养 5 只/笼。刺激组和药物组:动物每

基金项目:温州市科技局对外科技合作交流项目(H20100021)

作者单位:325000 温州医学院附属第一医院神经内科(夏誉、武志伟、尉晓娜、蒋尚融、何金彩);温州医学院心理系(舒丹、何金彩)

通讯作者:何金彩,教授,硕士生导师,电子信箱:hejcen@yahoo.

com.cn

天接受两种不同刺激,且单笼饲养。(2)给药:每天下午 16:00~17:00 进行,正常组和刺激组每只腹腔注射生理盐水 0.15ml,药物组每只腹腔注射 15mg/kg 咖啡因。(3)行为学观察:①旷场实验^[5]:采用北京硕林苑科技有限公司动物行为学视频分析系统,装置为一长方体形敞箱,长宽高分别为 50cm×50cm×20cm,底面划分为 25 个等边方格。实验室内保持安静,实验前动物在房间内先适应 1h。开始时将小鼠置于敞箱底面中央,用摄像头记录小鼠在 5min 内水平运动穿越的格子数。彻底清洁敞箱后再进行下一只测试。每周日上午 8:00~13:00 进行测试;②Morris 水迷宫^[6]:采用上海吉量软件科技有限公司的视频分析系统,水迷宫由圆形水池、平台和视频记录系统 3 部分构成。圆形水池是直径 100cm、高 50cm 的灰色铁皮大桶。平台直径 8cm,置于东南西北任一象限中央,没于水下 1cm,水温控制在 22~26℃。摄像机头在水池正上方约 1.5m 处,记录小鼠的游泳轨迹。定位航行实验:连续训练 4 天,每天 4 次,随机从东南西北 4 个象限将小鼠放入水中,放入时小鼠面向池壁,腹壁面向水面。记录小鼠从放入水池至找到并爬上平台的时间。每次观察时间为 60s,如果在 60s 内未找到平台则由实验者引上平台,潜伏期记为 60s。每天训练 4 次逃避潜伏期的平均值记为当天成绩。潜伏期越短,说明空间学习能力强。空间搜索实验:在第 5 天撤除平台,实验方法同前,记录小鼠在 60s 内穿越原平台所在位置的次数,作为空间搜索实验的成绩。穿越原平台的次数越多,则反映空间探索能力越强;③体重:称量实验前 1 天及第 10 周的体重。

3. 统计学方法:数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用统计学软件 SPSS 16.0 对原始数据进行统计分析。旷场实验水平运动穿越格子数和 Morris 水迷宫逃避潜伏期采用重复测量方差分析(RANOVA);Morris 水迷宫空间搜索穿越平台次数和体重增加量采用单因素方差分析(One-way ANOVA),以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 小鼠在旷场实验中的探索能力:慢性刺激前,3 组小鼠的水平穿越格子数没有显著性差异($P > 0.05$);实验第 2 周开始,刺激组和药物组的水平穿越格子数显著高于正常组($P < 0.05$);而刺激组和药物组之间没有统计学差异($P > 0.05$);随着测试次数的增加各组的穿越格子都在显著减少(图 1)。

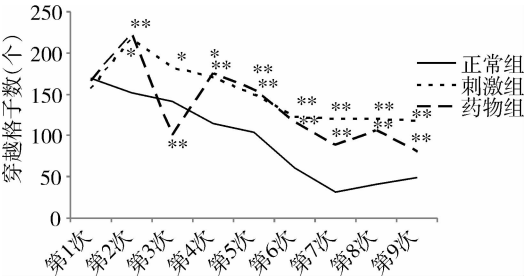


图 1 水平穿越格子数

和正常组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

2. 小鼠在 Morris 水迷宫中的空间学习记忆能力:①空间搜索穿越平台次数:在 Morris 水迷宫空间搜索实验中,正常组、刺激组、药物组 3 组之间穿越平台数没有明显统计学差异($P > 0.05$),分别为 4.13 ± 0.34 、 3.56 ± 0.71 、 3.50 ± 0.38 次,但正常组的次数在绝对数上要多于刺激组和药物组;②定位航行潜伏期:在 Morris 水迷宫定位航行实验中,随着训练天数的增加,各组小鼠的逃避潜伏期逐渐缩短($P < 0.01$),其中训练第 1 天药物组逃避潜伏期要明显短于正常组和刺激组($P < 0.01$);刺激组逃避潜伏期虽比正常组长,但是没有显著性差异($P > 0.05$,图 2)。

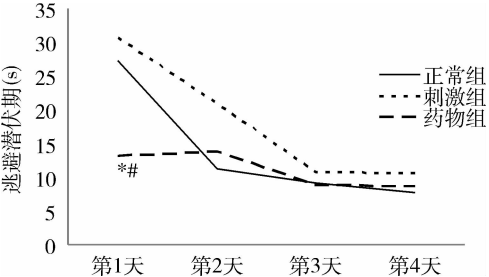


图 2 Morris 水迷宫定位航行实验中逃避潜伏期

和正常组比,* $P < 0.01$;和刺激组比,* $P < 0.01$

3. 对小鼠体重的影响:实验开始前,各组小鼠的体重没有显著性差异($P > 0.05$)。随着周龄的增加,各组小鼠的体重都在增长,但刺激组和正常组之间的体重增加量没有明显的统计学差异($P > 0.05$);药物组体重在第 10 周时明显低于正常组($P < 0.05$),体重增加量药物组也明显低于正常组($P < 0.05$,表 1)。

表 1 小鼠体重变化(g, $\bar{x} \pm s$)

组别	实验前	实验第 10 周	体重增加量
正常组	21.80 ± 0.44	26.60 ± 0.62	5.40 ± 0.69
刺激组	22.00 ± 0.38	25.38 ± 0.42	4.63 ± 0.65
药物组	21.90 ± 0.38	24.60 ± 0.43 *	3.40 ± 0.37 *

和正常组比较,* $P < 0.05$

讨 论

本研究参考慢性抑郁模型造模过程中的各种刺激,用以模拟社会中遇到的各类生活应激事件,以探索咖啡因对应激状态下小鼠的行为和空间学习记忆的影响^[4]。以往的研究表明咖啡因发挥其生物活性功能主要是通过拮抗腺苷各类受体^[7]。在本研究中主要采用 Morris 水迷宫及旷场实验观察慢性咖啡因对遭受应激小鼠的行为活动和记忆影响。

Morris 水迷宫是评价动物空间学习记忆功能的,

主要是观察动物在水迷宫中的行为学表现,宏观的表示神经系统功能以及药物的效应,这些长时程增强效应与 NMDA 受体功能相关,是研究海马回路功能的关键方法^[8]。Morris 水迷宫定位航行实验的重复训练,是空间学习和记忆巩固的过程,而空间搜索实验寻找原平台的过程就是记忆再提取的过程。

本研究结果如图 2 所示,随着训练天数的增加各组的逃避潜伏期都明显缩短,第 3 天后趋于稳定,说明随着训练次数的增加空间记忆显著得到了加强。药物组在训练的第 1 天逃避潜伏期就明显的短于其他两组,验证了咖啡因在加强学习记忆能力方面的作用。空间探索实验中,穿越原平台的次数,刺激组和药物组都要比正常组差,但没有明显差异,这与我们课题组的前期研究,小剂量咖啡因能加强小鼠空间搜索能力存在出入^[9]。导致这一结果不一致的原因可能是:①本研究实验条件下长期咖啡因注射对改善小鼠的记忆再提取影响不明显;②实验中选用的咖啡因浓度有差异;③应激状态下小鼠对咖啡因的敏感性下降;定位航行实验中,刺激组的逃避潜伏期要短于正常组相比,但没有明显的差异。

有文献报道,慢性刺激抑郁模型小鼠可能由于 BDNF 和 CREB 表达的减少,其空间学习记忆能力受到了损害^[10]。Angelucci 等^[11]报道咖啡因可以提高大鼠的空间学习和记忆能力。临床研究发现生活中长期大量消耗咖啡因的老龄妇女其认知和记忆能力测试表现要明显好于对照组^[12]。而本研究的慢性刺激对小鼠空间记忆损害不明显,可能是慢性刺激对海马区的 BDNF 表达影响不明显,不足以引起学习记忆的损害,没有影响记忆的提取。本研究的结果表明在慢性刺激状态下长期咖啡因消耗能加强小鼠的学习和记忆巩固能力,但对记忆再提取能力没有明显影响,神经可塑性高。新近研究发现,可以改善学习记忆的腺苷 A1 受体拮抗剂 ASP5854,其实同时阻断了腺苷 A1 和 A2A 受体,即 ASP5854 改善学习记忆是通过阻断腺苷 A1 和 A2A 双受体^[13]。同时,我们的最新研究也发现,腺苷 A2A 受体敲除小鼠其空间学习记忆能力也明显增强^[6]。因此,咖啡因对学习记忆的影响,可能是通过其同时阻断了腺苷 A1 和 A2A 受体而影响学习记忆的。

旷场实验普遍用于评价动物焦虑、抑郁、自发活动和探索行为能力。本研究结果(图 1)显示,经过长期慢性刺激后,小鼠在旷场实验中的穿越格子数显著减少,这与 Shi 等^[14]的研究结果相符。除此之外,给

予慢性刺激后,刺激组和药物组的穿越格子数显著高于正常组。然而,有研究显示,慢性刺激诱发的抑郁模型中,模型动物的穿越格子数要明显少于正常对照组^[2]。这可能与实验动物的品系、遭受的刺激不同有关。有研究报道不同的刺激对动物在旷场中的活动表现是不同或是相反的。Mineur 等发现,遗传背景和性别在动物对慢性刺激的反应敏感性方面起决定作用,引起的行为表现也各有差异。如抑郁症病人的临床表现各异一样,有些人活动增加,有些人活动减少。腺苷 A1 或 A2A 受体敲除小鼠有抗焦虑作用。但本研究中刺激组和药物组穿越格子数间没有明显差异,提示此剂量的咖啡因可能对小鼠在慢性刺激状态下的兴奋作用减弱,作用不明显。慢性应激可能使小鼠的兴奋性反应接近峰值,达到小鼠可以承受的应激兴奋状态后,对神经兴奋性药物如咖啡因的反应极微,不足以表现其生物活性。此外,刺激可能在一定程度上增加了腺苷的释放,与咖啡因拮抗作用相抵消。以上结论有待进一步研究加以支持解释。

本研究结果如表 2 所示,在慢性刺激的过程中,随着小鼠周龄的增加体重都在增长,但正常组和刺激组之间的体重增加量没有明显差异,这与 Grippo 等的研究经过慢性刺激后,正常组和慢性组之间的体重并没有明显差异相符。而应激结束后,药物组的体重要明显低于正常组,提示咖啡因能减缓小鼠体重的增加,这与 Esther 等的研究,长期咖啡因的摄入会减慢体重增加的临床研究一致。早期研究,咖啡因通过增加机体的代谢能力,摄入咖啡因 3h 后,脂肪分解加速。Spriet 等也报道,咖啡因能增加运动状态下肌肉组织对脂肪的利用。本研究中,刺激组和药物组在旷场实验中的探索能力得到增强,活动量增加,既运动量增加。药物组的脂肪利用提高,体重增加要慢于正常组。因此慢性咖啡因注射能减缓应激状态下小鼠的体重增加量,但不改变其生长趋势。

综上所述,本研究中咖啡因能缩短小鼠空间记忆中的定位航行潜伏期,能增加其在旷场试验中的探索行为。咖啡因对慢性刺激小鼠空间记忆和行为活动的影响可能是通过其对于腺苷受体的拮抗作用和海马中 BDNF 含量变化发挥生物学功能;而对体重的影响可能是其增强机体的代谢效能,增加脂肪消耗引起的。

参考文献

- 1 Fredholm BB, Battig K, Holmen J, et al. Actions of caffeine in the brain with special referenceto factors that tribute to its widespread use

- [J]. *Pharmacol Rev*, 1999, 51(1): 83 - 133
- 2 Katz RJ, Roth KA, Schmaltz K. Amphetamine and tranlycypromine in an animal model of depression: pharmacological specificity of the reversal effect [J]. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 1981, 5(2): 259 - 264
- 3 Willner P, Towell A, *et al.* Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant [J]. *Psychopharmacology (Berl)*, 1987, 93(3): 358 - 364
- 4 李卫东, 杨秀岩. 电针对慢性应激抑郁模型大鼠行为与海马组织环磷酸腺苷水平的影响 [J]. *中国行为医学科学*, 2007, 16(12): 1060 - 1062
- 5 Li S, Wang M, Li W, *et al.* Antidepressant like effects of piperine in chronic mild stress treated mice and its possible mechanisms [J]. *Life Sci*, 2007, 80(15): 1373 - 1381
- 6 Zhou SJ, Zhu ME, Shu D, *et al.* Referential enhancement of working memory in mice lacking adenosine A2A receptors [J]. *Brain Res*, 2009, 1303(1): 74 - 83
- 7 Joaquim A, Ribeiro, Ana M. Caffeine and adenosine [J]. *Journal of Alzheimer's Disease*, 2010, 20(1): 3 - 15
- 8 Vorhees CV, Williams MT. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory [J]. *Nature*, 2006, 1(2): 848 - 858
- 9 周赛君, 何金彩, 王小同. 中国临床神经科学 [J], 2008, 16(2): 139 - 144
- 10 Song L, Che W, Min - Wei W, *et al.* Impairment of the spatial learning and memory induced by learned helplessness and chronic mild stress [J]. *Pharmacol Biochem Beha*, 2006, 83(2): 186 - 193
- 11 Angelucci ME, Cesario C, Hiroi RH, *et al.* Effects of caffeine on learning and memory in rats tested in the Morris water maze [J]. *Braz J Med Biol Res*, 2002, 35(10): 1201 - 1208
- 12 Johnson - Kozlow M, Kritz - Silverstein D, Barrett - Connor E, *et al.* Coffee consumption and cognitive function among older adults [J]. *Am J Epidemiol* 2002, 156(9): 842 - 850
- 13 Mihara T, Mihara K, Yanimizu J, *et al.* Pharmacological characterization of a novel, potent adenosine A1 and A2A receptor dual antagonist, 5 - [5 - amino - 3 - (4 - fluorophenyl) pyrazin - 2 - yl] - 1 - isopropylpyridine - 2(1H) - one (ASP5854), in models of Parkinson's disease and cognition [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2007, 323(3): 708 - 719
- 14 Shi SS, Shao SH, Yuan BP, *et al.* Acute stress and chronic stress change brain - derived neurotrophic factor (BDNF) and tyrosine kinase - coupled receptor (TrkB) expression in both young and aged rat hippocampus [J]. *Yonsei Med J*, 2010, 51(5): 661 - 671

(收稿: 2011 - 09 - 09)

(修回: 2011 - 09 - 30)

正常中脑导水管脑脊液流动与年龄相关性研究

胡卫东 项立 张宏光 高天俊 王秀荣

摘要 目的 对正常女性中脑导水管层面脑脊液 (cerebrospinal fluid, CSF) 的流动情况进行磁共振 (magnetic resonance imaging, MRI) 定量研究并将其与年龄进行回归分析。方法 筛选 38 例正常女性志愿者, 测量其中脑导水管 CSF 流动情况, 以年龄作为因变量, 流速 (收缩期向下最大流速 V1、舒张期向上最大流速 V2、平均向下流速 V3、平均向上流速 V4 及平均流速 V5)、流量 (收缩期向下最大流量 Q1、舒张期向上最大流量 Q2、平均向下流量 Q3、平均向上流量 Q4、平均流量 Q5、平均净流量 Q6) 及心动周期 (收缩期向下最大流速对应心动周期 T1、舒张期向上最大流速对应心动周期 T2、平均心动周期 T3) 作为自变量进行线性回归分析。结果 一般回归方程分别为 $\text{age} = 38.146 + 0.825V1 + 0.705V2 - 0.738V3 - 0.298V4 - 0.887V5$, $\text{age} = 46.899 - 117.944Q1 + 21.319Q2 - 191.968Q3 + 62.774Q4 - 84.361Q5 - 227.401Q6$, $\text{age} = 36.047 + 0.063T1 + 0.016T2 + 0.010T3$ 。各项指标 P 均 > 0.05 , 无显著性差异。结论 自变量流速、流量及心动周期 3 者对因变量年龄无显著性影响。在应用 MR 定量分析 CSF 流速、流量及心动周期时无需考虑年龄因素。

关键词 脑脊液 导水管 磁共振成像 年龄因素 回归分析

Correlation Between Age and Normal Volunteer in the Cerebral Aqueduct of Cerebrospinal Fluid Flow. Hu Weidong, Xiang Li, Zhang Hongguang, *et al.* Department of Interposition Image, Longgang Center Hospital, Guangdong 518116, China

Abstract Objective To quantitatively study the features of cerebrospinal fluid flow dynamics in normal aqueduct cerebrospinal of normal female volunteers by MRI and go regression analysis of them with age. **Methods** Totally 38 cases of normal female volunteers were screened. The aqueduct cerebrospinal flow of CSF was measured age as the dependent variable, velocity (the out and in flow peak ve-

基金项目: 深圳市龙岗区科技计划基金资助项目 (YW2007044, YLL2010064)

作者单位: 518116 广东省深圳市龙岗中心医院介入影像科 (胡卫东、张宏光、高天俊、王秀荣); 消化内科 (项立)