氨酸水平的影响[J]. 中国现代医学杂志,2017,27(6):110 - 114
18 Grani G, D'Alessandri M, Del Sordo M, *et al*. Influence of thyrotropin and thyroid volume on basal serum calcitonin[J]. Exp Clin Endocrinol Diabetes, 2015,123 (1): 44 - 47
19 刘艳秋,解长银,王志伟,等. 糖尿病肾病患者血清和肽素与降钙素原水平的变化及意义[J]. 广东医学,2017,38(6):888 - 890
20 许庭松,孙奕. 超敏 C 反应蛋白、胱抑素 C 和同型半胱氨酸联合检测在糖尿病早期肾损害中的诊断价值[J]. 国际检验医学杂志,2017,38(4):553 - 554
21 Mori A, Suzawa H, Sakamoto K, *et al*. Vasodilator effects of elcatonin, a synthetic eel calcitonin, on retinal blood vessels in rats[J]. Biol Pharm Bull, 2015,38(10):1536 - 1541
22 黄赞鸿,张惜铃,陈义杰,等. 联合检测 Cys - c、Hcy 和 RBP 在糖尿病肾病早期诊断中的意义[J]. 实用医学杂志,2017,33(2):292 - 295
23 Borzouei S, Mousavi Bahar SH, Fereydouni MA, *et al*. Multiple endocrine neoplasia type IIa associated with Cushing's syndrome[J]. Arch Iran Med,2014,17 (6):451 - 454
24 Hirahatake KM, Slavin JL, Maki KC, *et al*. Associations between dairy foods, diabetes, and metabolic health: potential mechanisms and future directions[J]. Metabolism,2014,63(5): 618 - 27
25 郭健莲,刘惠娜,肖斌龙,等. 降钙素原与高敏 C 反应蛋白联合检测在老年冠心病患者细菌感染中的临床应用[J]. 中国感染控制杂志,2016,15(10):748 - 751

(收稿日期:2017 - 09 - 20)
(修回日期:2017 - 11 - 21)

缺锌对 NPP 小鼠学习记忆功能的影响

袁 颖 王豪升 张裕实 刘 瑶 罗云鹏 王月静 孙丽慧

摘 要 目的 探究低锌处理对第 5 腰椎(L_5)脊神经结扎横切所致神经病理性疼痛(NPP)模型小鼠的学习记忆和行为学的影响。**方法** 选取 30 只 SD 小鼠,采用数字表法随机分为 3 组($n = 10$):对照组、模型组(NPP)及低锌 NPP 组(LZn - NPP)。3 组术后分别在 3、7、14 天进行机械痛阈检测,14 天后进行 Morris 水迷宫实验测量小鼠空间学习记忆能力。水迷宫实验结束后,甲苯胺蓝染色法观察海马组织形态变化。利用原子吸收光谱方法测定血清锌离子,来观察低锌处理对脊神经结扎致痛模型小鼠学习记忆和行为学的影响。**结果** 对照组、NPP 组、LZn - NPP 组机械痛阈值逐渐降低($P < 0.05$)。Morris 水迷宫实验中,NPP 组 21.88 ± 11.67m/s,LZn - NPP 组 24.80 ± 8.32m/s 及对照组 9.62 ± 3.90m/s,隐藏平台潜伏期逐渐缩短($P < 0.05$)。甲苯胺蓝染色法结果显示,NPP 组海马区细胞数量减少,LZn - NPP 组海马区细胞数量明显减少,对照组海马区细胞形态完整。原子吸收光谱检测结果显示,对照组、NPP 组及 LZn - NPP 组锌含量逐渐减少。**结论** 低锌处理可以使神经病理性疼痛小鼠的学习记忆能力下降,锌离子对疼痛模型的学习记忆功能有显著影响。

关键词 锌 神经病理性疼痛 学习记忆 行为学 脊神经结扎横切
中图分类号 R5 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.08.024

Effects of Zinc Deficiency on Learning and Memory Functions in Mice. *Yuan Ying, Wang Haosheng, Zhang Yushi, et al. Department of Histology and Embryology, Qiqihar Medical College, Heilongjiang 161000, China*

Abstract Objective To investigate the impact of low zinc treatment of learning, memory and ethology in mice with neuropathic pain model which caused by spinal nerve ligation. **Methods** Thirty mice were divided into 3 groups($n = 10$) in random number table way: Control group, NPP group and LZn - NPP group. On the 3rd, 7th and 14th days, the mechanical pain threshold was detected of three groups. On the 14th days days, we measured the learning and memory ability of three groups mice with Morris water maze experiment. When the water maze experiment is over, we observed the morphological varieties of hippocampal tissue by toluidine blue stains. We measured the quantity of Zn^{2+} in blood serum by using atomic absorption spectrometry technology. We investigated the impact of low zinc treatment of learning, memory and ethology in mice with neuropathic pain model which caused by spinal nerve ligation. **Results** Mechanical pain threshold decreased gradually in Control group, NPP group and LZn - NPP group($P < 0.05$). In morris water maze experiment, NPP group 21.88 ± 11.67m/s, LZn - NPP group 24.80 ± 8.32m/s and Control group 9.62 ± 3.90m/s, Hidden platform latency decreased gradually($P < 0.05$). The result of toluidine blue stains shows the number of cells in the hippocampus of the NPP group decreased. The

基金项目:齐齐哈尔医学院院内科研基金资助项目(QY2016Z - 13)
作者单位:161000 齐齐哈尔医学院组织胚胎学教研室
通讯作者:孙丽慧,电子信箱:335187646@qq.com

number of cells in the hippocampus of the LZn – NPP group decreased significantly, and the cell morphology of the hippocampus in the Control group was intact. Atomic Absorption Spectrometry showed that the zinc content decreased gradually in Control group, NPP group and LZn – NPP group. **Conclusion** Low zinc treatment can reduce the learning and memory ability of neuropathic pain mice, and zinc ion has a significant influence on the learning and memory function of pain model.

Key words Zinc; Neuropathic pain; Learning and memory; Ethology; Spinal nerve ligation

神经病理性疼痛(neuropathic pain,NPP)是由外伤、肿瘤、感染等引起的对外周或中枢神经系统损伤后的一种慢性疾病[1,2]。其发病机制复杂多样,近年来随着医疗的发展,很多患者重大疾病病愈之后都留有神经病理性疼痛对患者的身心造成了极大的困扰,严重扰乱人正常的生活[3]。研究发现,施行左侧第 5 腰椎(L_5)脊神经结扎横切手术大鼠模型所产生的痛觉属于慢性应激,机体可因为慢性应激破坏其海马结构进而引起学习记忆的下降[4~6]。研究发现,锌作为机体重要的微量元素,在神经系统中分布尤其丰富。其中脑组织海马回锌离子分布较多,其次是皮质、纹状体和小脑[7~9]。本实验通过在脊神经结扎致痛的 NPP 模型小鼠中添加不同含量锌制剂,利用动物行为学、Morris 水迷宫及利用原子吸收光谱法检测其脊髓后角锌含量来分析低锌对致痛模型小鼠行为学的影响。

材料与方法

1. 实验动物:30 只雌雄各半 8 周龄 SD 小鼠(室温饲养,饮食水),体重为 10 ~ 15g(齐齐哈尔医学院实验动物中心提供)。

2. 实验机械:组织切片机(Leica 公司),超低温冰箱(Sanyo 公司),vonFrey 刺激针(vonFrey 公司);Olympus 万能显微镜和照相机(Olympus 公司);台式高速离心机(北京医用离心机厂)。

3. NPP 模型制备:首先制作 L_5 – SNT 模型,1% 戊巴比妥钠(25mg/kg)腹腔注射麻醉。自小鼠背部 L_4 ~ S_1 椎体处切开,将左侧椎旁肌肉钝性分离,去除 L_6 横突和 L_5 椎板,结扎邻近背根神经节的神经,割断神经远端,缝合切口。对照组小鼠切开皮肤分离左侧椎旁肌肉后,只将 L_6 横突及 L_5 椎板去除,神经保留[10]。

4. 实验动物分组:小鼠在标准环境适应性饲养 1 周后,随机分为对照组、正常喂养组(NPP)和低锌喂养组(LZn – NPP),$n = 10$。对照组和 NPP 组术后以每天以普通饲料饲养锌(5.0mg/kg),LZn – NPP 组术后每天以低锌饲料喂养锌(0.8mg/kg)[11]。

5. 行为学机械痛阈检测:术后第 1 天开始每 2 天观察小鼠的步态及术侧后肢着地协调程度、着地/离地时间、跛行、爪部畸形以及是否存在甩足、舔爪、咬肢体等现象;于脊神经结扎之前 1 天,以及脊神经结扎后的 3、7、14 天测定后足的机械性痛阈[12]。以 vonFrey 针刺激小鼠左侧足底,从轻至重,每种型号刺激针刺激 10 次,每次间隔 5s,记录能够引发缩足反应的最小力度为机械性痛阈。

6. Morris 水迷宫实验:术后第 14 天进行 Morris 水迷宫实验。每天 8:00 ~ 12:00 时进行训练,每天训练 4 次每次间隔 15 ~ 20min,连续进行 4 天训练,每次将小鼠移开时应将小鼠擦干,将动物放在 150 周的白炽灯下烤 5min,放回笼中。随机将动物从非平台所在象限的其他 3 个入水点面向池壁放入水中,相应的计算机软件系统可记录动物在 60s 内寻找并爬上平台的时间(潜伏期)。如果小鼠在 60s 内仍未找到平台,则将其引导至平台并停留 15s,潜伏期计为 60s[13,14]。

7. 原子吸收光谱技术:Morris 水迷宫实验之后,各组小鼠麻醉后取新鲜的脊髓组织,微波热能消化脊髓组织,离心(3000r/min)10min 后取上清液,进行原子吸收光谱检测[15,16]。

8. 甲苯胺蓝染色法观察海马组织形态变化:水迷宫实验结束后迅速断头取海马组织[17]。组织固定后石蜡包埋,制成切片,放入甲苯胺蓝溶液染色 30min,梯度乙醇溶液脱水,二甲苯透明,中性树脂封片,光学显微镜下观察海马神经元形态变化。

9. 统计学方法:应用 SPSS 13.0 统计学软件对数据进行统计分析。数据采用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结　　果

1. 机械痛阈值检测结果:对照组术后痛阈无明显下降,NPP 组和 LZn – NPP 组术后的痛阈与小鼠基础机械性痛阈比较,显著下降,差异有统计学意义($P < 0.05$);LZn – NPP 组与 NPP 组术后的痛阈与小鼠基础机械性痛阈比较,LZn – NPP 组痛阈降低,差异有统计学意义($P < 0.05$,表 1)。

表 1　机械痛阈检测（$\bar{x} \pm s$，g）

组别	术前 1 天	3 天	7 天	14 天
对照组	22.4 ±1.31	24.1 ±1.54	22.6 ±1.49	24.3 ±1.86
NPP	23.5 ±1.65	13.4 ±0.81 *	12.6 ±0.92 *	13.9 ±0.85 *
LZn – NPP	24.0 ±1.24	10.5 ±0.5 6 *#	9.3 ±0.83 *#	11.5 ±0.64 *#

与对照组比较，* $P<0.05$；与 NPP 组比较，# $P<0.05$

2. Morris 水迷宫实验：L_5 – SNT 术后，小鼠因运动神经元并未损伤，故对其运动能力无明显影响，4 天的训练显示，小鼠找到隐藏平台潜伏期逐渐缩短，NPP 组、LZn – NPP 组与对照组比较隐藏平台潜伏期显著较长（$P<0.05$），LZn – NPP 组最长（表 2）。

表 2　小鼠隐藏平台潜伏期（$\bar{x} \pm s$，m/s）

时间（天）	对照组	NPP 组	LZn – NPP 组
1	33.14 ±3.78	40.24 ±10.26 *	43.84 ±6.65 *#
2	19.04 ±4.16	32.36 ±8.97 *	35.11 ±10.43 *#
3	14.25 ±7.84	24.83 ±10.91 *	28.54 ±9.27 *#
4	9.62 ±3.90	21.88 ±11.67 *	24.80 ±8.32 *#

与对照组比较，* $P<0.05$；与 NPP 组比较，# $P<0.05$

3. 原子吸收光谱检测结果：在原子吸光光谱检测结果 3 组的锌含量分别为对照组 124.3 ±14.5，NPP 组 114.21 ±3.5，LZn – NPP 组 68.9 ±10.13 μg/dl，小鼠脊髓后角中对照组、NPP 组、LZn – NPP 组游离锌含量逐渐降低，LZn – NPP 组与对照组比较，差异有统计学意义（$P<0.05$）。

4. 甲苯胺蓝染色结果：NPP 组海马细胞数量减少，细胞间间隙增大，呈不规则状稀疏排列，细胞形态略有改变，细胞核观察不明显，细胞质中颗粒状物质减少。LZn – NPP 组海马细胞数量明显减少，排列疏松，细胞间隙明显增大，细胞形态改变，界限模糊，胞质中几乎没有颗粒状物质，呈现空泡状。对照组海马细胞形态完整，数量丰富，排布均匀，细胞核明显，胞质中可见大量深蓝色的粗颗粒状尼氏体（图 1）。

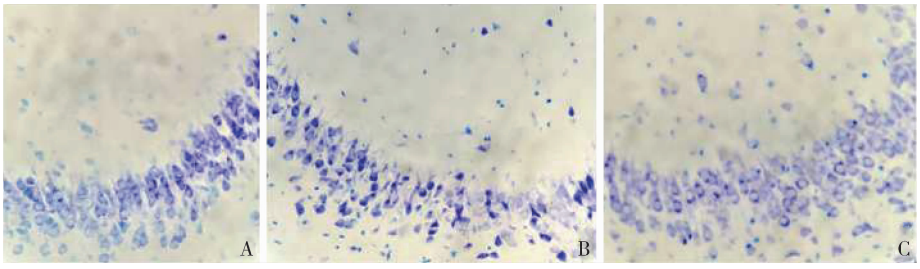


图 1　3 组海马组织（甲苯胺蓝，×400）

A. NPP 组；B. L – NPP 组；C. 对照组

讨　论

神经病理性疼痛是指由中枢或外周神经系统损伤或疾病引起的疼痛综合征。国际疼痛研究会这样定义神经病理性疼痛[18,19]。由于外周或中枢神经系统的直接损伤和功能紊乱引起的疼痛，它是一种慢性疼痛，表现为自发性疼痛、痛觉过敏和感觉异常等特征，大约有 2% ~40% 的成年人患有此病，由于病因多种多样，发病机制复杂，是一种困扰人类健康的难治性疾病。从生理角度讲，可分为周围性和中枢性神经病理性疼痛，前者包括糖尿病性周围神经病变、带状疱疹后神经痛、肿瘤浸润性神经痛、患肢痛、乳房切除术后的疼痛、复杂局部疼痛综合征、三叉神经痛和酒精性多发神经病等，后者即中枢性的神经痛包括多发性硬化症、脊髓损伤、脑卒中后疼痛及帕金森病等，此综合征发生率逐年升高。但由于发病机制复杂许多治疗效果不明显，严重影响患者身心健康[20]。因此需要通过深入研究了解 NPP 的机制从而为患者提供最佳的治疗方案。而且近年研究发现 NPP 小鼠的学习记忆出现明显的障碍，本实验通过 Morris 水迷宫实验发现，NPP 小鼠的隐藏平台潜伏期延长即可暗示小鼠由于神经病理性学习记忆减退，而且小鼠并非运动障碍导致学习记忆障碍，与对照组小鼠比较游泳速度无显著差异，且损伤的 L_5 脊神经为感觉神经非运动神经由此可证 NPP 小鼠空间学习记忆能力受到影响。本实验在有关感觉的机械检测中，NPP 小鼠的机械痛阈明显降低，且自主行为学观察中发现小鼠的自主行为障碍，由此也可说明 NPP 对小鼠的自主行为学有一定影响。

锌是体内不可缺少的微量元素，与脑的发育、脑功能及行为密切相关，锌可作为基因表达、组织修复以及记忆形成等生物学过程的重要介质，其参与学习记忆的重要枢纽是海马组织，海马是记忆编码，整理和检索的关键枢纽。近年来的研究显示，在脑、神经元、脊髓和神经节等的神经元轴突终末的突触小泡中

有丰富的锌离子。这些锌离子被发现可以在突触活动中扮演神经递质的角色来调节神经元的兴奋性。本实验的原子吸收光谱技术结果发现,NPP 组的脊髓后角锌离子的含量明显降低,说明在小鼠学习记忆及自主性行为发生障碍的同时控制感觉传递的脊髓后角中锌离子含量降低,且 LZn - NPP 组锌离子更低,且机械痛阈更低,说明锌离子参与了脊髓后角的痛觉传递及对小鼠的学习记忆具有保护作用,但如何对小鼠学习记忆起保护作用需要基因分子水平的研究,锌离子如何参与痛觉传递需开展深入探讨。

参考文献

1 Jeong NY, Shin YH, Jung J. Neuropathicpainin hereditary peripheral-neuropathy[J]. J Exerc Rehabil, 2013, 9(4): 397 - 399

2 Madronal N, Gruart A, Sacktor TC, *et al*. PKMzeta inhibition reverses learning - induced increases in hippocampal synaptic strength and-memony during trace eyeblink conditionin[J]. PLoS One, 2010, 5(4): 10400

3 Clark AK, Old EA, Malcangio M. Neuropathic pain and cytokines: current perspectives[J]. J Pain Res, 2013, 6: 803 - 814

4 张莉,王月静. 锌对神经病理性疼痛模型小鼠脊髓磷酸化 cAMP 反应元件结合蛋白表达的影响[J]. 解放军医学院学报, 2013, 34(11): 1174 - 1177

5 胡义凤,刘健,杨建军,等. 神经病理性疼痛对大鼠学习记忆功能和海马脑源性神经营养因子表达的影响[J]. 医学研究生学报, 2009, 22(4): 363 - 367

6 刘虹,韩芳,石玉秀. 创伤后应激障碍大鼠海马神经元凋亡中 Caspase - 12 的表达[J]. 解剖学报, 2014, 45(4): 452 - 456

7 Mirzayi M, Hekmatshoar M. Study of electrical conductivity and memory switching in the zine - vanadium - phosphate glass [J]. Physica B: Physics of Condensed Matter, 2013, 420: 70 - 73

8 Tahmasebi Boroujeni S, Naghdi N, Shahbazi M, *et al*. The effect of severe zinc deficiency and zinc supplement on spatial learning and memory[J]. Biol Trace Elem Res, 2009, 130(1): 48 - 61

9 Frederickson CJ, Moncrieff DW. Zinc - containing neurons[J]. Signals, 1994, 3(3): 127 - 139

10 张莉,王月静. 锌对神经病理性疼痛模型小鼠脊髓磷酸化 cAMP 反应元件结合蛋白表达的影响[J]. 解放军医学院学报, 2013, 34(11): 1174 - 1177

11 Jo SM, Danscher G, Schroder HD, *et al*. Depletion of vesicular zinc in dorsal horn of spinal cord causes increased neuropathic pain in mice [J]. Biometals, 2008, 21(2): 151 - 158

12 Chaplan SR, Baeh FW, Pogrel JW, *et al*. Quantitative assessment of tactile allodynia in the ratpaw[J]. J Neurosci Methods, 1994, 53(1): 55 - 63

13 Cimadevilla JM, Arias JL. Different vulnerability in female's spatial behavior after unilateral hippocampal inactivation[J]. Neurosci Lett, 2008, 439: 89 - 93

14 Cirulli F, Berry A, Alleva E. Intracerebroventricular administration of brain - derived neurotrophic factor in adult rats affects analgesia and spontaneous behavior but not memory retention in a Morris Water Maze task[J]. Neurosci Lett, 2000, 287: 207 - 210

15 Florek S, Becker - Ross H. High - resolution spectrometer for atomic spectrometry[J]. J Anal At Spectrom, 1995, 10: 145 - 147

16 Taylor A, Branch S, Day MP, *et al*. Atomic spectrometry update. Clinical and biological materials, foods and beverages[J]. J Anal At Spectrom, 2011, 26: 653 - 692

17 Berbari NF, Bishop GA, Askwith CC, *et al*. Hippocampal neurons possess primary cilia in culture[J]. J Neurosci Res, 2007, 85: 1095 - 1100

18 Banker G, Goslin K. Developments in neuronal cell culture[J]. Nature, 1988, 336: 185 - 186

19 Attal N, Lanteri - Minet M, Laurent B, *et al*. The specific disease burden of neuropathic pain: results of a French nationwide survey [J]. Pain, 2011, 152: 2836 - 2843

20 Jensen MP, Chodroff MJ, Dworkin RH. The impact of neuropathic pain on health - related quality of life: review and implications[J]. Neurology, 2007, 68: 1178 - 1182

（收稿日期:2017 - 07 - 01）
（修回日期:2017 - 11 - 02）

（上接第 99 页）

13 Abdul - Muneer PM, Schuetz H, Wang F, *et al*. Induction of oxidative and nitrosative damage leads to cerebrovascular inflammation in animal model of mild traumatic brain injury induced by primary blast [J]. Free Radic Biol Med, 2013, 60(2): 282 - 291

14 Rolland WB, Lekic T, Krafft PR, *et al*. Fingolimod reduces cerebral lymphocyte infiltration in experimental models of rodent intracerebral hemorrhage [J]. Exp Neurol, 2013, 241(1): 45 - 55

15 Hasegawa Y, Suzuki H, Sozen T, *et al*. Activation of sphingosine 1 - phosphate receptor - 1 by FTY720 is neuroprotective after ischemic stroke in rats [J]. Stroke, 2010, 41(2): 368 - 374

16 Rolland WB 2nd, Manaenko A, Lekic T, *et al*. FTY720 is neuroprotective and improves functional outcomes after intracerebral hemorrhage in mice [J]. Acta Neurochir Suppl, 2011, 111(2): 213 - 217

17 Janssen S, Schlegel C, Gudi V, *et al*. Effect of FTY720 - phosphate on the expression of inflammation - associated molecules in astrocytes in vitro [J]. Mol Med Rep, 2015, 12(4): 6171 - 6177

18 Zhang Z, Zhang Z, Fauser U, *et al*. FTY720 attenuates accumulation of EMAP - Ⅱ$^+$ and MHC - Ⅱ$^+$ monocytes in early lesions of rat traumatic brain injury [J]. J Cell Mol Med, 2007, 11(2): 307 - 314

19 Budde K, Schmouder RL, Brunkhorst R, *et al*. First human trial of FTY720, a novel immunomodulator, in stable renal transplant patients [J]. J Am Soc Nephrol, 2002, 13(4): 1073 - 1083

（收稿日期:2017 - 10 - 10）
（修回日期:2017 - 11 - 07）