

年轻小鼠咀嚼刺激长期改变对焦虑和认知的影响^{*}

苏俭生¹⁾ 韩雯斐¹⁾ 延莉²⁾ 陈丽莉¹⁾ 顾佳妹¹⁾ 嵇婷婷²⁾ 孟博^{2)**}

⁽¹⁾ 同济大学口腔医学院, 上海 200072;

⁽²⁾ 华东师范大学脑功能基因组学教育部重点实验室, 上海市脑功能基因组学重点实验室, 上海 200062

摘要 建立长期增加或减少年轻小鼠切牙的咀嚼刺激模型。通过形态学的观察, 研究小鼠下颌骨和咬肌的变化以及大脑皮层和海马的厚度改变; 通过行为学实验(旷场实验、高架十字迷宫、新异物体识别和 Morris 水迷宫实验)观察小鼠认知能力和焦虑情绪的变化; 通过高效液相色谱(HPLC)检测小鼠皮层、海马中 4 种单胺类神经递质(去甲肾上腺素(NE)、肾上腺素(E)、多巴胺(DA)和 5-羟色胺(5-HT))的变化, 以探讨小鼠焦虑情绪改变的机理; 通过荧光实时定量 PCR 检测小鼠皮层和海马与认知紧密相关的 4 种基因(BDNF、Synapsin I、NR2B 和 CREB)的 mRNA 表达, 以研究小鼠认知能力改变的机理。形态学结果显示: 各组小鼠下颌骨和咬肌纤维的形态没有影响, 各组小鼠皮层和海马的厚度也没有差异。行为学实验结果显示: 咀嚼增加组小鼠焦虑倾向低于对照组和咀嚼减少组, 各组小鼠短期记忆能力没有统计学差异, 咀嚼增加组小鼠空间认知能力优于咀嚼减少组。高效液相色谱结果显示, 咀嚼减少组小鼠与咀嚼增加组和对照组相比, 去甲肾上腺素在皮层中明显升高($P < 0.05$)。mRNA 检测结果显示, 咀嚼减少组小鼠 4 种与认知相关基因的表达量与咀嚼增加组相比都明显下调($P < 0.05$)。上述结果提示, 切牙咀嚼刺激的长期增加可以提高小鼠的自主运动能力, 降低焦虑程度, 提高空间认知能力, 上调海马中认知相关基因的表达。切牙咀嚼刺激的长期减少, 会降低小鼠的自主运动能力, 下调认知相关的基因表达, 增加大脑皮层中去甲肾上腺素的含量。

关键词 咀嚼, 认知, 焦虑

学科分类号 Q7

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00620

咀嚼是口腔重要的生理功能之一, 是在神经系统支配下由咀嚼肌、舌、颞下颌关节共同参与的生理活动, 对维持口颌面系统的健康有着重要意义, 对全身健康也有着重要影响。咀嚼功能是人体赖以生存的生理功能, 对促进人体生长发育有着重要的作用, 而咀嚼功能也是通过咀嚼运动来实现的。儿童的生长发育与咀嚼运动有着密切的关系, 咀嚼过程中咀嚼肌的功能性收缩和下颌运动, 使口颌系统获得正常的发育。在咀嚼过程中, 咀嚼肌的功能性收缩和下颌运动, 可对牙颌、面、颅面的软硬组织产生功能性刺激, 促进其血液循环及淋巴回流, 增强代谢, 使口颌系统获得正常发育和维护健康。咀嚼运动的功能性刺激, 还对牙弓、颌的建立和面肌动力平衡的发挥有很大影响。咀嚼运动可促使脑血管血流流速增加, 使脑血流量增多, 在促进脑的发育及功能的行使方面有重要作用。同时咀嚼还能反射性地引起胃、胰、肝、胆囊等分泌和释放消化液, 有助于机体对食物的消化吸收, 这对于生长发育也有重要的促进作用。

咀嚼口香糖可以放松心情^[1], 改善情节记忆能力和工作记忆^[2]。但异常的咬合早接触可以引起明显的不适, 造成患者头疼紧张等症状, 调整咬合

咀嚼口香糖可以放松心情^[1], 改善情节记忆能力和工作记忆^[2]。但异常的咬合早接触可以引起明显的不适, 造成患者头疼紧张等症状, 调整咬合

^{*} 国家自然科学基金(30840031, 30870790, 30970726, 81070876), 上海市科委自然科学基金(0852NM03600, 10JC1411200, 11ZZ38), 国家重点基础研究发展计划(973)(2009CB918402)和中央高校基本科研业务费专项资金资助项目。

^{**} 通讯联系人。Tel: 021-62233970, Fax: 021-62601953

E-mail: bmeng@brain.ecnu.edu.cn

收稿日期: 2011-01-14, 接受日期: 2011-04-17

后, 症状可明显缓解. 咬合早接触是磨牙症的病因之一. 磨牙症患者在躯体焦虑指数以及肌肉紧张指数方面分值偏高, 而在社会性指数方面分值偏低, 交感神经张力普遍偏高. 磨牙症患者具有焦虑倾向, 对心理 - 生理疾病易感性增加^[3].

有研究表明, 短期内(10天)磨短衰老的实验动物的磨牙其空间认知能力下降, 大脑中压力相关的激素升高, 但年轻小鼠并没有这种变化^[4]. 这可能是因为随着年龄的增加, 大脑开始出现退行性病变, 咀嚼刺激的减少可以加速记忆力的衰退. 年轻小鼠长期咀嚼刺激的改变对情绪和认知的影响没有相关研究. 但青少年期正是中枢神经系统正在逐步完善的时期, 所以在正常范围内长期增加或降低年轻小鼠的咀嚼刺激, 研究其对焦虑情绪和认知的影响是尤为必要的. 本文即将探讨长期增加或降低年轻小鼠切牙的咀嚼刺激, 对其认知和焦虑情绪是否会有影响.

1 材料与方法

1.1 建立实验模型

30只SPF级1月龄C57BL/6近交系雄性小鼠(上海斯莱克实验动物有限公司), 随机分为3组, 每组10只: 对照组(Control), 咀嚼刺激减少组(咀嚼减少组, Decrease)和咀嚼刺激增加组(咀嚼增加组, Increase). 实验过程中各组小鼠都通过吸入乙醚麻醉约1min. 咀嚼减少组下切牙被剪去约1mm使咬合降低, 咀嚼增加组使用光固化流动树脂覆盖于下切牙使咬合升高约1mm. 每3天处理一次, 并记录体重变化, 连续处理4个月. 实验小鼠的饲养符合华东师范大学实验动物福利委员会要求, 12h/12h光照周期, 温度(22 ± 3) $^{\circ}\text{C}$, 相对湿度(70 ± 4)%, SPF级净化空间, 自由进食、饮水. 每周称量记录小鼠体重变化.

1.2 行为学实验

1.2.1 咀嚼频率测定(chewing movement frequency). 实验第1天, 将完成实验处理后刚从麻醉中苏醒的小鼠放入10cm × 10cm × 30cm的透明箱子中, 箱子的3个内侧面装有镜子, 箱内有硬纸片棉花等可咀嚼但不能食用的物品, 录制小鼠进入箱子后15min内的活动. 实验结束后取出小鼠和物品, 将开场底部及四壁清理干净并喷洒10%酒精以去除气味. 实验第2天和第3天直接将小鼠和物品放

入透明箱中15min. 3组小鼠交替依序在每天同一时间段进行实验, 以保证各组小鼠实验条件尽量相同. 实验结束后根据录像计算小鼠咀嚼运动的次数.

1.2.2 旷场实验(open field test). 将3组小鼠交替依序进行实验, 以保证各组小鼠实验条件尽量相同. 将小鼠放入Truscan系统(美国Coulbourn公司)的自发活动箱(27cm × 27cm × 38cm)内, 打开开场顶部中心部位光源, 观察其在5min内的自由活动, 实验结束后取出小鼠, 将开场底部及四壁清理干净并喷洒10%酒精以去除气味. TruScan系统软件自动记录小鼠活动的各项指标. 分析小鼠的活动情况.

1.2.3 高架十字迷宫(elevated plus maze). 将3组小鼠交替依序进行实验, 以保证各组小鼠实验条件尽量相同. 高架迷宫规格分别为: 开臂35cm × 5cm; 闭臂35cm × 14cm × 14cm; 中心区域5cm × 5cm. 光源位于顶部中心. 实验开始时, 将小鼠头朝开臂方向放在中心区域, Anymaze视频分析软件(美国Stoelting公司)自动记录其在5min内开臂和闭臂中分别停留的时间及穿越次数. 实验完成后将小鼠取出, 将两臂清理干净, 喷洒10%酒精除去气味, 然后放入下一只小鼠继续测试.

1.2.4 新异物体识别(novel object recognition). 将3组小鼠交替依序进行实验, 以保证各组小鼠实验条件尽量相同. 实验分为熟悉阶段、训练阶段和测试阶段. 实验的最初3天为熟悉阶段, 每天抚摸每只小鼠5min, 随后将其单独放在一个正方形容器(54cm × 54cm × 24cm)中, 自由探索15min, 以熟悉实验环境. 在训练阶段, 两个物体(形状和颜色不同, 但大小相似)被对称地放在正方形容器中间区域的对角线位置, 给予每只小鼠5min的时间探索两个物体(A物体和B物体), 并记录5min内小鼠探索每个物体的时间. 每只小鼠实验结束用10%酒精仔细擦拭实验箱底部以及物体, 以避免气味干扰. 测试阶段在训练后1天进行. 测试时, 小鼠被放回正方形容器中, 其中的一个物体(A物体)已经被一形状和颜色完全不同但大小相似的新物体(C物体)代替, 记录5min内小鼠分别探索两个物体所用的时间. 小鼠探索一个物体所用的时间与小鼠探索两个物体所用总时间的比值即为此小鼠对此物体的识别指数. 计算式为

B 物体识别指数 = (探索 B 物体所用时间 × 100%) / (探索 A 和 B 物体所用总时间),

C 物体识别指数 = (探索 C 物体所用时间 × 100%) / (探索 B 和 C 物体所用总时间).

1.2.5 Morris 水迷宫(morris water maze). Morris 水迷宫由圆形水池(直径 100 cm, 高 50 cm)、摄像头以及 Morris 水迷宫视频系统(美国 Coulbourn 公司)组成. 圆形水面被通过圆心的两条假想垂线划分为 4 个象限. 实验分为训练阶段和测试阶段实验. 在一个象限的正中水域内放置一个圆形透明站台(直径 10 cm, 高 30 cm), 站台隐于水面下 1 cm 处. 其他 3 个象限周围幕布上分别悬挂不同的标志作为空间位置线索. 将无毒无味的食品级 TiO_2 粉末(上海江沪钛白化工制品有限公司)撒入水中混匀, 使水呈乳白色, 与小鼠黑色体毛形成对比, 便于软件跟踪. 水温保持于 25℃ 左右(提前 1 天放水, 使水平衡到室温). 在训练阶段, 每只小鼠每天按不同顺序分别从 4 个入水点(每个象限外周的中点)面壁式入水 4 次, 小鼠入水后尽力逃避水患, 当发现站台后则栖身其上, 允许其在站台上休息 15 s. Morris 水迷宫视频系统自动记录小鼠找到站台的潜伏期. 如果 60 s 仍未找到站台, 由操作者将小鼠引上站台休息 15 s 并将潜伏期记为 60 s. 将 3 组小鼠交替依序进行实验, 每天使用不同顺序, 以保证各组小鼠实验条件尽量相同. 当小鼠找到站台的潜伏期趋于稳定, 即开始测试阶段. 测试时, 除去水面下平台, 小鼠由随机两个入水点入水 60 s, 小鼠根据空间记忆寻找平台, Morris 水迷宫视频系统自动记录小鼠在平台所在象限的运动时间.

1.3 形态学观察

1.3.1 咬肌纤维组织形态. 3 组小鼠随机各选 2 只, 以 1%戊巴比妥钠(50 mg/ 体重)麻醉. 开胸, 左心室插针, 剪开右心房, 进行 4%多聚甲醛体循环灌注. 分离咬肌, 在 4%多聚甲醛固定液中 4℃ 固定 24 h 后进行常规石蜡包埋, 5 μm 连续切片, HE 染色. 显微镜下观察并拍照(100×).

1.3.2 下颌骨形态. 分离灌注后小鼠带有下颌切牙和磨牙的下颌骨, 放入装满水的容器在微波炉中加热 2 h, 保证下颌骨始终浸在水面下. 冷却后取出下颌骨, 分离附着的软组织. 下颌骨清洗后用 1%亚甲基蓝染色, 拍照.

1.3.3 皮层海马组织形态. 取出灌注后小鼠的脑组织, 在 4%多聚甲醛固定液中 4℃ 固定 2 h, 然后浸

入 4℃ 的 20%、30%梯度蔗糖 -PBS 溶液至组织块下沉. 用冰冻切片机, 进行冠状切片, 厚 20 μm , 脑片贴在明胶溶液预处理的载玻片上. 进行常规 HE 染色. 各组相同空间定位水平的脑片在显微镜下进行比较, 拍照(40×).

1.4 高效液相色谱检测单胺类神经递质含量

精确称取去甲肾上腺素(NE) 8.46 mg, 多巴胺(DA) 47.4 mg, 5-羟色胺(5-HT) 53.18 mg, 肾上腺素(E) 9.16 mg 标准品(Sigma 公司, 美国)溶解于 0.1 mol/L HCl 中, 定容至 25 ml, 配成 10 mmol/L 的标准储备溶液. 使用时用 0.1 mol/L HCl 稀释成各种浓度的标准液. 做完行为学的 3 组小鼠随机各选 4 只直接断头处死后, 在冰上迅速分离皮层和海马, 放入冻存管中, 在液氮中速冻. 各组同种组织放在一起, 样品称重, 每 20 mg 组织加 0.4 mol/L 高氯酸 700 μl (含 0.1%半胱氨酸), 冰浴中匀浆. 匀浆液离心(8 500 r/min, 4℃, 10 min), 取上清液进样. 色谱条件为: 流动相, 缓冲液 / 甲醇(92 : 8); 缓冲液为 3 mmol/L 庚烷磺酸钠, 100 mmol/L 醋酸, 85 mmol/L 柠檬酸, 0.2 mmol/L EDTA(pH 3.7); 柱温 40℃; 检测电压 0.6 V; 流速 1.0 ml/min; 进样量为 10 μl . 根据标准液浓度算出测试液中样品浓度, 再换算为组织中 10^{-9} mol/g 的递质浓度.

1.5 荧光实时定量 PCR 检测认知相关基因 mRNA 表达

做完行为学的 3 组小鼠随机各选 4 只直接断头处死后, 迅速分离皮层和海马, 用 RNAiso(Takara 公司, 日本)提取总 RNA, 步骤按照试剂说明书进行. 总 RNA 用紫外分光光度计测定浓度以及 A_{260}/A_{280} 比值, 并以 1%琼脂糖凝胶电泳确认 RNA 的浓度和质量. 取 1 μl 总 RNA 反转录成 cDNA (M-MLV 反转录酶, Invitrogen 公司), 具体步骤按照 M-MLV 说明书进行. PCR 反应体系为 25 μl : 5.0 μl 5×R-PCR 缓冲液, 0.3 μl 250 mmol/L Mg^{2+} , 0.75 μl 10 mmol/L dNTP, 1.0 μl 10 $\mu\text{mol/L}$ 引物 (Invitrogen 公司, 美国), 1.0 μl Taqman probe(Roche 公司, 美国), 1.0 μl Dye Calibration Standards (Biosearch 公司, 美国), 0.25 μl 5U/ μl HS Ex-Taq 酶(Takara 公司, 日本), 14.7 μl 双蒸水, 1.0 μl 模板. 待测基因 BDNF(脑源性神经营养因子)PCR 反应的上游引物为, 5' TCG CTT CAT CTT AGG AGT 3', 下游引物为, 5' TCA ACA TAA ACC ACC AAC 3', 长度为 445 bp; CREB(cAMP 应答

元件结合蛋白)上游引物为, 5' CGG TGT CTA ACG GTG TAA 3', 下游引物为, 5' TGG GAG AAG CGG AGT GTT 3', 长度为 250 bp; NR2B (N-甲基-D-天门氨酸受体的 2B 亚基)上游引物为, 5' GCA TTC CTA CGA CAC CTT CG 3', 下游引物为, 5' GAC CAC CAC TGG CTT ATT CC 3', 长度为 367 bp; Synapsin I (突触素 I)上游引物为, 5' AGG CTA CCC GTC AGG CAT CTA TCT C 3', 下游引物为, 5' TCA CCT CAT CCT GGC TAA GG 3', 长度为 380 bp 或者 342 bp, 内参采用 GAPDH, 上游引物为, 5' GTG AAG GTC GGT GTG AAC GG 3', 下游引物为, 5' TCA TGA GCC CTT CCA CAA TG 3', 长度为 517 bp. 将 cDNA 稀释 5~100 倍作为模板, 每个样品进行 3 个平行孔, 在 Roto-Gene 3000 荧光定量 PCR 仪(Cotbett 公司, 澳大利亚)上进行荧光实时多波长 PCR 检测. 反应条件: 95℃ 90 s, 95℃ 5 s, 60℃ 30 s 收集荧光, 共 40 个循环. 熔点曲线分析: 95℃ 1 min, 55℃ 1 min, 55℃ 10 s, (每个循环该步骤温度增加 0.5℃), 共 80 个循环, 整个过程中收集荧光. 反应结束, 由熔点曲线判定 PCR 反应的特异性, 根据各目的基因荧光曲线的 Ct 值以及标准曲线求出待测基因和内参基因 GAPDH 的绝对拷贝数, 并算出待测基因每 10¹⁰ 个拷贝数的 GAPDH 相对含量.

1.6 数据分析

所有实验数据采用平均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 用 SPSS12.0 软件进行单因素方差分析(one-way ANOVA). 用 LSD 进行各组间两两比较. * 表示统计学差异显著, $P < 0.05$; ** 表示统计学差异非常显著, $P < 0.01$.

2 实验结果

2.1 各组小鼠咀嚼频率的差异

图 1 显示, 3 组小鼠实验处理后的 15 min 内, 咀嚼刺激增加组小鼠的咀嚼频率明显高于对照组和刺激减少组, 刺激减少组的咀嚼频率明显低于对照组. 实验处理后第 2 天和第 3 天, 刺激减少组的咀嚼频率明显低于对照组和刺激增加组, 但刺激增加组与对照组没有差别.

2.2 各组小鼠体重的变化

3 组小鼠 4 个月体重变化如图 2 所示, 各组间体重变化差异没有统计学意义. 咀嚼刺激改变对小鼠体重变化没有影响.

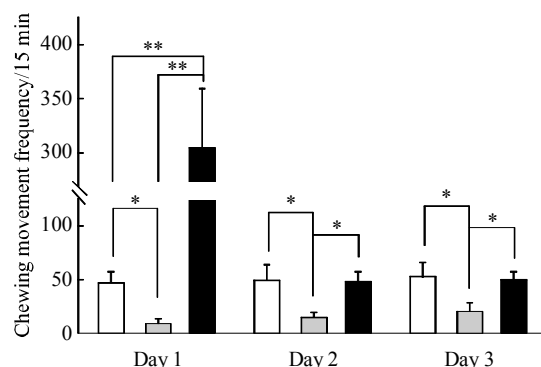


Fig. 1 Changes of chewing movement frequency

The chewing movement times in 15 min was counted for chewing movement frequency. In the first 15 min, on day 1, when the occlusion status just changed, the chewing movement times of increase group was sharply increased and much greater than that of control and decrease group; the chewing movement times of decrease group was also lower than control. On day 2 and day 3, there was no significant difference of chewing movement frequency between the increase and control group, while the decrease group showed lower frequency than the increase and control group. $n = 10$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. □: Control; ■: Decrease; ■: Increase.

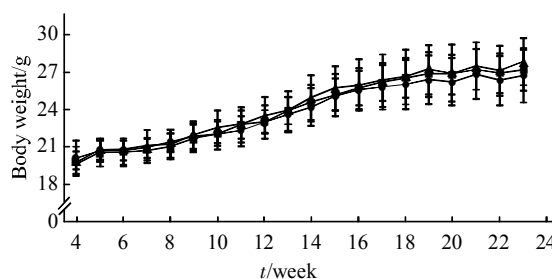


Fig. 2 Changes in body weight

There was no significant difference in body weight changes among the three groups. ●—●: Control; ▲—▲: Decrease; ■—■: Increase.

2.3 咀嚼刺激改变对小鼠下颌骨、咬肌和脑组织形态学影响

3 组小鼠下颌骨形态、下颌切牙及磨牙均未见明显异常. 咀嚼减少组下颌切牙略短于对照组和咀嚼增加组, 如图 3a~c. HE 染色结果表明 3 组小鼠咬肌纤维横断面以及纵断面的形态均未见明显异常, 如图 3d~i. 脑组织冠状面切片显示, 各组小鼠皮层和海马的组织形态和厚度亦未见异常, 如图 3j~l.

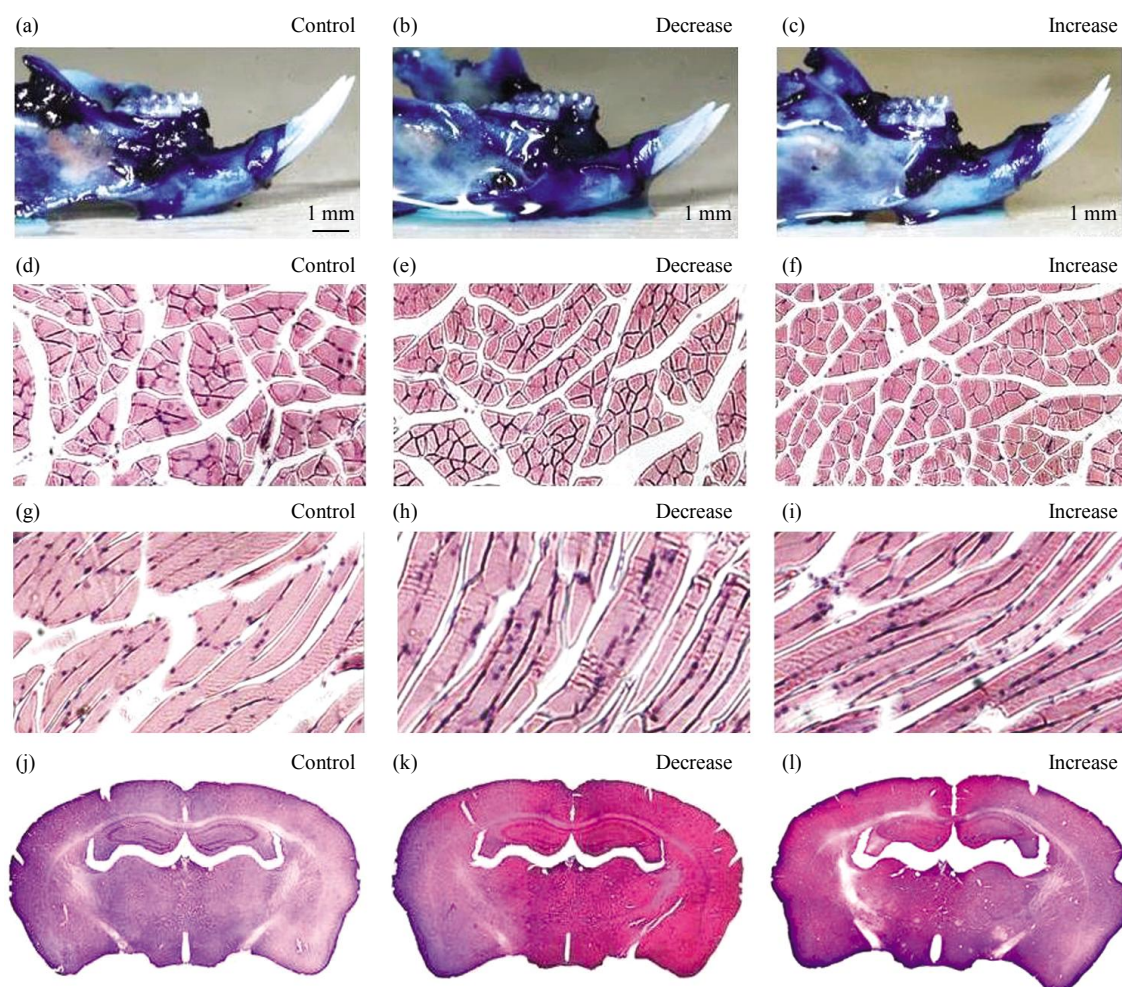


Fig. 3 Morphological changes

(a~c) No obvious abnormalities were found in the morphometric mandibles among the three groups. The lower incisors in the decrease group were shorter than those of the other two groups. (d~i) No significant differences were observed in the cross and longitudinal section of the masseter muscle among the three groups (HE staining, 100 $\times$). (j~l) There was no significant difference in brain cross-sectional histological observation among the three groups (HE staining, 40 $\times$).

2.4 咀嚼刺激改变对小鼠行为学的影响

2.4.1 旷场实验. 咀嚼减少组小鼠在旷场中运动的总距离和总体运动速度均明显低于对照组和咀嚼增加组(图 4a, b), 表明咀嚼减少组小鼠的自发活动能力降低. 咀嚼增加组在中心区域活动的时间比例显著高于对照组和咀嚼减少组(图 4c), 表明咀嚼增加组小鼠的焦虑情绪较低.

2.4.2 高架十字迷宫. 咀嚼增加组小鼠穿越开臂和闭臂的总次数均显著高于对照组和咀嚼减少组, 如图 4d. 对照组、咀嚼减少组和咀嚼增加组穿越开

臂的次数统计学没有差异, 如图 4e. 咀嚼增加组在开臂中运动时间百分比均显著高于对照组和咀嚼减少组, 如图 4f. 这同样表明咀嚼刺激的长期增加可以降低小鼠的焦虑情绪并提高自发活动能力.

2.4.3 新异物体识别. 对照组、咀嚼减少组和咀嚼增加组小鼠对 B 物体的识别指数以及对 C 物体的识别指数没有统计学差异, 如图 4g. 这说明咀嚼刺激的增加或减少对小鼠的短期记忆能力没有明显影响.

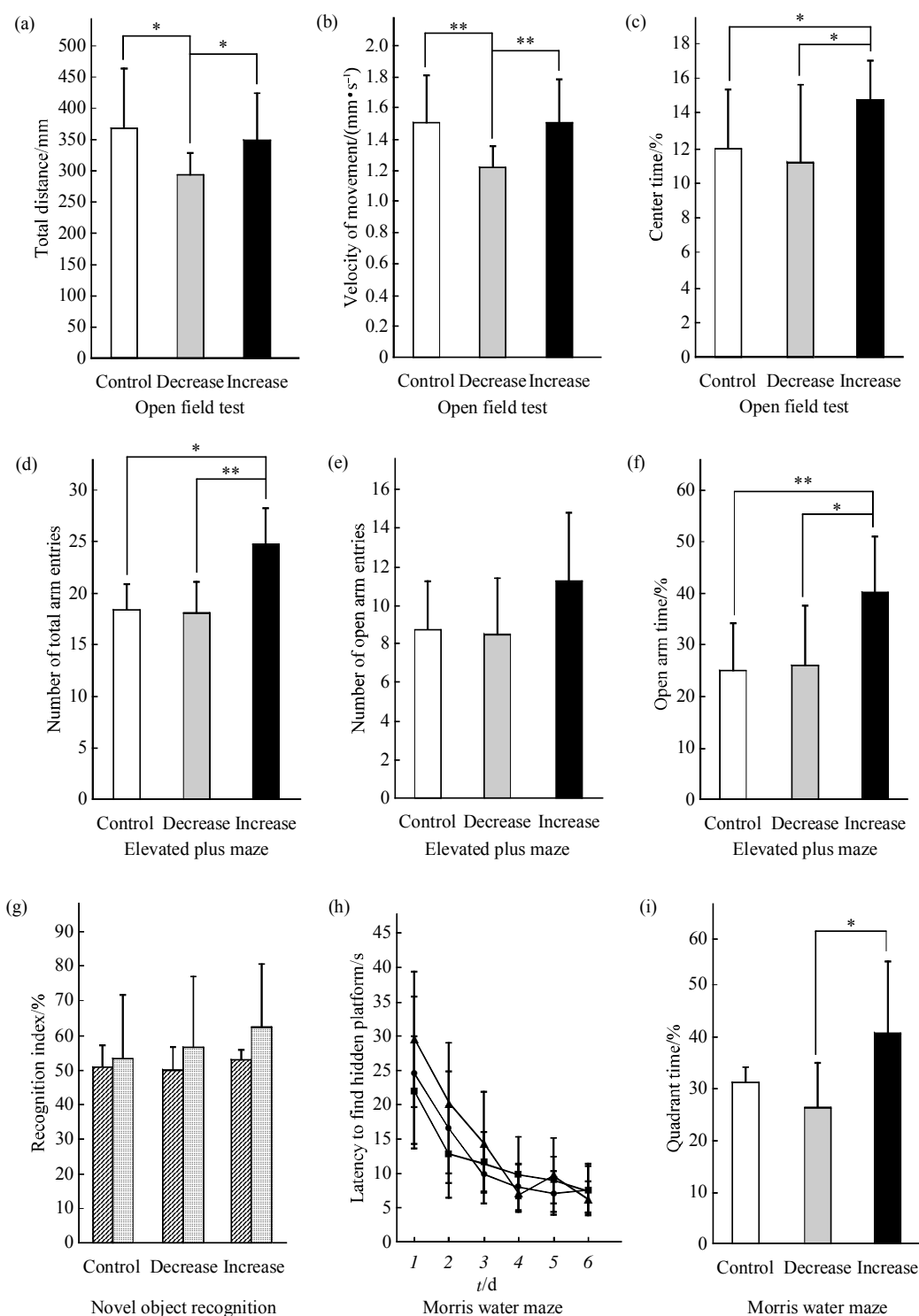


Fig. 4 The behavioral experiments

(a)~(c) The results of the open field test. (a) The total movement distance in the decrease group was significantly lower than that in the control and increase groups. (b) The velocity of movement in the decrease group was significantly lower than that in the control and increase groups. (c) The percentage of time moving in the center region of the increase group was significantly higher than the control and decrease groups. (d)~(f) The results of the elevated plus maze. (d) The number of total arm entries in the increase group was significantly higher than that in the control and decrease groups. (e) There was no significant difference in the number of open arm entries among the three groups. (f) The percentage of open arm moving time in the increase group was significantly higher than that in the control and decrease groups. (g) There was no significant difference in recognition index among the three groups in novel object recognition. ▨ : Object B; ▤ : Object C. (h)~(i) The results of Morris water maze test. (h) No significant difference in latency was found in Morris water maze training among the three groups. ●—● : Control; ▲—▲ : Decrease; ■—■ : Increase. (i) The percentage of quadrant time in the increase group was higher than that in the decrease group. □ : Control; ▤ : Decrease; ■ : Increase. $n = 10$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

2.4.4 Morris 水迷宫. 训练阶段为期 6 天, 3 组小鼠寻找平台的平均潜伏期均随着时间推移而逐渐减少. 至第 4 天, 3 组小鼠的平均潜伏期均小于 15 s, 并在第 5 和第 6 天保持平稳. 训练过程中, 各组小鼠寻找平台的平均潜伏期没有统计学差异, 如图 4h. 测试阶段移去平台后, 咀嚼减少组小鼠在平台所在象限运动时间的比例明显低于咀嚼增加

组. 这表明咀嚼增加组相对于咀嚼减少组其空间认知能力增强(图 4i).

2.5 皮层和海马中单胺类递质的差异

咀嚼减少组小鼠去甲肾上腺素(NE)在皮层中的含量高于对照组和咀嚼增加组. 3 组小鼠的肾上腺素(E)、多巴胺(DA)和 5-羟色胺(5-HT)在皮层和海马中的含量均没有统计学差异, 如图 5.

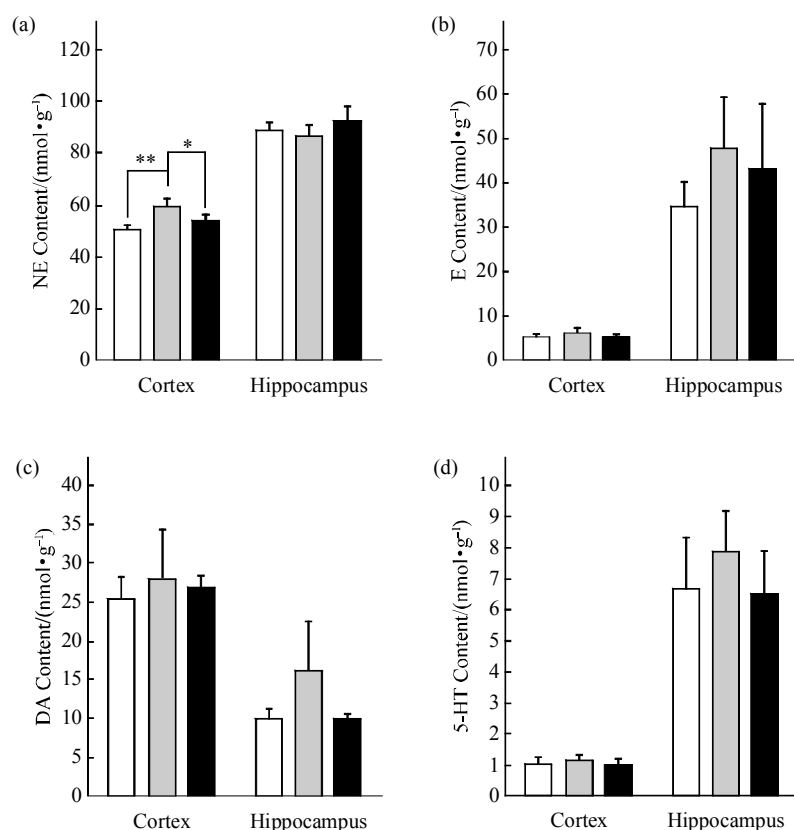


Fig. 5 The content of monoamine neurotransmitters in the cortex and hippocampus

(a) The NE content in the cortex of the decrease group was significantly higher than that in the control and increase groups; there was no significant difference in NE content in the hippocampus among the three groups. (b)~(d) There was no significant difference in E, DA or 5-HT content in the cortex or hippocampus among the three groups. Concentration was normalized to the loaded amount of wet tissue, $n=4$, * $P<0.05$, ** $P<0.01$. □: Control; ▒: Decrease; ■: Increase.

2.6 皮层和海马中与认知相关基因的表达差异

咀嚼减少组小鼠的皮层以及海马中突触素 I (synapsin I)、N-甲基-D-天门氨酸受体的 2B 亚基 (NR2B)、cAMP 应答元件结合蛋白 (CREB) 和脑源性神经营养因子 (BDNF) 的 mRNA 表达量均显著低

于对照组和咀嚼增加组. 咀嚼增加组小鼠皮层中 NR2B 以及海马中 Synapsin I、NR2B、CREB 和 BDNF 的 mRNA 表达量均显著高于对照组. 咀嚼增加组小鼠皮层中 Synapsin I、CREB 和 BDNF 的 mRNA 表达量均显著低于对照组, 如图 6.

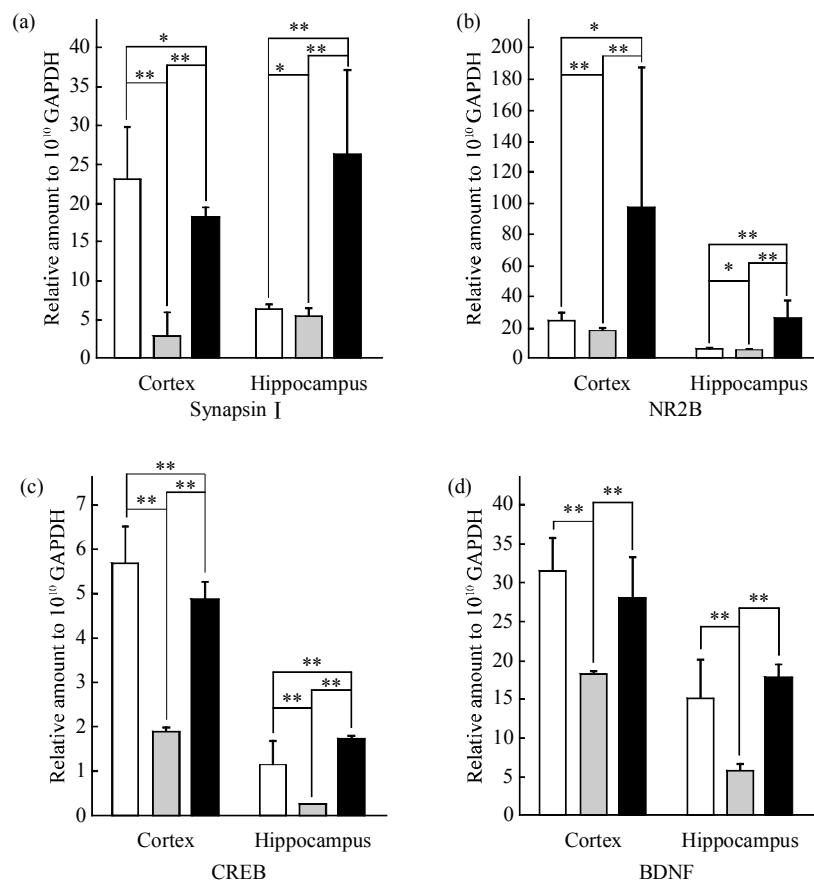


Fig. 6 mRNA expression changes in cortex and hippocampus

(a)~(d) The Synapsin I, NR2B, CREB and BDNF expression level in the cortex and hippocampus of the decrease group were significantly lower than those in the control and increase group; the Synapsin I, NR2B, CREB and BDNF expression level in the hippocampus of the increase group were significantly higher than those of the control group; the NR2B expression in the cortex of the increase group was significantly higher than that of the control group; the Synapsin I, CREB and BDNF expression levels in the cortex of the increase group were significantly lower than those of the control group. The mRNA copy numbers of Synapsin I, NR2B, CREB and BDNF were normalized to relative amount to GAPDH mRNA copy numbers, $n = 4$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. □: Control; ▒: Decrease; ■: Increase.

3 讨 论

本实验通过长期增加或降低年轻小鼠切牙的咀嚼刺激, 研究其认知和焦虑情绪的变化。由于啮齿类动物磨牙的生长和磨耗都较缓慢, 所以升高啮齿类动物磨牙的咬合高度易产生咬合创伤: 将 Wistar 大鼠磨牙的垂直距离升高 1 mm, 未出现明显肌纤维退变现象; 垂直距离升高 2 mm, 其咀嚼肌深层出现早期急性炎症反应, 后肌纤维再生直至 28 天后完成改建, 恢复正常肌纤维结构。但翼外肌肌纤维则发生了退变、萎缩并一直持续到第 84 天, 这可能是由于咬合垂直距离升高后髁突位置永久改变

所致^[5]。小鼠的切牙终生生长并不停磨耗, 小鼠除了进食, 还通过咬木屑铁笼等方式将不断长出的切牙磨短。如果切牙不能正常磨短, 那么切牙会不断长长, 最终导致小鼠死亡。所以小鼠切牙的咀嚼刺激远高于磨牙。而且, 与磨牙相比, 小鼠的切牙牙根粗长, 对咀嚼刺激改变的适应性更强, 不易产生病理变化。我们通过实验发现: 将小鼠下切牙降低约 1 mm(小鼠上下切牙的覆盖深度), 小鼠上下切牙仍能接触, 不影响进食, 但切牙的磨耗量减少, 咀嚼频率降低; 而使用硬度较小的光固化流动树脂使下切牙升高约 1 mm, 小鼠短期内咀嚼频率升高, 约 1 h 后, 可以在将树脂磨除, 也不影响其正常的

进食(图 1)。故我们采用将小鼠下切牙降低 1 mm 以减少切牙咬合刺激, 使用光固化流动树脂将下切牙升高 1 mm 以增加切牙咬合刺激。每 3 天对小鼠进行一次实验操作, 连续 4 个月。小鼠 4 个月的体重变化证实, 咀嚼增加组和咀嚼减少组与对照组之间没有统计学差异(图 2)。3 组小鼠的咬肌纤维、下颌骨以及下颌切牙和磨牙的形态均未见明显异常(如图 3a~f)也说明切牙咀嚼刺激的改变不会引起咀嚼系统的明显异常。同时 3 组小鼠大脑冠状面切片显示咀嚼刺激的改变也不会对皮层和海马的主要形态结构产生明显影响。以上结果说明, 本实验模型中小鼠切牙咀嚼刺激的改变是少量但是长期的, 对小鼠不会产生明显的不利影响。

旷场实验和高架十字迷宫都是评价动物焦虑状态的经典实验^[6-7]。焦虑的产生和大脑内神经递质网络失衡有关, 尤其是脑内神经递质的平衡被打破^[8-9]。本实验通过旷场实验和高架十字迷宫检测咀嚼刺激对年轻小鼠焦虑情绪的影响, 并通过高效液相色谱, 检测小鼠脑内单胺类神经递质的含量。结果显示, 咀嚼刺激的长期增加可以降低小鼠的焦虑情绪。同时咀嚼刺激的长期增加可以增加小鼠的自主运动能力; 相反, 刺激减少降低了小鼠的自主运动能力。咀嚼减少组小鼠与对照组和咀嚼增加组相比, 大脑皮层中去甲肾上腺素的水平升高。

去甲肾上腺素(NE)是应激相关的兴奋性神经递质。大脑中去甲肾上腺素能神经参与应激反应, 能直接增加心率, 引发储存的葡萄糖释放, 增加骨骼肌的血流量^[10]。去甲肾上腺素的升高和焦虑相关^[11]。咀嚼时心跳加快, 身体将消耗更多的能量, 从而抑制与紧张相关的激素(如糖皮质激素)的分泌。另外, 咀嚼可促进胰岛素的释放, 而在大脑中负责调节情绪的边缘系统中有胰岛素的受体^[1]。本实验中, 切牙咀嚼刺激的长期减少改变了年轻小鼠大脑皮层的功能状态, 使与应激相关的去甲肾上腺素增加, 从而导致了焦虑倾向的增高。尽管从旷场实验和高架十字迷宫的行为学结果来看咀嚼减少组与对照组差异没有统计学意义, 但可能与由于实验小鼠样本量限制有关。但是整体而言, 小鼠切牙咀嚼刺激增加使小鼠的焦虑情绪降低, 而咀嚼刺激减少导致大脑皮层中与焦虑相关的去甲肾上腺素上调, 这两者的趋势是一致的。

咀嚼可以增加向大脑运送氧气的血红蛋白含量, 加快大脑部分区域的血流量, 包括被认为与调节记忆有关的额颞区^[1]。本实验通过新异物体识别

检测小鼠的短期记忆力, 通过 Morris 水迷宫实验检测小鼠的空间认知能力。结果显示, 咀嚼刺激的长期改变, 并不能显著提高小鼠的短期记忆能力, 但是对小鼠的空间记忆能力产生了影响。咀嚼刺激长期增加的小鼠, 其空间认知能力优于刺激长期减少的小鼠, 因此切牙咀嚼刺激可以对不同类型的学习与记忆能力产生不同程度的影响。

突触可塑性是突触对内外环境变化做出反应的能力, 是学习记忆的神经生物学基础。脑源性神经营养因子(BDNF)对神经元的生长、发育、分化、维持和损伤修复都具有重要作用^[12], 对突触功能和可塑性也有调控作用^[13]。突触素(Synapsin)参与乙酰胆碱、谷氨酸等神经递质的释放过程, 与突触可塑性密切相关^[14]。NR2B 对成长过程中神经元可塑性及学习、记忆的形成至关重要, NR2B 可以增加钙内流, 从而易化长时程抑制(LTD)和长时程增强(LTP), 前脑 NR2B 过度表达的小鼠, 学习、记忆能力明显增强^[15]。CREB 对于 LTP 的产生是必需的, CREB 可通过其靶基因表达的产物提供足够的信号使突触强化, 与学习记忆过程密切相关^[16-17]。本实验通过荧光定量 PCR 检测与突触可塑性密切相关的上述 4 种基因的表达量。结果说明, 切牙咀嚼刺激长期减少可以下调小鼠皮层和海马中认知相关基因的表达, 咀嚼刺激增加可以上调海马中 4 种基因的表达, 但皮层中升降趋势并不一致, 这也许可以解释, 为什么在水迷宫测试中, 咀嚼增加组小鼠的空间认知能力明显高于咀嚼减少组, 而在新异物体识别实验中, 咀嚼增加组小鼠的短期记忆能力虽略有升高, 但是各组间差异没有统计学意义。

咀嚼作为重要的口腔功能, 与儿童和青少年的生长发育息息相关。本文的结论显示, 咀嚼对于情绪和记忆的形成也有影响。切牙咀嚼刺激的长期增加可以提高年轻小鼠的自主运动能力, 降低焦虑程度, 提高空间认知能力, 上调海马中认知相关基因的表达; 切牙咀嚼刺激的长期减少, 会降低年轻小鼠的自主运动能力, 增加大脑皮层中去甲肾上腺素的含量, 下调认知相关的基因表达。随着现代生活水平提高, 儿童摄取更多精细食物, 咀嚼刺激相对减少, 这是否不利于青少年的智力发育和心理健康, 本文的研究工作可能对此带来一定的启示。

参 考 文 献

- [1] Wilkinson L, Scholey A, Wesnes K. Chewing gum selectively improves aspects of memory in healthy volunteers. *Appetite*, 2002, 38(3): 235-236

- [2] Zibell S, Madansky E. Impact of gum chewing on stress levels: online self-perception research study. *Curr Med Res Opin*, 2009, **25**(6): 1491–1500
- [3] Gungormus Z, Erciyas K. Evaluation of the relationship between anxiety and depression and bruxism. *J Int Med Res*, 2009, **37**(2): 547–550
- [4] Watanabe K, Ozono S, Nishiyama K, *et al.* The molarless condition in aged SAMP8 mice attenuates hippocampal Fos induction linked to water maze performance. *Behavioural Brain Research*, 2002, **128**(1): 19–25
- [5] Akagawa Y, Nikm H, Tsuru H. Histologic changes in rat masticatory muscles subsequent to experimental increase of the occlusal vertical dimension. *J Prosthet Dent*, 1983, **50**(5): 725–732
- [6] Cryan J F, Holmes A. The ascent of mouse: advances in modelling human depression and anxiety. *Nat Rev Drug Discov*, 2005, **4**(9): 775–790
- [7] Weisstaub N V, Zhou M, Lira A, *et al.* Cortical 5-HT_{2A} receptor signaling modulates anxiety-like behaviors in mice. *Science*, 2006, **313**(5786): 536–540
- [8] Manji H K, Drevets W C, Charney D S. The cellular neurobiology of depression. *Nat Med*, 2001, **7**(5): 541–547
- [9] Kalueff A V. Neurobiology of memory and anxiety: from genes to behavior. *Neural Plast*, 2007, **2007**(78171): 1–12
- [10] Berecek K H, Brody M J. Evidence for a neurotransmitter role for epinephrine derived from the adrenal medulla. *Am J Physiol*, 1982, **242**(4): H593–H5601
- [11] Stahl S M. Mechanism of action of stimulants in attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Clin Psychiatry*, 2010, **71**(1): 12–13
- [12] Numakawa T, Suzuki S, Kumamaru E, *et al.* BDNF function and intracellular signaling in neurons. *Histol Histopathol*, 2010, **25**(2): 237–258
- [13] McAllister A K, Katz L C, Lo D C. Neurotrophins and synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci*, 1999, **22**: 295–318
- [14] Fdez E, Hilfiker S. Vesicle pools and synapsins: new insights into old enigmas. *Brain Cell Biol*, 2006, **35**(2–3): 107–115
- [15] Tang Y P, Eiji S, Tsien J Z, *et al.* Genetic enhancement of learning and memory in mice. *Nature*, 1999, **401**(6748): 63–69
- [16] Schmid R S, Graff R D, Schalaer M D, *et al.* NACM stimulates the ras-mapk pathway and creb phosphorylation in neuron cells. *J Neurobiol*, 1999, **38**(4): 542–558
- [17] White D M, Walker S L, Brenneman D E, *et al.* CREB contributes to the increased neurite of sensory neurons induced by vasoactive intestinal polypeptide and activity dependent neurotrophic factor. *Brain Res*, 2000, **868**(1): 31–38

The Impact of Long-term Chewing Stimulation Alterations on Anxiety and Cognition in Young Mice*

SU Jian-Sheng¹⁾, HAN Wen-Fei¹⁾, YAN Li²⁾, CHEN Li-Li¹⁾, GU Jia-Mei¹⁾, JI Ting-Ting²⁾, MENG Bo^{2)**}

¹⁾ School of Stomatology, Tongji University, Shanghai 200072, China;

²⁾ Shanghai Key Laboratory of Brain Functional Genomics, Key Laboratory of Brain Functional Genomics, Ministry of Education, East China Normal University, Shanghai 200062, China)

Abstract The investigated influence of long-term increases and decreases in incisal chewing stimulation on anxiety and cognition were investigated in young adult mice, and the underlying mechanisms were explored in detail. The results indicated that chewing was not associated with any significant differences in body weight, morphological differences in the mandibular and masseter muscle fibers, or the morphology of the cortex and hippocampus. In the open field test and elevated plus maze, less anxiety-related behaviors and higher activity levels were observed in the increase group; lower activity levels were observed in the decrease group. In novel object recognition, there were no significant differences in short-term memory ability between the three groups. In the Morris water maze, mice in the increase group exhibited greater spatial cognitive ability than the decrease group. To explore the mechanisms underlying the observed anxiety changes, the epinephrine (E), norepinephrine (NE), dopamine (DA) and 5-hydroxytryptamine (5-HT) neurotransmitters in the cortex and hippocampus were detected using high performance liquid chromatography. The results revealed that the decrease group exhibited higher NE in the cortex compared to the control and increase groups. The mRNA expression of four genes closely related with cognition (Synapsin I, NR2B, CREB and BDNF) were detected using real-time quantitative PCR, to investigate the mechanisms underlying cognitive changes. The results revealed that the decrease group exhibited lower mRNA expression of cognition-related genes in the cortex and the hippocampus, while the increase group exhibited higher mRNA expression in the hippocampus. Overall, the current findings indicate that long-term incisal chewing stimulation enhancement in young adult mice may decrease anxiety-related behavior and increase activity levels and spatial cognition.

Key words chewing, anxiety, cognition

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00620

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30840031, 30870790, 30970726, 81070876), The Shanghai Committee of Science and Technology (0852NM03600, 10JC1411200, 11ZZ38), The National Basic Research Program of China (2009CB918402) and The Fundamental Research Funds for The Central Universities.

**Corresponding author.

Tel: 86-21-62233970, Fax: 86-21-62601953, E-mail: bmeng@brain.ecnu.edu.cn

Received: January 14, 2011 Accepted: April 17, 2011