

慢性脱水中的脑甲醛代谢失调与学习迟缓*

李 婷^{1, 2)} 苏 涛¹⁾ 赫英舸¹⁾ 赫荣乔^{1)**}⁽¹⁾ 脑与认知科学国家重点实验室, 中国科学院生物物理研究所, 北京 100101; ⁽²⁾ 中国科学院大学生命科学学院, 北京 100049

摘要 慢性脱水是阿尔茨海默病患者的临床表现之一, 慢性脱水不但可以造成血清渗透压升高, 同时也引起中枢神经系统代谢失调和认知损伤。本文通过配制 4% NaCl 溶液作为 C57 BL/6 小鼠饮用水, 连续喂养 3 个月, 建立慢性脱水动物模型。慢性脱水(实验组)小鼠出现血清渗透压和 Na⁺ 浓度升高、体重减轻等脱水症状。实验组小鼠在“穿梭箱”行为范式中表现学习迟缓, 同时其脑内 5-羟色胺显著降低, 甲醛浓度升高, 产生甲醛的氨基脒敏感氧化酶(SSAO)活性升高, 并且活性升高的程度(脱水组酶活/对照组酶活)显著高于甲醛脱氢酶 3(ADH3)的变化程度。腹腔注射甲醛溶液 7 天(每天 1 次)也导致小鼠的“穿梭箱”学习过程迟缓, 并伴有脑内 5-羟色胺下降; 但在相同条件下, 连续 7 天注射 4% NaCl 溶液的小鼠组未见学习迟缓和 5-羟色胺水平的降低。这些结果提示, 慢性脱水导致小鼠脑内甲醛升高, 5-羟色胺下降, 可能是引起小鼠“穿梭箱”学习迟缓的原因之一。

关键词 慢性脱水, 穿梭箱, 学习迟缓, 甲醛, 5-羟色胺

学科分类号 Q189

DOI: 10.16476/j.pibb.2016.0104

随着衰老的进程, 许多老年人出现水代谢失调^[1]。年轻人体内含水量可达体重的 60%, 而 65 岁以上老人体内含水量降至 50% 左右。在非病理条件下, 衰老伴随着体内水分进行性减少, 以至于发生含水量的失衡。衰老引起口渴和饮水感受发生迟钝, 这种现象被视为机体慢性脱水(chronic dehydration)的原因^[2]。慢性脱水被认为是老年认知损伤的共同症状, 而老年痴呆病人更是如此^[3-5]。Purdy^[6]研究结果表明, 体重下降是阿尔茨海默病的主要临床特征。老年人体重的迅速下降主要起始于慢性脱水, 可能是从非痴呆状态向痴呆发展的征兆, 这也可能是引起老年痴呆的危险因素之一^[7]。

血清渗透压升高是动物和人体脱水的关键指标^[8-10], 同时可伴有细胞外液减少和血清钠、钾离子等浓度升高^[11-12]。在动物脱水的研究领域, 直接禁水法被用于肠道动力学、糖原代谢、肾水通道蛋白 AQP2 等研究^[13-15]。然而, 直接禁水造成的急性脱水模型, 由于实验条件过于剧烈, 并不适用于老年慢性脱水动物模型的研究。因此, 本文采用小鼠长期饮用高浓度 NaCl 盐水饲喂的方法, 建立一个慢性脱水动物模型, 用于研究慢性脱水导致实验动

物相关代谢的变化以及认知损伤。

甲醛存在于包括神经元在内的所有细胞, 并且与老年认知损伤密切相关^[16-18]。童志前等^[19]发现, 内源(尿)甲醛的含量与临床老年痴呆病人的认知损伤的严重程度呈正相关。采用甲醛代谢的前体甲醇长期喂食猕猴, 可以明显导致猕猴的工作记忆能力下降, 脑内老年斑的形成和 Tau 蛋白的异常磷酸化^[17-18, 20]。甲醛诱导的 Tau 蛋白聚集物具有细胞毒性, 引起神经细胞凋亡^[21-23]。在 SAMP8 小鼠中, 内源甲醛的异常升高可导致小鼠在 Morris 水迷宫中学习迟缓^[24-25]。在大鼠连续 30 天腹腔注射 0.5 mmol/L 甲醛的实验中, 大鼠脑组织甲醛浓度升高, 在 Morris 水迷宫中也表现学习记忆能力下降^[19]。尽管甲醛与认知功能之间的关系已经开展了大量的研究^[26-28], 但是, 慢性脱水与甲醛代谢之间的关系尚未阐明。

* 国家重点基础研究发展计划(973)(2012CB911004)资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 010-64889876, E-mail: rongqiaohe@163.com

收稿日期: 2016-03-26, 接受日期: 2016-04-05

本文通过小鼠长期(3个月)饮用 4% NaCl 水溶液, 建立慢性脱水动物模型。慢性脱水动物出现血清渗透压升高, Na^+ 浓度升高和体重降低的典型脱水症状, 小鼠脑内甲醛明显升高, 甲醛代谢失衡, 并表现出穿梭箱范式的学习迟缓。这些结果显示, 慢性脱水与内源甲醛代谢失调密切相关。该工作的开展, 有助于进一步理解慢性脱水引起老年认知损伤的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

动物: C57 BL/6 小鼠, 雄性, 6~8 周, 体重 20 g, 购于维通利华实验动物技术有限公司(北京)。

试剂: 甲醛溶液购于 Sigma 公司(美国), 乙腈购自 Thermo Fisher 公司(美国), 氯化钠(NaCl)、三氯乙酸、2, 4-二硝基苯肼(DNPH)、多聚甲醛等购自北京北化精细化学品有限责任公司(中国)。氨基脲敏感氨氧化酶(semicarbazide sensitive amine oxidase, SSAO)、乙醇脱氢酶 3(ADH3)、5-羟色胺(5-HT)、多巴胺(DA)、乙酰胆碱(Ach)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)及白介素 6(IL-6)等酶联免疫吸附试剂盒购于上海纪宁生物有限公司(中国)。超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)及谷胱甘肽还原酶(glutathione reductase, GR)检测试剂盒购自北京宝瑞杰生物有限公司(中国)。Anti-p181 tau、anti-p396 tau 及 anti-tau5 抗体购自 CST 公司(美国)。Anti- β -actin 购自 Sigma 公司(美国)。

1.2 动物饲养

小鼠单只分笼饲养, 饲养环境为昼夜 12 h 交替(室温度, 18℃~22℃; 湿度, 50%~60%), 食物和水自由摄取^[29]。小鼠适应环境 7 天后, 实验组饮用水更换为 4% NaCl 的水溶液, 持续喂养 3 个月。所有小鼠进行动物行为学检测后, 摘眼球取血, 脊椎脱臼处死。取动物脑、肝、肾等组织, -80℃冰箱冷冻储存。所有动物实验均获得中国科学院生物物理研究所, 动物道德伦理委员会的批准(批准号: SYXK2013-77)。

1.3 行为实验

1.3.1 穿梭箱

穿梭箱为两个相同的封闭箱(280 mm×155 mm×213 mm), 两者之间有门联通, 顶部有蜂鸣器, 底部有带电刺激栅格。实验时先将小鼠放入箱内任意一侧, 适应 10 min。然后给予条件刺激(声音)10 s。条件刺激 5 s 后同时给予 10 s 非条件刺激(足底电

流)。共进行 100 次训练, 每次训练间隔 30 s。按照每 10 次训练为一个点统计小鼠的学习曲线, 主动回避次数占总次数的比率作为反映小鼠学习效果的指标。每组 8 只, 每只小鼠实验完毕后用 75% 酒精擦拭整个装置, 待酒精全部挥发后进行下一只的测试^[30]。

1.3.2 Y 迷宫

Y 迷宫用 PVC 板制作, 内外壁贴白色胶纸。共 3 个臂, 各个臂夹角 120°, 规格 30 cm×8 cm×15 cm, 在中央处各有一个可移动的隔板。迷宫各个臂内贴有不同形状的几何图形作为视觉标记。小鼠进入迷宫时所在的臂称为起始臂。整个实验过程中起始臂和其他臂均一直打开, 动物可以自由出入。用摄像头记录 6 min 内小鼠的运动情况。每组 8 只, 每只小鼠实验完毕后用 75% 酒精擦拭整个装置, 待酒精全部挥发后进行下一只的测试^[31]。

1.3.3 八臂迷宫

八臂迷宫硬件部分中央平台直径 30 cm, 辐射分布的八个臂长 35 cm。每个臂除了通向中央平台的出口外, 其他三面均由高度为 25 cm 的墙阻隔。每个臂远心端放置高度为 1 cm 的食槽, 迷宫周围设置环境标示。实验所用饲料为巧克力味食物, 放置于目标臂的食槽中。首先对小鼠进行禁食处理, 24 h 后给予 2 h 的自主取食时间, 所用食料为实验过程中将要使用的巧克力味食物。该过程共进行 2 天, 使得特定的食物能够对小鼠产生驱使。将每只小鼠放入八臂迷宫内适应 10 min。该过程进行 2 天, 使得小鼠充分熟悉迷宫环境。随后, 将 1、3、4、7 臂设置为目标臂, 在每个食槽中放上巧克力味食物。将小鼠放于中央区, 用摄像头记录 10 min 内小鼠的活动状态。统计小鼠的工作记忆错误(小鼠再次进入放有食物臂的错误次数总和)、参照记忆错误(小鼠进入未放食物臂的错误次数总和及总错误(参照记忆错误次数和工作错误次数总和)。每天 1 次, 共进行 8 次。每组 8 只, 每只小鼠实验后用 75% 酒精擦拭整个实验装置, 待酒精挥发完毕后进行下一只的测试^[32]。

1.3.4 高架十字迷宫

高架十字迷宫由 2 个相对的开放臂、2 个相对的封闭臂及 1 个连接四只臂的中央平台组成。测试前, 将每只小鼠置于高架十字迷宫的中央平台处, 使其头部正对其中一个开放臂。用摄像头记录 5 min 内小鼠进入开放臂和封闭臂的次数和时间。进入任一臂以小鼠四只脚均进入到臂内为准。统计

小鼠进入开放臂次数 / 总次数, 进入封闭臂次数 / 总次数, 进入开放臂时间 / 总时间及进入封闭臂时间 / 总时间这 4 个指标。每组 8 只, 每只小鼠实验后用 75% 酒精擦拭整个实验装置, 待酒精挥发完毕后进行下一只的测试^[33]。

1.3.5 开放旷场

采用计算机实时监测分析系统 SMART-VIDEO-TRACKING。该仪器主要由 4 个敞口箱组成, 规格 40 cm×40 cm×30 cm。实验前将小鼠置于饲养室适应 1 周。实验开始前 30 min 将小鼠移入测试室适应, 以保证实验时小鼠活动趋于稳定。开始时将小鼠背对操作者放入旷场中央, 用摄像头记录小鼠每 5 min 的总运动距离与时间, 中心区域运动的距离与时间。每组 8 只, 每只小鼠实验后用 75% 酒精擦拭整个实验装置, 待酒精挥发完毕后进行下一只的测试^[33]。

1.3.6 运动与拉力

将小鼠前肢肌肉拉力测试仪调零, 使小鼠垂直状前肢双爪抓紧测试仪的网状力臂上, 待小鼠安静后垂直拉动小鼠尾巴直至脱离拉力测试仪, 记录数值。每只小鼠拉力测试重复 3 次, 每组 8 只^[33]。

1.3.7 痛觉测定

采用辐射热刺激“甩尾测痛法”测量小鼠尾部热痛觉敏感性。以小鼠甩尾反应的潜伏期(tail-flick latency, TFL)作为痛阈指标。先将小鼠装进小鼠固定器中, 适应 10 min。待小鼠安静后在每只动物尾部后 2 cm 测其 TFL, 以刺激开始至出现甩尾的时间为痛阈值。基础痛阈值取 3 次的平均值, 每次测量间隔 5 min, 每组 8 只^[30]。

1.4 血清钠/钾离子含量及血清渗透压检测

小鼠血清中钠 / 钾离子浓度使用美国 P-E3030 原子吸收光谱仪火焰法测定, 由北京中医药大学代为检测。小鼠血清渗透压由德国罗泽渗透压检测仪(OM815, 亚森国际, 德国)检测^[34]。

1.5 小鼠体内自由水及结合水测定

采用小鼠身体组分 MRI 分析仪对 C57 BL/6 体内自由水与结合水含量进行活体检测, 由北京大学生命科学学院代为检测^[35]。

1.6 HPLC 检测脑甲醛浓度

称取小鼠 0.1 g 脑组织, 加入 0.5 ml SDN 裂解液组织匀浆, 随后加入 0.5 ml 三氯乙酸, 离心(13 000 r/min, 4℃ 30 min)。取 0.4 ml 上清, 加入 0.1 ml DNPH(1g/L), 0.5 ml 乙腈, 混匀后 60℃ 水浴 30 min, 离心(13 000 r/min, 4℃ 30 min), 取上

清进行 HPLC 检测^[36]。

1.7 酶联免疫吸附法测定

采用酶联免疫吸附法试剂盒检测小鼠血清中氨基脲敏感氨氧化酶(SSAO)及甲醛脱氢酶 3(ADH3)的含量及活性。同时检测小鼠脑中 5-羟色胺、多巴胺和乙酰胆碱等神经递质的变化。所有实验步骤均严格按照说明书进行。

1.8 血清中应激因子及炎症因子的测定

采用超氧化物歧化酶及谷胱甘肽还原酶检测试剂盒, 测定小鼠血清中 SOD 及 GR 酶活性。采用酶联免疫试剂盒, 检测小鼠血清中 TNF- α 及 IL-6 的含量。所有步骤均严格按照说明书进行。

1.9 Western blotting 检测脑中 Tau 蛋白磷酸化水平

称取 0.1 g 小鼠脑组织, 加入 1 ml SDN 裂解液组织匀浆, 离心(13 000 r/min, 4℃ 30 min), 取上清。用 BCA 试剂盒测定蛋白质浓度, 对蛋白质进行 SDS 凝胶电泳分离, 然后将其转印到 PVDF 膜上, 进行一抗孵育(一抗为 Tau 5、anti-pT181、anti-pS396 及 anti- β -actin)。摇床过夜(4℃), 进行二抗孵育。用 ECL 超敏化学发光液显影^[33]。

1.10 甲醛与 4% NaCl 腹腔注射

小鼠于鼠房内适应 1 周后, 随机分为两组, 每组 8 只。实验组腹腔注射 0.2 mg/kg 浓度的甲醛溶液或 4% NaCl 水溶液连续 7 天, 对照组注射等体积生理盐水溶液。处理后根据上述实验步骤对小鼠进行行为学及各项生化指标的检测^[19]。

1.11 统计方法

测定值用平均数 $\pm$ 标准误(mean $\pm$ SE)表示, 各组实验数据采用统计软件 SPSS 17.0 中的 ONE-WAY ANOVA 法分析, $P < 0.05$ 或者 $P < 0.01$ 作为具有统计学差异显著性。

2 结 果

2.1 慢性脱水小鼠模型的建立

血清渗透压升高与否是检验动物脱水的关键指标。C57 BL/6 小鼠持续饮用 4% NaCl 水溶液 3 个月后的测定结果显示, 血清渗透压(图 1a, $P < 0.01$)和血清 Na^+ 浓度(图 1b, $P < 0.05$)显著高于对照组, 同时伴有体重的降低(图 1c, $P < 0.01$), 但未见血清 K^+ 浓度的显著升高(图 1d, $P=0.185$)。采用小鼠身体成分分析仪 MRI, 分析小鼠体内含水量, 与对照组比较, 实验组小鼠体内自由水(图 1e, $P=0.541$)和结合水(图 1f, $P=0.857$)均未见显著变化。

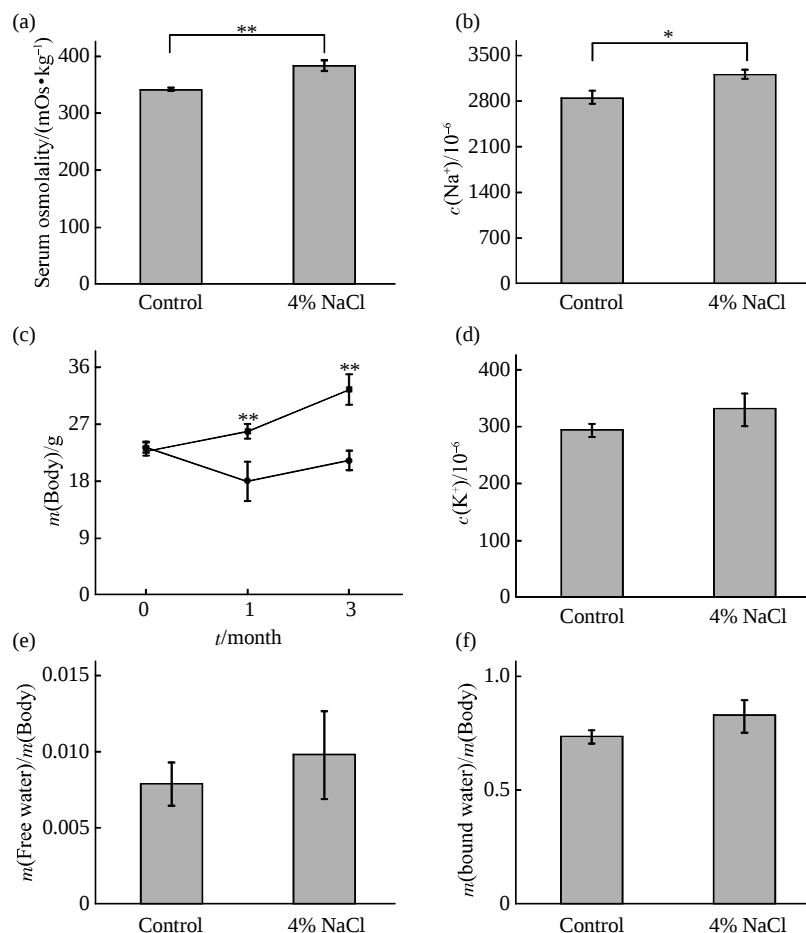


Fig. 1 Changes of serum osmotic pressure, sodium concentrations and body weight in NaCl-treated group

The serum osmotic pressure (a), sodium concentrations (b) in 4% NaCl-treated group were determined as described in **Materials and methods**. Their body mass were measured (c). ■—■: Control group; ●—●: 4% NaCl group. Under the same conditions, the serum potassium concentration (d), free water/body mass (e) and bound water/body mass (f) were also measured. The data are shown as the *mean* ± *SE*; **P* < 0.05; ***P* < 0.01.

通过设计实验, 对实验组的应激和炎症反应状态也进行了检测, 主要测定了脑内 SOD(图 S1a)、GR(图 S1b)酶活性, 以及 TNF- α (图 S1c)和 IL-6(图 S1d)的表达. 但未见这些指标显著升高. 以上结果表明, 饮用 4% NaCl 盐水 3 个月, 可以建立慢性脱水动物模型.

2.2 4%NaCl 水溶液饮用 3 个月后小鼠在穿梭箱学习过程中表现迟缓

在穿梭箱训练过程中(图 2a), 尽管实验组和对照组小鼠随着训练次数的增加, 主动回避刺激的成功率都不断增加, 且最终都可以达到 75%, 表明

两组小鼠最终都可以学会躲避疼痛刺激. 但实验组在学习过程中, 较对照组始终表现出学习缓慢, 直到第 40~50 次刺激时, 其主动回避刺激的成功率显著低于对照组(*P* < 0.05), 说明实验组的学习能力较为迟缓.

为了确定饮用盐水是否能够影响记忆能力, 作者观察了训练后第 2 天实验组主动回避刺激的情况. 结果表明, 实验组与对照组无显著差异(图 2b, *P* > 0.05), 即小鼠一旦学会躲避刺激, 在一定时间内会保持记忆. 为了保证穿梭箱实验的准确性, 作者对小鼠尾部痛觉敏感性进行了热痛觉检测. 如

图 2c 所示, 两组小鼠尾部痛觉的敏感性没有显著性差异($P=0.785$).

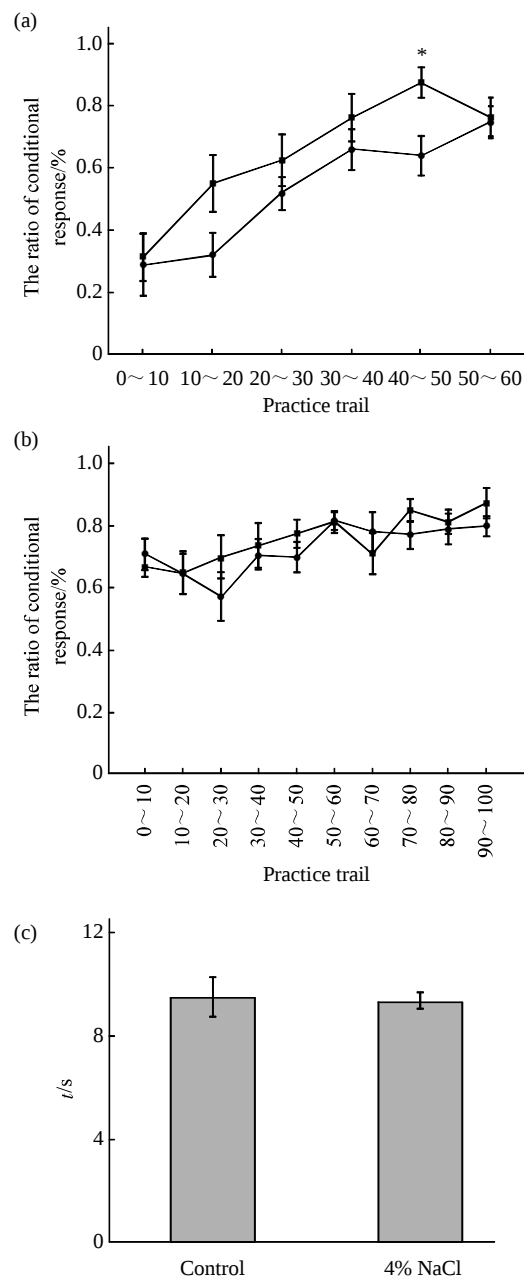


Fig. 2 Shuttle box detection in C57 BL/6 mice with chronic dehydration

The experimental conditions of water intake were shown in Figure 1. After stimulating by the case of sound, the ratio of conditional response was used to measure learning and memory ability (a). The horizontal axis is the number of training. Memory test was done after the second day of training (b). ■—■: Control; ●—●: 4% NaCl. Tail flick test was performed in the experimental conditions (c). The data are shown as the mean $\pm$ SE. * $P < 0.05$.

另外, 与对照组相比, 在其他迷宫类检测学习记忆行为范式中, 如 Y 迷宫(图 S2)及八臂迷宫(图 S3), 实验组未表现出显著差异. 实验组在检测焦虑行为的高架十字迷宫(图 S4a, 4b)和开放旷场(图 S5a, 5b, 5c)实验中, 均未表现出显著差异($P > 0.05$). 但实验组在拉力实验中表现出了差异(图 S5d, $P < 0.05$). 如上所述, 实验组在疼痛刺激下的黑暗穿梭箱中, 表现出学习能力迟缓.

2.3 4% NaCl 水溶液饮用 3 个月后小鼠脑甲醛升高

小鼠连续饮用 4% NaCl 水溶液 3 个月, 其脑内甲醛升高(图 3a, $P < 0.05$), 同时 SSAO 酶活性显著升高(图 3b, $P < 0.05$), 其表达水平也有所升高(图 3c, $P=0.061$). 在相同条件下, 虽然甲醛脱氢酶 ADH3 蛋白含量有所下降(图 3d, $P=0.123$), 但酶活性升高(图 3e, $P < 0.05$). 比较二者酶活性升高的程度(脱水组 / 对照组), SSAO 酶活性升高的程度显著大于 ADH3(图 3f, $P < 0.05$), 即小鼠脑内产生甲醛的酶活性, 高于降解甲醛的酶活性. 这些结果提示, 4% NaCl 水溶液连续处理 3 个月, 可以导致小鼠脑内甲醛代谢失衡, 从而引起甲醛浓度升高.

2.4 腹腔注射甲醛可导致小鼠穿梭箱行为异常

分别采用甲醛水溶液和 4% NaCl 水溶液对小鼠进行腹腔注射(1 次 / 天, 共 7 天). 结果显示, 与对照组相比, 甲醛注射组在第 50~60 次训练时, 表现出学习迟缓(图 4a, $P < 0.05$), 而 4% NaCl 注射组与对照组相比, 却始终未见显著变化(图 4b). 但训练终末, 两组主动回避刺激成功的百分率都可达 75%以上. 与对照组相比, 甲醛注射组小鼠脑内甲醛含量显著上升(图 4c), 而 4% NaCl 组未出现脑甲醛含量的显著改变(图 4d). 为了排除疼痛差异的干扰, 实验中分别测定了对照组、甲醛注射组(图 4e)、4% NaCl 注射组(图 4f)小鼠尾部痛觉的敏感性, 均未见明显差异. 这些结果提示, 饮用 4% NaCl 水溶液 3 个月所引起学习迟缓的原因之一, 可能是慢性脱水导致脑内甲醛的升高所致.

2.5 实验组小鼠脑内 5-羟色胺水平显著下降

既然腹腔注射甲醛, 能够引起小鼠在穿梭箱学习过程的迟缓, 那么甲醛是否可以导致脑内相关神经递质的水平发生改变? 实验结果显示, 4% NaCl 水溶液饮用 3 个月后, 导致小鼠脑内 5-羟色胺水平显著下降(图 5a, $P < 0.05$), 而实验组脑内的乙

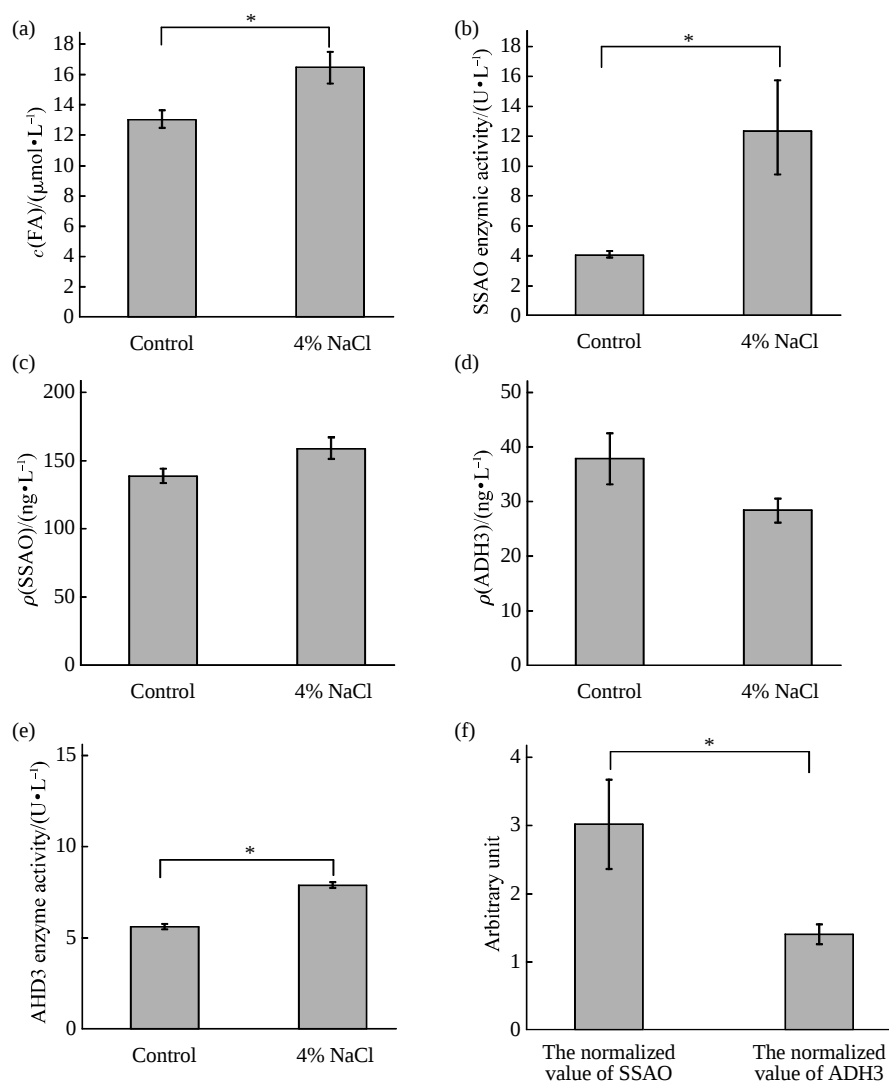


Fig. 3 Measurement of the formaldehyde concentration in brain and SSAO/ADH3 enzymatic activity in serum

The brain formaldehyde concentration of NaCl-treated mice (a) was measured as described^[36]. SSAO concentration (b) and its enzymatic activity (c) as well as ADH3 concentration (d) and its enzymatic activity (e) were detected with ELISA. Changes in the ratio (dehydrated group/control group) of SSAO activity was significantly greater than that of ADH3 (f). The data are shown as the *mean* ± *SE*; **P* < 0.05; ***P* < 0.01.

酰胆碱(图 5b, $P=0.527$)和多巴胺(图 5c, $P=0.833$)的含量未见显著改变. 为了进一步证明由甲醛引起脑内 5-羟色胺含量的降低, 作者通过腹腔注射甲醛或 4% NaCl 来检测脑内 5-羟色胺含量. 如图 5d 所示, 腹腔注射甲醛同样导致小鼠脑内 5-羟色胺含量的显著下降($P < 0.05$), 而腹腔注射 4% NaCl 的小鼠脑内 5-羟色胺的含量下降不显著(图 5d, $P=0.088$). 这些结果暗示, 脑甲醛升高后, 通过降低脑内 5-羟色胺, 影响了小鼠在穿梭箱行为范式中的

的学习过程.

另外, 作者检测了 4% NaCl 水溶液饮用 3 个月小鼠脑内 Tau 蛋白的磷酸化水平. 无论第 181 位酪氨酸残基, 还是第 396 位丝氨酸残基的侧链, 均未见磷酸化水平的显著变化(图 S6a 和 6b). 脑组织的 Tau 蛋白(Tau5)水平也未见明显变化. 这提示 Tau 蛋白的磷酸化, 可能未参与慢性脱水小鼠在穿梭箱行为范式过程中出现的学习迟缓.

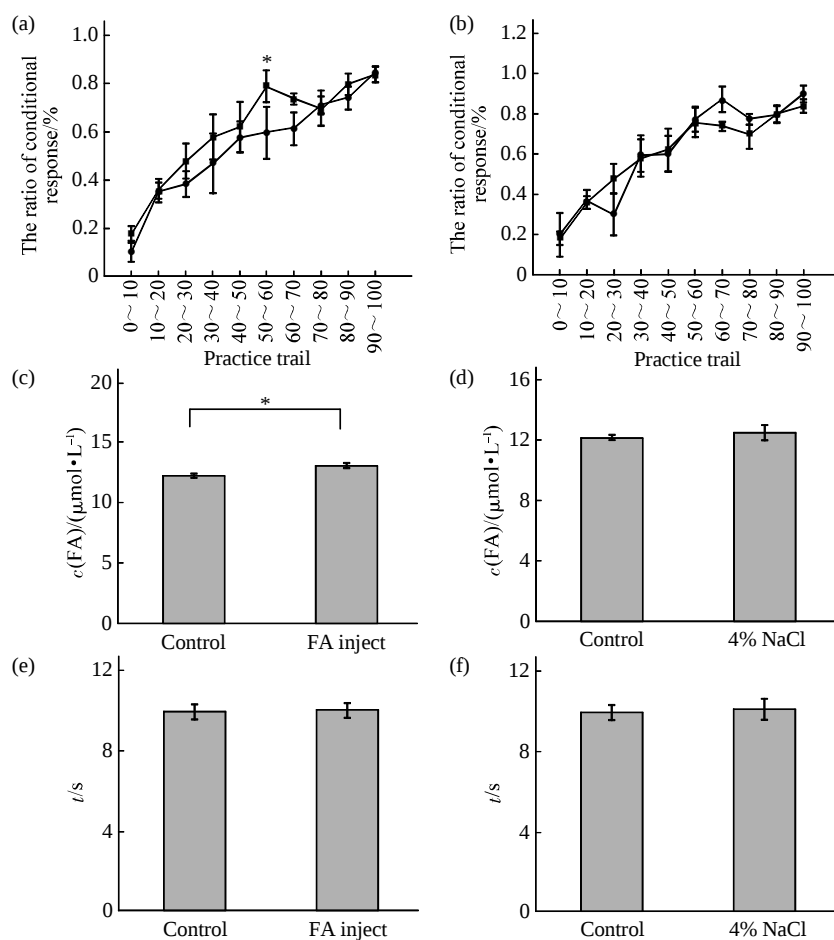


Fig. 4 Shuttle box detection in C57 BL/6 mice injected with formaldehyde or 4%NaCl

The experimental conditions of water intake were shown in Figure 1, except for the injection with formaldehyde or 4% NaCl. After stimulating by the case of sound, the ratio of conditional response was used to measure learning and memory ability (a, b). The horizontal axis is the number of training. Brain formaldehyde concentration was detected by HPLC (c, d). Tail flick test was performed in the experimental conditions (e, f). The data are shown as the $mean \pm SE$; * $P < 0.05$. (a) ■—■: Control; ●—●: FA inject. (b) ■—■: Control group; ●—●: 4% NaCl Group.

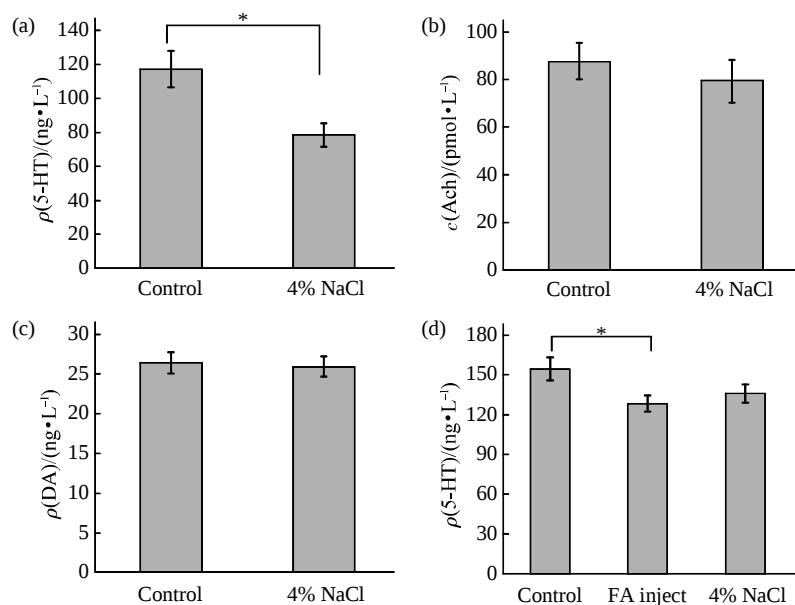


Fig. 5 Level changes of 5-HT, Ach and DA in the mouse brain

The levels of 5-hydroxytryptamine (5-HT, a), acetylcholine (Ach, b) and dopamine (DA, c) in the brain of 4%NaCl-treated mice were detected by ELISA kits for three months group. Meanwhile, the 5-HT concentration of mice injected intraperitoneally with formaldehyde or 4% NaCl were also detected (d). The data are shown as the $mean \pm SE$; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

3 讨 论

本文作者观察到了慢性脱水可以导致实验小鼠在“穿梭箱”实验范式中的学习迟缓,同时小鼠脑内 5-羟色胺显著降低,脑内甲醛升高,并伴有甲醛代谢酶活性的显著改变,即产生甲醛酶 SSAO 活性升高的程度,显著高于降解甲醛酶活性的升高程度。这些结果提示,慢性脱水导致小鼠脑内甲醛代谢失衡,可能是影响 5-羟色胺代谢的因素之一。

与对照组相比,慢性脱水组小鼠在“Y 迷宫”和“八臂迷宫”的学习记忆中均未见显著差异。慢性脱水小鼠在“穿梭箱”行为范式中表现出学习迟缓,这可能是“穿梭箱”的行为范式,通过声音刺激联合电击足底(厌恶刺激)来左右小鼠的学习过程^[37]。与“Y 迷宫”和“八臂迷宫”依赖自发运动的学习记忆不同,“穿梭箱”是给予条件刺激引发恐惧的学习记忆范式^[38]。另外,由于实验组饮用高盐水溶液,出现慢性脱水的症状,限制了采用“Morris 水迷宫”检测小鼠学习认知能力。由于进入水缸之后,小鼠会出现饮水行为,从而干扰水迷宫学习范式。因此,在本实验中没有使用“Morris 水迷宫”这一范式。

小鼠脑内 5-羟色胺含量是与穿梭箱表现行为直接相关的。很多学者发现,在小鼠训练 100 次的同时,向脑室注射 5-羟色胺的激动剂或抑制剂都能影响小鼠穿梭箱学习的过程^[39]。脑内的 5-羟色胺含量又与动物的恐惧记忆直接相关。早在 1982 年,Archer^[40]的实验结果表明,脑内 5-羟色胺含量的降低会增加和延长大鼠的恐惧记忆。徐林等^[41]发现,脑内不能产生 5-羟色胺的缺陷小鼠与普通小鼠相比,焦虑水平低但却长时间保留着恐惧记忆。在敲除 5-羟色胺的小鼠脑内注射 5-羟色胺后,这种增强的恐惧记忆能够消退至与对照组小鼠一样^[41]。这些结果进一步说明,增强的恐惧记忆是由 5-羟色胺缺乏引起的。由血中 5-羟色胺调节的抗巩固蛋白(anticonsolidation protein)也在穿梭箱学习记忆范式中发挥作用,包括影响恐惧与焦虑等行为^[42]。慢性脱水组小鼠脑内 5-羟色胺显著降低,而腹腔注射甲醛的小鼠同样出现脑内 5-羟色胺水平明显下降。因此,小鼠对暗穿梭箱的刺激引发对恐惧的敏感,这就不难理解为什么慢性脱水小鼠在“穿梭箱”行为范式中表现学习迟缓。

在细胞培养基中加入 0.5 mol/L 山梨醇或 0.3 mol/L 甘露醇引发细胞脱水的模型已经很成

熟^[43-44],但是,细胞脱水模型难以做到长期操作而形成慢性脱水的状态。因此,作者未使用细胞作为慢性脱水的模型。关于动物脱水模型,直接禁水建立的是急性脱水,造成的损失往往是水、盐电解质紊乱,甚至形成酸中毒。黄玲玲等采用“醋酸去氧皮质酮(DOCA)-高盐”建立高血压大鼠模型,使用 4% NaCl 饮用联合皮下注射 DOCA 8 周的方法造模,用于高血压的研究^[45-46]。参考他们的工作,同时也为了避免形成高血压,作者采用给小鼠长期饮用 4% NaCl 水溶液来建立慢性脱水模型。该模型小鼠出现了血清渗透压和钠离子浓度升高,体重减轻等脱水症状,但是伴随高血压相关的一些因子(如 TNF- α 及 IL-6)并没有升高。这一模型的建立有助于进一步探索慢性脱水诱发老年认知损伤的机制。

综上所述,在慢性脱水组中,小鼠出现“穿梭箱”学习范式的迟缓,可能是脑内 5-羟色胺降低所致。然而,作者认为甲醛代谢失调在其中可能是关键因素之一。其理由如下: a. 饮用 4% NaCl 组出现脑内甲醛升高,同时伴有脑内 5-羟色胺的降低; b. 慢性脱水组脑内 SSAO 酶活显著升高,同时伴有该酶蛋白水平一定程度的增加; c. SSAO 的升高程度显著高于甲醛降解酶 ADH3,使得甲醛在脑内蓄积; d. 腹腔注射甲醛可以明显导致小鼠脑内 5-羟色胺水平的减低,而相同条件下注射 4% NaCl,脑内 5-羟色胺降低不明显。因此,本文的工作可以小结为:慢性脱水导致脑内甲醛升高,后者的升高引起 5-羟色胺在脑内的下降,从而使得慢性脱水小鼠在穿梭箱的学习过程中表现迟缓。那么,脱水是如何导致脑甲醛上升的,甲醛又是如何引起 5-羟色胺降低的,其作用机制仍有待进一步探索。

附件 图 S1~S6, 见本文网络版附录(<http://www.pibb.ac.cn>)

致谢 感谢中国科学院生物物理研究所的王玉婧、吴蓓蓓、于乐祥和王晴在动物实验中给予的帮助。感谢中科院生物物理研究所莫炜川博士在数据分析过程中给予的帮助。感谢中国科学院生物物理研究所实验动物中心的周磊老师、武欣怡老师及杨赛老师在动物饲养方面给予的帮助。

参 考 文 献

- [1] Luckey A E, Parsa C J. Fluid and electrolytes in the aged. Archives

- of Surgery, 2003, **138**(10): 1055-1060
- [2] Stout N R, Kenny R A, Baylis P H. A review of water balance in ageing in health and disease. *Gerontology*, 1999, **45**(2): 61-66
 - [3] Buffa R, Mereu R M, Putzu P F, *et al.* Bioelectrical impedance vector analysis detects low body cell mass and dehydration in the patients with Alzheimer's disease. *JNHA*, 2010, **14**(10): 823-874
 - [4] Koopmans R T, Ekkerink J L, Sirre L G, *et al.* Multi-infarct dementia in nursing home patients; more comorbidity and shorter life expectancy than in Alzheimer's disease. *Ned Tijdschr Geneeskde*, 1992, **136**(45): 2223-2227
 - [5] Buffa R, Mereu R M, Putzu P F, *et al.* Bioelectrical impedance vector analysis detects low body cell mass and dehydration in the patients with Alzheimer's disease. *JNHA*, 2010, **14**(10): 823-874
 - [6] Purdy M. Accelerating weight loss may signal development of Alzheimer's disease. *Bio-Medicine*, 2006, <http://news.bio-medicine.org/medicine-news-3/Accelerating-weight-loss-may-signal-development-of-Alzheimers-disease-3163-1/>
 - [7] Gharibzadeh, Hoseini. Chronic dehydration may be a preventable risk factor for Alzheimer's disease. *Med Hypoth*, 2007, **68**(3): 718
 - [8] 吴妮莉. 血清钠及血浆渗透压、尿比重检测对水电解质体液失调的临床观察与分 B 析. *中国社区医师*, 2012, **7**(14): 265
Wu N L. *Chinese Community Doctors*, 2012, **7**(14): 265
 - [9] 丁育基, 段安安, 鲁晓莉, 等. 血清渗透压监测在颅脑重症治疗中的应用和意义. *中华外科杂志*, 1996, **34**(4): 224-228
Yu D J, Duan A A, Lu X L, *et al.* *Chinese Journal of Surgery*, 1996, **34**(4): 224-228
 - [10] 罗晨. 高温高湿环境补液及运动对大鼠体内电解质及激素调节的影响. 北京体育大学, 2009
Luo C. *Beijing Sports University*, 2009
 - [11] 薛丽霞, 李淑娥, 孙艳杰, 等. 颅脑术后高渗性脱水的护理. *解放军护理杂志*, 2009, **26**(5): 52-53
Xue L X, Li S E, Sun Y J, *et al.* *Nursing Journal of Chinese People's Liberation Army*, 2009, **26**(5): 52-53
 - [12] 章霞. 速尿不同给药方式对危重患者脱水效果的影响. *护理与康复*, 2008, **7**(12): 891-893
Zhang X. *Nursing and Rehabilitation Journal*, 2008, **7** (12): 891-893
 - [13] 张文仁. 牛奶致小鼠便秘模型的建立与机制探讨. 兰州大学, 2007
Zhang W R, *Lan Zhou University*, 2007
 - [14] 朱金钗. 禁水致脱水对大鼠睾丸内精子输送影响的形态定量研究. 川北医学院, 2013
Zhu J C, *North Sichuan Medical College*, 2013
 - [15] 邓英姿, 张远慧, 许顶立. 禁水大鼠肾脏与尿液水通道蛋白 2 表达的改变及意义. *第一军医大学学报*, 1999, **19**(6): 493-495
Deng Y Z, Zhang Y H, Xu D L. *Journal of Firearm Military Medical University*, 1999, **19**(6): 493-495
 - [16] Chen J, Sun M, Wang X, *et al.* The herbal compound geniposide rescues formaldehyde induced apoptosis in N2a neuroblastoma cells. *Sci China Life Sci*, 2014, **57**(4): 412-421
 - [17] Li T, Su T, He Y G, *et al.* Brain formaldehyde is related to water intake behavior. *A & D*, 2016(DOI: 10.14336/AD.2016.0323)
 - [18] Lu Y, He H J, Zhou J, *et al.* Hyperphosphorylation results in tau dysfunction in DNA folding and protection. *J Alzheimer's Dis*, 2013, **37**(3): 551-563
 - [19] Tong Z Q, Zhang J L, Luo W, *et al.* Urine formaldehyde level is inversely correlated to mini mental state examination scores in senile dementia. *Neurobiol Aging*, 2011, **32**(1): 31-41
 - [20] Chen J Y, Sun M R, Wang X H, *et al.* The herbal compound geniposide rescues formaldehyde-induced apoptosis in N2a neuroblastoma cells. *Sci China Life Sci*, 2014, **57**(4): 412-421
 - [21] Nie C L, Wei Y, Chen X, *et al.* Formaldehyde at low concentration induces protein tau into globular amyloid-like aggregates *in vitro* and *in vivo*. *PloS One*, 2007, **2**(7): e629
 - [22] Chi Y N, Zhang X, Cai J, *et al.* Formaldehyde increases intracellular calcium concentration in primary cultured hippocampal neurons partly through NMDA receptors and T-type calcium channels. *Neurosci Bull*, 2012, **28**(6): 715-722
 - [23] Bartlett P, He R Q. Introduction to the thematic issue "From brain function to therapy". *Sci China Life Sci*, 2014, **57**(4): 363-365
 - [24] Qiang M, Xiao R, Su T, *et al.* A novel mechanism for endogenous formaldehyde elevation in SAMP8 mouse. *J Alzheim Dis*, 2014, **40**(4): 1039-1053
 - [25] Tong Z Q, Han C S, Qiang M, *et al.* Age related formaldehyde interferes with DNA methyltransferase function, causing memory loss in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 2015, **36**(1): 100-110
 - [26] Su T, Monte W C, Hu X, *et al.* Formaldehyde as a trigger for protein aggregation and potential target for mitigation of age-related, progressive cognitive impairment. *Curr Top Med Chem*, 2016, **16**(5): 472-484
 - [27] Mei Y, Jiang C, Wan Y, *et al.* Aging-associated formaldehyde-induced norepinephrine deficiency contributes to age-related memory decline. *Aging Cell*, 2015, **14**(4): 659-668
 - [28] Lu J, Li T, He R Q, *et al.* Visualizing the microtubule-associated protein tau in the nucleus. *Sci China Life Sci*, 2014, **57**(4): 422-431
 - [29] Mo W C, Fu J P, Ding H M, *et al.* Hypomagnetic field alters circadian rhythm and increases algesia in adult male mice. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2015, **42**(7): 639-646
 - [30] 马宁. 小鼠神经行为测试组合建立及邻苯二甲酸二异丁酯对小鼠学习记忆影响的研究. 中国疾病预防控制中心营养与食品安全所, 2011
Ma N. *Chinese Center For Disease Control And Prevention*, 2011
 - [31] 刘小粉, 颜子力, 王建红, 等. 长期注射吗啡对戒断后小鼠 Y-迷宫空间识别记忆的影响. *动物学研究*, 2009, **30**(2): 199-203
Liu X F, Yan Z L, Wang J H, *et al.* *Zoological Research*, 2009, **30**(2): 199-203
 - [32] 王峰. 三七、栀子有效组分及其配伍对 APP/PS1 小鼠行为学的作用. 北京中医药大学, 2014
Wang F. *Beijing University of Chinese Medicine*, 2014
 - [33] Wu B B, Wei Y, Wang Y J, *et al.* Gavage of D-Ribose induces A β -like deposits, Tau hyperphosphorylation as well as memory loss and anxiety-like behavior in mice. *Oncotarget*, 2015, **6** (33): 34128-34142
 - [34] 吴鹏程. 火焰法原子吸收光谱仪的最佳条件设定. *计量与测试技术*, 2013, **40**(5): 32-34
Wu P C. *Metrology & Measurement Technique*, 2013, **40**(5): 32-34
 - [35] 付晶鹏. 亚磁场对小鼠运动能力的影响及机制研究. 中国科学院生物物理研究所, 2015
Fu J P. *Institute of Biophysics, Chinese academy of Sciences*, 2015
 - [36] Su T, Wei Y, He R Q. Assay of brain endogenous formaldehyde

- with 2, 4-dinitrophenylhydrazine though UV-HPLC. Progress in Biochemistry and Biophysics, 2011, **38**(12): 1171–1177
- [37] Tashev R, Stefanova M. Hippocampal asymmetry in angiotensin II modulatory effects on learning and memory in rats. Acta Neurobiol Exp(Wars), 2015, **75**(1): 48–59
- [38] Taylor C J, He R Q, Bartlett P F. The role of the N-methyl-D-aspartate receptor in the proliferation of adult hippocampal neural stem and precursor cells. Sci China Life Sci, 2014, **57**(4): 403–411
- [39] Jiang F Z, Lv J, Wang D, *et al.* Effect of 5-HT_{1A} receptors in the hippocampal DG on active avoidance learning in rats. Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi, 2015, **31**(1): 44–48
- [40] Archer T. Serotonin and fear retention in the rat. J Comp Physiol Psychol, 1982, **96**(3): 491–516
- [41] Dai J X, Han H L, Tian M, *et al.* Enhanced contextual fear memory in central serotonin-deficient mice. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, **105**(33): 11981–11986
- [42] Gusev S B, Mekhtiev A A. The role of serotonin-modulated anticonsolidation protein in memory formation in rats in a shuttle box. Zh Vyssh Nerv Dejatel Im I P Pavlova, 2012, **62**(2): 208–215
- [43] Stoothoff W H, Johnson G V. Hyperosmotic stress-induced apoptosis and tau phosphorylation in human neuroblastoma cells. J Neurosci Res., 2001, **65**(6): 573–582
- [44] Tanii H, Ankarcrona M, Flood F, *et al.* Alzheimer's disease presenilin-1 exon 9 deletion and L250S mutations sensitize SH-SY5Y neuroblastoma cells to hyperosmotic stress-induced apoptosis. Neuroscience, 2000, **95**(2): 593–601
- [45] 黄玲玲. 葡萄籽原花青素对 DOCA- 高盐诱导高血压大鼠心血管重构的保护作用及其可能机制. 安徽医科大学, 2012
Huang L L. Anhui Medical University, 2012
- [46] 李同. 高盐饮食对 Wistar 大鼠血压和左室重构的影响及替米沙坦和辣椒素干预作用. 遵义医学院, 2013
Li T. Zunyi Medical University, 2013

Chronic-dehydrated Dysmetabolism of Formaldehyde in Mouse Brain and Decline of Learning in The Shuttle Box*

LI Ting^{1,2}, SU Tao¹, HE Ying-Ge¹, HE Rong-Qiao^{1**}

⁽¹⁾ State Key Laboratory of Brain and Cognitive Science, Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;

⁽²⁾ The University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract Chronic dehydration is regarded as a common symptom of patients with age-related cognitive impairment, particularly those with Alzheimer disease. Chronic dehydration causes not only serum hyperosmotic-pressure increase, but also metabolic dysfunction of central nerve system and cognitive impairment. Here, we show the establishment of an animal model for chronic dehydration with C57 BL/6 mouse that was administrated with 4% NaCl instead of water intake for 3 months. For NaCl-fed group, serum osmotic pressure and Na⁺ concentration were significantly increased and their body weight was decreased, indicating the chronic dehydrated symptoms. The chronic dehydrated mice (fed with 4% NaCl) with a marked low level of 5-hydroxytryptamine showed slower learning in “Shuttle box” behavior assay than those fed with water as controls. Brain formaldehyde was increased following an imbalance of the activities between semicarbazide sensitive amine oxidase (SSAO) and formaldehyde dehydrogenase 3 (ADH3). To demonstrate that dysmetabolism of formaldehyde induces a low level of 5-hydroxytryptamine (5-HT) and the slow learning, formaldehyde was intraperitoneally injected to the mouse for 7 days. The results showed that formaldehyde injection leads to an elevation of 5-HT and slow-learning in shuttle box, however, 4% NaCl injection does not result in any significant differences in 5-HT and behavior assay. These data suggest that chronic dehydration in mice results in dysregulation of brain formaldehyde, which decreases the level of 5-HT and slows learning in shuttle box.

Key words chronic dehydration, shuttle box, slow learning, formaldehyde, 5-hydroxytryptamine

DOI: 10.16476/j.pibb.2016.0104

*This work was supported by a grant from The National Basic Research Program of China (2012CB911004).

**Corresponding author.

Tel: 86-10-64889876, E-mail: rongqiaohe@163.com

Received: March 26, 2016

Accepted: April 5, 2016

附 录

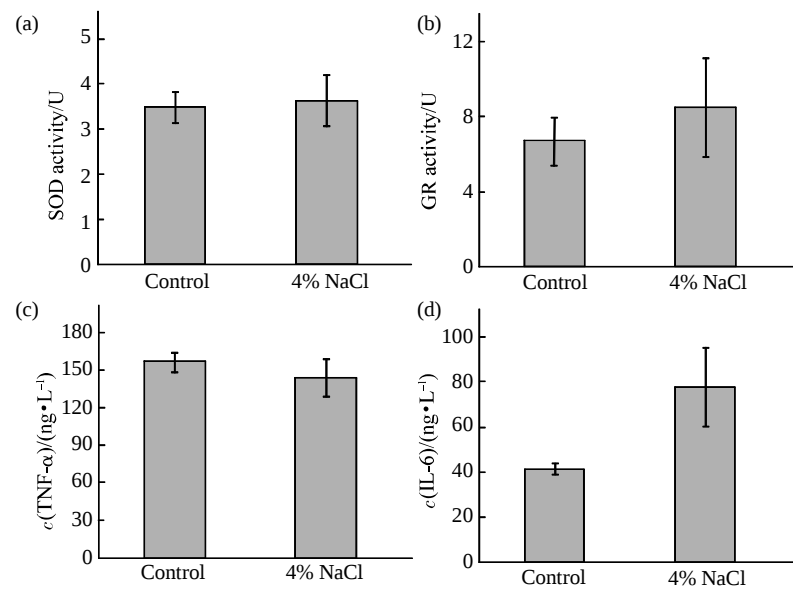


Fig. S1 Expression of serum SOD, GR, TNF- α and IL-6 in 4%NaCl drinking group

The experimental conditions of water intake were shown in Figure 1. Activities of serum superoxide dismutase (SOD, a) and glutathione reductase (GR, b) as well as concentrations of TNF- α (c) and IL-6 (d) in 4% NaCl-treated group were also measured. The data are shown as the *mean* $\pm$ *SE*.

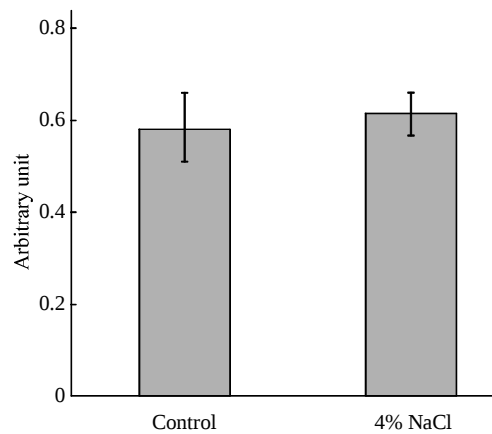


Fig. S2 Y maze test in C57 BL/6 mice with chronic dehydration

The experimental conditions of water intake were shown in Figure 1. The percentage of alteration in the Y maze was used to measure the exploration of a new environment. The data are shown as the *mean* $\pm$ *SE*.

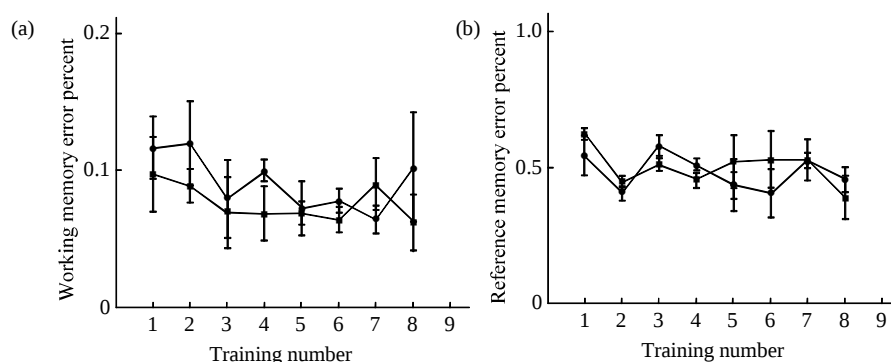


Fig. S3 Eight-arm maze test in C57 BL/6 mice with chronic dehydration

The experimental conditions of water intake were shown in Figure 1. Working memory error percentage (a) and reference memory errors percentage (b) were seen as the longitudinal axis of the index for judging the ability of learning and memory of mice. The data are shown as the *mean* $\pm$ *SE*. ■—■: Control; ●—●: 4% NaCl.

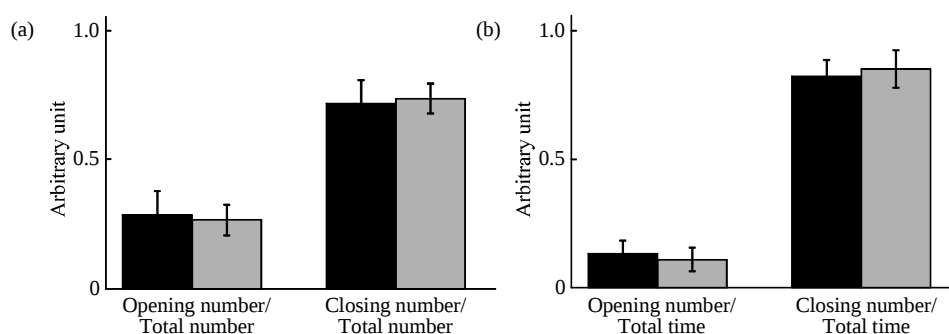


Fig. S4 Elevated plus maze in C57 BL/6 mice with chronic dehydration

The experimental conditions of water intake were shown in Figure 1. In the elevated plus-maze, the percentage of the time spent (min) in the open arms and close arms (a), the number of open arm and close arm entries (b) within 5 min was recorded. The data are shown as the *mean* $\pm$ *SE*. ■: Control; □: 4% NaCl.

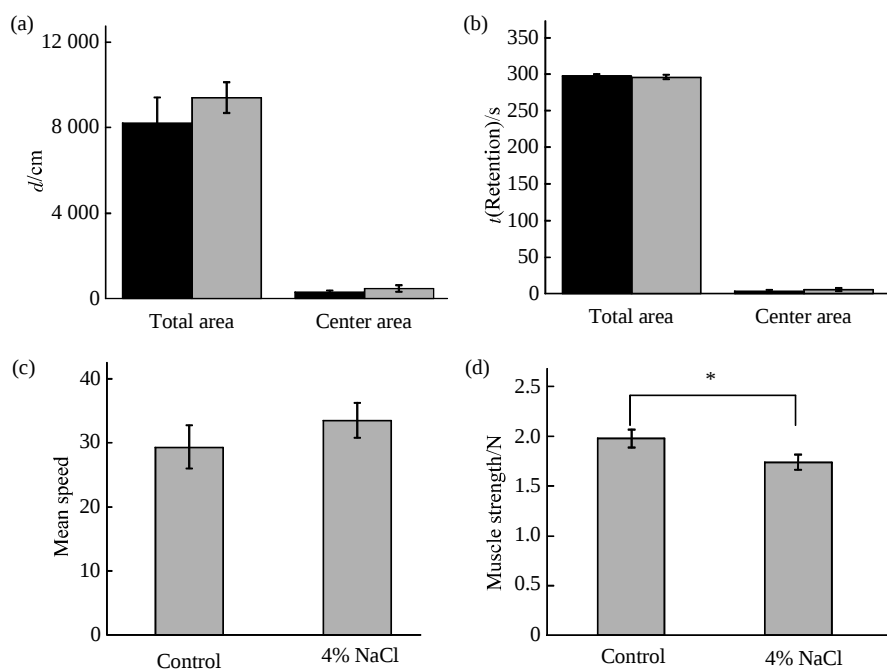


Fig. S5 Open field test and the tension of the fore legs measurement

The experimental conditions of water intake were shown in Figure 1. In open field test, the distance in central area and total area (a), the time spending in central area and total area (b). ■: Control group; □: 4% NaCl group. Movement speed (c) were recorded within 5 min. Meantime, the tension of the fore legs was detected (d). The data are shown as the *mean* $\pm$ *SE*; **P* < 0.05.

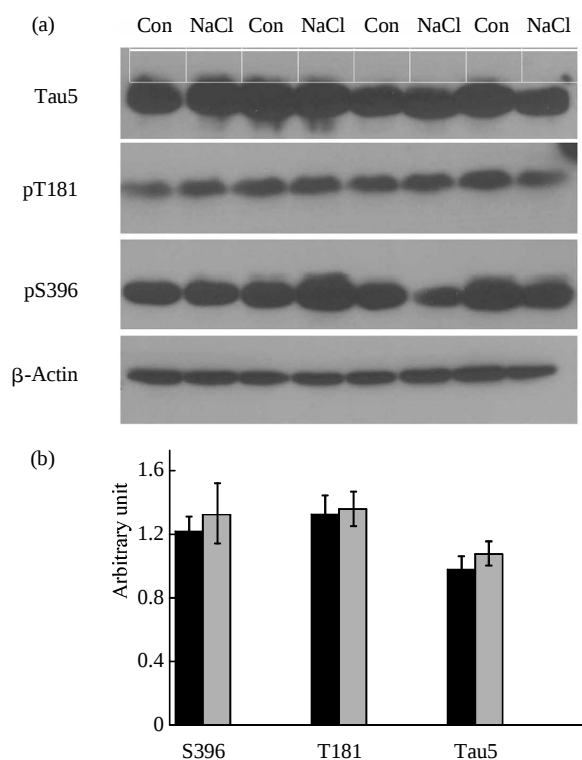


Fig. S6 Tau phosphorylation in the 4%NaCl-treated mice for three months

Conditions for the treatment were the same as for Figure 1, except that phosphorylation of Tau in brain was detected by Western blotting using anti-pT181, anti-pS396, anti-Tau-5 (a), respectively. β -Actin was used as a loading control. Quantification is shown in (b). The phosphorylation levels were expressed as the ratio between phospho-site and the total Tau staining. The data are shown as the *mean* $\pm$ *SE*. ■: Control; □: 4% NaCl.