

DOI: 10.13276/j.issn.2097-1656.2024.06.004

· 遗传发育与疾病研究专题 ·

短期超重力负荷对小鼠神经发生及空间工作记忆能力的作用分析

王建斌¹, 梁雅楠², 曹秀丽¹, 郑敏化¹ (¹空军军医大学基础医学院医学遗传与发育生物学教研室, 陕西 西安 710032; ²延安大学生命科学学院, 陕西 延安 716000)

[摘要] **目的** 分析短期超重力负荷对于小鼠大脑神经发生和空间工作记忆的影响。**方法** 将雄性 C57BL/6 小鼠随机分为对照组、9 G 超重力离心组 (9 G 组) 和 15 G 超重力离心组 (15 G 组), 每组 8 只。实验组小鼠分别在 9 G 和 15 G 离心力条件下进行离心处理, 每日 15 min, 为期 3 周。而后对各组小鼠进行水迷宫、八臂迷宫、旷场和高架十字迷宫行为学分析, 比较小鼠的空间学习和工作记忆、焦虑水平和运动功能的组间差异, 并通过免疫荧光染色技术分析小鼠大脑侧脑室下带和海马齿状回颗粒层下带的神经发生表型。**结果** 与对照组相比, 9 G 组和 15 G 组小鼠在离心处理后体质量显著下降 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 三组小鼠的各项行为学指标无统计学差异; 与对照组和 9 G 组相比, 15 G 组小鼠脑冠状切面侧脑室面积显著减小 ($P < 0.01$), 15 G 组小鼠侧脑室 CD24⁺ 的室管膜细胞数目显著减少 ($P < 0.01$); 三组小鼠侧脑室下带和海马齿状回颗粒层下带的神经发生无显著差异。**结论** 短期超重力负荷对于小鼠的神经发生、空间学习和工作记忆、焦虑水平和运动功能无显著影响, 提示短期超重力环境作用 (如短期飞行训练) 后生物体大脑具有较强的适应性和稳态维持能力, 尚能应对这种短暂的重力环境变化; 另一方面, 15 G 组小鼠侧脑室截面积显著减小且室管膜细胞数目减少, 提示高强度或长期的超重力负荷可能经由脑室缺陷损害大脑的结构和高级脑功能。

[关键词] 超重力负荷; 神经发生; 空间工作记忆; 焦虑

[中图分类号] R852.2 **[文献标志码]** A

Effects of short-term hypergravity load on adult neurogenesis and spatial working memory in mice

WANG Jianbin¹, LIANG Ya'nan², CAO Xiuli¹, ZHENG Minhua¹

¹Department of Medical Genetics and Developmental Biology, School of Basic Medical Sciences, Air Force Medical University, Xi'an 710032, China; ²School of Life Sciences, Yan'an University, Yan'an 716000, China

[Abstract] **Objective** To analyze the effects of short-term hypergravity load on adult neurogenesis and spatial working memory in mice. **Methods** Male C57BL/6 mice were randomly divided into control group, 9 G hypergravity centrifugation group (9 G group) and 15 G hypergravity centrifugation group (15 G group), with 8 mice in each group. The mice in the experimental groups were subjected to centrifugal force of 9 G or 15 G by centrifugation for 15 min a day for 3 weeks. Then, behavioral analysis of water maze, eight-arm maze, open field test and elevated plus maze test were performed to compare the differences of spatial learning and working memory, anxiety level and motor function between the groups. Immunofluorescence staining was used to analyze the neurogenesis phenotype of the subventricular zone and the subgranular zone of the hippocampal dentate gyrus. **Results** Compared with the control group, the body mass of mice in 9 G group and 15 G group decreased significantly after centrifugation ($P < 0.05$, $P < 0.01$). There were no significant differences in behavioral indicators among the three groups. Compared with the control group and the 9 G group, the coronal area of lateral ventricle in the 15 G group was significantly reduced ($P < 0.01$) and the number of CD24⁺ ependymal cells

基金项目: 陕西省自然科学基金基础研究计划项目 (2024JC-YBMS-155); 空军军医大学医学重大问题科技攻关项目 (2020ZTC03)

作者简介: 王建斌, 硕士研究生, 从事跨膜蛋白 Ttyh1 通过星形胶质细胞调控胶质母细胞瘤进展的作用及机制研究, Tel:18394325217, E-mail: wangjianbin202207@163.com

通信作者: 郑敏化, Tel:15319722995, E-mail: zhengmh@fmmu.edu.cn

网络首发: <https://link.cnki.net/urlid/61.1526.R.20240508.1110.002> (2024-05-08)

in the lateral ventricle of the 15 G group was significantly decreased ($P < 0.01$). There was no significant difference in the neurogenesis of the subventricular zone and the subgranular zone of the dentate gyrus in the hippocampus among the three groups. **Conclusion** Short-term hypergravity load has no significant effect on neurogenesis, spatial learning and working memory, anxiety level and motor function in mice, suggesting that the mammalian brain has strong adaptability and homeostatic maintenance capacity after short-term hypergravity load (such as short-term flight training), and can still cope with such transient changes of gravity environment. On the other hand, the coronal area of lateral ventricle and the number of ependymal cells decreased significantly in the 15 G group, suggesting that high intensity or long-term hypergravity load may damage brain structure and higher brain functions through ventricular defects.

[Key words] hypergravity load; neurogenesis; spatial working memory; anxiety

成体神经发生是大脑中成体神经干细胞产生分化型后裔细胞的过程。研究表明,这一过程与大脑组织稳态维持、成体记忆的形成和巩固、认知和情绪等方面密切相关。相应地,神经发生过程失调或受损则可能导致记忆能力衰退、认知障碍、情绪和精神障碍等^[1],严重影响到个体的作业能力。

现代高性能战斗机具有灵活机动的特点,其所产生的持续性正加速度具有增长快(6 G/s)、G值高(>9 G)、持续时间长(15~45 s)并可反复出现的特点。因此,军事飞行员在飞行过程中会间断性、重复性地暴露在超高重力环境中^[2]。既往研究表明,超重力环境可引起生物体认知功能下降,如新物体识别能力的降低^[3]。在体外研究中,超重力处理PC12神经元样细胞后,其神经突长度显著增加,表明超重力作用可能诱导神经元加速分化^[4];另一项研究也表明超重力处理促进了间充质干细胞的神经分化^[5]。然而,超重力作用对于体内神经发生与分化的作用仍不清楚。

成体哺乳动物的神经发生局限于两个特定区域:侧脑室的室下带(subventricular zone, SVZ)^[6]和海马齿状回的颗粒层下带(subgranular zone, SGZ)^[7-8]。在这两个微环境中,神经干细胞和前体细胞并非单一的类型,而是由不同发育阶段的细胞群组成,并存在动态且连续的状态转化过程^[9]。在SVZ区域,神经干细胞被称为B型细胞,在激活后分裂产生短暂增殖态细胞(C型细胞),进而产生神经母细胞(A型细胞)^[10]。在啮齿类动物脑中,神经母细胞沿吻侧迁移流向嗅球迁移,并在嗅球分化成熟为 γ -氨基丁酸能中间神经元,整合至神经网络。因此,SVZ神经发生对啮齿类动物的各项嗅觉功能非常重要,例如气味辨别和嗅觉学习记忆^[11]。人类SVZ的神经发生研究表明,神经母细胞并不迁移至嗅球中,而是迁移到纹状体中产生新的神经元^[12]。最近的研究表明纹状体在进化中的体积扩大与现代人类认知功能的增强有关,因此维系纹状体体积的成体神经发生是认知灵活性的必要条件^[13]。在海马SGZ区,神经干细胞呈现放射状胶

质样细胞形态(也称为I型细胞),I型细胞在激活后产生中间祖细胞(II型细胞),再经过几次增殖后产生神经母细胞(III型细胞)。神经母细胞沿着SGZ切向迁移,并发育成未成熟神经元,径向迁移到颗粒细胞层,终末分化为齿状回颗粒神经元^[14]。大量的研究揭示SGZ的神经发生与学习记忆、焦虑抑郁等情绪的发生发展密切相关^[15]。新近的研究表明,去甲肾上腺素通过维持海马神经发生水平来调控生物个体的空间工作记忆^[16]。综上,成体SVZ和SGZ的神经发生过程是个体认知和情绪形成的重要参与者^[17-18]。

考虑到飞行员的作业效能与空间工作记忆、认知能力及精神情绪状态密切相关^[2,19],而上述方面均受到大脑成体神经发生的调控作用,本研究将通过短期超重力离心模拟飞行中加速度负荷,探索超重力对小鼠神经发生的作用,以及对空间工作记忆及焦虑情绪的影响。上述研究期望能够以模式生物上的研究结果为提示,为飞行员适应性训练提供重要的参考依据,为飞行员认知和情绪的评价与防护提供研究基础,提高飞行员的飞行安全和工作效能。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 8~10周龄健康雄性C57BL/6小鼠24只,小鼠体质量20~25 g。动物饲养条件控制在12 h照明/12 h黑暗环境,温度24℃,湿度40%~50%,自由饮水和进食。本研究中使用的所有动物实验程序均按照空军军医大学实验动物福利与伦理委员会批准的方案进行(许可证号:20241207),符合《实验动物管理条例》相关规定。

1.1.2 实验试剂 OCT冷冻包埋剂(Sakura,日本);40 g/L多聚甲醛组织固定液(塞维尔生物,中国);牛血清白蛋白(Sigma-Aldrich,美国)。抗体及稀释比例:Anti-Sox2(兔源性,1:400,Abcam,英国);Anti-GFAP(羊源性,1:1 000,Abcam,英国);Anti-Doublecortin(DCX,兔源性,1:400,Abcam,英国);

Anti-EGFR (兔源性, 1:400, Abcam, 英国); Anti-CD24 (大鼠源性, 1:400, BD Pharmingen, 美国); Anti-Ki67 (兔源性, 1:400, Millipore, 美国); Anti-N-Cadherin (小鼠源性, 1:1 000, BD Bioscience, 美国); Anti-Tbr2 (兔源性, 1:400, Abcam, 英国); CY3 标记二抗 (驴抗小鼠, 1:500, Jackson ImmunoResearch, 美国); CY2 标记二抗 (驴抗羊, 1:500, Jackson ImmunoResearch, 美国); CY3 标记二抗 (驴抗兔, 1:500, Jackson ImmunoResearch, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 短期超重力离心动物模型建立 选择 24 只 8~10 周龄 C57BL/6 雄性小鼠, 随机分为对照组、9 G 超重力离心组 (9 G 组) 和 15 G 超重力离心组 (15 G 组), 每组 8 只。对照组小鼠不做离心处理, 离心组小鼠分别设置在 9 G 和 15 G 离心力条件下进行离心实验, 每日选在相同时段, 每只小鼠离心 15 min, 为期 21 d^[20]。

1.2.2 水迷宫实验 实验流程参照 VORHEES 等^[21]的方法: 实验过程包括 5 d 平台隐藏训练期和 1 d 无平台测试期。在训练期, 将水池分为 4 个象限, 分别用 NW、NE、SW、SE 命名。平台高度低于水平面 0.5~1.0 cm 左右, 在所有隐藏平台期内平台位置固定。每日每只小鼠进行 4 次实验, 平台放在第三象限, 从第一象限开始, 依次将小鼠面朝水池壁放入水中。小鼠在水中自由探索 1 min, 超过 1 min 未找到平台, 则引导小鼠到平台并让小鼠在平台上停留 15 s。每只小鼠两次下水的时间间隔不少于 20 min。在测试期撤去平台, 将小鼠放入第一象限, 记录小鼠运动过程进行分析。

1.2.3 旷场实验 实验流程参照 ANTIRIO 等^[22]方法。测试前 1 h, 三组小鼠运送到行为学实验室适应环境。打开软件设置分组并打开实时视频, 从鼠笼中取出实验小鼠并放在旷场箱的中心区域。实验人员离开旷场箱周围以免干扰到小鼠。用软件开始分析, 让小鼠在旷场箱里自由活动 10 min。软件实时记录小鼠的行为活动以及相应时间。停止分析并保存录像, 将小鼠从旷场箱中移出并放回鼠笼。在进行下一只小鼠的实验之前, 用 750 mL/L 乙醇和纸巾清洁整个旷场箱区域。

1.2.4 高架十字迷宫 实验流程参照 KNIGHT 等^[23]方法。三组小鼠提前 1 h 运送到行为学实验室适应环境, 减少动物紧张。实验开始前, 清洁高架十字迷宫。打开软件设置分组并打开实时视频, 将小鼠背向实验员放在高架十字迷宫的中央区域, 小鼠面向开臂, 实验员迅速离开, 实验时长 5 min。每次动物实验完成后

清除动物在迷宫内遗留下来的尿液、粪便等。打开动物行为分析软件, 跟踪小鼠在高架十字迷宫内的轨迹运动, 计算各项指标。

1.2.5 八臂迷宫 实验流程参照 KURZINA 等^[24]的方法。开始实验前禁食 24 h, 此后每日训练结束后限制性地给予正常食料。实验开始前, 8 个臂均放置面包屑作为奖励, 在 7 d 的实验期间, 所有动物都在 8 臂放射状迷宫中进行训练, 每日 1 次, 行为任务为只进入一次放有食物的迷宫臂。每次训练开始时, 小鼠被放在迷宫中心, 计时 5 min; 若小鼠在时限内进入过包含奖励的 8 个臂, 则提前结束, 未全部进入 8 个臂的小鼠按时限终止; 测试期间再次进入同一臂被认为是错误。观察小鼠的行为, 记录它们进入每个臂的次数和停留时间。

1.2.6 小鼠脑组织取材 行为学实验结束后进行小鼠脑组织取材。10 g/L 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉后固定四肢, 用 750 mL/L 乙醇消毒小鼠胸腹部, 逐层剪开小鼠皮肤及肋骨, 暴露心脏。剪开小鼠右心房, 用镊子固定心脏, 用头皮针穿刺左心室, 当有落空感后固定针头, 使用 40 mL PBS 溶液缓慢灌注, 将小鼠血液冲出。小鼠肝脏褪色证明灌注成功。逐层剪开头皮, 沿颅缝剪开颅骨, 暴露出脑组织。离断脊髓, 分离脑神经, 小心取出脑组织。用 OCT 包埋脑组织, 液氮急冻后置于 -80 °C 冰箱中保存待用。

1.2.7 免疫荧光染色 使用 Leica CM1500 冰冻切片机将脑组织按照 14 μ m 厚度切片, 贴于载玻片上。在组织载玻片上滴加 40 g/L 多聚甲醛, 室温固定 15 min, PBS 溶液清洗 3 次, 每次 5 min。100 mL/L 马血清封闭 1 h, 在切片上滴加一抗 4 °C 孵育过夜。PBS 清洗一抗, 共洗 3 次, 每次 5 min。在组织上滴加二抗, 室温避光孵育 2 h。PBS 清洗二抗, 共洗 3 次, 每次 5 min。在组织上滴加 Hoechst 稀释液 (1:5 000), 室温孵育 15 min 后用 750 g/L 甘油进行封片, 封片后切片在 -20 °C 冰箱内避光保存。

1.2.8 统计学分析 采用 ImageJ 进行细胞计数和荧光面积统计, 采用 GraphPad Prism 8 软件进行数据分析和作图。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两多重比较采用 Bonferroni 的多重比较检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 短期超重力离心后小鼠体质量变化

本研究采用短期超重力离心法, 在 9 G 和 15 G 条件下对小鼠进行离心处理, 建立短期超重力负荷的动物模型。在造模期间, 每隔 3 d 对小鼠体质量进行一

次称量。造模结束后,通过对比分析发现,与对照组相比,经过9 G和15 G离心处理的小鼠体质量均出现了显著下降($P < 0.01$),而在9 G和15 G两组之间,小鼠的体质量变化并未展现出明显的统计学差异(图1A)。此外,本研究还对三组小鼠脑质量进行了

统计学分析,结果显示,在对照组、9 G组和15 G组之间,小鼠脑质量并未展现出统计学上的显著差异(图1B~C)。这表明,在短期的超重力离心处理下,虽然小鼠体质量有所减轻,但其脑组织质量并未受到明显影响。

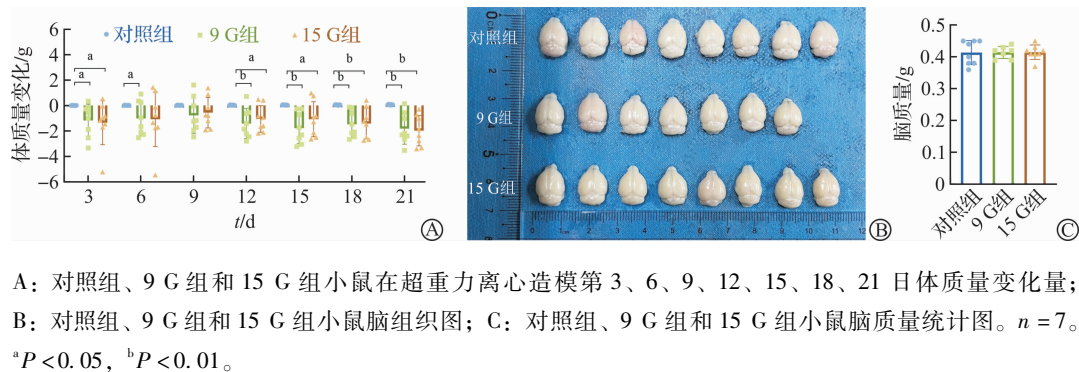


图1 短期超重力离心对小鼠体质量和脑质量的影响

2.2 短期超重力离心对小鼠空间学习和空间工作记忆的影响

造模结束后,本研究运用水迷宫实验对三组小鼠的空间学习和记忆能力进行评估。实验数据表明,随着训练天数的递增,三组小鼠总路程和潜伏期均呈现减少的趋势。然而,在每日测试中,三组小鼠总路程和总时间并未展现出显著差异(图2A~B)。在测试期,穿越平台次数、第三象限路程/总路程和第三象限时间/总时间这三个关键指标在三组小鼠之间也未发现显著差异(图2C~E),代表性轨迹图见图2F。除水迷宫实验外,本研究进一步通过八臂迷宫对三组

小鼠的空间工作记忆能力进行深入研究。在八臂迷宫实验任务中,三组小鼠在各项评价指标上均未显示出显著差异,包括潜伏期、工作记忆错误次数、总入臂次数、中央区滞留时间、总运动距离及总静止时间(图3A~F),代表性轨迹和热图见图3G~H。值得注意的是,与对照组相比,9 G组和15 G组小鼠总运动距离有下降的趋势,总静止时间则有增加的趋势(图3E~F),提示增加G值或长期超重力处理可能会对小鼠空间工作记忆产生显著影响。以上结果表明,短期超重力离心处理对小鼠的空间学习和空间工作记忆能力并未产生显著影响。

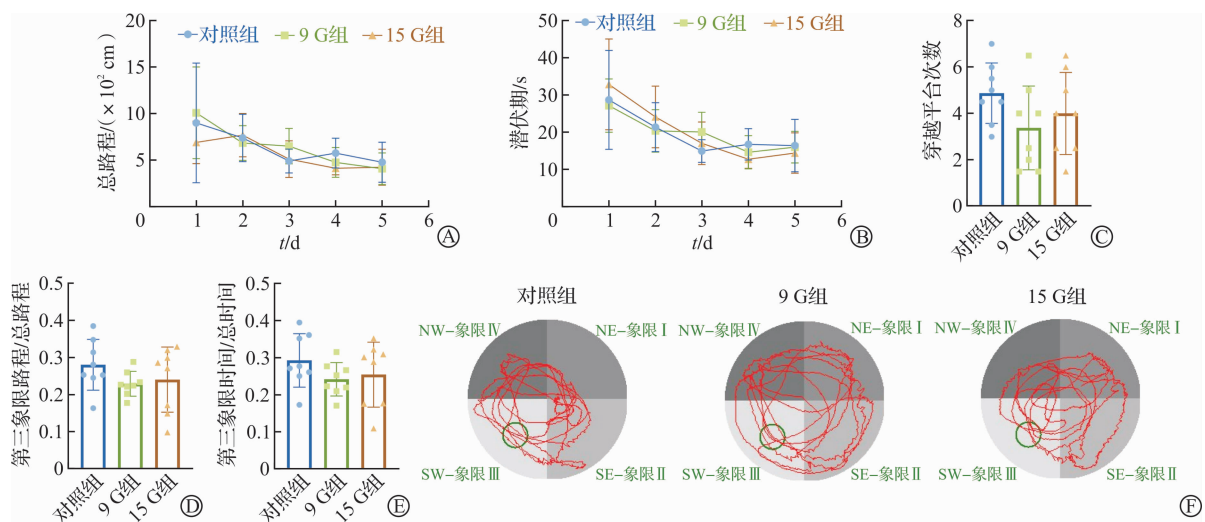
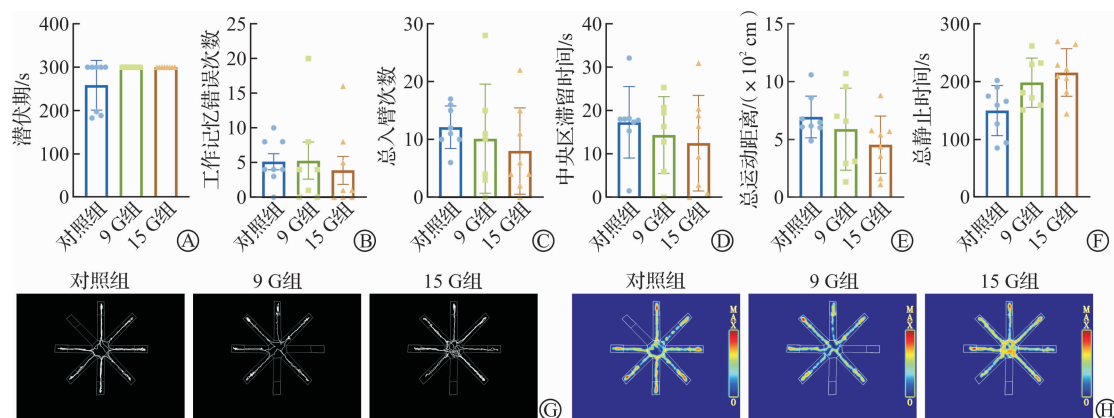


图2 对照组、9 G组和15 G组小鼠水迷宫实验各项指标分析



A: 潜伏期统计图; B: 工作记忆错误次数统计图; C: 总入臂次数统计图; D: 中央区滞留时间统计图; E: 总运动距离统计图; F: 总静止时间统计图; G: 八臂迷宫实验小鼠代表性轨迹图; H: 八臂迷宫实验小鼠代表性热图。n = 7。

图3 对照组、9 G 组和 15 G 组小鼠八臂迷宫实验各项指标分析

2.3 短期超重力离心对小鼠焦虑水平和运动能力的影响

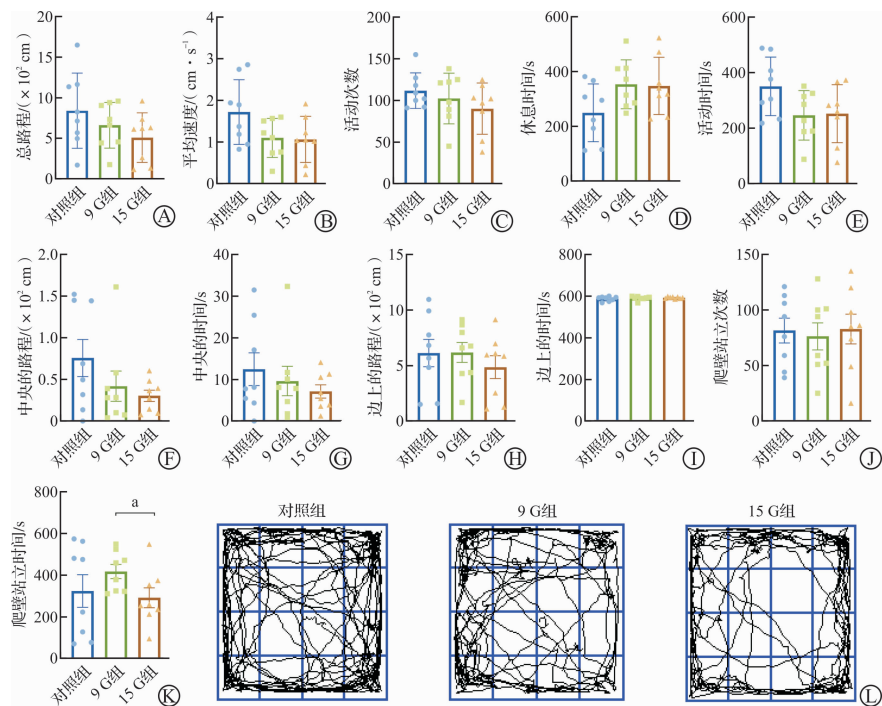
在对小鼠的空间学习和工作记忆进行评估后,本研究进一步通过旷场实验评估短期超重力离心对小鼠焦虑水平和运动功能的影响。在旷场实验中,本研究观察到三组小鼠在除爬壁站立时间外的其余指标上并未展现出显著差异(图4A~J),代表性轨迹如图4L所示。综合考虑其他指标,我们认为9 G组和15 G组间在爬壁站立时间上所呈现的差异不足以说明两组小鼠在焦虑水平上存在显著差异(图4K)。因此,统计学结果表明,短期超重力离心对小鼠焦虑水平和运动能力并未产生显著影响。另一方面,我们发现与对照组相比,9 G组和15 G组小鼠的总路程、平均速度、活动次数、活动时间、中央的路程和时间以及边上的路程均存在下降的趋势(图4A~C, 4E~H),而休息时间则有增加的趋势(图4D),提示更高的超重力强度或长期暴露可能会导致小鼠焦虑水平的增加以及运动能力的降低。然而,考虑到旷场实验在评估焦虑水平方面存在一定的局限性,我们进而采用高架十字迷宫来评估短期超重力离心对小鼠焦虑水平的影响。实验结果显示,三组小鼠在总路程、平均速度、总进臂次数等关键指标上无显著统计学差异(图5A~E, 5G~N),代表性轨迹如图5O所示。此外,9 G组和15 G组在开臂进入次数上虽存在统计学差异,但参照其他各项指标,此差异不足以说明9 G组和15 G组小鼠在焦虑水平上存在显著差异(图5F)。综合以上结果,短期超重力离心对小鼠焦虑水平和运动能力并未产生显著影响。

2.4 15 G 组小鼠冠状面侧脑室面积和 CD24 阳性室管膜细胞数目显著降低

行为学实验结果表明,经过短期超重力离心处理

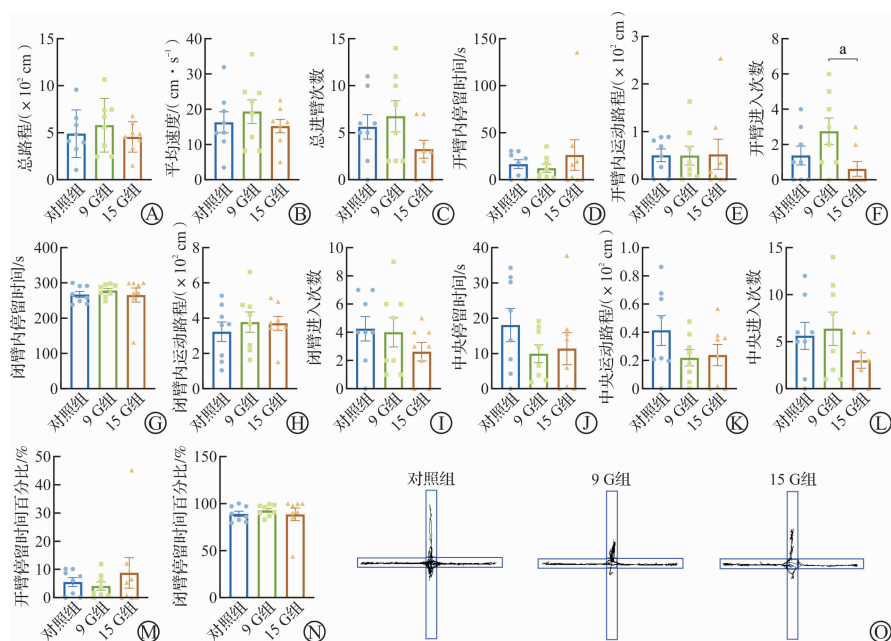
后三组小鼠的空间学习和工作记忆、焦虑水平和运动功能方面未展现出显著差异。为了进一步探究超重力对小鼠大脑组织形态是否存在影响,本研究采用免疫荧光染色技术对三组小鼠大脑的解剖学结构进行观察(图6A)。观察结果显示,在冠状面切片中,与对照组和9 G组相比,15 G组小鼠侧脑室面积显著减少($P < 0.01$,图6B),而在9 G组和对照组小鼠之间,冠状切面侧脑室面积虽无统计学差异,但9 G组小鼠冠状面侧脑室面积相较于对照组呈现出减少的趋势(图6B)。基于这些观察结果,我们推测超重力作用可能会导致小鼠侧脑室体积减小。值得注意的是,MARSHALL-GOEBEL等^[25]研究表明,在长期太空飞行过程中,失重状态会导致宇航员大脑侧脑室体积增加。然而,关于重力环境变化如何具体影响大脑侧脑室体积,以及侧脑室体积变化对大脑功能产生的潜在影响,目前仍缺乏明确的认识。

室管膜细胞排列在侧脑室的边缘,对脑脊液的产生与调节起到关键作用。为了更深入地了解超重力对侧脑室的影响,本研究还对侧脑室区域的室管膜细胞进行了染色观察。实验结果表明,与对照组相比,15 G组小鼠大脑侧脑室CD24⁺的室管膜细胞数目显著减少($P < 0.01$,图6C~D)。在成年小鼠的侧脑室区域,室管膜细胞通过黏附连接组成单层细胞屏障,将神经发生区域与脑脊液分隔开^[26]。为了探究超重力处理后SVZ区域室管膜细胞间的黏附连接是否发生缺陷,本研究通过N-Cadherin免疫荧光染色进行观察(图6E)。统计学分析表明,三组小鼠SVZ区域N-Cadherin阳性荧光面积无显著差异(图6F),提示短期超重力离心对SVZ区域室管膜细胞的黏附连接可能并未产生显著影响。



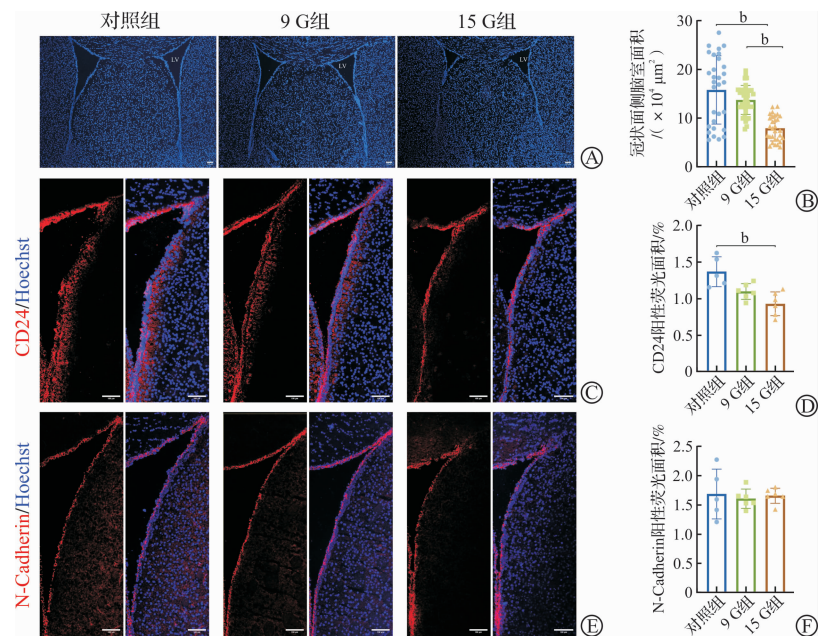
A: 总路程统计图; B: 平均速度统计图; C: 活动次数统计图; D: 休息时间统计图; E: 活动时间统计图; F: 中央的路程统计图; G: 中央的时间统计图; H: 边上的路程统计图; I: 边上的时间统计图; J: 爬壁站立次数统计图; K: 爬壁站立时间统计图; L: 旷场实验小鼠代表性轨迹图。n=8。^aP<0.05。

图4 对照组、9 G 组和 15 G 组小鼠旷场实验各项指标分析



A: 总路程统计图; B: 平均速度统计图; C: 总进臂次数统计图; D: 开臂内停留时间统计图; E: 开臂内运动路程统计图; F: 开臂进入次数统计图; G: 闭臂内停留时间统计图; H: 闭臂内运动路程统计图; I: 闭臂进入次数统计图; J: 中央停留时间统计图; K: 中央运动路程统计图; L: 中央进入次数统计图; M: 开臂停留时间百分比统计图; N: 闭臂停留时间百分比统计图; O: 高架十字迷宫小鼠代表性轨迹图。n=8。^aP<0.05。

图5 对照组、9 G 组和 15 G 组小鼠高架十字迷宫各项指标分析



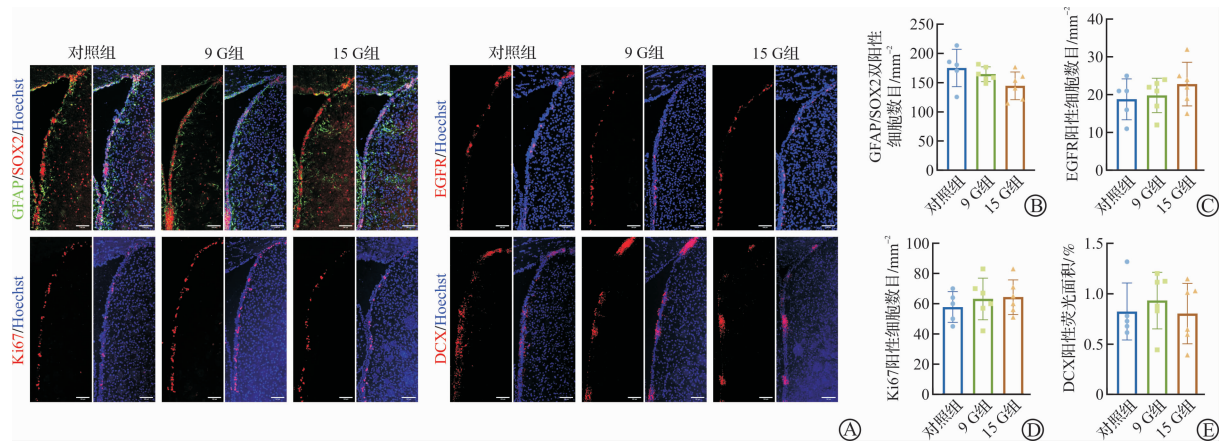
A: 侧脑室冠状面切片的 Hoechst 染色显示脑组织与脑室结构; B: 冠状面侧脑室面积统计图; C: SVZ 区域 CD24 阳性室管膜细胞免疫荧光染色结果; D: CD24 阳性荧光面积统计图; E: SVZ 区域 N-Cadherin 阳性黏附免疫荧光染色结果; F: N-Cadherin 阳性荧光面积统计图。SVZ: 侧脑室的室下带。 $n=5$ 。标尺为 $100 \mu\text{m}$ 。 $^b P < 0.01$ 。

图 6 短期超重力离心对侧脑室和室管膜细胞的影响

2.5 短期超重力离心对于小鼠神经发生无显著影响

既往研究已经充分证实,室管膜细胞在大脑神经发生过程中起着至关重要的作用^[27]。本研究进而对三组小鼠 SVZ 区域神经发生进行染色观察。根据文献[10],本研究确定在 SVZ 区域中,以 GFAP/SOX2 双阳性作为 B 型放射状胶质样细胞的标志,EGFR 阳性作为

C 型短暂增殖态细胞的标志,DCX 阳性作为 A 型神经母细胞的标志。实验结果表明,对照组、9 G 组和 15 G 组小鼠大脑 SVZ 区域 GFAP/SOX2 双阳性细胞、Ki67 阳性细胞、EGFR 阳性细胞和 DCX 阳性细胞数目并无显著统计学差异 (图 7A ~ E)。

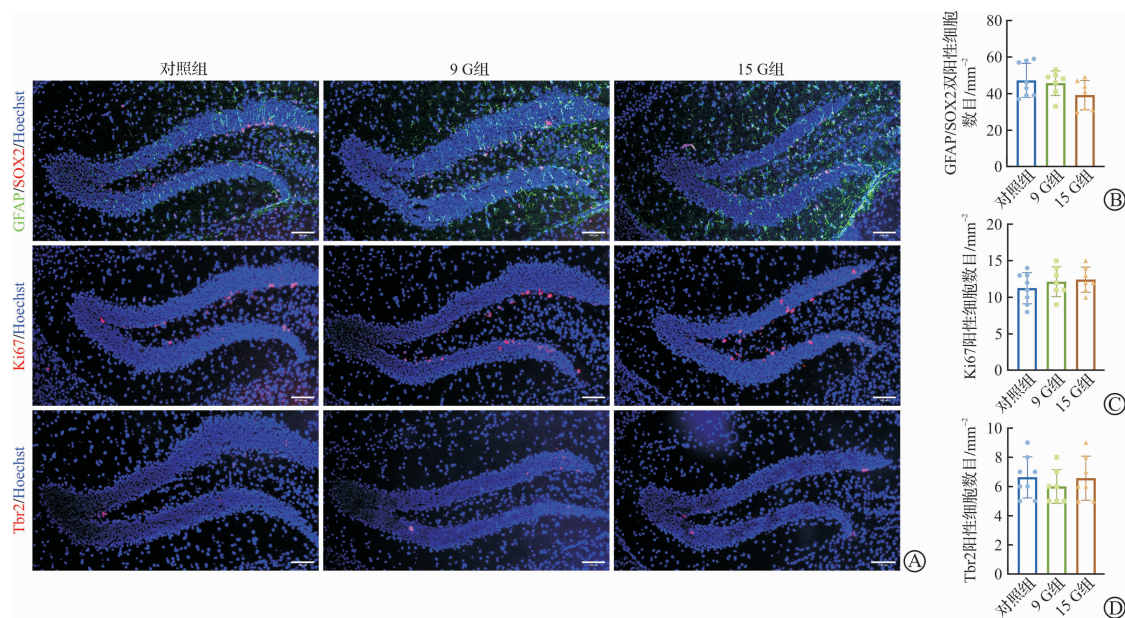


A: SVZ 区域放射状胶质样细胞、短暂增殖态细胞和神经母细胞免疫荧光染色结果; B: GFAP/SOX2 双阳性细胞数目统计图; C: EGFR 阳性细胞数目统计图; D: Ki67 阳性细胞数目统计图; E: DCX 阳性荧光面积统计图。SVZ: 侧脑室的室下带。 $n=5$, 标尺为 $100 \mu\text{m}$ 。

图 7 SVZ 区域神经干细胞及各型前体细胞免疫荧光染色结果

为了进一步探索超重力对成体神经发生的影响,本研究进而分析了与学习、记忆和情绪紧密相关的SGZ区域神经发生表型。基于文献[14],本研究以GFAP/SOX2双阳性作为I型放射状胶质样细胞的标志,将Tbr2阳性作为II型中间祖细胞的标志。其中,小鼠海马齿状回区域的Tbr2阳性细胞数目在出生后

随着年龄的增加而逐渐减少^[28]。实验结果表明,在SGZ区域,三组小鼠的GFAP/SOX2双阳性细胞、Ki67阳性细胞和Tbr2阳性细胞数目之间也无显著统计学差异(图8A~D),这一结果与SVZ区域观察到的现象一致,进一步证实了短期超重力离心对小鼠的神经发生过程没有显著影响,与之前的行为学实验结果相吻合。



A: SGZ区域放射状胶质样细胞、Ki67阳性细胞、中间祖细胞免疫荧光染色结果; B: GFAP/SOX2双阳性细胞数目统计图; C: Ki67阳性细胞数目统计图; D: Tbr2阳性细胞数目统计图。SGZ: 颗粒层下带。
n=7。标尺为100 μm。

图8 SGZ区域神经干细胞及各型前体细胞免疫荧光染色结果

3 讨论

在飞行员日常训练中,间断性、重复性暴露于高G值力学环境是一个普遍现象。高G值对飞行员大脑功能的影响一直备受关注。既往研究表明,过高的G值刺激可能导致飞行员出现脑血流量减少、脑氧代谢率下降、视觉障碍乃至意识丧失等现象^[2,29],严重威胁飞行安全。此外,飞行员的认知能力、情绪及心理状态与作业能力及飞行效能密切相关。然而,关于高G值对飞行员认知与情绪的具体影响尚未完全揭示,亟待深入研究以揭示其潜在作用。

鉴于飞行员日均暴露于高G值的时间相对有限,研究短期高G值负荷对大脑认知与情绪的影响具有重要的现实意义。本研究通过超重力离心模拟高G值暴露,将24只小鼠随机分为对照组、9G组和15G组。随后,利用水迷宫、八臂迷宫、旷场和高架十字迷宫等行为学实验,评估三组小鼠的空间学习和工作记忆、焦虑水平和运动功能。实验结果表明,相较于对照组,9G组和15G组小鼠在行为学表现上无显著差

异。此外,本研究还通过免疫荧光染色技术,深入探讨了三组小鼠SVZ和SGZ区域的神经发生情况。与体外超重力刺激能够促进神经分化^[4-5]不同,本实验结果显示三组小鼠SVZ和SGZ区域神经干细胞及其后裔分化细胞数目均无显著差异,与行为学实验结果相吻合,表明短期超重力离心并不能促进体内神经干细胞分化。然而,值得注意的是,与对照组和9G组相比,15G组小鼠脑冠状面侧脑室面积和室管膜细胞数目显著减少,表明短期超重力作用下脑室结构的改变。既往研究表明,太空飞行任务中失重环境导致脑脊液在大脑中重新分布,从而使得大脑侧脑室体积增加^[25],而本研究中的超重环境导致了脑室减小,结论存在较好的对应性。但超重力作用通过何种方式影响侧脑室体积目前仍不清楚,未来需要更多的研究去揭示其生物学作用及机制。

室管膜细胞作为一层上皮细胞,排列在大脑的脑室壁上,其纤毛的协调运动对调节脑脊液动力学至关重要。这种动力学调节对于神经干细胞功能、神经发生以及清除大脑中的废物和毒素具有关键作用^[30]。短

期超重力离心导致的室管膜细胞数目减少可能影响大脑的可塑性。另一方面,侧脑室作为大脑中充满脑脊液的腔室,对维持大脑正常功能起到关键作用。侧脑室体积的变化可能影响脑脊液的流动和循环,进而影响营养物质的运输和代谢废物的清除^[31]。这些变化可能对大脑的代谢和神经信号传递产生深远影响,进一步影响小鼠的行为和认知功能。

综上所述,本研究表明短期超重力离心并不会对小鼠的空间学习和工作记忆能力、焦虑水平、运动功能和神经发生产生显著影响,提示哺乳动物大脑能够应对这种短暂的重力环境变化,具有较高的适应性和稳态维持能力。然而,15 G 组小鼠侧脑室冠状截面积和室管膜细胞数目的显著减少提示我们,如果继续提高 G 值或延长高 G 值暴露时间,超重力负荷很可能经由脑室缺陷损害大脑的结构和高级脑功能。因此,未来的研究需要进一步探索不同时间尺度、G 值上限暴露对大脑结构和功能的影响,从而为飞行员适应性训练提供重要的科学依据,为飞行员抗 G 负荷中脑功能的维护保驾护航。

【参考文献】

- [1] ANACKER C, HEN R. Adult hippocampal neurogenesis and cognitive flexibility—linking memory and mood[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2017, 18(6): 335–346.
- [2] GREEN N D, FORD S A. G-induced loss of consciousness: retrospective survey results from 2 259 military aircrew[J]. *Aviat Space Environ Med*, 2006, 77(6): 619–623.
- [3] LEE J, JANG D, JEONG H, et al. Impairment of synaptic plasticity and novel object recognition in the hypergravity-exposed rats[J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 15813.
- [4] GENCHI G G, CIALDAI F, MONICI M, et al. Hypergravity stimulation enhances PC12 neuron-like cell differentiation[J]. *Biomed Res Int*, 2015, 2015: 748121.
- [5] TERANISHI M, KUROSE T, NAKAGAWA K, et al. Hypergravity enhances RBM4 expression in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and accelerates their differentiation into neurons[J]. *Regen Ther*, 2023, 22: 109–114.
- [6] LLEDO P M, ALONSO M, GRUBB M S. Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2006, 7(3): 179–193.
- [7] MING G L, SONG H J. Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions[J]. *Neuron*, 2011, 70(4): 687–702.
- [8] GAGE F H, TEMPLE S. Neural stem cells: generating and regenerating the brain[J]. *Neuron*, 2013, 80(3): 588–601.
- [9] BOND A M, MING G L, SONG H J. Adult mammalian neural stem cells and neurogenesis: five decades later[J]. *Cell Stem Cell*, 2015, 17(4): 385–395.
- [10] LIM D A, ALVAREZ-BUYLLA A. The adult ventricular-subventricular zone (V-SVZ) and olfactory bulb (OB) neurogenesis[J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2016, 8(5): a018820.
- [11] BRAGADO ALONSO S, REINERT J K, MARICHAL N, et al. An increase in neural stem cells and olfactory bulb adult neurogenesis improves discrimination of highly similar odorants[J]. *EMBO J*, 2019, 38(6): e98791.
- [12] ERNST A, ALKASS K, BERNARD S, et al. Neurogenesis in the striatum of the adult human brain[J]. *Cell*, 2014, 156(5): 1072–1083.
- [13] ERNST A, FRISÉN J. Adult neurogenesis in humans—common and unique traits in mammals[J]. *PLoS Biol*, 2015, 13(1): e1002045.
- [14] KUHN H G, TODA T, GAGE F H. Adult hippocampal neurogenesis: a coming-of-age story[J]. *J Neurosci*, 2018, 38(49): 10401–10410.
- [15] LI Y D, LUO Y J, CHEN Z K, et al. Hypothalamic modulation of adult hippocampal neurogenesis in mice confers activity-dependent regulation of memory and anxiety-like behavior[J]. *Nat Neurosci*, 2022, 25(5): 630–645.
- [16] GULINO R, NUNZIATA D, DE LEO G, et al. Hippocampal noradrenaline is a positive regulator of spatial working memory and neurogenesis in the rat[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(6): 5613.
- [17] CONOVER J C, TODD K L. Development and aging of a brain neural stem cell niche[J]. *Exp Gerontol*, 2017, 94: 9–13.
- [18] APPLE D M, FONSECA R S, KOKOVAY E. The role of adult neurogenesis in psychiatric and cognitive disorders[J]. *Brain Res*, 2017, 1655: 270–276.
- [19] 周悦, 王超贤, 吴迪, 等. 工作记忆训练对飞行情境意识提升的实证研究[J]. *空军军医大学学报*, 2023, 44(2): 151–155.
- [20] 沈娱汀, 傅昭粤, 宋云, 等. +15 Gz 重复暴露 7 d 对小鼠学习记忆功能和心理状态的影响[J]. *空军军医大学学报*, 2022, 43(1): 26–30, 35.
- [21] VORHEES C V, WILLIAMS M T. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory[J]. *Nat Protoc*, 2006, 1(2): 848–858.
- [22] ANTIOIRIO A T, ALEMÁN-LAPORTE J, ZANATTO D A, et al. Mouse behavior in the open-field test after meloxicam administration[J]. *J Am Assoc Lab Anim Sci*, 2022, 61(3): 270–274.
- [23] KNIGHT P, CHELLIAN R, WILSON R, et al. Sex differences in the elevated plus-maze test and large open field test in adult Wistar rats[J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2021, 204: 173168.
- [24] KURZINA N P, ARISTOVA I Y, VOLNOVA A B, et al. Deficit in working memory and abnormal behavioral tactics in dopamine transporter knockout rats during training in the 8-arm maze[J]. *Behav Brain Res*, 2020, 390: 112642.
- [25] MARSHALL-GOEBEL K, MACIAS B R, KRAMER L A, et al. Association of structural changes in the brain and retina after long-duration spaceflight[J]. *JAMA Ophthalmol*, 2021, 139(7): 781–784.
- [26] NELLES D G, HAZRATI L N. Ependymal cells and neurodegenerative disease: outcomes of compromised ependymal barrier function[J]. *Brain Commun*, 2022, 4(6): fcac288.
- [27] DENG S Y, GAN L, LIU C, et al. Roles of ependymal cells in the physiology and pathology of the central nervous system[J]. *Aging Dis*, 2023, 14(2): 468–483.
- [28] LIU W, CREWS F T. Persistent decreases in adult subventricular and hippocampal neurogenesis following adolescent intermittent ethanol exposure[J]. *Front Behav Neurosci*, 2017, 11: 151.
- [29] FRESNEL E, DRAY G, PLA S, et al. Cerebral oxygenation responses to aerobic flight[J]. *Aerosp Med Hum Perform*, 2021, 92(10): 838–842.
- [30] SPASSKY N, MEUNIER A. The development and functions of multiciliated epithelia[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2017, 18(7): 423–436.
- [31] ATCHLEY T J, VUKIC B, VUKIC M, et al. Review of cerebrospinal fluid physiology and dynamics: a call for medical education reform[J]. *Neurosurgery*, 2022, 91(1): 1–7.

(2024-03-18 收稿; 2024-04-30 修回)

(编辑: 袁天峰)