

封面：

分类号_____

密级_____

U D C_____

编号_____

厦 门 大 学

博 士 后 研 究 工 作 报 告

油酰乙醇胺通过促进海马神经发生改善脑缺血后认知功能障碍

杨立朝

工作完成日期 2015年11月13日

报告提交日期 2015年11月

厦门大学

2015年11月

油酰乙醇胺通过促进海马神经发生改善脑缺血后认知功能障碍

**oleoylethanolamide improves spatial cognitive deficits through
enhancing hippocampal neurogenesis after cerebral ischemia**

博 士 后 姓 名 杨立朝

流动站（一级学科）名称 生物学

专 业（二级学科）名称 药理学

研究工作起始时间：2013 年 10 月

研究工作期满时间：2015 年 11 月

厦 门 大 学

2015 年 11 月

厦门大学博士后研究报告
著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用博士后研究报告的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交该报告的纸质版和电子版，有权将该报告用于非赢利目的的少量复制并允许该报告进入学校图书馆被查阅，有权将该报告的内容编入有关数据库进行检索，有权将博士后研究报告的标题和摘要汇编出版。保密的博士后研究报告在解密后适用本规定。

本研究报告属于： 1、保密（ ）， 2、不保密（）

纸本在 年解密后适用本授权书；

电子版在 年解密后适用本授权书。

（请在以上相应括号内打“√”）

作者签名： 日期： 年 月 日

导师签名： 日期： 年 月 日

摘 要

我们先前的研究表明油酰乙醇胺（OEA）对急性脑缺血损伤具有神经保护作用。本研究的目的是探讨 OEA 对脑缺血引起的空间认知障碍，海马长时程增强作用（LTP）的抑制作用和海马神经发生的影响。结果表明：OEA 30 mg/kg 显著改善大鼠脑缺血后空间认知功能障碍，促进海马长时程增强。另外，我们证实 OEA 通过促进海马神经发生改善脑缺血后的认知障碍。进一步的研究表明，OEA 明显增加海马组织脑源性神经营养因子（BDNF）和过氧化物酶体增殖活化受体（PPAR α ）的表达。我们的研究证实 OEA 可通过加强海马神经发生改善脑缺血后的认知功能障碍，为 OEA 临床应用于脑卒中的治疗提供了进一步的理论依据。

关键词：油酰乙醇胺；大鼠局灶性脑缺血；空间认知功能；海马神经发生

Abstract

Oleoylethanolamide (OEA) has been shown to have neuroprotective effects after acute cerebral ischemic injury. The aim of this study was to investigate the effects of chronic OEA treatment on ischemia-induced spatial cognitive impairments, electrophysiology behavior and hippocampal neurogenesis. Daily treatments of 30 mg/kg OEA significantly ameliorated spatial cognitive deficits and attenuated the inhibition of long-term potentiation (LTP) in the middle cerebral artery occlusion (MCAO) rat model. Moreover, OEA administration improved cognitive function in a manner associated with enhanced neurogenesis in the hippocampus. Further study demonstrated that treatment with OEA markedly increased the expressions of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and peroxisome proliferator-activated receptors α (PPAR α). Our data suggest that chronic OEA treatment can exert functional recovery of cognitive impairments and neuroprotective effects against cerebral ischemic insult in rats via triggering of neurogenesis in the hippocampus, which supports the therapeutic use of OEA for cerebral ischemia.

Keywords: Oleoylethanolamide; Rats Focal cerebral ischemia; Spatial cognitive function; Hippocampal neurogenesis

目 录

前 言.....	1
材料与amp;方法.....	4
结 果.....	15
1. OEA 改善脑缺血后的认知障碍.....	15
2. OEA 改善缺血诱导的 LTP 损伤.....	15
3. OEA 促进神经前体细胞的增殖.....	16
4. OEA 促进神经前体细胞的存活.....	16
5. OEA 促进新生神经元的生成和突触可塑性.....	17
6. OEA 通过促进海马神经发生改善认知障碍.....	17
7. OEA 促进 BDNF、PPAR α 的表达，抑制 cleave-PARP1 的活性.....	18
讨 论.....	27
小 结.....	31
参考文献.....	33
致 谢.....	38
博士生期间发表的学术论文、专著.....	39
博士后期间发表的学术论文、专著.....	40
承担基金情况.....	41
个人简历.....	42
联系地址.....	43

缩写	英文全名	中文名称
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor	脑源性生长因子
BrdU	Bromodeoxyuridine	溴脱氧尿苷
Caspase	Cystein-asparate protease	半胱氨酸天冬氨酸水解酶
CCA	Common carotid artery	颈总动脉
CNS	Centralnervous system	中枢神经系统
CREB	cAMP-responsive element protein	cAMP 反应元件结合蛋白
D	Day	天
DG	Dentate gyrus	齿状回
ECA	Extrenal carotide artery	颈外动脉
EGF	Epidermalgrowth factor	表皮生长因子
GAP-43	Growth associated protein-43	生长相关蛋白-43
GCL	Granular cell layer	颗粒细胞层
GFAP	Glial fibrillary acidic protein	神经胶质原纤维蛋白
GSK-3 β	Glycogen synthase kinase-3 β	糖原合成激酶 3 β
h	hour	小时
ICA	Internal carotid artery	颈内动脉
OEA	Oleoylethanolamide	油酰乙醇胺
MAPK	Mitogen-activated protein kinase	促分裂原活化蛋白
MCAO	Middle cerebral artery occlusion	大脑中动脉栓塞
min	minute	分钟
NeuN	Neuronal Nuclei	神经细胞核
LTP	long-term potentiation	突触传递长时程增强
SDS	Sodium dodecyl sulphate	十二烷基磺酸钠
SEM	Standard error of the means	标准误差
SGZ	Subgranular zone	齿状回颗粒下区
SYP	Synaptophysin	突触囊泡蛋白
TBST	Tris buffered solution tween	Tris-tween 缓冲液
TTC	2'3'5'-Triphenyltetrazolium Chloride	2'3'5'-三苯基氯化四氮唑

前 言

国内外越来越多的研究证实, 卒中后的脑损伤不仅涉及神经元, 还包括血管、胶质细胞等组织与细胞。因此, 卒中后的神经修复与功能重建必须运用整体的观念系统考虑神经发生、血管新生和胶质细胞反应等综合因素。大量的研究表明, 在脑卒中发生后的损伤脑区有神经元新生 (neurogenesis), 血管增生 (angiogenesis) 和神经胶质细胞的增殖 (astrogliosis)。神经发生和血管发生过程中, 周围神经和血管紧密缠绕, 血管供应神经氧和血液, 神经调控血管的舒张和收缩并有助于免疫反应^[1]; 神经和血管的前体细胞有相同的信号转导途径和基因信息通路, 共同影响神经和血管的前体细胞分化成特异性的细胞亚型和时空分布规律。缺血区新血管形成的 VEGF 和 bFGF, 刺激内源性神经发生^[2]。体内及体外实验发现, 神经干细胞来源的 NO 诱导内皮细胞血管内皮生长因子 (VEGF) 和脑源性生长因子 (BDNF) 表达的增加, 后两者则通过与受体 VEGFR2 和 TrkB 的作用促进神经干细胞中 NO 的产生及干细胞的增殖^[3]。神经发生和血管新生促进血脑屏障的恢复^[4]。以上研究提示, 缺血后神经损伤的修复不独立依赖于神经血管单位的某一成分, 而是神经与血管之间的相互作用与影响直接决定了神经功能的恢复。

脑缺血破坏了神经血管单元的神经功能稳态, 而内源性物质及外源性药物可以通过增强神经血管因子的表达, 促进神经发生和血管新生, 恢复和重构神经血管稳态, 这个过程我们称之为神经血管网络重构。神经血管网络重构是“神经血管单元”这个概念在脑损伤后治疗和康复过程中干预靶点的具体化。脑缺血本身可以促进神经发生和血管新生, 然而这个自发应激修复过程很微弱, 不足以恢复脑损伤后的神经血管稳态^[5]。神经血管网络重构强调通过外源性药物等增强脑缺血后内源性神经血管网络重构, 从而达到修复脑损伤改善神经功能的作用。

油酰乙醇胺 (Oleylethanolamide, OEA) 是一种天然存在于组织和循环血液中的脂肪酸乙醇胺类化合物 (fatty acid ethanolamides, FAEs)。在兴奋性脑损伤如脑外伤后, 脑内的神经元释放 OEA, 且发挥明显的神经保护作用, 其机制可能部分与其抑制谷氨酸能神经递质的释放有关^[6]。研究者用高效液相/质谱分析

的方法测定了脑梗死患者脑组织内 OEA 释放的水平，结果发现中风引发 OEA 大量释放，且主要集中在脑缺血原发灶的周边区^[7]。近两年关于 OEA 的研究取得了很好的进展，如 2010 年 Ainhoa Plaza-zabla 的研究证实 OEA 改善 N, a-二甲-3,4-甲烯二氧苯乙胺引起的认知障碍^[8]；2012 年 Syed SK 等发现 OEA 是 GPR119 受体的内源性配体^[9]；2013 年 Ramiro González-Aparicio 等发现在小鼠帕金森模型中 OEA 可拮抗 6-OH-DA 诱导的神经毒性，而且这种保护作用是通过激动 PPAR α 受体^[10]；2013 年 Suleimani YM 等报道 OEA 引起的浓度和内皮依赖性动脉血管舒张，机制可能与抑制 Ca²⁺释放及产生 NO 有关^[11]；2013 年 Melis M 等报道 OEA 激动 PPAR α 阻断尼古丁诱发的多巴胺神经元的兴奋性，影响与依赖性相关的行为活动^[12]。2014 年 Ramiro González-Aparicio 等报道 OEA 通过抑制 TRPV1 受体改善 6-OH-DA 引起的运动障碍^[10]。

活性小分子 OEA 是核受体 Peroxisome Proliferator-Activated Receptor alpha(PPAR α)高亲和内源性激动剂^[13]。研究发现 PPAR α 参与脑缺血后的神经保护作用机制，PPAR α 激动药非诺贝特可明显减少小鼠大脑中动脉阻塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)后脑梗死体积，并且这种保护作用不依赖于其外周降脂效应，而与其直接激动 PPAR α 受体，减轻脑缺血后的氧化应激反应，抑制 VCAM 和 ICAM 的表达，减轻炎症反应有关^[14, 15]。PPAR α 的另一种人工合成激动剂 Wy-14643 也有助于减轻神经元内的氧化应激损伤^[15]，减少脑梗死体积，并可抑制 HO-1, iNOS 及 ICAM-1 等炎症分子的表达^[15]。PPAR α 除了参与脑缺血的神经保护作用以外，也有研究报道 PPAR α 受体参与乙酰胆碱的生物合成^[16]，激活 PPAR α 可促进学习记忆能力，促进海马神经发生抑制小胶质细胞活化^[17]。PPAR α 可以通过上调 VEGF 的表达促进体内外血管新生^[18, 19]。但目前对 PPAR α 在卒中后神经发生、血管新生中的作用尚没有报道，其在脑缺血中的功能仍需进一步明确。

目前脑卒中药物研发的关键问题是动物实验有效而临床应用无效。随着人口的老齡化，脑卒中的高发病率、高致残率和高死亡率居高不下，是威胁人类健康的三大主要疾病之一，全球每年约有 1500 万人患脑卒中，我国每年新增脑卒中患者 250 万人，死亡 100 万患者。国内外围绕缺血后神经元的损伤与修复机制进行了大量的研究并取得了一定的进展，虽然研制了许多神经保护药物，但无一例

能够达到有效的临床治疗效果。因此,应用外源性药物促进神经发生和血管新生,恢复和重构神经血管稳态是卒中治疗的新策略。本文主要探讨 OEA 是否促进卒中后神经血管稳态重构,并对相关分子机制进一步探讨,从全新的角度寻求有效治疗脑卒中损伤的新途径,为促进脑卒中新药的研发提供了一个新思路。

厦门大学博硕士论文摘要库

材料与方法

1. 实验动物

健康 Sprague-Dawley (SD) 雄性大鼠，体重 270-320 g，SPF 级，购于中国医学科学院实验动物中心。手术前后单独饲养，室温保持 23-25℃，光照周期 12 h，为正常昼夜节律自由饮水和饮食。所有模型制备手术均在 SPF 级实验室完成，手术器械均严格消毒，全部操作在无菌条件下进行。术后动物均饲养于同样的环境。

2. 药品试剂及溶液配制：

2.1 药品与试剂

油酰乙醇胺 (OEA)，由本课题组合成，纯度 > 99% (NMR 及 HPLC-MS 测定)。

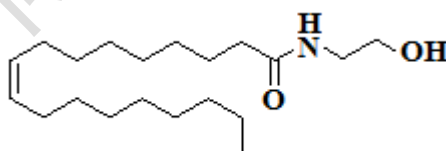


Fig. Chemical structure of OEA

水合氯醛

国药集团

多聚甲醛

国药集团

蔗糖

广州化学试剂厂

甲醇

国药集团

30%过氧化氢

国药集团

细胞裂解液

美国 CST 公司

Acr/Bis 溶液

美国 Invitrogen 公司

蛋白上样缓冲液	美国 Invitrogen 公司
BCA 试剂盒	中山剑桥
PVDF 膜	美国 Minipore 公司
rat monoclonal anti-BrdU	美国 Abcam 公司
mouse anti-NeuN	美国 Millipore 公司
rabbit anti-GFAP	美国 Sigma 公司
Alexa Fluor 594 donkey anti-rat IgG	美国 Invitrogen 公司
Alexa Fluor 488 donkey anti-mouse IgG	美国 Invitrogen 公司
Alexa Fluor 488 donkey anti-rabbit IgG	美国 Invitrogen 公司
GAP-43	美国 CST 公司
SYN	美国 CST 公司
mouse monoclonal anti- β -actin	美国 CST 公司
BDNF	美国 CST 公司
PPAR α	美国 CST 公司
Cleave-PARP1	美国 CST 公司
标准分子量蛋白 Marker	美国 CST 公司

2.2 溶液配制

(1) 0.01M PBS (pH 7.40): NaCl 8.0 g, KCl 0.2 g, KH₂PO₄ 0.24 g, NaHPO₄·12H₂O 3.63 g, pH 调至 7.40, 加双蒸水定容至 1 L。

(2) 3%蔗糖 4%多聚甲醛固定液: 取 700 ml PBS (pH 7.40), 加热至 75℃, 称取 40 g 多聚甲醛和 30 g 蔗糖加入到 PBS 中, 保持 75℃并同时搅拌, 用巴斯德吸管加入数滴 1N NaOH 至清亮, 用 PBS 定容至 900 ml, 过夜降至室温, 1 N HCl 调 PH 值至 7.30-7.40, 定容至 1 L, 室温保存。

(3) 30%蔗糖 4%多聚甲醛固定液: 取 700 ml PBS (PH 7.40), 加热至 75℃, 称取 40 g 多聚甲醛和 300 g 蔗糖加入到 PBS 中, 保持 75℃并同时搅拌, 用巴斯德吸管加入数滴 1N NaOH 至清亮, 用 PBS 定容至 900 ml, 过夜降至室温, 1N HCl 调 PH 值至 7.30-7.40, 定容至 1 L, 室温保存。

(4) 丽春红溶液: 0.5 g 丽春红溶解于 1 ml 冰醋酸中, 加双蒸水定容至 100 ml, 临用前配制。

(5) 考马斯亮蓝染料溶液: 0.5 g 考马斯亮蓝 R-250, 90 ml 甲醇, 90 ml 双蒸水, 20 ml 冰醋酸, 溶解, 过滤后 4℃ 保存。

(6) 0.01 M HEPES (pH 8.0): 0.2383 g HEPES, 加少量双蒸水溶解, 用 1 N NaOH 调 pH 值至 8.0, 定容至 100 ml。

- (7) 30%凝胶储备液: 29 g 丙烯酰胺, 1 g N, N-亚甲基双丙烯酰胺, 溶于 60 ml 双蒸水中, 加热至 37°C, 溶解, 定容至 100 ml。用 0.45 μm 滤膜过滤。pH 应小于 7.0。避光, 置棕色瓶中, 4°C 保存。
- (8) 10%SDS: 10 g SDS 溶于 90 ml 双蒸水中, 加热至 68°C 助溶, 1 N NaOH 调 pH 值至 7.20, 定容至 100 ml, 室温保存。
- (9) 10%过硫酸铵: 0.1 g 过硫酸铵溶解于 1 ml 双蒸水, 临用前配制。
- (10) 1.5 M Tris-HCl (pH 8.80): 在 800 ml 水中溶解 181.65 g Tris 碱, 用浓盐酸调 pH 值至 8.80, 定容至 1 L, 分装, 高压灭菌。
- (11) 1.0 M Tris-HCl (pH 6.80): 在 800 ml 水中溶解 121.09 g Tris 碱, 用浓盐酸调 pH 值至 6.80, 定容至 1 L, 分装, 高压灭菌。
- (12) 15%分离胶溶液: 双蒸水 4.6ml, 30%丙烯酰胺 10 ml, 1.5 M Tris-HCl (pH 8.80) 5.0 ml, 10%SDS 0.2ml, 10%过硫酸铵 0.2ml, TEMED 0.008 ml。
- (13) 5%积层胶溶液: 双蒸水 5.5ml, 30%丙烯酰胺 1.3ml, 1.5M Tris-HCl (pH 8.80) 1.0ml, 10%SDS 0.08 ml, 10%过硫酸铵 0.08 ml, TEMED 0.008 ml。
- (14) 0.5 M EDTA (pH 8.00)储备液: 称取 186.1 g EDTA-2Na, 溶于 800 ml 双蒸水中, 在磁力搅拌器上剧烈搅拌, NaOH 颗粒调 pH 值至 8.00, 定容至 1 L, 分装, 高压灭菌。
- (15) 2 \times SDS 凝胶加样缓冲液: 称取 Tris 碱 1.21 g, 加入 15 ml 双蒸水, 浓盐酸调 pH 值至 6.8, 加入 SDS 4 g, 溴酚蓝 0.2 g, 甘油 20 ml, 加水至 40 ml, 临用前加入 DTT (终浓度为 200 mM), 定容至 50 ml。
- (16) 5 \times (Tris-甘氨酸电泳缓冲液): 称取 7.55 g Tris 碱, 47 g 甘氨酸, 25 ml 10% SDS, 加双蒸水定容至 500 ml。
- (17) 转移缓冲液: 称取 2.9 g 甘氨酸, 5.8 g Tris, 0.37 g SDS, 200 ml 甲醇, 加双蒸水定容至 1 L。
- (18) TBS: 称取 Tris 碱 6.057 g, 加水 400 ml 溶解, 浓盐酸调 pH 至 7.5, 加 NaCl 4.5 g, 加双蒸水定容至 500 ml。
- (19) TBST: 含 0.05% Tween-20 的 TBS。
- (20) 洗脱液: 3 g 甘氨酸, 19ml 1 N HCl, 2 ml 10%SDS, 2 ml Tween-20, 加双蒸水定容至 200 ml。
- (21) DAB 显色液: 12 mg DAB 溶于 0.05 M Tris-HCl(pH 7.6)缓冲液 20 ml, 再加入 30%的 H₂O₂ 20 μl 。
- (22) Aprotinin 储存液: 1 mg Aprotinin 溶解于 1 ml 0.01M HEPES(pH 8.00)中, 分装, -20°C 保存。
- (23) Leupeptin 储存液: 1 mg Leupeptin 溶解于 1 ml 双蒸水中, 分装, -20°C 保存。

(24) 10 mM PMSF: 87 mg PMSF 溶解于 5 ml 异丙醇中, 分装, -20°C 保存。

3. 仪器设备

仪器名称	生产厂家
BP121S 型电子天平	德国 Sartorius 公司
CC1-K6 型循环控温水浴	德国 HUBER 公司
CO ₂ 培养箱	日本 Sanyo 公司
ECLIPSE T1-S	日本 Nikon 公司
FW-4000 正置荧光显微镜	德国 Leica 公司
JY92-2D 型超声破碎仪	宁波新芝生物科技股份有限公司
LAS-3000 型凝胶成像系统	日本 Fuji film 公司
MLS-3750 高压灭菌锅	日本 SANYO 公司
MI900 型冰冻切片机	德国 Leica 公司
PB-10 型酸度计	德国 Sartorius 公司
SDS-PAGE 凝胶电泳系统	北京百晶生物技术有限公司
TS-1 型振荡仪	海门市其林贝尔仪器制造有限公司
Ultra-Turrax T 25 型组织匀浆机	德国 Janke & Kunkel 公司
101-1AB 型电热鼓风干燥箱	天津泰斯特仪器有限公司
3k15 型低温高速离心机	德国 Sigma 公司
-80 度冰箱	美国 Revco 公司
90-2 型恒温磁力搅拌器	上海振荣科学仪器有限公司
全自动酶标仪	美国 Molecular Devices 公司
全自动荧光酶标仪	美国 Molecular Devices 公司
湿转电转仪	北京六一仪器厂
纯水仪	美国 Millipore 公司
Morris 水迷宫自动监控仪	中国医学科学院药物研究所
脑立体定位仪	美国 Stoeking 公司
TDT RX7-5 处理器	Tucker-Davis Technologies
TDT RA16PA 前置放大器	Tucker-Davis Technologies

4. 实验方法

4.1 动物分组

动物分为 Sham 组、Model 组和 OEA 组, OEA 组大鼠脑缺血后第 8 d 开始

给予 OEA (30 mg/kg); Sham 组和 Model 组大鼠给予等体积溶媒。

4.1.1 OEA 对大鼠 MCAO 后神经前体细胞增殖的影响

动物在处死前连续两天，每天两次给予 BrdU (50 mg/kg)，分别在脑缺血后 14d、42 d 和 48 d 处死动物灌流取脑组织，采用免疫荧光法，western blot 法检测 OEA 对 MCAO 大鼠海马齿状回区域 (DG) 神经前体细胞增殖、分化和突触可塑性的影响。

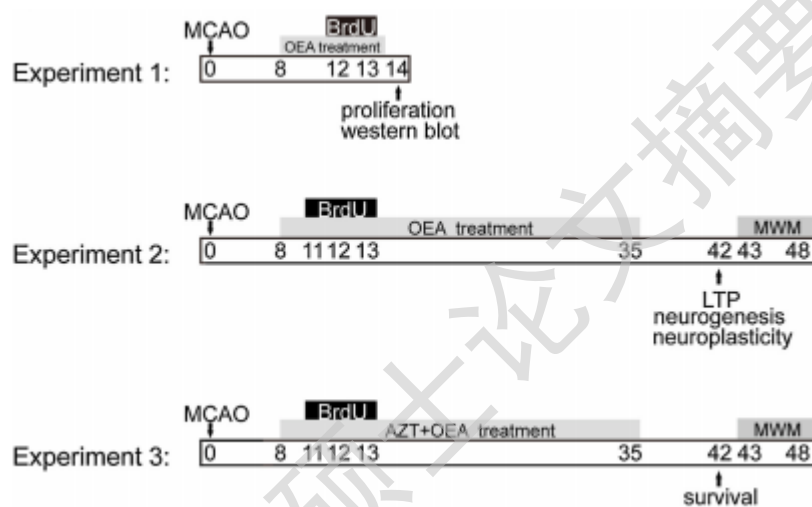


Fig. 1. Experimental design. Time points represent days after MCAO induction. BrdU (50 mg/kg i.p.) was given twice daily during days 12–13. BrdU immunohistochemistry was performed on day 14 after MCAO. In experiment 2, rats received BrdU twice daily during days 11–13 after MCAO, immunohistochemistry was performed on day 42 after MCAO, and the water maze test was performed during days 43–48 after MCAO. In experiment 3, ZAT was administered during the period of OEA treatment (day 8–35), immunohistochemistry was performed on day 42 after MCAO, the water maze test was performed during days 43–48 after MCAO.

4.2 大鼠暂时性大脑中动脉阻塞模型 (tMCAO)

按照 Longa 等的方法制备 tMCAO 模型[20, 21]。大鼠用 10%水合氯醛麻醉(350 mg/kg, i.p.)，体温维持在 $37\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ ，仰卧位固定于手术台上。沿颈正中线切开皮肤，仔细分离右侧颈总动脉 (CCA)，颈外动脉 (ECA)，颈内动脉 (ICA)。将

ECA 结扎剪断，拉直与 ICA 成一直线。在 ECA 上剪开一小口，将一根长 4.0 cm，直径 0.26 mm 的圆头硅化尼龙线由此开口插入 ICA 约 1.85-2.00 cm，至大鼠大脑前动脉起始处，阻断大脑中动脉的血流供应。缝合手术切口，动物放回鼠盒。大脑中动脉阻塞缺血 2 h 后，轻柔抽出硅化尼龙线进行缺血后再灌注。全部过程中室温保持在 23-25°C。

4.3 神经功能缺失评分

再灌后 24 h，参照 Bederson 5 分法[22]：正常为 0 分；对侧上肢不能完全伸展为 1 分；向对侧推时抵抗力下降为 2 分；提尾时向对侧转圈为 3 分；自动转圈为 4 分；无自发性活动、意识障碍为 5 分。

4.4 水迷宫

Morris 水迷宫主要由一金属圆柱形水池(池高 60 cm，直径 120 cm)和自动显示、监测、记录装置及安全岛(直径 10 cm 的平台)组成。预先在水池中注入清水，在诸如墨水使池水成为不透明的黑色，水面高出平台 15 cm。这样动物不能通过听、视和嗅觉到达平台,以便检测动物对空间位置的敏感性。水温保持 20-22°C，水池分为 4 个象限(东、南、西、北)，平台置于西北象限的中心。每只大鼠的游泳活动通过电视仪进行监测，数据连于计算机进行处理分析。水迷宫实验前 5 天为定位航行实验，每只大鼠每天接受 2 次训练寻找平台，两次分别半随机地从两个方向头朝向池壁入水，每次训练间隔 5 min，记录找到平台的时间(潜伏期)和所经过的路程总和(累计路程)。如果大鼠在 90 s 内未找到平台,则潜伏期以 90s 计算。无论在 90 s 内找到平台与否，大鼠都在平台上停留 15 秒。最后一次训练结束后，进行探索实验，移去平台，大鼠自由游泳 90 秒寻找平台，记录其在每个象限花费的时间和路程。

4.5 LTP 试验

麻醉大鼠海马长时程增强(LTP)的诱发和记录方法

1. 大鼠的固定和立体定位

大鼠腹腔注射乌拉坦(1.2 g/kg)麻醉后，固定于脑立体定位仪上。剪开头部暴露其颅骨，去除骨膜，用 3%过氧化氢涂抹项骨表面使其骨缝清晰。依据大鼠脑立体定位图谱，使用立体定位仪确定前、海马区穿通纤维通路(PP，前肉后 7.5

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.