论著

文章编号:1000-5404(2006)08-0804-03

环境刺激对缺氧缺血性脑损伤大鼠海马巢蛋白表达及学习记忆的影响

鲁利群,赵聪敏,蒲昭霞 (第三军医大学新桥医院儿科,重庆 400037)

提 要: 目的 研究不同环境刺激对缺氧缺血性脑损伤(hypoxic-ischemic brain damage, HIBD)新生大鼠海马巢蛋白(nestin)表达以及学习记忆能力的影响。**方法** 按Rice法制备7日龄SD大鼠HIBD模型,随机分为3组:丰富环境组(enriched environment, EE)、贫瘠环境组(impoverished environment, IE)和标准环境组(standard environment, SE)。另设假手术组。各组大鼠于术后第1天开始分别给予不同环境刺激。术后第28天,通过Morris水迷宫实验测试学习记忆能力,免疫组织化学染色检测海马nestin的表达。**结果** 在学习记忆能力上,IE组明显差于假手术组、SE组和EE组,SE组差于假手术组和EE组,假手术组和EE组无显著差异。海马nestin免疫组织化学染色结果显示,EE组大鼠表达强于假手术组、SE组和IE组,SE组强于假手术组和IE组。**结论** 丰富环境刺激可以增加海马nestin的表达,促进神经再生,改善学习记忆能力,而贫瘠环境刺激却使海马nestin表达减少,阻碍神经再生,加重学习记忆能力的损害。

关键词: 脑缺血;脑缺氧;环境;巢蛋白;学习记忆

中图法分类号: R338.64;R339.5;R742 **文献标识码**: A

Effects of different environment stimulation on nestin expression in rat hippocampus after hypoxic-ischemic brain damage

LU Li-qun, ZHAO Cong-min, PU Zhao-xia (Department of Pediatrics, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: **Objective** To observe the effects of different environment stimulation on the nestin expression in hippocampus and the ability of learning and memory of rats after hypoxic-ischemic brain damage (HIBD). **Methods** Rat HIBD models were established by the method of Rice in 45 SD rats, then randomly divided into three groups: standard environment stimulation group (SE), enriched environment stimulation group (EE), and impoverished environment stimulation group (IE). Another 15 rats only underwent sham-operation. Different environment intervention that was designed according to Puurunen and Bourgeon's literatures was applied to the rats on day 2 after HIBD operation. On day 28, Morris water maze was used to evaluate the ability of learning and memory. Then the nestin expression in the hippocampus was measured by immunohistochemistry. **Results** The ability of learning and memory of IE group reduced and was much lower than that of sham-operation group, SE group and EE group, that of SE group was lower than that of sham-operation group and EE group, but no significant difference between sham-operation group and EE group. Immunohistochemical analysis showed that nestin expression in the hippocampus of EE group significantly increased as compared with that of other groups and that of SE group was stronger than that of sham-operation group and IE group. **Conclusion** The EE stimulation could increase the nestin expression in the hippocampus of neonatal rats with HIBD, enhance neuranagenesis, and improve the ability of learning and memory, while the IE stimulation could decrease the nestin expression, inhibit neuranagenesis, and impair the ability of learning and memory.

Key words: cerebral ischemia; cerebral hypoxia; environment; nestin; learning and memory

缺氧缺血性脑损伤(hypoxic-ischemic brain damage, HIBD)是新生儿窒息的严重并发症,死亡率和后遗症发生率较高,存活者因为生活环境不同,预后也不一样,所以如何改善环境,提高存活患儿的生存质量问题成为临床研究的热点。对成年大鼠的研究证实,丰富环境刺激能促进神经再生,增加神经元数目,改善脑功能,而贫瘠环境则作用相反[1-3]。因此,探讨不同环境对于发育期脑损伤的作用及机制,对临床应用环境干预治疗新生儿HIBD非常必要。本实验采用新生大鼠HIBD模型,通过不同环境刺激,检测海马巢蛋白

作者简介:鲁利群(1971-),女,重庆市人,硕士研究生,主治医师,主要从事发育期脑损伤的早期干预方面的研究。电话:(023)68755602

通讯作者:赵聪敏,电话:(023)68755602

收稿日期:2005-10-31;修回日期:2006-03-02

(nestin)表达和学习记忆能力的变化，判断疗效并探讨可能的神经机制。

1　材料与方法

1.1　动物分组及模型制备

SPF 级 7 日龄新生 SD 大鼠 52 只(由第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供)，雌雄不限，体质量 12～18 g，按 Rice[4] 法制作 HIBD 模型。乙醚吸入麻醉后，置仰卧位，四肢头部固定，75% 乙醇消毒，作颈部正中切口，分离并结扎左侧颈总动脉，缝合皮肤后放入自制透明缺氧仓内(缺氧仓置于 37 ℃恒温水浴箱中)，以氧氮混合气(氧浓度为 8%)0.5～1 L/min 缺氧 2 h，出现自发或夹尾左旋则证明模型制作成功，纳入实验，予回笼饲养。术后第 2 天存活大鼠共 46 只，选取 45 只随机分为丰富环境(enriched environment，EE)组、贫瘠环境(impoverished environment，IE)组、和标准环境(standard environment，SE)组。每组 15 只。另设假手术(sham)组 15 只大鼠，仅分离颈总动脉，不结扎，不缺氧。

1.2　不同环境刺激

EE、SE、IE 参照 Puurunen[5] 和 Bourgeon 等[6] 的方法设计。术后第 2 天开始刺激，EE 组每个笼内 7～8 只幼鼠和 1 只母鼠，放入柠檬、树叶、刨花、木板、铁皮等，并播放轻音乐，以明暗红色灯光照射，每日持续 1 h。术后 8 d(即幼鼠生后 15 d，睁眼后)至 28 d，每日上午将幼鼠与母鼠分离 1 h，给予 EE 刺激。EE 为 70 cm×60 cm×50 cm 的透明有机玻璃大笼，笼内放置不同颜色、形状的物体，如管道、转笼和玩具等。每 3 天改变环境 1 次。总干预时间为 28 d。假手术组和 SE 组每个笼内 5 只幼鼠和 1 只母鼠，IE 组每个笼内 1 只幼鼠和 1 只母鼠，均饲养于 28 cm×18 cm×15 cm 的不透明标准笼内，笼内不设任何物体，也不予上述任何刺激。术后 14 d(生后 21 d)，各组幼鼠均与母鼠分离断奶，继续刺激至术后 28 d。4 组大鼠均提供 12 h 光～12 h 暗昼夜光变化，自由进食进水，定期清洁换笼。

1.3　Morris 水迷宫实验

干预结束后，各组大鼠开始进行 Morris 水迷宫试验。方法如下：Morris 水迷宫为一直径 150 cm、高 50 cm 的不锈钢圆形水池，外接动态轨迹摄像和计算机分析系统。水深 40 cm，水温保持在(24±2) ℃，水中加全脂淡奶粉 160 g 使水浑浊。在水池边缘确定东、南、西、北 4 个点，在水池中间设立一个直径 9 cm，高 24 cm 的透明有机玻璃平台，没于水下 1 cm。测试时室内安静，物品陈设、照明度一致。

1.3.1　定位航行实验　　共 5 d，每天上、下午各 1 轮，每轮 4 次。每次分别从 4 个象限 1/2 弧度处头朝壁入水，在 1 min 内触到平台的时间为逃避潜伏期(escape latency period，Elp)。以最后 1 d 4 次所用时间的总平均值作为观察指标。

1.3.2　空间探索实验　　第 5 天下午撤除平台，大鼠于原平台对侧象限入水，观察其 1 min 内穿越原平台所在位置的次数(穿台次数)。

1.4　Nestin 免疫组织化学检测

水迷宫测试结束后，每组大鼠予心脏灌注固定取脑组织，常规石蜡包埋切片，用于免疫组织化学染色。一抗为兔抗大鼠 nestin 多克隆抗体(1∶100，武汉博士德公司)。按 S-P 免疫组化试剂盒说明书(北京中杉试剂公司)进行操作。DAB 呈色，苏木精复染。用 PBS 代替一抗作为阴性对照。以细胞质和突起出现棕黄色颗粒为阳性反应产物。用真彩色图像分析仪(Leica Qween)，对每张切片双侧海马 CA1、CA2、CA3、DG 区所有 nestin 免疫阳性细胞进行计数，计数高倍视野下(400 倍)海马随机 10 个视野阳性细胞数，取其平均值。

1.5　统计学分析

所有数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS 11.0 统计软件进行单因素方差分析和 t 检验。

2　结果

2.1　不同环境刺激对 HIBD 新生大鼠学习记忆能力的影响

定位航行和空间探索实验反应学习记忆能力，结果显示，在 Elp 和穿台次数上，假手术组与 SE 组，SE 组与 EE 组，SE 组与 IE 组，各组间分别进行比较，差异显著($P<0.01$)，假手术组与 IE 组，EE 组与 IE 组，各组间比较，差异非常显著($P<0.001$)，而假手术组与 EE 组比较，差异不显著($P>0.05$)(表 1)。

表 1　不同环境刺激对 HIBD 新生大鼠学习记忆能力和海马 Nestin 表达的影响($n=15$，$\bar{x}\pm s$)

组别	定位航行实验	空间探索实验	Nestin 阳性细胞计数
	逃避潜伏期(s)	穿台次数	
假手术组	15.42±5.26[a]	6.5±1.54[a]	22±3.15[b]
贫瘠环境组	57.34±6.37[b]	2.4±1.21[b]	31±2.68[b]
丰富环境组	18.35±4.69[c]	6.1±1.05[c]	95±3.74[d]
标准环境组	32.16±8.06	4.2±1.34	56±4.02

a：$P<0.001$，与贫瘠环境组比较；b：$P<0.01$，与丰富环境组比较；c：$P>0.01$，d：$P<0.05$，与标准环境组比较

2.2　不同环境刺激对 HIBD 新生大鼠海马 nestin 表达的影响

光镜观察发现，假手术组 nestin 棕黄色阳性颗粒仅在海马齿状回亚颗粒带有较少表达，而 SE、EE 和 IE 组海马各区均可见 nestin 阳性颗粒，以齿状回表达最多(图 1、图 2)，分布于细胞质和突起。EE 组 nestin 免疫阳性颗粒较假手术组、SE 组和 IE 组染色深，数量多，假手术组海马 Nestin 阳性细胞最少，阳性染色最淡。图像分析结果显示，假手术组与 SE 组，SE 组与 EE 组，SE 组与 IE 组，各组间 nestin 阳性细胞计数，差异具有统计学意义($P<0.05$)，假手术组与 EE 组，EE 组与 IE 组，各组间比较，差异显著($P<0.01$)(表 1)。

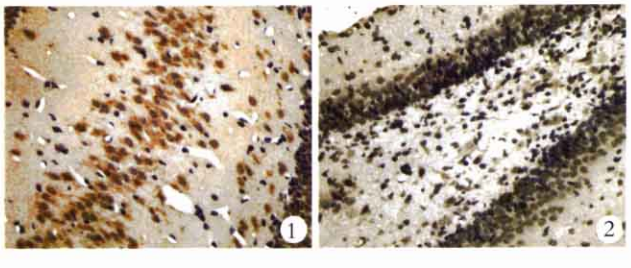


图 1　EE 组大鼠海马 DG 区 nestin 表达　(S-P×400)

图 2　IE 组大鼠海马 DG 区 nestin 表达　(S-P×400)

3 讨论

不同环境刺激，会对脑的形态和功能产生不同的影响。EE 刺激能促进脑发育和各种脑损伤修复，IE 刺激则延缓脑发育和脑损伤修复[3,7,8]。本实验显示，经过 EE 刺激后，大鼠学习记忆能力得到加强，几乎恢复到正常水平，而经过 IE 刺激，大鼠学习记忆能力明显减退，说明不同环境刺激对 HIBD 新生大鼠学习记忆能力的影响也不同。环境的丰富与贫瘠均相对于标准环境而言，体现在空间、内部设置和成员组成上，由此提供不同的刺激，包括多感官、运动和社交刺激。IE 的生活空间狭小、单调，各种感官刺激和活动非常有限，群体成员少，社交机会遭到剥夺。相反，EE 生活空间大，内置物体丰富而新奇，群体成员多，除了能够提供充分的多感官、运动和社交刺激外，还能提供训练学习的机会。学习记忆作为脑的高级活动之一，其实质就是复杂的信息获取、传递与整合的过程。信息来自环境，不同环境发出信息的质和量也不同，因此，各组大鼠在学习记忆能力上的差别可能正与此有关。

Nestin 是一种中间丝蛋白，主要存在于胚胎期和受损伤的大脑，是未分化状态多能神经干细胞的抗原标志[9]，与神经再生密切相关。本实验显示，假手术组的 nestin 免疫阳性产物，仅仅在海马齿状回(DG)的亚颗粒带有较少表达，与文献[10]报道符合。SE 组不仅在齿状回区，其余各区均有少量 nestin 阳性产物表达，表达水平也较假手术组增高，其原因可能与 HIBD 有关[11]。SE 组较 IE 组，EE 组较 SE 组和 IE 组，海马 nestin 表达量都明显增高，分别说明 EE 刺激能增加 nestin 阳性神经元和神经前体细胞，而 IE 刺激则使新的神经发生减少。新的研究表明，神经胶质细胞不仅参与胶质瘢痕的形成，也与脑功能发挥有关，所以无论神经干细胞分化为神经元还是神经胶质细胞，都有利于损伤修复。海马是学习记忆的结构基础，DG 区又是神经发生的主要区域，各组大鼠学习记忆能力的差别也与之相吻合。虽然假手术组 nestin 表达量较其余各组都低，但 HIBD 后新的神经发生可能尚不足以代偿死亡的神经元，而且也并非所有的 nestin 阳性细胞都分化为神经元，新生神经元在形成后也不能立刻产生功能，会经历一短暂不成熟状态，因此假手术组大鼠的学习记忆能力仍然最强。而 EE 刺激后大鼠神经再生明显且逐渐成熟，使之学习记忆功能几乎恢复到了正常水平。

脑损伤后，nestin 蛋白的重新表达与神经营养因子的释放有关[12]，而不同环境刺激后，海马各种神经营养因子的表达水平也不同[13]，因此，环境因素可能通过改变海马神经营养因子的表达水平，来诱导海马 nestin 的表达。脑损伤后神经再生的形式有两种：①神经干细胞重新分化为神经元；②未受损神经元的轴突再生与突触重建。本实验显示，神经元再生可能是环境刺激影响发育期脑损伤修复的机制之一。

参考文献：

[1] KOMITOVA M, MATTSSON B, JOHANSSON B B, *et al*. Enriched environment increases neural stem/progenitor cell proliferation and neurogenesis in the subventricular zone of stroke-lesioned adult rats[J]. Stroke, 2005, 36(6): 1278 - 1282.

[2] ENGINEER N D, PERCACCIO C R, PANDYA P K, *et al*. Environmental enrichment improves response strength, threshold, selectivity, and latency of auditory cortex neurons[J]. J Neurophysiol, 2004, 92(1): 73 - 82.

[3] BRUEL-JUNGERMAN E, LAROCHE S, RAMPON C. New neurons in the dentate gyrus are involved in the expression of enhanced long-term memory following environmental enrichment[J]. Eur J Neurosi, 2005, 21(2): 513 - 521.

[4] RICE J E 3rd, VANNUCCI R C, BRIERLEY J B. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat[J]. Ann Neurol, 1981, 9(2): 131 - 141.

[5] PUURUNEN K, SIVENIUS J. Influence of enriched environment on spatial learning following cerebral insult[J]. Rev Neurosci, 2002, 13(4): 347 - 364.

[6] BOURGEON S, XERRI C, COQ J O. Abilities in tactile discrimination of textures in adult rats exposed to enriched or impoverished environments[J]. Behav Brain Res, 2004, 153(1): 217 - 231.

[7] SCHRIDDE U, VAN-LUIJTELAAR G. The role of the environment on the development of spike-wave discharges in two strains of rats[J]. Physiol Behav, 2005, 84 (3): 379 - 386.

[8] PABAN V, JAFFARD M, CHAMBON C, *et al*. Time course of behavioral changes following basal forebrain cholinergic damage in rats: Environmental enrichment as a therapeutic intervention[J]. Neuroscience, 2005, 132(1): 13 - 32.

[9] SCORZA C A, ARIDA R M, CAVALHEIRO E A, *et al*. Expression of nestin in the hippocampal formation of rats submitted to the pilocarpine model of epilepsy[J]. Neurosci Res, 2005, 51(3): 285 - 291.

[10] BECQ H, JORQUERA I, BEN-ARI Y, *et al*. Differential properties of dentate gyrus and CA1 neural precursors[J]. J Neurobiol, 2005, 62(2): 243 - 261.

[11] SALMAN H, GHOSH P, KERNIE S G. Subventricular zone neural stem cells remodel the brain following traumatic injury in adult mice[J]. J Neurotrauma, 2004, 21(3): 283 - 292.

[12] LAI C, FENG L. Neuregulin induces proliferation of neural progenitor cells via PLC/PKC pathway[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 319(2): 603 - 611.

[13] MOHAMMED A H, ZHU S W, DARMOPIL S, *et al*. Environmental enrichment and thebrain[J]. Progr Brain Res, 2002, 138: 109 - 133.

(编辑 王 红)