论著

文章编号:1000-5404(2006)08-0816-03

丰富环境对缺氧缺血性脑损伤大鼠海马突触超微结构及突触素表达的影响

蒲昭霞,赵聪敏,鲁利群 (第三军医大学新桥医院儿科,重庆 400037)

提 要:目的 探讨早期丰富环境干预对缺氧缺血性脑损伤(HIBD)新生大鼠海马CA1区神经元突触超微结构和突触素(p38)表达的影响。**方法** 按Rcie法制作HIBD新生动物模型,共计20只,随机分为干预组和非干预组。同时设假手术对照组10只。干预组大鼠于术后第2天开始给予丰富环境刺激,持续20 d。干预结束后用透射电镜观察各组海马CA1区锥体神经元超微结构,免疫组化和图像分析技术检测p38的表达。**结果** 与对照组比较,非干预组海马CA1区锥体细胞见部分核膜消失、线粒体嵴模糊、神经元突触数量减少,突触间隙增宽,突触囊泡减少,突触后致密物变薄;干预组神经元和突触无明显异常。非干预组海马CA1区突出素光密度值明显低于干预组和对照组($P<0.01$),而干预组和对照组之间无显著差异($P>0.05$)。**结论** 阻止或减轻HI后突触超微结构的损伤、促进突触的重建可能是丰富环境发挥作用的物质基础。

关键词: 缺氧缺血性脑病;早期干预;突触素;电子;显微镜

中图法分类号: R329.27;R339.5;R743.31 **文献标识码:** A

Effects of enriched environmental intervention on synaptic ultrastructure and synaptophysin expression in hippocampus of neonatal rats

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

Abstract: Objective To observe the effect of early enriched environmental intervention on synaptic ultrastructure and the synaptophysin expression (p38) in hippocampal CA1 area after hypoxia-ischemic brain damage(HIBD) in neonatal rats. **Methods** The rat model of HIBD was made by the method of Rice in 20 Sprague-Dawley rats, and divided randomly into 2 groups: the intervention group, non-intervention group. Another 10 rats underwent sham-operation as control. From the second day after HIBD, the rats of the intervention group were kept in an enriched environment for 20 d, the rats of non-intervention group and sham-operation group were raised in standard enviroment instead. The hippocampal ultrastructure was observed with electron microscope and the p38 expression was detected immunohistochemically in all rats. **Results** The ultrastructure of hippocampus CA1 pyramidal neuron in the non-intervention group were distorted as compared with that in the intervention group and control group. The corrected optical densities (COD) of immunoreactive products of the hippocampal p38 were significantly decreased in non-intervention group as compared with intervention group and control group ($P<0.01$). There were no marked difference of either ultrastructure or immunohistochemically reactived COD of p38 between intervention group and control group ($P>0.05$). **Conclusion** Early enriched environment intervention could improve the synaptic reconstruction and reduce the ultrastructural damage induced by hypoxic-ischemia.

Key words: hypoxia-ischemic brain damage; early intervention; synaptophysin; electron microscope

近年来关于缺氧缺血性脑损伤(hypoxia-ischemic brain damage, HIBD)的早期干预是人们研究的热点。有研究表明早期丰富环境(environmental enrichment)干预可促进HIBD大鼠脑损伤的修复,临床上通过有组织有目的的丰富环境刺激来减少发育期脑损伤及神经系统后遗症,促进脑损伤的康复,疗效相当显著。但由于对机制尚未完全搞清,影响进一步推广。海马是大脑边缘系统的组成部分、能参与调节行为反应、内脏活动和生物节律等功能[1],海马CA1区是缺氧缺血最敏感的结构之一[2]。因此本实验通过给予HIBD新生大鼠丰富环境刺激,观察其海马CA1区锥体神经元超微结构的变化和突触素(p38)表达的影响,探讨丰富环境干预促进HIBD脑损伤修复的可能神经机制。

作者简介: 蒲昭霞(1974-),女,四川省射洪市人,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)68774602

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

1　材料与方法

1.1　动物模型的制备与分组

7 日龄 SD 大鼠 30 只，体质量 12～15 g（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），参照 Rice[3] 法建立新生大鼠 HIBD 动物模型。大鼠无水乙醚吸入麻醉后，取颈部正中切口，分离结扎左侧颈总动脉，然后置于 37℃ 有机玻璃缺氧箱中，持续充以气流量为 0.5 L/min 的 8% 氧氮混合气体 2 h，制成 HIBD 动物模型，术后夹尾左旋者纳入实验。制模后按随机数字表分为干预组、非干预组，假手术对照组各 10 只。对照组仅切开大鼠颈部皮肤并暴露左侧颈总动脉，不结扎，缝合皮肤后不入缺氧仓。各组均由母鼠带养。

1.2　干预方法

干预组在术后 24 h 开始给予丰富环境刺激。丰富环境参照国内外文献[4,5]设计，为 70 cm×60 cm×50 cm 的大笼，笼内放置不同颜色、形状及气味的物体，包括各种质感的砂纸、毛刷，冰冷的金属和有刺激性气味的柠檬、薄荷棉球，还有转盘、管道、斜坡、秋千、跷跷板、小球等“玩具”，并配以舒缓的轻音乐。睁眼前干预组新生鼠每日放入笼内 4 次，每次 10 min，睁眼后每日放入丰富环境中 2 h，每周将环境改变 2 次，以造成新异的刺激，总干预时间为 20 d。非干预组和对照组分别饲养于 25 cm×15 cm×10 cm 无特殊刺激的标准环境中。3 组均提供 12 h 光～12 h 暗昼夜光变化，自由进食进水，定期换笼。

1.3　海马 CA1 区锥体神经元超微结构观察

干预结束后，每组随机取 2 只动物，快速断头取脑（4 ℃），剥离左侧海马 CA1 区，组织块大小约 1 mm×1 mm× 1 mm，每例取 2 个标本，放入 2.5% 戊二醛前固定 24 h，先用 PBS 冲洗 5 min ×3 次，再用 1% 锇酸溶液固定 2 h，并再次用 PBS 冲洗 5 min×3 次，梯度酒精脱水，用包埋液（苯二甲酸二丙烯酯）包埋，超薄切片做醋酸铀和枸橼酸铅双重染色，而后用透射电子显微镜观察海马 CA1 区神经元超微结构的变化。

1.4　突触素免疫组化染色及图像分析

干预结束后，各组大鼠用 1% 戊巴比妥钠（40 mg/kg）腹腔注射麻醉后，用 4% 多聚甲醛行心脏灌注固定，取大脑于同样固定液中外固定，常规脱水，石蜡包埋，丘脑水平连续冠状切片厚约 3 μm，用于海马突触素免疫组化染色。小鼠抗大鼠 p38 抗体（Sigma5768）按 1∶800 稀释，其余步骤按 S-P 试剂盒（北京中杉生物技术公司）说明书操作。以 PBS 代替一抗做阴性对照。然后用彩色病理图像分析系统测量切片海马 CA1 区 p38 吸光度值（OD），同时测量同一张切片胼胝体的 OD 值以作为背景 OD 值，用矫正吸光度值 COD（实测值－背景值）进行比较和分析，以避免染色过程中非特异性染色所造成的误差。

1.5　统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 11.0 统计软件进行两两比较和单因素方差分析。

2　结果

2.1　海马 CA1 区锥体神经元超微结构改变

经透射电镜观察，假手术对照组海马 CA1 区锥体神经元核膜清晰，核仁明显，细胞器丰富，突触结构完整；与对照组比较，非干预组海马 CA1 区神经元见部分核膜消失、线粒体嵴模糊、神经元突触数量减少，突触间隙增宽，突触囊泡减少，突触后致密物变薄；干预组神经元和突触无明显异常（图 1，图 2）。



图 1　干预组海马 CA1 区神经元超微结构　（TEM×60 000）

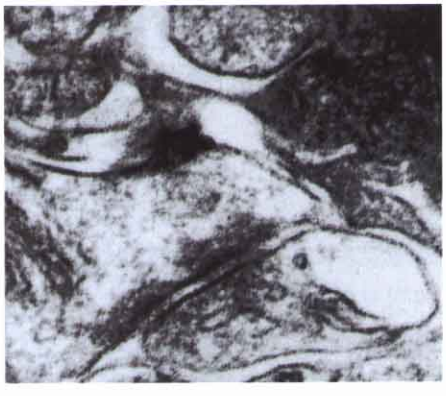


图 2　非干预组海马 CA1 区神经元超微结构　（TEM×60 000）

2.2　p38 免疫组化染色

p38 阳性染色呈棕黄色颗粒状或点状沉积，海马、齿状回呈现明显免疫板层分布，以始层、辐射层染色较深，腔隙层和分子层染色次之，齿状回分子层染色最深；非干预组海马各层突出素染色较干预组和对照组相应各层浅染（图 3，图 4）。非干预组海马 CA1 区矫正吸光度值为（0.328 8±0.190 6），较干预组矫正吸光度值（1.086 3±0.241 83）明显降低（$P<0.01$）；干预组和对照组矫正吸光度值无显著差异（$P>0.05$）

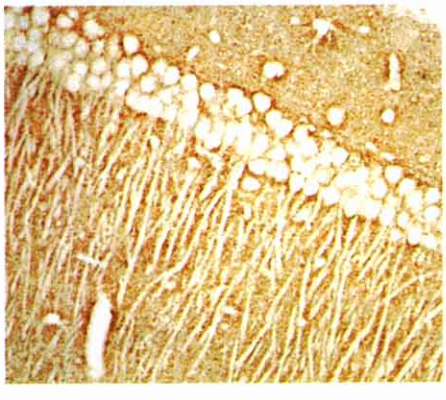


图 3　干预组海马 p38 免疫组化染色结果　（S-P×400）



图4 非干预组海马 p38 免疫组化染色结果 (S-P×400)

3 讨论

幼鼠对外界环境的认识依赖于视觉、触觉、嗅觉、味觉、听觉、平衡感觉等多种感觉刺激的信息输入，中枢神经系统对这些传入信号进行分析、整合，调整其结构以适应外界环境的变化。本实验中使用的丰富环境模型包括明暗灯光和各种颜色刺激视觉的发育；舒缓的轻音乐刺激听觉的发育；各种温度、形状、质感不同的物体刺激触觉和的发育；有刺激性气味的柠檬、薄荷刺激味觉和嗅觉的发育；转盘、秋千等刺激前庭平衡感觉的发育；初生时的早期搬动、母鼠的哺乳行为和群体的社会交往均可增加幼鼠的情感体验，降低幼鼠对应激的行为反应。因此这种包含多感官刺激的丰富环境模型是可行的。

本实验通过透射电镜显示，HIBD 非干预组海马 CA1 区神经元见部分核膜消失、线粒体嵴模糊、神经元突触数量减少，突触间隙增宽，突触囊泡减少，突触后致密物变薄。而突触是神经元间信息传递的特化结构，突触前膜含有大量的突触囊泡，与神经递质的释放密切相关[6]；突触后膜主要为突触后致密物质，含有微管蛋白、肌动蛋白、神经丝蛋白及各种酶和兴奋性谷氨酸受体等[7]，突触后致密物质厚度的变化是突触机能变化最关键的形态学基础；突触间隙内含有大量分解神经递质的降解酶，突触间隙越宽，神经递质传导所需的时间越长，在传导过程被降解的量越多，从而导致神经传导和学习记忆能力的下降。非干预组突触超微结构出现了改变，说明 HI 可造成神经元突触超微结构的损伤。而干预组与对照组比较，神经元和突触超微结构无明显异常，说明如果早期给予丰富环境刺激，可以减轻 HI 所致的突触超微结构损伤，改善突触结构和神经信息的传递，维持神经元突触的正常结构和功能。

突触素(p38)是一种特异性位于突触前囊泡膜上的钙结合蛋白，参与发育神经元突触的形成，其分布和密度可间接反映突触的密度[8]。实验显示干预组较非干预组 p38 免疫反应光密度明显增加($P<0.01$)，说明丰富环境刺后，海马 CA1 区有新突触的形成，这可能是丰富环境干预促进脑损伤修复的原因之一。新突触形成的方式有两种：①未受损神经元通过轴突绕道投射，树突不寻常分叉等方式进行突触重建；②海马齿状回神经干细胞增殖、迁移和分化，大量新生神经元到达受损区域，与周围神经元形成新的突触连接，以达到代偿目的[9,10]。总之，阻止或减轻 HI 后突触超微结构的损伤、促进突触的重建可能是丰富环境发挥作用的物质基础。

参考文献：

[1] 曾小鲁. 神经解剖学基础[M]. 北京：高等教育出版社，1994：172.

[2] CHOI D W. Cerebral hypoxia: some new approaches and unanswered questions[J]. J Neurosci, 1990, 10(8): 2493-2501.

[3] 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.

[4] FERNANDEZ V, ADARO L, SANHUEZA-TSUTSUMI M, *et al*. Early-life polysensorial stimulation and nutrition: topographic levels of susceptibility in the rat visual cortex[J]. Biol Neonate, 1997, 71(4): 265-276.

[5] VENABLE N, PINTO-HAMUY T, ARRAZTOA J A, *et al*. Greater efficacy of preweaning than postweaning environmental enrichment on maze learning in adult rats[J]. Behav Brain Res, 1988, 31(1): 89-92.

[6] WHISHAW I Q, ROD M R, AUER R N. Behavioral deficits revealed by multiple tests in rats with ischemic damage limited to half of the CA1 sector of the hippocampus[J]. Brain Res Bull, 1994, 34(3): 283-289.

[7] THIEL G. Synapsin I, synapsin II, and synaptophysin: marker proteins of synaptic vesicles[J]. Brain Pathol, 1993, 3(1): 87-95.

[8] WU K, SIEKEVITZ P. Neurochemical characteristics of postsynaptic density fraction isolated from adult canine hippocampus[J]. Brain Res, 1988, 457(1): 98-112.

[9] FAVERJON S, SILVEIRA D C, FU D D, *et al*. Beneficial effects of enriched environment following status epilepticus in immature rats[J]. Neurology, 2002, 59(9): 1356-1364.

[10] AUVERGNE R, LERE C, EL-BAHH B, *et al*. Delayed kindling epileptogenesis and increased neurogenesis in adult rats housed in an enriched environment[J]. Brain Res, 2002, 954(2): 277-285.

(编辑 王 红)