文章编号:1000-5404(2006)20-2033-04

论著

脑发育不同阶段丰富环境刺激对缺氧缺血性脑损伤大鼠学习记忆的影响

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 探讨在不同发育阶段丰富环境刺激对缺氧缺血性脑损伤(hypoxic-ischemic brain injury, HIBI)新生大鼠学习记忆能力的影响。**方法** 7 d龄SD大鼠通过结扎左侧颈总动脉,吸入8%氧氮混合气,制成HIBI模型,分为干预组(intervention)、非干预组(non-intervention),同时设假手术对照组(sham)。其中干预组根据干预开始时间又分为早期干预组(断奶前开始干预)、晚期干预组(断奶后开始干预),分别在断奶前后(生后25 d)开始给予丰富环境刺激,总干预时间为20 d。3个月龄时测定各组学习记忆能力(Morris水迷宫),海马CA1区存活锥体神经元计数评估脑损伤程度,比较不同发育阶段丰富环境干预的效果。**结果** 早期干预组学习记忆能力和海马存活锥体神经元数明显高于晚期干预组($P<0.01$)。早期干预组与假手术组差异无显著意义($P>0.05$)。**结论** 断奶前开始给予丰富环境干预较断奶后能明显改善HIBI大鼠学习记忆能力,减轻HI后海马病理损伤程度可能是其原因之一。

关键词: 缺氧缺血性脑病;丰富环境;早期干预;学习记忆
中图法分类号: R338.64;R339.5;R743.31 **文献标识码:** A

Effect of environmental enrichment at different development stages on learning and memory abilities in hypoxia-ischemic brain injured postnatal rats

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

Abstract: Objective To observe the effects of environmental stimulation at different stages of development on postnatal rats with hypoxia-ischemic brain injury (HIBI). **Methods** HIBI postnatal SD rats models were established by dissecting and ligating the left common carotid artery, and after 2 h of recovery, exposing to 8% oxygen-92% nitrogen gas mixture for 2 h. The HIBI rats were randomly divided into early intervention groups, late intervention group, non-intervention group. Intervention group were kept in enriched environment before or after weaning for 20 d. Non-intervention group and control group were kept in a standard environment. Space learning and memory were tested with Morris water maze. **Results** The ability of space learning and memory in early intervention group was better than that in late intervention group ($P<0.01$). The number of the survival pyramid neurons of hippocampus CA1 section of early intervention group was much more than that of late intervention group ($P<0.01$). There was no marked difference between early intervention group and sham group. **Conclusion** The damage in the left hippocampus of early intervention group is decreased obviously, and the ability of learning and memory is promoted while late intervention group has quiet effects, which indicating that environmental enrichment at pre-weaning improves learning and memory of HIBI rats much more than that at post-weaning. Changes of pathology in their hippocampus are possibly associated with the effects of environment.

Key words: hypoxia-ischemic brain damage; environmental enrichment; early intervention; learning and memory

研究表明丰富环境干预能促进缺氧缺血性脑损伤(hypoxic-ischemic brain injury, HIBI)的修复和脑功能的改善[1,2]。环境康复疗法有望成为临床治疗HIBI及减轻脑损伤后遗症的无创、无痛苦的有效方法。但是关于发育期脑损伤(如HIBI)后丰富环境干预的时机选择尚存在很大争议,一部分学者认为早期干预可能加重脑损伤[3],还有观点认为神经系统在人的一生中都具有很强的可塑性,任何时候给予丰富环境刺激

作者简介:蒲昭霞(1974-),女,四川省遂宁市人,硕士研究生,主治医师,主要从事发育期脑损伤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:2006-04-30;修回日期:2006-09-11

均可改善脑功能，以至于错过了脑损伤患儿治疗的最佳时机，延误了病情。大鼠妊娠 18 d 至生后 25 d（即断奶前）是中枢神经系统发育的关键期，因此我们建立了 HIBI 新生大鼠模型，分别在断奶前后开始给予丰富环境刺激，比较在不同发育阶段其对学习记忆能力及脑损伤的改善作用，为临床早期积极的环境疗法治疗发育期脑损伤提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 7 d 龄 SD 雄性大鼠（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），体质量 12～18 g，共计 38 只。

1.1.2 主要仪器 Morris 水迷宫由本院中心实验室提供。德国 Leica-Qwin 彩色病理图文分析系统。

1.2 方法

1.2.1 HIBI 动物模型制备与分组 参照 Rice[4] 法建立新生大鼠 HIBI 动物模型，术后出现夹尾左旋或自发左旋者表明建模成功。纳入实验共 32 只大鼠，随机分为早期干预组、晚期干预组、非干预组、假手术对照组，每组 8 只。假手术对照组仅切开大鼠颈部皮肤并暴露左侧颈总动脉，不结扎，缝合皮肤后不缺氧。各组均由母鼠带养。

1.2.2 干预方法 丰富环境模型参照 Sale 等[5] 文献设计。饲养笼规格为 70 cm×60 cm×50 cm 的半透明有机玻璃笼，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。

早期干预组在术后 24 h 即开始干预。睁眼前将仔鼠与母鼠分离，每日放入笼内 4 次，每次 10 min。日龄 14 d 即大鼠睁眼后，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。

晚期干预组在日龄 25 d 开始放入丰富环境中，其余条件与早期干预组睁眼后一致。

非干预组和假手术组分别饲养于 25 cm×15 cm×10 cm 无特殊刺激的标准环境中，各干预组在非干预时间亦饲养于标准环境中。4 组大鼠均在 25 d 时断奶并与母鼠分离。各组均提供 12 h 光/12 h 暗昼夜光变化，自由进食进水，定期换笼。

1.2.3 学习记忆能力的测试 各组饲养至 3 月龄（100 d）时进行 Morris[6] 水迷宫测试。Morris 水迷宫是检测空间分辨学习记忆能力的经典实验方法。

实验分为两部分进行。①前 6 d 为定位航行实验，用于测量大鼠对水迷宫学习和记忆的获取能力。每天分上、下午两段，每段训练 4 次，每次 60 s，两次训练之间间隔 30 s，历时 6 d。训练时随机选择一个入水电点，将大鼠面向池壁放入水中，观察记录大鼠寻找并爬上平台的路线图及逃避潜伏期（即从大鼠入水到找到水下隐蔽平台并立于其上所需时间），若大鼠在 60 s内未找到平台，则以 60 s 计。②空间探索实验，用于测量大鼠学会寻找平台后，对平台空间位置记忆的保持能力。既在最后一次训练结束后，撤去平台，面向池壁任选一入水点放入水中，用摄像机拍摄大鼠游泳轨迹，记录在 60 s 内搜索平台的线路图，并计算其在原平台象限游泳距离占游泳总距离的百分比。

1.2.4 尼氏体染色及左侧海马 CA1 区锥体神经元计数 Morris 水迷宫测试结束后，各组大鼠经心脏灌注固定后，取脑组织行石蜡包埋，丘脑水平连续冠状切片。石蜡切片脱蜡至水，采用 1% 甲苯氨蓝染色法，以锥体神经元染色界限清晰为标准，计数左侧海马 CA1 区正常锥体神经元数目（×400），每个动物连续计数 3 张相邻切片，取平均值。

1.3 统计学处理

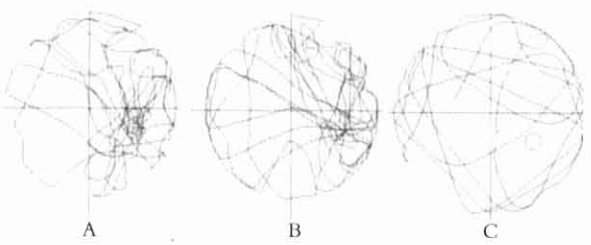
结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS 11.0 统计软件对实验数据进行两两比较和单因素方差分析，两两比较采用 SNK 法。

2 结果

2.1 Morris 水迷宫测试结果

2.1.1 运动轨迹 在定位航行实验中，各组大鼠寻找平台的行为差异很大。第 1 次训练时各组大鼠先绕池壁航行，试图通过池壁逃生。但是早期干预组和假手术组经过几次失败的尝试后，开始以对角线在水池中航行，并很快找到平台，运动轨迹多呈直线式。晚期干预组环绕池壁航行的次数长达 20～30 次，第 4 天开始才有了从水池中寻找出路的动机，而且以缩小圆圈的方式搜索平台，运动轨迹呈趋向式。非干预组运动轨迹以边缘式和随机式为主，几乎没有在水池中寻找平台的倾向。

图 1 显示在空间探索实验中的运动轨迹，可见撤除平台后早期干预组和假手术组均能记忆原平台的位置，寻找路线大多集中在原平台象限，平台对面象限最少，运动轨迹集中于原平台位置。晚期干预组也以原平台象限为主，但运动轨迹不集中于原平台位置。非干预组游泳路线散乱，游泳轨迹以随机式和边缘式为主。



A：早期干预组；B：晚期干预组；C：非干预组

图 1 大鼠在空间探索实验中的运动轨迹示意图

2.1.2 定位航行实验——逃避潜伏期 各组逃避潜伏期随训练次数的增多而逐渐缩短。早期干预组和假手术组从第 2 天开始潜伏期就很快下降。晚期干预组在前 4 天潜伏期呈平台状，以后显著下降。非干预组在整个训练过程中潜伏期逐渐下降，但无明显变化的趋势。训练第 6 天，早期干预组逃避潜伏期较晚期干预组和非干预组明显缩短（$P<0.01$）；晚期干预组和非干预组比较逃避潜伏期也明显缩短（$P<0.05$）；早期干预组和假手术组之间差异无显著意义（$P>0.05$），见表 1。

2.1.3 空间探索实验——原平台象限游泳距离占游泳总距离百分比 早期干预组和假手术组明显高于晚期干预组和非

干预组（$P<0.01$）；晚期干预组和非干预组比较原平台象限游泳距离百分比也明显增高（$P<0.05$）；早期干预组和假手术组之间差异无显著意义（$P>0.05$）。见表 1。

表 1　Morris 水迷宫实验结果（$n=8$）

组别	逃避潜伏期（s）	空间探索实验（%）
非干预组	51.779 ± 11.779^{a}	9.038 ± 5.360^{a}
假手术组	4.321 ± 2.355	68.183 ± 8.178
早期干预组	6.858 ± 3.337	59.338 ± 10.817
晚期干预组	35.152 ± 12.738^{ab}	22.925 ± 11.142^{ab}

a：$P<0.01$ 与早期干预组比较；b：$P<0.05$ 与非干预组比较

2.2　尼氏体染色及左侧海马 CA1 区锥体神经元计数

假手术组左侧海马结构清晰，细胞形态正常，布局有序，神经元无损伤缺失，胞体、胞核清晰，核仁清楚，尼氏体密集，均匀分布于核周。早期干预组左侧海马各区可见少量神经元缺失及胶质增生，但细胞形态大致正常，细胞排列较为整齐，尼氏体清晰。晚期干预组左侧海马各区细胞缺失较明显，排列较为散乱，尼氏体染色浅淡，但细胞形态大致正常。非干预组左侧海马各区细胞层数减少，神经元细胞间隙变大，排列散乱、稀疏，细胞形态多异常，尼氏体减少，核仁不清，可见核固缩、核碎裂。每组随机选择 8 例进行左侧海马 CA1 区锥体神经元计数。结果显示，存活细胞数晚期干预组为（65 ± 12.54）个，早期干预组为（103.75 ± 7.48）个，假手术组为（110.5 ± 10.96）个，非干预组为（50.75 ± 8.27）个。晚期干预组较早期干预组和假手术组神经元数明显减少（$P<0.01$），较非干预组细胞数增加（（$P<0.05$），早期干预组和假手术组无明显差异（$P>0.05$）。

3　讨论

婴儿出生后头几年是其智力发育最重要的阶段，只有在此时期内的丰富环境刺激才能使肌体的潜能被充分挖掘出来，这种积极的环境训练开始越早，对其智力和行为发育所起的作用就越明显。过了这个时期，就不能获得效果或者达到最好水平[7]。这个时期称为神经系统发育的关键期，关键期内的丰富环境干预即为早期干预。大鼠妊娠 18 d 至生后 25 d（即断奶前）是中枢神经系统发育的关键期，因此我们以 7 日龄新生鼠 HIBI 模型模拟新生儿 HIE，分别在术后24 h 和断奶后（生后 25 d）开始给予丰富环境干预，比较不同发育阶段丰富环境刺激对学习记忆的影响。

制模过程中新生鼠出现自发或夹尾左旋，是由 HI 引起大脑皮层下运动中枢损害致平衡失调所致，是模型成功的行为学标志。HI 不仅可导致大脑皮层损伤，还可能损伤与学习记忆功能密切相关的海马结构，而海马各区对缺氧缺血的易感性不同，以 CA1 区对缺氧缺血最为敏感，即缺氧缺血最易引起海马 CA1 区神经元损伤、缺失。因此我们在观察各组学习记忆能力变化的同时也对缺血缺氧侧海马 CA1 区存活锥体神经元进行计数，比较各组海马损伤程度。

本实验显示经过 HI 处理的各组空间学习记忆能力和海马结构与假手术组比较均在一定程度上受到损伤。非干预组训练 6 d 没有寻找平台的动机，学习记忆能力明显受损，海马神经元损伤也最为严重；早期干预组训练第 2 天开始逃避潜伏期就很快下降，运动轨迹呈直线式，空间探索时其游泳路线也集中在原平台位置，学习记忆能力与假手术组比较下降不明显，且海马锥体神经元缺失不明显，排列整齐，形态正常，海马损伤最轻；晚期干预组训练第 4 天才通过学习意识到平台的重要性，运动轨迹呈趋向式，海马神经元出现明显的神经元缺失，排列散乱，海马损伤程度介于早期干预组和非干预组之间。实验结果表明新生鼠 HI 后可导致远期学习记忆功能受损，但给予丰富环境干预后可得到明显改善，且早期干预对学习记忆能力的改善作用优于晚期干预，甚至可能恢复到正常水平，而阻止或减轻 HI 后海马的病理损伤程度可能是其原因之一。

根据本实验结果及相关文献，早期干预可减轻 HI 后海马病理损伤程度可能与下述原因有关：①减少 HI 后持续的神经元凋亡。缺氧缺血后脑细胞的损害以凋亡为主，且持续时间长，可达 30 d 以上。持续的神经元凋亡将导致脑损伤面积的扩大，是 HIBI 中枢神经系统远期并发症产生的一个重要原因[8]。早期干预可逆转凋亡病理进程，降低脑神经元凋亡数量，起到修复脑损伤、增强学习记忆力的作用[9]。而在发育晚期阶段（断奶后），缺氧缺血区及其周边大部分神经元已经由于能量衰竭、兴奋性神经递质的释放、大量氧自由基的产生、离子稳态的失衡等一系列病理生理过程导致神经元的不可逆凋亡、坏死[10]，所以晚期干预已经无法阻止脑损伤及功能损害的发生。②改善突触结构和神经元间的信息传递。突触是神经信息传递的特化结构。发育早期突触连接尚未完全形成，而且 HI 早期神经元突触素表达增加，突触可塑性更强[11]，早期干预可以通过改变突触的结构，建立与外界环境相适应的突触连接和神经纤维网络。而我们先前的研究发现（另文报道），HIBI 在神经系统发育后期，随着恢复时间的延长，神经元突触素表达减少，突触可塑性降低，HI 所致的异常突触连接和神经元回路已经形成或固定化，这时丰富环境干预对突触的修饰作用较弱。③促进海马齿状回神经干细胞的增殖、分化，新生神经元迁移至损伤区域并与周围神经元形成突触联系，替代死亡的神经元[12,13]。研究表明丰富环境刺激可以增加 HIBI 新生鼠海马 nestin 的表达，促进神经再生，改善学习记忆能力[14]。但早期干预是否比晚期干预更能促进 nestin 的表达？或者在神经系统发育关键期内，神经干细胞的增殖分化能力更强？尚需进一步深入研究。

本实验证实在神经系统发育早期阶段(即关键期前)开始给予丰富环境干预,可阻止或减轻围生期 HI 所致脑损伤,促进脑功能的恢复,且干预越早,效果越好,减轻 HI 后海马病理损伤程度可能是其原因之一。

参考文献:

[1] TAN S, PARKS D A. Preserving brain function during neonatal asphyxia[J]. Clin Perinatol, 1999, 26(3): 1733-747, viii.

[2] 陈达光, 陈燕惠. 婴幼儿早期智能开发与教养[M]. 福州: 福建教育出版社, 1997: 1-12.

[3] STELMACH T, KALLAS E, PISAREV H, *et al*. Antenatal risk factors associated with unfavorable neurologic status in newborns and at 2 years of age [J]. J Child Neurol, 2004, 19(2): 116-122.

[4] RICE J E Jr., 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] SALE A, PUTIGNANO E, CANCEDDA L, *et al*. Enriched environment and acceleration of visual system development[J]. Neuropharmacology, 2004, 47(5): 649-660.

[6] MORRIS R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat[J]. J Neurosci Methods, 1984, 11(1): 47-60.

[7] 冯润金,李桂云. 碘缺乏病研究进展(一)[J]. 国外医学: 医学地理分册, 1994, 15(1): 1-6.

[8] AY I, SUGIMORI H, FINKLESTEIN S P. Intravenous basic fibroblast growth factor (bFGF) decreases DNA fragmentation and prevents downregulation of bcl-2 expression in the ischemic brain following middle cerebral artery occlusion in rats[J]. Brain Res Mol Brain Res, 2001, 87(1): 71-80.

[9] 陈敏榕, 陈燕惠, 陈达光, 等. 早期干预对缺氧缺血性脑损伤大鼠学习记忆能力及神经元凋亡的影响[J]. 福建医科大学学报, 2004, 38(3): 285-287

[10] COLTON C A, SNELL J, CHERNYSHEV O, *et al*. Induction of superoxide anion and nitric oxide production in cultured microglia[J], Ann N Y Acad Sci, 1994, 738(6): 54-63.

[11] 宋文秀, 曹云涛, 刘华庆. 新生鼠脑缺血再灌注后海马 CA1 区突触素的表达及意义[J]. 第四军医大学学报, 2004, 25(16): 1467-1469.

[12] 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.

[13] 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.

[14] 鲁利群, 赵聪敏, 蒲昭霞. 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[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(8): 804-806.

(编辑 王 红)

欢迎订阅 2007 年《护理学报》

《护理学报》是由南方医科大学(原第一军医大学)主办的护理专业学术性期刊,是我国唯一的护理学报。全军优秀医学期刊,中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊),《CAJ-CD 规范》执行优秀期刊。月刊,大 16 开,96 页,每月 20 日出版。辟有专家论坛、论著、研究生园地、综述、临证护理、调查研究、护理教育、临床护理、护理管理、药械护理、心理卫生、社区护理、健康教育、国外护理见闻、个案研究、护理创新、中医护理、基层来稿、学术争鸣等 20 多个栏目。本刊办刊特色鲜明,标准化、规范化程度高,具有较强的科学性、新颖性、实用性和学术导向性,在护理界享有较高的学术威望。

本刊率先推出刊授继续教育项目,独家推出"读者写作一对一辅导"等紧贴读者、作者需求的举措,创造了"以读者、作者需求为导向"的服务品牌,赢得广大护理人员的赞誉。

- 2007 年针对护理同仁护理研究及心理护理中存在的问题开辟专题系列讲座
- 订阅本刊并参加学习者可获 I 类继续教育学分
- 1 周回复初审结果,拟刊用的稿件通过电话、E-mail 指导修改,3 个月之内刊出
- 基金课题论文,研究生课题论文等优秀论文免审稿费走"快审通道",优先刊用
- 学术质量高,基金论文比在护理核心期刊中排名第二
- 对本刊读者的来稿开展"一对一"写作辅导

CN 44-1631/R, ISSN 1008-9969, 邮发代号: 46-200

定 价: 7 元/本, 84 元/年(包括邮资)

订 购: 国内各地邮局均可订阅,编辑部全年接受邮购

地 址: 广州市广州大道北 1838 号《南方护理学报》编辑部 邮 编: 510515

电 话: (020)87280550, 61641193, 61641192, (0711)41193(军线) 传 真: (020)87280550

电子邮件: nflhxb@fimmu.com; nanfangj@pub.guangzhou.gd.cn 网 址: www.hlxb.com.cn