文章编号:1000-5404(2006)20-2065-03

论著

丰富环境刺激对缺氧缺血性脑损伤大鼠脑神经丝蛋白表达的影响

于若谷,赵聪敏,王丽雁,张雨平,温恩赐 (第三军医大学新桥医院儿科,重庆 400037)

提 要:目的 研究丰富环境刺激对缺氧缺血性脑损伤(hypoxic-ischemic brain injury, HIBI)大鼠脑神经丝(neurofilament, NF)蛋白的影响。**方法** 大鼠分为正常对照组12只、缺氧缺血非干预组及丰富环境干预组各20只,干预组予早期抚触和丰富环境刺激共28 d,行为学测定后,利用免疫组织化学方法观察各组海马神经丝蛋白的染色情况,并借助自动图像分析系统对其进行定量分析。**结果** 非干预组左侧脑组织NF表达较干预组及正常对照组明显减少,左侧与右侧脑组织NF-H积分光密度值之比(L: R_{NF})非干预组明显小于对照组及干预组($P<0.01$),干预组与对照组无显著差异($P>0.05$)。Morris水迷宫测试表明远期学习记忆能力非干预组明显低于对照组及干预组($P<0.01$),干预组与对照组无显著差异($P>0.05$)。**结论** 早期抚触和丰富环境刺激有助于促进缺血缺氧脑损伤恢复,促进脑组织神经网络重建是其可能的机制之一。

关键词: 丰富环境;缺氧缺血性脑损伤;神经丝蛋白
中图法分类号: R174;R341;R743.31 **文献标识码:** A

Effects of early enriched environment intervention on neurofilament protein expression in rats with hypoxic-ischemic brain injury

YU Ruo-gu, ZHAO Cong-min, WANG Li-yan, ZHANG Yu-ping, WEN En-yi (Department of Pediatrics, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To investigate effect of enriched environment on neurofilament protein (NF) expression in the rats with hypoxic-ischemic brain injury (HIBI). **Methods** Totally 52 7-day-aged rats were divided into normal control group ($n=12$), and the left 40 into HI non-intervention group($n=20$) and EE intervention group($n=20$) after establishment of HIBI model. EE intervention group received touch and enriched environment stimulus for 28 d. After determination of ethology, the expression of NF protein was observed in the hippocampus and the results were analyzed quantitatively with image analysis system. **Results** Compared with normal control group and EE intervention group, the NF expression and the ratio of integrated optical density of NF in right to left brain (L: R_{NF}) were decreased in HI non-intervention group, while no difference was seen in the normal control group and EE intervention group. Morris water maze indicated that long-term memory of HI non-intervention group was much lower than that of normal control group and EE intervention group ($P<0.01$), but EE intervention group was similar in normal control group. **Conclusion** Touch and enriched environment stimulus conduce to attenuate HIBI, probably by the mechanism of promoting neural network's re-establishment.

Keywords: enriched environment; hypoxic-ischemic brain damage; neurofilament protein

缺氧缺血性脑损伤(hypoxic-ischemic brain injury, HIBI)是围产期严重威胁新生儿健康的一种常见疾病,严重影响儿童生活质量,但迄今为止尚无理想的治疗方法。目前普遍认为早期干预有助于脑损伤康复,早期环境干预包括早期抚触和丰富环境刺激,环境刺激可影响脑的形态和功能,如前脑皮层增厚,神经元胞体增大,树突分枝增多,动物的记忆能力增强等[1-3],对脑发育具有重要作用。本实验通过检测HIBI大鼠脑组织中脑神经丝蛋白(neurofilament protein, NFP)的含量,探讨早期抚触和丰富环境刺激对于促进缺血缺氧的脑组织恢复及脑组织神经网络重建的可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 小鼠抗大鼠磷酸化NF-H单抗(一抗)购自美国NeoMarkers公司,免疫组化染色SABC试剂盒及DAB染

作者简介:于若谷(1974-),女,重庆市人,硕士,主治医师,主要从事脑损伤早期干预方面的研究。电话:(023)68774102,E-mail: yrgmail@163.com
通讯作者:赵聪敏,电话:(023)68755602
收稿日期:2005-10-31;修回日期:2006-06-15

色试剂盒购自武汉博士德生化试剂公司，牛血清白蛋白（BSA）购自美国 Sigma 公司。

1.1.2 实验动物及分组 选择 7 d 龄（P7）健康 SD 大鼠，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 12～15 g，共 52 只。按照实验设计分为正常对照组（12 只）、缺氧缺血非干预组及丰富环境干预组，每组 20 只。

1.2 方法

1.2.1 HIBI 模型

参照文献[4]方法：选择 7 d 龄 SD 大鼠，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，缝合皮肤后置于自制 1 L 容积缺氧仓内，以氧氮混合气（氧浓度为 8%）1～2 L/min 持续灌注 2 h，制成 HIBI 模型。缺氧仓置于恒温水浴箱中，维持环境温度在 37～37.5 ℃。缺氧后将新生鼠放回母鼠身边常规喂养。缺氧缺血后出现自发左旋或夹尾左旋者纳入实验。

丰富环境参照 Fernanandez 等的方法设计，在大笼子（42 cm×26 cm×21 cm）中放管道、秋千、梯子、会响的玩具、各色小球、泡花，每周改变环境 2 次。

缺氧缺血非干预组及丰富环境干预组：HIBI 模型制备过程如上所述。干预组：缺氧后 24 h 予毛刷从头到尾刷毛，每次 15 min，每日 2 次，至幼鼠睁眼后放置于丰富环境中，每次 2 h，每日 1 次。干预时间共 28 d。非干预组：HIBI 模型制备过程如上所述。饲养于 28 cm×18 cm×15 cm 的标准笼内，不予早期抚触及丰富环境刺激。正常对照组：不做缺血缺氧处理，饲养于 28 cm×18 cm×15 cm 的标准笼内，不予早期抚触及丰富环境刺激。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。

1.2.2 标本采集与制备 各组大鼠在第 35 天时予戊巴比妥钠 40～50 mg/kg 腹腔注射深麻醉，开胸剪开右心耳，以 4% 多聚甲醛经左心室灌注至流出液清亮。迅速断头取前脑，肉眼大体观察，切除额极 2 mm，剩余脑组织由中间等分，后部分常规脱水、石蜡包埋、连续冠状切片，片厚 10 μm，用于 HE 染色。前部分脑组织用 4% 多聚甲醛后固定 16 h，20% 蔗糖溶液浸泡至标本下沉，锡箔纸包裹，液氮冷冻 10 min，－70 ℃冰箱保存，－20 ℃恒冷切片机上连续冠状切片，片厚 20 μm，用于免疫组化。

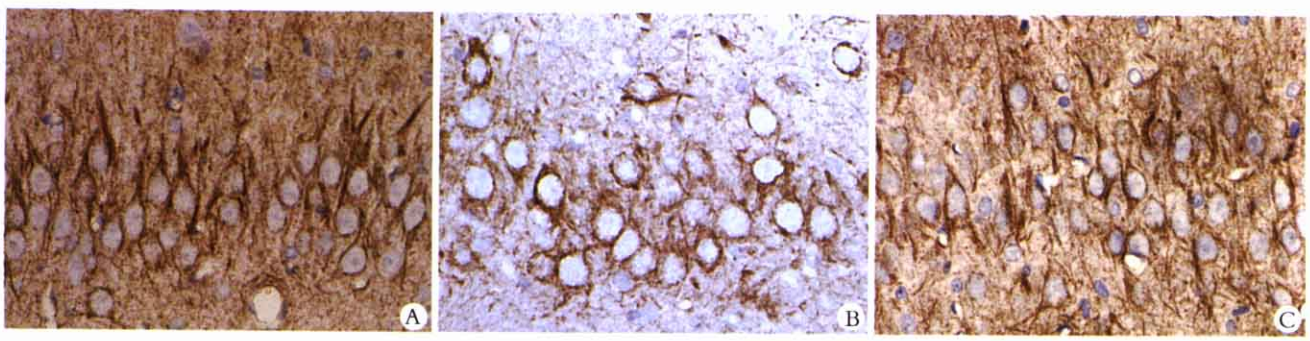
1.2.3 NF 免疫组化 切片在 PBS 液中浸泡 10 min，新鲜配制 0.6% H_2O_2 室温处理 30 min 后，用 PBS 液洗涤 3 次，每次 5 min，加入 10% 牛血清白蛋白（BSA），室温孵育 30 min，用正常山羊血清 1 滴/片封闭，室温 20 min 后加足量小鼠抗大鼠 NF 单克隆抗体（一抗），37 ℃孵育 1 h，再室温敷育过夜，PBS 液洗涤后加生物素标记羊抗小鼠 IgG（二抗）37 ℃孵育 20 min，加 SABC 37 ℃孵育20 min，DAB 显色。

1.2.4 图像分析 免疫组化染色结果采用真彩色医学图像分析软件（Midia Cybernetics 公司 image-proplus 4.5）进行分析。每张切片于选取前联合水平冠状切片，每张切片于双侧脑半球选择 3 个位置相应、不重复的视野，放大 400 倍，测出阳性染色积分光密度（IOD）值，将 3 个视野总 IOD 值作为该侧脑组织阳性染色 IOD 值，计算结扎血管侧与对侧 IOD 值之比，即左侧 IOD：右侧 IOD，以 L：R_{NF} 表示 NF IOD 比值。每例标本选择 3 张相邻切片，取平均值作为此例标本 L：R_{NF} 结果。每组 6 例。

1.2.5 远期学习记忆功能检测 新生鼠饲养至 1 月龄时各组随机各选 10 只用 Morris 水迷宫测试学习记忆功能。定位航行实验：训练前 24 h 将大鼠放入水迷宫中自由游泳 3 min 以熟悉迷宫环境。实验历时 4 d，每天在固定时间分上午、下午 2 个时间段，每个时间段训练 4 次。分别从池壁 4 个象限的中点将大鼠头朝池壁放入水池，记录大鼠从入水至爬上平台的时间，即隐匿平台逃避潜伏期（escape latency，EL），至 60 s 找不到平台，即将引其上平台，EL 记为 60 s，让大鼠在平台上休息 15 s。取实验第 4 天 EL，计算各组均数。隐匿平台逃避潜伏期反映动物获得经验的能力，即学习能力。空间探索实验：第 5 天进行空间探索实验，撤除平台，将大鼠随机从某一象限池壁中点头朝池壁放入水中，记录 2 min 穿越平台的次数。空间探索实验反映动物保持经验的能力，即记忆能力。

2 结果

嗅束、纹状体、胼胝体、内囊、外囊及皮层可见 NF-H 染色阳性。缺氧缺血非干预组左侧脑组织 NF 表达较右侧及正常对照组明显减少，左侧与右侧脑组织 NF-H 积分光密度值之比（L：R_{NF}），缺氧缺血非干预组（0.398±0.110）L：R_{NF} 值明显小于正常对照组（0.975±0.011）及丰富环境干预组（0.821±0.138）（$P<0.01$），干预组 L：R_{NF} 值与正常对照组无明显差异（$P>0.05$）（图 1）。



A：正常对照组；B：非干预组；C：干预组

图 1 各组大鼠左侧海马 CA1 区 NF 表达 （SABC×400）

Morris 水迷宫检测大鼠空间学习记忆功能。在定位航行实验中，各组大鼠隐匿平台逃避潜伏期（escape latency，EL）均随游泳次数增多而缩短。缺氧缺血非干预组 EL 较正常对照组明显延长（$P<0.01$），丰富环境干预组 EL 值较缺氧缺血非干预组缩短（$P<0.01$），较正常对照组有延长，但无显著差异（$P>0.05$）。在空间探索实验中，正常对照组大鼠运动轨迹主要集中在原平台位置，而缺氧缺血非干预组则多沿池壁游泳，撤去平台后 120 s 内，缺氧缺血非干预组跨越平台次数明显低于正常对照组（$P<0.01$），丰富环境干预组与正常对照组无显著差异（$P>0.05$）（表 1）。

表 1　早期干预 28 d 后 Morris 水迷宫实验结果（$n=10$）

组别	隐匿平台逃避潜伏期（s）	空间探索（次）
正常对照组	26.12 ± 4.03	4.91 ± 2.01
缺氧缺血非干预组	39.98 ± 7.86[a]	2.13 ± 1.33[a]
丰富环境干预组	29.06 ± 5.11[b]	4.45 ± 1.59

a：$P<0.01$，与正常对照组比较；b：$P<0.01$，与缺氧缺血非干预组比较

3　讨论

近年来，对缺血缺氧性脑损伤的发病机制的研究不断深入，但尚未完全阐明。目前普遍认为早期干预有助于脑损伤康复，有研究认为未成熟脑的可塑性强，通过早期干预可使新生鼠大脑皮层厚度与重量增加、神经胶质细胞增生明显、树突枝增多和突触增加等，使受损脑通过轴突绕道投射，树突出现不寻常的分叉，并产生非常规的神经突触等途径进行功能代偿[1-3]。本实验通过检测 HIBI 大鼠脑组织中 NFP 的含量，说明早期抚触和丰富环境刺激有助于促进缺血缺氧的脑组织恢复，促进脑组织神经网络重建是其可能的机制之一。

神经丝（neurofilaments，NF）和其它纤维蛋白形成相互交织的三维网状结构，在维持神经细胞的形态和运动功能、维持轴突的空间构型及其正常的神经信号传导速度中发挥重要的作用。由于 NFP-200 是神经元细胞质的中间丝，与其他的中间丝蛋白无交叉性反应，能特异地对神经元核周体、神经树突及轴突进行染色。神经元轴突的出芽和再生是神经元损伤及缺血时发生可塑性变化的重要标志[5,6]，因而 NFP-200 常被用于探查缺血性半影区神经元轴突的形态学变化及相关蛋白的表达，并由此证实神经元轴突的出芽及再生。大量研究证实，神经丝蛋白和突触素是反映神经元和突触功能状况的内在标志物之一[7,8]。

学习记忆的神经机制一方面依赖于中枢神经结构的可塑性，另一方面依赖于神经网络结构的完整性。神经系统运行中，一种信号的传导是多路并行的，不会因为某个轴突的障碍中断整个通路，但会影响信息传输的质量。因此神经传导通路发育越好，其信息传输量越大，对学习记忆的形成越有利。神经丝蛋白是神经元的骨架蛋白，是构成神经通讯网络的基本结构。研究表明[9]，神经网络结构的健全性是学习记忆功能的基础，学习记忆能力与神经丝蛋白阳性面积呈正相关，因此神经丝蛋白的表达强度是其特征性指征之一。

本实验结果显示，正常对照组双侧及 HIBI 组大鼠右侧（正常侧）NF 阳性纤维密集，粗细均匀，纹理清晰，左侧（缺血侧）NF 阳性纤维明显减少，着色浅淡，纤维变短、变细，纹理不清，同时左侧 NF 免疫反应物 IOD 值也明显低于对侧和对照组同侧（$P<0.05$），表明该区域内 NF 的表达量也明显降低。而丰富环境干预组左侧 NF 免疫反应物 IOD 值较正常对照组无显著性差异（$P>0.05$）。引起 NF 表达减少的原因可能有两方面[10,11]：一是能量代谢的降低可造成细胞内大量钙离子的内流和蓄积，从而激活大量蛋白水解酶，引起神经元内神经丝蛋白等结构蛋白的水解。二是神经丝蛋白合成能力下降。由于神经元的细胞骨架在维持神经细胞正常形态和轴浆运输方面具有至关重要的作用，因此神经丝蛋白表达的减少可导致神经元的合成、迁移和细胞内物质转运过程出现障碍，因而无法维持神经系统正常的功能活动。这也很可能是缺血缺氧性脑病患者出现功能障碍的原因之一。因此，本实验通过检测 HIBI 大鼠脑组织中 NFP 的含量，说明早期抚触和丰富环境刺激有助于促进缺血缺氧脑损伤恢复，促进脑组织神经网络重建是其可能的机制之一。

参考文献：

[1] VANNUCCI R C, PERLMAN J M. Interventions for perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy[J]. Pediatrics, 1997, 100(6): 1004 - 1014.

[2] BEDI K S, BHIDE P G. Effects of environmental diversity on brain morphology[J]. Early Hum Dev, 1988, 17(2-3): 107 - 143.

[3] TEATHER L A, MAGNUSSON J E, CHOW C M, *et al*. Environmental conditions influence hippocampus-dependent behaviours and brain levels of amyloid precursor protein in rats[J]. Eur J Neurosci, 2002, 16(12): 2405 - 2415.

[4] RICE J E, 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] STROEMER R P, KENT T A, HULSEBOSCH C E. Neocortical neural sprouting, synaptogenesis, and behavioral recovery after neocortical infarction in rats[J]. Stroke, 1995, 26(11): 2135 - 2144.

[6] SCHLAEPFER W W. Neurofilaments: structure, metabolism and implications in disease[J]. J Neuropathol Exp Neurol, 1987, 46(2): 117 - 129.

[7] AL-CHALABI A, MILLER C C. Neurofilaments and neurological disease[J]. Bioessays, 2003, 25(4): 346 - 355.

[8] GAMA-SOSA M A, FRIEDRICH V L Jr., DEGASPERI R, *et al*. Human midsized neurofilament subunit induces motor neuron disease in transgenic mice [J]. Exp Neurol, 2003, 184(1): 408 - 419.

[9] 郭德玉，李　斌，李　林. 大鼠生长及衰老过程中学习记忆能力与皮层神经丝蛋白表达关系[J]. 实验动物科学与管理，2003，20（增刊）：138 - 139.

[10] 蒲昭霞，赵聪敏，鲁利群. 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[J]. 第三军医大学学报，2006，28（8）：816 - 818.

[11] 于若谷，赵聪敏，王丽雁，等. 丰富环境干预后 HIBI 大鼠脑超微结构改变[J]. 第三军医大学学报，2006，28(8)：819 - 820.

（编辑　王　红）