文章编号:1000-5404(2006)20-2071-03

论著

早期丰富环境干预对缺氧缺血性脑损伤新生鼠海马GAP-43表达的影响

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 探讨早期丰富环境干预对缺氧缺血性脑损伤(hypoxic-ischemic brain injury, HIBI)新生大鼠海马生长相关蛋白(Growth-associated protein-43, GAP-43)表达的影响。**方法** 按Rice法制备SD大鼠HIBI模型,随机分为干预组和非干预组,假手术大鼠作为对照组。干预组大鼠于HIBI后第2天开始丰富环境干预,分别于术后第3、7、14、21、28天取各组大鼠脑组织进行免疫组织化学染色和RT-PCR检测,观察不同时间点各组大鼠海马GAP-43及其mRNA表达的差异。**结果** 非干预组大鼠海马GAP-43及其mRNA表达强于对照组($P<0.01$),干预组海马GAP-43表达于术后第14、21、28天强于非干预组,差异显著($P<0.05$),GAP-43mRNA表达于术后第7、14、21、28天强于非干预组,差异显著($P<0.05$)。**结论** 早期丰富环境干预可以增强HIBI新生大鼠海马GAP-43及其mRNA的表达,提示GAP-43表达的增多可能参与了丰富环境影响HIBI新生大鼠损伤修复的机制。

关键词: 脑缺血;脑缺氧;早期干预;环境;生长相关蛋白
中图法分类号: R338.26;R394.3;R743.31 **文献标识码:** A

Effects of early enriched environment intervention on GAP-43 expression in rat hippocampus after hypoxic-ischemic brain injury

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 early enriched environment intervention on the expression of growth-associated protein-43(GAP-43) in the hippocampus of rats with hypoxic-ischemic brain injury (HIBI). **Methods** After the establishment of HIBI model in SD rats by the method of Rice, the animals were divided randomly into 2 groups: the intervention group and non-intervention group. The sham-operation rats were used as control group. Enriched environment intervention had been administrated to the rats of intervention group since the 2nd day after HIBI. On the 3rd, 7th, 14th, 21st and 28th day, immunohistochemistry and RT-PCR were used to measure the expressions of GAP-43 protein and mRNA in the hippocampus of rats. **Results** The expression of GAP-43 protein and mRNA in the rat hippocampus were increased in the non-intervention group than in the control group($P<0.01$). The expressions of GAP-43 protein and mRNA were respectively much higher in the intervention group than in non-intervention group on the 14th, 21st and 28th day($P<0.05$), and on the 7th, 14th, 21st and 28th day($P<0.05$). **Conclusion** Early enriched environment intervention can increase the expressions of GAP-43 protein and mRNA in the hippocampus of HIBI rats, indicating that the up-regulation of GAP-43 expression may be associated with the effects of early enriched environment intervention on the rats with HIBI.

Key words: cerebral hypoxia; cerebral ischemia; early intervention; environment; growth-associated protein

新生儿缺氧缺血性脑损伤(hypoxic-ischemic brain injury, HIBI)至今仍是导致脑瘫、智力低下以及癫痫等多种慢性伤残情况的常见原因,目前尚缺乏理想有效的治疗手段。临床研究表明,早期丰富环境干预能够促进HIBI新生儿脑功能的恢复,但机制不清。基础研究也证实,丰富环境能增强发育期脑的可塑性,促进脑发育和成年动物各种脑损伤后脑功能的恢复,使感觉运动功能和学习记忆能力得到改善[1,2],但较少探讨其对于发育早期脑损伤修复的作用及机制。海马与学习记忆密切相关。因此,本实验采用新生大鼠HIBI模型,动态观察早期丰富环境干预对海马生长相关蛋白(growth-associated protein-43, GAP-43)及其

作者简介:鲁利群(1971-),女,重庆市人,硕士,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:2006-06-15

mRNA 表达的影响，探讨可能的作用机制，旨在为临床治疗提供基础理论支持和指导。

1 材料与方法

1.1 动物分组及模型制备

SPF 级 7 d 龄新生 SD 大鼠 95 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 12～16 g，按 Rice[3] 法制作 HIBI 模型。结扎左侧颈总动脉后置于氧浓度为 8% 的氧氮混合气缺氧舱内，以 0.5～1 L/min 的气体流量予缺氧 2 h，缺氧结束后大鼠全身发灰，部分伴抽搐，出现自发或夹尾左旋者纳入实验，回笼由母鼠行母乳喂养。存活至术后第 2 天大鼠共 85 只，选取 80 只分为干预组和非干预组 2 组，每组 40 只。另选体质量范围相同 7 d 龄 SD 大鼠 40 只，仅分离左侧颈总动脉，不予结扎和缺氧，作为对照组。每组分 5 个时相点，即术后 3、7、14、21、28 d，每个时相点 8 只大鼠。

1.2 早期丰富环境干预

干预组术后第 2 天开始干预，环境干预参照文献[4]进行。1 只母鼠哺育 8 只幼鼠，每日将幼鼠与母鼠一起，以明暗红色灯光刺激视觉发育，播放轻音乐刺激听觉发育，放入柠檬、玉米穗、树叶等刺激嗅觉发育，放入绒线、刨花、木板、玻璃瓶等刺激触觉及温度觉发育，持续 1 h。术后 8 d（即幼鼠生后 15 d，睁眼开始）至 28 d，每日将幼鼠与母鼠分离 1 h，给予丰富环境刺激。丰富环境为 70 cm×60 cm×50 cm 的透明有机玻璃大笼，边框颜色鲜艳，笼顶为铁纱网，笼内放置不同颜色、形状的物体，包括 PVC 管道、斜坡、秋千和玩具等。每 3 天改变环境 1 次，以造成新异刺激。总干预时间为 28 d。非干预组和对照组 1 只母鼠哺育 5 只幼鼠，饲养于 28 cm×18 cm×15 cm 的不透明标准笼内，不予上述任何刺激。2 组均提供 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 免疫组织化学法实验取材及检测

1.3.1 实验取材　每组分别于术后 3、7、14、21 d 及 28 d 时，各取 4 只大鼠，心脏灌注固定取脑组织，常规石蜡包埋行冠状位连续切片。

1.3.2 免疫组化法检测　一抗为小鼠抗大鼠 GAP-43 单克隆抗体（Sigma，1∶800）。按 S-P 免疫组化试剂盒说明书进行操作，DAB 显色。对照实验切片用 PBS 代替一抗孵育，其他步骤相同。

1.3.3 图像分析　每只大鼠分别取含海马组织切片 3～4 张，每例动物的切片断面均相似，应用图像分析系统测定海马各区 GAP-43 的光密度值（OD 值），同时测定同一张切片上视束的 OD 值作为背景，GAP-43 的 OD 值减去背景的 OD 值得到矫正 OD 值（COD 值），即 GAP-43 免疫反应产物的实际光密度值。用 COD 值进行比较分析，以避免非特异性染色所造成的误差。

1.4 RT-PCR 引物合成和检测

1.4.1 引物合成　按 GAP-43mRNA 基因序列，由深博生物有限公司设计并合成 2 个寡核苷酸引物，预期扩增产物长度 405 bp。以磷酸甘油醛脱氢酶（GAPDH）作为内参，预期扩增产物长度为 289 bp。

1.4.2 RT-PCR 法检测　分别取各时相点两组大鼠海马组织 80～100 mg，采用 Trizol 试剂提取总 RNA，测 $D(260)/D(280)$ 于 1.7～2.0 之间，按 RT-PCR 试剂盒说明书进行逆转录和基因扩增，退火温度为 58 ℃，循环次数为 34 次。以 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。用凝胶成像仪对 RT-PCR 产物的电泳条带进行光密度分析，结果以所测定的目的条带的光密度值与内参条带的光密度值之比（GAP-43/GAPDH）表示。

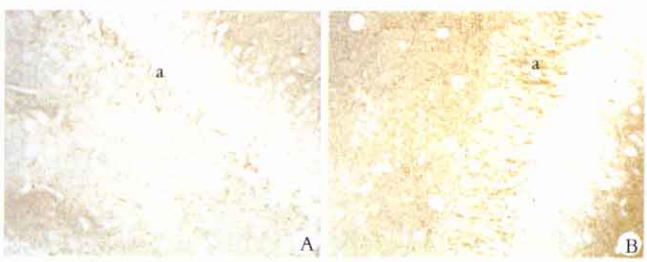
1.5 统计学分析

所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示，用 SPSS 11.0 统计软件进行单因素方差分析，组间比较采用 Tukey 法。

2 结果

2.1 免疫组化染色结果

光镜下观察，海马 GAP-43 免疫组化阳性物质为棕黄色颗粒，沉积于锥体细胞的胞体及主树突干周围，神经元细胞质及主树突干不着色，颗粒细胞膜、神经胶质细胞膜及神经纤维网也有较多阳性颗粒沉积，非干预组和对照组 GAP-43 免疫阳性颗粒较干预组染色浅，数量少（图 1A、B）。图像分析结果显示，与对照组比较，各时间点非干预组 COD 值显著增高（$P<0.01$），干预组 COD 值于术后 14、21 d 及 28 d 时较非干预组增高，差异显著（$P<0.05$），而术后 3 d 和 7 d 两组 COD 值差异不显著（$P>0.05$）。见表 1。



A：非干预组；B：干预组　a：GAP-43 阳性颗粒

图 1　HIBI 后 14 d 大鼠海马 DG 区 GAP-43 表达　（S-P×400）

2.2 RT-PCR 检测结果

凝胶成像分析结果显示，大鼠海马神经组织中，非干预组 GAP-43mRNA/GAPDHmRNA D 值之比于各时间点显著高于对照组（$P<0.01$），干预组 D 值之比于术后 7、14、21 d 及 28 d 时较非干预组增高，差异显著（$P<0.05$），术后 3 d 差异不明显（$P>0.05$）。见表 2、图 2。

表 1　丰富环境干预对 HIBI 新生大鼠海马 GAP-43 COD 值的影响（$n=4$）

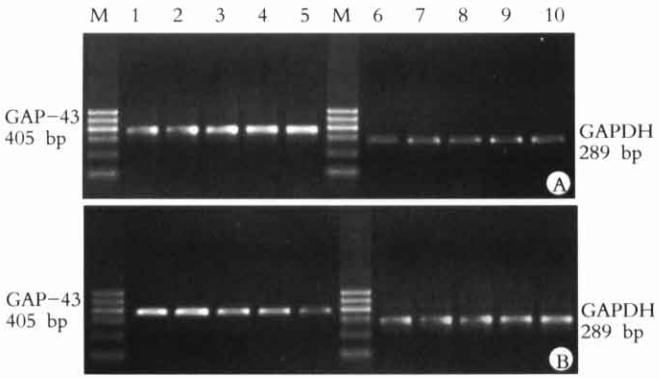
组别	3 d	7 d	14 d	21 d	28 d
对照组	0.653 6±0.039 1	0.861 4±0.047 2	0.552 6±0.030 8	0.471 6±0.042 3	0.369 5±0.037 0
非干预组	0.916 6±0.051 4[a]	1.156 3±0.041 9[a]	1.162 5±0.037 4[a]	1.132 8±0.025 7[a]	0.852 2±0.048 3[a]
干预组	1.038 2±0.045 8	1.180 5±0.039 4	1.445 8±0.053 5[b]	1.423 7±0.029 8[b]	1.152 1±0.036 5[b]

a：$P<0.01$ 与对照组比较；b：$P<0.05$ 与非干预组比较

表 2　丰富环境干预对 HIBI 新生大鼠海马 GAP-43mRNA/GAPDH mRNA *D* 值比的影响（$n=4$）

组别	3 d	7 d	14 d	21 d	28 d
对照组	1.53 ± 0.27	1.15 ± 0.19	1.06 ± 0.14	0.63 ± 0.30	0.52 ± 0.36
非干预组	2.18 ± 0.33[a]	2.26 ± 0.15[a]	2.23 ± 0.25[a]	1.87 ± 0.28[a]	1.54 ± 0.14[a]
干预组	2.25 ± 0.35	2.74 ± 0.13[b]	2.58 ± 0.21[b]	2.31 ± 0.17[b]	1.96 ± 0.23[b]

a：$P<0.01$，与正常对照组比较；b：$P<0.05$，与非干预组比较



A：非干预组，M：标准；1、6：术后 28 d；2、7：术后 21 d；3、8：术后 14 d；4、9：术后 7 d；5、10：术后 3 d

B：干预组，M：标准；1、6：术后 3 d；2、7：术后 7 d；3、8：术后 14 d；4、9：术后 21 d；5、10：术后 28 d

图 2　GAP-43 mRNA 表达（RT-PCR）

3　讨论

丰富环境是指动物的饲养环境空间较大，成员较多，内置物体丰富而新奇，能够充分提供多感官刺激、运动和社交的机会[6]。参照国外文献，本实验针对新生大鼠设计制作了丰富环境模型，力求全面输入视觉、听觉、触觉、嗅觉、本体觉和温度觉等多感官刺激，并给予活动和相互交往的机会。新生大鼠随日龄增加皮质神经元的线粒体、粗面内质网和游离核糖体明显增多，直至 2 周，所以 2 周内是新生大鼠脑发育的高峰期和关键期[7]。关键期内，脑在结构和功能上都具有很强的适应和重组的能力[8]。由于 2 周内幼鼠尚未睁眼，睡眠多，活动少，所以，本实验从幼鼠 HIBI 后第 2 天即开始通过声音、气味、明暗灯光、冷暖及软硬物体等进行早期刺激。

本实验对 HIBI 新生大鼠进行早期丰富环境干预，结果显示，与对照组比较，非干预组海马 GAP-43 及其 mRNA 的表达增高，说明新生大鼠发生 HIBI 后，海马轴突生长和突触重建十分活跃，其神经可塑性和自我修复能力较强。与非干预组比较，干预组海马 GAP-43 及其 mRNA 表达量分别在干预 7 d 和 14 d 后增加明显（$P<0.05$），表明较短时间内的丰富环境刺激，就能引起脑内 GAP-43 核酸和蛋白水平的显著变化。但干预时间过短，如干预 3 d 后，其增高不明显（$P>0.05$）。随着干预时间延长直至 28 d，GAP-43 蛋白和核酸的表达仍然维持在一个较高的水平，明显高于非干预组（$P<0.05$）。由此表明，较短时间内的丰富环境干预就能使海马组织出现分子水平的改变，并持续较长时间，推测 GAP-43 上游物质的改变应该更早。

研究证实，神经环路的重建需要新蛋白的转录翻译和细胞骨架成分的活化，进而改变原有的突触连接。在发育及损伤后的可塑性改变中，多种转录因子参与了对下游蛋白的调控。内外环境因素的改变，通常通过神经递质或神经营养因子结合细胞膜 NMDA 受体通道，活化相应信号途径，再引起转录因子磷酸化。与神经生长发育和突触形成密切相关的蛋白如 GAP-43，即处于这些信号途径的调控下[9]。GAP-43 位于神经元轴突生长锥质膜，能启动生长锥形成，引导轴突生长，调节轴突形成新的突触联系[10]。所以，尽管 HIBI 会导致神经元凋亡坏死和突触联系中断，但丰富环境干预后 GAP-43 表达的增加，将会促使存活神经元轴突再生及突触重建，代偿损伤中断的神经环路，从而恢复脑功能。因此，GAP-43 的增多可能参与了丰富环境影响 HIBI 新生鼠损伤修复的机制。

参考文献：

[1] ARNAIZ S L, D' AMICO G, PAGLIA N, *et al*. Enriched environment, nitric oxide production and synaptic plasticity prevent the aging-dependent impairment of spatial cognition [J]. Mol Aspects Med, 2004, 25(1-2): 91 - 101.

[2] PINAUD R. Experience-dependent immediate early gene expression in the adult central nervous system: evidence from enriched-environment studies [J]. Int J Neurosi, 2004, 114(3): 321 - 333.

[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] PUURUNEN K, SIVENIUS J. Influence of enriched environment on spatial learning following cerebral insult [J]. Rev Neurosci, 2002, 13(6): 347 - 364.

[5] SALE A, PUTIGNANO E, CANCEDDA L, *et al*. Enriched environment and acceleration of visual system development[J]. Neuropharmacology, 2004, 47(5): 649 - 600.

[6] DOBROSSY M D, DUNNETT S B. Environmental enrichment affects striatal graft morphology and functional recovery [J]. Eur J Neurosi, 2004, 19(1): 159 - 168.

[7] LIU Q, WONG-RILEY M T. Postnatal developmental expressions of neurotransmitters and receptors in various brain stem nuclei of rats [J]. J Appl Physiol, 2005, 98(4): 1442 - 1457.

[8] KNUDSEN E I. Sensitive periods in the development of the brain and behavior[J]. J Cogn Neurosi, 2004, 16(8): 1412 - 1425.

[9] JOHNSTON M V. Injury and plasticity in the developing brain [J]. Exp Neurol, 2003, 184(Suppl 1): S37 - S41.

[10] FARINA V, GADAU S, LEPORE G, *et al*. Growth-associated protein expression in the frontal and occipital cortices of callosotomized rats [J]. Funct Neurol, 2004, 19(3): 181 - 184.

（编辑　王　红）