论著

文章编号:1000-5404(2009)22-2178-03

丰富与贫瘠环境对新生鼠脑损伤后脑功能的影响

鲁利群,江 俊,杨 欣,刘松梅 (成都医学院第一附属医院儿科,成都 610500)

摘 要:目的 研究丰富与贫瘠环境对缺氧缺血性脑损伤(hypoxic-ischemic brain damage, HIBD)后脑功能的影响。**方法** 制备3 d龄SD大鼠HIBD模型,随机数字表法分为丰富环境组(enriched environment, EE)、贫瘠环境组(impoverished environment, IE)和标准环境组(standard environment, SE)。另设假手术组作为对照。各组大鼠于术后第2天开始分别给予不同环境刺激。术后32 d,应用悬吊和斜坡实验测试感觉运动功能,Morris水迷宫实验了解学习记忆能力,免疫组织化学染色检测皮层和海马胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)的表达。**结果** 感觉运动和学习记忆能力测试发现,IE组明显差于SE组($P<0.01$),SE组差于Sham组和EE组($P<0.01$),Sham组和EE组无显著差异($P>0.05$)。皮层和海马GFAP免疫组织化学染色结果显示,Sham组GFAP阳性细胞数分别低于其他3组($P<0.01$),而SE组低于EE组,高于IE组($P<0.01$)。**结论** 丰富环境增加新生鼠脑损伤后GFAP的表达,改善脑功能;贫瘠环境加重脑功能的损害。

关键词: 缺氧缺血;环境;胶质纤维酸性蛋白;脑功能;早产

中图法分类号: R338.2;R339.5;R742 **文献标识码:** A

Effects of enriched environment and impoverished environment on brain function of premature rats after hypoxic-ischemic brain damage

LU Li-qun, JIANG Jun, YANG Xin, LIU Song-mei (Department of Pediatrics, First Affiliated Hospital, Chengdu Medical College, Chengdu 610500, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of enriched environment and impoverished environment on brain function after hypoxic-ischemic brain damage (HIBD). **Methods** Three-day-old SD rats, which were divided into enriched environment group (EE), standard environment group (SE) and impoverished environment group (IE) by random digits table were used to establish HIBD model. The sham-operation rats served as control group. Different environment stimulations were administrated to the rats respectively since the 2nd day after HIBD. On the 32nd day, hanging test and incline plane test were carried out to evaluate the sensorimotor function. Morris water maze was used to evaluate the learning and memory ability. The expression of GFAP in the cortex and hippocampus was measured by the method of immunohistochemistry. **Results** The brain function of IE group was much worse than that of SE group ($P<0.01$), and the function of SE group was worse than that of sham group and EE group ($P<0.01$). There was no significant difference between sham group and EE group ($P>0.05$). Immunohistochemical analysis showed the expression of GFAP in the cortex and hippocampus of Sham group was significantly lower than that of other groups ($P<0.01$), and the expression of GFAP of SE group was lower than that of EE group, but higher than that of IE group ($P<0.01$). **Conclusion** Enriched environment stimulation increases the expression of GFAP in the brain of premature rats after HIBD, and improves the brain function. Impoverished environment stimulation impairs the brain function.

Key words: hypoxic-ischemia; environment; glial fibrillary acidic protein; brain function; premature

围产技术的提高使得早产儿存活率逐年增高,但随之由早产儿脑损伤所导致的神经系统伤残者也明显增多[1]。临床观察发现,生活环境的差异对缺氧缺血性脑损伤(hypoxic-ischemic brain damage, HIBD)患儿预后有显著不同影响,如被亲人冷落、遗弃,生活于孤独、贫瘠环境者,常常出现体智能发育的严重障碍,而

基金项目: 成都医学院校基金(CYZ07-004)
Supported by the Science Foundation of Chengdu Medical College (CYZ07-004)

作者简介: 鲁利群,女,重庆市人,博士研究生,副主任医师,主要从事新生儿脑损伤方面的研究。电话:(028)83016674, E-mail: luliqun7@tom.com

收稿日期: 2009-06-15;**修回日期:** 2009-09-22

生活于丰富多彩环境者其症状常常能得到不同程度的改善甚至消失。既往的研究多着眼于环境因素对足月儿 HIBD 的影响及机制探讨,但不同环境对早产儿脑损伤的影响尚少见研究报道。本实验采用 3 日龄新生大鼠 HIBD 模型,模拟早产儿脑损伤,给予丰富和贫瘠环境刺激,观察大鼠脑胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)表达和脑功能的变化,旨在探讨丰富环境刺激的作用及机制,为临床改善环境,治疗早产儿脑损伤提供理论支持。

1　材料与方法

1.1　动物分组及模型制备

SPF 级 3 日龄新生 SD 大鼠 60 只(由本校实验动物中心提供),雌雄不限,体质量 7 ~ 9 g。新生鼠 HIBD 模型参照 7 日龄大鼠 HIBD 模型制作方法[2,3]。模型制作成功 37 只,失败 5 只,死亡 18 只。因代乳母鼠有限,仅选取 30 只按质量编号,查随机数字表分为丰富环境(enriched environment, EE)组、贫瘠环境(impoverished environment, IE)组和标准环境(standard environment, SE)组,每组 10 只。另取 10 只幼鼠设假手术组,只分离颈总动脉,不予结扎和缺氧处理。

1.2　丰富和贫瘠环境刺激

EE、SE、IE 参照文献[4]设计。环境刺激方法同文献[2],总刺激时间为 32 d。环境刺激结束后进行脑功能测试。

1.3　感觉运动功能测试

悬吊实验:使大鼠前腿抓住一水平的玻璃棒(直径 0.5 cm),离开桌面 45 cm ,记录大鼠抓棒至掉下的时间。评分标准:1 分, <10 s;2 分,10 ~ 30 s;3 分,30 s 至 2 min;4 分,2 ~ 5 min;5 分, >5 min。每只大鼠非连续测试 5 次,1 次/d,取其平均值。

斜坡实验:将大鼠头向下倒置于 45°斜面上,记录大鼠转为头向上角度 >135°所需时间。

1.4　学习记忆能力测试

Morris 水迷宫实验包括定位航行实验和空间探索实验,水迷宫设置和实验方法参照文献[2]。

1.5　GFAP 免疫组织化学检测

脑功能测试结束后,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 GFAP 多克隆抗体(1∶200,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。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),对每张切片皮层及左侧海马各区所有 GFAP 免疫阳性细胞进行计数,计数高倍视野下(400 倍)随机 10 个视野阳性细胞数,取其平均值。

1.6　统计学分析

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 12.0 统计软件进行单因素方差分析。

2　结果

2.1　环境对 HIBD 新生鼠感觉运动功能和学习记忆能力的影响

在前 4 d 的定位航行训练和第 5 天的空间探索实验中,假手术组和 EE 组大鼠游泳轨迹以趋向式为主,目标直接趋向隐匿平台,在平台所在象限轨迹最多;而 SE 组以无目的的随机式为主,IE 组则以随机式和绕水池边缘游走的边缘式为主,游泳轨迹密集度在各象限无明显差别。各组实验结果见表 1。

表 1　不同环境对 HIBD 新生鼠脑功能的影响 ($n = 10, \bar{x} \pm s$)

组别	感觉运动功能		学习记忆能力	
	悬吊实验(分)	斜坡实验(s)	定位航行实验逃避潜伏期(s)	空间探索实验穿台次数
假手术组	4.8 ± 0.6[a]	2.5 ± 1.4[a]	17.28 ± 4.36[a]	6.3 ± 1.72[a]
标准环境组	2.6 ± 0.8	6.7 ± 2.2	33.05 ± 6.44	4.8 ± 1.61
丰富环境组	4.2 ± 1.0[a]	3.0 ± 1.5[a]	20.15 ± 4.49[a]	6.5 ± 1.12[a]
贫瘠环境组	1.8 ± 0.5[a]	9.3 ± 1.6[a]	49.30 ± 7.18[a]	2.2 ± 1.50[a]

a:$P < 0.01$,与标准环境组比较

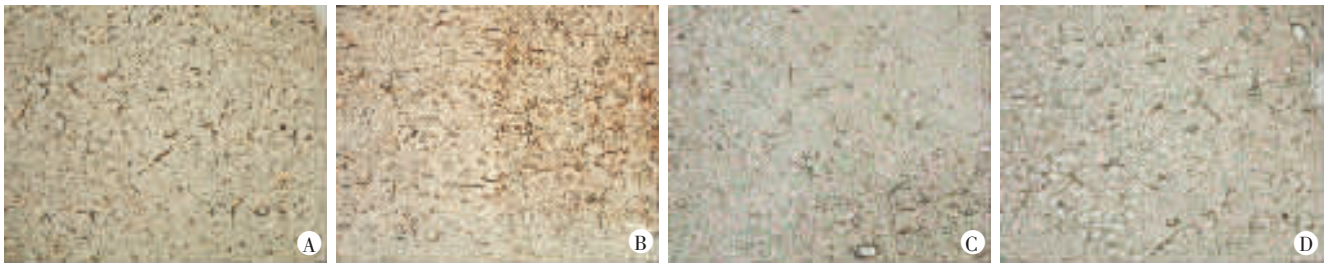
2.2　环境对 HIBD 新生鼠脑 GFAP 表达的影响

光镜观察发现,GFAP 阳性颗粒主要位于细胞胞体和突起,假手术组新生鼠皮层和海马 GFAP 阳性细胞较少,分布较稀疏,胞体小,突起细短,染色淡,而 SE 组、EE 组和 IE 组可见较多 GFAP 阳性细胞,细胞胞体大,突起略细而长,染色深(表 2、图 1)。

表 2　不同环境对 HIBD 新生鼠脑 GFAP 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	GFAP 阳性细胞数
假手术组	10	18.17 ± 2.52
标准环境组	10	31.40 ± 2.91[a]
丰富环境组	10	43.08 ± 1.47[ab]
贫瘠环境组	10	25.54 ± 2.68[ab]

a:$P < 0.01$,与假手术组比较;b:$P < 0.01$,与标准环境组比较



A:标准环境组;B:丰富环境组;C:假手术组;D:贫瘠环境组

图 1　免疫组化观察各组大鼠脑 GFAP 表达 (S-P ×400)

3 讨论

调查显示,早产儿脑损伤的发生率约为10%。极早产儿中10% ~15%发展为脑瘫,50%出现学习障碍[1]。宫内感染和缺氧窒息是早产儿脑损伤的主要原因,脑室周围白质软化则是其主要损伤形式。表现为少突胶质细胞减少,轴突肿胀破坏,髓鞘弥漫性损伤,星形胶质细胞肥大增生,神经元之间、皮质和皮质下中枢之间的信号传导受阻,神经移行及信息整合异常,出现运动、认知和行为等障碍[5]。减少后遗神经障碍的发生是目前治疗的关键。

廖伟等[6]采用2 d龄新生鼠HIBD模型进行丰富环境干预,发现适度的丰富环境刺激有利于脑室周围白质损伤的修复。早产儿脑损伤的动物模型众多,3 d龄新生大鼠相当于胎龄24 ~28周的可存活早产儿[7]。本实验制作3 d龄新生大鼠HIBD模型后,测试其感觉运动功能(反映动物肢体肌力及躯体平衡力,与皮层功能有关)和学习记忆能力(与海马功能有关),结果与文献[7]报道一致,即丰富环境有利于HIBD新生鼠脑功能的恢复。同时,IE组脑功能实验成绩较SE组差,说明贫瘠环境不利于新生鼠脑损伤后脑功能的恢复。结果的差异主要由环境因素的差异所致。EE组大鼠在开眼前给予触觉、听觉和嗅觉刺激,开眼后再加以视觉、运动和社交刺激。推测外界丰富信息的反复刺激,以及积极主动的运动锻炼,使中断的信号传导出现再通,或重建信号传导通路,中枢信息重新整合,形成新的神经环路,从而改善脑功能。而IE组大鼠断奶前除了仅有母鼠陪伴外(断奶前幼鼠离开母鼠难以存活),无上述任何丰富的多感官刺激,且生活孤独,生活空间狭小。少而单调的外界信息刺激,消极被动的运动形式,显然不利于脑功能的改善。

神经元凋亡、坏死及再生往往是脑损伤的研究重点,然而星形胶质细胞是中枢神经系统中数量最多的神经细胞之一,在神经元迁移、脑损伤修复再生中也发挥了重要作用,如合成和分泌各种多肽因子与细胞外基质,调控神经元微环境,对电信号、神经递质、激素等刺激发生反应,促进神经再生等[8]。研究也证实,未成熟脑脑室周围白质中的星型胶质细胞对缺血和炎症具有反应性和易损性,其功能和反应性的正常维持对保护白质完整、加强神经再生和脑损伤修复具有重要意义[9]。GFAP是一种相对分子质量为(50 ~52) $\times 10^3$的酸性蛋白,在活性星形胶质细胞中表达相对较多,常作为星形胶质细胞的特异性标记物。本实验假手术组脑GFAP表达较低,GFAP阳性细胞数低于3个模型组,表明新生鼠HIBD后星形胶质细胞反应性增多,活性增强,机体具有损伤后自我修复的能力。Skoff等[10]研究发现,新生动物缺氧缺血后短时间内大量神经元和胶质细胞受损,而较长时间后神经细胞会再表达其内部特征,并进行解剖上的修复。如缺氧缺血后1个月,脑仍经历巨大的神经元变性,如广泛的神经炎,轴突和树突产生生长锥,大量未成熟突触形成和小轴突的髓鞘形成。本实验系大鼠HIBD后约1个月,脑GFAP阳性细胞数在EE组、SE组和IE组中依次减少,表明其星形胶质细胞反应在3组中的递减,由星形胶质细胞对于脑损伤修复的作用,可推测EE组脑的损伤修复功能最好,IE组最差。此与前述3组脑功能测试结果相吻合,也提示星形胶质细胞的活性变化可能参与了丰富与贫瘠环境影响新生鼠脑损伤修复的生理机制,但其具体机制仍不清楚,有待进一步探讨。

参考文献:

[1] Marret S, Foix-L'helias L, Ancel P Y, *et al*. Is it possible to protect the preterm infant brain and to decrease later neurodevelopmental disabilities? [J]. Arch Pediatr, 2008, 15 (Suppl 1): S31 - S41.

[2] 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.

[3] Back S A, Rivkees S A. Emerging concepts in periventricular white matter injury[J]. Semin Perinatol, 2004, 28(6): 405 - 414.

[4] Hicks A U, Hewlett K, Windle V, *et al*. Enriched environment enhances transplanted subventricular zone stem cell migration and functional recovery after stroke [J]. Neuroscience, 2007, 146(1): 31 - 40.

[5] Deng W, Pleasure J, Pleasure D. Progress in periventricular leukomalacia[J]. Arch Neurol, 2008, 65(10): 1291 - 1295.

[6] 廖 伟, 赵聪敏, 温恩懿, 等. 早期丰富环境干预对未成熟大鼠脑室周围白质软化脑功能的影响[J]. 实用儿科临床杂志, 2007, 22(20): 1570 - 1572.

[7] Stadlin A, James A, Fiscus R, *et al*. Development of a postnatal 3-day-old rat model of mild hypoxic-ischemic brain injury [J]. Brain Res, 2003, 993(1 - 2): 101 - 110.

[8] Mishima T, Sakatani S, Hirase H. Intracellular labeling of single cortical astrocytes *in vivo*[J]. J Neurosci Methods, 2007, 166(1): 32 - 40.

[9] Sen E, Levison S W. Astrocytes and developmental white matter disorders [J]. Ment Retard Dev Disabil Res Rev, 2006, 12(2): 97 - 104.

[10] Skoff R P, Bessert D, Barks J D, *et al*. Plasticity of neurons and glia following neonatal hypoxic-ischemic brain injury in rats[J]. Neurochem Res, 2007, 32(2): 331 - 342.

(编辑 汪勤俭)