

新生小鼠兴奋毒性脑损伤的神经行为功能研究

齐志业, 贺湘英, 李琪, 莫亚雄, 梁琨

(昆明医学院第一附属医院儿科, 云南 昆明 650032)

[摘要] 目的 探讨兴奋毒性脑损伤模型小鼠神经行为功能改变情况,为围生期脑损伤的神经保护研究提供新的实验方法。方法 生后5日ICR种小鼠55只,采用完全随机的方法分为空白组、生理盐水组和鹅膏蕈氨酸(ibotenic acid, IA)组,用IA建立兴奋毒性脑损伤模型,小鼠生后第6,7,8,9,10日进行平面翻正实验、生后第8,10,12日进行游泳实验、生后第33和34日进行Y-迷宫分辨学习实验。结果 IA组小鼠生后第6~10日翻正实验时间为 2.12 ± 0.61 、 1.86 ± 0.65 、 1.50 ± 0.51 、 1.28 ± 0.29 、 1.01 ± 0.15 ,明显长于空白组和生理盐水组($P < 0.05$),生后第8~12日游泳实验评分为 6.33 ± 0.98 、 6.87 ± 0.74 、 7.13 ± 0.64 ,明显低于空白组和生理盐水组($P < 0.05$);IA组Y-迷宫分辨学习实验“学会”次数为 19.79 ± 2.42 ,明显多于空白组和生理盐水组的 16.29 ± 2.48 、 16.30 ± 2.37 ($P < 0.05$)、正确反应率86.7%,明显低于空白组和生理盐水组的96.5%、95.0%($P < 0.05$)。结论 新生小鼠兴奋毒性脑损伤模型发育反射和学习记忆功能都受到损伤,可以用行为学的方法对兴奋毒性脑损伤小鼠早期发育反射和远期行为进行评估。 [中国当代儿科杂志,2009,11(3):191-193]

[关键词] 鹅膏蕈氨酸;兴奋毒性;脑损伤;行为;新生小鼠

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2009)03-0191-03

Neurobehavioral function of neonatal mice following excitotoxic brain damage

QI Zhi-Ye, HE Xiang-Ying, LI Qi, MO Ya-Xiong, LIANG Kun. Department of Pediatrics, First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650032, China (Liang K, Email: liangkun@public.km.yn.cn)

Abstract: Objective To assess the changes of neurobehavioral function in a neonatal mouse model of excitotoxic brain damage. **Methods** Fifty-five 5-day-old ICR neonatal mice were randomly assigned to three groups: blank (no intravenous) control ($n = 20$), saline control ($n = 20$) and excitotoxic brain damage model (ibotenic acid treatment, $n = 15$). Behavioral function was evaluated by the surface righting reflex test (postnatal days 6-10), the swimming test (postnatal days 8-12) and the Y-maze discrimination learning test (postnatal days 33-34). **Results** Righting time in the surface righting reflex test in the ibotenic acid treatment group on postnatal days 6-10 was more prolonged than that in the two control groups ($P < 0.05$). Swimming test scores in the ibotenic acid treatment group were significantly lower than those in the two control groups ($P < 0.05$). In the Y-maze discrimination learning test, the mice from the ibotenic acid treatment group performed significantly worse than two control groups, presenting with increased learning times (19.79 ± 2.42 vs 16.29 ± 2.48 or 16.30 ± 2.37 ; $P < 0.05$) and achieving a lower correct percentage (86.7% vs 96.5% or 95.0%) ($P < 0.05$). **Conclusions** The developmental reflexes and learning and memory functions were impaired in neonatal mice following excitotoxic brain damage. Behavioral testing is useful in the evaluation of early developmental reflexes and long-term neurobehavioral outcome in neonatal mice with excitotoxic brain damage.

[Chin J Contemp Pediatr, 2009, 11 (3):191-193]

Key words: Ibotenic acid; Excitotoxic; Brain damage; Behavior; Neonatal mice

随着早产儿出生率的增加,早产儿脑白质损伤(white matter damage, WMD)已成为新生儿脑损伤的重要形式,患儿6~9个月时脑瘫(cerebral palsy)发病率高达20%^[1],并可引起神经发育障碍、认知及行为学异常等后遗症^[2]。大量研究指出,新生儿WMD的病因是多因素的,涉及到许多围生期前和

围生期因素,其中过度释放的谷氨酸(glutamate, Glu)及其随之激活的兴奋毒性级联反应为这些危险因素提供了共同的分子通路^[3]。本研究通过对新生小鼠兴奋毒性脑损伤模型神经行为的检测,了解其神经行为改变情况,为围生期脑损伤的神经保护研究提供新的实验方法。

[收稿日期]2008-06-24; [修回日期]2008-08-22

[基金项目]云南省自然科学基金(2004C0019R)

[作者简介]齐志业,男,硕士。主攻方向:新生儿疾病的诊治。

[通讯作者]梁琨,女,教授,昆明医学院第一附属医院儿科,邮编:650032。

1 材料与方法

1.1 实验动物及试剂

由昆明医学院动物科提供生后5日(P5) ICR种小鼠55只,雌雄不限,体重 ≥ 3.0 g,采用完全随机的方法分为空白组、生理盐水组和鹅膏蕈氨酸(ibotenic acid, IA)组,按顺序编号。神经兴奋毒素IA系美国Sigma公司生产;吸入麻醉药品异氟烷由美国波多黎各百特公司生产。

1.2 兴奋毒性脑损伤模型的建立

参照Marret等^[4]的方法,P5新生小鼠异氟烷吸入麻醉后,用5 μ L的微量注射器脑内注射IA。注射位置在右侧大脑半球额顶叶区头皮下2 mm,距矢状缝旁2 mm,矢状缝与人字缝交点3 mm。分两次注入,每次1 μ L(5 μ g IA)。每次注入后穿刺针留置20 s。生理盐水组以同样的方法脑内注射生理盐水,空白组不做任何处理。

1.3 行为功能检测

1.3.1 平面翻正实验 在小鼠生后的第6,7,8,9,10天(P6,P7,P8,P9,P10)进行。将小鼠仰面置于同质平面上,记录其完全翻正(以四肢着地为标准)所需时间,2 s内翻正为正常。如果两次的实验评分不同,再进行第3次实验,计算3次的平均翻正时间。为了避免个体差异,应用该实验结果对小鼠进行筛选,将成绩高于正常值(2 s)两倍或两倍以上的小鼠剔除^[5]。

1.3.2 游泳实验 在小鼠生后的第8,10,12天(P8,P10,P12)进行。游泳实验^[5]在20 cm \times 30 cm \times 20 cm规格的游泳水箱中进行,从小鼠在水中游泳的方向、头部在水中的位置(角度)以及四肢运动情况3方面评分:(A)方向记分:下沉0分,漂浮1分,游泳呈旋转或弧形2分,呈直线或近直线3分;

(B)角度记分:下沉0分,鼻在水面1分,头鼻在水面2分,头鼻在水面且水在耳下或在中耳水平3分;(C)四肢运动:不划动0分,后肢划动1分,四肢划动2分。

1.3.3 Y-迷宫分辨学习实验 在小鼠生后的第33,34天进行Y迷宫分辨学习实验^[6]。实验装置为一具有相等三分岔的Y型盒(18 cm \times 8 cm \times 15 cm),分别标为A、B、C臂,箱底由铜丝组成,间隔3 mm左右。A臂外1/2端铜丝不通电,为安全区。C臂近端为起步区。实验分2 d进行。第1天实验前,先将小鼠放入C臂而不通电,使小鼠自由活动熟悉各臂环境。正式实验时,动物放于C臂起步区,电击小鼠足部(电击参数为40 V),小鼠即奔跑逃避,直至安全区。凡小鼠受电击后能从起步区直接逃至安全区为正确反应,否则属错误反应,每训练10次让小鼠休息1 min。以连续10次训练中有9次(90%)正确反应定为学会标准。记录“学会”所需训练次数。第2天记录10次训练中正确反应次数作为记忆保持率,以每组平均正确反应百分率作为评价记忆指标。正确反应率(%) = 正确反应数/总测试次数 \times 100%。

1.4 统计方法

采用SPSS 11.0软件进行处理和分析,检验水准选择0.05($\alpha = 0.05$),组间比较用方差分析或秩和检验,记忆成绩结果用百分比表示。

2 结果

2.1 平面翻正实验、游泳实验结果

小鼠生后第6~10天IA组翻正反射时间明显长于空白组和生理盐水组($P < 0.05$);小鼠生后第8、10、12天IA组游泳实验评分明显低于空白组和生理盐水组($P < 0.05$)。见表1,2。

表1 小鼠平面翻正时间比较

分组	鼠数	P6	P7	P8	P9	P10
空白组	20	1.41 \pm 0.40	0.99 \pm 0.26	0.84 \pm 0.30	0.73 \pm 0.14	0.75 \pm 0.12
生理盐水组	20	1.47 \pm 0.56	1.00 \pm 0.30	0.82 \pm 0.21	0.78 \pm 0.18	0.68 \pm 0.13
IA组	15	2.12 \pm 0.61 ^a	1.86 \pm 0.65 ^a	1.50 \pm 0.51 ^a	1.28 \pm 0.29 ^a	1.01 \pm 0.15 ^a
F值		9.225	23.983	20.858	36.341	28.439
P值		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

a:与空白组和生理盐水组比较, $P < 0.05$

2.2 Y-迷宫分辨学习实验结果

IA组小鼠“学会”所需次数为19.79 \pm 2.42,明显多于对照组的16.29 \pm 2.48,16.30 \pm 2.37($P < 0.05$);空白组和生理盐水组之间差异无显著性;实验组记忆

正确反应率为86.7%,明显低于空白组与生理盐水组(96.5%,95.0%, $P < 0.05$),空白组和生理盐水组之间差异无显著性。

表2 小鼠不同时间游泳实验评分比较

分组	鼠数	P8	P10	P12
空白组	20	7.20 ± 0.77	8.00	8.00
生理盐水组	20	7.05 ± 0.76	8.00	8.00
IA组	15	6.33 ± 0.98 ^a	6.87 ± 0.74 ^a	7.13 ± 0.64 ^a
F值(或H值)		5.175	23.100	25.066
P值		<0.01	<0.01	<0.01

a:与空白组和生理盐水组比较,P<0.05

3 讨论

早产儿WMD是导致早产儿伤残的重要原因。目前对于小鼠围生期WMD模型的研究主要集中在脑损伤解剖学上和神经功能量化测定方面,对其脑损伤的监测都是用组织病理学改变反映神经细胞丢失程度^[7]。而能证明早期和远期脑功能恢复情况对于研究脑损伤机制和评估治疗效果则有很重要的临床意义。在围生期脑损伤中,尤其是缺氧缺血性损害的幼鼠和成年大鼠神经行为试验中,其神经行为功能都有损伤^[8]。而对于新生小鼠WMD不同的发展时期神经学上的缺陷尚不清楚。

在对人类早产儿脑损伤的随访的研究中,随访时间一般为1~5年^[9],缺少对早产儿脑损伤后学龄期或青春期脑神经行为改变和生长发育情况的研究。在动物实验中,对于新生小鼠脑损伤不同的发展时期神经学上的缺陷也不清楚。因此,本实验通过对小鼠早期(相当于人类33~37周大脑发育情况)和远期(相当于人类学龄期至青春期间大脑发育情况)神经行为研究来观察兴奋毒性脑损伤后神经行为功能改变情况。

平面翻正、游泳实验是小鼠早期发育的里程碑,反映小鼠早期感觉运动功能发育情况,且结果不依赖于小鼠的品系和性别。在本研究中,IA组翻正实验时间明显长于对照组,游泳实验评分明显低于对照组,表明兴奋毒性脑损伤小鼠早期发育反射明显落后,与HIE模型的研究结果相一致^[8],说明兴奋毒性脑损伤也同样对其早期发育行为产生影响。

在Y-迷宫分辨学习实验中,IA组“学会”所需次数明显多于对照组,而记忆正确反应率明显低于对照组,表明小鼠WMD后学习记忆也明显受损。近年来研究发现,兴奋性氨基酸NMDA受体与认知功能的分子机制有关^[10]。NMDAR-2β作为NMDA受体的一个亚基,是多数小鼠海马NMDA受体复合物组成形式的关键成分,参与学习、记忆功能^[11]。在小鼠兴奋毒性脑损伤模型中,NMDA受体被过度激活,可能使其在大脑突触形成、稳定及适应性等方

面的功能受损,从而影响学习记忆功能。

本研究结果表明,新生小鼠兴奋毒性脑损伤模型发育反射行为和学习记忆功能都受到了损伤。因此,可以用行为学这种可量化、可多次重复进行的非侵袭性检测方法对兴奋毒性脑白质损伤模型小鼠的早期发育反射和远期行为进行评估,从而为围生期脑损伤神经保护的研究提供了新的实验方法^[12~14]。

[参 考 文 献]

- [1] Inage YW, Itoh M, Takashima S. Correlation between cerebrovascular maturity and periventricular leukomalacia[J]. *Pediatr Neurol*, 2000, 22 (3):204-208.
- [2] 毛健. 早产儿脑白质损伤的有关问题[J]. *中国实用儿科杂志*, 2002, 17(7):386-389.
- [3] Rogido M, Husson I, Bonnier C, Lallemand MC, Mérienne C, Gregory GA, et al. Fructose-1,6-biphosphate prevents excitotoxic neuronal cell death in the neonatal mouse brain[J]. *Brain Res Dev Brain Res*, 2003, 140(2):287-297.
- [4] Marret S, Mukendi R, Gadisseux JF, Gressens P, Evrard P. Effect of ibotenate on brain development: an excitotoxic mouse model of microgyria and posthypoxic-like lesions[J]. *Neuropathol Exp Neurol*, 1995, 54(3):358-370.
- [5] Kihara T, Surjono TW, Sakamoto M, Matsuo T, Yasuda Y, Tanimura T. Effects of prenatal rubratoxin-B exposure on behaviors of mouse offspring[J]. *Toxicol Sci*, 2001, 61(2):368-373.
- [6] Xu XH, Zhao TQ. Effects of puerarin on D-galactose-induced memory deficits in mice [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2002, 23(7):587-590.
- [7] Roohey T, Raju TN, Moustogiannis AN. Animal models for the study of perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy: a critical analysis[J]. *Early Hum Dev*, 1997, 47 (2):115-146.
- [8] Ikeda T, Mishima K, Yoshikawa T, Iwasaki K, Fujiwara M, Xia YX, et al. Selective and long-term learning impairment following neonatal hypoxic-ischemic brain insult in rats[J]. *Behav Brain Res*, 2001, 118(1):17-25.
- [9] 周丛乐,姜毅,汤泽中,王素寰,姜凌云. 早产儿脑白质损伤的发生、预后与病因探讨[J]. *中华围产医学杂志*, 2003, 6(6):325-328.
- [10] 王云甫,范华燕,任传成,何国厚,叶天雄,余绍祖. 局灶性脑缺血后海马各区NMDAR表达的实验研究[J]. *临床神经病学杂志*, 2001, 14(1):27-29.
- [11] Loftis JM, Janowsky A. The N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR2B: localization, functional properties, regulation, and clinical implications[J]. *Pharmacol Ther*, 2003, 97(1):55-85.
- [12] Vorhee CV. Behavioral and functional ontogeny: biomarkers of neurotoxicity [M]. //Chang LW. *Principles of Neurotoxicology*. New York;Marcel Dekker, Inc, 1994, 241-250.
- [13] 钟乐,王霞,余小河,杨于嘉. 新生大鼠缺氧缺血性脑损伤后的远期行为学测试[J]. *中国当代儿科杂志*, 2005, 7(3):245-248.
- [14] 刘美娜,庄思齐,张红宇,覃肇源,李晓瑜. 早期高压氧治疗对氧缺血性脑损伤新生大鼠的远期保护作用[J]. *中国当代儿科杂志*, 2006, 8(3):216-220.

(本文编辑:吉耕中)