

· 实验研究 ·

新生大鼠缺氧缺血性脑损伤后的远期行为学测试

钟乐, 王霞, 余小河, 杨于嘉

(中南大学湘雅医院儿科, 湖南 长沙 410008)

〔摘要〕 目的 目前对新生鼠缺氧缺血性脑损伤(HIBD)模型的研究多采用病理学和生化指标,而缺乏功能评价手段。该研究对新生大鼠 HIBD 后的行为学改变及其测定方法进行探讨,为新生大鼠 HIBD 的研究提供功能评价的方法。**方法** 24只7日龄新生SD大鼠随机分为对照组($n = 12$)和HIBD组($n = 12$),HIBD组大鼠予以缺氧缺血,对照组大鼠仅予以假手术。生后3周,两组大鼠予以T迷宫测试及感觉运动测试对学习记忆、空间能力和感觉运动功能进行评估。然后处死两组大鼠,取脑组织切片行尼氏染色,计数海马DG区和皮层区单位面积神经元的数目,并对行为学和组织学的结果进行相关分析。**结果** 在行为测试中,HIBD组大鼠的成绩显著低于正常鼠。在T迷宫测试中,两组在第3,4d的正确率有显著差异($P = 0.049, P < 0.001$),HIBD组的正确率($68.3\% \pm 26.2\%$, $66.7\% \pm 15.6\%$)显著低于对照组($86.7\% \pm 15.6\%$, $98.3\% \pm 5.7\%$)。在感觉运动测试中,与正常鼠比较,HIBD鼠在足错误和肢体放置测试中表现出左右运动的不对称(均 $P < 0.001$),姿势反射也显示出了运动功能异常($P = 0.032$)。缺氧缺血导致了神经元损伤,使海马DG区(39.7 ± 5.9 vs 50.9 ± 4.1 , $P < 0.001$)和皮层单位面积内神经元(12.7 ± 3.3 vs 18.2 ± 3.3 , $P < 0.001$)数目显著减少。但行为学测试结果与组织学改变无相关性。**结论** 新生鼠缺氧缺血会造成远期学习记忆,空间能力和感觉运动功能障碍,T迷宫测试和三项感觉运动测试可以作为大鼠HIBD模型的评价指标。 [中国当代儿科杂志,2005,7(3):245-248]

〔关键词〕 缺氧缺血,脑;行为学;大鼠,新生

〔中图分类号〕 R-33 **〔文献标识码〕** A **〔文章编号〕** 1008-8830(2005)03-0245-04

Long-lasting behavioral alterations in neonatal rats after hypoxic-ischemic brain damage

Le ZHONG, Xia WANG, Xiao-He YU, Yu-Jia YANG. Department of Pediatrics, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China (Yang Y-J, Email: yjy@cjcp.org)

Abstract: Objective The neonatal rat model of hypoxic-ischemic brain damage (HIBD) is a useful tool for studying hypoxic-ischemic encephalopathy of the newborn. Although many reports have studied the pathological and biochemical outcomes on HIBD in the animal model, little research has focused on assessing the long-lasting behavioral changes. This study was designed to examine the long-lasting behavioral alternations following HIBD in neonatal rats. **Methods** Twenty-four 7-day-old SD rats were randomly assigned into a Control group ($n = 12$) and a HIBD group ($n = 12$). The rats in the HIBD group were subjected to ligation of the left carotid artery, followed by 2 hrs hypoxia exposure. A battery of behavioral tests, including the T-maze test and sensorimotor tests, were performed at postnatal age 3 - 4 weeks. Histological changes and their correlations with the results of behavioral tests were evaluated. **Results** In the behavioral tests, HIBD rats performed significantly worse than control rats. In the T-maze test, the HIBD group differed significantly from the Control group, achieving the correct percentage on the 3rd and 4th days after hypoxia-ischemia (HI) of $68.3\% \pm 26.2\%$ vs $86.7\% \pm 15.6\%$ ($P = 0.049$) and $66.7\% \pm 15.6\%$ vs $98.3\% \pm 5.7\%$ ($P < 0.001$), respectively. In the sensorimotor tests, asymmetries of foot-faults and limb-placing were detected in HIBD rats. The postural reflex test showed an abnormal motor function in HIBD rats. The neurons number in the DG area of the hippocampus (39.7 ± 5.9) and the cortex (12.7 ± 3.3) was significantly reduced in the HIBD group when compared with those in the Control group (50.9 ± 4.1 and 18.2 ± 3.3 , respectively). There was no correlation between the behavioral tests results and histological changes. **Conclusions** HI injury in neonatal rats may cause long-lasting deficits of learning, spatial and sensorimotor function. Behavioral testing is an important measure of outcome following HIBD, and behavioral testing measures may be used to test the efficacy of HIBD treatment. [Chin J Contemp Pediatr, 2005, 7(3): 245 - 248]

[收稿日期]2004-10-12; [修回日期]2005-02-07

[作者简介]钟乐(1977-),女,博士,经治医师。主攻方向:新生儿脑损伤。

[通讯作者]杨于嘉,中南大学湘雅医院儿科,邮编410008。

Key words: Hypoxia-ischemia, brain; Behavior; Rat, newborn

缺氧缺血性脑病(hypoxic-ischemic encephalopathy, HIE)是新生儿期最常见的脑损伤病因,也是脑瘫、精神发育迟滞、学习障碍和癫痫的常见原因^[1]。Rice 法制作的新生鼠缺氧缺血性脑损伤(hypoxic-ischemic brain damage, HIBD)模型,采用7日龄的新生大鼠单侧颈总动脉结扎后暴露于低氧环境下制作而成。7日龄的大鼠处于脑发育的高峰期,此时缺氧缺血造成的脑损伤与围产期窒息造成的足月儿脑损伤相似^[2],是研究HIE损伤机制和保护因素的常用动物模型。

对HIBD有保护作用的治疗措施除了能减轻神经元损伤外,更重要的是应该能改善脑损伤造成的远期功能改变。然而,目前对HIBD的保护研究多采用病理学和生化指标,较少对远期功能进行评价。在中枢神经系统,特别是未成熟脑中,组织的修复和代偿机制会影响远期的损伤情况和功能恢复,因此近期的病理或行为评估不一定和远期评估的结果一致^[3, 4]。

HIBD是一种弥漫性脑损伤,可以造成单侧脑皮层、纹状体和海马损伤^[2, 5]。皮层损伤可以导致感觉运动功能受损^[4];纹状体损伤会导致自发运动的改变^[5],而海马损伤则会导致空间记忆和学习能力下降^[6]。但在新生鼠HIBD模型中,纹状体损伤仅会导致近期自发运动改变,在断奶后,这种功能缺陷将会恢复^[5]。因此,本研究参照Balduini^[5]和Bona^[4]的行为学测试方法对大鼠缺氧缺血后远期的学习记忆、空间能力和感觉运动功能进行评估,为HIBD的干预研究提供评价手段。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

新生清洁级Sprague-Dawley大鼠(由中南大学实验动物中心提供),雌雄不限,体重在12 g以上,随机分为对照组和HIBD组,每组12只。新生大鼠均由母乳母乳喂养,21日龄时断奶,雌雄分笼。予以清洁饮食饮水,室温维持在22℃,予以12 h光照,12 h黑暗。

1.2 HIBD模型制作

HIBD组大鼠7日龄时乙醚吸入麻醉,分离、结扎、断开左颈总动脉,缝合皮肤后放回母鼠笼恢复2 h,而后将之放入8%的氮氧混合气的37℃恒温箱2 h。对照组大鼠于7日龄行假手术,仅予分离左颈

总动脉,不予以结扎和缺氧。

1.3 行为学测试

均采用双盲法进行,即行测试者不知道动物的分组。

1.3.1 T迷宫觅食试验(T maze test) T迷宫为木制,每条臂宽11 cm,高18 cm,长40 cm,起始臂末端15 cm处设有闸门。自22日龄起检测。在T迷宫左右两臂的末端放置一个直径为5 cm的器皿,内置40 mg的食物,测试动物在T迷宫中进行2 d的觅食适应后开始测试。测试分为预备和测试两个阶段。预备阶段时,任意选择T迷宫的一臂,用木闸门将之关闭,动物只能进入开放的臂内,并将食物吃完,然后将之放入起始臂内,关15 s后撤去所有的闸门开始测试,在这一阶段,动物的后肢进入两臂中的任一臂就认为是作出了选择,不准再后退。如果动物进入预备阶段未进入的臂内,就允许其吃完食物后回笼;如果进入已进入过的臂内,将其在该臂内关10 s后回笼。每只动物每日测试5次,每次间隔15 min,连续4 d。记录每日测试的正确率。

1.3.2 感觉运动功能测试(sensorimotor function test) 包括以下三项试验。待大鼠达34日龄时进行测试。

1.3.2.1 足错误(foot-faults test) 将大鼠放在水平的金属网格上(50 cm×40 cm,每格3 cm×3 cm,金属直径为0.4 cm),记录2 min爪子落入网格中的次数,为排除不同大鼠活动度的差别的影响,只将左右侧错误次数的差值进行统计学分析。

1.3.2.2 姿势反射(postural reflex test) 抓住大鼠的尾巴,使之悬挂于距离桌面50 cm高处。正常鼠将两个前肢都伸向桌面(0分),而有脑损伤的大鼠损伤大脑半球对侧(右侧)的肢体呈屈曲状(1分),然后将大鼠放在桌上,在肩后的侧面加压直到前肢伸直,重复数次,如果损伤大脑半球对侧(右侧)的抵抗力减弱为异常(2分)。

1.3.2.3 肢体放置(limb-placing test) 记录大鼠在不同的感觉刺激下左右侧前后爪的放置情况,计分标准如下:0分,爪子放置正确、迅速;1分,迟缓或不完全正确;2分,不能放置。记录每只鼠两侧得分的差值。①将大鼠放于桌面,正常情况下大鼠会伸展前爪放于桌上;②用手指抬起大鼠头部以避免其看见桌面,将大鼠的前肢接触桌子边缘检测前肢的感觉;③大鼠面向桌子的边缘检测前肢的放置。正常鼠将双前爪放于桌上;而脑损伤鼠对侧爪放置

错误;④检查者将大鼠握住缓慢向桌子边缘移动,检测前、后肢体的放置;⑤将大鼠放在桌上,轻轻地从侧边将之推向桌子边缘,正常大鼠会抓住桌子边缘,而脑损伤大鼠对侧的前、后肢可能会掉下来;⑥同⑤,只是从后面推。

1.4 组织切片及染色

HIBD 后 4 周将大鼠处死,4% 多聚甲醛灌注并取脑组织固定后石蜡包埋,制成 3 μm 的石蜡切片,脱腊水化后行尼氏染色。取前囟和前囟后 3 mm 部位行尼氏染色,0.1% 甲苯胺兰 60℃ 温染 1 min,水洗,70%,80% 酒精脱水,95% 酒精镜下分化,直至细胞核和背景为淡蓝或无色,100% 酒精脱水,松节油透明,封片。光镜下 ($\times 200$) 在相同部位取单位面积计数神经元。

1.5 统计学分析

全部资料用 SPSS 11.0 软件包统计软件处理。计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,均数比较用 t 检验;等级资料比较用 Mann-whitney U 检验。相关分析采用 pearson 相关分析(计量资料)或 spearman 相关分析(等级资料)。

2 结果

2.1 行为学测试

2.1.1 T 迷宫测试 各组在连续 4 d 的试验中,正确率如表 1 所示。随着天数的增加,对照组正确率逐渐增高,而 HIBD 组正确率上升不明显,说明学习能力较差。在第 3,4 d 时,差异有显著性意义(表 1)。

表 1 T 迷宫测试正确率的比较

(%, $\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

	1 d	2 d	3 d	4 d
对照组	61.7 $\pm$ 18.0	81.7 $\pm$ 13.4	86.7 $\pm$ 15.6	98.3 $\pm$ 5.7
HIBD 组	58.3 $\pm$ 27.8	63.3 $\pm$ 36.0	68.3 $\pm$ 26.2	66.7 $\pm$ 15.6
t	0.377	1.653	2.082	6.606
P	0.710	0.112	0.049	< 0.001

2.2 感觉运动功能测试

2.2.1 足错误 HIBD 组右左差值(3.0 ± 1.0)较对照组(0.7 ± 1.3)显著增高($t = -4.841$, $P < 0.001$),说明该组大鼠左右运动不对称,右侧(缺血脑对侧)差于左侧。

2.2.2 姿势反射 在姿势反射测试中各组大鼠得分情况见表 2。得分越高提示脑损伤越严重。对照组 12 例均为 0 分,而 HIBD 组仅 8 例为 0 分,两组

差异有显著意义($Z = -2.145$, $P = 0.032$)(表 2)。

表 2 各组大鼠姿势反射得分比较 $n(\%)$

	n	评 分		
		2	0	1
对照组	12	12 (100%)	0 (0)	0 (0)
HIBD 组	12	8 (66.7%)	4 (33.3%)	0 (0)

2.2.3 肢体放置 大鼠在肢体放置测试中右左侧的得分差值情况见图 1。得分越高提示脑损伤越严重。正常大鼠的得分差值绝大多数为 0 分,而 HIBD 大鼠的得分差为 1~4 分,与正常鼠比较差异有显著意义($Z = -4.331$, $P < 0.001$)(图 1)。

图 1 各组大鼠肢体放置测试右左侧得分差值情况 ($n = 12$)

2.3 尼氏染色

缺氧缺血导致了神经元损伤,使海马 DG 区和皮层单位面积内神经元数目显著减少(均 $P < 0.01$)(表 3,图 2)。

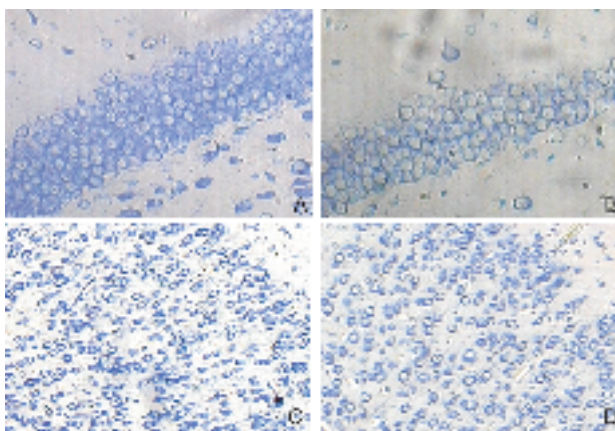


图 2 HIBD 对大鼠海马 DG 区和皮层区神经元密度的影响(尼氏染色)

A: 对照组 DG 区 ($\times 200$); B: HIBD 组 DG 区 ($\times 200$); C: 对照组皮层 ($\times 100$); D: HIBD 组皮层 ($\times 100$)

2.4 组织学与行为学结果的相关分析

将 HIBD 大鼠海马 DG 区单位面积内神经元数目与 T 迷宫测试第 4 d 的正确率进行相关分析,两者无相关性($r = -0.043$, $P = 0.896$)。将 HIBD 大鼠皮层区单位面积内神经元数目与三项感觉运动得分之和进行相关分析,两者也无相关性($r_s = 0.286$, $P = 0.368$)。

表3 两组 DG 区以及皮层区单位面积内神经元数目
(%, $\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

	DG 区	皮层区
对照组	50.9 $\pm$ 4.05	18.2 $\pm$ 3.3
HIBD 组	39.67 $\pm$ 5.91	12.75 $\pm$ 3.28
t	5.435	4.035
P	< 0.001	0.001

3 讨论

在本研究中,尼氏染色的结果发现在缺氧缺血后 4 周,海马 DG 区和皮层神经元较正常鼠明显减少。行为学测试结果显示,HIBD 大鼠在损伤 3 周后 T 迷宫测试和感觉运动测试成绩会显著低于对照组。但由于个体差异,在感觉运动测试中,HIBD 大鼠不一定所有的测试均异常;而正常鼠也可能有某项测试的异常^[4],因此本研究采用了 3 项感觉运动测试以提高检查的准确性和特异性。在本研究中所有的 HIBD 大鼠至少有一项感觉运动测试异常,而 12 只正常鼠中,有 10 只所有的感觉运动测试正常。

组织学和行为学结果的相关分析显示两者并无相关性,这可能是由于大脑结构和功能的复杂性造成的。一方面,除了海马,大脑皮质、纹状体、杏仁核和小脑也与学习记忆有关^[7];除了皮层,丘脑、纹状体的损伤也会导致大鼠感觉运动功能异常^[4];另一方面,除了神经元的数目外,突触的多少,神经元间的连接和脑白质的功能均可能影响脑的功能。因此,在对 HIBD 的治疗措施进行评估时,远期组织学检查和行为学测试都是必不可少的。

在行为学测试过程中还需要注意以下几点,以增加测试的可靠性:①本研究中对照组(假手术组)大鼠和 HIBD 组大鼠各有 3 只和 4 只出现左侧眼睑下垂,这是由于分离左颈总动脉时,损伤了动眼神经。因此正常对照组需要进行假手术才可更好的与 HIBD 组进行比较;②不同窝别的鼠行为测试的结果可能会有差异,因此如能将同窝别大鼠按照体重进行配对分组,结果将更可靠;③每日的测试均需在同一时间进行(本实验为上午 9 点),以避免时间的差异对大鼠活动能力的影响;④所有行为学测试均为同一人盲法进行,以排除操作手法和主观判断对测试结果的影响。

本研究显示新生鼠缺氧缺血会造成远期学习记忆,空间能力和感觉运动功能障碍,T 迷宫测试和三项感觉运动测试可以为 HIBD 的治疗措施研究提供有效的评价手段。

[参 考 文 献]

- [1] Park KI. Transplantation of neural stem cells: cellular & gene therapy for hypoxic-ischemic brain injury [J]. Yonsei Med J, 2000, 41(6): 825-835.
- [2] Rice JE 3rd, Vannucci RC, Brierley JB. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat [J]. Ann Neurol, 1981, 9(2): 131-141.
- [3] Shuaib A, Murabit MA, Kanthan R, Howlett W, Wishart T. The neuroprotective effects of gamma-vinyl GABA in transient global ischemia: a morphological study with early and delayed evaluations [J]. Neurosci Lett, 1996, 204(1-2): 1-4.
- [4] Bona E, Johansson BB, Hagberg H. Sensorimotor function and neuropathology five to six weeks after hypoxia-ischemia in seven-day-old-rats [J]. Pediatr Res, 1997, 42(5): 678-683.
- [5] Balduini W, De Angelis V, Mazzoni E, Cimino M. Long-lasting behavioral alterations following a hypoxic/ischemic brain injury in neonatal rats [J]. Brain Res, 2000, 859(2): 318-325.
- [6] Balduini W, De Angelis V, Mazzoni E, Cimino M. Simvastatin protects against long-lasting behavioral and morphological consequences of neonatal hypoxic/ischemic brain injury [J]. Stroke, 2001, 32(9): 2185-2191.
- [7] Thompson RF. The neurobiology of learning and memory [J]. Science, 1986, 233(4767): 941-947.

(本文编辑:王霞)