

论著·实验研究

运动康复对缺氧缺血性脑损伤新生大鼠 空间学习记忆的影响

陈小璐 蒋莉

(重庆医科大学附属儿童医院神经内科,重庆 400014)

[摘要] **目的** 探讨运动康复对缺氧缺血性脑损伤(HIBD)新生大鼠脑结构和空间学习记忆的影响。**方法** 48只7日龄Sprague-Dawley大鼠随机分为假手术组、HIBD组及运动组。HIBD组和运动组建立HIBD模型,运动组于建模2周后开始4周的运动康复。检测各组大鼠运动功能和空间学习记忆能力,观察脑重变化和突触超微结构,计数海马CA1区存活锥体细胞并检测磷酸化CaMKII及脑源性神经营养因子(BDNF)表达水平。**结果** 运动组大鼠运动功能及空间学习记忆能力均优于HIBD组,和假手术组间差异无统计学意义。HIBD组大鼠海马突触前膜囊泡减少,突触间隙增宽,突触后致密物变薄,而运动组未见明显异常。HIBD组、运动组大鼠左侧脑重及海马CA1区存活锥体细胞均较假手术组低,HIBD组又较运动组低($P < 0.01$)。运动组大鼠海马CA1区磷酸化CaMKII和BDNF表达水平均明显高于HIBD组。**结论** 运动康复可促进HIBD大鼠海马神经元存活,增强突触可塑性,改善其受损的空间记忆能力。
[中国当代儿科杂志,2010,12(5):363-367]

[关键词] 缺氧缺血;运动康复;学习记忆;新生大鼠

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2010)05-0363-05

Physical training improves spatial learning and memory impairments following hypoxic-ischemic brain damage in neonatal rats

CHEN Xiao-Lu, JIANG Li. Department of Neurology, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China (Jiang L, Email: dr_jiangli@163.com)

Abstract: Objective To investigate the effect of physical training on cerebral structure and spatial learning and memory in neonatal rats submitted to hypoxic-ischemic brain damage (HIBD). **Methods** Forty-eight 7-day-old Sprague-Dawley rats were randomly divided into three groups: a group that was subjected to left carotid ligation followed by 2 hrs hypoxic stress (HIBD); a group that received physical training 2 weeks after the HIBD event; a control group that was subjected to a sham-operation without ligation and hypoxic stress. Following four weeks physical training, motor function test and water maze tasks were performed. Bilateral brain weight, cerebral morphology and left hippocampal ultrastructure of the animals were examined. The expression levels of phosphor calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) and brain derived neurotrophic factor (BDNF) were determined by immunohistochemistry. **Results** Compared with the control group, the motor function and the spatial learning and memory ability in the non-trained HIBD group were significantly decreased, whereas there was no significant difference between the trained-HIBD and the control groups. The left hemisphere weight and neurons in the left hippocampal CA1 zone of both HIBD groups decreased and the reduction was more significant in non-trained HIBD group. The ultrastructure of the left hippocampus was remarkably abnormal in the non-trained HIBD group, while no obvious abnormality was observed in the trained HIBD and the control groups. Phosphor-CaMKII and BDNF expression in the left hippocampus in the trained HIBD group increased significantly compared with that in the non-trained HIBD group. **Conclusions** Physical training can restrain brain damage and ameliorate spatial learning and memory impairments in rats with HIBD.
[Chin J Contemp Pediatr, 2010, 12 (5):363-367]

Key words: Hypoxia-ischemia; Physical training; Learning and memory; Neonatal rats

新生儿缺血缺氧脑病(HIE)是指围产期窒息导致的缺血缺氧性脑损伤(HIBD),目前我国窒息儿中HIE的发病率为7.5%~57.6%,是严重危害新生儿健康的常见病,病情重、病死率和致残率高,可

发生多种永久性神经功能缺损,如智力低下、脑性瘫痪和癫痫等,是新生儿期以后致残的主要原因^[1]。

运动康复是指通过病人自身的力量或治疗师的辅助操作或借助于器械所进行的主动或被动运动,

[收稿日期]2010-01-25;[修回日期]2010-02-25

[作者简介]陈小璐,男,硕士研究生。

[通信作者]蒋莉,教授。

以改善局部或全身功能为目的的一种治疗方法^[2]。国内外越来越多的动物及人体研究发现运动康复可明显提高学习记忆能力,促进诸如脑外伤、神经变性疾病等患者认知功能的改善^[3-4],然而目前关于运动康复对 HIE 患儿学习记忆影响的研究尚不多见。为了探讨运动康复对 HIE 患儿学习记忆的影响及其可能机制,本实验通过制做新生鼠 HIBD 模型,经过运动康复后检测神经功能及空间学习记忆能力,并对其海马结构及海马区与学习记忆相关的蛋白水平进行检测。

1 材料和方法

1.1 实验动物及分组

7 日龄 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 48 只(重庆医科大学动物实验中心提供)随机分组:假手术组 16 只,运动与非运动 HIBD 组各 16 只。运动 HIBD 组于 HIBD 2 周后每天给予平衡、抓握、旋转、行走等训练。非运动 HIBD 组及假手术组大鼠不予干预,于生后 21 d 断奶后饲养于标准饲养笼内至生后 49 d。

1.2 HIBD 模型的制作

参照 Rice-Vannucci 法^[5]建立 HIBD 模型:大鼠经乙醚麻醉后于颈部正中行一切口,分离左颈总动脉,6-0 丝线行双线结扎,缝合皮肤。手术结束后,动物回窝恢复 100~120 min,然后将其置于 37℃ 水浴的密闭缺氧箱中,持续充以 80 ml/L 氧氮混合气体,气流量 0.5 L/min,维持 100~120 min。缺氧完毕后,存活者继续保温 1 h 后作为行为测定,不能翻身、平衡异常或左旋者视为成功模型,返回母鼠笼中饲养。假手术组游离而不结扎左颈总动脉,不予缺氧处理。各组大鼠均由母鼠喂养至生后 21 d 断奶。

1.3 运动康复器材及方法

①滚笼训练器:为长 6.5 cm,直径 12.5 cm 的圆形网状仪器。将大鼠放入该器内然后手摇按 5 r/min 进行转动训练。②平衡木训练:采用 100 cm 长,2.5 cm 宽的圆木棒,平放距地面 2 cm 处,让大鼠在其上行走。③转棒训练:取长 150 cm,直径 4.5 cm 的圆棒,将大鼠放于该棒的一端以 3 r/min 的速度分别向左右交替转动。④网屏训练:网屏为 50 cm×40 cm 网带,网眼为 1 cm×1 cm,网板的左右和上方用 2.5 cm 高的木板框边,网屏距地面高度为 80 cm,下方铺以海绵,先将网屏水平放置,将鼠放于其上,然后缓缓将其一端抬高,在 2 s 内将此网屏变成垂直位,保持 5 s,观察大鼠是否会从网屏上掉下或用前爪抓握住网屏。以上 4 种运动康复项目

每项每天进行 10 min,每周进行 6 d,持续 4 周。

1.4 神经功能评分

参考文献^[6]神经功能评分方法如下。

平衡木行走评分:大鼠能跳上横木,在横木上行走不跌倒为 0 分;在横木上行走跌倒机会小于 50% 为 1 分;在横木上行走跌倒机会大于 50% 为 2 分;能跳上横木,但不能向前移动为 3 分;在平衡木上不能行走,但可坐在横木上为 4 分;将大鼠放在平衡木上即会掉下为 5 分。

转棒行走评分:转动过程中大鼠可在转棒上行走为 0 分;转动过程中大鼠不会掉下,且持续时间达 60 s 以上为 1 分;转动开始后大鼠从转棒上掉下为 2 分;转动开始前大鼠就从转棒上掉下为 3 分。

网屏试验评分:大鼠前爪抓住网屏可达 5 s,且不滑落为 0 分;暂时抓住网屏,滑落一段距离,但未掉下为 1 分;在 5 s 内掉下为 2 分;网屏转动时大鼠即掉下为 3 分。计算每只大鼠各项评分之和的平均值,作为其综合评分。

分别于运动康复后 7 d、14 d、21 d、28 d 每组随机抽取 8 只大鼠进行神经功能评分,观察比较每组大鼠神经功能情况。

1.5 海马突触超微结构观察

运动康复结束后,每组随机抽取 8 只大鼠断头处死,置于冰台上面,剪开颅骨,剥离脑组织,0.01 M PBS 冲洗掉表面血迹,分离出左侧海马,表面滴加 2.5% 戊二醛,切取约 1 mm×1 mm 大小的海马组织,浸泡于 2.5% 戊二醛中 4℃ 保存,经 PBS 冲洗后,1% 锇酸固定,再经 PBS 冲洗后,梯度丙酮脱水,环氧树脂 618 浸透包埋,超薄切片,醋酸铀和柠檬酸铅双染后,透射电镜下 (TECNAI10 荷兰 Philips 公司) 观察突触形态结构。

1.6 空间学习记忆行为测验

剩余的所有大鼠于 50 日龄时以 Morris 水迷宫测试空间学习记忆能力。(1)定位航行试验:测量获取学习记忆的能力。第 1 天让大鼠自由游泳 2 min,从第 2 天起,每天上午训练 4 次,每次从不同点入水,记录大鼠寻找并爬上平台所需时间(寻台潜伏期),连续 5 d。如果大鼠在 60 s 内未找到平台,潜伏期记为 60 s。(2)空间探索试验:测量保持空间位置记忆的能力。定位航行实验结束后,于次日上午撤除平台,选择第 3 象限池壁中点作为入水点,将大鼠面向池壁放入水中,记录在 60 s 内跨过该象限平台相应位置的次数。

1.7 脑重测定

水迷宫测试后所有大鼠断头取脑,用镊子夹去

双侧嗅球,脑干沿小脑下缘修平,保留绒球小结叶,沿中线剖开,用纱布擦干表面血迹,用电子天平分别称取左右半球脑重。

1.8 病理改变

称取脑重并肉眼观察脑形态变化后,立即将左半球固定于40 g/L 甲醛缓冲液中,常规石蜡包埋,冠状连续切片,苏木精-伊红染色后观察海马的改变。在400倍光镜下大脑乳头体水平的切片上对左侧海马CA1区存活锥体细胞进行计数,随机观察CA1区5个视野并计数正常锥体细胞数目,取平均值作为每组代表值。

1.9 海马磷酸化CaMKII及BDNF表达水平

免疫组化法检测左侧海马磷酸化钙调素依赖性蛋白激酶II(CaMKII)和脑源性神经营养因子(BDNF)水平:切片常规脱蜡,3%双氧水灭活内源性过氧化物酶10 min,蒸馏水洗3次;0.01 M 枸橼酸缓冲液(pH 6.0)中加热沸腾后断电,间隔8 min后反复1~2次,自然冷却,PBS洗2次;滴加正常山羊血清封闭液室温下15 min后甩去,加1:100磷酸化CaMKII或1:200 BDNF一抗(Cell Signaling Technology公司)室温孵育2 h,PBS洗2 min×3次;滴加生物素标记的二抗室温下孵育15 min,PBS洗2 min×3次;SABC37℃孵育15 min,PBS洗5 min×3次,DAB显色,镜下控制反应时间。蒸馏水洗涤、晾干,中性树胶封片。阳性细胞表现为神经突起部位黄棕色颗粒。左侧海马CA1区光镜下(×400倍)每张切片随机取5个视野,测量平均光密度值,取其平均值进行统计分析。

1.10 统计学分析

采用SPSS软件进行统计学处理。数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用方差分析,两两比较用 q 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 神经功能评分

各组大鼠神经功能评分随年龄增长呈下降趋势,运动组大鼠在运动2周、3周及4周后的神经功能评分($1.12 \pm 0.25, 0.71 \pm 0.28, 0.46 \pm 0.18$)和同龄期假手术组大鼠的神经功能评分($0.92 \pm 0.15, 0.67 \pm 0.25, 0.50 \pm 0.36$)均明显优于HIBD组($1.42 \pm 0.30, 1.21 \pm 0.31, 1.04 \pm 0.33$)。在各测试时间点运动组与假手术组间神经功能评分差异无统计学意义($P > 0.05$) (图1)。

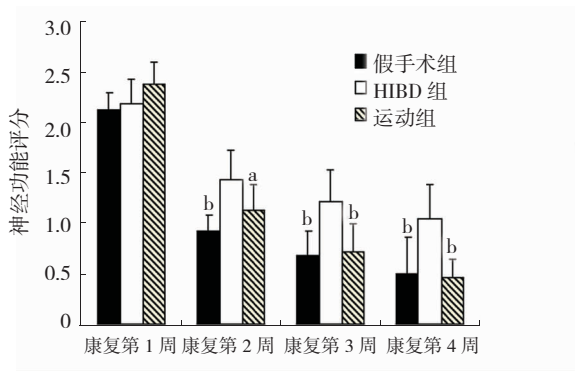


图1 各组大鼠不同时间点神经功能评分与HIBD组相比,a: $P < 0.05$,b: $P < 0.01$ 。

2.2 突触形态透射电镜观察

在60 000倍透射电镜下观察HIBD组大鼠左侧海马可见突触前膜内囊泡数量减少,突触前后膜轮廓模糊,突触间隙增宽,突触后致密物厚度减低,而运动组及假手术组左侧海马神经毡区每视野下突触数量多于HIBD组,突触前膜内囊泡丰富,突触前后膜轮廓清晰(图2)。

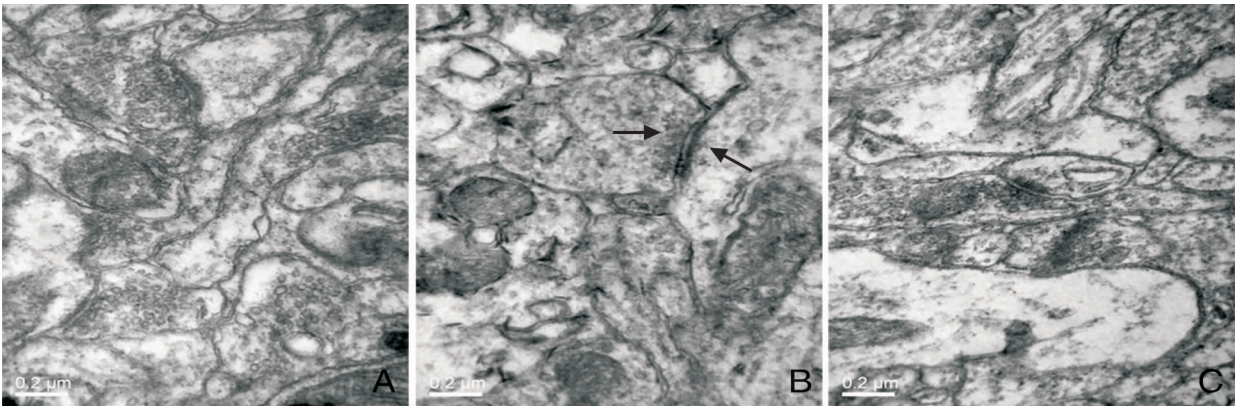


图2 大鼠左侧海马突触超微结构观察(透射电镜,×60 000) A:假手术组,左侧海马区突触前膜内囊泡丰富,突触前后膜轮廓清晰;B:HIBD组,大鼠左侧海马区可见突触前膜内囊泡数量减少,突触前后膜轮廓模糊,突触间隙稍增宽,突触后致密物厚度减低(箭头所示);C:运动组,与假手术组无明显差别。

2.3 Morris 水迷宫

在5 d 的 Morris 水迷宫定位航行实验中,各组大鼠寻台潜伏期随训练时间延长而下降,在各测试时间点 HIBD 组寻台潜伏期均明显长于运动组(第1~2 天 $P<0.05$,第3~5 天 $P<0.01$)和假手术组(第1~3 天 $P<0.01$,第4~5 天 $P<0.05$),而运动组与假手术组间差异无统计学意义($P>0.05$)(图3)。在第6 天的空间探索实验中,HIBD 组大鼠穿越平台次数(2.62 ± 0.74 次)较假手术组(4.62 ± 1.19 次)及运动组(5.25 ± 1.98 次)少,差异有统计学意义($P<0.01$),运动组与假手术组间差异无统计学意义($P>0.05$)。

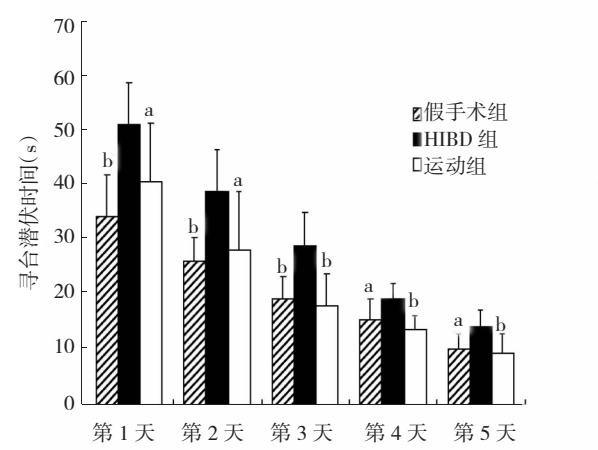


图3 各组大鼠水迷宫定位航行实验寻台潜伏期与 HIBD 组相比,a: $P<0.05$,b: $P<0.01$ 。

2.4 脑重变化

HIBD 组、运动组大鼠左侧平均脑重均低于假

手术组。而 HIBD 组(0.46 ± 0.02 g)又较运动组(0.63 ± 0.06 g)低($P<0.01$)。各组大鼠右侧平均脑重之间差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.5 病理改变

HIBD 组大鼠左侧海马大量神经元出现变性坏死,散在正常神经细胞,可见胶质细胞增生。运动组大鼠左侧海马亦有变性和坏死的神经元出现,但程度较 HIBD 组轻。假手术组左侧海马结构未见明显异常(图4)。400 倍光镜下计数左侧海马 CA1 区存活锥体细胞发现假手术组存活锥体细胞较 HIBD 组和运动组多,运动组又多于 HIBD 组($P<0.01$)(表1)。

2.6 海马磷酸化 CaMKII 及 BDNF 表达水平

运动组左侧海马 CA1 区锥体细胞磷酸化 CaMKII 平均光密度值明显高于 HIBD 组,与假手术组相比差异无统计学意义。运动组、HIBD 组左侧海马 CA1 区 BDNF 平均光密度值较假手术组高,而运动组又明显高于 HIBD 组($P<0.01$)(表1)。

表1 各组大鼠左侧海马 CA1 区存活锥体细胞计数及磷酸化 CaMKII 与 BDNF 平均光密度值 ($n=8, \bar{x}\pm s$)

组别	海马 CA1 区存活 锥体细胞数	平均光密度值	
		磷酸化 CaMKII	BDNF
假手术组	63 ± 9	0.299 ± 0.020	0.136 ± 0.008
HIBD 组	47 ± 6^a	0.226 ± 0.020^a	0.179 ± 0.009^a
运动组	$56\pm12^{b,c}$	0.283 ± 0.021^c	$0.235\pm0.015^{a,c}$
F 值	15.514	36.227	197.715
P 值	<0.01	<0.01	<0.01

a: 与假手术组比较, $P<0.01$; b: 与假手术组比较, $P<0.05$; c: 与 HIBD 组比较, $P<0.01$ 。

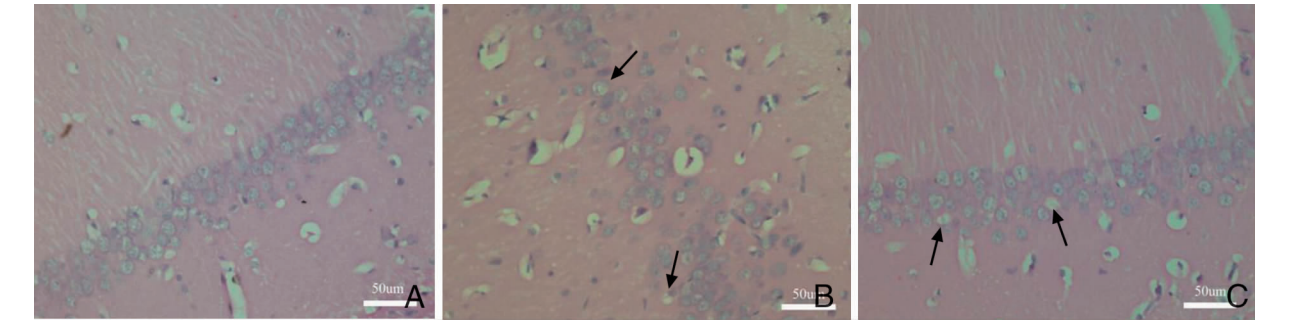


图4 各组大鼠左侧海马 CA1 区苏木精-伊红染色($\times400$) 可见假手术组(A)左侧海马 CA1 区结构未见明显异常。HIBD 组(B)出现大量神经元变性坏死(箭头所示),散在正常神经细胞,胶质细胞增生,细胞排列紊乱,失去正常结构层次。运动组(C)大鼠左侧海马 CA1 区亦有变性和坏死的神经元出现(箭头所示),但程度较 HIBD 组轻,细胞排列稍疏松,结构层次尚存在。

3 讨论

脑缺血缺氧可导致皮质、海马、基底节等结构损伤,加之胆碱能神经元和 AVP 肽能神经元受损,脑内学习记忆的神经生化基础受损,Pepaz 环路受到

破坏,从而出现记忆障碍^[7]。运动可以明显提高学习记忆功能,已有不少关于运动康复改善中老年脑卒中患者学习记忆功能的报道^[8],但有关其对 HIBD 患儿学习记忆影响及机制的研究还不多。HIBD 患儿大脑处于发育阶段,与成熟期脑相比,未成熟脑在结构和功能上具有很强的适应和重组能

力,更易受外界环境和刺激的影响。因此是否可以通过运动康复来改善 HIBD 患儿的学习记忆功能呢?为了证实这个设想,本实验使用相当于人类新生儿期的 7 日龄 SD 大鼠为实验对象,建立 HIBD 模型后采用滚笼,平衡木,转棒和网屏训练抓握、旋转、平衡和行走能力。训练 4 周后,神经功能评分发现运动组评分明显优于 HIBD 组。Morris 水迷宫实验结果显示运动组大鼠寻台潜伏期明显低于 HIBD 组,60 s 内跨越平台次数明显多于 HIBD 组,进一步的形态学观察发现无论是建模侧大脑半球重量,还是海马区存活锥体细胞数,运动组大鼠均高于 HIBD 组。提示运动康复可减少缺血缺氧后海马神经元死亡,促进神经元存活,修复受损脑组织,从而改善缺血缺氧脑损伤后受损的神经功能与学习记忆功能。

学习记忆的细胞和分子基础定位于突触,记忆形成的基础是突触效应增强,神经元得到的各种信息:各种感觉、运动、情感以及注意力等,利用不同的神经递质通过特殊的通路运送到同一神经元,然后第二信使刺激特殊的蛋白激酶等发挥作用^[9]。突触效应增强的具体表现是突触可塑性增强,可塑性包括突触前和突触后可塑性,长时程增强(LTP)和长时程抑制(LDP)是主要表现模式。突触可塑性结构基础中最重要的一个结构是附于突触后膜胞浆侧厚约 50 nm 的一种超微结构-突触后致密物(PSD),其厚度、长度与面积在 LTP 形成中均发现有增加现象,由此推测 PSD 的变化可能是突触功效增强的物质基础^[10]。CaMKII 是突触后致密物的主要成分,占 PSD 组分蛋白总量的 20%~30%。它具有 30 个磷酸化位点,其磷酸化状态用于控制酶的活性参与学习记忆过程的调控^[11]。Giese 等^[12]证明 CaMKII 自身磷酸化在诱导 LTP 的形成中是必须的。本实验通过观察大鼠海马超微结构发现,运动组大鼠左侧海马神经毡区每视野下突触数量多于 HIBD 组,突触前膜内囊泡丰富,突触前后膜轮廓清晰,突触后致密物厚度亦较 HIBD 组更厚,免疫组化检测发现运动组大鼠左侧海马磷酸化 CaMKII 表达水平明显高于 HIBD 组,由此证实运动康复可诱导海马磷酸化 CaMKII 蛋白表达增高,增加突触后膜厚度,增强突触结构可塑性,从而提供了改善学习记忆的物质基础。

作为一种重要的神经营养因子,BDNF 对神经元的生长、发育、分化、维持和损伤修复以及突触可塑性发挥着重要作用,可促进突触发育,减少神经元凋亡。Linnarsson 等^[13]用 Morris 水迷宫检测 BDNF 基因缺失的突变小鼠空间学习能力,结果发现青年 BDNF 突变小鼠空间学习能力较正常对照组明显下

降,而老年 BDNF 突变小鼠丧失学习能力。此外,在给予 BDNF 抗体的大鼠中会出现空间学习记忆的缺陷。以上结果表明,BDNF 是海马依赖性学习记忆任务中结构与功能整合的一个关键分子。本实验中运动组大鼠左侧海马 BDNF 表达明显高于 HIBD 组及假手术组,提示运动康复可诱导海马 BDNF 表达增多,从而促进海马锥体细胞存活,增强突触可塑性,最终改善学习记忆功能。

综上所述,运动康复通过诱导海马 BDNF 表达增加促进缺血缺氧后大鼠海马锥体细胞存活,增强突触可塑性,从而改善神经功能及空间学习记忆。因此对于 HIBD 患儿,待其生命体征稳定后应尽早进行运动康复,改善预后。此外,通过在一定范围内对运动的可变因素(如频率、周期与强度等)进行准确的定量调控,同时进一步确认脑功能恢复的最佳时间窗,为临床开展有效系统的运动康复提供理论依据将是今后进一步的研究方向。

[参 考 文 献]

- [1] 陈彤,张秋业. 新生儿缺氧缺血性脑病发病机制研究进展[J]. 齐鲁医学杂志,2007, 22(6): 553-555.
- [2] Stella SG, Vilar AP, Lacroix C, Fisberg M, Santos RF, Mello MT, et al. Effects of type of physical exercise and leisure activities on the depression scores of obese Brazilian adolescent girls[J]. Braz J Med Biol Res, 2005, 38(11): 1683-1689.
- [3] Waynman S, Gomez Pinilla F. License to run: exercise impacts functional plasticity in the intact and injured central nervous system by using neurotrophins[J]. Neurorehabil Neural Repair, 2005, 19(4): 283-295.
- [4] Deeny SP, Poeppel D, Zimmerman JB, Roth SM, Brandauer J, Witkowski S, et al. Exercise, APOE, and working memory: MEG and behavioral evidence for benefit of exercise in epsilon 4 carriers[J]. Biol Psychol, 2008, 78(2): 179-187.
- [5] Rice JE, Vannucci RC, Brierley JB. The influence of immaturity on hypoxic ischemic brain damage in the rat[J]. Ann Neurol, 1981, 9(4): 131-141.
- [6] 徐莉,李玲,陈景藻,郭振援,王冰水,袁华,等. 康复训练对大鼠脑梗死神经功能恢复的影响[J]. 中华物理医学与康复杂志,2000, 22(2): 86-88.
- [7] 贾健民,贾健平. 大鼠脑反复缺血致不可逆性学习记忆障碍的研究[J]. 心理学报,1995, 27(1): 69-71.
- [8] 路微波,胡永善,吴毅,白玉龙,姜鹭春,朱秉,等. 康复训练改善脑卒中患者认知障碍的临床观察[J]. 中国康复医学杂志,2008, 23(7): 622-624.
- [9] 李玲,徐莉. 康复训练促进脑梗死大鼠记忆功能的恢复[J]. 第四军医大学学报,2000, 21(12): 1555-1558.
- [10] 黄小玉,王忱. 突触可塑性的结构基础和分子机制[J]. 重庆医学,2006, 35(21): 1992-1994.
- [11] 刘鹏,伟忠民. 细胞内 Ca^{2+} 浓度和 CaMKII 对学习和记忆的作用与影响的研究进展[J]. 辽宁医学院学报,2009, 30(1): 92-94.
- [12] Giese KP, Fedorov NB, Filipkowski RK, Silva AJ. Autophosphorylation at Thr286 of the alpha calcium-calmodulin kinase II in LTP and learning[J]. Science, 1998, 279(5352): 870-873.
- [13] Linnarsson S, Bjorklund A, Emfors P. Learning deficit in BDNF mutant mice[J]. Eur J Neurosci, 1997, 9(12): 2581-2587.

(本文编辑:王庆红)