

论著·实验研究

丰富环境干预促进缺氧缺血性脑损伤新生大鼠神经元细胞增殖和功能修复

陈光福¹ 张蕴芳¹ 龙琦¹ 温文² 许美权² 杨雅玲²

(深圳市第二人民医院/深圳大学第一附属医院 1. 儿科; 2. 病理科, 广东 深圳 518035)

[摘要] **目的** 探讨丰富环境刺激对缺氧缺血性脑损伤(HIBD)新生大鼠神经元增殖、学习记忆能力和运动功能的影响。**方法** 108只7日龄 Sprague-Dawley 新生大鼠随机分为假手术组、HIBD组和干预组。采用 Rice-Vannucci 方法制作 HIBD 模型。干预组于 HIBD 后行丰富环境刺激。干预后 7 d、14 d、28 d 进行行为学测试(水迷宫试验、悬吊试验、斜坡试验),光镜下计数海马 CA1 区单位面积神经元的数目。**结果** HIBD 组 7 d、14 d 和 28 d 海马 CA1 区锥体细胞数明显少于假手术组锥体细胞数 ($P < 0.01$);干预组干预后 7 d、14 d 和 28 d 海马 CA1 区锥体细胞数均多于 HIBD 组 ($P < 0.01$)。HIBD 组和干预组 7 d、14 d、28 d 隐匿平台逃避潜伏期(EL)较假手术组明显延长 ($P < 0.01$),跨越平台次数均明显低于假手术组 ($P < 0.01$),而干预组 7 d、14 d 及 28 d EL 较 HIBD 组明显缩短,跨越平台次数较 HIBD 组明显增加 ($P < 0.01$)。HIBD 组与干预组 7 d、14 d 和 28 d 悬吊试验维持时间和得分均低于假手术组 ($P < 0.01$),斜坡试验时间高于假手术组 ($P < 0.01$),而干预组 14 d 和 28 d 悬吊试验维持时间和得分均明显高于 HIBD 组 ($P < 0.01$),斜坡试验时间明显低于 HIBD 组 ($P < 0.01$)。**结论** 早期丰富环境干预可以促进 HIBD 神经细胞的修复,并改善大鼠学习记忆能力和运动功能。 [中国当代儿科杂志,2012,14(2):139-143]

[关键词] 缺氧缺血性脑损伤;丰富环境;神经元细胞;行为学测试;大鼠

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2012)02-0139-05

Effects of environmental enrichment on the repair and proliferation of neurons in neonatal rats with hypoxic-ischemic brain damage

CHEN Guang-Fu, ZHANG Yun-Fang, LONG Qi, WEN Wen, XU Mei-Quan, YANG Ya-Ling. Department of Pediatrics, Second People's Hospital of Shenzhen, Shenzhen, Guangdong 518035, China (Email: szchengf@163.com)

Abstract: Objective To study the effects of environmental enrichment on neuron proliferation, learning and memory ability and motor ability in neonatal rats with hypoxic-ischemic brain damage (HIBD). **Methods** One hundred and eight 7-day-old Sprague-Dawley rats were randomly divided into three groups: sham operation (CON group), HIBD and intervention group. HIBD model was prepared according to the classic Rice-Vannucci method. Environmental enrichment was administered for the rats in the intervention group after HIBD inducement. Behavioral tests (Water maze test, Suspension test and Slope test) were performed and the number of neural cells in the left hippocampus was examined 7, 14 and 28 days after intervention. **Results** The pyramid cells in the hippocampus CA1 area in the HIBD group were significantly less than in the CON group at 7, 14 and 28 days ($P < 0.05$). The number of pyramid cells in the hippocampus CA1 area in the intervention group was significantly higher than in the HIBD group ($P < 0.01$) at 7, 14 and 28 days. The hidden platform escape latency period (EL) in the Water maze test was significantly more prolonged and the cross-platform number within 2 minutes was significantly less in the HIBD and the intervention groups than in the CON group at all observed time points ($P < 0.01$). The EL was significantly shorter and the cross-platform number within 2 minutes was significantly higher in the intervention group than in the HIBD group at all observed time points ($P < 0.01$). The maintain time and score in the Suspension test were significantly lower and the time in the Slope test was significantly more prolonged in the HIBD and intervention groups than in the CON group at 7, 14 and 28 days ($P < 0.01$). An increased maintain time and score and a decreased time in the Slope test were found in the intervention group compared with the HIBD group at 14 and 28 days ($P < 0.01$). **Conclusions** Environmental enrichment can improve motor function, learning and memory ability, and promote the repair and proliferation of neurons in neonatal rats with HIBD.

[Chin J Contemp Pediatr, 2012, 14 (2):139-143]

Key words: Hypoxic-ischemic brain damage; Environmental enrichment; Neuron; Behavioral test; Rats

[收稿日期]2011-11-16;[修回日期]2011-12-04

[基金项目]深圳市科技计划项目(200902031)。

[作者简介]陈光福,男,博士,主任医师。

新生儿缺氧缺血性脑损伤(hypoxic-ischemic brain damage, HIBD)是指围生期窒息缺氧导致脑的缺氧缺血性损害,临床上出现一系列中枢神经系统异常的表现,是围生期足月儿脑损伤的最常见原因,常可引起脑瘫、癫痫、智力低下等严重后遗症。采用有计划、有目的的丰富环境活动等综合治疗进行早期干预,可减少或者避免婴幼儿智能和运动发展偏离正常。作者先前研究发现早期干预具有激活内源性神经干细胞增殖和分化的作用^[1],本研究采用丰富环境刺激对HIBD新生大鼠进行早期干预,观察丰富环境刺激对28 d内HIBD新生大鼠脑组织神经元细胞、学习记忆能力和运动功能的影响,并进一步探讨丰富环境刺激对新生儿HIBD神经功能修复的作用。

1 材料与方法

1.1 实验分组及模型制作

健康7日龄Sprague-Dawley新生大鼠共108只,雌雄不限,平均体重 14.3 ± 1.6 g,随机分为3组,每组36只。假手术组、缺氧缺血组(HIBD组)及干预组。根据观察时间点分为3个亚组:干预后7 d、14 d和28 d($n=12$)。采用Rice-Vannucci经典方法^[2]制成HIBD模型,乙醚吸入麻醉,颈部正中切开,分离左侧颈总动脉,双线结扎,中间剪断,缝合伤口,实验结束后将大鼠放回鼠笼由母鼠喂养。假手术组只切开颈部皮肤,不结扎劲总动脉。

1.2 实验方法

1.2.1 早期干预 干预组行丰富环境刺激。丰富环境设置在70 cm×60 cm×50 cm的透明有机玻璃大笼中,每个笼内8只幼鼠和1只母鼠,笼内放置不同颜色、形状的物体,如柠檬、树叶、刨花、木板、铁皮、斜坡、秋千、跷跷板、管道、转笼和玩具等,并播放轻音乐,同时予忽明忽暗的红色灯光刺激视觉(亮1 min、暗1 min,亮、暗交替),每日持续1 h。每3 d改变环境1次,总干预时间为28 d。非干预的HIBD组和假手术组分别饲养于25 cm×15 cm×10 cm无特殊刺激的标准环境中。3组均提供12 h光、12 h暗的昼夜光变化,自由进食、进水,定期换笼。

1.2.2 水迷宫试验 7 d、14 d和28 d时各组随机选择12只大鼠用Morris水迷宫试验测试学习记忆功能。(1)定位航行试验:训练前24 h将大鼠放入水迷宫中自由游泳3 min以熟悉迷宫环境。试验历时4 d,每天在固定时间分上午、下午2个时间段,

每个时间段训练4次。分别从池壁4个象限中点将大鼠头朝池壁放入水池,记录大鼠从入水中到爬上平台的时间,即隐匿平台逃避潜伏期(escape latency, EL),至60 s找不到平台,即将其引上平台,EL记为60 s,让大鼠在平台上休息15 s。取试验第4天的EL计算各组平均数。EL反映动物获得经验的能力,即学习能力。(2)空间探索试验:第5天进行空间探索试验,撤除平台,将大鼠随机从某一象限池壁中点头朝池壁放入水中,记录2 min穿越平台次数。空间探索试验反映动物保持经验的能力,即记忆能力。

1.2.3 悬吊试验 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,记录大鼠掉下的时间。评分标准:≤10 s计1分;~30 s计2分;~2 min计3分;~5 min计4分;~5 min计5分。

1.2.4 斜坡试验 将大鼠头向下倒置于45度斜面上,记录大鼠转为头向上角度>135度的时间。以s为计算单位。

1.2.5 神经元细胞计数 分别于7 d、14 d和28 d处死各组大鼠2只,制成脑组织石蜡切片,脱蜡复水后行尼氏染色。0.1%甲苯胺蓝,60%温染1 min,水洗,脱水,95%乙醇镜下分化,脱水、透明、封固。光镜下(×400)计数海马CA1区单位面积神经元的数目。

1.3 统计学分析

采用SPSS 13.0软件进行统计学处理,所有数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。多组间比较采用方差分析,多组间两两比较采用 q 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组海马CA1区神经元细胞变化

假手术组海马CA1区锥体细胞排列致密,细胞质中尼氏体清晰可见;HIBD组锥体细胞排列紊乱,细胞丢失明显,细胞质中尼氏体减少或消失,部分细胞可见核固缩和核碎裂。HIBD组7 d、14 d和28 d海马CA1区锥体细胞数($44 \pm 6, 45 \pm 7, 51 \pm 8$)明显少于假手术组锥体细胞数($106 \pm 10, 105 \pm 10, 111 \pm 11$),差异有统计学意义($P<0.01$)。干预组海马CA1区锥体细胞排列整齐,干预后7 d、14 d和28 d锥体细胞数($76 \pm 13, 91 \pm 11, 99 \pm 11$)均多于HIBD组($44 \pm 6, 45 \pm 7, 51 \pm 8$),差异有统计学意义($P<0.01$)。见图1。

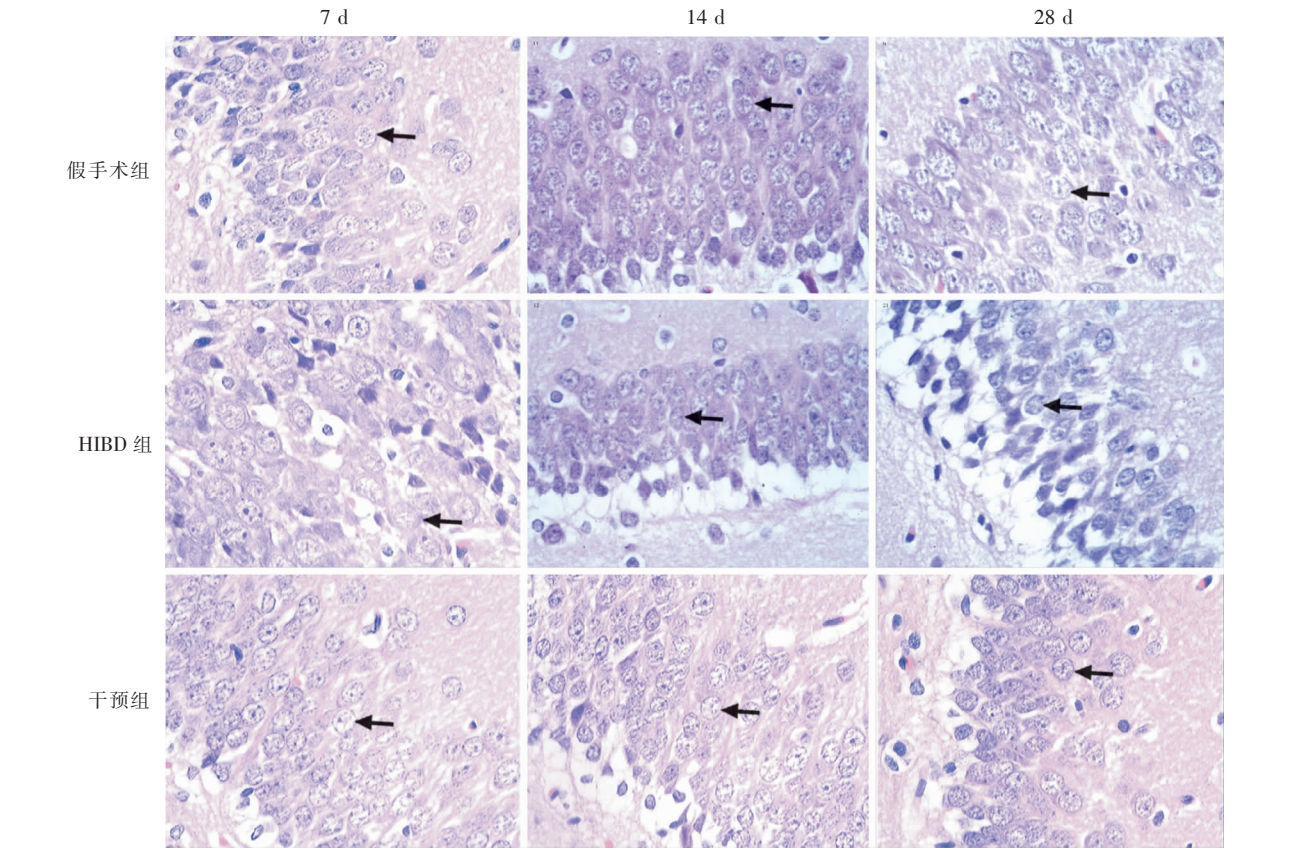


图 1 左侧海马 CA1 区神经元细胞变化(尼氏染色, ×400) 假手术组 7 d、14 d 及 28 d 海马 CA1 区锥体细胞排列致密, 细胞核中染色质清晰可见,细胞呈锥形,顶部可见轴突。HIBD 组 7 d 海马 CA1 区锥体细胞肿胀、变性,细胞排列紊乱,细胞核中染色质减少,部分细胞可见核固缩和核碎裂,细胞间隙增宽;HIBD 组 14 d 和 28 d 海马 CA1 区锥体细胞排列紊乱,细胞丢失明显,细胞核中染色质减少或消失,大部分细胞可见核固缩、碎裂和浓染,细胞间隙增宽、空泡。干预组 7 d 海马 CA1 区锥体细胞排列稀疏,细胞丢失较明显,细胞核中染色质减少,细胞间隙增宽;干预组 14 d 海马 CA1 区锥体细胞排列稍稀疏,细胞核中染色质减少,细胞间隙增宽;干预组 28 d 海马 CA1 区锥体细胞排列较整齐,细胞核中染色质减少,细胞间隙稍增宽。箭头所示为锥体细胞。

2.2 各组 Morris 水迷宫试验结果

在定位航行试验中,各组大鼠 EL 均随游泳次数增多而缩短。HIBD 组和干预组 7 d、14 d、28 d 的 EL 较假手术组明显延长($P<0.01$),但干预组 7 d、14 d、28 d 的 EL 较 HIBD 组明显缩短($P<0.01$)。在空间探索试验中,假手术组大鼠运动轨迹主要集

中在原平台位置,而 HIBD 组则多沿池壁游泳。撤去平台后 2 min 内,HIBD 组 7 d、14 d、28 d 跨越平台次数均明显低于假手术组($P<0.01$);干预组 7 d、14 d、28 d 2 min 内跨越平台次数高于 HIBD 组,但低于假手术组,差异有统计学意义($P<0.01$)。见表 1,图 2~3。

表 1 各组 Morris 水迷宫试验结果 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	EL(s)			2 min 跨越平台次数		
		7 d	14 d	28 d	7 d	14 d	28 d
假手术组	12	43.5±7.9	37.2±7.3	21.2±4.5	8.3±2.2	7.9±4.9	5.5±2.3
HIBD 组	12	71.1±10.8 ^a	62.4±9.1 ^a	39.0±6.8 ^a	3.9±1.4 ^a	3.2±3.2 ^a	2.4±1.5 ^a
干预组	12	52.3±8.4 ^{a,b}	43.5±8.4 ^{a,b}	26.6±2.8 ^{a,b}	6.6±2.1 ^{a,b}	5.8±2.9 ^{a,b}	5.0±1.8 ^{a,b}
F 值		13.8	15.4	21.7	26.9	28.5	31.2
P 值		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

a. 与假手术组比较, $P<0.01$; b. 与 HIBD 组比较, $P<0.01$

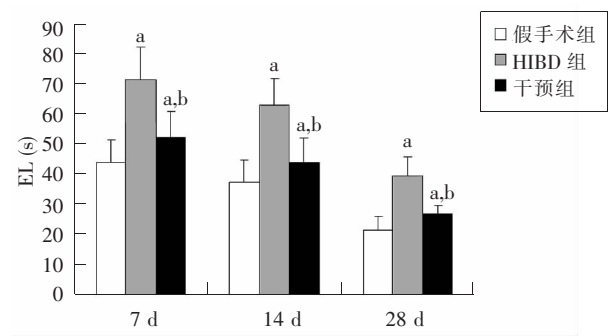


图2 各组 Morris 水迷宫试验 EL 比较($n=12$) a:与假手术组比较, $P<0.01$; b:与 HIBD 组比较, $P<0.01$

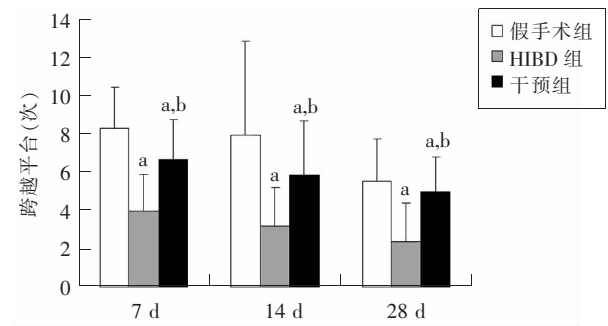


图3 各组 Morris 水迷宫试验跨越平台次数比较($n=12$) a:与假手术组比较, $P<0.01$; b:与 HIBD 组比较, $P<0.01$

2.3 各组悬吊试验结果

HIBD 组与干预组悬吊试验维持时间和得分均

低于假手术组,差异有统计学意义($P<0.01$)。但干预组 14 d 和 28 d 悬吊试验维持时间和得分均明显高于 HIBD 组,差异有统计学意义($P<0.01$),见表 2,图 4。

2.4 斜坡试验

HIBD 组 7 d、14 d、28 d 的斜坡试验时间(s) (5.4 ± 1.5 , 5.0 ± 1.3 , 5.6 ± 1.7)与干预组(4.7 ± 1.2 , 3.5 ± 1.1 , 2.9 ± 1.0)均高于假手术组(2.3 ± 0.8 , 2.3 ± 0.9 , 2.0 ± 0.9),差异有统计学意义($P<0.01$)。干预组 14 d、28 d 斜坡试验时间明显低于 HIBD 组,差异有统计学意义($P<0.01$)。

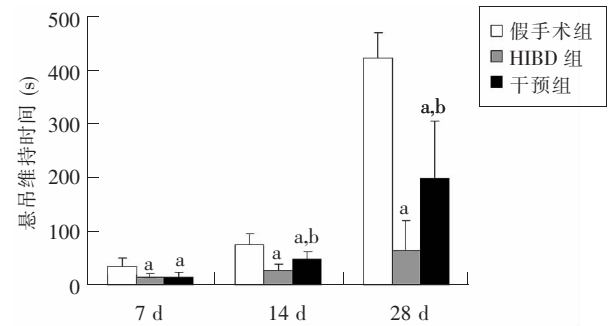


图4 各组悬吊维持时间比较($n=12$) a:与假手术组比较, $P<0.01$; b:与 HIBD 组比较, $P<0.01$

表2 各组悬吊试验结果 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	维持时间(s)			得分		
		7 d	14 d	28 d	7 d	14 d	28 d
假手术组	12	34 ± 17	73 ± 21	420 ± 48	2.8 ± 0.6	3.7 ± 0.7	5.6 ± 0.6
HIBD 组	12	14 ± 7 ^a	27 ± 10 ^a	63 ± 56 ^a	2.0 ± 0.5 ^a	2.3 ± 0.9 ^a	2.8 ± 1.2 ^a
干预组	12	14 ± 8 ^a	48 ± 14 ^{a,b}	199 ± 104 ^{a,b}	1.4 ± 0.5 ^a	3.0 ± 0.5 ^{a,b}	4.2 ± 0.8 ^{a,b}
F 值		39.3	53.6	87.4	32.7	14.4	32.5
P 值		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

a. 与假手术组比较, $P<0.01$; b. 与 HIBD 组比较, $P<0.01$

3 讨论

婴儿期是神经系统发育的关键期,关键期内的丰富环境刺激和训练即为早期干预。这种积极丰富的环境刺激开始越早,对其智力和行为发育所起的作用就越明显。研究证实,通过早期干预可显著改善 HIBD 预后,降低伤残发生率^[3]。本研究采用的早期干预方法包括各种不同颜色玩具的视觉刺激;各种不同形状、质感物体的触觉刺激;秋千、楼梯、平

衡木的平衡功能训练。用毛刷对幼鼠进行刺激类似母鼠在代养幼鼠过程中舔舐幼鼠的行为,可促进幼鼠的海马神经元发育和认知功能的成熟。水迷宫试验结果显示,干预后 7 d、14 d、28 d 新生大鼠的 EL 明显低于 HIBD 组;干预后 7 d、14 d、28 d 新生大鼠 2 min 跨越平台次数明显多于 HIBD 组,结果表明早期干预可促进缺氧缺血后损伤脑组织认知功能的恢复。

本研究发现,与假手术组比较,HIBD 组新生大鼠悬吊试验、斜坡试验表现较差,说明 HIBD 对新生

大鼠运动功能产生了损害。经过丰富环境刺激干预后,干预组新生大鼠在悬吊试验、斜坡试验等测试中的表现明显强于 HIBD 组,说明干预组新生大鼠较 HIBD 组在肌力、平衡能力、协调能力及环境适应能力等方面明显增强,早期干预能够使中枢神经系统的协调、整合、控制能力增强,尤其是肌力增加明显,而肌力增加又促进了平衡能力和协调能力的改善,同时丰富的环境刺激提高了大鼠的兴奋性和对环境的适应能力。

本研究结果显示,早期丰富环境刺激可以维护海马区神经细胞的结构完整,改善 HIBD 大鼠的学习记忆及行为能力。以早期抚触和丰富环境为主的早期干预对脑功能的促进作用可能涉及多方面机制^[4]:①减少缺氧缺血后持续的神经元的凋亡。缺氧缺血后脑细胞的损害以凋亡为主,且持续时间长,可达 30 d 以上。持续的神经元凋亡将导致脑损伤面积的扩大,是 HIBD 中枢神经系统远期并发症的一个重要原因。②改善突触结构和神经元间的信息传递。突触是神经信息传递的特化结构。③促进海马齿状回神经干细胞的增殖、分化,新生神经元迁移至损伤区域并与周围神经元形成突触联系,替代死亡的神经元。此外,有报道早期丰富环境对脑发育和远期行为的影响与血清皮质酮水平密切相关^[5]。可塑性是指脑在外界刺激下发生结构和功能重塑的巨大潜能^[6]。在脑损伤之后,只要经过适当早期干预,就可通过改变神经元的大小、脑总体质量、个别突触的数目和结构,并增加神经元间的连接和神经通路等方式对运动发育产生积极影响。早期干预可能通过使神经元细胞体积增加,突触联系范围扩大,增加脑的可塑性和可代偿性,从而改善认知功能^[7-8]。有研究表明,神经干细胞(nerve stem cells, NSCs)在哺乳动物脑内终生存在于侧脑室外侧壁的室下带和海马齿状回(dentate gyrus, DG)的颗粒下层以及大脑皮质等部位^[9-10],早期干预可以激活内源性神经干细胞的增殖^[11-12],通过丰富环境刺激可促进内源性 NSCs 动员并朝中枢神经系统损伤区定向迁移^[13]。我们既往研究发现早期干预可以促进 HIBD 大鼠脑组织 Brdu 阳性和 Nestin 阳性神经干细

胞增殖^[1]。因此,通过丰富环境刺激进行早期干预可促进 HIBD 新生大鼠脑组织神经细胞修复和行为学改善,其作用可能与激活内源性神经干细胞的增殖与分化有关。

[参 考 文 献]

[1] 陈光福,张蕴芳,龙琦,温文,许美权. 早期干预对缺氧缺血性脑损伤新生大鼠内源性神经干细胞增殖的影响[J]. 实用儿科临床杂志,2011,26(20):1575-1577.

[2] Rice JE, Vannucci RC, Brierley JB. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat[J]. Ann Neural, 1981,9(2):131-141.

[3] Couto RC, Carvalho EA, Pedrosa TM, Pedroso ER, Neto MC, Biscione FM. A 10-year prospective surveillance of nosocomial infections in neonatal intensive care units[J]. Am J Infect Control, 2007, 35(3): 183-189.

[4] 陈燕惠,刘玲,陈敏榕,陈达光. 早期干预对新生鼠脑神经生长相关蛋白表达及细胞凋亡的影响[J]. 实用儿科临床杂志, 2007, 22(14):1083-1084.

[5] 马良,陈燕惠,韦立新. 早期丰富环境对大鼠远期行为发育及血清皮质酮的影响[J]. 中国当代儿科杂志,2011,13(7): 586-589.

[6] 沈晓明. 儿童脑科学研究的临床和教育学意义:从研究到应用[J]. 中国儿童保健杂志,2006,14(1):1.

[7] 胡金梅,何展文,刘木金,罗向阳. 早期综合干预对脑损伤综合征患儿的疗效[J]. 中国康复杂志,2009,24(2):140.

[8] 胡素君,蔡春玲,王玲. 早期干预对高危新生儿智能及运动发育的影响[J]. 中国实用神经疾病杂志,2008,11(2):86-88.

[9] Liu YP, Bradley TL, Mustafa KB, Dempsey RJ, Vemuganti R. The potential of neural stem cells to repair stroke-induced brain damage[J]. Acta Neuropathol, 2009,117(5):469-480.

[10] Rueger MA, Backes H, Walberer M, Neumaier B, Ullrich R, Simard ML, et al. Noninvasive imaging of endogenous neural stem cell mobilization in vivo using positron emission tomography[J]. J Neurosci, 2010, 30(18): 6454-6460.

[11] Nithianantharajah J, Hannan AJ. Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system[J]. N Rev Neurosci, 2006, 7(9):697.

[12] Maegele M, Lippert-Gruener M, Ester-Bode T, Garbe J, Bouillon B, Neugebauer E. et al. Multimodal early onset stimulation combined with enriched environment is associated with reduced CNS lesion volume and enhanced reversal of neuromotor dysfunction after traumatic brain injury in rats[J]. Eur J Neurosci, 2005, 21(9):2406-2418.

[13] 熊方令,高宜录. 内源性神经干细胞修复中枢神经系统损伤的策略[J]. 基础医学与临床,2010,30(10):1105-1108.

(本文编辑:俞燕)