

论著 · 实验研究

新生大鼠缺氧缺血性脑损伤远期行为学
和超微结构改变

欧阳福连¹ 周细中¹ 方素珍¹ 蔡颖谦² 李宏¹

(南方医科大学珠江医院 1. 儿科; 2. 神经外科实验室, 广东 广州 510282)

[摘 要] 目的 建立新生大鼠缺氧缺血性脑损伤(HIBD)模型,观察远期行为学及超微结构改变。方法 60 只 7 日龄新生 Sprague-Dawley 大鼠随机分为 HIBD 组和假手术组,每组 30 只。生后 5 周进行 Morris 水迷宫试验及感觉功能测试;取脑组织切片行尼氏染色计数神经元数目;取皮层、海马行透射电镜,观察突触结构,测量突触后致密区(PSD)厚度及活性区长度,并与行为学结果进行相关分析。结果 Morris 水迷宫试验中,HIBD 组大鼠寻找平台潜伏期时间明显长于假手术组($P < 0.05$);HIBD 组大鼠穿越平台次数较假手术组少($P < 0.05$)。感觉运动功能试验中,HIBD 组测试结果明显差于假手术组。尼氏染色提示 HIBD 组神经元数目明显减少($P < 0.01$)。电镜显示 HIBD 组大鼠突触数量减少,PSD 厚度及活性区长度变薄变短。HIBD 组大鼠 PSD 厚度与 Morris 水迷宫试验寻找平台潜伏期时间呈负相关($r = -0.861, P < 0.01$),与三项感觉功能评估得分之和亦呈负相关($r = -0.758, P < 0.05$)。结论 缺氧缺血可致新生鼠远期神经元减少和超微结构损伤,造成远期行为学功能障碍。

[中国当代儿科杂志,2012,14(5):380-384]

[关键词] 缺氧缺血;超微结构;行为学;新生大鼠
[中图分类号] R-33 [文献标识码] A [文章编号] 1008-8830(2012)05-0380-05

Long-term behavioral and ultrastructural alterations following hypoxic-ischemic brain damage in neonatal rats

OU-YANG Fu-Lian, ZHOU Xi-Zhong, FANG Su-Zhen, CAI Ying-Qian, LI Hong. Department of Pediatrics, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, China (Li H, Email:lh32998@126.com)

Abstract: Objective To study long-term behavioral and ultrastructural alterations in a hypoxic-ischemic brain damage (HIBD) model of neonatal rats. **Methods** Sixty seven-day-old Sprague-Dawley rats were randomly subjected to unilateral carotid artery ligation followed by hypoxic exposure (HIBD group) or sham operation ($n = 30$ each). A battery of behavioral tests, including Morris water maze test and sensorimotor tests, were performed at a postnatal age of 5 weeks. Nissl staining was used for counting neurons. Transmission electron microscopy was used for observing synapse structures and measuring the thickness of the postsynaptic density area and the length of the postsynaptic active area. The correlations of histological changes with the results of behavioral tests were evaluated. **Results** The HIBD group showed a significantly longer escape latency ($P < 0.05$) and a lower frequency of original platform crossing ($P < 0.05$) in the Morris water maze test compared with the sham operation group. The sensorimotor function test showed that the sensorimotor function in the HIBD group was worse than in the sham operation group. Nissl staining showed that the number of neurons in the HIBD group was significantly reduced ($P < 0.01$) compared with the sham operation group. Transmission electron microscopy showed that synapses were significantly reduced in number, and that the thickness of the postsynaptic density area and the length of the postsynaptic active area were reduced in the HIBD group. The thickness of the postsynaptic density area was negatively correlated with escape latency in the Morris water maze test ($r = -0.861, P < 0.01$), and also negatively correlated with the total score of sensorimotor function tests ($r = -0.758, P < 0.05$) in the HIBD group. **Conclusions** Hypoxia ischemia can lead to neuron loss and ultrastructure damage, resulting in long-term deficit of behavioral functions in neonatal rats. [Chin J Contemp Pediatr, 2012, 14(5):380-384]

Key words: Hypoxia ischemia; Ultrastructure; Behavior; Neonatal rats

[收稿日期]2011-11-24;[修回日期]2012-2-22
[作者简介]欧阳福连,女,硕士研究生。
[通信作者]李宏,教授。

新生儿缺氧缺血性脑损伤(hypoxic-ischemic brain damage, HIBD)是指围产期窒息导致脑的缺氧缺血性损害,是造成围产期新生儿死亡和儿童伤残的主要原因之一^[1]。新生儿处在大脑发育关键期,未成熟前具有较好的可塑性和代偿性^[2],不仅急性期,恢复期积极的综合干预亦有助于减轻后遗症,因此对HIBD患儿远期后遗症进行全面合理的评估对预后判断和治疗有积极指导意义。

HIBD是一种弥漫性损伤,易损伤的脑区最常见为海马及皮层,海马是重要的空间学习记忆相关脑区^[3],而皮层则与感觉运动功能密切相关^[4]。由于HIBD致病因素的复杂性,加上婴幼儿脑发育的可塑性,临床上要确切地评价HIBD的远期预后及干预的效果相当困难。目前对于HIBD远期预后及干预措施疗效的评价多停留在行为学及上述两个脑区损伤后常规病理学改变的观察上,鲜有超微结构的研究^[5-6]。突触是神经元和效应细胞之间传递信息的功能部位,与行为学表现之间关系密切,也是脑发育可塑性的核心。观察突触超微结构的改变不仅可以深入探究HIBD损伤机理及修复机制,还可以了解其与行为学之间的相关性,从而有望对HIBD远期预后及干预疗效做出早期客观的评价。因此本研究观察HIBD大鼠远期突触超微结构改变,并与行为学结果进行相关分析,探讨HIBD后超微结构改变的意义,指导HIBD远期预后及疗效评估。

1 材料与方法

1.1 材料

清洁级健康7日龄Sprague-Dawley(SD)新生大鼠60只,雌雄不限,体重12~18 g,由广州南方医科大学实验动物中心提供。石蜡切片机(德国Leica公司),尼氏染色液(上海碧云天生物技术公司),透射电镜(德国Leica公司),图片采集系统(德国Leica公司),混合气体(广州气体公司)。

1.2 方法

1.2.1 分组 60只大鼠随机分为假手术组和HIBD组(两组大鼠体重差异无统计学意义),每组30只。均由母鼠母乳喂养至21日龄时断奶,随后予以清洁饮食及饮水,室温维持在22℃,每日予以12 h光照,12 h黑暗环境。均于35日龄时进行行为学测定,随后每组各随机取15只处死行脑尼氏染色,取8只处死进行超微结构观察。

1.2.2 模型制作 参照Rice方法^[7]制备新生鼠HIBD模型:7日龄大鼠在乙醚麻醉下行颈前正中切

口,分离左侧颈总动脉并结扎,保温2 h后,放入含8%氧气和92%氮气的密闭容器内2 h,制成HIBD模型,术后送还母鼠喂养。假手术组大鼠仅予分离左颈总动脉,不予结扎和缺氧。

1.2.3 行为学检测 两组大鼠于35日龄时行Morris水迷宫试验测试空间学习能力^[8]。(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1次,每次从不同象限入水,记录大鼠寻找并爬上平台所需时间(寻找平台潜伏期),连续5 d,如果大鼠在120 s内未找到平台,潜伏期则记为120 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。

两组大鼠达35日龄时进行感觉运动功能测试^[4]。(1)足错误:将大鼠放在水平的金属网格上(60 cm×40 cm,每格3 cm×3 cm,金属直径约为0.4 cm),记录2 min内爪子落入网格中的次数,为排除不同大鼠活动度差别的影响,选择左右侧错误次数的差值进行统计学分析。(2)姿势反射: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),而有脑损伤的大鼠在损伤大脑半球对侧(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)的抵抗力减弱则示为异常(2分)。(3)肢体放置: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:爪子放置正确、迅速计0分;爪子放置迟缓或不完全正确计1分;爪子不能放置计2分。记录每只鼠两侧得分的差值。不同感觉刺激包括: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。正常鼠会将双前爪放于桌上;而脑损伤鼠损伤大脑半球的对侧爪放置错误;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,而脑损伤大鼠因损伤大脑半球对侧的前、后肢可能会掉下来;⑥同⑤,只是从后面推。

1.2.4 脑组织尼氏染色 行为学测试后各组随机取15只处死,4%多聚甲醛灌注并取脑组织固定后行石蜡包埋,取前囟和前囟后3 mm部位,制成

3 μm厚的石蜡切片,每个标本随机选取3张切片,脱腊水化后行尼氏染色。光镜下观察计数神经元数量,每张切片取5个视野,以5个视野均数作为该张切片神经元数量,最后以3张切片均数作为该标本神经元数量。

1.2.5 脑组织突触超微结构观察及突触后致密区厚度和活性区长度测量 各组随机取8只大鼠断头处死,迅速剪开颅骨、剥离大脑,分离出左侧皮层和海马,分别取矢状缝旁左侧脑额叶皮层及海马CA1区切成1 mm×1 mm×1 mm小块,每只鼠皮层和海马随机取3个小块,浸泡于2.5%戊二醛中4℃保存。经PBS冲洗后,1%锇酸固定,PBS冲洗,梯度丙酮脱水,环氧树脂618浸透包埋,每只鼠皮层和海马随机选取其中1个包埋块制作超薄切片,醋酸铀和柠檬酸铅双染后,常规电镜制片、观察,选神经毡区放大46000倍观察突触、神经元形态结构,对突触后致密区(PSD)厚度和活性区长度进行测量(PSD是电镜下见到的突触后膜内侧胞质面一层均质的高电子密度致密物质,其厚度即致密物厚度。活性区长度指突触前膜与聚集成簇的突触小泡相接触形成突触活性区,其长度也反映突触接触面积的大小。两者的测量是参照Guldner等人^[9]方法经Leica图像分析仪测得)。每个标本切片中随机取5个视野,测量5个视野中的8个突触的PSD厚度和活性区长度,算出均数作为该标本的值。

1.3 统计学分析

用SPSS 17.0统计软件进行统计处理,数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用t检验,相

关分析采用Pearson相关分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 行为学检测结果

2.1.1 Morris水迷宫试验 在5 d的Morris水迷宫定位航行试验中,各组大鼠寻找平台潜伏期随训练时间延长而缩短,在各时间点HIBD组寻找平台潜伏期均明显长于假手术组(均 $P < 0.05$)。在第6天的空间探索试验中,HIBD组大鼠穿越平台次数(2.7 ± 1.9)较假手术组(6.2 ± 3.2)少,差异有统计学意义($t = -5.201, P < 0.05$)。

2.1.2 感觉运动功能测试 足错误试验中HIBD组左右差值(3.6 ± 2.1)较假手术组(0.7 ± 0.8)明显增高($t = 7.177, P < 0.05$),说明HIBD组大鼠左右运动不对称,右侧(缺血对侧)差于左侧。姿势反射中假手术组30只大鼠得分均为0,而HIBD组仅10例为0分,另20例为2分。肢体放置试验中假手术组30只大鼠有28例得分为0分,仅2例为1分,而HIBD组大鼠的得分为1~4分(其中4例1分,10例2分,8例3分,8例4分)。

2.2 脑组织尼氏染色结果

尼氏染色结果发现假手术组大鼠的神经元排列整齐,神经元内布满蓝色尼氏小体,无空泡(图1A、B);而HIBD组部分神经元肿胀,神经元数量明显减少(图1C、D)。HIBD大鼠海马CA1区及皮层神经元数目较假手术组明显减少($P < 0.01$),见表1。

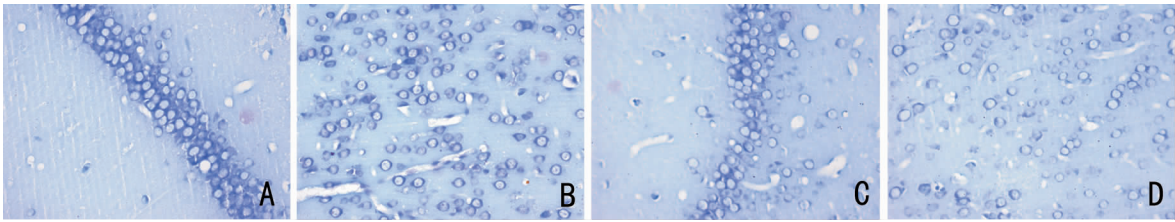


图1 脑组织尼氏染色结果(×400) 假手术组大鼠左侧海马CA1区(图A)和左侧皮层(图B)的神经元排列整齐,神经元内布满蓝色尼氏小体,无空泡;而HIBD组大鼠左侧海马CA1区(图C)和左侧皮层(图D)的部分神经元肿胀,神经元数量明显减少。

表1 两组大鼠海马和皮层神经元数目比较 ($\bar{x} \pm s$)			
组别	n	海马	皮层
假手术组	15	62 ± 6	91 ± 5
HIBD组	15	46 ± 6	62 ± 9
t值		8.0	10.7
P值		<0.001	<0.001

2.3 脑组织超微结构观察结果

假手术组大鼠海马和皮层神经元外形轮廓清晰,胞质内线粒体丰富,膜光滑清晰;粗面内质网及游离核糖体丰富;核大而圆,核仁明显突起交织形成神经毡,毡区突触数目众多,突触结构清晰、完整;突触前膨大内可见较多突触小泡,密集均匀分布于突触前膨大内,PSD较厚,活性区较长。见图2A、B。

HIBD 组海马和皮层损伤严重,可见神经元胶质细胞及毛细血管间隙变大,内有电子密度较低的絮状物,有的神经元胞质内出现空泡,线粒体肿胀;神经毡区突触减少,突触前膨大肿胀、轮廓不清晰,膜厚薄不均,部分区域不连续;突触小泡溶解

空泡形成,PSD 变薄、薄厚不均,活性区长度变短。见图 2C、D。

对各组突触 PSD 厚度和活性区长度进行测量。HIBD 组较假手术组 PSD 厚度变薄,活性区长度缩短,差异有统计学意义(均 $P < 0.01$)。见表 2。

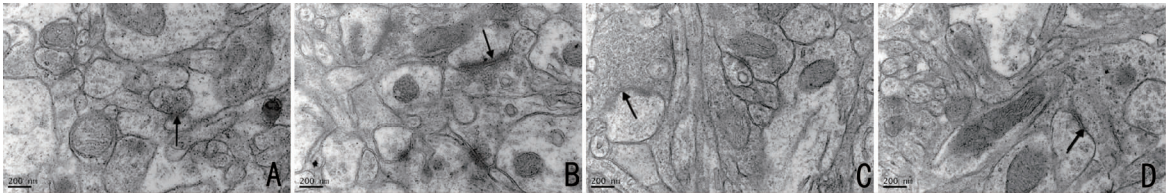


图 2 假手术组大鼠左侧海马超微结构(×46 k) 假手术组大鼠左侧海马(图 A)和左侧皮层(图 B)外形轮廓清晰,膜光滑清晰,核大而圆,核仁明显突起交织形成神经毡,毡区突触数目众多,突触结构清晰、完整;突触前膨大内可见较多突触小泡,密集均匀分布于突触前膨大内,突触后致密区(PSD)较厚,活性区较长(箭头所示)。HIBD 组左侧海马(图 C)和左侧皮层(图 D)损伤严重,神经毡区突触减少,突触前膨大肿胀、轮廓不清晰,膜厚薄不均,部分区域不连续;突触小泡溶解空泡形成,PSD 变薄、薄厚不均,活性区长度变短(箭头所示)。

表 2 两组大鼠海马和皮层 PSD 厚度和活性区长度比较 ($\bar{x} \pm s$, nm)					
组别	n	PSD 厚度		活性区长度	
		海马	皮层	海马	皮层
假手术组	8	38 ± 6	56 ± 8	117 ± 13	254 ± 17
HIBD 组	8	13 ± 3	15 ± 3	71 ± 9	83 ± 11
t 值		10.2	13.0	8.5	24.4
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

2.4 脑组织超微结构和病理学与行为学的相关分析

将 HIBD 组大鼠海马 CA1 区单位面积内神经元数目与 Morris 水迷宫试验第 5 天寻找平台潜伏期时间进行相关分析,发现两者无相关性($r = 0.131, P = 0.642$)。将 HIBD 组大鼠皮层单位面积内神经元数目与三项感觉功能评估之和进行相关分析,两者亦无相关性($r = 0.135, P = 0.632$)。

将 HIBD 组大鼠海马突触 PSD 厚度与 Morris 水迷宫试验第 5 天寻找平台潜伏期时间进行相关分析,发现两者呈负相关($r = -0.861, P = 0.006$)。将 HIBD 组大鼠皮层突触 PSD 厚度与三项感觉功能评估之和进行相关分析,发现两者亦呈负相关性($r = -0.758, P = 0.029$)。

3 讨论

HIBD 是一种弥漫性损伤,发病机制复杂,是由多种机制综合作用所致的一系列生化连锁反应或称缺氧缺血性瀑布的结果。而海马和皮层是脑的重要

区域,与学习记忆和感觉运动功能等密切相关。海马损伤则会导致空间记忆和学习能力下降,皮层损伤可以导致感觉运动功能受损。本研究结果表明,缺氧缺血可导致大鼠远期空间学习记忆及皮层感觉运动功能障碍,病理学提示海马 CA1 区及皮层神经元损伤、数量明显减少,与国外的研究^[10-11]一致。

从理论上讲,神经元数量的减少会导致相应功能的障碍,但本研究结果却发现,大鼠神经元数量改变与行为学结果之间并无相关性。分析其原因,可能是由于大脑结构和功能的复杂性造成的,因为除了海马和皮层,其他脑区也与空间学习记忆和感觉运动功能有关^[12]。但是,除了神经元的数目外,突触在神经功能的表达中起着重要的作用。突触是神经元和效应细胞之间传递信息的功能部位,在一定条件下突触可以调整功能、改变形态和增减数目,这种能力称作突触重塑。突触重塑主要包括功能重塑和形态重塑,后者主要表现为新突触形成、突触形状、面积及 PSD 厚度和活性区长度变化等^[13]。PSD 是电镜下见到的突触后膜内侧胞质面一层均质的高电子密度致密物质,内含神经递质受体、细胞骨架和多种信号分子,是对 HIBD 反应比较敏感的结构,与信息传递和整合的速率有关,是反映突触可塑性的重要形态学指标之一^[14]。本研究发现电镜下观察 HIBD 远期的海马和皮层可见神经元皱缩,神经毡区突触减少,突触小泡溶解空泡形成,PSD 变薄、薄厚不均,活性区长度变短。相关分析显示行为学测试结果与电镜 PSD 厚度呈负相关性,表明突触的改变是导致 HIBD 大鼠远期行为学障碍的主要原因。

由于婴儿神经系统功能发育的生理特征,当脑

神经细胞在组织学上受到损伤后,有些临床症状或体征并不会立即出现,而是在以后(甚至数年间)的生长发育过程中逐渐显现出来。本研究发现神经元数目减少与神经功能之间并无相关性,而神经元数目减少一般意味着急性期脑损伤比较严重,故不能单纯从急性期脑损伤的严重程度来判断 HIBD 患儿的远期预后,而要从远期的突触状态来判断功能和预后。综上,突触的改变是导致神经功能改变的重要原因,而突触又存在很强的可塑性,许多因素都可以影响远期突触的变化,故临床上康复的首要任务是要运用一切手段使 HIBD 后远期的突触结构得以尽可能多的保留,从而改善神经功能。在临床上,除了全面进行神经功能评分外,弥散加权成像^[15-17]、视频脑电图及磁共振波谱^[18]、PET^[19]等间接反映神经功能的辅助检查,在 HIBD 诊断和预后评估中都发挥着越来越重要的作用,为将来 HIBD 的诊断和治疗提供新的方向。

[参 考 文 献]

[1] 中华医学会儿科学分会新生儿学组. 新生儿缺氧缺血性脑病诊断标准[J]. 中国当代儿科杂志, 2005, 7(2): 97-98.

[2] Johnston MV, Ishida A, Ishida WN, Matsushita HB, Nishimura A, Tsuji M. Plasticity and injury in the developing brain[J]. Brain Dev, 2009, 31(1): 1-10.

[3] 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.

[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] 鲁利群, 范建义, 赵聪敏. 环境刺激对缺氧缺血性脑损伤新生大鼠学习记忆及海马病理学的影响[J]. 实用儿科临床杂志, 2007, 22(2): 103-105.

[6] 曲云霞, 何绘敏, 李开花, 王朝晖, 徐立新. 白藜芦醇对缺氧缺血性脑损伤新生大鼠学习记忆和海马突触素表达的影响[J]. 中国小儿急救医学, 2010, 17(5): 434-436.

[7] Rice JE 3rd, Vannucci RC, Brierley JB. The influence of immatu-

rity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat[J]. Ann Neurol, 1981, 9(2): 131-141.

[8] 陈小璐, 蒋莉. 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[J]. 中国当代儿科杂志, 2010, 12(5): 363-367.

[9] Guldner FH, Ingham CA. Increase in postsynaptic density material in optic target neurous of the rat suprachiasmatic nucleus after bilateral enucleation[J]. Neurosci Lett, 1980, 17(1-2): 27-31.

[10] Kakizawa H, Matsui F, Tokita Y, Hirano K, Ida M, Nakanishi K, et al. Neuroprotective effect of nipradilol, an NO donor, on hypoxic-ischemic brain injury of neonatal rats[J]. Early Hum Dev, 2007, 83(8): 535-540.

[11] Kumral A, Uysal N, Tugyan K, Sonmez A, Yilmaz O, Gokmen N, et al. Erythropoietin improves long-term spatial memory deficits and brain injury following neonatal hypoxia-ischemia in rats[J]. Behav Brain Res, 2004, 153(1): 77-86.

[12] 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.

[13] Jaworski J, Kapitein LC, Gouveia SM, Dortland BR, Wulf PS, Grigoriev I, et al. Dynamic microtubules regulate dendritic spine morphology and synaptic plasticity[J]. Neuron, 2009, 61(1): 85-100.

[14] 刘传军, 郭延奎, 李亚鲁. 早期干预对缺氧缺血性脑损伤新生鼠大脑皮质突触重塑的影响[J]. 中国妇幼保健, 2011, 26(11): 1702-1705.

[15] Chan KC, Khong P, Lau HF, Cheung PT, Wu EX. Late measures of microstructural alterations in severe neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy by MR diffusion tensor imaging[J]. Int Devel Neurosci, 2009, 27(6): 607-615.

[16] Rutherford M, Malamateniou C, McGuinness A, Allsop J, Biarge MM, Counsell S. Magnetic resonance imaging in hypoxic-ischaemic encephalopathy[J]. Early Hum Dev, 2010, 86(6): 351-360.

[17] Jissendi Tchofo P, Christophe C, David P, Metens T, Soto Ares G, Balériaux D. Apparent diffusion coefficient (ADC) and magnetization transfer ratio (MTR) in pediatric hypoxic-ischemic brain injury[J]. J Neuroradiol, 2005, 32(1): 10-19.

[18] Ancora G, Soffritti S, Lodi R, Tonon C, Grandi S, Locatelli C, et al. A combined a-EEG and MR spectroscopy study in term newborns with hypoxic-ischemic encephalopathy[J]. Brain Dev, 2010, 32(10): 835-842.

[19] Kumar A, Chugani HT. PET in the assessment of pediatric brain development and developmental disorders[J]. PET Clin, 2008, 3(4): 487-515.

(本文编辑: 王庆红)