

探索环境对局灶性脑梗死大鼠行为学恢复及梗死灶周围皮层神经颗粒素表达的影响

槐雅萍¹, 贾新风², 贾子善¹

[摘要] 目的 观察探索环境对局灶性脑梗死大鼠行为学恢复及神经颗粒素(Ng)表达的影响。方法 健康雄性 SD 大鼠 70 只,其中 60 只电凝法造成右侧大脑中动脉阻断(MCAO)模型后,随机分为探索组($n=30$,置于迷宫笼喂养)和手术对照组($n=30$,置于普通笼喂养),另 10 只为假手术组。各实验组随机取 10 只,分别于术后 1 d、7 d、14 d、28 d 时进行 Berderson 神经功能评分、肌力试验及平衡木试验。探索组和手术对照组分别于术后 1 d、7 d、14 d、28 d 处死 5 只大鼠,假手术组分别于 7 d、28 d 时处死 5 只大鼠,进行 Ng 免疫组化染色。结果 探索组行为学评分于 14~28 d 优于手术对照组($P<0.05$)。Ng 阳性神经元数在 7 d、14 d、28 d 明显多于手术对照组($P<0.01$)。结论 探索环境可促进大鼠行为学功能的恢复并促进梗死灶周围皮层 Ng 表达。

[关键词] 探索环境;脑梗死;行为;神经颗粒素(Ng);大鼠

Effect of Exploratory Environment on Behavioral Recovery and Expression of Neurogranin in Rats after Unilateral Local Cerebral Infarction HUAI Ya-ping, JIA Xin-feng, JIA Zi-shan. Department of Rehabilitation Medicine, Hebei Provincial People's Hospital, Shijiazhuang 050051, Hebei, China

Abstract: **Objective** To study the effect of exploratory environment on behavioral recovery and the expression of neurogranin (Ng) in rats after unilateral local cerebral infarction. **Methods** 70 male Sprague-Dawley rats were adopted. After making the model of MCAO with electric coagulation, 60 rats were randomly divided into exploratory group ($n=30$, living in maze cages) and control group ($n=30$, living in large standard cages). Other 10 rats as the sham group lived in standard cage. 10 rats were chosen randomly from the groups for Berderson test, manual muscle and balancing test on the 1st, 7th, 14th, 28th day after operation, and 5 rats were sacrificed separately in exploratory group and control group at the same time. 5 rats in sham group were randomly sacrificed separately on the 7th, 28th day after operation. The expressions of Ng in the peri-ischemic cortex were detected with immunohistochemistry stain. **Results** The scores of behavior in exploratory group improved compared with that in control group ($P<0.05$) from 14 d after operation. The number of Ng positive cells increased in exploratory group compared with that in control group ($P<0.01$) from 7 d after operation. **Conclusion** Exploratory environment can facilitate the functional recovery and the Ng expression in rats after unilateral local cerebral infarction.

Key words: exploratory environment; cerebral infarction; behavior; neurogranin (Ng); rats

[中图分类号] R743 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1006-9771(2009)03-0220-03

[本文著录格式] 槐雅萍,贾新风,贾子善.探索环境对局灶性脑梗死大鼠行为学恢复及梗死灶周围皮层神经颗粒素表达的影响[J].中国康复理论与实践,2009,15(3):220—222.

探索学习是指动物主动接受新的信息而改变自身行为、适应新的环境,不断用新的记忆取代旧的记忆的过程。学习会增加突触的数量,改变突触的结构^[1],改变啮齿类动物脑内特定区域树突棘的密度^[2]。神经颗粒素(neurogranin, Ng)是可塑性相关分子^[3]。本文拟观察探索环境对局灶性脑梗死大鼠行为学恢复及梗死灶周围皮层 Ng 表达的影响,探讨探索学习影响脑梗死后功能恢复的机制。

1 材料和方法

基金项目:河北省科技攻关课题(07276101D-3)。

作者单位:1. 河北省人民医院康复医学科,河北石家庄市 050051; 2. 天津大港油田总医院,天津市 300280。作者简介:槐雅萍(1973-),女,河北河间市人,硕士,副教授,主要研究方向:神经系统疾病康复。通讯作者:贾子善。

1.1 实验动物 清洁级雄性 SD 大鼠 70 只,3~4 月龄,体重 230~260 g,购自华中科技大学同济医学院实验动物学部,合格证号:SCXK(鄂)2004-0007。将动物随机分为大脑中动脉闭塞(MCAO)模型组 60 只,假手术组 10 只。

1.2 制备 MCAO 模型及分组 参照 Bederson 等^[4]的方法电凝制备 MCAO 模型。术后 24 h 随机分为探索组 30 只,对照组 30 只。另 10 只不电凝 MCA,其余步骤与手术组相同,为假手术组。

假手术组和对照组大鼠饲养于标准笼,每笼 5 只。探索组每 15 只一组饲养于由一个圆笼和一个方笼组成的迷宫笼^[5];直径 500 mm 圆笼同 640×480×120 mm 方笼中间通过两通道相连;圆笼中间由丝网分隔,一侧为进食区,一侧为饮水区;方笼由丝网分隔形成通道宽 80×80 mm 的迷宫,迷宫由易到难,每周变换 1

次。

1.3 行为学评价 各实验组随机取 15 只,分别于术后 1 d、7 d、14 d、28 d 时进行 Berderson 神经功能评分^[4](表 1)、肌力试验(表 2)及平衡木试验(表 3)。

表 1 Berderson 神经功能评分标准

评分	表现
0	无神经缺损体征
1	病灶对侧腕关节、肘关节屈曲,肩内收(提尾悬空实验)
2	向麻痹侧侧推阻力下降(侧推实验)伴 1 级体征
3	2 级体征伴自由活动向麻痹侧转圈

表 2 肌力试验评分标准

评分	表现
0	大鼠在绳上悬掉 0~2 s
1	大鼠在绳上悬掉 3~4 s
2	大鼠在绳上悬掉时间≥5 s,无第三肢上绳
3	大鼠在绳上悬掉时间≥5 s,有第三肢上绳

表 3 平衡木试验评分标准

评分	表现
0	大鼠穿过平衡木,不会跌倒
1	大鼠穿过平衡木,跌倒机会小于 50%
2	大鼠穿过平衡木,跌倒机会大于 50%
3	大鼠能穿过平衡木,瘫痪侧后肢不能帮助向前移动
4	大鼠不能穿过平衡木,但可以坐在上面
5	大鼠放在平衡木上会掉下来

1.4 标本的制备 各手术组分别于术后 1 d、7 d、14 d、28 d 随机取 5 只,假手术组术后 7 d 随机取 5 只,28 d 随机取 5 只。用 10%水合氯醛腹腔内注射麻醉后固定于手术台,剪开胸腔,暴露心脏,用 9 号针头插入左心室,灌注生理盐水,待右心耳膨起,剪开右心耳让血液流出,至右心耳流出液为无色透明时开始用 4%多聚甲醛灌注固定,先快后慢,每只大鼠约 300 ml,总量在 20~30 min 内灌完。固定后立即剖颅取脑,在视交叉处切开,冠状切取 2 mm 厚包含梗死灶区域及左右半球的组织块浸于 4%多聚甲醛中再固定 4 h。常规梯度酒精脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,连续冠状切片,切片厚 5 μm。

1.5 免疫组化染色 组织切片常规脱蜡、水化。PBS 冲洗 3 次,每次 3 min;0.3% H₂O₂ 室温孵育 10 min;PBS 冲洗;热修复 30 min;PBS 冲洗;滴加溶液 A(蛋白阻断液),室温孵育 10 min;PBS 冲洗;滴加一抗(Ng 稀释比例为 1:1000,购自美国 Upstate),置 20%甘油湿盒 4℃恒温过夜;PBS 冲洗;滴加生物素标记二抗,室温孵育 10 min;PBS 冲洗;滴加过氧化物酶标记的链霉菌抗生素蛋白,室温孵育 10 min;PBS 冲洗;DAB 显色,自来水充分冲洗,苏木素复染,梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。PBS 代替一抗做阴性对照。

1.6 图像处理 每只大鼠选取 3 张切片,每张切片选取 3 个高倍视野,用 CMIAS8 真彩色病理图像分析系统(中国航天航空大学图像分析中心)进行分析,统计

梗死灶周围皮层 Ng 阳性细胞数。

1.7 统计学方法 各组数据以($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 12.0 统计软件,组间比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 行为学评价 假手术组大鼠各项行为学评分均正常;造模各组大鼠均出现明显的瘫痪,且随着时间的推移逐渐恢复;1~7 d 探索组与对照组各项评分均无显著性差异($P>0.05$),但探索组于 14~28 d 各项评分均优于对照组($P<0.05$)。详见表 4。

表 4 各组术后行为学评分比较

组别	时间	神经功能评分	肌力试验	平衡木试验
探索组	1 d	2.07±0.26	2.06±0.70	3.00±0.76
	7 d	1.73±0.46	1.93±0.70	2.47±0.52
	14 d	1.13±0.52 ^a	2.53±0.52 ^a	1.07±0.59 ^a
	28 d	0.20±0.41 ^a	2.60±0.51 ^a	0.13±0.52 ^a
对照组	1 d	2.13±0.35	2.00±0.76	3.26±0.70
	7 d	1.80±0.41	1.80±0.68	2.53±0.74
	14 d	1.73±0.46	2.00±0.85	2.00±0.65
	28 d	0.93±0.59	2.00±0.76	0.80±0.86

注: a:与对照组同期比较, $P<0.05$ 。

2.2 梗死灶周围皮质 Ng 表达 探索组术后 1 d 梗死灶周围区 Ng 表达与对照组比较无显著性差异($P>0.05$)。随时间延长,Ng 表达逐渐增强,于术后 14 d 达到最高,然后下降。在术后 7~28 d,探索组阳性细胞数均高于对照组($P<0.01$)。见表 5。

表 5 各组梗死灶周围 Ng 阳性细胞数比较(/HD)

时间	探索组	对照组	假手术组
1 d	20.20±3.11	19.60±1.52	—
7 d	31.60±4.64 ^{a,b}	23.00±3.60 ^a	73.60±2.30
14 d	39.67±4.22 ^b	27.00±2.50	—
28 d	29.80±2.80 ^{a,b}	21.93±2.81 ^a	73.80±1.92

注: a:同假手术组同期比较, $P<0.01$; b:与对照组同期比较, $P<0.01$ 。

3 讨论

学习记忆属于高级神经活动或脑的高级功能,它是高等动物和人类最具有特色的生理特性之一。学习主要是指人或动物通过神经系统接受外界环境信息而影响自身行为的过程;记忆是指获得的信息或经验在脑内储存和提取的神经活动过程。两者密切相关,且都与脑的可塑性密切相关。

众多动物与临床研究都证实,学习可以促进脑的可塑性,引起神经系统形态学变化和功能变化。Gaab 等发现,通过对不同声音信号的学习训练,其听觉皮质较训练前增厚,同时伴随着分辨不同频率声音的能力的增加^[6]。张峰等发现,强化学习训练有助于改善颅脑损伤后患者的记忆功能恢复^[7];运动再学习对脑卒中后患者的吞咽功能、平衡能力、肢体功能的恢复均有促进作用^[8-9]。本实验结果显示,在实验性脑梗死后,将大鼠饲养于探索环境中,使之有从事探索学习,并与

其他大鼠进行交流的机会,其行为学结果在 MCAO 手术第 14 天后,明显优于群居于标准笼的对照组大鼠,提示探索环境可促进脑梗死后患肢功能的恢复。其机制可能是探索环境引起损伤后大脑周围皮质的可塑性变化。

Ng 系新近发现的一种由 78 个氨基酸组成的神经元特异性蛋白激酶,与生长相关蛋白(GAP-43)同属于 Calpacitin 蛋白家族^[10]。本课题组前期实验证实,在丰富环境及探索环境中饲养的大鼠,可以促进局灶性脑梗死大鼠梗死灶周围 GAP-43 的表达^[11]。Ng 作为一种神经元特异性蛋白,主要在大脑皮质、海马 CA1 和 CA3 区、齿状回、纹状体和杏仁核中高表达,并常见于这些区域的神经元胞体和树突。Li 等研究显示,大鼠 MCAO 可导致同侧大脑半球广泛性的 Ng 染色缺失^[12]。提示 Ng 是外伤性和缺血性脑组织损害等多种中枢神经系统疾病引起大脑病理改变所涉及的物质基础之一。

Ng 作为钙调蛋白(calmodulin, CaM)的储库及蛋白激酶 C(PKC)的作用底物,在 Ca^{2+} 介导的细胞信号转导过程中具有重要作用^[13-14],然而其在缺血神经元损伤及修复中的变化及作用尚未见报道。本研究表明,在大鼠 MCAO 后第 1 天探索组与对照组均出现 Ng 表达的减少,与 Li 等研究结果^[12]一致。MCAO 术后梗死灶周围皮质 Ng 表达随时间推移逐渐增高,到第 2 周左右达高峰然后逐渐下降,探索组各时间点均高于对照组,而假手术组无明显变化,与行为学结果相一致,提示探索学习通过增加梗死灶周围 Ng 的表达促进脑卒中后功能的恢复。

本研究提示,探索环境可以促进 Ng 的表达,有助于 Ng 发挥参与神经突触的形成功能,参与神经系统的可塑性,改善学习记忆功能。出现上述结果可能的机制为:Ng 在大脑中是作为 PKC 底物发挥作用,并可能在功能上将突触后 Ca^{2+} /钙调蛋白信号途径和 PKC 介导的第二信使系统连接起来,通过存在于其氨基酸末端的 G0 蛋白活化区域影响 G0 蛋白的 GTP 酶活性^[12,15]。Ng 在大鼠成年期与突触可塑性相关的 Ca^{2+} 介导的第二信使级联过程中扮演了关键的角色^[16]。在突触发育和重塑过程中,Ng 作为一种 PKC 介导的分子级联反应的“第三信使”底物^[17]。以上信号转导过程最终影响了长时程增强(long-term potentiation, LTP)和长时程抑制(long-term depression, LTD)等突触可塑性机制,导致了大鼠学习记忆功能的改善。

由此推测,探索学习促进脑梗死后 Ng 表达恢复是探索学习促进脑卒中康复的可能机制之一。

[参考文献]

- [1]Klintsova AY, Greenough WT. Synaptic plasticity in cortical systems[J]. Curr Opin Neurobiol, 1999, 9:203-208.
- [2]O'Malley A, O'Connell C, Murphy KJ, et al. Transient spine density increases in the mid-molecular layer of hippocampal dentate gyrus accompany consolidation of a spatial learning task in the rodent[J]. Neuroscience, 2000, 99(2): 229-232.
- [3]Johansson BB. Brain plasticity and stroke rehabilitation[J]. Stroke, 2000, 31(1):223-239.
- [4]Bederson JB, Pitlis LH, Tsun M, et al. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination[J]. Stroke, 1986, 17(3): 472-476.
- [5]贾子善, 李阔, 槐雅萍, 等. 不同环境干预对局灶性脑梗死大鼠行为学恢复的影响[J]. 中国康复医学杂志, 2007, 22(7):578-580.
- [6]Gaab N, Gaser C, Schlaug G, et al. Improvement-related functional plasticity following pitch memory training[J]. Neuroimage, 2006, 31(1):255-263.
- [7]张锋, 季建伟, 李子强, 等. 丰富环境与强化性学习训练促进颅脑损伤患者的记忆功能恢复[J]. 中国临床康复, 2005, 9(16):88-89.
- [8]席建明, 王庆波, 史丙俊, 等. 运动再学习方案对脑卒中患者步行功能的影响[J]. 中国中医急症, 2006, 15(10):1066-1067.
- [9]刘立明, 朱才兴, 成忠实, 等. 运动再学习方案对老年卒中平衡功能的疗效[J]. 中国康复, 2006, 21(3):172-173.
- [10]Gerendasy D. Homeostatic tuning of Ca^{2+} signal transduction by members of the calpacitin protein family[J]. J Neurosci Res, 1999, 58(1):107-119.
- [11]李阔, 高俊淑, 李娜, 等. 不同环境对局灶性脑梗死大鼠梗死灶周围皮质 GFAP、GAP-43 表达的影响[J]. 中国康复医学杂志, 2007, 22(7):581-583.
- [12]Li GL, Farooque M, Lewen A, et al. MAP2 and neurogranin as markers for dendritic lesions in CNS injury. An immunohistochemical study in the rat[J]. Acta Pathol Microbiol Immunol Scand, 2000, 108(2):98-106.
- [13]马强. 有关应激及糖皮质激素影响海马 LTP 的研究进展[J]. 国外医学生理、病理科学与临床分册, 2001, 21(6):430-431.
- [14]蒋晓江, 李书林, 许志强, 等. 生长抑素与血肿远隔区边缘叶-海马的损伤机制研究[J]. 中国危重病医学, 2000, 12(8):502-504.
- [15]Alvarez-Bolado G, Rodriguez-Sanchez P, Tejero-Diez P, et al. Neurogranin in the development of the rat telencephalon[J]. Neuroscience, 1996, 73(2):565-580.
- [16]李玲, 徐莉, 晏培松, 等. 脑梗死大鼠康复训练后脑的增殖细胞核抗原的表达及病理学改变[J]. 中华物理医学与康复杂志, 2000, 22(5): 339-342.
- [17]Shughrue PJ, Merchenthaler I. Estrogen prevents the loss of CA1 hippocampal neurons in gerbils after ischemic injury[J]. Neuroscience, 2003, 116(3):851-861.

(收稿日期:2008-09-27 修回日期:2008-12-09)