

## 尼莫通对新生大鼠缺氧缺血后学习记忆和海马星形胶质细胞的影响

杨涛 谢集建 常燕群 陈运彬

**[摘要]** 目的 研究尼莫通对缺氧缺血性脑损伤(HI)后大鼠学习和记忆能力的影响,并探讨其作用机理。方法 7日龄大鼠行右侧颈总动脉结扎后吸入8%氧气2h建立HI模型。随机取13只予尼莫通腹腔注射,每日1次,共5天;至80d左右行Y迷宫测试,然后用胶质纤维酸性蛋白(GFAP)免疫组化染色标记星形胶质细胞。结果 HI组学习记忆能力明显低于正常对照组( $P < 0.01$ ),尼莫通可提高学习能力,但对记忆无明显作用。HI组海马结构辐射层GFAP阳性细胞数密度高于对照组和治疗组( $P < 0.05$ ),其他各层差异不显著。结论 缺氧缺血性脑损伤可致大鼠学习记忆障碍,可能与缺氧缺血后海马结构中胶质细胞改变导致神经元微环境调节能力减退有关,尼莫通对脑缺氧缺血有一定的改善作用。

**[关键词]** 缺氧缺血;学习;记忆;星形胶质细胞;尼莫通;大鼠

**Effect of nimotop on the long term learning and memory and astrocytes in perinatal rats after hypoxia-ischemia** YANG Tao, XIE Jijian, CHANG Yan-qun, et al. Department of Pediatrics, Guangdong Maternal and Children Hospital, Guangzhou 510010, Guangdong, China

**[Abstract]** **Objective** To study the effects and mechanisms of hypoxia-ischemia (HI) on long-term learning and memory abilities and astrocytes in hippocampal formation and the efficacy of nimotop in treating hypoxic-ischemic brain damage. **Methods** The rats were subjected to right common carotid artery ligation followed by exposure to 8% oxygen at 37°C for 2 h and then 13 rat pups received an intraperitoneal injection of nimotop per day immediately following cerebral hypoxia-ischemia for 5 days. When the rats were 80-day-old, they were given test of Y-maze to determine their learning and memory abilities, and then their brain tissues were studied by immunohistochemistry for glial fibrillary acidic protein (GFAP) that marked astrocytes. **Results** The learning and memory abilities of the HI group were lower than those of the normal control and nimotop treated group ( $P < 0.01$ ), nimotop significantly increased Y-maze learning abilities ( $P < 0.05$ ) of rats received HI, but did not affect their memory abilities. The numerical density of GFAP-positive cells in CA1 radiatum stratum of hippocampal formation were markedly higher in the HI group than those in the other two groups ( $P < 0.01$ ), but the others strata showed no difference. **Conclusion** Hypoxic-ischemic brain damage cause rats to disorders of learning and memory that may be correlated with increase astrocyte in hippocampal formation which became easy to be damaged of declining regulation abilities of neurons microenvironment. Nimotop may be effective to counteract hypoxic-ischemic brain damages.

**[Key words]** hypoxia-ischemia; learning; memory; astrocyte; nimotop; rat

中图分类号:R743.3 文献标识码:A 文章编号:1006-9771(2005)09-0693-02

**[本文著录格式]** 杨涛,谢集建,常燕群,等.尼莫通对新生大鼠缺氧缺血后学习记忆和海马星形胶质细胞的影响[J].中国康复理论与实践,2005,11(9):693-694.

缺氧缺血性脑病(hypoxic-ischemic encephalopathy, HIE)是新生儿时期常见的神经系统疾病。在缺氧缺血性脑损伤发病过程中,星形胶质细胞参与其中并起着重要作用。本实验通过建立大鼠HIE模型,并在急性期给予尼莫通干预治疗,观察其对缺氧缺血性脑损伤后远期学习记忆的影响。

## 1 材料和方法

**1.1 实验动物及造模** 选择反应佳,外观无异常、体重在15~20g的7日龄Wistar大鼠49只(湖北省医科院动物中心提供),雌雄不拘。按窝随机分3组:正常对照组( $n=15$ )、缺氧缺血组( $n=21$ )、尼莫通治疗组( $n=13$ )。后2组大鼠经乙醚吸入麻醉后,颈正中切口,游离左侧颈总动脉,用5-0丝线结扎,缝合切口。2h后置于30×20×20cm大小的缺氧舱内,以2L/min的速度输入含8%氧气的氮氧混合气体2h。HI后,尼莫通治疗组动物立即给予尼莫通(拜尔公司)160mg/kg腹腔注射,每日1次,共5d。

**1.2 学习记忆能力测试** 造模完毕后,饲养至80d左右进行Y迷宫实验。将动物放入迷宫中任一臂适应2~3min,然后将其他任一臂的信号灯打开作为条件信号,示安全区,指示动物应跑向该臂,经5s延时后,不亮灯两臂及连接区通电(50±5)V,作为非条件刺激。当动物逃避电击至安全区后,切断电流,灯光持续约30s,然后熄灯。凡通电时动物直接跑向安全区为正确反应,反之为错误。达到“学会”标准为连续10次训练中有9次正确。记录每一动物达标前所需测试次数,作为学习快慢的指标。24h后检测记忆保持情况,即在连续10次测试中正确反应次数,以记忆保持的百分数表示。

**1.3 脑片制备及免疫组化染色** 行为学实验结束后,动物经4%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,心脏快速灌注100~150ml生理盐水后,立即灌注4℃含4%多聚甲醛的磷酸缓冲液300~500ml固定(pH=7.4)。取脑,切取海马部的脑片,厚3mm,在上述固定液中4℃固定过夜,0.01mol/L的PBS(pH=7.4)漂洗3次,梯度酒精脱水、石蜡包埋。连续石蜡切片,片厚4~6μm,每20张取3张,56℃~58℃烤箱内烤片30min,脱蜡,入双蒸水后再入PBS5min;滤纸吸干水分,加入3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-甲醇10~15min,复合消化液消化,再入

作者单位:1.510010 广东广州市,广州医学院附属广东省妇女儿童医院儿科(杨涛、谢集建、常燕群、陈运彬);2.442000 湖北十堰市,武汉大学医学院太和医院(谢集建)。作者简介:杨涛(1968-),女,江西南昌市人,副主任医师,主要研究方向:小儿神经康复。

1% BSA, 37℃ 30 min。滴加兔抗胶质纤维酸性蛋白 (GFAP) 血清 (Sigma 公司产品, 北京中山生物技术公司分装, 即用型), 再入生物素化的羊抗兔 IgG 和 SABC 液 (武汉博士德公司产品), 37℃ 各 30 min。DAB-0.01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 显色 10~15 min。以上各步骤间均用 PBS 充分漂洗。脱水、透明、中性树胶封片。对照实验用 PBS 代替一抗。免疫组化染色切片用计算机图象分析仪 (Leica), 选取海马体部和齿状回计数 GFAP 免疫染色阳性细胞的数密度。

1.4 统计学方法 实验所得数据用 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 确定方差齐性后用方差分析, 组间比较用 *q* 检验, *P* < 0.05 为有显著性差异。

## 2 结果

2.1 Y 迷宫测试 缺氧缺血组大鼠训练次数明显高于对照组 (*P* < 0.01), 记忆保持率低于正常对照组 (*P* < 0.05); 尼莫通治疗组训练次数较缺氧缺血组明显下降 (*P* < 0.01), 而记忆保持率与缺氧缺血组无显著性差异。见表 1。

表 1 Y 迷宫测试中大鼠训练次数和记忆保持率

组别	n	训练次数	记忆保持率 (%)
对照组	15	20.67 ± 7.03 <sup>a</sup>	80.00 ± 18.90 <sup>b</sup>
缺氧缺血组	21	32.82 ± 8.22	59.00 ± 21.32
治疗组	13	20.69 ± 7.96 <sup>a</sup>	69.13 ± 22.42

注: 与缺氧缺血组比较, a: *P* < 0.01, b: *P* < 0.05。

2.2 免疫组化 与对照组比较, 缺氧缺血组大鼠海马结构中 GFAP 阳性胶质细胞增多, 突起明显且增长, 以 CA1 区辐射层最显著; 治疗组海马和齿状回 GFAP 免疫阳性反应接近正常对照组。见表 2。

表 2 GFAP 免疫组化染色阳性细胞计数 (10<sup>-4</sup> / μm<sup>2</sup>)

组别	n	辐射层	腔隙分子层	齿状回门区
对照组	5	3.53 ± 0.94	5.65 ± 1.13	6.96 ± 0.7
缺氧缺血组	6	5.58 ± 0.40 <sup>a</sup>	6.66 ± 0.38	7.18 ± 0.7
治疗组	6	3.53 ± 0.29	5.10 ± 0.20	6.34 ± 0.38

注: 与对照组和治疗组比较, a: *P* < 0.05。

## 3 讨论

哺乳类动物大脑海马 (特别是 CA1 区) 对缺氧缺血损伤特别敏感<sup>[1]</sup>, 而海马是学习记忆的关键部位。Speiser 等报道, 新生大鼠缺氧损伤后, 在出生后 20~45 d 可出现暂时性活动亢进和持久的空间记忆缺陷<sup>[2]</sup>, 与我们的结论一致。

星形胶质细胞具有针对所有神经递质的受体及电压敏感性离子通道, 这使它能够对神经元的信号作出反应; 星形胶质细胞还在神经可塑性上起重要作用, 可支持突触发芽、形成新的多突触连接、维持现存的神经元回路等<sup>[3]</sup>。在脑缺氧缺血性损伤早期, 星形胶质细胞肿胀和肥大, 挤压毛细血管, 引起血管损害; 缺氧缺血且使星形胶质细胞摄取谷氨酸的能力下降, 加重神经细胞兴奋性损伤。另一方面, 星形胶质细胞可释放

大量的牛磺酸, 在缺氧中起神经保护作用; 星形胶质细胞还具有破坏自由基的高浓度的抗氧化剂和酶, 如谷胱甘肽、过氧化物歧化酶等, 保护大脑免受自由基的损伤<sup>[3]</sup>。本试验结果表明, 脑缺氧缺血后晚期, 海马结构中星形胶质细胞仍高于对照组, 这种反应性胶质细胞增生在一定程度上反映了脑缺氧缺血的程度。

本实验中, 缺氧缺血组海马 CA1 辐射层 GFAP 阳性细胞数明显高于对照组, 而腔隙分子层、齿状回分子层则差异不显著。这可能与海马突触连接环路对脑缺氧损伤的敏感性不同有关。海马 Schaffer 侧枝至 CA1 区锥体细胞的突触通路上的长时程增强 (long-term potentiation, LTP) 具有协同性、联合性、特异性, 已成为信息储存和记忆的细胞机制<sup>[4]</sup>, 故这种差异也从另一个侧面反映了 CA1 区对脑缺氧缺血特别易感。另外, 胶质细胞反应的区域差异也可能由于胶质细胞存在的环境差异或由于胶质细胞本身的区域差异所致<sup>[5]</sup>。

尼莫通主要成份为尼莫地平, 是 1,4-双氢吡啶类 L 型 Ca<sup>2+</sup> 通道阻滞剂, 可阻止细胞外 Ca<sup>2+</sup> 内流和抑制细胞内 Ca<sup>2+</sup> 释放, 从而有效地保护神经细胞免受缺氧缺血损害。Mrsic 等研究表明, 尼莫地平可阻止缺氧大鼠脑内花生四烯酸的聚集, 并显著提高缺氧动物的记忆力<sup>[6]</sup>。Nyakas 等报道, 对产前缺氧的大鼠经胃管每天给予尼莫地平治疗, 能改善动物的异常开场行为和学习情绪行为<sup>[7]</sup>。本研究发现, 尼莫通治疗组 GFAP 阳性细胞数与对照组接近, 而行为学实验观察到对脑缺氧缺血损伤后的学习能力提高有益, 但对记忆保持率无明显作用, 推测与选择的动物和学习记忆模型不同以及脑内有多个记忆网络有关, 值得进一步深入研究。

## [参考文献]

- [1] Hopkins RO, Haaland KY. Neuropsychological and neuropathological effects of anoxic or ischemic induced brain injury[J]. J Int Neuropsychol Soc, 2004, 10(7): 957-961.
- [2] Speiser Z, Katzir O, Rehavi M, et al. Sparing by rasagiline (TPV-1012) of cholinergic functions and behavior of the postnatal anoxia rat[J]. Pharmacol Biochem Behav, 1998, 60: 387-393.
- [3] 熊晖, 梁卫兰, 吴希如. 围产期缺氧缺血性脑损伤中星形胶质细胞的病理生理改变[J]. 生理科学进展, 2000, 31: 218.
- [4] 韩济生. 神经科学纲要[M]. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1993: 723.
- [5] Peng JH, Feng Y, LeBlanc MH, et al. Apoptosis and necrosis in developing cerebellum and brainstem induced after focal cerebral hypoxic-ischemic injury[J]. Brain Res Dev Brain Res, 2005, 156(1): 87-92.
- [6] Mrsic J, Zupan G, Erakovic V, et al. The influence of nimodipine and MK-801 on the brain free arachidonic acid level and learning ability in hypoxia exposed rats[J]. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 1997, 21: 345-358.
- [7] Nyakas C, Buwalda B, Markel E, et al. Life-spanning behavioural and adrenal dysfunction induced by prenatal hypoxia in the rat is prevented by the calcium antagonist nimodipine[J]. Eur J Neurosci, 1994, 6: 746-753.

(收稿日期: 2005-07-07)