

• 专题 •

行为训练对大鼠海马梗死灶周围及颞叶皮层 NR2B 表达的影响

潘惠娟,李玲,杨华,江山,谭永霞

[摘要] 目的 研究行为训练对双侧海马梗死大鼠梗死灶周围及颞叶皮层 N-甲基-D-天门冬氨酸(NMDA)受体 2B 亚单位(NR2B)表达的影响。方法 将 54 只大鼠随机分为行为训练前、训练 7 d、14 d、21 d 组;制动前、制动 7 d、14 d、21 d 组及正常对照组。于造模 3 d 后开始分别给予行为训练或制动,观察不同时间点各组大鼠海马梗死灶周围及颞叶皮层 NR2B 的表达。结果 正常大鼠海马及颞叶皮层内均有 NR2B 的丰富表达,造模后明显下降,给予行为训练后逐渐增高,较制动组有非常显著性差异($P < 0.01$)。结论 行为训练能促进海马梗死大鼠梗死灶周围及颞叶皮层内 NR2B 的表达。

[关键词] 脑梗死;海马;N-甲基-D-天门冬氨酸(NMDA);受体(NR2B);大鼠

Effect of behavior training on the expression of NR2B around the infarcted focus and in the cortex of temporal lobe in rats with bilateral hippocampal infarction PAN Hui-juan, LI Ling, YANG Hua, et al. Department of Physiotherapy and Rehabilitation, Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shanxi, China

[Abstract] **Objective** To study the effect of behavior training on the expression of NR2B around the infarcted focus and in the cortex of temporal lobe in rats with bilateral hippocampal infarction. **Methods** 54 SD rats were randomized into pre-training, 7 d, 14 d, 21 d after training groups, pre-immobilization, 7 d, 14 d, 21 d immobilization groups and control group. Behavior training and immobilization were performed on the 3rd day after the infarction. Immunohistochemistry was used to detect the expression of NR2B around the infarcted focus and in the cortex of temporal lobe at different points of time. **Results** The expression of NR2B was abundant in the normal hippocampus and cortex of temporal lobe of rats. The expression of NR2B decreased after infarction and increased after behavior training. However, the expression of NR2B had little increased in immobilization groups, and showed significant difference compared with that in behavior training groups ($P < 0.01$). **Conclusion** Behavior training can accelerate the expression of NR2B around the infarcted focus and in the cortex of temporal lobe in rats with bilateral hippocampal infarction.

[Key words] cerebral infarction; hippocampus; N-methyl-D-aspartate (NMDA); receptor(NR2B); rat

中图分类号:R743.3 文献标识码:A 文章编号:1006-9771(2006)01-0005-03

[本文著录格式] 潘惠娟,李玲,杨华,等.行为训练对大鼠海马梗死灶周围及颞叶皮层 NR2B 表达的影响[J].中国康复理论与实践,2006,12(1):5-7.

诸多研究表明,无论在损伤早期、中期和后期,功能训练对于促进脑梗死后神经功能的恢复都有十分重要的作用。我们以前的实验发现,双侧海马梗死后大鼠的学习记忆功能明显下降,给予行为训练后训练组较制动组明显恢复^[1]。本实验即通过观察行为训练对大鼠海马梗死后梗死灶周围及颞叶皮层内与学习记忆相关的 N-甲基-D-天门冬氨酸(NMDA)受体 2B 亚单位(NR2B)表达的影响,探讨行为训练参与学习记忆功能恢复的机制。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 自制冷光源 由本科和中国科学院西安光学精密机械研究所联合研制,光源为一充气氙灯,输出功率:0.008~0.37 W/cm²,输出波长 490~530 nm,波峰 530 nm,输出端连一直径 0.6 mm 的石英光纤。

1.1.2 实验动物及主要试剂 二级 SD 雄性大鼠 54 只,平均体重(210±10) g,周龄 8~10 周,由本校实验动物中心提供;随机分为行为训练前、训练 7 d、14 d、21 d 组;制动前、制动 7 d、14 d、21 d 组及正常对照组。每小组各 6 只。于造模 3 d 后将训练前和制动前两组大鼠 12 只灌注取材,余大鼠开始分别给予行为训练或

制动,训练组每天上午训练 3 次,每次间隔 10 min;制动组进入制动笼中饲养。正常对照组不予任何处理。四氯四碘荧光素钠(虎红, RB):北京化工厂,批号:870627,密封避光保存,使用前用生理盐水稀释为 2.5%。

1.2 造模方法 大鼠用 2%戊巴比妥钠按 50 mg/kg 常规麻醉后,将其俯卧于脑立体定位仪上,沿头颅正中切开头皮暴露颅骨,在前囟后 4.8 mm,中线向左、右旁开 3.6 mm 处,分别用牙科钻轻轻钻一个直径约 1 mm 的骨窗,置冷光源光纤管尾端至一侧皮层下 3.2 mm(海马 CA1 区)。于尾静脉注射虎红 70 mg/kg 后,立即通过光纤管照射,强度:0.37 W/cm²,照射时间 30 min。照射完毕后,再补充 1/2 原剂量虎红,同法立即进行另一侧的冷光源照射。缝合头皮,正常喂养。正常对照组不作任何处理,正常饲养。

1.3 行为训练与制动

1.3.1 Morris 水迷宫 为一直径 150 cm、高 70 cm 的圆池,内有乳白色溶液,水深 47 cm。将水池分为 4 个象限。直径 8 cm、高 45 cm 的白色站台,随机置于圆池内某一象限并固定。训练期间周围参照物保持不变。

第 1 天让大鼠自由游泳适应 2 min。从第 2 天开始,从站台所占象限外的另 3 个象限中随机选择 1 个入水点,将大鼠面向池壁放入池中,观察并记录大鼠寻找并爬上平台的潜伏期。如 2 min 内找不到站台,则将其在站台上放置 30 s 后再放回笼中,这时潜伏期记

为 120 s。训练时分别从 3 个不同的入水点入水,每次不同动物的入水点相同,训练顺序固定。

1.3.2 制动笼 长 40 cm,直径 6 cm 的网状笼,头端有一容器给予食物和水,能使大鼠的四肢和身体处于固定状态。

1.4 取材及处理 于不同时间点分别灌注取脑组织,取材时注意保持脑组织结构的完整性。10%福尔马林液后固定 2 h,再换入 20%蔗糖液中直至标本沉底,4℃冰箱保存过夜。组织标本行连续冠状冰冻切片,片厚 35 μm,隔 4 取 1,然后进行免疫组化染色。

1.5 免疫组化染色 按 ABC 法进行抗 NR2B 免疫组织化学反应。切片入 0.3% TritonX-100 和 3%牛血清白蛋白的 KPBS 中室温浸泡 30 min,然后加入兔抗 NR2B(1:300,武汉博士德公司) 4℃下孵育 48 h,加入生物素标记的羊抗兔 IgG(1:500, Sigma),室温孵育 2 h,加生物素-卵白素- HRP 复合物(ABC, 1:500, Sigma),室温孵育 2 h。以上每一步骤之后,均用 0.01 mol/L KPBS 液充分漂洗 3 次,每次 10 min。最后用葡萄糖氧化酶- DAB- 硫酸镍胺法呈色。阴性对照用一抗稀释液(1%小牛血清白蛋白 + 0.3% TritonX-100 + 0.01 mol/L KPBS, pH = 7.4) 替代孵育,其他反应步骤相同。常规贴片、脱水、透明、封片。全部反应分 4 轮进行,每 1 轮均严格将同一时间点的训练组和制动组切片一起反应,以保证两者具有可比性。免疫阳性物呈紫蓝色。所有阴性对照切片不着色或仅呈淡的背景色。

1.6 图像分析与统计学处理 用德国产 LEICA Q Win 图像处理与分析系统进行图像分析。从每只大鼠脑片中选择典型反应的 3 张切片检测海马结构及颞叶皮层区域 NR2B 免疫反应的灰度值。测量时,不同鼠脑切片之间相同解剖结构的测量区域位置相同,每一解剖结构各测 3 个视野,每个视野测量的像素量(即被测量面积)保持一致。以上测量值与相应阴性对照切片测量值相减后的平均值为各区域的最终灰度值。结果采用 SPSS 11.0 统计软件进行数据处理,按完全随机设计资料进行方差分析,并进一步进行多个样本均数间两两比较的 LSD/t 检验。

2 结果

2.1 海马 NR2B 的表达 正常对照组大鼠海马锥体细胞层 NR2B 表达灰度值为 (61.33 ± 18.27),可见大量密集排列的锥体细胞顶树突,从胞体一直延伸到海马裂。造模 3 d 后大鼠海马梗死灶周围 NR2B 的表达水平较正常组大鼠表达明显下降,训练、制动组间无显著性差异 (P = 0.812);至训练 7 d 时,训练组较前有所升高,制动组则仍处于较低水平,两组间有非常显著性差异 (P = 0.004);训练 14 d 时,训练组 NR2B 的表达进一步升高,制动组则急剧下降,两组间有非常高度显著性差异 (P = 0.000);到训练 21 d 时,训练组恢复到

接近正常水平,而制动组虽有所升高,但仍处于较低水平,两组间有非常高度显著性差异 (P = 0.000)。见表 1 及封三彩图 1.1 ~ 1.4。

2.2 颞叶皮层 NR2B 的表达 正常大鼠颞叶皮层的锥体细胞层内布满 NR2B,可见比海马内更密集排列、更长的锥体细胞顶树突,灰度值 (77.44 ± 15.70)。造模 3 d 后较正常组大鼠表达明显下降,训练、制动组间比较无显著性差异 (P = 0.632);至训练 7 d 时,训练组较前有所升高,制动组则仍处于较低水平,两组间有非常显著性差异 (P = 0.004);训练 14 d 时,训练组 NR2B 的表达进一步升高,制动组则急剧下降,两组间有非常高度显著性差异 (P = 0.000);到训练 21 d 时,训练组进一步恢复,而制动组虽有所升高,但仍处于较低水平,两组间有非常高度显著性差异 (P = 0.000)。见表 2 及封三彩图 1.5 ~ 1.8。

表 1 各组大鼠海马内 NR2B 的表达(灰度)

组别	n	训练前	训练 7 d	训练 14 d	训练 21 d
训练组	6	17.17 ± 5.76	24.33 ± 6.70 ^a	33.94 ± 9.81 ^a	40.89 ± 12.52 ^a
制动组	6	17.78 ± 5.56	16.89 ± 5.88	11.00 ± 3.40	19.39 ± 8.23

注:a:与制动组比较, P < 0.01。

表 2 各组大鼠颞叶皮层内 NR2B 的表达(灰度)

组别	n	训练前	训练 7 d	训练 14 d	训练 21 d
训练组	6	31.33 ± 8.86	33.17 ± 8.83 ^a	42.72 ± 9.43 ^a	52.94 ± 14.74 ^a
制动组	6	32.78 ± 7.68	24.28 ± 6.10	18.50 ± 6.04	30.61 ± 7.45

注:a:与制动组比较, P < 0.01。

3 讨论

N-甲基-D-天门冬氨酸受体 (N-methyl-D-aspartate receptor, NR) 是中枢神经系统中一类重要的兴奋性氨基酸——谷氨酸 (Glu) 受体,为配体门控的离子通道,由不同亚单位组成四聚体或五聚体,编码这些亚单位的基因分居 3 个家族,分别命名为 NR1、NR2 和 NR3。其中 NR1 是受体复合物的功能亚单元, NR2 是受体复合物的调节亚单元, NR2 有 4 个独立基因,即 NR2A、NR2B、NR2C 和 NR2D。NR 由多个 NR1 亚单位和至少 1 种 NR2 亚单位组成。NR1 和 NR2A 亚单位广泛分布在成年哺乳动物的大脑中, NR2B 亚单位主要分布在前脑区域如海马和纹状体,而 NR2C 亚单位则分布于小脑, NR2D 亚单位分布在中脑。单独的 NR3 亚单位不能形成功能性受体,但是它可以和 NR1 / NR2 聚合形成复合物。由不同的亚单位组成的受体往往表现出不同的功能特性^[2]。

NR 被认为是突触可塑性及皮质和海马神经元长时程增强效应 (LTP) 的主要调控者,构成了中枢神经系统的重要功能(如学习和记忆)的基础,而 LTP 的损害与一些神经退行性疾病紧密相关。过度激活 NR 则可能导致缺血性神经细胞死亡以及癫痫^[2]。在缺血性脑损伤的众多环节中, NR 介导的 Glu 神经兴奋毒性起着关键作用。有研究表明,缺血性脑损伤后, NR2A 和 NR2B 表达变化的不同可能是造成海马 CA1 区、CA3 区及齿状回缺血敏感性差异的一个重要原因。NR 亚

型的特性亦提示,在短暂性海马缺血损伤中,NR2B 扮演着比 NR2A 更为活跃的角色^[3]。

在本实验中,造模 3d 后梗死灶周围 NR2B 的表达水平明显下降,这是因为光化学反应使大量神经元发生缺血性坏死所致;而神经元的损伤坏死则是由于脑缺血后大量兴奋性氨基酸释放,引起膜持续性去极化,并使 NR 调控的 Ca^{2+} 通道开放,细胞内 Ca^{2+} 超载,产生大量自由基,终致神经元发生不可逆性损伤^[4]。研究表明,缺血引起的 NR2A 和/或 NR2B 表达下降会改变 NR 的功能,在全脑缺血 12 和 24 h 后,CA1 区及海马其他部位 NR2B mRNA 表达减少;缺血 6 和 24 h 后,海马中的 NR2B 蛋白显著降低。NR 通道的功能在缺血后 6 h 仍然能够维持,18~24 h 以后就几乎丧失殆尽了^[2]。NR 功能的改变则进一步导致动物学习记忆功能的下降。而颞叶皮层内 NR2B 表达的减少可能与 Papez 环路被破坏,使学习记忆能力下降及 LTP 形成减退有关^[5-7]。

对海马 LTP 的大量研究表明,NR 是学习记忆的关键物质^[8]。进一步研究发现,NR2B 亚单位在 LTP 调控过程中扮演了非常重要的角色^[9]。“聪明基因”的提出^[10],更使 NR2B 成为了研究学习记忆相关疾病的一个作用靶点。研究发现,敲除 NR2B 基因后小鼠记忆能力下降;而移植转染 NR2B 基因细胞可使大鼠记忆明显增高;学习过程可以提高 NR2B 通道蛋白的磷酸化程度^[7];老年大鼠较青年大鼠脑内 NR2B mRNA 和蛋白质均明显减少^[11]。

本实验结果表明,随着行为训练时间的延长,梗死灶周围及颞叶皮层内 NR2B 的表达均逐渐增多,而制动组的表达则呈下降趋势,21 d 后才见少许恢复。说明行为训练可以促进神经元内 NR2B 的表达。我们已发现行为训练可以促进海马梗死大鼠学习记忆功能的恢复,本实验结果也间接证实了 NR2B 参与了学习记忆的形成过程。

研究发现,行为学习改变了树突和突触形态结构^[12],增加了运动皮层和海马突触数密度和面密度,活化海马和运动皮层的传入通路^[13];NR 密度的增加,加强了 NR 依赖的 LTP 的产生^[14]。余茜等的研究发现,康复训练可使梗死大鼠海马突触结构改变,活性增强,同时活化海马 NR 通道,增强了突触传递功能,促进其习得性 LTP 形成,从而促进梗死鼠的学习记忆能力的恢复^[15]。本实验室既往的研究也证实,康复训练能促进感觉运动皮质区梗死大鼠神经功能及学习记忆的恢复^[16],同时发现梗死灶周围及对侧相应皮质 P38 表达明显增加,表明康复训练刺激了大脑皮层,使未受损的神经元与周围神经元建立起更多的新的突触

连接,从而促进中枢神经系统功能的恢复^[17]。

由此,我们推测,行为训练可能通过改变梗死大鼠海马的突触结构,活化突触间传递通路,增加 NR2B 在海马及颞叶皮层内的表达,并进一步通过 NR2B 促学习得性 LTP 的形成,进而增强海马突触效应的可塑性,改善大鼠认知功能,最终促进了海马梗死大鼠学习记忆功能的恢复。

行为训练可以促进双侧海马梗死大鼠梗死灶周围和颞叶皮层内 NR2B 的表达,并促进学习记忆功能的恢复,这可能是行为训练参与脑梗死后学习记忆功能恢复的机制之一。但其参与学习记忆的具体机制,以及如何促进海马与其他学习记忆相关脑区的功能整合,还有待进一步研究。

[参考文献]

- [1]李玲,潘惠娟. 康复训练对双侧海马梗死大鼠学习记忆功能的影响[J]. 第四军医大学学报,2004,25(22):2101-2104.
- [2]易宏伟,刘国卿. 选择性 NMDA 受体 NR2B 亚单位拮抗剂与神经元保护作用[J]. 药学进展,2003,27(5):269-274.
- [3]徐铁军,樊红彬,张风真,等. 前脑缺血再灌注后大鼠海马 NMDA 受体亚单位 NR2A 和 NR2B 蛋白质表达的变化[J]. 神经解剖学杂志,2002,18(2):110-116.
- [4]万选才,杨天祝,徐承熹. 现代神经生物学[M]. 北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,1999:162.
- [5]陈忠,魏尔清. 突触可塑性的机制[J]. 中国神经科学杂志,2001,17(3):247-253.
- [6]余小平,王开发. 学习与记忆的机制简介[J]. 生物学通报,1999,34(5):21-22.
- [7]李玺,袁海峰,张智燕. 脑尔康对 AD 模型小鼠脑内 NMDA 受体亚单位 NR2B 表达的影响[J]. 中国医药学报,2004,19(1):11-14.
- [8]韩太真,吴馥梅. 学习与记忆的神经生物学[M]. 北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,1998:279.
- [9]Mallon AP, Auberson YP, Stone TW. Selective subunit antagonists suggest an inhibitory relationship between NR2B and NR2A-subunit containing N-methyl-D-aspartate receptors in hippocampal slices[J]. Exp Brain Res, 2005, 162(3):374-383.
- [10]Bliss TV. Yong receptors make smart mice[J]. Nature, 1999, 401(6748):25-27.
- [11]Clayton DA, Browning MD. Deficits in the expression of the NR2B subunit in the hippocampus of aged Fisher 344 rats[J]. Neurobiol Aging, 2001, 22(1):165-168.
- [12]Ivanco TL, Racine RJ, Kolb B. Morphology of layer III pyramidal neurons is altered following induction of LTP in sensorimotor cortex of the freely moving rat[J]. Synapse, 2000, 37(1):16-22.
- [13]Rao BS, Raju TR, Meti BL. Increased numerical density of synapses in CA3 region of hippocampus and molecular layer of motor cortex after self-stimulation rewarding experience[J]. Neurosci, 1999, 91(3):799-803.
- [14]Stecher J, Muller WE, Hoyer S. Learning abilities depend on NMDA-receptor density in hippocampus in adult rats[J]. J Neural Transm, 1997, 104(2-3):281-289.
- [15]余茜,李晓红,何成松. 康复训练对脑梗死大鼠学习记忆与听觉 P300 认知电位的影响[J]. 中华内科杂志,2004,43(1):52-53.
- [16]李玲,徐莉,袁华,等. 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.
- [17]李薇,李玲,牟翔,等. 康复训练对脑梗死大鼠大脑皮质突触膜糖蛋白表达的影响[J]. 中华物理医学与康复杂志,2001,23(6):334-336.

(收稿日期:2005-06-13)

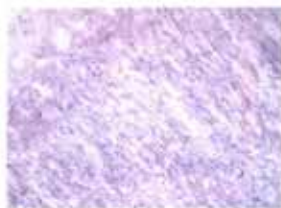


图1.1 正常大鼠海马内NR2B的表达(ABC, 400 ×)

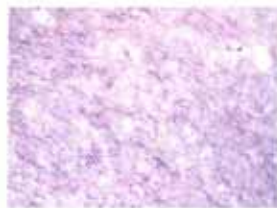


图1.2 梗死3 d后大鼠海马内NR2B的表达(ABC, 400 ×)



图1.3 训练14 d后大鼠海马内NR2B的表达(ABC, 400 ×)



图1.4 制动14 d后大鼠海马内NR2B的表达(ABC, 400 ×)

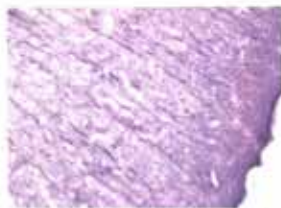


图1.5 正常大鼠额叶皮层内NR2B的表达(ABC, 400 ×)



图1.6 海马梗死3 d后额叶皮层内NR2B的表达(ABC, 400 ×)



图1.7 训练14 d大鼠额叶皮层内NR2B的表达(ABC, 400 ×)

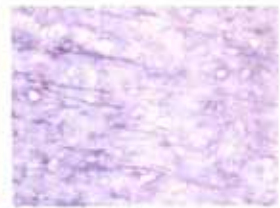


图1.8 制动14 d大鼠额叶皮层内NR2B的表达(ABC, 400 ×)