

DOI: 10.3969/j.issn.1006-9771.2013.05.010

·基础研究·

早期干预对宫内感染致脑损伤仔鼠脑组织 NB-3 表达的影响

袁新华, 王红丽, 邓庆先

[摘要] 目的 探讨早期干预对仔鼠脑组织 NB-3 的表达及其运动功能的影响。方法 孕 17~18 d Wistar 大鼠 45 只腹腔注射脂多糖 (LPS) 380 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 连续 2 d (LPS 组), 另 15 只注射同等剂量的无菌生理盐水(NS 组)。随机选取 LPS 组仔鼠 80 只, 分为干预组 40 只(I 组)和非干预组 40 只(NI 组); 随机选取 NS 组仔鼠 40 只为对照组。早期干预措施主要给予早期触摸与丰富康复训练。仔鼠出生后 24 h 内在 LPS 组和 NS 组随机取 5 只行脑组织 HE 染色。其余大鼠分别于出生后 14 d、28 d 行悬吊试验, 1 d、7 d、14 d、21 d、28 d 行脑组织免疫组织化学染色, 观察 NB-3 的表达。结果 脑组织 NB-3 的表达及悬吊试验评分三组间均有非常高度显著性差异 ($P<0.001$)。结论 宫内感染可致脑损伤鼠 NB-3 表达增加, 早期干预使脑损伤鼠 NB-3 表达持续增加, 并改善其运动功能。

[关键词] 宫内感染; 脑损伤; 早期干预; NB-3; 神经可塑性; 大鼠

Effect of Early Intervention on Expression of NB-3 in Neonatal Rats with Cerebral Injury Induced with Intrauterine Infection YU-AN Xin-hua, WANG Hong-li, DENG Qing-xian. Department of Pediatrics, Huzhou Maternity & Child Care Hospital, Huzhou 313000, Zhejiang, China

Abstract: **Objective** To investigate the effect of early intervention on adhesion molecule NB-3 expressing in cerebral injured neonatal rat induced with intrauterine infection. **Methods** Pregnant rats were consecutively injected with lipopolysaccharide (LPS) 380 $\mu\text{g}/\text{kg}$ or saline 17 d after gestation. The offspring from the LPS group accepted early intervention (I group, $n=40$) or not (NI group, $n=40$), and those for saline group were as control group ($n=40$). They were assessed with suspension test 14 d and 28 d after born, and the expression of were NB-3 were detected with immunohistochemistry 1 d, 7 d, 14 d, 21 d, 28 d after born. **Results** The expression of NB-3 was different among these 3 groups, as well as the scores of suspension test ($P<0.001$). **Conclusion** Intrauterine infection increases the expression of NB-3 of neonatal rats with brain damage. The early intervention may increase persistently the expression of NB-3, and improve the motor function.

Key words: intrauterine infection; cerebral injury; early intervention; NB-3; neuronal plasticity; rats

[中图分类号] R742.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1006-9771(2013)05-0436-04

[本文著录格式] 袁新华, 王红丽, 邓庆先. 早期干预对宫内感染致脑损伤仔鼠脑组织 NB-3 表达的影响[J]. 中国康复理论与实践, 2013, 19(5): 436-439.

新生儿发生脑白质损伤受多种因素的影响, 但其主要原因是围生期宫内感染。宫内感染易引起早产, 早产儿的主要病理变化为脑白质损伤。研究证实, 早期干预可以促进宫内感染致脑损伤仔鼠的神经行为的改善。

神经黏附分子 NB-3 是近年发现的黏附分子, 属于免疫球蛋白超家族的 Contactin 亚家族, 集中表达于神经系统, 主要表达在神经元的胞体和轴突中^[1]。它对中枢和周围神经元都有作用, 可以促神经元黏附以及调节轴突生长; 不仅具有轴突导向作用, 还可以促进突触重塑; 可以通过促进少突胶质细胞的成熟, 进而促进有髓神经纤维髓鞘的形成。本研究探讨宫内感染对脑损伤仔鼠脑组织 NB-3 的表达及其运动功能的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料

清洁级成熟 Wistar 大鼠 90 只, 其中雌性大鼠 60 只, 雄性大鼠 30 只, 体重 220~300 g, 由佳木斯大学医学院运动实验室提供; 脂多糖(LPS, 血清型 055:B5): 美国 SIGMA 公司; SABC 免疫组化试剂盒、抗神经细胞 NB-3 特定蛋白抗体: 北京博奥森生物工程有限公司。

1.2 动物模型制备与分组

动物室温(21 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 常规饲养、自由饮食, 明暗周期各半。环境适应 2 周后, 于 17:00 以 2:1(雌:雄)合笼, 次日 8:00 查阴道涂片, 以查得精子为妊娠第 0 天, 孕鼠另笼饲养。孕 17 d 大鼠予 0.1 mg/ml 脂多糖 380 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 腹腔注射, 共 2 d; 或予等量生理盐水。孕

作者单位: 湖州市妇幼保健院儿科, 浙江湖州市 313000。作者简介: 袁新华(1970-), 男, 浙江湖州市人, 副主任医师, 主要研究方向: 新生儿监护。

22 d 前分娩的仔鼠为早产鼠, 去除。仔鼠出生后, 取胎盘行 HE 染色, 观察宫内感染情况, 判断标准为大量中性粒细胞浸润。随机选取脂多糖组仔鼠 85 只, 分为干预组($n=40$)和非干预组($n=40$); 随机选取生理盐水组仔鼠 40 只为对照组。干预组给予丰富康复训练, 对照组和非干预组常规饲养, 不给任何干预。1 日龄生理盐水组、脂多糖组各 5 只取脑组织做病理检测。1 日、7 日、14 日、21 日、28 日龄对照组、干预组、非干预组各 8 只。

1.3 早期干预

1.3.1 早期触摸 将 2 日龄干预组仔鼠托至掌心, 用毛刷从头到尾均匀有力刷动, 注意不要用力过大, 以免产生疼痛。每次 20 min, 每日 1 次。同时给予不同强度及频率的声音和灯光刺激干预至 2 周龄。

1.3.2 康复训练 由于小鼠出生后 2 周开始睁眼, 于 15 日龄开始给予丰富康复训练。①丰富环境: 每日暴露于丰富环境中 2 h, 上、下午各 1 h。在 $60\times 45\times 45$ cm 笼内放置不同颜色及形状的物体, 包括转盘、管道、阶梯、摇铃、秋千、斜坡、杠杆以及不同颜色和大小圆球等, 每周将环境改变 2 次, 以造成新异刺激, 第 28 日龄结束刺激。非干预组和对照组分别饲养于 $20\times 30\times 30$ cm 标准笼内, 不予干预。②平衡木训练: 平衡木长 170 cm, 宽 2 cm, 平放距地面 7 cm 处, 让仔鼠在上面行走, 10 min/次。③转棒训练: 转棒长 150 cm, 直径 4.5 cm; 中点固定于 3 r/min 转动器上, 顺、逆时针交替转动, 10 min/次。以上每种干预方法至少间隔 1 h。

1.4 运动功能评定

对 14 日龄、28 日龄的仔鼠进行悬吊试验。在自然光的安静房间内, 使仔鼠前肢抓住距离桌面 45 cm 的水平玻璃棒(直径 0.5 cm), 记录仔鼠从抓握至掉下的时间。评分标准为: 1 分: <10 s; 2 分: 10~30 s; 3 分: 30 s~2 min; 4 分: 2~5 min; 5 分: ≥ 5 min。

1.5 NB-3 检测

不同日龄仔鼠麻醉下从心耳部位进行灌洗后, 迅速断头、取脑, 将完整大脑置于中性甲醛溶液中固定。各例石蜡包埋组织均取 $5\text{ }\mu\text{m}$ 切片 6 张, 5 张行 NB-3 免疫组化染色, 1 张用 PBS 代替一抗作阴性对照。采用 SABC 法进行组化染色。

光镜(40×10)下 NB-3 阳性细胞胞体和轴突周围为棕黄色。每个大鼠取 6 张切片, $40\times$ 物镜下每个切片

取相互不重叠的 4 个视野, 应用 Image Pro Plus 4.5 图像分析软件计算 NB-3 免疫阳性细胞积分光密度(IOD)。

1.6 统计学分析

实验数据均以($\bar{x}\pm s$)表示, 采用 SPSS 18.0 统计软件, 多组间比较采用单因素方差分析, 显著性水平 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 一般情况

注射脂多糖后, 孕鼠的活动、进食均减少, 3 只提前分娩, 5 只死亡, 其余 37 只顺利生产, 共娩出足月活产仔鼠 225 只, 死产仔鼠 35 只。脂多糖组仔鼠身体颜色青紫、精神萎靡、进食减少、行动迟缓、活动减少、体重低。生理盐水组孕鼠无异常反应, 共娩出足月活产鼠 120 只, 足月仔鼠出生后身体颜色淡红, 反应灵敏, 体重正常。

2.2 子宫和胎盘的检测

脂多糖组孕鼠胎盘可见血管充血、水肿, 大量中性粒细胞浸润。生理盐水组孕鼠胎盘未见明显炎症反应。

2.3 脑组织病理学改变

脂多糖组新生仔鼠脑组织 HE 染色可见白质、胼胝体、内囊部位组织疏松, 胶质细胞聚集, 囊间少突胶质细胞减少, 脑室内出血、脑白质内血管扩张充血、脑白质内毛细血管破裂出血。对照组新生仔鼠脑组织 HE 染色可见白质结构完整, 布局有序, 核淡, 核仁清楚。

2.4 神经行为学检测

14 日龄时, 与对照组相比, 非干预组仔鼠反应迟钝、活动减少、平衡性差、肌力差、肌张力高, 悬吊时肢体自主活动明显减少, 下肢颤抖增多, 悬吊持续时间短, 测试得分明显降低($P<0.01$); 对照组测试得分明显优于干预组($P<0.01$); 干预组测试得分优于非干预组($P<0.05$)。28 日龄时, 干预组悬吊时间与对照组接近, 测试得分无显著性差异($P>0.05$)。见表 1。

2.5 NB-3 表达

1 日龄干预组和非干预组 NB-3 阳性细胞 IOD 无显著性差异($P>0.05$), 其他日龄对照组和非干预组 NB-3 阳性细胞密度值较干预组低。见表 2。

表 1 各组仔鼠悬吊试验评分

组别	n	14 d	28 d	F	P
对照组	6	3.5000±0.5477	4.1667±0.7528	3.077	0.028
非干预组	6	1.5000±0.5108 ^a	2.1667±0.9832 ^a	2.105	0.047
干预组	6	2.3333±0.5164 ^{a,b}	3.6667±1.0328 ^b	8.000	0.018
F		20.962	7.500		
P		0.000	0.006		

注：a: 与对照组相比， $P<0.05$; b: 与非干预组相比， $P<0.05$

表 2 各组仔鼠脑组织 NB-3 阳性细胞表达(IOD)

日龄	干预组(n=8)	非干预组(n=8)	对照组(n=8)	F	P
1	4568.54±255.54	4568.54±255.34	3151.02±739.17	23.745	0.000
7	6419.77±501.18	5262.24±357.93	5831.41±691.09	9.383	0.001
14	5557.94±883.91	3537.37±519.65	4694.05±558.54	24.527	0.000
21	5284.77±777.61	2555.70±604.72	4286.02±587.07	34.796	0.000
28	3296.01±767.68	1145.13±203.69	2186.17±417.54	34.487	0.000
F	23.975	122.324	42.718		
P	0.000	0.000	0.000		

3 讨论

大脑的发育过程十分复杂，并且具有其独特的敏感时期。因此，发育中的大脑比成年大脑更容易受到伤害。在发育敏感期内，机体内部或者外部因素的影响都可能使大脑的发育过程推迟或终止。但中枢神经损伤后具有一定程度的可塑性，可塑性与动物物种、年龄、损伤部位和程度、药物作用、功能训练和学习等因素密切相关。因此，寻找可塑性的分子证据对丰富可塑性理论具有重要意义。

丰富康复训练由丰富环境和一般康复训练组成，两者共同作用可以使大脑功能达到最佳恢复状态。研究证明，不同的康复手段会产生不同的康复效果。广泛的皮质损伤可使脑组织结构和功能发生改变，对损伤区域的刺激可促进功能恢复。但单纯增加力量的训练并不能诱导脑组织重塑，必须配合技巧训练^[2]。研究显示，简单运动方式，如强迫性跑笼训练仅可促进脑血管生成，而复杂技巧训练如转棒和杂技可增加脑皮层突触数量^[3-4]。现已证实，脑区所做任务的多少和任务的性质可以决定树突分支的复杂性。

丰富康复训练可以诱导脑缺血周边区神经生长因子(NGF)、脑源性神经营养因子(BDNF)、转化生长因子(TGF)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)等神经营养因子的表达；神经营养因子不仅在中枢神经系统发育过程中对神经元的生存、分化、生长起作用，而且在脑损伤时对神经细胞具有重要的保护作用，并能促

进神经细胞功能的恢复^[4-5]。

本研究显示，随着日龄的增加，脑损伤仔鼠的运动功能均有所改善，早期干预可以进一步提高脑损伤鼠运动功能的恢复。

神经细胞黏附分子 NB-3 是近年发现的黏附分子，也被称为 contactin-6，是一个糖基磷脂酰肌醇相连的免疫球蛋白超家族的 contactin 细胞亚群的识别分子，并且明确地表达在神经系统，具有促进神经生长、分化的作用^[1,6-7]。Takeda 等研究发现，无论 NB-3 以可溶性形式还是以底物形式存在，都具有促神经元轴突生长的作用，并与 NB-3 的量成正比关系^[8]。Cui 等发现，NB-3 的表达与少突胶质细胞的发育是一致的，并且可以通过一系列机制促进少突胶质细胞的分化及成熟^[9]。NB-3 在包括小脑在内的脑的大部分区域都有表达，它的表达在出生后突然增高，并且在小鼠出生后第 7 天达到高峰，第 2~3 周进入平台期，这时神经系统的发育已进入最后阶段^[6,8]。

本研究显示，1 日龄脂多糖组小鼠 NB-3 表达较生理盐水组高，7 日龄各组总体表达较 1 日龄高，14 日龄较 7 日龄低，28 日龄更低，这与 Lee 等的研究结果一致。相同时间段上，干预组较非干预组和对照组脑组织 NB-3 的表达高。提示，随着年龄的增长，NB-3 的表达增高；早期干预可以进一步提高 NB-3 的表达，在达到高峰后有所下降，并维持在一定水平上。

本研究显示，早期干预不仅可以改善脑损伤仔鼠

的运动功能, 还可以提高神经黏附分子 NB-3 的表达。由于 NB-3 具有促神经元黏附及轴突导向作用, 在中枢神经系统的损伤修复方面具有一定的意义。早期干预对宫内感染致脑损伤鼠的运动功能的提高, 机制之一可能是由于通过提高 NB-3 的表达来实现的。

我们推测, 能诱导 NB-3 表达增加的因素可能促进脑损伤后神经细胞的修复。神经黏附分子 NB-3 的表达可能是环境刺激影响发育期脑损伤修复的机制之一。

[参考文献]

- [1] Ogawa J, Kaneko H, Masuda T, et al. Novel neural adhesion molecules in the Contactin/F3 subgroup of the immunoglobulin superfamily: isolation and characterization of cDNAs from rat brain [J]. *Neurosci Lett*, 1996, 218(3): 173-176.
- [2] Studenski S, Carlson MC, Fillit H, et al. From bedside to bench: does mental and physical activity promote cognitive vitality in late life? [J]. *Sci Aging Knowledge Environ*, 2006, 28: 21-23.
- [3] Adlard PA, Perreau VM, Pop V, et al. Voluntary exercise decreases amyloid load in a transgenic model of Alzheimer's disease [J]. *J Neurosci*, 2005, 25: 4217-4221.
- [4] Kleim JA, Jones TA, Schallert T. Motor enrichment and the induction of plasticity before or after brain injury [J]. *Neurochem Res*, 2003, 28: 1757-1769.
- [5] Ding Y, Li J, Clark J, et al. Synaptic plasticity in thalamic nuclei enhanced by motor skill training in rat with transient middle cerebral artery occlusion [J]. *Neurol Res*, 2003, 25: 189-194.
- [6] Lee S, Takeda Y, Kawano H, et al. Expression and regulation of a gene encoding neural recognition molecule NB-3 of the contactin/F3 subgroup in mouse brain [J]. *Gene*, 2000, 245(2): 253-266.
- [7] Kunie S, Toyoshima M, Takeda Y, et al. Synaptic formation in subsets of glutamatergic terminals in the mouse hippocampal formation is affected by a deficiency in the neural cell recognition molecule NB-3 [J]. *Neurosci Lett*, 2010, 473(2): 102-106.
- [8] Takeda Y, Akasaka K, Lee S, et al. Impaired motor coordination in mice lacking neural recognition molecule NB-3 of the contactin/F3 subgroup [J]. *J Neurobiol*, 2003, 56(3): 252-265.
- [9] Cui XY, Hu QD, Tekaya M, et al. NB-3/Notch1 pathway via Deltex1 promotes neural progenitor cell differentiation into oligodendrocytes [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(24): 25858-25865.

(收稿日期: 2012-10-18 修回日期: 2012-12-14)