

· 基础研究 ·

运动训练对新生期大鼠反复惊厥所致学习能力损害及海马 ZnT3 表达的影响

倪宏 向玉 姜玉武 蒋伟明 王浙东 吴希如

【摘要】目的 探讨踏转轮运动训练对新生期大鼠反复惊厥所致学习能力损害及海马 ZnT3 表达的影响。**方法** 将出生后 6 d 的 SD 大鼠随机分为惊厥组和对照组。惊厥组每日吸入三氟乙醚诱导惊厥发作 1 次,每次持续 30 min,连续 6 d;对照组给予同样操作,但期间不吸入三氟乙醚。2 组大鼠分别于出生后 29 ~ 35 d 及 61 ~ 67 d 进行 Y 迷宫学习训练,检测其学习、记忆功能。期间 2 组大鼠于出生后 51 ~ 56 d 进行踏转轮训练,每天 1 次,每次 30 min,连续 6 d。最后于出生后 78 d 时将各组大鼠处死行脑组织切片,检测 ZnT3 在海马中的表达。**结果** ①学习能力测试:惊厥组大鼠第 1 次 Y-迷宫辨别学习达标的电刺激次数为 (60.0 ± 14.1) 次,与对照组 $[(37.5 \pm 17.2)$ 次]比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);第 2 次惊厥组 Y-迷宫辨别学习达标的电刺激次数为 (27.5 ± 14.1) 次,与对照组 $[(21.0 \pm 11.0)$ 次]比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);2 组大鼠第 2 次学习能力成绩均较第 1 次显著改善,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。②记忆能力测试:惊厥组与对照组 2 次测试结果间差异均无统计学意义($P > 0.05$)。③ZnT3 原位杂交检测:2 组大鼠 ZnT3 mRNA 在海马各区均有明显表达,差异无统计学意义($P > 0.05$);但惊厥组大鼠齿状回 ZnT3 mRNA 灰度值与 CA3 区比值较对照组显著减小,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 运动训练能显著改善新生期反复长程惊厥对大鼠学习能力的损害,并能有效调节海马区 ZnT3 的异常表达水平。

【关键词】 惊厥; Y-迷宫; 运动训练; ZnT3

The long-term effects of physical exercise on recurrent neonatal seizure-induced cognitive deficit and ZnT3 expression in rat hippocampus NI Hong*, XIANG Yu, JIANG Yu-wu, JIANG Wei-ming, WANG Zhe-dong, WU Xi-ru.

* Institute of Pediatric, Suzhou University Affiliated Children's Hospital, Suzhou 215003, China

【Abstract】 Objective To explore the long-term effects of physical exercise on neonatal seizure-induced learning, memory deficit and the expression of zinc transporter-3 (ZnT3) in rat hippocampus. **Methods** Sprague-Dawley rats aged 6 days were randomly divided into a recurrent-seizure group (RS) and a control group. At postnatal day 6 (P6), the recurrent seizures were induced by inhalation of the volatile agent flurothyl once a day for consecutive 6 days. The rats in the control group were placed in the container for an equal period of time as those in the RS group without exposure to flurothyl. Y-maze test was performed to evaluate learning and memory capacity at postnatal day 29 to 35 and 61 to 67, respectively. During the period of postnatal day 51 to 56, all the animals in the RS and control groups were subject to a 30-minute daily aerobic exercise program for consecutive 6 days. All the animals were sacrificed at postnatal day 78, and the *in situ* hybridization method was used to detect the expression of ZnT3 mRNA in hippocampus. **Results** ①The number of trials needed for getting correct response to the electric stimulation in the first Y-maze test was (60 ± 14.1) and (37.5 ± 17.2) for the RS and control groups, respectively ($P < 0.05$), while that in the second Y-maze test carried out 24 hours later was (27.5 ± 14.1) and (21 ± 11.01) for the RS and the control groups, respectively ($P > 0.05$). ②Memory test revealed no significant difference between the RS and the control groups ($P > 0.05$). ③*In situ* hybridization detection showed that the expression of ZnT3 mRNA in hippocampus was not significantly different between the two groups. However, there showed a significant difference between the dentate gyrus and CA3 in the RS group with regard to the expression of ZnT3 mRNA ($P < 0.05$). **Conclusions** Physical exercise improves the learning capacity of neonatal seizure-induced cognitive deficit and might have effects on the regulation of zinc transporter gene expressions in hippocampus.

【Key words】 Seizure; Y-maze; Physical exercise; ZnT3

新生儿期惊厥是十分常见的临床病症,约有

20% ~ 40% 患儿将出现残障,在早产儿中几乎高达 90% (尤其可导致智力障碍)^[1,2]。我们在前期研究中发现,采用三氟乙醚吸入法将出生后 6 d 的大鼠制作成新生大鼠长程或反复惊厥模型,于发育中不同时间点(直到成年期)检测其行为改变,发现大鼠惊厥阈下降,学习记忆及活动水平均受损害,并且与海马兴奋性

基金项目:国家自然科学基金(30470555),江苏省自然科学基金(BK2007509),江苏省高校自然科学基金(07KJB320103)

作者单位:215003 苏州,苏州大学附属儿童医院儿科研究所(倪宏),神经内科(蒋伟明、王浙东);湖北工业大学外国语学院(向玉);北京大学第一医院儿科神经组(姜玉武、吴希如)

天门冬氨酸受体 (NMDA)、抑制性 γ -氨基丁酸 (GABA) 受体亚基及 Zn^{2+} 相关基因表达异常有关^[3,4]。本研究拟以 Y-迷宫正确反应率作为行为学观测指标,以 Zn^{2+} 转运调控基因 ZnT3 作为分子标记物,探讨运动训练对新生期惊厥所致认知功能障碍和 ZnT3 表达水平的影响,为脑瘫儿童的临床康复提供理论及实验依据。现报道如下。

材料与方法

一、实验动物及试剂

1. 实验动物:6 日龄的 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 21 只,体重 8.30 ~ 15.30 g,清洁级,由浙江省医学科学院实验动物中心提供。所有大鼠在避强光、24 h 昼夜循环、避噪音、自由饮食及进水条件下饲养。

2. 主要试剂:三氟乙醚 (Aldrich Chem. Co. P. O. Box355) 密封避光保存;两端标记寡核苷酸探针干粉、寡核苷酸探针稀释液、寡核苷酸探针预杂交液、复合消化液 (P/E, pH 值为 6.4)、生物素标记的小鼠抗地高辛、高敏过氧化物酶链亲和素复合物、DEPC、DAB Kit、蛋白酶 K、乙二醇四乙酸二钠、曲拉通 X-100,均为天津灏洋生物制品科技有限责任公司产品。

二、行为学训练器材

1. Y-迷宫刺激器:选用 Y 型 MG-2Y 刺激器,由江苏张家港市生物医学仪器厂生产。Y 迷宫由 3 个相同的臂组成,分别称为 I 区、II 区、III 区。通常将下臂 (I 区) 定为起步区,左侧 (II 区) 为安全区,右侧 (III 区) 为电击区,三臂相交处为隔离区 (0 区)。迷宫底部铺设直径 0.2 cm、长 14.0 cm、间距 1.0 cm 的铜棒,通电后能刺激实验动物。每臂长 45 cm,顶端各装一盏 15 W 的刺激信号灯。

2. 踏转轮训练器:包括同步低频电动机、变频调速器和钢质转轮三部分。转轮直径 21 cm、宽 26 cm、周长 63 cm,可在同步低频电动机的驱动下转动,转动速度可由变频调速器控制,用秒表记录转轮转动 1 周的时间,根据周长计算出转轮运动速度。

三、实验操作步骤

1. 三氟乙醚致新生期大鼠惊厥模型制作^[3]:取日龄为 6 d 的 SD 大鼠,采用随机数字表法将其分为对照组 ($n=10$) 和惊厥组 ($n=11$)。将惊厥组仔鼠放置于自制实验舱中,通过舱顶注射孔滴入 0.1 ml 三氟乙醚后封闭实验舱,待仔鼠出现惊厥后开始计时,30 min 后取出仔鼠,观察仔鼠行为持续约 4 h,仔鼠每天诱导惊厥 1 次,共持续 6 d。对照组仔鼠除不给予三氟乙醚外,其它处理与惊厥组完全相同。

2. Y-迷宫实验^[5]:2 组实验大鼠于出生后 29 ~ 35 d 及 61 ~ 67 d 分别进行 2 次 Y 型迷宫实验。采用

Xu 等^[5]介绍的方法,实验在安静、光线较暗环境中由专人负责进行,每天训练时间固定。(1) 学习测试:将大鼠放入 Y 型迷宫中适应 5 min,然后在起步区予以电击致其逃至安全区,信号灯光持续 15 s;然后以大鼠所在臂作为下一次测试的起始位置,2 次测试的时间间隔为 45 s。电刺激参数:电压 40 V,延时 5 s。以大鼠经电刺激后 10 s 内一次性从起步区逃至安全区为“正确反应”,否则为“错误反应”。每个实验日每只大鼠训练 20 次,以连续 10 次测试中有 9 次正确反应定为学会标准,将达到学会标准所需的电击次数作为学习记忆成绩,电击次数越少,表明学习能力越强。(2) 记忆再现测试:待学习测试达标的大鼠休息 24 h 后,采用同法检测其记忆功能,共连续电刺激大鼠 20 次,记录其成功逃至安全区的次数,并以此结果代表大鼠记忆再现功能。

3. 踏转轮运动训练^[5]:在实验大鼠出生后 51 ~ 56 d 时,将对照组和惊厥组大鼠置于转轮中,转轮速度为 8 ~ 9 m/min,每天训练 1 次,每次训练 30 min,连续 6 d。

四、标本制作及原位杂交检测

于各组大鼠出生 78 d 后用复合麻醉剂腹腔注射 (3 ml/kg 体重) 麻醉 2 h,经左心室插管至主动脉,用血管钳固定,用小剪刀剪开右心耳,先灌流生理盐水 50 ml,再用 4℃、4% PFA 50 ml 缓慢灌流,然后立即断头取脑。脑组织置于 4% PFA 后固定 24 h,20% 蔗糖溶液 24 h,取部分海马组织块。室温下进行梯度酒精脱水:70% 乙醇 120 min,80% 乙醇 180 min,95% 乙醇 180 min,95% 乙醇 840 min (过夜),100% 乙醇 60 min,100% 乙醇 60 min;然后用二甲苯透明、石蜡包埋,置于轮转式切片机中切片,切片厚度 3 μ m。

Dig 标记单核苷酸 ZnT3 mRNA 探针序列为 5'-GTGCTGCTAAATACCCACCAACCACCTCCCC-3',采用 TBD 的原位杂交试剂盒。具体步骤如下:石蜡切片脱蜡至水;置打孔液中 (室温) 10 min 以改变组织细胞通透性,使探针能快速顺利穿透细胞膜;置过氧化氢封闭液 (室温) 中 20 min 以封闭内源性过氧化氢酶;滴加复合消化工作液覆盖标本表面 (室温 10 min);滴加预杂交工作液覆盖标本表面并置于 37℃ 湿盒内孵育 2 h;滴加杂交工作液覆盖标本表面并置于 37℃ 湿盒内孵育 4 h;滴加小鼠抗地高辛生物素标记的抗体工作液 (现用现配);滴加高敏过氧化物酶链亲和素复合物工作液 (现用现配);DAB 显色,于光学显微镜下观察细胞内胞浆阳性颜色 (细胞浆中呈棕黄色颗粒为阳性反应) 与细胞外背景颜色对比度,当反差明显时用蒸馏水洗终止反应。

五、图像分析

采用德国产 LEICA QWin 图像处理与分析系统对本图像进行分析,分别从每只大鼠切片中选取 2 张切片,检测其海马结构及海马齿状回区 CaMKII mRNA 阳性反应的灰度值,另外再检测其周边背景灰度值,两值相减后的平均值即为最终灰度值。

六、统计学分析

本研究所得数据以($\bar{x} \pm s$)表示,原位杂交灰度数值比较采用 SAS 软件,按完全随机成组设计资料进行 t 检验,灰度比值分析采用 Ridit 秩和检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

结 果

一、第 1 次 Y-迷宫测试结果分析(出生后 29 ~ 35 d)

惊厥组大鼠在第 1 次 Y-迷宫辨别学习中达标的电刺激次数为(60.0 ± 14.1)次,与对照组相应结果[(37.5 ± 17.2)次]比较,差异具有统计学意义($P < 0.05$),表明惊厥组大鼠存在学习能力下降。在记忆保存测试中,惊厥组逃至安全区的正确次数为(0.3 ± 0.9)次,对照组为(0.5 ± 14.1)次,2 组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。

二、第 2 次 Y-迷宫测试结果分析(出生后 61 ~ 67 d)

惊厥组大鼠在第 2 次 Y-迷宫辨别学习中达标的电刺激次数为(27.5 ± 14.1)次,与对照组相应结果[(21.0 ± 11.01)次]比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);2 组实验大鼠第 2 次学习功能测试成绩均较第 1 次显著改善,差异具有统计学意义($P < 0.01$);表明经运动训练后,惊厥组大鼠学习能力有了显著改善。在第 2 次记忆保存测试中,惊厥组逃至安全区的正确次数为(0.5 ± 0.8)次,对照组为(0.3 ± 0.9)次,2 组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。

三、ZnT3 原位杂交结果分析

ZnT3 mRNA 阳性神经元呈棕黄色,分布于海马各区域中。灰度分析结果显示,惊厥组大鼠海马 CA3 区 ZnT3 mRNA 阳性神经元灰度值为(31.21 ± 5.99),对照组为(26.97 ± 10.5),其间差异无统计学意义($P > 0.05$);惊厥组大鼠海马齿状回区 ZnT3 mRNA 阳性神经元灰度值为(21.23 ± 9.23),对照组为(30.89 ± 20.97),其间差异亦无统计学意义($P > 0.05$);惊厥组大鼠齿状回灰度值与 CA3 区之比为(0.67 ± 0.26),较对照组(1.16 ± 0.55)显著减小,差异具有统计学意义($P < 0.05$),提示尽管 2 组实验大鼠 ZnT3 在海马区总的表达水平间没有差异,但在亚区分布方面略有变化,即惊厥组大鼠 CA3 区 ZnT3 mRNA 阳性神经元表达水平高于齿状回区(图 1A ~ D)。

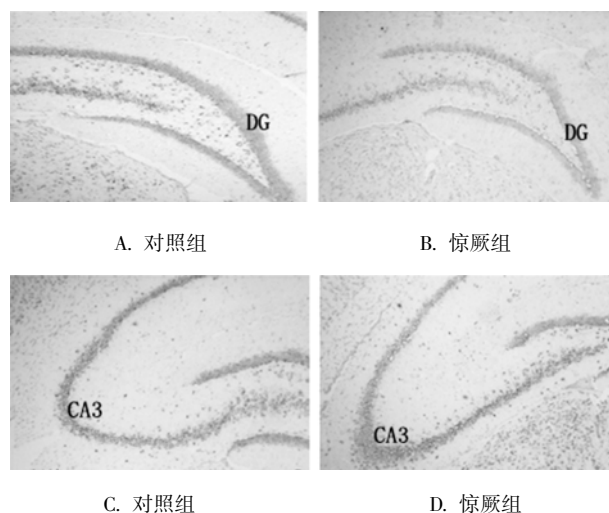


图 1 各组实验大鼠海马齿状回(A,B)和 CA3 区(C,D) ZnT3 mRNA 表达比较(DAB 显色, $\times 100$)

讨 论

大量动物实验证明,成年大鼠癫痫持续状态后会造成学习和记忆功能损害^[6,7];然而发育期惊厥是否造成远期认知功能损伤尚存在争议。新生儿三氟乙醚吸入性惊厥具有惊厥诱发迅速明确、死亡率低等特点,是研究临床新生儿期惊厥的理想模型。我们在国内率先开展了新生儿三氟乙醚诱发惊厥的系列基础研究,采用 Morris 水迷宫法证明新生儿反复长程惊厥能够在学习和记忆功能产生远期损害^[3,4];国外 Sogawa 等^[8,9]学者也发现发育期反复三氟乙醚惊厥能导致成年时学习记忆受损及惊厥阈降低。本研究选用 Y-迷宫方法检测惊厥大鼠模型学习记忆功能,进一步验证了发育期惊厥诱发认知功能损伤的动态变化过程,弥补了以往研究的不足。本研究结果表明,发育期反复惊厥可造成严重的远期学习记忆功能损害,并且早在发育期 29 d(出生 29 d)时就已出现认知损伤。另外本研究未检测到 2 组大鼠记忆保持能力间差异有统计学意义($P > 0.05$),推测一方面与检测手段灵敏度有关,如 Morris 水迷宫检测灵敏度可能稍高于 Y-迷宫;另一方面也可能与动物数量偏少有关,还有待今后进一步研究验证。

关于运动训练改善脑可塑性的研究是近年来康复领域的新热点之一^[10-13]。跑转轮及跑台训练是目前国内外基础研究中常用的训练手段。van Praag 等^[14]研究发现,成年小鼠经跑转轮运动后,学习能力明显提高;Setkowicz 等^[15]研究发现,大鼠经跑转轮和游泳训练后,能降低其惊厥易感性,并对发育中惊厥所诱发的学习损害具有一定干预功效。姜淑杰等^[16]报道,跑台运动训练在短时间内可明显提高幼龄大鼠学习能力,但对记忆能力改善不明显。我们以往的研究发现,实验大鼠经慢速转轮运动训练(7 m/min, 每天 2 次,

30 min/次,连续 6 d)后,其在 Y-迷宫中的学习成绩明显优于对照组^[5]。本研究进行的是针对发育期惊厥的早期干预,因而采取慢速训练方式(8 m/min,每天 1 次,30 min/次,连续 6 d)以减少运动应激造成的脑损伤,结果表明经转轮运动训练后,惊厥组大鼠 Y-迷宫学习成绩与对照组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。尽管本研究没有探讨单纯 Y-迷宫学习训练对发育期惊厥性脑损伤大鼠认知功能的干预作用,但有研究已证实单纯 Y-迷宫训练或单纯 Morris 水迷宫训练对发育期惊厥性脑损伤大鼠认知功能的干预作用是有限的^[20]。本研究结果提示,运动训练结合 Y-迷宫学习能显著改善新生期反复长程惊厥对大鼠学习能力的损伤。

为进一步探讨新生期惊厥对学习记忆影响的相关分子学机制,本研究采用原位杂交法对大鼠海马 Zn^{2+} 转运体 3 ($ZnT3$) mRNA 表达水平进行检测。在海马谷氨酸能神经元的突触前膜囊泡内有一组织化学反应阳性的 Zn^{2+} 池,以齿状回颗粒细胞及 MS 通路中含量最多^[17]。惊厥可使 MS 通路中的 Zn^{2+} 与谷氨酸一同由突触前膜释放进入突触间隙中,从而调节谷氨酸的释放量及与突触后膜谷氨酸受体结合,减轻谷氨酸引起的兴奋毒性损伤。 Zn^{2+} 转运的上述特点在控制惊厥易感性及参与学习记忆等方面具有重要意义^[18]。现已证实, Zn^{2+} 在突触前膜囊泡内的积聚是通过特定转运体实现的,其中 $ZnT3$ 被证实负责在 MS 通路中将 Zn^{2+} 转运入突触前膜囊泡内^[19]。以往研究曾观察到新生期大鼠经三氟乙醚诱发惊厥后,成年期表现有认知功能损伤,同时 RT-PCR 检测发现 $ZnT3$ mRNA 在海马中的表达水平增高,但由于 RT-PCR 无法对 $ZnT3$ mRNA 表达上调进行解剖学定位,因此本研究进一步通过原位杂交法探讨 $ZnT3$ 表达的亚区分布,发现惊厥组与对照组 $ZnT3$ 表达在海马各区差异均无统计学意义($P > 0.05$),但惊厥组齿状回与 CA3 区灰度值之比较对照组明显减小,差异具有统计学意义($P < 0.05$),提示尽管 $ZnT3$ 在 2 组大鼠海马区总的表达方面没有显著差异,但在亚区分布方面惊厥组 CA3 区表达水平高于齿状回区,提示运动训练能影响惊厥组海马 $ZnT3$ 水平,使原来过高的 $ZnT3$ 表达水平下调;同时也提示尽管给予运动训练等早期干预,但惊厥组仍有 $ZnT3$ 表达分布异常的特点,即 CA3 区存在 $ZnT3$ 过表达现象。

综上所述,本研究结果表明运动训练能显著改善新生期反复长程惊厥对大鼠学习能力的损害,并能有效缓解实验大鼠海马区 $ZnT3$ 的异常表达。

参 考 文 献

- [1] Scher S. Neonatal seizures and brain damage. *Pediatr Neurol*, 2003, 29:381-390.
- [2] Scher MS, Aso K, Beggarly ME, et al. Electrographic seizures in pre-term and full term neonates: clinical correlates, associated brain lesions and risk for neurological sequelae. *Pediatrics*, 1993, 91: 128-134.
- [3] Jiang HN, Bo YW. Long-term effects of neonatal seizures on subsequent NMDA-1 and GABA-A- $\alpha 1$ receptor expression in hippocampus of the Wistar rat. *Neurosci Lett*, 2004, 368:254-257.
- [4] Ni H, Jiang YW, Wu XR, et al. C-Fos, N-methyl-D-aspartate receptor 2C, GABA-A-1 immunoreactivity, seizure latency and neuronal injury following single or recurrent neonatal seizures in hippocampus of Wistar rat. *Neurosci Lett*, 2005, 380:149-154.
- [5] Xu WP, Shan LD, Gong S, et al. Forced running enhances neurogenesis in the hippocampal dentate gyrus of adult rats and improves learning ability. *Acta Phys Sinica*, 2006, 58:415-420.
- [6] Ni H. Seizure-induced brain injury in brain development and Zn^{2+} metastasis in hippocampus. *Sheng Li Ke Xue Jin Zhan*, 2006, 37: 331-334.
- [7] 倪宏. 热性惊厥与颞叶癫痫. 国外医学(儿科学分册), 2003, 30: 321-324.
- [8] Liu Z, Yang Y, Silveira DC, et al. Consequences of recurrent seizures during early brain development. *Neurosci*, 1999, 92:1443-1454.
- [9] Sogawa Y, Monokoshi M, Silveira DC, et al. Timing of cognitive deficits following neonatal seizures: relationship to histological changes in the hippocampus. *Brain Res Dev Brain Res*, 2001, 131:73-83.
- [10] Chen CC, Chang HC, Chung MY, et al. Menhaden fish oil improves spatial memory in rat pups following recurrent pentylentetrazole-induced seizures. *Epilepsy Beh*, 2006, 8:516-521.
- [11] Lai MC, Holmes GL, Leed KH, et al. Effect of neonatal isolation on outcome following neonatal seizures in rats, the role of corticosterone. *Epilepsy Res*, 2006, 68:123-136.
- [12] 谭来勋, 孙圣刚, 张双国. 运动训练诱发大鼠脑梗死周边区域神经突触变化的机制. *中华物理医学与康复杂志*, 2006, 28:433-436.
- [13] 江山, 李玲, 袁华, 等. 行为学训练对大鼠海马梗死后齿状回区神经干细胞迁移能力的影响. *中华物理医学与康复杂志*, 2006, 28: 510-514.
- [14] van Praag H, Christie BR, Sejnowski TJ, et al. Running enhances neurogenesis, learning and long-term potentiation in mice. *Proc Nat Acad Sci USA*, 1999, 96:13427-13431.
- [15] Setkowicz Z, Mazur A. Physical training decreases susceptibility to subsequent pilocarpine-induced seizures in the rat. *Epilepsy Res*, 2006, 71:142-148.
- [16] 姜淑杰, 刘瑾彦, 杨若愚, 等. 跑台运动促进幼龄大鼠学习能力. *生理学报*, 2006, 58: 365-369.
- [17] Colvin RA, Fontaine CP, Laskowski ML, et al. Zn^{2+} transporters and Zn^{2+} homeostasis in neurons. *Euro J Phar*, 2003, 479:171-185.
- [18] Cross DJ, Cavazos JE. Synaptic reorganization in subiculum and CA3 after early-life status epilepticus in the kainic acid rat model. *Epilepsy Res*, 2007, 73:156-165.
- [19] 楼江燕, 倪宏. 锌转运体的结构预测、转运机制和功能. 国外医学(医学地理分册), 2006, 27:59-61.
- [20] 丁美丽, 倪宏, 王浙东, 等. 青霉素诱发发育期大鼠反复惊厥对学习记忆功能的远期影响. *中国行为医学科学杂志*, 2008, 17:50-51.

(修回日期:2008-02-20)

(本文编辑:易 浩)