

· 基础研究 ·

早期干预对宫内缺氧、缺血大鼠脑功能及神经生长相关蛋白表达的影响

刘玲 陈达光 陈燕惠

【摘要】目的 研究早期干预对宫内缺氧、缺血大鼠脑功能及神经生长相关蛋白表达的影响。**方法** 选用 SD 大鼠制作宫内缺氧、缺血脑损伤(hypoxic-ischemic brain damage, HIBD)动物模型共计 30 只,并同时选取 30 只正常大鼠作为对照。将上述大鼠随机分为 HIBD 干预组、HIBD 非干预组、正常干预组及正常非干预组。各干预组大鼠于出生后 2~28 d 期间,分别对其进行早期干预(包括按摩、丰富环境刺激等)。当早期干预治疗结束后,通过跳台测试评价各组大鼠的脑功能,随后取各组大鼠脑组织进行 GAP-43 免疫组化染色检测,以观察各组大鼠 GAP-43 表达的差异。**结果** 在跳台测试实验中,HIBD 干预组大鼠学习、记忆成绩明显优于 HIBD 非干预组($P < 0.05$),正常干预组大鼠的学习、记忆成绩也明显优于正常非干预组($P < 0.05$);通过 GAP-43 免疫组化检测结果发现,HIBD 干预组大鼠额皮质及海马 CA3 区的 GAP-43 表达明显强于 HIBD 非干预组($P < 0.05$),正常干预组的 GAP-43 表达亦明显强于正常非干预组($P < 0.05$)。**结论** 早期干预可以促进大鼠受损脑功能的恢复,而且对正常大鼠的脑功能发育也有促进作用,GAP-43 表达的增强可能是早期干预改善大鼠脑功能的主要机制之一。

【关键词】 缺氧、缺血/早期干预; 神经生长相关蛋白; 大鼠

Effects of early intervention on functional outcome and content of GAP-43 in the brain of rats with hypoxic-ischemic brain damage LIU Ling, CHEN Da-guang, CHEN Yan-hui. Department of Pediatrics, Union Hospital, Fujian Medical University, Fuzhou 350001, China

【Abstract】 Objective To study the effects of early intervention on functional outcome and content of growth associated protein (GAP-43) in the brain of rats with hypoxic-ischemic brain damage (HIBD). **Methods** The animal model of intra-uterus HIBD was established in 30 pregnant Sprague-Dawley rats, who were then divided randomly into 4 groups: the intervention HIBD group (HIBD-IT), the non-intervention HIBD group (HIBD-NIT), the intervention control group (control-IT), the non-intervention control group (control-NIT). From the second day after the operation, the rats of the HIBD-IT and control-IT groups were kept in an enriched environment and administered with the neonatal handling including massage for 14 days. On the 28th day, jumping stand test was administered to all the rats, at the same time, the expression of GAP-43 in brain of the rats in different groups were measured by immunohistochemical method. **Results** On the jumping stand test, the performance of control-IT and HIBD-IT groups were significantly better than that of the control-NIT and HIBD-NIT groups ($P < 0.05$), respectively. Immunohistochemical analysis showed that expression of GAP-43 in prefrontal cortex and CA3 region of hippocampus, was significantly stronger in the HIBD-IT and control-IT groups as compared with that of the HIBD-NIT and the control-NIT groups ($P < 0.05$), respectively. **Conclusion** Early intervention could effectively improve learning and memory and relieve the neuron behavior sequela in HIBD rats, and the intervention could also improve the brain function of the normal rats. The up-regulated GAP-43 expression in the brain may contributed to the amelioration of brain function treated by early intervention.

【Key words】 Hypoxic-ischemic; Early intervention; Growth associated protein; Rats

围生期缺氧、缺血性脑损伤(hypoxic-ischemic brain damage, HIBD)能够导致脑瘫、癫痫等多种严重神经系统后遗症。近年来国内外有学者通过对 HIBD 患儿进行早期干预,发现该治疗在防止后遗症产生、改善患儿智力发育水平等方面具有显著疗效^[1,2]。本研究观察早期干预对宫内缺氧、缺血大鼠脑功能恢复的

影响以及该期间内大鼠脑组织神经生长相关蛋白(growth associated protein, GAP-43)表达水平的变化,试图从中枢神经系统可塑性角度探寻早期干预促进脑损伤修复的可能机制。现报道如下。

材料与方法

一、动物分组及模型制备

共选取孕 21 d 的 SD 雌性大鼠 20 只,体重 300 ~

350 g, 平均 315 g。所有大鼠经乙醚吸入麻醉后, 剖腹并结扎其一侧子宫角血管, 切下该侧子宫置入 37℃ 水浴中, 15 min 后, 立即行剖宫术, 取出胎鼠制作缺氧、缺血动物模型, 将其中符合 HIBD 脑损伤标准^[3,4]的胎鼠 (均已达到中、重度脑损伤水平) 归入缺氧、缺血组 (HIBD 组)。而 SD 雌性大鼠的另一侧子宫角血管则不予结扎, 剖宫后立即取出胎鼠归入正常组, 最后 HIBD 组和正常组各有 30 只胎鼠进入实验。HIBD 组根据胎鼠体重及缺血、缺氧程度等平均划分为 HIBD 干预组和 HIBD 非干预组; 正常组胎鼠则根据随机表法分为正常干预组及正常非干预组, 上述 4 个亚组各有胎鼠 15 只。

二、干预方法

早期干预方法^[5,6]: 在胎鼠出生后 2~13 d 内, 每天将干预组胎鼠与母鼠分开 1 次, 用毛刷从头至尾沿脊柱轻轻地摩擦, 持续 15 min; 非干预组胎鼠则不进行触摸治疗。从出生后第 14 天胎鼠睁眼开始, 将干预组胎鼠置入丰富环境 (参照 Femandaz 等^[7]介绍的方法, 制作 42 cm × 26 cm × 21 cm 大笼, 笼内放置各种不同颜色及形状的物体, 包括管道、秋千、斜坡等等, 并且每周改变颜色、形状 2 次) 中, 每日持续 1 h; 并于出生后第 22 天 (此时胎鼠已断奶) 开始, 将大鼠全天置入丰富环境中, 该干预方法共持续 1 周。当干预组胎鼠与母鼠分开时, 非干预组胎鼠也与母鼠分开 (将其置入 28 cm × 18 cm × 15 cm 无特殊刺激的标准铁笼中) 相同时间。每天均给予 4 组胎鼠 12 h 光照刺激, 自由摄食、饮水, 定期换笼饲养。

三、动物行为学测试——跳台测试

各组大鼠于出生后第 28 天, 分别将其置入反应箱 (跳台被动回避条件反射箱的制作参见 Lashley 法^[8]) 内适应 3 min, 随后接通 36 V 交流电, 当动物受到电击时, 其正常反应是跳回平台以躲避伤害性刺激。各组大鼠先训练数分钟后开始测试, 记录 5 min 内每只大鼠受到电击的次数 (即 5 min 错误次数), 并以此作为学习成绩; 24 h 后重新进行测验 (即记忆保持测验)。先将大鼠置于平台上, 记录每只大鼠从放置到平台那一刻到第一次跳下平台所需的时间 (即第 1 次跳下平台潜伏期), 并检测大鼠在 3 min 内跳下平台的次数 (即 3 min 错误次数)。

四、实验取材及免疫组化法检测

各组大鼠于出生后第 29 天时, 应用 20% 乌拉坦腹腔注射麻醉, 随后用 4% 多聚甲醛 (4℃) 进行心脏灌注, 持续时间为 1.5 h 左右, 然后取出大鼠海马、额皮质等组织于 10% 甲醛液中外固定过夜, 最后进行脱水、包埋、切片 (厚度 4~6 μm) 等处理。一抗采用小鼠 IgG 抗 GAP-43 单克隆抗体 (由 Oncogene 公司出

品); 切片经脱蜡、水化后置入 0.3% H₂O₂ 中, 采用 SP 法进行染色。用 PBS 和正常小牛血清分别代替一抗进行孵育, 作为 GAP-43 抗体特异性的阴性对照。采用 OLYMPUS 光学显微镜对上述标本进行观察, 免疫组化结果采用半定量积分法分析^[9]。根据每张切片的阳性细胞比例及着色深浅程度进行计分, 如着色比例 < 1/3 为 1 分, 介于 1/3~2/3 之间为 2 分, > 2/3 为 3 分; 着色程度标准: 无着色为 0 分, 浅黄色为 1 分, 棕黄色为 2 分, 棕褐色为 3 分。根据两者乘积判断阳性等级: 分别有 0 分 (-)、1~3 分 (+)、4~6 分 (++)、> 6 分 (+++) 等等。

五、统计学分析

实验数据采用 SPSS 11.0 版统计软件进行分析, 行为学测试结果采用随机分组的方差分析法进行比较, GAP-43 的免疫组化结果比较则采用多独立样本的非参数检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

一、各组大鼠跳台测试结果比较

各组大鼠经相应干预处理后, 分别经跳台实验检测其行为学改变情况 (共包括 3 项指标, 分别是 5 min 错误次数、第 1 次跳下平台潜伏期及 3 min 错误次数), 发现 4 组大鼠各指标间差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$), 即 HIBD 组大鼠各指标均明显差于正常非干预组 ($P < 0.05$); 进一步分析后发现, 干预组大鼠各指标均优于非干预组 (即正常干预组各指标明显优于正常非干预组, HIBD 干预组各指标亦明显优于 HIBD 非干预组, 均 $P < 0.05$), 具体数据详见表 1。

表 1 出生后第 28 天时各组大鼠跳台测试结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组 别	n	5 min 错误次数	第 1 次跳下平台潜伏期(s)	3 min 错误次数 (经 24 h 学习后)
HIBD 干预组	15	0.933 ± 0.884 * Δ	140.333 ± 32.337 * Δ	1.133 ± 0.834 * Δ
HIBD 非干预组	15	1.733 ± 1.223	111.467 ± 48.319	1.800 ± 1.146
正常干预组	15	0.200 ± 0.414 Δ	175.000 ± 8.772 Δ	0.267 ± 0.458 Δ
正常非干预组	15	0.733 ± 0.704	167.600 ± 18.422	0.533 ± 0.640

注: 与 HIBD 非干预组比较, * $P < 0.05$; 与正常非干预组比, Δ $P < 0.05$

二、各组大鼠 GAP-43 的免疫组化染色结果比较

经光镜观察发现, GAP-43 免疫组化染色阳性物质呈棕褐色颗粒, 分布于大鼠神经元细胞膜上。进一步观察后发现, HIBD 干预组神经元有较多免疫阳性颗粒, 而 HIBD 非干预组则较之有所减少, 2 个正常亚组大鼠的阳性反应产物均较 HIBD 组减少, 其中正常非干预组最少。经统计学分析后发现, 4 组大鼠额皮质、海马 CA3 区的 GAP-43 阳性反应差异有统计学意义 (均 $P < 0.05$); 进一步比较后发现, HIBD 干预组额皮

质、海马 CA3 区的 GAP-43 阳性反应等级高于 HIBD 非干预组 ($P < 0.05$), 正常干预组额皮质阳性反应等级亦高于正常非干预组 ($P < 0.05$), HIBD 干预组和 HIBD 非干预组的阳性反应等级均高于正常非干预组 (均 $P < 0.05$), 其相应的免疫反应照片见图 1~3, 具体数据详见表 2。

表 2 出生后第 29 天时 4 组大鼠额皮质、海马 CA3 区 GAP-43 的免疫阳性反应比较 (只)

组 别	n	额皮质各反应等级的大鼠只数				海马 CA3 区各反应等级的大鼠只数			
		-	+	++	+++	-	+	++	+++
HIBD 干预组	15	0	0	7	8	0	0	6	9
HIBD 非干预组	15	0	3	9	3	0	2	10	3
正常干预组	15	0	4	10	1	0	2	11	2
正常非干预组	15	0	8	7	0	0	8	6	1

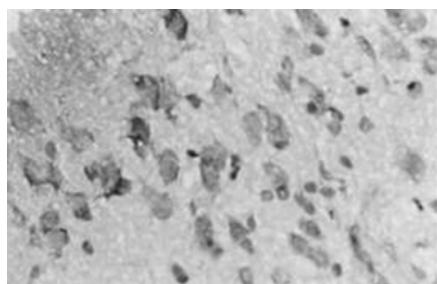


图 1 HIBD 干预组大鼠脑组织 GAP-43 表达 (SP 法, ×400)

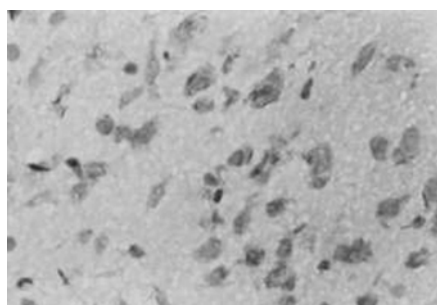


图 2 HIBD 非干预组大鼠脑组织 GAP-43 的表达 (SP 法, ×400)

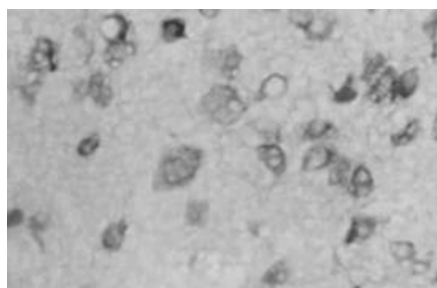


图 3 正常非干预组大鼠脑组织 GAP-43 的表达 (SP 法, ×400)

讨 论

在本研究中,我们通过制作宫内缺血缺氧大鼠模型进行实验观察,是因为该模型的病理特征与人类围

生期缺氧、缺血性脑损伤极为相似^[10]。同时相关研究表明,额皮质是感觉运动的核心调节中枢之一,具有生长活跃、对损伤敏感等特点;而海马 CA3 区是涉及空间学习记忆的关键部位,CA3 区的发育水平及损伤修复的程度与跳台实验中的表现有着密切关系^[11],因此我们选择大鼠额皮质及海马 CA3 区作为研究部位。

由于大鼠在出生后 2~13 d 内还不能睁眼,故这个阶段的干预措施主要是沿着动物脊柱进行触摸治疗,以刺激其神经系统发育。从出生后第 14 天大鼠睁眼开始,将干预组大鼠置入丰富环境中接受各种刺激。该环境为小鼠提供了更大的活动空间(还包括各种鲜艳的色彩及各种形状的管道、秋千、迷宫及斜坡等),可使小鼠的多种感官觉在活动中受到刺激,使其平衡能力、运动能力得到训练。跳台测试主要检测的是受试小鼠对有害刺激采取被动回避反应的学习能力及记忆能力,可反映小鼠的空间学习及记忆巩固能力。本研究通过比较跳台测试结果中的多个参数后发现, HIBD 各亚组小鼠成绩均较正常非干预组差,说明缺氧、缺血可导致小鼠学习记忆功能明显损害;同时还发现 HIBD 干预组小鼠学习、记忆成绩明显优于 HIBD 非干预组,正常干预组的学习记忆成绩亦优于正常非干预组,提示早期干预不仅可使 HIBD 小鼠的学习、记忆能力得到显著改善,而且还能提高正常小鼠的学习、记忆功能。

在本研究中,我们通过免疫组化检测发现:无论是 HIBD 组小鼠,还是正常组小鼠,经过早期干预后,其 GAP-43 表达水平均较干预前有所提高,综合上述行为学、神经生物学两方面的研究结果,可以认为早期干预对脑损伤恢复的影响与中枢神经系统的可塑性有关。GAP-43 作为构建中枢神经系统可塑性的基本物质,已成为研究神经生长及损伤修复的首选探针之一^[12,13]。在神经系统的初期发育阶段中,GAP-43 在神经元胞体中的含量较高,它可促进轴突生长;待其轴突形成后,GAP-43 则只在例如突触等生长较旺盛的结构中呈高浓度表达,而在胞浆中的含量明显降低。随着机体年龄的增长,GAP-43 水平逐步回落;直至出现脑损伤时,GAP-43 含量才再次升高,以促进损伤修复,其参与损伤修复的可能机制包括^[14]:损伤导致机体神经元坏死、突触联系中断,刺激周围未受损神经元合成大量 GAP-43;该蛋白通过与信息分子相互作用,可促进轴突侧支出芽,与靶区神经元再建轴突联系,恢复原已中止的突触效应,使得机体受损功能得到一定程度的代偿;同时脑损伤还可促进机体启用原处于静止状态的神经元轴突,使 GAP-43 含量进一步增高,以增强兴奋性氨基酸受体的反应性,强化钙离子信息系统,促使平时处于潜伏状态的神经结构被重新利用,并参与到功

能重建与结构重组中,从而促进损伤修复。

临床上常用药物治疗处理脑损伤患者的后遗症,但疗效并不令人满意。余茜等^[5]通过对脑梗死大鼠进行康复训练,发现大鼠学习记忆功能得到明显改善。本研究也证实了早期干预促进脑损伤修复的有效性,并从中枢神经系统可塑性角度探讨了早期干预促进脑损伤修复的部分可能机制,即早期干预可促进 GAP-43 的表达。同时相关研究还表明,出生后 28 d 的大鼠的发育水平与 2 周岁儿童相当^[16],而 0~2 岁是儿童神经系统发育的重要时期,这一阶段内的神经系统不仅发育迅速,而且其可塑性也比较强,若此时对宫内缺血缺氧大鼠进行早期干预将具有重要意义。早期干预作为一种综合性的康复训练手段,应充分抓住机体中枢神经系统发育这一关键时期,最大程度地挖掘脑可塑性潜能以促进脑损伤修复;与此同时,在对正常干预组与正常非干预组各项指标的检测中也发现,早期干预亦可促进正常大脑组织的智力发育水平。因此,无论是将早期干预应用于临床 HIBD 患儿的康复治疗中,还是将它应用于正常儿童智能开发中,都具有十分重要的意义,值得临床推广应用。然而,关于早期干预改善脑功能的确切机制,还有待更进一步的研究。

参 考 文 献

- 1 Tan S, Parks DA. Preserving brain function during neonatal asphyxia. Clin Perinatol, 1999, 26:733-747.
- 2 陈燕惠,陈达光,陈珊,等. 婴儿早期教育实验研究. 中国优生优育杂志, 1998, 9:72.
- 3 Bjelke B, Andersson K, Ogren SO, et al. Asphyctic lesion; proliferation of tyrosine hydroxylase-immunoreactive nerve cell bodies in the rat substantia nigra and functional changes in dopamine neurotransmission. Brain Res, 1991, 543:1-9.
- 4 Bona E, Johansson BB, Hagberg H. Sensorimotor function and neuropathology five or six weeks after hypoxia-ischemia in seven-day-old rats. Pediatr Res, 1997, 42:678-683.
- 5 Ickes BR, Pham TM, Sanders LA, et al. Long-term environment leads to regional increase in neurotrophin levels in rat brain. Exp Neurol, 2000, 164:45-52.
- 6 Pham TM, Ickes BR, Albeck D, et al. Changes in brain nerve growth factor levels and nerve growth factor receptors in rats exposed to environmental enrichment for one year. Neuroscience, 1999, 94:279-286.
- 7 Femandaz V, Adaro L, Sanhueza-Tsutsumi M, et al. Early-life polysensory stimulation and nutrition: topographic levels of susceptibility in the rats visual cortex. Biol Neonate, 1997, 71:265-276.
- 8 Galler JR, Fleischer SF, Turkewitz G, et al. Varying deficits in visual discrimination performance associated with different forms of malnutrition in rats. J Nutr, 1980, 110:231-240.
- 9 张声, 李莉, 林华, 等. 胃癌淋巴结转移相关因素的分析. 中华肿瘤杂志, 2001, 23:239-243.
- 10 Frim DM, Short MP, Rosenberg WS, et al. Local protective effects of nerve growth factor-secreting fibroblasts against excitotoxic lesions in the rat striatum. J Neurosurg, 1993, 78:267-273.
- 11 Handelman GF, Olton DA. Spatial memory following damage to hippocampal CA3 pyramidal cells with kainic acid: impairment and recovery with preoperative training. Brain Res, 1981, 217:41.
- 12 杨辉, 蔡文琴, 张可成. GAP-43 的表达与神经生长、可塑性的关系. 国外医学生理病理科学与临床分册, 1995, 15:117-119.
- 13 Kawasaki T, Nishio T, Kawaguchi S, et al. Spatio temporal distribution of GAP-43 in the developing rat spinal cord: a histological and quantitative immunofluorescence study. Neurosci Res, 2001, 39:347-358.
- 14 Delisa JA. Rehabilitation medicine principle and practice. New York: Lippincott-Raven Publishing House, 1998. 1069-1070.
- 15 余茜, 李晓红, 何成松, 等. 康复训练对脑梗死大鼠学习记忆与健侧海马突触体胞浆 Ca^{2+} 浓度的影响. 中华物理医学与康复杂志, 2004, 26:201-211.
- 16 Jiang W, Duong TM, de Lanerolle NC. The neuropathology of hyperthermic seizures in the rat. Epilepsia, 1999, 40:5-19.

(修回日期:2004-07-25)

(本文编辑:易 浩)

· 研究简报 ·

骨骼肌钝挫伤后肌电检测的应用研究

陈疾忤 陈世益 李云霞 张鹏

骨骼肌损伤是骨科常见疾患,其中以骨骼肌挫伤最为常见^[1]。骨骼肌损伤后伴有受损处瘢痕形成、肌肉纤维化等,易导致再损伤^[2]。

寻找合理有效的监测手段来评估骨骼肌损伤后的修复状况,对骨骼肌损伤的临床诊治具有重要意义。目前对骨骼肌损

伤后修复的研究主要涉及生物力学、分子生物学及组织化学等方面^[3],多用于动物实验和离体标本的检测,不适用于临床上的骨骼肌损伤患者。

Hurme 等^[4]研究证实:骨骼肌钝挫伤后伴有局部神经纤维分支受损,包括 2 种类型的肌肉失神经支配,一种是肌肉内神经分支受损造成的神经源性的失神经支配,另一种是由于肌纤维的受损导致的肌源性失神经支配。我们设想,骨骼肌挫伤后肌纤维变性、神经损伤后的暂时失神经支配和肌肉再生修复后的神经再支配过程,可能通过损伤局部肌电信号的变化表现出来,

基金项目:国家自然科学基金(No. 30170446),上海市医学“百人计划”资助项目(No. 97BR017)

作者单位:200040 上海,复旦大学附属华山医院运动医学科