

· 论 著 ·

早期干预对未成熟大鼠脑损伤学习记忆及 NMDA 受体 NR1 亚单位表达的影响*

廖 伟, 赵聪敏[△], 温恩懿, 张雨平, 王丽雁
(第三军医大学新桥医院儿科, 重庆 400037)

摘要:目的 探讨早期干预对未成熟大鼠脑损伤后学习记忆及 NMDA 受体 NR1 亚单位表达的影响。方法 选 2 日龄 SD 大鼠制作未成熟大鼠脑损伤模型, 随机分为丰富环境(EE)组、贫瘠环境(IE)组、标准环境(SE)组, 每组 20 只。另选 20 只 2 日龄 SD 大鼠, 仅分离左侧颈总动脉, 不予结扎和缺氧, 作为对照组(Sham)。EE 组于术后第 3 天行触摸和丰富环境干预, 总干预时间为 30d。标准环境组和对照组均饲养于标准环境中, 不行早期干预。干预结束后行学习记忆能力检测, 同时分别于生后第 7、35 天取各组大鼠海马脑组织免疫细胞化学检测 NR1 亚单位表达。结果 生后 5 周龄时, EE 组学习记忆能力较 SE 组及 IE 组明显改善[逃避潜伏期(ELP): 4.75 ± 2.85 与 12.45 ± 3.23 、 8.42 ± 2.23 比较, 空间探索能力: 61.36 ± 8.12 与 50.24 ± 8.29 、 40.12 ± 7.99 比较, $P < 0.05$]; 且丰富环境组海马 CA1 区 NR1 阳性反应物着色最强, 与标准环境组、贫瘠环境组及对照组比较差异有统计学意义(43.2 ± 6.6 与 59.5 ± 8.1 、 88.5 ± 15.5 、 62.3 ± 9.5 比较, $P < 0.01$)。结论 早期干预可增强未成熟大鼠脑损伤的学习记忆能力, NMDA 受体 NR1 亚单位表达增多可能是其机制之一。

关键词: 未成熟大鼠; 脑室周围白质软化; 早期干预; 丰富环境; N-甲基-D-门冬氨酸受体; NR1 亚单位蛋白

中图分类号: R365.741

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2009)22-2784-03

Influence of early intervention on learning memory ability and expression of NMDA receptor

NR1 subunit protein of premature rats with brain damage

LIAO Wei, ZHAO Cong-min[△], WEN En-yi, et al.

(Department of Pediatrics, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To investigate the influence of early intervention on learning memory ability and expression of NR1 in premature rats with brain damage. **Methods** Two days old postnatal of periventricular leucomalacia (PVL) SD rats models were established by the method of SA Back. Then they were used and randomly divided into enriched environment (EE), impoverished environment (IE) and standard environment (SE) groups ($n=20$). The sham-operation (sham) rats were served as control group ($n=20$). The neonatal handling and enriched environment intervention were administrated to the EE groups. On 35d, the learning and memory function were evaluated. On 7, 35d, the expression of NR1 in the hippocampus was measured by the method of immunohistochemistry. **Results** The learning and memory ability (escaped latent period: 4.75 ± 2.85 vs 12.45 ± 3.23 ; 8.42 ± 2.23 ; space learning and memory test: 61.36 ± 8.12 vs 50.24 ± 8.29 , 40.12 ± 7.99) of EE group were improved compared with SE, IE group ($P < 0.05$). And those abilities of non-intervention group reduced and were much lower than those of sham group. Immunohistochemistry analysis showed that expression of NR1 on 35d in the hippocampus of EE group significantly increased compared with that of SE, IE and sham group (43.2 ± 6.6 vs 59.5 ± 8.1 , 88.5 ± 15.5 , 62.3 ± 9.5 , $P < 0.01$). **Conclusion** Early intervention can improve learning memory ability in premature rats with brain damage. The enriched environment stimulation could increase the expression of NR1, and it may be mechanism of the recovery of PVL in the premature rats.

Key words: premature rat; periventricular leukomalacia; early intervention; enriched environment; N-methyl-D-aspartate receptors; NR1 subunit protein

随着围生医学技术的提高, 早产儿存活率明显提高, 但随之伴发神经系统后遗症明显增多。未成熟脑损伤的主要病理变化是脑室周围白质软化(periventricular leucomalacia, PVL), 直接后果可出现感觉运动、记忆功能障碍。研究表明, 大脑海马 N-甲基-D-门冬氨酸(N-Methyl-D-Aspartate receptors, NMDA)受体的表达与学习记忆有关^[1], 而学习记忆能力可反映脑白质的功能。已证实早期丰富环境(enriched environment, EE)可改善足月大鼠脑损伤后感觉、认知功能障

碍^[2]。未成熟脑的可塑性更强, 因此本研究观察不同环境刺激对未成熟大鼠脑损伤后学习记忆的影响及 NMDA 受体 NR1 亚单位表达情况, 旨在为临床早期应用环境刺激干预早产儿脑损伤提供理论依据。

1 材料与方

1.1 模型制备及动物分组 参照 Back 等^[3]及石晶等^[4]方法, 实验对象选取 2 日龄 SD 大鼠 80 只(由第三军医大学实验动物中心提供), 雌雄不限, 体质量 7.1~9.5g, 将大鼠乙醚吸入

* 基金项目: 重庆市自然科学基金资助项目(CSTC, 2007BB5057)。△ 通讯作者, 电话(023)68755602; E-mail: zhao_54@163.com。

麻醉后,取颈部正中切口,分离结扎右颈总动脉,术后 2h 后置自制缺氧箱,以氮氧混合气(氧浓度为 6%)0.5~1L/min 持续灌注 2h,回笼均由母鼠带养。存活至术后第 2 天大鼠共 65 只,选取 60 只随机分为 EE 组、贫瘠环境(impooverished environment,IE)组、标准环境(standard environment,SE)组,每组 20 只。另选 20 只 2 日龄新生 SD 大鼠,仅分离左侧颈总动脉,不予结扎和缺氧,作为对照组(sham operation,Sham)。

1.2 干预方法 EE 组:(1)早期多感官刺激。术后第 3 天用软毛刷将幼鼠从头到尾柔和刷动,持续 15min,每日 1 次,并同时行声音、气味、冷暖及软硬物体触觉刺激等感官刺激,干预 9d。(2)EE 刺激。早期多感官刺激结束后(即幼鼠生后 2 周,约幼鼠开眼时),干预组行 EE 刺激。EE 参照文献[5]:设置 70cm×60cm×50cm 的透明有机玻璃大笼,每个笼内 5 只幼鼠和 1 只母鼠,笼内放置不同颜色、形状的物体,如柠檬、树叶、刨花、木板、铁皮、斜坡、秋千、跷跷板、管道、转笼和玩具等,并播放轻音乐,以明暗红色灯光照射,每日持续约 1h,以鼠由活泼运动到安静为止;每 3 日改变环境 1 次,共干预 21d。SE 组和对照组分别饲养于 25cm×15cm×10cm 无特殊刺激的 SE 中。3 组均提供昼夜光变化,自由进食进水,定期换笼。IE 组每个笼内 1 只幼鼠和 1 只母鼠,均饲养于 28cm×18cm×15cm 的不透明标准笼内,笼内不设任何物体,也不予上述任何刺激。各组均至 35d 时行行为学检测。

1.3 学习记忆能力的影响 两组均于日龄 5 周进行 Morris 水迷宫测试,检测学习记忆能力。(1)定位航行实验:前 5d 为定位航行实验,每天上、下午两段进行,每段训练 4 次,每次 60s,两次训练间隔 30s,共训练 5d。将大鼠放入水中,记录大鼠的逃避潜伏期(escape latency period,ELP,即从大鼠入水到找到水下隐蔽平台并立于其上所需时间),若大鼠在 60s 内未找到平台,则以 60s 计。以最后 1d 4 次所用时间的总平均值作为观察指标。(2)空间探索实验:第 6 天撤除平台,进行空间探索实验,任选一入水点,用摄像机拍摄大鼠游泳轨迹,计算其在原平台象限游泳距离占游泳总距离的百分比。

1.4 不同时点大鼠脑海马 CA1 区 NR1 亚单位的表达 各组取 2 个时相点,即生后 7、35d,每个时相点取 5 只大鼠观察 NR1 亚单位的表达。按照 SP 免疫组化试剂盒说明书操作进行,最后 DAB 显色 1~2min,镜下观察细胞出现棕黄色为 NR1 阳性细胞。一抗为山羊抗大鼠 NR1 多克隆抗体,用磷酸盐缓冲液代替一抗作为阴性对照。

1.5 图像分析 免疫组化染色后,以细胞显示棕黄色为 NR1 阳性反应物。NR1 的标记强度用平均灰度值表示,采用德国 Leica-Qwin 彩色病理图文分析系统进行处理。每张切片在海马 CA1 区选取 2 个位置相应、不重复的视野,测量各视野的平均灰度值,取 2 个视野平均灰度值的均值作为该片的灰度值。每例标本选取 2 张相邻切片,取平均值作为此例标本的免疫组化结果。灰度值越低,蛋白表达越强;反之蛋白表达越弱。

1.6 统计学方法 所有计量数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 10.0 软件进行方差分析和 *q* 检验。

2 结 果

2.1 学习记忆能力检测结果 IE 组 ELP 及空间探索能力明显较对照组减弱 ($P < 0.05$);EE 组 ELP 及空间探索能力明显

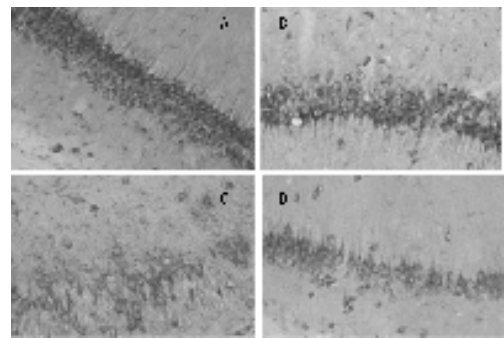
较 SE 组及 IE 组明显改善 ($P < 0.01$),见表 1。

2.2 海马 CA1 区 NR1 蛋白免疫组化结果 各组均于生后 7d 可见神经元 NR1 蛋白表达阳性,各组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。于生后 35d,见 EE 组海马 CA1 区 NR1 阳性反应物着色最强、最多,平均灰度值最低,与 SE 组、IE 组及对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。IE 组 CA1 区 NR1 阳性反应物着色最弱,平均灰度值最强,与 SE 组及对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$),见图 1、表 2。

表 1 各组大鼠学习记忆能力的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	学习记忆能力	
		ELP(s)	空间探索能力(%)
Sham 组	20	4.61±2.12	65.23±6.92
EE 组	20	4.75±2.85 ^a	61.36±8.12 ^a
IE 组	20	12.45±3.23 ^b	40.12±7.99 ^b
SE 组	20	8.42±2.23	50.24±8.29

^a:与 IE 组、SE 组比较, $P < 0.01$; ^b:与 Sham 组比较, $P < 0.05$ 。



A:SE 组;B:EE 组;C:IE 组;D:Sham 组。

图 1 免疫细胞化学检测生后 35d 4 组大鼠脑海马区 NR1 免疫组化染色 (SP×400)

表 2 不同时间点各组大鼠海马 CA1 区 NR1 阳性细胞平均灰度值 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	生后 7d	生后 35d
Sham 组	20	23.5±5.6	62.3±9.5
EE 组	20	18.8±6.5 ^a	43.2±6.6 ^b
IE 组	20	21.4±4.8	88.5±15.5 ^c
SE 组	20	30.4±7.3	59.5±8.1

^a:与 Sham 组、IE 组及 SE 组比较, $P > 0.05$; ^b:与 Sham 组、IE 组及 SE 组比较, $P < 0.01$; ^c:与 SE 组及 Sham 组比较, $P < 0.01$ 。

3 讨 论

国外研究证实,早期 EE 干预可促进因宫内窘迫造成大鼠脑海马神经细胞损伤的再生,并且是改善其认知功能障碍最重要、有效的手段^[6-7]。未成熟脑由于突触数目、神经元数目和神经网络通路都处于不断修复中,受遗传及环境因素作用,能通过凋亡修剪等机制,建立与环境相适应的突触连接和相应的神经元回路,因此,未成熟脑具有更高的可塑性。

Back 等^[3]及石晶等^[4]建立的脑室周围白质软化损伤模型,主要表现为未成熟少突胶质细胞受损为主,神经元损害少

见,与临床上早产儿 PVL 的发病年龄及发病机制相对应,作为研究未成熟脑损伤的动物模型已得到充分肯定。作者参照 Back 及石晶等^[3-4]的经验建立 PVL 模型,设计 EE、SE 及 IE 进行早期干预及对比观察,但考虑到 2 周内幼鼠尚未睁眼,活动少,睡眠多,所以,本实验建模后第 3 天只进行声音、气味、明暗灯光、冷暖及软硬物体等刺激,2 周后力求全面输入视觉、听觉、触觉、嗅觉、本体觉和温度觉等多感官刺激,并给予活动和相互交往的机会。结果显示,早期用 EE 干预的大鼠学习记忆功能方面较 IE 组及 SE 组有显著提高。而学习记忆能力又反映了脑白质的功能,说明早期丰富环境干预可促进未成熟大鼠脑白质损害脑功能的恢复,与对成年脑损伤^[8]和脑退行性疾病^[9]动物模型的结果相似。

NMDA 受体是离子型谷氨酸受体亚型,它被认为是突触可塑性及神经元长时程增强效应(long-term potentiation, LTP)的主要调控者,目前多数研究认为 NMDA 受体依赖的突触可塑性与海马形成的学习记忆等重要脑功能的完成密切相关。NMDA 受体至少存在 7 个亚单位,其中 NR1 亚单位是 NMDA 受体通道的必需组分,在 LTP 的形成过程中起重要作用,它的表达量代表了 NMDA 受体的表达水平。因此 NR1 的表达成了中枢神经系统的重要功能(学习和记忆的基础)^[10]。本实验结果显示,EE 组 NR1 表达明显高于 SE 组及 IE 组。其原因可能为:早期 EE 刺激可改善未成熟脑海马内的突触传递,增强突触的可塑性,诱导 LTP 增强,而 NR1 亚单位在 LTP 形成过程中起重要作用,因此 NR1 蛋白表达增多,最终使其学习记忆能力得到改善。

综上所述,早期干预可增强未成熟大鼠脑损伤的学习记忆能力,使未成熟大鼠脑损伤的脑功能恢复,NMDA 受体 NR1 表达增多可能是其学习记忆能力增强机制之一,这为临床早期应用 EE 干预早产儿脑损伤,减少神经伤残后遗症提供了理论依据。但国外研究显示,EE 虽可使成年大鼠脑损伤后运动能力及迷宫试验成绩显著提高,但 60d 后海马 CA1 神经元数量显著减少,推测原因可能为过长或过强给予了 EE 干预所致^[11]。因此对于未成熟脑,早期 EE 干预的强度、时段多长才能达到最佳效果,还需继续深入研究。

参考文献:

- [1] Taverna FA, Georgiou J, McDonald RJ, et al. Defective place cell activity in nociceptin receptor knockout mice with elevated NMDA receptor-dependent long-term potentiation[J]. *J Physiol*, 2005, 565(Pt 2): 579.
- [2] Will B, Galani R, Kelche C, et al. Recovery from brain injury in animals: Relative efficacy of environmental enrichment, physical exercise or formal training (1990-2002) [J]. *Prog Neurobiol*, 2004, 72(3): 167.
- [3] Back SA, Han BH, Luo NL, et al. Selective vulnerability of late oligodendrocyte progenitors to hypoxia-ischemia [J]. *J Neurosci*, 2002, 22(2): 455.
- [4] 石晶,姚裕家,李晋辉,等. 未成熟大鼠实验性脑室周围白质软化动物模型的建立及评价[J]. *实用儿科临床杂志*, 2006, 21(19): 1330.
- [5] Rema V, Armstrong JM, Jenkinson N, et al. Short exposure to an enriched environment accelerates plasticity in the barrel cortex of adult rats [J]. *Neuroscience*, 2006, 140(2): 659.
- [6] Lemaire V, Lamarque S, Le MM, et al. postnatal stimulation of the pups counteracts prenatal stress-induced deficits in hippocampal neurogenesis [J]. *Biol Psychiatry*, 2006, 59(9): 786.
- [7] Yang J, Hou C, Ma N, et al. Enriched environment treatment restores impaired hippocampal synaptic plasticity and cognitive deficits induced by prenatal chronic stress [J]. *Neurobiol Learning Mem*, 2007, 87(5): 257.
- [8] Will B, Galani R, Kelche C, et al. Recovery from brain injury in animals: Relative efficacy of environmental enrichment, physical exercise or formal training (1990-2002) [J]. *Prog Neurobiol*, 2004, 72(5): 167.
- [9] Da'mico ASL, Paglia N. Enriched environment, nitric oxide production and synaptic plasticity prevent the aging-dependent impairment of spatial cognition [J]. *Mol Aspects Med*, 2004, 25(1-2): 91.
- [10] Lukoyanov NV, Paula BM. A single high dose of dizocilpine produces long-lasting impairment of the water maze performance in adult rats [J]. *Neurosci Lett*, 2000, 285(2): 139.
- [11] Farrell R, Evans S, Corbett D. Environmental enrichment enhances recovery of function but exacerbates ischemic cell death [J]. *Neuroscience*, 2001, 107(4): 585.

(收稿日期:2009-06-05)

(上接第 2783 页)

water labyrinth test performance in rat [J]. *Anatomischer Anzeiger*, 2003, 185: 277.

[7] 曹智丽,李友,贺彬琪,等. 甲醛对植入后小鼠胚胎发育毒性的时间-效应关系 [J]. *中国新药杂志*, 2007, 16(8): 607.

[8] 任振华,李光武. 甲苯神经毒性对小鼠神经行为功能的影响 [J]. *环境与职业医学*, 2006, 23(3): 264.

[9] Filley CM, Halliday W, Kleinschmidt-DeMasters BK. The effects of toluene on the central nervous system [J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2004, 63(1): 1.

(收稿日期:2009-06-05)