

· 论 著 ·

脑发育不同阶段丰富环境刺激对大鼠海马 MAP-2 表达的影响

蒲昭霞¹, 赵聪敏^{2△}, 张雨平²

(1. 成都军区机关医院儿科 610011; 2. 第三军医大学新桥医院儿科, 重庆 400037)

摘要:目的 探讨脑发育不同阶段丰富环境(EE)刺激对缺氧缺血性脑损伤(HIBD)新生鼠神经可塑性的影响及机制。方法 7日龄 SD大鼠通过结扎左侧颈总动脉,吸入8%氧氮混合气,制成HIBD模型,分为早期干预组、晚期干预组、非干预组,另设假手术组。早期干预组于脑发育关键期内,即建模后第2天开始进行EE干预。晚期干预组于脑发育关键期后,即建模后第23天(日龄30d)开始进行EE干预。两组干预条件一致,总干预时间为20d。各组大鼠饲养至日龄100d时用免疫组织化学法检测患侧海马微管相关蛋白-2(MAP-2)的表达水平。**结果** 早期干预组患侧海马MAP-2的表达明显高于晚期干预组和非干预组($P < 0.01$),早期干预组与假手术组差异无统计学意义($P > 0.05$),晚期干预组MAP-2的表达高于非干预组($P < 0.05$)。**结论** EE干预可增强神经可塑性。MAP-2在海马表达的变化,可能参与了脑发育不同阶段EE对HIBD神经可塑性的影响机制。

关键词: 缺氧缺血性脑损伤; 丰富环境; 发育脑; 关键期; 神经可塑性; 微管相关蛋白

中图分类号: R365.741

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2009)22-2790-03

Influence of environmental enrichment at different stages of development on expression of MAP-2 in hippocampus of hypoxia-ischemic brain damaged rats

PU Zhao-xia¹, ZHAO Cong-min^{2△}, ZHANG Yu-ping²

(1. Department of Pediatrics, Organization Hospital of Chengdu Military Region, Chengdu, Sichuan 610011, China;

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

Abstract: Objective To explore the effects of environmental stimulation on neuronal plasticity and possible mechanisms at different stages of development of hypoxia-ischemic brain damaged (HIBD) postnatal rats. **Methods** The Sprague Dawley (SD) rats' models of HIBD were established by the method of Rice. Then the rats with HIBD were divided randomly into 3 groups: early intervention group, late intervention group and non-intervention group. The sham-operation rats served as sham-operation group. Environmental enrichment intervention was administrated to the early intervention group rats for 20d since 2d after HIBD. The same intervention to the late intervention group rats since 23d after HIBD. On the age of 100d, the immunohistochemical stain was used to detect the gray values of MAP-2 in hippocampus respectively. **Results** Immunohistochemical analysis showed that the expression of MAP-2 in left-sided hippocampus of early intervention group significantly increased as compared with that of late intervention group ($P < 0.01$). There was no significant difference between early intervention group and sham group ($P > 0.05$), and the expression of MAP-2 of late intervention group were stronger than that of non-intervention group ($P < 0.05$). **Conclusion** The neuronal plasticity of early intervention group is promoted more than that of late intervention group. The changes of MAP-2 in their hippocampuses are possibly associated with the influence of environment on neuronal plasticity at different developmental stage of HIBD.

Key words: hypoxia-ischemic brain damage; environmental enrichment; developmental brain; critical period; neuronal plasticity; Microtubule-associated protein-2

缺氧缺血性脑损伤(hypoxic-ischemic brain damage, HIBD)是围生期窒息的严重并发症,死亡率和致残率较高,目前仍是导致脑瘫、智能落后和癫痫等的常见原因^[1]。大量研究表明,丰富环境(enriched environment, EE)刺激可通过影响神经突触可塑性对发育脑进行塑型^[2],但人们在干预的时机选择上尚存在很大争议,以至于错过了脑损伤患儿治疗的最佳时机,延误了病情。尽管临床研究已证实,脑发育关键期内的早期干预对改善预后更有效^[3],但由于缺乏基础理论依据的支持,影响了临床的进一步推广。微管相关蛋白-2(microtubule-associated protein-2, MAP-2)是神经元细胞骨架的重要成分之一,参与突起生长、胞浆蛋白运输、神经元塑形等功能,是脑缺氧缺血后神经细胞受损及再生指标之一^[4]。大鼠妊娠18d至生后25d是大脑发育的关键期,因此本实验通过对HIBD新生鼠脑发育关键期前后给予EE干预,检测其成年后海马MAP-2表达的变化,旨在为早期运用EE干预治疗发育期脑

损伤提供基础理论支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 7日龄SD雄性大鼠(第三军医大学大坪医院实验动物中心提供),雌雄不拘,体质量12~16g,共计38只。

1.1.2 主要仪器 德国Leica-Qwin彩色病理图文分析系统。

1.2 方法

1.2.1 HIBD动物模型制备与分组 随机选取30只新生鼠,参照Rice等^[5]方法建立HIBD动物模型,出现自发左旋或夹尾左旋者为建模成功的标志,纳入实验,共24只,分为早期干预组、晚期干预组、非干预组,每组8只。另设假手术对照组8只,仅切开大鼠颈部皮肤并暴露左侧颈总动脉,不结扎,缝合皮肤后不入缺氧仓。各组均由母鼠带养。

1.2.2 干预方法 EE参照Puurunen^[6]等和Sale等^[7]文献设计。早期干预组于脑发育关键期内,即建模后24h开始给予

△ 通讯作者,电话:(023)68774602;E-mail:zhao_54@163.com。

EE 干预,每日将仔鼠与母鼠分离,放入 EE 笼内,每日 4 次(上、下午各 2 次),每次持续 30min。EE 为 70cm×60cm×50cm 的半透明有机玻璃大笼,笼内放置不同颜色、形状及气味的物体,包括各种质感的砂纸、毛刷,冰冷的金属和有刺激性气味的柠檬、薄荷棉球,还有转盘、管道、斜坡、秋千、跷跷板、树叶、刨花、小球等“玩具”,同时配以明暗红色灯光刺激及舒缓的轻音乐。干预过程中每周将环境改变 2 次,以造成新异的刺激,总干预时间为 20d。晚期干预组于脑发育关键期后,即建模后第 23 天(日龄 30d)开始给予 EE 干预,其余条件与早期干预组相同。非干预组和假手术组分别饲养于 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。各组大鼠均在 25d 时断奶并与母鼠分离。4 组大鼠均提供 12h 光/12h 暗昼夜光变化,自由进食、进水,定期换笼。

1.2.3 MAP-2 免疫组化染色及图像分析 各组大鼠饲养至 100d(3 月龄)时用 1%戊巴比妥钠(40mg/kg)腹腔注射麻醉后,用 4%多聚甲醛磷酸缓冲液行心脏灌注固定,取大鼠于同样固定液中外固定,常规脱水,石蜡包埋,丘脑水平连续冠状切片厚约 3 μ m,用于海马突触素免疫组化染色。小鼠抗大鼠 MAP-2 抗体按 1:100 稀释,其余步骤按 SP 试剂盒(北京中杉生物技术公司)说明书操作。以磷酸盐缓冲液代替一抗做阴性对照。每例动物取切片 3 张,每张切片断面相似,应用真彩色图像分析系统(德国,LeicaQwin),对左侧海马 CA1 区 MAP-2 免疫阳性反应产物进行灰度值测定,灰度值越高阳性表达越低。每张切片所测面积大于 50%海马 CA1 区,应用 Qwin 软件测量灰度值,同时测定该切片胼胝体的灰度值作为背景,取测定值减去背景测定值的绝对值即实际灰度值,以避免非特异性染色所造成的误差。取 3 次平均值作为该例样本测定值。再以该组 8 例样本的均值作为该组的实验结果,所有灰度值测量均在相同光学条件下完成。

1.3 统计学方法 所获实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPASS11.0 统计软件对数据进行两两比较和单因素方差分析(ANOVA), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 MAP-2 免疫反应阳性产物的分布 光镜显微镜下可见假手术组 MAP-2 棕黄色免疫反应产物主要表达在神经元树突及胞体,为单一均匀光滑的 MAP-2 免疫染色树突,呈条索样、流星样放射状排列,双侧对称。海马各区锥体神经元和齿状回颗粒细胞层神经元排列比较整齐,可清晰分辨出胞体比树突染色弱,胞核居中不着色,树突阳性染色呈树枝状交叉分布于分子层。胶质细胞、血管和白质不被染色。早期干预组、晚期干预组和非干预组 MAP-2 免疫阳性产物分布与假手术组一致。与假手术组比较,早期干预组阳性细胞数较少,染色较浅,但树突尚光滑连续无断裂;而晚期干预组和非干预组树突呈串珠样排列,出现神经元脱失苍白区及树突断裂消失,在神经元脱失最明显区域可见数个散在的强 MAP-2 表达的锥体神经元的胞体及断裂,但浓染的突起存在,其中晚期干预组免疫阳性染色较非干预组深,见图 1~4。

2.2 MAP-2 免疫阳性产物图像分析结果 对海马 CA1 区图像分析结果显示,早期干预组 MAP-2 平均灰度值低于晚期干预组($P < 0.01$),晚期干预组低于非干预组($P < 0.05$),组间两两比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);假手术组低于早期干预组,但差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 1。

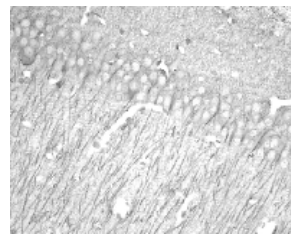


图 1 假手术组海马 MAP-2 免疫组化染色 (SP×400)

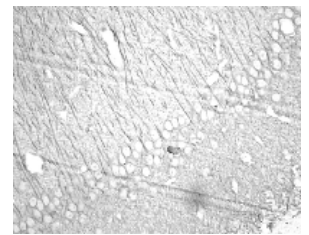


图 2 早期干预组海马 MAP-2 免疫组化染色 (SP×400)

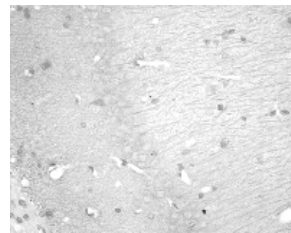


图 3 晚期干预组海马 MAP-2 免疫组化染色 (SP×400)

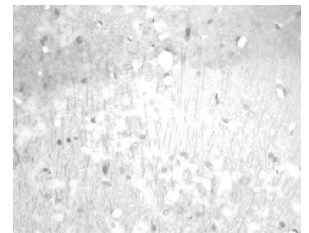


图 4 非干预组海马 MAP-2 免疫组化染色 (SP×400)

表 1 各组大鼠海马 CA1 区 MAP-2 的表达 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	MAP-2 灰度值
假手术组	8	182.197 5±8.675
早期干预组	8	188.944 0±5.738*▲
晚期干预组	8	207.241 0±3.337▼
非干预组	8	212.450 0±3.693

*:与晚期干预组和非干预组比较, $P < 0.01$;▼:与非干预组比较, $P < 0.05$;▲:与假手术组比较, $P > 0.05$ 。

3 讨论

微管是细胞骨架的重要成分之一,在维持细胞增长、细胞分裂及细胞骨架稳定等方面具有重要作用。MAP-2 是微管组装的启动子,属于结构性微管相关蛋白家族,能与微管可逆性的结合,相对分子质量为 280~300kd,由一个微管结合结构域(短臂)和一个投射结构域(长臂)构成,在 MAP-2 的短臂端含有 3~4 个氨基酸重复序列,每个重复序列由 18 个氨基酸构成,他们构成了与微管结合的位点。MAP-2 长臂端含有很多磷酸化位点,当它被 CAMP 依赖性蛋白激酶、MAP-2 激酶、钙/钙调素酶磷酸化后可引起 MAP-2 从微管上脱落下来,使微管发生解聚^[8]。MAP-2 是脑内最丰富的蛋白质之一,主要存在于中枢神经系统神经元胞体、树突、树突棘和突触后致密区,与突触后膜上一些信号蛋白和膜受体相连,是许多神经信号传导通路的底物,调节神经元突触可塑性以及细胞骨架动力学、对树突的延伸和分支起重要作用^[9]。近年来 MAP-2 免疫活性下降在脑损伤中的作用日益受到重视,被认为是脑缺氧缺血后神经细胞受损及再生指标之一^[10]。

动物实验表明脑发育时伴有 MAP-2 磷酸化状态的调节^[11],体外海马神经元培养也观察到,在树突生长期 MAP-2 磷酸化显著升高。检测不同发育时期大鼠海马细胞中 MAP-2 的表达水平,发现发育早期磷酸化 MAP-2 是非磷酸化 MAP-2 的 4 倍,发育晚期正好相反。反义寡核苷酸阻断 MAP-2 的合成,可使树突的生长停止,突触的数量和密度明显减少。这表明 MAP-2 在神经元形态学和可塑性方面起作用,

MAP-2 的表达对于树突的分化是必需的,其磷酸化状态对神经元突起生长是非常重要的。本实验对 MAP-2 免疫组化定量结果表明,非干预组患侧海马 CA1 区表达较假手术组明显减少,提示缺血缺氧后神经元受到损伤,MAP-2 磷酸化障碍,微管的不稳定性增强,微管聚合作用下降,这样必然会导致细胞骨架完整性遭到破坏,树突崩溃,发育停止,突触连接中断,突触结构和功能受到影响。给予 EE 干预后早期干预组和晚期干预组海马 CA1 区 MAP-2 的表达均增高,提示 EE 对大鼠海马 CA1 区有保护作用,可以使树突生长和受损细胞结构恢复,在一定程度上能阻止 HIBD 的病理过程。实验发现早期干预组 MAP-2 的表达高于晚期干预组,说明早期应用 EE 干预对阻止神经元损伤,促进已受损细胞的修复作用优于晚期应用。MAP-2 在海马表达的变化可能参与了脑发育不同阶段 EE 对 HIBD 神经可塑性的影响机制,而这种表达变化的原因尚不清楚,可能与不同发育阶段脑中 MAP-2 磷酸化状态不一致有关。

参考文献:

- [1] Robert C, Vannucci B, Jeffrey M. Interventions for perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy[J]. *Pediatrics*, 1997, 100(6):1004.
 - [2] Brenes Saenz JC, Villagra OR, Fornaguera Trias J. Factor analysis of Forced Swimming test, Sucrose Preference test and Open Field test on enriched, social and isolated reared rats[J]. *Behav Brain Res*, 2006, 169(1):57.
 - [3] 郭亚乐,袁宝莉,李瑞林,等. 丰富环境干预对早产儿预后的影响 [J]. *实用儿科临床杂志*, 2003, 18:378.
 - [4] Wish G. High-Mr microtubule-associated proteins: properties and functions [J]. *Biochemistry*, 1989, 259(1):1.
 - [5] Rice JE, Vannucci RC, Brierley JB. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat [J]. *Ann Neurol*, 1981, 9(2):131.
 - [6] Puurunen K, Sivenius J. Influence of enriched environment on spatial learning following cerebral insult[J]. *Rev Neurosci*, 2002, 13(3):347.
 - [7] Sale A, Putignano E, Cancedda L, et al. Enriched environment and acceleration of visual system development [J]. *Neuropharmacology*, 2004, 47(5):649.
 - [8] Pilar Zamora-Leon S, Lee G, Peter Davies. Binding of Fyn to MAP-2c through an SH3 Binding Domain [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(43):39950.
 - [9] Cristofanilli M, Thanas S, Brosius J, et al. Neuronal MAP2 Mrna: species-dependent differential dendritic targeting competence [J]. *J Mol Biol*, 2004, 341(4):927.
 - [10] Li Y, Jiang N, Powers C. Neurodamage and plasticity identified by MAP2, GAP43, Cyclin D1 immunoreactivity after focal cerebral ischemia in rats [J]. *Stroke*, 1998, 29(9):1972.
 - [11] Brazel CY, Romanko MJ, Rothstein RP, et al. Roles of the mammalian subventricular zone in brain development [J]. *Prog Neurobiol*, 2003, 69(1):49.
- (收稿日期:2009-06-05)
-
- (上接第 2789 页)
- expansion, and sensorimotor deficits in hypoxic-ischemic neonatal rats [J]. *Korean Med Sci*, 2008(23):484.
 - [2] Mizuno K, Hida H, Masuda T, et al. Pretreatment with low doses of erythropoietin ameliorates brain damage in periventricular leukomalacia by targeting late oligodendrocyte progenitors: a rat model [J]. *Neonatology*, 2008, 94(4):255.
 - [3] Chen ZY, Asavaritikrai P, Prchal JT, et al. Endogenous erythropoietin signaling is required for normal neural progenitor cell proliferation [J]. *Biol Chem*, 2007, 282(35):25875.
 - [4] Spandou E, Soubasi V, Papoutsopoulou S. Erythropoietin prevents hypoxia/ischemia induced DNA fragmentation in an experimental model of perinatal asphyxia [J]. *Neurosci Lett*, 2004, 366(1):24.
 - [5] Kumral A, Genc S, Ozer E, et al. Erythropoietin downregulate bax and DP5 proapoptotic gene expression in neonatal hypoxic-ischemic brain injury [J]. *Biol Neonate*, 2006, 89(3):205.
 - [6] Gunnarson E, Song Y, Kowalewski JM, et al. Erythropoietin modulation of astrocyte water permeability as a component of neuroprotection [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(5):1602.
 - [7] Agnello D, Bigini P, Villa P, et al. Erythropoietin exerts an anti-inflammatory effect on the CNS in a model of experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. *Brain Res*, 2002, 952(1):128.
 - [8] Lu XM, Xie WY, Liu PC, et al. Mechanism of the cardioprotection of rhEPO pretreatment on suppressing the inflammatory response in ischemia-reperfusion [J]. *Life Sci*, 2005, 9(1):53.
 - [9] Bang OY, Lee JS, Lee PH, et al. Autologous mesenchymal stem cell transplantation in stroke patients [J]. *Ann Neurol*, 2005, 57(6):874.
 - [10] Liu Y, Zhang X, Dai Y, et al. Effects of bone marrow mesenchymal stem cells on learning and memory functional recovery in neonatal rats with hypoxic-ischemic brain damage [J]. *中华儿科杂志*, 2008, 46(9):648.
 - [11] 吴永超,郑启新,胡东,等. 骨髓间充质干细胞神经营养因子的表达及对脊髓神经元的保护作用 [J]. *中国康复医学杂志*, 2006, 21(10):867.
 - [12] Mendonca ML, Freitas GR, Silva SA, et al. Safety of intra-arterial autologous bone marrow mononuclear cell transplantation for acute ischemic stroke [J]. *Arq Bras Cardiol*, 2006, 86(1):52.
- (收稿日期:2009-06-05)