

早期丰富环境刺激对脑瘫大鼠脑发育的影响*

李晓捷¹ 吕智海¹ 孙忠人² 高 晶¹

摘要 目的: 研究丰富环境刺激对脑瘫大鼠脑发育的影响。**方法:** 给予 LPS 组 28 只孕 16、17 日龄大鼠连续两天腹腔注射脂多糖 350 μ g/kg, 制备脑瘫动物模型, 对照组 8 只注射等量生理盐水。15 日龄两组仔鼠利用神经行为学检测鉴定脑瘫动物模型, 并检测脑源性神经生长因子(BDNF)表达。将脑瘫鼠随机分为干预组、非干预组。对干预组进行丰富环境刺激 27 天, 非干预组和对照组常规饲养。**结果:** 干预组与非干预组比较悬吊试验、斜坡试验、旷场试验、拒俘试验、学习能力、记忆能力有显著性差异($P<0.05$ 与 $P<0.01$); 干预组与正常对照组比较斜坡试验、姿势、肌张力、学习能力有显著性差异($P<0.05$ 与 $P<0.01$)。15 日龄脑瘫组与对照组比较, BDNF 表达无显著性差异($P>0.05$); 42 日龄干预组与非干预组、对照组比较均有显著性差异($P<0.01$)。**结论:** 丰富环境刺激可使脑瘫大鼠肌力、兴奋性、环境适应能力、记忆能力明显增强, 达到正常化水平; 平衡能力、协调能力、学习能力(或得分)明显增强, 但未达到正常化水平; 干预组 BDNF 表达较非干预组、正常对照明显增加, 但未能改善姿势、肌张力、不自主运动能力。

关键词 脑性瘫痪; 丰富环境刺激; 脑发育; 脑源性神经生长因子

中图分类号: R742.3, R722, R49 文献标识码: A 文章编号: 1001-1242(2006)-12-1061-04

Effects of enriched environmental stimulation on brain development in cerebral palsy rats/LI Xiaojie, LU Zhihai, SUN Zhongren, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2006, 21(12):1061-1064

Abstract Objective: To study the effect of enriched environmental stimulation on brain development in cerebral palsy rats. **Method:** The lipopolysaccharides (LPS) group was consecutively injected intraperitoneally with LPS(350 μ g/kg) both in the gestation 16d and 17d ($n=28$) to develop the model of cerebral palsy. The control group ($n=8$) was injected with the same quantity of saline. The neonat rats of 15 days old in the two groups were tested with neurobehavioral method to identify cerebral palsy, and detected the expression of brain derived growth factor (BDNF). The rats with cerebral palsy were randomly divided into intervention group and non-intervention group. The intervention group was stimulated by enriched environment for 27 days, while the non-intervention group and normal group were fed in the routine way. **Result:** There were a significant differences in hanging test, inclined plane test, open field test, resistant to capture test (or score), learning and memory ability between intervention group and non-intervention group ($P<0.05$ or $P<0.01$), and significant differences were found in inclined plane test, posture, muscle tension and learning ability between intervention group and normal group ($P<0.05$ or $P<0.01$); There was no difference in BDNF expression of 15 days young rats between the cerebral palsy rats and normal rats ($P>0.05$); There was obvious difference of BDNF expression in the intervention group of 42 days rats, compared with the non-intervention group and normal group of 42 days rats ($P<0.01$). **Conclusion:** Enriched environment stimulation can effectively improve muscle tension, excitability, adaptive capacity to environment, memory capacity in the cerebral palsy rats of intervention group, and make the abilities reach to normal level; Enriched environment stimulation can markedly ameliorate the ability of balance, coordination and learning in intervention group, but the above aspects can't reach the normal level; At the same time, enriched environment stimulation can obviously increase the BDNF expression in the rats of intervention group, compared with the non-intervention group and normal group, yet the stimulation, can't improve the posture, muscle tension and the ability of non-autokinetic movement.

Author's address College of Rehabilitation Medicine, Jiamusi University, Jiamusi, 154002

Key words cerebral palsy; enriched environment stimulation; brain development; brain derived growth factor

脑性瘫痪(cerebral palsy, CP)已成为儿童发育期最主要的致残性疾病^[1]。随产科和新生儿重症监护治疗技术的发展, 早产儿的存活率明显提高, 导致脑损伤及脑瘫的比例增加。孕期感染是导致上述问题的主要因素之一。因此, 探讨胚胎生物学因素, 以及早期防治 CP 的发生和病情发展已经成为当前研究

* 基金项目: 黑龙江省自然科学基金项目(D2004-50); 黑龙江省教育厅科学技术研究项目(10551305)

1 佳木斯大学康复医学院, 佳木斯大学儿童神经康复实验室, 佳木斯市德祥街 419 号, 154002

2 黑龙江中医药大学附属第二医院

作者简介: 李晓捷, 女, 教授, 主任医师

收稿日期: 2006-09-18

的重点。本研究旨在为宫内感染致早产脑瘫鼠的早期干预寻找可行性方法。

1 材料与方法

1.1 材料及研究对象

研究对象为成熟 Wistar 雌性大鼠 50 只, 雄性大鼠 25 只, 体重 190g—275g, 由佳木斯大学实验动物中心提供。脂多糖(Lipopolysaccharides, LPS, 血清型 055:B5, 美国 SIGMA 公司)。脑源性神经生长因子(brain derived growth factor, BDNF)免疫组化染色试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司)。MG-2 迷宫刺激器(张家港市生物医学仪器厂)。

1.2 方法

将研究对象常规饲养, 饮食自由, 明暗周期 12h/12h, 室温 $18^{\circ}\text{C}\pm 3^{\circ}\text{C}$ 。于下午 17 时以 2:1 合笼, 次日上午 8 时查阴道涂片, 查到精子记为妊娠第 0d, 孕鼠另笼饲养。随机选取孕鼠分为 LPS 组 28 只和对照组 8 只。LPS 组孕 16d、17d 大鼠连续两天腹腔注射 LPS, 剂量为每次 350 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 对照组大鼠腹腔注射等量生理盐水。观察两组大鼠的分娩时间, 孕 22d 前分娩的仔鼠为早产鼠, 孕 22d—23d 分娩的仔鼠为足月产鼠。随机选取 24h 早产组、足月产组、对照组仔鼠各 5 只, 做病理检测。对 15 日龄 3 组仔鼠分别进行神经行为学检测, 鉴定脑瘫动物模型。取 15 日龄脑瘫仔鼠 3 只、对照组 5 只检测脑海马部位 BDNF 的表达。将 15 日龄脑瘫大鼠随机分为干预组 8 只和非干预组 7 只, 对照组为 10 只。干预组进行早期触摸 7d, 丰富环境刺激 20d, 非干预组、对照组常规饲养。对 42 日龄 3 组大鼠进行神经行为学检测, 利用三等分迷宫试验仪检测大鼠学习记忆能力, 并检测 BDNF 表达。

1.3 病理学检测

取生后 24h 三组仔鼠各 5 只常规 HE 染色病理检测光镜下观察皮质、内囊、胼胝体等部位脑组织。

1.4 神经行为学检测及脑瘫鉴定

依据我实验室常规操作^[2], 其中倾斜板试验: I: 将大鼠放在倾斜 15° 的平板上, 每秒钟抬高 10° — 60° 停留超过 1min 为阴性。II: 将大鼠放在倾斜 75° 的平板上, 停留超过 1min 为阴性, 阳性为异常。

1.5 BDNF 检测

按说明书要求进行。400 倍光镜下观察阳性细胞数。

1.6 丰富环境刺激方法

早期触摸: 15 日龄干预组脑瘫仔鼠托至掌心, 用软毛刷从头到尾匀速有力刷动, 持续 20min, 每天

1 次, 共干预 7d。丰富环境刺激: 早期触摸结束后, 每日暴露于丰富环境中 2h, 将 $40\text{cm}\times 50\text{cm}\times 70\text{cm}$ 大笼内放置不同颜色及形状的物体, 包括管道、阶梯、摇铃、秋千、“玩具”等, 每周将环境改变 2 次, 以造成新异刺激。

1.7 学习记忆能力检测

利用三等分迷宫试验(50V—60V)检测大鼠的学习记忆能力。训练大鼠由暗臂(通电)跑向亮臂(断电)以逃避电击(即为正确)的能力。每次测试随机点亮一臂, 连续 10 次试验中 9 次正确即为学会, 达到学会标准所需训练的次数为学习能力的指标。24h 后检测大鼠逃避电击的记忆能力, 连续 10 次电击试验, 正确次数为记忆能力的指标。

1.8 统计学分析

采用 SPSS11.5 统计软件进行统计, 两组间比较采用 t 检验, 多组间均数比较采用 q 检验, 非正态分布和方差不齐时, 用秩和检验。

2 结果

2.1 孕鼠分娩及早产仔鼠一般情况

LPS 组 28 只孕鼠腹腔注射 LPS 后 2 只当天死亡, 1 只难产致死, 对照组 8 只孕鼠腹腔注射后活动、进食均正常, 无一例死亡。生产结果: LPS 组存活早产仔鼠 69 只; 足月产仔鼠 29 只; 对照组存活足月产仔鼠 22 只。

2.2 生后 24h 仔鼠脑组织病理学检测结果

LPS 足月产组及对照组脑皮质结构完整, 布局有序, 核淡, 核仁清楚。LPS 早产组大鼠皮质、胼胝体、内囊部位可见组织疏松, 胶质细胞聚集, 囊间少突胶质细胞减少。可见脑室内出血、脑皮质内血管扩张、脑皮质内毛细血管破裂出血。

2.3 15 日龄大鼠行为学检测结果

见表 1。倾斜板试验对照组 I: 2 只为阳性, II: 13 只为阳性; LPS 足月产组 I: 21 只为阳性, II: 22 只为阳性; LPS 早产组 I: 46 只为阳性, II: 62 只为阳性。

经上述神经行为学检测, LPS 早产组脑瘫鼠 18 只, LPS 足月产组、正常对照组无脑瘫鼠。

2.4 42 日龄大鼠行为学检测结果

见表 2。倾斜板试验对照组 I: 1 只为阳性, II: 1 只为阳性; 非干预组 I: 3 只为阳性, II: 5 只为阳性; 干预组 I: 1 只为阳性, II: 4 只为阳性。

2.5 BDNF 检测结果

15 日龄: 脑瘫组 (9.80 ± 2.46) 个与对照组 (10.87 ± 2.80) 个比较无显著性差异 ($P>0.05$)。42 日龄: 干预

组(19.08±4.03)个与对照组(14.04±2.91)个、干预组(19.08±4.03)个与非干预组(12.04±2.84)个、非干预组(12.04±2.84)个与对照组(14.04±2.91)个比较均有显著性差异($P<0.01$ 、 $P<0.01$ 与 $P<0.05$)。

2.6 学习能力

干预组(38.63±7.42)次与对照组(28.60±6.08)次、干预组(38.63±7.42)次与非干预组(63.71±10.59)次、非干预组(63.71±10.59)次与对照组

(28.60±6.08)次比较均有显著性差异($P<0.05$ 、 $P<0.01$ 与 $P<0.01$)。

2.7 记忆能力

干预组(7.25±1.04)次与对照组(7.90±0.74)次比较无显著性差异($P>0.05$),干预组(7.25±1.04)次与非干预组(5.14±1.07)次、非干预组(5.14±1.07)次与对照组(7.90±0.74)次比较均有显著性差异($P<0.01$)。

表 1 15 日龄大鼠神经行为学检测结果

($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	体重(g)	悬吊试验(s)	斜坡试验(s)	姿势(分)	肌张力(分)	不自主运动(分)	旷场试验(分)	拒俘试验(分)
对照组	17	26.24±5.16	15.32±3.77	1.58±0.34	10.00±0.00	10.00±0.00	10.00±0.00	3.29±1.79	0.88±0.78
LPS 足月产组	24	26.03±5.65	13.35±3.28	1.79±0.49	10.00±0.00	10.00±0.00	10.00±0.00	2.75±1.07	0.83±0.56
LPS 早产组	64	23.26±4.87 ^{①③}	10.30±4.16 ^{②④}	2.36±0.83 ^{②③}	9.18±1.23 ^{①④}	8.69±1.82 ^{①③}	9.94±0.35	1.39±1.03 ^{②③}	0.11±0.40 ^{②③}
F 值		3.91	13.46	11.53	9.19	10.47	0.64	23.08	25.88
P		<0.05	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	>0.05	<0.01	<0.01

与对照组比较① $P<0.05$,② $P<0.01$;与 LPS 足月产组比较:③ $P<0.01$,④ $P<0.05$

表 2 42 日龄大鼠神经行为学检测结果

($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	悬吊试验(s)	斜坡试验(s)	姿势(分)	肌张力(分)	不自主运动(分)	旷场试验(分)	拒俘试验(分)
对照组	10	4.35±1.46	1.95±0.68	10.00±0.00	10.00±0.00	10.00±0.00	15.80±3.33	3.80±1.40
非干预组	7	2.41±0.40 ^⑤	5.94±0.61 ^⑤	6.86±0.90 ^⑤	6.57±0.98 ^⑤	9.71±0.76	7.71±1.80 ^⑤	2.29±0.76 ^⑥
干预组	8	3.68±0.55 ^③	3.24±0.60 ^{①④}	8.13±0.83 ^②	7.25±1.49 ^①	9.75±0.71	12.75±3.62 ^③	3.63±0.92 ^④
F 值		7.72	80.79	48.05	30.15	0.69	14.09	4.31
P		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	>0.05	<0.01	<0.05

干预组与对照组比较① $P<0.01$,② $P<0.05$;干预组与非干预组比较③ $P<0.05$,④ $P<0.01$;非干预组与对照组相比较⑤ $P<0.01$,⑥ $P<0.05$

3 讨论

3.1 脑损伤机理

随着近年来围产技术的迅猛发展,未成熟儿的成活率大大提高,早产、低出生体重儿致 CP 呈上升趋势^[3],已有研究证实^[2]其主要病理变化为脑皮质损伤。脑皮质损伤,尤其是脑室周围白质软化相对发生率日益增高。早产儿脑皮质损伤是导致脑瘫的主要原因之一,依其神经病理学改变可分为:脑室周围白质软化、脑室周围白质出血及梗死,以前者更为多见。新生儿期神经行为学异常,是早期发现脑损伤的主要途径。脑皮质损伤可破坏神经元之间、皮质和皮质下中枢之间的信号传导,其损害导致少突胶质细胞减少,甚至轴突破坏及板下区神经元损伤,直接后果是髓鞘发育延迟、神经移行及整合异常,而出现灰质异位和皮层容积减少,脑室扩张、胼胝体变薄,进而出现运动、认知、知觉、行为异常及顽固性癫痫,其中以痉挛型双瘫为多见。对于孕鼠腹腔注射 LPS 致宫内感染造成脑皮质损伤的原因,Volpe^[4]认为通常有如下两方面的认识:感染与脑皮质损伤的发生有明显相关性;缺血为其主要原因,早产儿血供系统不成熟且自我调控能力差,造成供应脑的血流量减少,造成脑组织缺氧。缺氧及酸中毒还可导致脑血管自主调节功能障碍,影响脑血流,当血压升高过大时,可造成脑室周围毛细血管破裂出血,低血压时脑血

流量减少,又可引起缺血性损伤^[5]。

3.2 丰富环境刺激对脑瘫大鼠脑发育的影响

触摸使肌内的感受器受到刺激而产生神经冲动,经脊神经后根进入脊髓,兴奋 α -运动神经元,反射性引起靶肌肉收缩。早期触摸对脑瘫大鼠中枢神经系统的影响是通过早期触摸使运动单位的骨骼肌在 α -运动神经元的控制下运动协调化,建立正常的相反神经抑制机制。在丰富环境刺激中,阶梯可以训练大鼠四肢肌肉的力量及协调性,秋千可以训练大鼠前肢力量及平衡,管道可以训练大鼠的协调能力及对新异环境的适应能力,“玩具”可以训练大鼠的协调能力及对新鲜事物的适应能力。丰富环境刺激能够使中枢神经系统的协调、整合、控制能力增强,尤其使大鼠肌力增加明显,通过不同的环境刺激大大增加了脑瘫大鼠的兴奋性、对陌生环境的适应能力。

人类重心移动必须具备足够的肌力和平衡能力。斜坡试验若要达到正常化,必须具备足够的肌力,建立翻正反射、平衡反射。本实验证明环境刺激能够改善 CP 大鼠前肢的肌力,无法完成斜坡试验可能原因是无法建立正常的翻正反射、平衡反射等高级反射。

丰富环境刺激对脑瘫大鼠脑发育影响的机制可能是:生后早期暴露于丰富环境,给予多种感觉刺激

可使运动皮层和视觉皮层树突长度增加及分支的增多^[6];并使得脑组织代谢增强、脑血流变化及结构发生改变,同时使得动物的感觉运动功能和学习记忆能力增强,亦可影响突触的形成和认知发育^[7]。通过促使海马部位形成较多的突触,增强学习记忆能力。

据报道未成熟脑的可塑性强^[8],通过早期干预可使新生大鼠皮层厚度与重量增加,神经胶质细胞增生明显、树突支增多和突触增加等,使受损脑通过轴突绕道投射、树突出现不寻常的分叉、并产生非常规的神经突触等途径进行功能代偿。早期干预可使正常新生大鼠认知水平提高和海马神经营养因子的含量明显提高,认为神经生长因子含量的增高与小鼠认知水平的提高有关^[9-10]。环境刺激可影响脑的形态及功能^[11],环境刺激与学习记忆能力密切相关的海马长时程增强产生有关^[12],可增强中枢神经系统的可塑性和学习记忆能力。

BDNF 可以下调 N-甲基-D-天冬氨酸 (N-methyl-D-aspartate,NMDA)受体功能,抵抗兴奋性氨基酸的毒性,减轻自由基对神经元的损伤。BDNF 能通过阻止 caspase-3 的活性而抑制细胞凋亡,还能通过抑制胶质细胞的活性和巨噬细胞的浸润,达到抑制脑缺血再灌注损伤引起的炎症反应。本研究发现,丰富环境刺激可增强 BDNF 的表达,而 BDNF 在未成熟脑的发育过程及脑损伤后的修复过程中均有重要作用,BDNF 还与学习、记忆等高级精神活动密切相关。

参考文献

- [1] 李树春. 小儿脑性瘫痪 [M]. 郑州: 河南科学技术出版社, 2000.1—3.
- [2] 李晓捷,高晶,孙忠人.宫内感染致早产鼠脑瘫动物模型制备及其鉴定的实验研究 [J]. 中国康复医学杂志,2004,19(12):885—889.
- [3] 李林, 李晓捷.小儿脑性瘫痪病因研究进展[J].中国康复医学杂志,2004,19(12):941—944.
- [4] Volpe JJ.Neurology of the Newborn [M]. 3rd edition. Philadelphia,PA:W.B.Ssunders,1995.294.
- [5] 王慕荻主编. 儿科学 [M]. 第 5 版. 北京: 人民卫生出版社, 2000.125.
- [6] Pascual R, Figueroa H. Effects of preweaning sensorimotor stimulation on behavioral and neuronal development in motor and visual cortex of the rat[J].Biol Neonate,1996,69(6):399—404.
- [7] Liu D, Diorio J, Day JC, et al. Maternal care, hippocampal synaptogenesis and cognitive development in rats [J].Nat Neurosci,2000,3(8):799—805.
- [8] 丁国芳,孙金涛.围产期高危儿的早期干预[J].国外医学·儿科学分册,1992,19(1):25—26.
- [9] Pham TM,Soderstrom S,Henriksson BG, et al. Effects of neonatal stimulation on later cognitive function and hippocampal nerve growth factor[J]. Behav Brain Res,1997,8(1):113—120.
- [10] 胡君,陈燕惠,陈达光,等.早期触摸和环境刺激对宫内缺血缺氧大鼠脑功能的影响[J].中国康复,2002,17(4):193—195.
- [11] Ellbent T, Pantev C, Wienbruch C,et al. Increased cortical representation of the fingers of the left hand in string players [J]. Science, 1995,270:305—307.
- [12] Foster TC, Gagne J, Massicotte G. Mechanism of altered synaptic strength due to experience: relation to long-term potentiation[J]. Brain Res,1996,736:243—250.

向康复科医师推荐——《骨科临床检查图解》(第 5 版)

近年来,骨关节创伤患者日益增多,术后的康复越来越受到患者的重视,骨关节康复科医师的需求也越来越多。体格检查和阅读 X 线片是骨关节康复科医师的基本功。然而国内系统介绍骨科检查的书籍并不多。《骨科临床检查图解》就是一本以图解的形式专论骨科临床检查的专著。全书共 13 章,第二章为骨科检查的一般原则和四肢周围神经的检查,其他 11 章分别介绍了颈、肩、肘、腕、手、胸腰椎、髋、膝、胫骨、踝、足的检查技术。每个章节一般首先介绍该部位常见骨科疾病的特点,然后采用图解与简单文字介绍相结合的方式,按骨科常用的望、触、动诊的顺序讲解体格检查,最后介绍常见的正常和异常 X 线片。以上 3 个部分前后呼应、编排新颖、逻辑性强。其突出的特点是图文并茂、系统讲解,易于读者理解、记忆和掌握各种骨科体格检查的要点及相应的临床意义。另外,本书对正常和异常 X 线片及图示的讲解,也有助于读者提高阅读 X 线片的能力。

该书由山东科学技术出版社最新出版,16 开,精装,310 页,定价 68 元,全国各新华书店及医药卫生书店销售。