

不同环境设置对局灶性脑梗死大鼠梗死灶周围 Syn 表达的影响*

李娜¹ 高俊淑¹ 李阔² 陈景红¹ 贾子善^{3,4}

摘要 目的: 观察不同环境对局灶性脑梗死大鼠梗死灶周围突触膜糖蛋白表达的影响。方法: 雄性 SD 大鼠 95 只, 采用电凝法造成右侧大脑中动脉阻断(MCAO)模型后, 随机分为独居组(n=20), 社交组(n=30), 探索学习组(n=20), 丰富环境组(n=20), 假手术对照组(n=5)。于不同时间分批处死大鼠, 用免疫组化染色观察梗死灶周围皮质 Syn 阳性表达。结果: MCAO 后梗死灶周围皮质 Syn 阳性表达均高于假手术对照组, 并且随着时间的推移, 其表达进一步增高。探索学习组、丰富环境组于 MCAO 术后各时间点 Syn 表达均明显优于独居组和社交组($P<0.05$, $P<0.01$); 探索学习组在 3、4 周表达高于丰富环境组($P<0.05$); 社交交往组表达高于独居组($P<0.05$)。结论: 丰富环境; 探索学习及社交交往均能促进梗死灶周围 Syn 的表达。

关键词 丰富环境; 探索学习; 脑梗死; 大鼠; 突触膜糖蛋白

中图分类号: R493, R743 文献标识码: A 文章编号: 1001-1242(2009)-03-0213-03

The effects of different environmental interventions on Syn expressions in peri-infarction cortex of rats after unilateral local cerebral infarction/LI Na, GAO Junshu, LI Kuo, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2009, 24(3): 213—215

Abstract Objective: To observe the effects of different environmental interventions on synaptophysin (Syn) expressions in peri-infarction cortex of rats after unilateral local cerebral infarction. **Method:** After the models of MCAO were established by electric coagulation successfully, 95 male rats were randomly divided into 5 groups: individual living group(n=20), social communication group(n=30), learning group(n=20), enriched environment group(n=20) and sham operated group(n=5). The rats were randomly sacrificed at different time points. The expressions of Syn in peri-infarction cortex were examined by immunohistochemistry staining. **Result:** After MCAO, the expressions of Syn in peri-infarction cortex upregulated significantly comparing with that in sham group at any time points. The expressions of Syn in learning group and enriched environment group were higher than that in individual living group and social communication group at any time points after MCAO ($P<0.05$ or $P<0.01$). It were higher in learning group than that in enriched environment group on day14 and 21 ($P<0.05$); and also were higher in social communication group than that in individual living group ($P<0.05$). **Conclusion:** Learning, enriched environment and social communication after MCAO could up-regulate the expressions of Syn in peri-infarction regions.

Author's address Rehabilitation Center, Hebei Provincial People's Hospital, Shijiazhuang, 050051

Key words enriched environment; learning; cerebral infarction; rat; synaptophysin

目前认为脑卒中后的神经功能恢复与脑的可塑性有关, 突触膜糖蛋白(synaptophysin, Syn)作为脑可塑性的相关分子已广泛应用于神经系统可塑性研究中^[1]。已有证据表明丰富环境可促进脑梗死大鼠的行为学恢复^[2]。本文拟观察不同环境设置对 Syn 表达的影响, 探讨不同环境影响脑梗死后功能恢复的机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

清洁级雄性 SD 大鼠 95 只, 3—4 月龄, 体重 230—260g, 购自华中科技大学同济医学院实验动物学部。合格证号 SCXK(鄂)2004—0007。将动物随机分为 MCAO 模型组 90 只, 假手术对照组 5 只。

1.2 制备 MCAO 模型及分组

参照 Bederson 等^[3]的方法制备大脑中动脉阻断(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型。大鼠用 10% 水合氯醛(0.35ml/100g 体重)腹腔内注射麻醉, 以左侧卧位固定于手术台, 剃除右侧颞顶部鼠毛。常规消毒后, 在右眼与右耳之间切开皮肤, 分离

* 基金项目: 河北省卫生厅资助课题(03025)

1 河北省人民医院神经二科, 石家庄, 050051

2 沧州市地区医院神经内科

3 河北省人民医院康复中心

4 通讯作者

作者简介: 李娜, 女, 主治医师, 医学硕士

收稿日期: 2008-09-23

颞肌,暴露颞骨翼板,术中避免损伤面神经、面部主要动脉、静脉、眼外肌及泪腺和颧弓。在手术显微镜下,用牙钻经颞骨翼板钻至硬脑膜,暴露大脑中动脉后,用小咬骨钳向下咬去部分颅骨,暴露大脑中动脉近端,用电凝器凝闭嗅束近端至大脑下静脉之间的一段大脑中动脉,然后依次缝合颞肌及皮肤。腹腔内注射 0.2 万 IU 青霉素以预防感染。术后 24h 随机分为独居组 20 只,社交组 30 只,探索学习组 20 只和丰富环境组 20 只。假手术对照组 5 只,不电凝 MCA,其余步骤与手术组相同。

1.3 造模后饲养环境

假手术对照组:饲养于标准笼,每笼 5 只。独居组:一鼠一笼,居于标准笼(550mm×350mm×200mm);社交交往组:5 只一组,群居于标准笼;探索学习组:10 只一组,居于迷宫笼^[4]。迷宫笼为直径 500mm 圆笼,与 640mm×480mm×120mm 的方笼间通过两通道相连。圆笼中间由丝网分隔,一侧为进食区,一侧为饮水区,方笼由丝网分隔为通道 80mm 宽的迷宫,由易到难,每周更换一次迷宫;丰富环境组:10 只一组居于大小为 815mm×610mm×450mm 的丰富环境笼。在笼子边高 150mm 处沿两侧各放一 70mm 宽木板,两块木板通过 25mm 宽的平衡木连接;一侧通过阶梯连接笼底;另一侧通过滑梯连接笼底,并在高 220mm 处沿一角放一斜板。铁链和秋千悬于笼中;各种小木块以及各种小的玩具每周更换一次。同时给予声音及光照刺激^[5-6]。

1.4 标本的制备

社交组于造模后第 1 天、3 天各取 5 只,假手术对照组于造模后 1 周时取 5 只,其他各试验组分别于造模后第 1 周、2 周、3 周、4 周各组随机取 5 只,用 10%水合氯醛腹腔内注射麻醉后固定于手术台,剪开胸腔,暴露心脏,用 9 号针头插入左心室,灌注生理盐水,待右心耳膨起,剪开右心耳让血液流出,至右心耳流出液为无色透明时开始用 4%多聚甲醛灌注固定,先快后慢,每只大鼠约需 200ml,总量在 20—30min 内灌完后立即剖颅取脑在视交叉处切开后浸于 4%多聚甲醛中再固定 4h。经常规梯度酒精脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,做 5μm 厚连续切片备染。

1.5 免疫组化染色

石蜡切片常规脱蜡至水。充分水洗后将切片浸入 0.01M 枸橼酸盐缓冲液(pH6.0),电炉加热至沸腾后断电,间隔 5min 后,反复 1 次,冷却后 0.1M PBS 洗涤 2 次进行抗原热修复;滴加正常山羊血清封闭液,室温 20min,甩去多余液体,不洗;滴加小鼠抗大鼠 Syn(为 1:200,购自武汉博士德),4℃过夜;PBS 洗 3 次,滴加生物素化二抗(1:200),37℃20min;PBS 洗 3 次;滴加 SABC,37℃20min,PBS 洗 4 次;DAB 显色,蒸馏水洗涤、脱水、透明、中性树脂胶封片。PBS 代替一抗做阴性对照。

1.6 图像处理

用 HPIAS-1000 真彩色病理图像分析系统测定皮质缺血周边区阳性曝光点的光密度(OD)值,以同一张切片上未受累胼胝体 OD 值为背景,得到校正的光密度(COD)值。每例标本测 5 张切片,在每张脑切片的缺血侧部分(假手术组大鼠在假手术侧部分)随机选取 5 个高倍镜(200×)视野,取平均值。所有 OD 值测量均在相同光学、光源条件下完成。

1.7 统计学分析

所有数据均以均数±标准差表示,数据处理采用 SPSS12.0 统计分析软件统计分析,所有数据进行正态性及方差齐性检验后,组间比较采用单因素方差分析。

2 结果

Syn 免疫阳性产物分布于大脑皮质的广泛区域,呈点状弥漫性分布。MCAO 后各时间点梗死灶周围皮质 Syn 阳性表达均高于假手术组,并且随时间的推移,其表达进一步增高。探索学习组、丰富环境组于 MCAO 术后各时间点 Syn 表达均明显强于独居组和社交组($P<0.05$ 或 $P<0.01$);于第 7 天、14 天、21 天社交交往组 Syn 表达均优于独居组($P<0.05$);于第 21 天、28 天探索学习组 Syn 表达均优于丰富环境组($P<0.05$)(表 1)。

3 讨论

丰富环境(enriched environment)是指存在多个干预因子的环境^[4]。Turner 等^[7]研究了不同饲养条件对正常大鼠视觉皮质突触的影响,发现单个神经元突触数量以丰富环境组最多,其次为社交交往(群

表 1 各组梗死灶周围皮质 Syn 阳性表达比较

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

组别	第 7 天	第 14 天	第 21 天	第 28 天
独居组	0.779±0.007	1.202±0.005	1.505±0.009	1.757±0.014
社交组	0.858±0.009 ^①	1.242±0.004 ^①	1.605±0.008 ^①	1.771±0.011
探索组	1.042±0.007 ^{②③}	1.517±0.005 ^{②③}	2.266±0.010 ^{②④}	2.761±0.016 ^{②④}
丰富组	1.032±0.007 ^{②③}	1.510±0.006 ^{②③}	1.988±0.007 ^{②③⑤}	2.559±0.010 ^{②④⑤}

同独居组比较: ① $P<0.05$, ② $P<0.01$; 同社交组比较: ③ $P<0.05$, ④ $P<0.01$; 同探索组比较: ⑤ $P<0.05$

居)组,而单只饲养于标准环境组最少。许多其他研究亦表明丰富环境可增加正常成年或衰老动物脑树突分支及棘密度、突触数量及突触接触面积、神经介质和神经营养因子等广泛的化学和解剖学的可塑性变化。

探索学习是指动物主动去接受新的信息而改变自身行为、适应新环境的过程^[8]。许多研究亦表明学习是影响脑的可塑性的主要因素之一,学习会增加突触的数量,改变突触的结构^[9]。当大鼠经水迷宫训练获得了空间辨别性学习记忆功能后,在海马内会引起突触数量增多、突触活性区膜面积增加、突触小泡数量和体积增加等一系列形态学变化,这些变化可认为是空间辨别性学习记忆在大鼠海马结构内引起了突触形态学的可塑性变化^[10],而树突棘可能是长期突触可塑性的关键,直接关系到记忆在大脑的存储^[11]。

Syn 在中枢、外周神经系统和神经内分泌细胞中均有表达,在神经系统的发育、疾病、损伤与再生、可塑性变化等的研究中具有重要意义。Syn 可以间接评定突触的数量、密度及分布。

Satroemer 等^[12]观察到脑梗死后在梗死灶周围及对侧相应区域 Syn 的表达明显增加。使用定量免疫组化分析发现突触蛋白也可能与突触的长期可塑性有关。在脑缺血损伤后恢复过程中,两侧半球 Syn 表达明显增加^[13]。脑缺血损伤后 Syn 的表达很可能预示着突触效率和新突触生成等结构和功能的可塑性改变。已有证据表明丰富环境可增加视皮质突触数量^[14],预防衰老脑突触密度下降^[15],长期运动也可预防衰老脑突触数量的减少,学习可改善大鼠海马突触的效率^[16]。

本研究发现,探索学习组大鼠脑梗死灶周围 Syn 阳性神经元数量在多个时间点明显多于其他组,丰富环境组大鼠脑梗死灶周围 Syn 阳性神经元数量在多个时间点明显多于社交组,而独居组少于社交组。提示丰富环境、探索学习、社会交往能够促进局灶性脑梗死大鼠大脑皮质 Syn 的表达增加,从而促进神经功能重组,这可能是丰富环境、探索学习和社会交往促进脑梗死后功能恢复的机制之一。

参考文献

[1] Johansson BB. Brain plasticity and stroke rehabilitation [J].

Stroke, 2000, 31(1): 223—23.

- [2] Biernaskie J, Corbetti D. Enriched Rehabilitative Training promotes improved forelimb motor function and enhanced Dendritic growth after focal ischemic injury [J]. J Neurosci, 2001,21:5272—80.
- [3] Bederson JB, Pitlis LH, Tsun M, et al. Rat Middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination[J]. Stroke, 1986,17(3): 472—476.
- [4] 贾子善,李阔,槐亚萍,等.不同环境干预对局灶性脑梗死大鼠行为学恢复的影响[J]. 中国康复医学杂志,2007,22(7):578—580.
- [5] Ohlsson AL, Johansson BB. The enviroment influences functional outcome of cerebral infarction in rats[J]. Stroke,1995, 26:644—649.
- [6] Grabowski M, Sorensen JC, Mattsson B, et al. Influence of an enriched environment and cortical grafting on functional outcome in brain infarcts of adult rats[J]. Rxp Neurol,1995,133: 1—7.
- [7] Turner AM, Greenough WT. Differential rearing effects on rat visual cortex Synapses: I. Synaptic and neuronal and synapses per neuron[J]. Brain Res, 1985, 329(1-2):195—203.
- [8] 高俊淑,李阔,李娜,等.探索学习对局灶性脑梗死大鼠梗死灶周围皮质 BDNF 的影响[J]. 中国康复医学杂志,2007,22(7):583—585.
- [9] Klintsova A Y, Greenough W T. Synaptic plasticity in cortical systems[J]. Current opinion in Neurobiology, 1999, 9:203—208.
- [10] 宿宝贵,许鹿希.大鼠海马结构在空间辨别性学习记忆时的突触形态可塑性的定量研究[J].解剖学研究,2000,22(1):40—42.
- [11] Leggio MG, Mandolesi L, Federico F, et al. Environmental enrichment promotes improved spatial abilities and enhanced dendritic growth in the rat [J]. Behav Brain Res, 2005,163(1): 78—90.
- [12] troemer RP, Kent TA, Hulsebosch CE. Neucortical Neural Sprouting, Synaptogenesis and Behavioral Recovery after Neocortical infarction in Rats[J]. Stroke, 1995, 26:2135—2144.
- [13] Keyvani K, Schallert T. Plasticity-associated molecular and structural events in the injured brain [J].Journal of Neuropathology and Experimental Neurology,2002,61(10):831—840.
- [14] Turner AM, Greenough WT. Differential rearing effects on rat visual cortex synapses. I. Synaptic and meuronal density and synapses per neuron[J]. Brain Res, 1985, 329(1-2):195—203.
- [15] Saito S, Kobayashi S, Ohashi Y, et al. Decreased synaptic density in aged brains and its prevention by rearing under enriched environment as revealed by synaptophysin contents[J]. J Neurosci Res, 1994,39(4):57—63.
- [16] Van Reempts J, Dikova M, Werbrouck J, et al. Synaptic plasticity in rat hippocampus associated with learning [J]. Behav Brain Res, 1992,51(2):175—183.