

行为学训练对局灶性脑缺血大鼠梗死侧海马CA3区突触结构的影响

段小东¹ 张雷² 胥方元¹ 郭声敏¹ 刘曦¹ 姜伟¹

摘要

目的:研究行为学训练对局灶性脑缺血大鼠梗死侧海马CA3区突触结构的影响并探讨其机制。

方法:48只健康雄性Wistar大鼠制成右侧大脑中动脉脑梗死模型后随机分为训练组和对照组,每组各24只,2组又随机分为7d、14d和21d 3个时段进行观察,每个时段8只。训练组于造模1d后,给予Morris水迷宫训练,对照组置于普通笼中正常喂养,不予干预。透射电子显微镜下观察各时间点不同组大鼠梗死侧海马CA3区突触结构参数的变化。

结果:电镜下观察到各时段电针组梗死侧海马CA3区突触后致密物(PSD)厚度、活性区宽度、突触后膜曲率均较对照组明显增加,差异有显著性意义($P<0.05$)。

结论:行为学训练可以改善局灶性脑梗死大鼠梗死侧海马CA3区突触结构参数的表达,促进神经功能的恢复,从而改善脑梗死大鼠的学习记忆能力。

关键词 脑缺血;水迷宫;突触结构;大鼠

中图分类号:R743.3 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2012)-05-0415-05

The effect of behavior training on synaptic structures of hippocampal CA3 neurons in rats with ischemia cerebral infarction /DUAN Xiaodong, ZHANG Lei, XU Fangyuan, et al. //Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2012, 27(5): 415—419

Abstract

Objective: To evaluate the effects of behavior training on synaptic interface structures around the area of cerebral infarction and to explore its role of functional recovery in cerebral infarction.

Method: Forty-eight adult male Wistar rats were randomly divided into training group and control group after the establishment of models of ischemic cerebral infarction, and the training group was divided into 7d, 14d, and 21d sub-groups. Training group was given morris water training 1 day after model establishing. The control group fed normal ordinary apartments and was not given any treatment. Synaptic ultrastructure in the hippocampal CA3 area in ischemia side were observed under transmission electron microscopy.

Result: The synaptic curvatures and thickness of postsynaptic density(PSD) as well as the length of active area were obviously increased in training group when compared with control group ($P<0.05$).

Conclusion: Behavior training can promote the recovery of cerebral infarcted neural function and the learning and memory abilities in rats, which are likely to be related to the synaptic structure changes in hippocampus CA3 area.

Author's address Department of Physiotherapy and Rehabilitation, Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou, 646000

Key word cerebral infarction; morris water training; synaptic structure; rat

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2012.05.007

1 四川省泸州医学院附属医院康复医学科,泸州,646000; 2 泸州医学院公共卫生学院

作者简介:段小东,女,主治医师,硕士; 收稿日期:2011-11-22

随着缺血性脑卒中发病率逐年增高,脑梗死治疗已成为当前临床研究的重要内容之一。脑梗死患者后遗功能障碍十分广泛,其中以学习记忆障碍与运动功能障碍最为常见,对患者的生存质量影响也最大。行为学训练是一种康复训练方法,它主要用来训练相关对象的学习、记忆、空间辨别、觅食等本能性行为能力,促进受损的行为学功能恢复^[1]。目前国内外对行为学训练的研究比较多,主要集中在对痴呆大鼠的研究,而对局灶性脑缺血大鼠的研究还很少。本研究采用右侧大脑中动脉缺血性梗死模型,观察行为学训练后梗死侧海马CA3区突触结构参数的变化,从突触机制上探讨行为学训练对局灶性脑缺血大鼠脑损伤修复的机制,为脑卒中患者的临床康复提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

60只健康雄性Wistar大鼠,平均体重(250 ± 20)g,年龄8—10周,由泸州医学院实验动物中心提供。造模成功的48只动物随机分为脑梗死自由活动组(对照组)和脑梗死行为学训练组(训练组),每组24只。2组分3个时段进行观察,每个时段8只。

1.2 主要仪器与试剂

JEM-1400型透射电子显微镜(日本),SIS图像采集分析系统(德国),DP12数码相机;日本OLYMPUS光学仪器有限公司,Morris水迷宫视频跟踪分析系统(包括摄像机、录像机、显示器和分析系统);成都泰盟科技有限公司,MT-200Morris水迷宫跟踪分析系统(S1000);成都泰盟科技有限公司,Image-Pro Plus 6.0专业图像分析软件,多聚甲醛戊二醛,NaCl,戊巴比妥钠,3%双氧水等。

1.3 局灶性脑缺血模型制作方法

参照廖维靖等^[2]和Longa等^[3]的大鼠大脑中动脉缺血模型造模方法制成右侧大脑中动脉梗死模型。用1%的戊巴比妥钠按照30—40mg/kg对大鼠进行腹腔麻醉,固定于手术台上,消毒后颈部正中切开,分离右颈总动脉、颈内动脉、颈外动脉及翼腭动脉,颈内动脉挂线备用,在翼腭动脉起始部环扎,并结扎颈外动脉和颈总动脉近心端,在颈总动脉分叉处的近心端约5mm处剪一长约0.2mm的小口,将预先用

多聚赖氨酸浸泡处理的强力尼龙钓鱼线(直径0.22mm,长25mm,离头端2mm处均匀地涂上一层聚胺酯清漆,使其头端形成光滑的锥形,直径约0.25mm)从颈总动脉切口插入,经颈总动脉分叉后沿颈内动脉入颅,至大脑前动脉,稍感阻力时停止,插入深度从分叉处计约17—19mm,然后用手术线结扎颈内动脉以扎紧线栓,剪去多余尼龙线,最后缝合皮肤,此外在术中和术后用小型负反馈电热毯对动物进行保温,使肛温保持在37℃。苏醒后放回鼠笼正常喂食和饮水,保持室温25℃。在手术中保持无菌操作。

造模成功标准^[4]:大鼠苏醒后提尾时左侧肢体内收屈曲;同侧Hornor征;爬行时向左划圈;站立时向左侧倾倒。凡具有以上4项体征中任何一项者均纳入研究对象。大鼠死亡时及时补充,保证每组动物数量。

1.4 治疗方法

对照组和训练组大鼠在造模成功后置于普通笼中正常喂养。训练组于术后第1天开始行为学训练;对照组只在同等条件下饲养,不做任何干预。

Morris水迷宫训练^[5]:Morris水迷宫选用大鼠通用型,圆桶形,水池直径120cm,高55cm,实验时放入的水深22cm,水中加入奶粉,使其呈乳白色不透明状,水温为22℃。在水池壁的边沿均匀分布4个不同形状的标记,由此将水池等分为4个象限,选第三象限正中放置平台(平台高21cm,平台直径10cm,没于水下1cm,根据计算机中的分析软件进行调整位置。将训练组大鼠放于水迷宫中适应2min,将受试大鼠按顺时针方向依次由第一象限至第四象限入水点顺序面向池壁放入水中。记录2min内寻找平台的时间(逃避潜伏期)。如果大鼠在2min内找到平台,记录2min中内实际逃避潜伏期;如果在2min内未找到平台,由实验者将其引上平台并停留10s,逃避潜伏期记录为2min,1次/d。每次不同动物的入水点相同,训练顺序固定。此项目主要训练大鼠的学习记忆能力。

1.5 取材及处理

对照组和训练组在术后7d,14d,21d分别进行取材,每时段每组各取材8只。以1%的戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,固定于操作台上,迅速开胸,先以

250ml生理盐水快速将左心室灌流大鼠体内血液冲净,再以4%多聚甲醛200ml行心脏灌注固定(大约持续15min),灌注完成后断头取脑,分离海马组织,参照大鼠脑立体定位图^[6]定位取海马CA3区,取1mm×1mm×2mm组织3块,固定于3%戊二醛+4%多聚甲醛固定液中。行常规电镜标本包埋、醋酸铀和枸橼酸铅双染。每份标本制作2张铜网,铜网由左上角至右上角的斜线上移动,每份标本随机摄取突触像5张,15000倍显微照片(日本JEM-1400型透射电子显微镜),再光学放大至50000倍。

1.6 突触形态学参数的定量分析

用SIS图像采集分析系统以及Image-Pro Plus 6.0专业图像分析软件测量突触间隙宽度、突触后致密物(postsynaptic density, PSD)的厚度、突触后膜的弦长和弧长及突触活性区的长度。其中活性区长度与突触后膜致密物的厚度参考Guldner方法测量^[7];突触界面曲率的测量参数参照Jones等的方法^[8],即突触后膜的弦长与相应的弧长之比等于界面曲率;突触间隙宽度用多点平均法测定。每组测定40镜照片。

1.7 统计学分析

用SPSS 13.0版软件进行整理及统计学分析, $P<0.05$ 为差异有显著性意义。按完全随机设计资料进行方差分析,并进一步进行多样本均数间两两比较的LSD- t 检验法进行统计分析。

2 结果

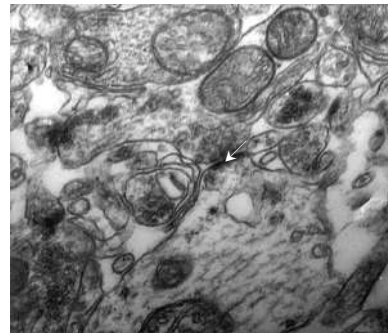
2.1 突触形态结构

两组局限性脑缺血大鼠梗死侧海马CA3区突触Gray I型突触图像均符合兴奋性突触形态特征,具有不典型的不对称界面,突触前膜和突触后膜较模糊,突触后膜有浓密的电子致密物,突触前终末聚集有较多呈圆形的突触囊泡,突触后膜比突触前膜明显增厚。对照组突触多为平直型突触,即突触前、后膜近于直线且平行,少数突触的后膜轻度弯曲形成微凹型或微凸型,一般只有一个活性区域,见图1。训练组突触多表现为凹型和凸型突触,多数为凹性突触,其形态成弧形;突触的体积比较大,大多有两个或以上的活性区域,见图2。

2.2 透射电镜突触形态图像分析仪统计结果

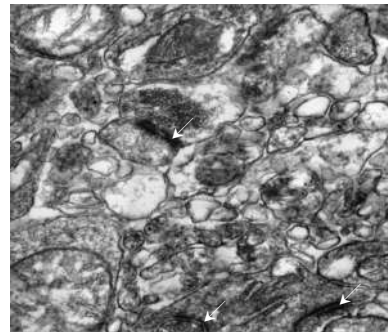
两组局限性脑缺血大鼠梗死侧海马CA3区参数结构见表1,训练组PSD厚度、活性区长度、突触界面曲率均增加,与同期对照组比较差异均有显著性意义($P<0.05$);两组大鼠梗死侧海马CA3区突触间隙宽度同期两两比较差异无显著性意义($P<0.05$)。

图1 对照组海马CA3区突触形态(透射电镜,×50000)



醋酸铀和枸橼酸铅双染

图2 训练组海马CA3区突触形态(透射电镜,×50000)



醋酸铀和枸橼酸铅双染

3 讨论

突触是神经元之间传递信息的重要结构,可塑性是神经元和神经网络发生的适应性变化,在高级神经中枢的脑内,每一个神经元在整个生命活动过程中都具备可持续形成突触连接的潜在能力,这种能力是神经网络可塑性的基础^[9]。中枢神经系统突触功能和结构的可塑性变化是神经康复的基础。脑缺血大鼠随缺血时间的延长,会出现突触结构异常,突触密度下降^[10]。海马与学习、记忆的关系密切,对梗死/缺氧等许多致病因素较为敏感,再加上其结构

表1 两组大鼠梗死侧海马CA3区突触结构参数比较 (x±s)

组别	只数	突触间隙宽度(nm)	PSD厚度(nm)	后膜活性区长度(nm)	突触界面曲率
对照组	24				
7d	8	21.44 ± 1.25	47.00 ± 5.12	296.92 ± 8.44	1.017 ± 0.210
14d	8	21.47 ± 1.08	51.06 ± 5.23	301.44 ± 8.09	1.018 ± 0.017
21d	8	20.96 ± 1.37	52.68 ± 4.16	309.53 ± 2.65	1.020 ± 0.209
训练组	24				
7d	8	20.71 ± 2.41	54.23 ± 8.16 ^{①②}	326.22 ± 8.72 ^{①②}	1.019 ± 0.014 ^②
14d	8	21.71 ± 3.01	60.33 ± 9.51 ^①	335.32 ± 8.28 ^{①②}	1.026 ± 0.017 ^{①②}
21d	8	19.46 ± 2.65	64.44 ± 10.70 ^①	340.16 ± 6.72 ^{①②}	1.040 ± 0.018 ^{①②}

与对照组同期比较,①P<0.01;组内两两比较,②P<0.05。

和功能具有明显的可塑性,因此常作为学习记忆的研究对象。最近 Briones 等^[11]研究发现,复杂环境可作为一种独立影响因素,促进缺血损伤区附近的海马神经元突触及树突生长,提示在脑缺血治疗期间,对患者进行功能训练可以促进大脑损伤区周围神经环路恢复,有助于其神经功能的恢复及重建。梁荫基^[12]等人研究发现,Morris 水迷宫训练可以诱导大鼠海马 CA3 区轴突的重塑,提示苔藓纤维系统可作为一个研究轴突重塑和认知关系的理想区域。

行为学训练是运动训练的一种,它主要训练动物的本能行为能力,如学习、记忆、空间辨别及觅食等,促进受损的行为学功能的恢复。Morris 水迷宫主要应用于学习记忆、老年痴呆、缺血性痴呆、智力与衰老、行为生物学等方面的研究。Morris 水迷宫实验通过定位航线试验测量大鼠获取经验(学习)的能力,以潜伏期表示;通过空间搜索试验,测量大鼠保存经验(记忆)的能力,以跨越原平台次数及平台象限游泳距离表示。本研究中,我们选用水迷宫进行训练,因为大鼠的梗死灶位于海马区,而水迷宫被证实是学习记忆能力最好的训练工具。李玲^[13-15]等人研究表明,海马梗死大鼠经过水迷宫训练后,其受损的学习记忆明显得到恢复,在训练后3周基本可达正常水平,而制动组大鼠的学习记忆能力虽然也有一定恢复,但始终低于正常水平,同时行为学训练能显著增强多聚唾液酸神经细胞黏附分子(PSA-NCAM)和巢蛋白(nestin)在脑梗死大鼠海马齿状回区的表达,而且还可增强神经干细胞的迁移能力,促进神经功能恢复,从而水迷宫训练可以促进海马梗死大鼠的学习记忆能力的恢复。

本实验通过电镜观察发现,对照组大鼠缺血侧海马 CA3 区突触形态多为平直型,PSD 厚度较薄,活

性区长度短;训练组大鼠以凹型突触增加为主,在纵切面上呈一“U”型,PSD 厚度大,活性区长度长。训练组大鼠缺血侧海马 CA3 区 PSD 厚度、突触活性区长度、突触界面曲率与同期对照组比较差异均具有显著性意义(P<0.05)。表明 Morris 水迷宫训练可使脑梗死大鼠缺血侧突触结构参数发生改变,增强了突触的传递功能,在行为上表现为其学习记忆能力优于对照组。突触界面曲率的改变是突触可塑性的一个形态学特征,弯曲型突触比平直型突触有更多的线粒体,处于更活跃的状态。扩大突触界面曲率导致接触面积的增大,由于弯曲度大的界面呈“袋状”,减少向周围间隙扩散,有利于递质与受体更有效的结合以及递质作用后被重新摄取,从而提高神经信息传递的有效性。因此推测突触界面曲率的增大可以作为一种代偿机制^[16-17]。PSD 厚度与神经运动功能和学习记忆的保持能力密切相关^[18],PSD 附于突触后膜胞浆侧厚约 50nm,含有 30 余种与突触传递紧密相关的蛋白成分是突触后可塑性结构基础最重要的部分。其厚度、长度与面积在长时程增强形成中均发现有增加现象,由此推测 PSD 的变化可能是突触功效增强的物质基础^[19]。突触后膜致密物质厚度增加,可能与某些酶及其底物蛋白的磷酸化过程引起其分子构型改变有关,这可能是功能变化的形态学基础^[20]。突触小泡是突触前部的特征性结构,小泡内含有化学物质,称为神经递质。突触前膜与聚集成簇的突触小泡相接触形成突触活性区,突触活性区长度反映神经递质释放的有效面积。囊泡融合有助于介导突触传递,神经营养因子的释放^[21]。我们的研究发现训练组大鼠缺血侧海马 CA3 区的突触活性长度比对照组明显增加,说明行为学训练可以影响神经冲动的传递功能。突触前部和突触后

部相对应的细胞膜较其余部位略增厚,分别称为突触前膜和突触后膜,两膜之间的狭窄间隙称为突触间隙。我们在研究中观察到行为训练21d后脑缺血大鼠缺血侧海马CA3区的突触间隙变化不大,不具有显著性意义。这是否与我们的治疗方法、治疗时间和治疗的强度有关,还需要我们进一步研究。另研究认为^[22]海马区轴突和树突之间的间隙与学习能力和记忆能力密切相关,所有潜在的连接模式都惊人地依赖突触前和突触后神经元的解剖位置。

由此可见,行为训练可以改善脑梗死大鼠学习记忆能力,其机制可能与行为学训练促进了海马区突触结构和传递的可塑性变化有关,使神经系统的功能重组和代偿,从而改善学习记忆能力。

参考文献

- [1] Wang R, Tang Y, Feng B, et al. Changes in hippocampal synapses and learning-memory abilities in age-increasing rats and effects of tetrahydroxystilbene glucoside in aged rats[J]. *Neuroscience*, 2007, 149(4): 739—746.
- [2] 廖维靖, 刘淑红, 范明, 等. 线栓阻断大鼠大脑中动脉制作梗死性脑损伤模型的改良[J]. *中华物理医学与康复杂志*, 2002, 24: 349—352.
- [3] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. *Stroke*, 1989, 20: 84—91.
- [4] 杨敏, 李涛, 余茜. 运动训练对脑梗死大鼠行为学及突触形态结构参数的影响[J]. *中国康复医学杂志*, 2007, 22(1): 24—27.
- [5] 段小东, 余茜, 胥方元. 电针“百会”, “大椎”穴对脑缺血大鼠学习记忆能力的影响[J]. *泸州医学院学报*, 2009, 32(5): 497—499.
- [6] 包新民, 舒斯之. 大鼠脑立体定位图谱[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1999, 17—83.
- [7] Guldner FH, Ingham CA. Increase in postsynaptic density material in optic target neuron of the rat suprachiasmatic nucleus after bilateral enucleation[J]. *Neurosci Lett*, 1980, 17: 27—32.
- [8] Jones DG. Synaptic plasticity perforated synapses: their relevance for all understanding of abnormal synaptic organization[J]. *APMIS Suppl*, 1993, 40: 25—34.
- [9] 段小东, 余茜, 覃波, 等. 电针对脑梗死大鼠学习记忆能力和梗死侧海马CA3区突触结构的影响[J]. *中华物理与康复杂志*, 2010, 4(32): 262—265.
- [10] 王慧鹃, 李陈莉, 赵秀丽, 等. 大鼠脑缺血后突触超微结构的变化[J]. *解剖学杂志*, 2003, 26(6): 587—590.
- [11] Briones TL, Suh E, Jozsa L, et al. Behaviorally induced synaptogenesis and dendritic growth in the hippocampal region following transient global cerebral ischemia are accompanied by improvement in spatial learning[J]. *Exp Neurol*, 2006, 19(8): 530—538.
- [12] 梁荫基, 宿宝贵, 潘三强, 等. Morris水迷宫训练诱导大鼠海马轴突重塑[J]. *暨南大学学报*, 2009, 2(30): 158—159.
- [13] 李玲, 江山, 袁华, 等. 行为学训练对海马梗死大鼠齿状回区神经干细胞增殖能力的影响[J]. *中国康复医学杂志*, 2010, 25(11): 1035—1039.
- [14] 江山, 李玲, 袁华, 等. 行为学训练对大鼠海马梗死后齿状回区神经干细胞迁移能力的影响[J]. *中华物理医学与康复杂志*, 2006, 28(8): 510—514.
- [15] 李娅娜, 李玲, 李薇, 等. 行为学训练对海马损伤梗死大鼠齿状回区BrdU和Nestin表达的影响[J]. *中国卒中杂志*, 2009, 4(3): 201—206.
- [16] Liepert J. Transcranial magnetic stimulation in neurorehabilitation[J]. *Acta Neurochir Suppl*, 2005, 93: 71—74.
- [17] Ogiue-Ikeda M, Kawato S, Ueno S. Acquisition of ischemic tolerance by repetitive transcranial magnetic stimulation in the rat hippocampus[J]. *Brain Res*, 2005, 1037: 7—11.
- [18] Rosenmund C, Rettig J, Brose N. Molecular mechanisms of active zone function[J]. *Curr Opin Neurobiol*, 2003, 13: 509—519.
- [19] 张立丰, 刘汉伟, 刘晓丹, 等. 浅谈学习记忆中的突触可塑性[J]. *中国医药资讯*, 2011, 3(8): 435.
- [20] 王威, 唐伟, 孙忠人. 电针对拟老年性痴呆大鼠学习记忆和海马神经元突触形态可塑性的影响研究[J]. *中国实用神经疾病杂志*, 2010, 13(18): 29—30.
- [21] Mo W, Nicolson T. Both pre- and postsynaptic activity of nsf prevents degeneration of hair-cell synapses[J]. *PLoS One*, 2011, 6(11): 27146.
- [22] Ropiredy D, Ascoli GA. Potential synaptic connectivity of different neurons onto pyramidal cells in a 3D reconstruction of the rat hippocampus[J]. *Front Neuroinform*, 2011, 5: 5.