

丰富环境干预对慢性低灌注血管性痴呆大鼠学习记忆及突触素蛋白和微管相关蛋白的影响*

赵 晖¹ 王少烽² 张秋霞^{1,3} 王 蕾¹

摘要

目的:观察丰富环境干预对慢性低灌注血管性痴呆大鼠学习记忆能力、海马突触素(SYN)蛋白及微管相关蛋白-2(MAP-2)表达的影响。

方法:雄性SD大鼠随机分为正常对照组、模型组、丰富环境组。双侧颈总动脉永久性结扎制备慢性低灌注大鼠模型。丰富环境干预50d后,利用Morris水迷宫检测学习记忆功能;免疫组织化学法检测SYN、MAP-2的表达。

结果:慢性低灌注大鼠空间参考记忆能力下降,搜索隐藏平台的逃避潜伏期和游泳路径明显延长;定位记忆障碍,在空间探索实验中准确穿越平台位置的次数减少;工作记忆明显损害,寻找移动平台的逃避潜伏期及游泳路径比正常大鼠明显延长($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。海马CA1、CA3区SYN、MAP-2的免疫反应明显减弱($P < 0.01$)。丰富环境干预后,大鼠搜索隐匿平台的逃避潜伏期和游泳路径均有不同程度的缩短,准确穿越平台所在位置的次数比模型组增加;移动平台位置后,动物找到平台的时间和游泳路径明显比模型组缩短($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$);海马区SYN、MAP-2的积分光密度值均有不同程度增加($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。

结论:丰富环境干预可改善慢性低灌注大鼠学习记忆能力,其作用与上调海马SYN、MAP-2蛋白表达,提高突触可塑性有关。

关键词 血管性痴呆;丰富环境;康复;微管相关蛋白-2;突触素

中图分类号:R743.3, R493 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2012)-08-0687-05

Effects of enriched environment on learning and memory as well as synaptophysin protein and microtubule-associated protein in vascular dementia rats with chronic hypo-perfusion/ZHAO Hui, WANG Shaofeng, ZHANG Qiuxia, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2012, 27(8): 687-691

Abstract

Objective: To observe the effects of enriched environment(EE) intervention on learning-memory, synaptophysin(SYN) and microtubule-associated protein-2 (MAP-2) in vascular dementia (VD) rats with chronic hypo-perfusion.

Method: SD rats were divided into normal group, model group and EE group. The chronic hypo-perfusion model was replicated by permanent bilateral common carotid artery ligation. Learning-memory function examination assessed with Morris water-maze was performed at 50 days after EE intervention. SYN and MAP-2 were observed by immunohistochemistry combined with image analysis.

Result: The escape latency and swim distance for searching the hidden platform were obviously longer in model group in comparison with normal group. The frequency of rats going through the platform correctly decreased in model group. The escape latency and swim distance for searching the moving platform were obviously longer in model group in comparison with normal group ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). The immunoreaction of SYN and MAP-2 in

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2012.08.001

*基金项目:国家自然科学基金资助项目(30973782);北京市自然科学基金(7102014);北京市属高等学校人才强教深化计划“中青年骨干人才培养计划”项目(PXM2011014226)

1 首都医科大学中医药学院,北京,100069;2 北京市第八中学;3 通讯作者

作者简介:赵晖,女,副教授;收稿日期:2012-02-07

hippocampal CA1 and CA3 regions reduced significantly in model group ($P < 0.01$). The escape latency and swim distance for searching the hidden platform were obviously shorter in EE group in comparison with model group. The frequency of rats going through the platform correctly increased and the escape latency and swim distance for searching the moving platform were obviously shorter in EE group in comparison with model group. The integrated optical density (IOD) values of SYN and MAP-2 expressions increased markedly in EE group ($P < 0.01$ or $P < 0.05$).

Conclusion: EE intervention can improve the ability of learning-memory of rats in chronic hypo-perfusion status, it is related to the increasing of expressions of SYN and MAP-2 and synaptic plasticity.

Author's address Capital University of Medical Sciences, Beijing, 100069

Key word vascular dementia; enriched environment; rehabilitation; microtubule-associated protein; synaptophysin

血管性痴呆(vascular dementia, VaD)是由各种脑血管疾病引起的智能及认知功能障碍为特征的综合征,是痴呆中最常见的类型之一。在缺血性和出血性脑损害后进行及时有效的干预,能够在一定程度上防止其发展并减少血管性痴呆的发生^[1]。

神经系统损伤后,在修复过程中其结构或功能可发生动态变化以适应不断改变的内外环境,1947年Hebb提出丰富环境的概念,这一模式被用来研究环境对脑发育和脑损伤修复的影响^[2-4]。本研究旨在探讨丰富环境早期干预对慢性低灌注血管性痴呆大鼠认知功能的影响,并通过检测海马微管相关蛋白-2(microtubule associated protein-2, MAP-2)及突触素(synaptophysin, SYN)蛋白的表达,从突触可塑性角度探讨其作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 动物:SD大鼠,雄性,体重180—200g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,合格证号:SCXK(京)2007-0001。实验条件下自然饮食,适应环境3天后进行实验。

1.1.2 试剂与仪器:二步法抗兔免疫组化检测试剂盒(EnVision+HRP/Rb),MAP-2单克隆抗体购自北京康为世纪生物科技有限公司;突触素单克隆抗体购自Epitomics公司。Morris水迷宫由中国医学科学院丰富环境干预研究所研制;德国LEICA ASP300全自动脱水机;日本Nikon生物显微镜;日本NIS-Elements Basic Research图像采集分析系统。

1.2 实验方法

1.2.1 慢性低灌注大鼠模型制备:参考文献方法^[1],

大鼠麻醉后,仰卧固定,颈正中去毛消毒后,颈正中切口,分离双侧颈总动脉,双重丝线结扎双侧颈总动脉(common carotid artery, CCA),缝合伤口。

1.2.2 饲养环境设置:丰富环境:大鼠饲养在大笼子(100cm × 60cm × 40cm)内,每笼8只;笼中设置各种可操纵的物品和“玩具”,包括支架、秋千、爬梯、斜坡、水管、积木、乒乓球等,其中隧洞和滚轮是必须具备的玩具;多点放置食物和水;玩具每周更换2次。标准环境:标准大鼠笼(28cm × 18cm × 15cm),每笼3只,仅放置水、食物和垫料。

1.2.3 分组及环境干预:45只雄性SD大鼠随机分为3组,正常对照组(12只):不建立模型,不干预;模型组(17只):建立血管痴呆模型,但不给干预;丰富环境组(16只):建立血管痴呆模型,给予丰富环境干预。手术后第24h开始干预,每天夜间(20:00—次日8:00)置于丰富环境饲养笼中12h,干预结束仍旧回标准饲养笼中饲养,总干预时间为50d。模型大鼠及正常组均饲养于标准环境。

1.2.4 学习记忆功能的测定:脑缺血第52天利用Morris水迷宫对各组大鼠进行学习记忆能力检测。因手术后部分动物死亡,模型组有11只大鼠、丰富环境干预组有13只大鼠参加各项指标测试。①空间参考记忆能力的测试。平台放在水池西南象限(第Ⅲ象限)正中距池壁22cm处。隐藏平台获得实验:每只大鼠每天测试4次,记录大鼠在90s内成功进驻平台所需时间(即逃避潜伏期)和游泳路径,计算每天各组大鼠寻找平台的逃避潜伏期和游泳路径的平均值。空间搜索实验:第5天撤除平台,观察并记录:30s内各组大鼠在原平台象限(第Ⅲ象限)游泳时间与总游泳时间比值(tP/tT);在原平台象限游

泳路程占总游泳路程比值(dP/dT);各组大鼠穿过原平台所在位置的次数,即穿环次数。②工作记忆能力的测试。迷宫设置同前,空间搜索实验结束后,移动平台位置,将平台分别放置第 I、II、IV象限,记录大鼠寻找平台的时间(逃避潜伏期)和游泳路径。

1.2.5 突触结构蛋白 SYN、MAP-2 免疫组织化学染色。按照 SP 免疫组织化学染色法进行,切片常规脱蜡复水,柠檬酸缓冲液(pH=6.0)进行微波抗原修复;3%过氧化氢,室温,避光,保湿盒中处理 10min 以灭活内源酶;SYN(抗体稀释浓度 1:100)和 MAP-2(抗体稀释浓度 1:200)37℃ 孵育 2h, PBS 冲洗;辣根酶标记抗兔 IgG(1:2000)80 μl 室温孵育 60min, DAB 显色 6min;蒸馏水洗涤终止显色,苏木素复染 5min,常规脱水、透明、封片,阴性对照为用 PBS 代替一抗。采集海马 CA1、CA3 区各 3 个观察视野的 MAP-2、SYN 阳性表达细胞,统计每个视野下阳性表达的积分光密度(integrated optical density, IOD)以反映 MAP-2、synapsin I 的免疫染色强度。

1.3 统计学分析

运用 SPSS 10.0 进行统计与分析,学习记忆检测数据采用重复测量的单因素方差分析;图像分析数据采用单因素方差分析, LSD 检验比较组间差异。

2 结果

2.1 对慢性低灌注大鼠学习记忆能力的影响

2.1.1 隐藏平台获得实验:各组大鼠第 1 天寻找平台的时间和路径未见明显差异,在第 2、3、4 天游泳训练时间,模型组大鼠搜寻隐藏平台的逃避潜伏期及游泳路径明显延长,和正常组相比差异显著($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$);丰富环境组在第 3 天训练时段搜索平台的游泳路径,及第 4 天搜索平台的逃避潜伏期明显减少,与模型组差异显著($P < 0.01$,表 1—2。)

2.1.2 空间搜索实验。撤离平台后,各组大鼠在原平台象限游泳时间与总游泳时间的比值(tP/tT)及平台象限的游泳距离占总游泳距离的比值(dP/dT)均没有显示出显著性差异。但模型组大鼠准确穿越原平台所在位置的次数明显比正常组减少($P < 0.01$),丰富环境组准确穿越原平台所在位置的次数比模型组明显增加($P < 0.01$, 表 3。)

2.1.3 工作记忆测试:当平台移动到第 I 象限时,模型大鼠搜索平台的时间和路径比正常组明显延长($P < 0.01$);和模型组相比,丰富环境干预组大鼠搜索平台的时间和游泳路径均明显缩短($P < 0.01—0.05$)。当平台移动到第 II 象限时,模型组搜索平台的时间明显比正常组增加($P < 0.05$)。当平台放置于第 IV 象限时,模型大鼠搜索平台的路径明显比正常组延长($P < 0.05$),丰富环境干预组搜索平台的游泳路径明显比模型组缩短($P < 0.05$,见表 4—5。)

2.2 对突触体素表达的影响

正常组海马 SYN 免疫反应产物为棕黄色的点

表 1 各组大鼠在隐藏平台获得实验中的逃避潜伏期比较

组别	例数	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天
正常组	12	82.28 ± 17.46	51.05 ± 23.97 ^②	22.53 ± 14.65 ^①	12.81 ± 6.90 ^①
模型组	11	84.75 ± 12.76	71.57 ± 18.29	45.30 ± 19.56	40.03 ± 23.35
丰富环境组	13	85.83 ± 15.04	54.69 ± 23.98	36.66 ± 19.15	24.60 ± 12.06 ^①

与模型组比较:① $P < 0.01$;② $P < 0.05$

表 2 各组大鼠在隐藏平台获得实验中的游泳路径比较

组别	例数	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天
正常组	12	1002.09 ± 200.68	788.87 ± 444.84 ^②	436.97 ± 284.22 ^①	236.59 ± 110.33 ^①
模型组	11	1049.35 ± 235.59	975.50 ± 385.39	838.46 ± 245.90	568.52 ± 355.24
丰富环境组	13	1019.70 ± 381.69	831.67 ± 368.33	546.96 ± 339.19 ^①	438.42 ± 246.29

与模型组比较:① $P < 0.01$;② $P < 0.05$

表 3 各组大鼠空间探索能力比较

组别	例数	tP/tT(%)	dP/dT(%)	穿环次数
正常组	12	0.29 ± 0.06	0.28 ± 0.09	1.33 ± 0.49 ^①
模型组	11	0.23 ± 0.08	0.22 ± 1.00	0.45 ± 0.52
丰富环境组	13	0.24 ± 0.09	0.27 ± 0.18	1.23 ± 0.44 ^①

与模型不干预组比较:① $P < 0.01$

表 4 各组大鼠工作记忆测试实验中的逃避潜伏期比较

组别	例数	I 象限	II 象限	IV 象限
正常组	12	21.55 ± 16.21 ^①	15.21 ± 6.44 ^②	26.89 ± 17.93
模型组	11	44.37 ± 18.92	30.29 ± 21.30	30.65 ± 21.06
丰富环境组	13	25.48 ± 21.80 ^②	21.26 ± 16.81	24.22 ± 21.38

与模型不干预组比较:① $P < 0.01$;② $P < 0.05$

表5 各组大鼠工作记忆测试实验中的游泳路径比较

($\bar{x} \pm s, \text{cm}$)

组别	例数	I 象限	II 象限	IV 象限
正常组	12	937.58 ± 764.59 ^①	864.62 ± 375.77 ^①	1008.66 ± 795.62 ^②
模型组	11	2238.77 ± 963.25	1380.40 ± 976.93	1772.23 ± 536.21
丰富环境组	13	1204.02 ± 1103.02 ^①	1086.26 ± 905.43	1115.84 ± 776.13 ^②

与模型组比较:① $P < 0.01$;② $P < 0.05$

状或细颗粒状物,颗粒较粗,颜色较深,分布密集,一些颗粒围绕在细胞周围,衬托出细胞轮廓;模型组大鼠海马 CA1、CA3 区 SYN1 的免疫反应明显减弱, SYN1 表达的积分光密度值明显降低($P < 0.01$);和模型组相比,丰富环境组海马 CA1 区 SYN1 积分光密度值明显增加($P < 0.01$)。SYN1 图像分析结果见表 6;免疫组织化学染色照片见图 1。

2.3 丰富环境干预对微管相关蛋白-2 表达的影响

正常大鼠海马结构 CA1-3 区内,锥体细胞胞体在胞膜下出现 MAP-2 阳性反应,辐射层和腔隙层内可见密集、粗大、丛状的 MAP-2 免疫阳性的神经元

突起;模型组大鼠 CA1、CA3 区 MAP-2 免疫阳性表达明显低于正常组($P < 0.01$);丰富环境干预后,慢性脑缺血大鼠海马 MAP-2 表达较模型组大鼠增加($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。图像分析结果见表 7;免疫组织化学染色照片见图 2。

3 讨论

双侧颈总动脉永久性结扎是公认的研究慢性低灌注的动物模型,主要模拟人类由于慢性脑供血不足,逐渐出现学习记忆缺损的病理过程^[5]。空间记忆是依赖于海马的陈述性记忆,慢性脑缺血 50d 后,

表6 各组大鼠海马 SYN1 积分光密度值比较 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	CA1 区	CA3 区
正常组	43.22 ± 14.09 ^①	41.82 ± 17.49 ^①
模型组	18.29 ± 5.22	20.43 ± 7.38
丰富环境组	40.99 ± 14.94 ^①	37.79 ± 14.43

与模型组比较:① $P < 0.01$

表7 各组大鼠海马 MAP-2 积分光密度值比较 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	CA1 区	CA3 区
正常组	93.19 ± 37.86 ^①	81.14 ± 54.03 ^①
模型组	37.53 ± 8.70	41.62 ± 9.30
丰富环境组	80.04 ± 32.83 ^①	67.73 ± 16.43 ^②

与模型组比较:① $P < 0.01$;② $P < 0.05$

图1 各组大鼠海马 CA1 区 SYN 的表达

(免疫组化染色, ×200)

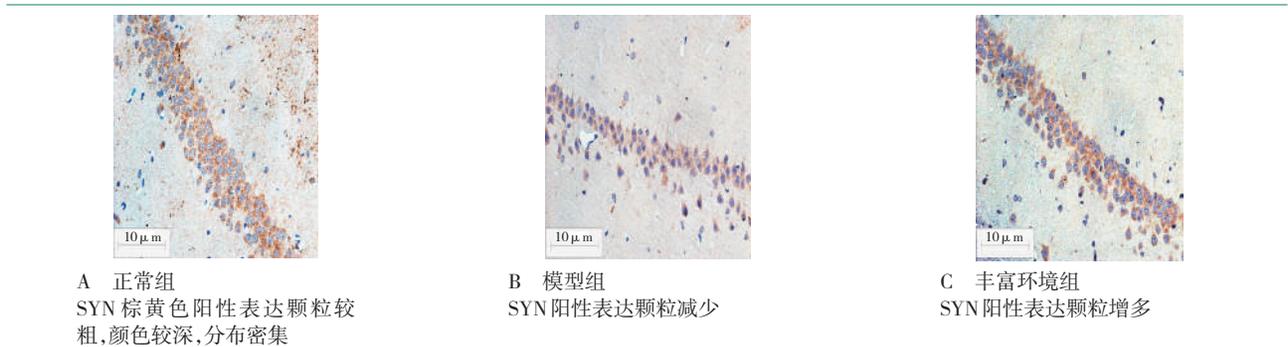


图2 各组大鼠海马 CA1 区 MAP-2 的表达

(免疫组化染色, ×200)



大鼠学会寻找固定位置的能力明显下降,提示大鼠空间参考记忆明显受损,并在空间探索实验中定位记忆障碍,准确穿越平台的次数减少。按照 Frick 的方法^[6],我们在用固定位置平台测试空间参考记忆之后,移动平台,检测大鼠的工作记忆,结果显示,模型大鼠搜索移动平台的能力明显较正常大鼠降低,表明工作记忆也明显损害。研究表明,早期给予丰富环境刺激可在一定程度上提高正常动物以及各种脑损伤动物的感觉运动功能和学习记忆能力^[7-8]。本实验在大鼠双侧颈总动脉结扎 24h 后,实施丰富环境干预,大鼠空间参考记忆、工作记忆能力明显增强,结果肯定了丰富环境干预对认知功能的早期康复作用。

突触是实现神经元信息传递的基本结构单位,突触损伤是神经功能退行性疾病的早期的、共同的病理改变,与认知损害联系密切^[9]。SYN 作为突触重塑的特异性分子标志物,广泛用来追踪体内和离体的突触发生^[10],可准确反映突触的分布和密度。MAP-2 作为突触后的标志蛋白,其表达与树突的生长、分支和重塑相一致,在调节突触可塑性方面起着关键的作用^[11]。本结果显示,慢性低灌注大鼠海马 SYN、MAP-2 阳性表达均明显降低,结合学习记忆功能检测结果,提示慢性低灌注致学习记忆功能损害与海马突触数量及传递功能的改变关系密切。

越来越多的研究证实,非侵入性的环境刺激对减轻认知障碍和维持组织完整是有益的^[12]。丰富环境对行为、记忆的作用具有神经解剖学和分子生物学基础。丰富环境能增加神经干(祖)细胞增殖和分化能力,同时还具有神经保护作用,通过选择性转录神经递质相关基因和增加神经营养因子的产生,保持突触的持续可塑性,提高中枢神经系统的环境适应能力,降低再次受损的危险性^[13]。本次实验结果也显示,在慢性脑缺血早期进行丰富环境干预,能明显提高动物学习记忆功,增强海马组织 SYN、MAP-2 蛋白表达,说明环境刺激可能促进神经组织的突触发生,重建新的突触联系。

临床实验进一步证实,颅脑损伤患者在采用营养神经等药物治疗及肢体功能训练的同时,用图画装点房间,利用录音、录像、画册提供色彩、声、光刺激患者,患者记忆力评分明显高于单纯采用营养

神经等药物治疗及肢体功能训练的患者^[14]。神经退行性疾病的康复治疗是神经康复领域的一大难题。随着社会老龄化,脑血管病的高发率,我国血管性痴呆的患病率逐年上升,约 20%—40% 的脑卒中患者伴有程度不同的智能障碍^[14],故应重视血管性痴呆的预防和治疗。丰富环境的研究应用,以及药物联合环境干预的治疗理念,可能会为神经康复带来新的希望^[15]。

参考文献

- [1] 田金洲.血管性痴呆[M].北京:人民卫生出版社,2003.598—607.
- [2] 贾子善.努力探索脑卒中康复的最佳环境[J].中国康复医学杂志,2007,22(7):577.
- [3] 贾子善,李聪元,闫桂芳,等.康复治疗对脑卒中患者脑的结构可塑性的影响[J].中华物理医学与康复杂志,2004,26(10):634—636.
- [4] 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]. *Progress in Neurobiology*, 2004, 72(3):167—182.
- [5] 冯丽君,张楠,程焱,等.阿尔茨海默病和血管性痴呆患者认知功能和精神行为症状[J].中国心理卫生杂志,2011,25(5):334—338.
- [6] Frick KM, Baxter MG, Markowska AL, et al. Age-related spatial reference and working memory deficits assessed in the water maze[J]. *Neurobiol Aging*, 1995, 16(2):149—160.
- [7] Jin K, Wang X, Xie L, et al. Evidence for stroke-induced neurogenesis in the human brain[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(35):13198—13202.
- [8] Johansson BB. Functional and cellular effects of environmental enrichment after experimental brain infarcts[J]. *Restor Neurol Neurosci*, 2004, 22(3—5):163—174.
- [9] Gornicka-Pawlak E, Jabłońska A, Chyliński A, et al. Housing conditions influence motor functions and exploratory behavior following focal damage of the rat brain[J]. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 2009, 69(1):62—72.
- [10] Dahlqvist P, Rönnbäck A, Bergström SA, et al. Environmental enrichment reverses learning impairment in the Morris water maze after focal cerebral ischemia in rats[J]. *European Journal of Neuroscience*, 2004, 19(8):2288—2298.
- [11] Francis PT, Perry EK. Cholinergic and other neurotransmitter mechanisms in Parkinson's disease, Parkinson's disease dementia, and dementia with Lewy bodies[J]. *Mov Disord*, 2007, 22(Suppl 17): S351—357.
- [12] Derksen MJ, Ward NL, Hartle KD, et al. MAP2 and synaptophysin protein expression following motor learning suggests dynamic regulation and distinct alterations coinciding with synaptogenesis[J]. *Neurobiol Learn Mem*, 2007, 87(3):404—415.
- [13] Laviola G, Hannan AJ, Macrì S, et al. Effects of enriched environment on animal models of neurodegenerative diseases and psychiatric disorders[J]. *Neurobiology of Disease*, 2008, 31(2):159—168.
- [14] 张峰,季建伟,李子强,等.丰富环境与强化性学习训练促进颅脑损伤患者的记忆功能恢复[J].中国临床康复,2005,9(16):88—89.
- [15] 谢鸿宇,吴毅.丰富环境在神经退行性疾病中的应用新进展[J].中国康复医学杂志,2011,6(26):2592—2596.