

丰富环境干预强度对脑缺血大鼠肢体功能及神经生长相关蛋白的影响*

张 琪¹ 张秋霞¹ 王 蕾¹ 赵 晖^{1,2} 王海征¹

摘要

目的:探讨丰富环境(EE)的不同干预强度对脑缺血大鼠肢体运动感觉功能及神经病理学的影响,并从神经可塑性角度探讨其机制。

方法:线栓法建立永久性大脑中动脉缺血(MCAO)模型,随机分为5组:假手术组、模型组,以及丰富环境干预1h组、12h组、24h组。横木行走、抓握力量、触觉刺激实验评价肢体运动感觉功能的变化;尼氏染色结合图像分析技术观察皮质运动感觉区神经元及尼氏体的病理变化;Western blot检测神经生长相关蛋白GAP-43的表达。

结果:每天1h丰富环境干预可增加缺血大鼠触觉敏感度($P<0.05$),但对横木行走能力、前肢抓握力量及神经病理学没有明显影响;12或24h丰富环境干预,可增强肢体运动感觉功能,增加皮质运动感觉区神经元数量,减轻尼氏体脱落程度,上调GAP-43蛋白表达,较模型组有显著性差异($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。

结论:适宜强度丰富环境干预可促进脑缺血大鼠肢体感觉功能康复,其机制可能与上调GAP-43蛋白表达和促进神经元轴突再生有关。

关键词 丰富环境;康复;神经可塑性;脑缺血

中图分类号:R493;R743.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2012)-09-0813-05

Effects of enriched environment intervention of different intensities on limb functional recovery and neuron growth associated protein expression following cerebral ischemia in rats/ZHANG Qi,ZHANG Qiuxia,WANG Lei, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2012, 27(9): 813—817

Abstract

Objective:To observe the effects of enriched environment(EE) intervention of different intensities on sensorimotor functional and neuropathological recovery after cerebral ischemia in rats, and further to explore the mechanism of neural plasticity.

Method: Permanent middle cerebral artery occlusion(MCAO) model was replicated by string ligation, and Sprague-Dawley rats were divided into 5 groups: a sham-operation group, and a model group were reared in standard cage and other 3 groups were reared in an EE cages lasted 1h, 12h and 24h daily respectively for 20d ($n=17$ rats/group). The limb sensorimotor function was evaluated with beam-walking, bar-grasping and tactile stimulation test at 20d post ischemia; the pathological changes of neurons and Nissl bodies of sensorimotor region of cortex were observed by Nissl staining and image analysis technology. Western blot method was used to evaluate the expression of nerve growth associated protein-43(GAP-43) of ischemia cortex 20d post ischemia.

Result:EE intervention for 12h and 24h daily could promote the limb sensorimotor functional recovery of ischemia rats, and increase the number of neurons, relieve the Nissl bodies depigmentation and upregulate the expression of

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2012.09.006

*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 通讯作者

作者简介:张琪,女,在读硕士研究生; 收稿日期:2012-02-07

GAP-43 in sensorimotor region of cortex. But EE intervention for 1h could promote the recovery of tactile sensitivity or fine motor function only, compared with 12h and 24h groups there was no significant difference of beam-walking ability, bar-grasping evaluating and pathological changes in sensorimotor region of cortex($P<0.01$ or 0.05).

Conclusion: EE intervention of a certain intensities could promote the limb sensorimotor functional recovery, the possible mechanisms were protecting the neurons, increasing the expression of GAP-43 and promoting axonal regeneration.

Author's address School of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing, 100069

Key word enriched environment; rehabilitation; neural plasticity; cerebral ischemia

脑卒中后神经功能康复不仅受到生理性因素、病理因素的影响,还受到环境因素的影响。早在1947年,Hebb等^[1]学者就注意到理想的后天环境对动物和人类脑发育及行为表现有积极作用,创立了环境因素对动物行为影响的研究方法,提出丰富环境刺激能促进脑功能的发挥。丰富环境(enriched environment, EE)是指存在多个干预因子的环境,是复杂的无生命物与社会刺激的复合体。大量研究证实,丰富环境干预对脑发育和脑损伤修复具有显著的促进作用^[2]。但缺乏丰富环境干预强度对脑梗死大鼠神经功能及其机制的影响的研究。本实验采用大鼠大脑中动脉缺血(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型,观察丰富环境的不同干预强度对脑梗死大鼠神经功能及神经病理学的影响,为临床应用环境干预策略提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物: 68只SPF级雄性SD大鼠,体质量240—260g,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)2006—0009。饲养在首都医科大学实验动物中心,许可证号:SYXK(京)2005—0022。实验条件下自然饮食,适应环境3d后进行实验。

1.1.2 主要试剂: 兔抗鼠神经生长相关蛋白(growth associated protein, GAP-43)兔GAP-43单克隆抗体(GAP-43 rabbit monoclonal antibody)、抗GAPDH单克隆抗体(anti-GAPDH monoclonal antibody)、羊抗兔IgG(anti-rabbit IgG) 购自Epitomics公司;Tis-组织蛋白抽提试剂、BCA蛋白定量试剂盒,均购自北京康为世纪生物科技有限公司。

1.1.3 主要仪器: YLS-12A大小鼠抓力测试仪,山东科学技术设备站生产;AEG-220电子分析天平(日本);centrifuge 5810R离心机:美国Eppendorf公司;MODEL 680酶标仪:美国BIO-RAP公司。LEICA ASP300全自动脱水机:德国;LEICA RM2235轮转式石蜡切片机:德国;LEICA HI1210摊片机:德国;LEICA EG1150H包埋机:德国;Nikon生物显微镜:日本;NIS-Elements Basic Research 图像采集分析系统:日本。

1.2 实验方法

1.2.1 大鼠永久性大脑中动脉缺血(pMCAO)模型的制备: 依据参照文献[3]稍加改进制作大鼠中动脉永久性缺血模型。大鼠用10%水合氯醛0.35g/kg腹腔注射麻醉,仰卧位固定,分离右侧颈总动脉、颈内动脉及颈外动脉,结扎颈外动脉与颈总动脉,以动脉夹夹闭颈内动脉远心端后,于颈外动脉与颈内动脉分叉处作一切口,从切口处插入直径0.24mm,头端直径0.27mm的光滑钓鱼尼龙线,插入栓线约18mm处,有阻力感时停止进线并记录缺血时间。

1.2.2 饲养环境: 标准环境: 大鼠饲养于28cm×18cm×15cm的标准大鼠笼,3只/笼,大鼠笼仅放置水、食物和垫料。

丰富环境: 大鼠饲养在大笼(100cm×60cm×40cm)内,每笼8—10只大鼠,笼中摆放木盒、管道作为动物躲避场所,设置各种可操纵的物品和“玩具”,如秋千、爬梯、滚轮、平衡木;多点放置食物和水,笼具中摆放的物品每日更换位置,玩具每周更换2次。

1.2.3 动物分组及丰富环境干预方法: 将造模成功、符合入选条件(大鼠术后2h苏醒,右眼出现Horner征,左侧前爪不能完全伸展,行走时身体倒向左侧及左侧肢体偏瘫并存活)68只大鼠纳入实验。随机分

为:模型不干预组以及丰富环境干预1h组、12h组、24h组,每组17只大鼠。模型不干预组饲养于标准环境。丰富环境干预组大鼠均在脑缺血24h后,开始丰富环境干预。24h干预组大鼠全天均处于丰富环境饲养笼中;1h及12h干预组每天夜间(20:00—次日8:00)分别置于丰富环境饲养笼中1h和12h,干预结束,在标准饲养笼中饲养。另设假手术组10只动物,该组大鼠麻醉后,仅暴露颈内外动脉分支,不闭塞大脑中动脉,术后饲养于标准环境。各组大鼠自由摄食、饮水。造模后20d进行各项指标检测。

1.2.4 神经功能检测:①横木行走实验:横木宽2.5cm,长120cm,厚2.5cm,距地面60cm水平悬空放置,横木一端连接一个暗盒(长25cm,宽22cm,高18cm),术前训练2d,2次/d,让所有大鼠都能通过横木走进暗盒。评分标准:0分,通过横木,能够保持平衡且大鼠4只爪子均位于木条表面;1分,通过横木,大鼠爪子抓住平衡木的边缘;2分,抓住平衡木,且一肢体自平衡木垂下;3分,两个肢体自平衡木垂下,或在平衡木上旋转(>60s);4分,试着在平衡木上维持平衡却跌下来(>40s);5分,试着在平衡木上维持平衡却跌下来(>20s);6分,自平衡木上跌落(<10s)。②抓握力量测试:评价脑缺血后前肢抓握力量的变化。大鼠双前肢抓住拉力测试仪的拉力横杆,测试者左手先固定拉力板,右手向后拉住鼠尾,松开左手,右手向后拉拽大鼠身体,大鼠为了不从横杆滑脱会抓握横杆不放,直至滑脱,读取使大鼠滑脱的最大拉力值,每只动物测2次,取平均值。

③触觉刺激实验:评价躯体感觉和精细运动执行功能。用相同面积(0.7cm×0.7cm)的医用胶布贴在大鼠左前肢腕部腹侧面作为触觉刺激,记录大鼠揭除胶布的潜伏期。术前训练2d,2次/d,使大鼠能在30s内完成揭除胶布的动作。

1.2.5 脑组织病理形态学观察:各组动物完成行为学检测,每组随机取5只大鼠,麻醉后,进行4%多聚甲醛磷酸缓冲液(pH7.4)心内灌注固定,内固定充分后,开颅取全脑,冠状位取视交叉向尾端3—4mm组织块,投入相同固定液固定1周,常规石蜡包埋,切片,进行Nissl染色,在Olympus光学显微镜下观察各组切片病理形态学改变,在每张切片缺血侧(右侧)梗死灶周围采集皮质运动感觉区相互不重叠的4个

视野,利用图像采集系统进行存活神经元计数,并对神经元尼氏体进行图像分析,根据积分光密度值(integrated optical density, IOD)判断神经细胞尼氏小体的含量。

1.2.6 GAP-43蛋白表达的检测:Western blot检测大鼠GAP-43的表达,每组随机取5只大鼠,麻醉后冰浴取脑组织,快速分离缺血侧大脑感觉运动皮质,Tris-组织蛋白抽提试剂提取组织蛋白50mg,BCA法进行蛋白定量。加入5×SDS-PAGE上样缓冲液煮沸5min,制备3μg/μl样本;用10% SDS-PAGE分离后,350mA恒流湿法4℃电转移80min,5%脱脂奶粉室温封闭1h;兔抗大鼠GAP-43(1:20000)、GAPDH(1:5000;Epitomics公司)单克隆抗体4℃中孵育过夜;TBST洗膜3次,二抗山羊抗兔IgG-辣根过氧化物酶孵育60min;TBST洗膜3次,ECL发光、显影。Image Quant TL软件分析蛋白印迹显影图片,读取条带积分光密度值。以GAPDH作为内参。

1.3 统计学分析

SPSS13.0进行数据统计分析,方差分析LSD法进行组间比较, $P<0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 对脑缺血大鼠肢体运动感觉功能的影响

脑缺血大鼠横木行走能力、前肢抓握力量及触觉均明显受损,较假手术组有显著性差异($P<0.01$)。每天12h或24h丰富环境干预可提高大鼠横木行走能力,增强前肢抓握力量,并增加触觉敏感度,与模型大鼠相比,差异显著($P<0.01$);每天1h丰富环境干预也可提高触觉敏感度,揭除胶布潜伏期较模型大鼠明显缩短($P<0.05$);但对横木行走能力、前肢抓握力量没有明显影响(见表1)。

2.2 对脑缺血大鼠皮质运动感觉区神经元损伤的影响

Nissl染色结果显示(图1),脑缺血20d,模型不干预组大鼠皮质运动感觉区神经元轮廓模糊,部分胞质自溶,颗粒脱失,胞核碎裂消失,尼氏小体含量明显减少。丰富环境干预后,各组大鼠脑组织病理损伤程度均有不同程度减轻,损伤区正常与坏死细胞相间存在。图像分析结果显示:每天丰富环境干预12h、24h,皮质运动感觉区结构完整可辨的神经

表1 各组大鼠肢体运动感觉功能比较 (x±s)

组别	例数	横木行走能力评分	前肢抓握力量(g)	触觉刺激潜伏期(s)
假手术组	10	0.00 ± 0.00 ^①	1494.73 ± 300.85 ^①	22.90 ± 5.72 ^①
模型不干预组	10	4.20 ± 0.92	830.07 ± 280.78	223.00 ± 60.03
丰富环境干预1h组	11	3.45 ± 1.21	1061.56 ± 119.31	182.27 ± 33.34 ^②
丰富环境干预12h组	12	2.75 ± 1.60 ^①	1137.28 ± 392.39 ^②	146.92 ± 38.07 ^①
丰富环境干预24h组	11	2.09 ± 1.38 ^①	1151.29 ± 260.52 ^②	173.18 ± 14.63 ^①

与模型不干预组比较:①P<0.01;②P<0.05

元数量较模型不干预组大鼠明显增多,差异显著(P<0.01);尼氏体脱失程度减轻,尼氏小体着色较深,阳性表达IOD明显高于模型组(P<0.01)。但大鼠每天接受丰富环境干预1h,神经元存活数目及神经元内尼氏小体含量虽有增多趋势,但无显著性意义。

2.4 丰富环境对脑缺血大鼠皮质运动感觉区神经生长相关蛋白GAP-43表达的影响

丰富环境干预后,各组大鼠缺血侧脑组织皮质运动感觉区突触结构蛋白GAP-43表达均有不同程度增加,特别是每天丰富环境干预12h、24h,可明显增强GAP-43蛋白的表达,和模型组相比,差异显著(P<0.05—0.01);但每天1h丰富环境干预对GAP-43蛋白表达的影响和模型组相比没有显著性差异(表3,图2)。

表2 各组大鼠缺血脑组织皮质运动感觉区神经元损伤比较 (x±s)

组别	例数	神经元细胞数(n·mm ⁻²)	神经元尼氏小体(10D)
假手术组	5	97.65 ± 12.49 ^①	40.67 ± 16.60 ^①
模型不干预组	5	43.20 ± 9.61	26.78 ± 9.26
丰富环境干预1h组	5	46.10 ± 6.29	31.55 ± 19.08
丰富环境干预12h组	5	64.00 ± 6.97 ^①	45.75 ± 6.87 ^①
丰富环境干预24h组	5	59.05 ± 8.03 ^①	47.20 ± 10.01 ^①

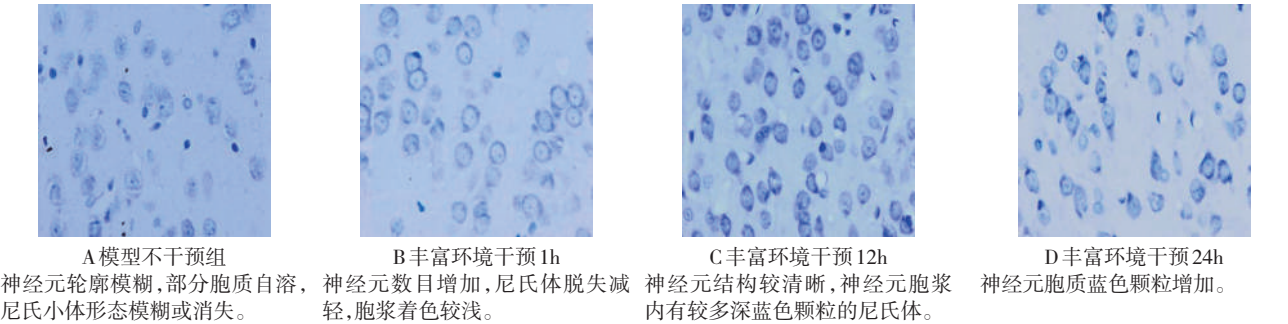
①与模型不干预组比较P<0.01

表3 各组大鼠皮质运动感觉区突触结构蛋白GAP-43的表达 (x±s)

组别	例数	GAP-43/GAPDH(10D)
假手术组	5	1.31 ± 1.03
模型不干预组	5	0.76 ± 0.20
丰富环境干预1h组	5	1.09 ± 0.50
丰富环境干预12h组	5	1.62 ± 0.55 ^②
丰富环境干预24h组	5	1.78 ± 0.75 ^①

与模型不干预组比较:①P<0.01;②P<0.05

图1 各组大鼠皮质锥体细胞尼氏体染色 (Nissl染色, ×400)



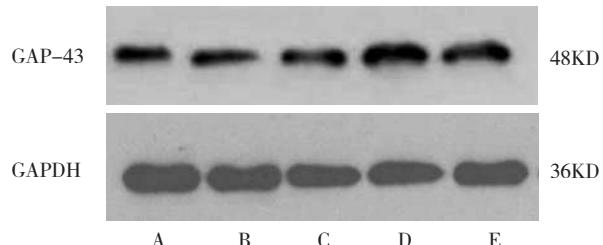
3 讨论

根据啮齿动物习性制备的丰富环境模型是一种广泛采用的康复治疗模型,相对于标准的动物饲养环境来说,这种环境具有更大的活动空间、更多的自发运动和学习机会。极大地提高了动物获取环境中的物理性刺激和社会性刺激的可能性^[4-5]。本实验结果显示,每天12或24h丰富环境干预可提高动物横木行走能力、前肢抓握力量及精细运动执行能力,

增加皮质运动感觉区神经元数量,减轻尼氏体脱失程度,对神经细胞有一定的保护作用。每天1h丰富环境干预,缺血大鼠触觉敏感度增加,但肢体运动功能及神经病理损伤程度较不干预大鼠没有明显差异。提示,丰富环境可促进脑缺血大鼠运动感觉功能的康复,但要达到一定的干预强度。

脑损伤后的功能康复取决于脑内神经网络的可塑性。研究发现,丰富环境可引起一系列的可塑性

图2 Western blot检测大鼠皮质运动感觉区
GAP-43蛋白的表达



GAPDH 为内参, A 为假手术组, B 为模型组, C 为丰富环境干预 1h 组, D 为丰富环境干预 12h 组, E 为丰富环境干预 24h 组

相关分子的表达变化^[6-7]。GAP-43 在神经纤维的生长、发育、轴突再生以及突触功能的维持等方面起着重要作用^[8], 并成为研究神经生长发育和损伤修复等神经可塑性的首选探针^[9]。本次实验观察到, 脑缺血 20d 后, 大鼠皮质组织 GAP-43 的表达有降低趋势, 结合病理形态学观察结果, 其原因可能与以下因素有关: ①脑缺血损伤后, 神经元的变性坏死, 导致轴突终末发生变性、丢失; ②由于缺血导致神经元物质代谢和蛋白质合成能力下降, 轴浆运输障碍, 使轴突终末 GAP-43 免疫反应产物减少。每天丰富环境干预 12h、24h, 可明显增强 GAP-43 蛋白的表达, 促使皮质运动感觉区神经细胞的轴突发芽及突触重建。研究表明, 丰富环境可通过增加多感官刺激、自愿物理运动、社会性刺激及相互交往的机会, 从而引起动物中枢神经系统在生化、形态学以及功能上的改变, 增加神经干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^[10-11]。

丰富环境无疑是一个有效、低风险、低成本的促进脑损伤的康复手段。但目前尚缺乏丰富环境在脑卒中患者康复中的应用研究报道。如何构筑脑卒中患者的丰富康复环境还不十分清楚。我们期望通过探讨丰富环境对脑缺血损伤后神经功能重建的作用

及其规律, 推进环境干预在脑损伤康复中的应用, 为环境疗法的临床适时选择性应用及有机结合运用提供理论基础和实验依据。

参考文献

- [1] 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.
- [2] Laviola G, Hannan AJ, Macri 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.
- [3] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniotomy in rats[J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91.
- [4] Jin K, Wang X, Xie L, et al. Evidence for stroke-induced neurogenesis in the human brain[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(35): 13198-13202.
- [5] Johansson BB. Functional and cellular effects of environmental enrichment after experimental brain infarcts[J]. *Restor Neurol Neurosci*, 2004, 22(3-5): 163-174.
- [6] 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.
- [7] Johansson BB. Functional and cellular effects of environmental enrichment after experimental brain infarcts[J]. *Restor Neurol Neurosci*, 2004, 22(3-5): 163-174.
- [8] Casoli T, Stefano GD, Fattoretti P, et al. GAP-43 mRNA detection by in situ hybridization, direct and indirect in situ RT-PCR in hippocampal and cerebellar tissue sections of adult rat brain[J]. *Micron*, 2003, 34(8): 415-422.
- [9] Carulli D, Buff A, Strata P. Reparative mechanisms in the cerebellar cortex[J]. *Prog Neurobiol*, 2004, 72(6): 373.
- [10] Döbrössy MD, Dunnett SB. Environmental housing and duration of exposure affect striatal graft morphology in a rodent model of Huntington's disease[J]. *Cell Transplant*, 2008, 17(10-11): 1125-1134.
- [11] Nithianantharajah J, Hannan AJ. Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2006, 9: 697-709.