

丰富环境及康复训练对创伤性脑损伤大鼠神经功能恢复的影响*

李娅娜¹ 李玲^{1,2} 江山¹ 王会会¹ 谢红萍¹

摘要

目的:研究丰富环境及康复训练对创伤性脑损伤大鼠神经功能恢复的影响。

方法:成年SD大鼠制作创伤性脑损伤大鼠模型,随机分为单纯脑损伤组、丰富环境组、行为训练组、运动训练组及综合康复训练组,每组10只,另设正常对照组10只。单纯脑损伤组不予任何处理,置于标准笼饲养;丰富环境组给予丰富环境笼饲养,不予训练;行为训练组给予水迷宫训练,置于标准笼饲养;运动训练组给予行走、平衡、抓握训练,置于标准笼饲养;综合康复训练组给予丰富环境笼饲养,并给予水迷宫及行走、平衡、抓握训练。各组大鼠于损伤后第3天、7天、14天、21天分别给予运动及学习记忆功能评定。

结果:脑损伤后第3天,各组大鼠的运动及学习记忆能力无显著性差异,均低于空白对照组($P < 0.05$)。综合康复训练组大鼠的运动及学习记忆能力在训练第7天时明显改善,与空白对照组大鼠比较无显著性差异;而行为训练组大鼠的学习记忆能力也在第7天—第14天有显著改善,与对照组无明显差异;运动训练组与丰富环境组大鼠的学习记忆能力第21天开始也有明显好转,但均低于对照组($P < 0.05$)。运动训练组大鼠的运动能力在第7天—第14天有显著改善,与对照组无明显差异;行为训练组与丰富环境组大鼠的运动能力第21天开始也有明显好转,但均低于对照组($P < 0.05$);单纯脑损伤组大鼠的运动及学习记忆能力未见有显著改善,低于对照组($P < 0.05$)。

结论:丰富环境及康复训练可促进创伤性脑损伤大鼠运动及学习记忆功能的恢复。

关键词 创伤性脑损伤;丰富环境;康复训练;运动;学习记忆

中图分类号:R651.1, R493 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2013)-05-0393-05

Effects of enriched environment and rehabilitation training on the recovery of neural function of rats with traumatic brain injury/LI Yana, LI Ling, JIANG Shan, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2013, 28(5): 393—397

Abstract

Objective: To study the effect of enriched environment and rehabilitation training on the recovery of neural function of rats with traumatic brain injury.

Method: Sprague-Dawley adult male rats were made in traumatic brain injury model and then randomly assigned to model group, EE group, behavior training group, exercise group and comprehensive rehabilitation training group. Another ten rats were as normal group. The rats in the model group were feed in cages while those in the EE group were feed in enriched environment cages, both of them were not given training. The rats in behavior training group were given Morris water maze training while those in the exercise group were given balancing, grasping and walking exercises everyday. Both of them were feed in normal cages. The rats in comprehensive rehabilitation training group were feed in EE cages and given Morris water maze training, balancing, grasping and walking exercises everyday. The rats in the control group were without any treatment. Neural function test at the time points

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2013.05.002

*基金项目:国家自然科学基金资助项目(81071595;81201514)

1 解放军总医院第一附属医院康复医学科,北京,100048; 2 通讯作者

作者简介:李娅娜,女,住院医师;收稿日期:2013-01-07

of 3, 7, 14, and 21 days.

Result: The neural function of rats with traumatic brain injury was no different and worse than those in the control group at the time of 3 days. The ability of movement, learning and memory of rats in comprehensive rehabilitation training group improved to normal level at the time of 7 days. The ability of learning and memory of rats in behavior training group was improved to normal level at the time of 14 days. The ability of learning and memory of rats in EE group and exercise group was better than before at the time of 21 days but also worse than those in the control group. The motor function of rats in behavior training group was improved to normal level at the time of 14 days. The motor function of rats in EE group and behavior training group was better than before at the time of 21 days but also worse than those in the control group. The neural function of rats in model group was no change and worse than those in the control group at the time points of 3, 7, 14, and 21 days.

Conclusion: Enriched environment and rehabilitation training can improve the ability of movement, learning and memory of rats with traumatic brain injury.

Author's address First Affiliated Hospital of Chinese PLA General Hospital, Beijing, 100048

Key word traumatic brain injury; enriched environment; rehabilitation training; movement learning and memory

创伤性脑损伤(trumatic brain injury, TBI)常伴有相应的运动、认知及学习记忆功能障碍,严重影响患者预后,给社会及家庭带来沉重负担。其中,运动功能障碍最为常见且严重影响患者的生存质量。而学习记忆功能障碍常见并持久,成为严重阻碍患者康复的重要因素之一。海马是学习记忆的关键结构^[1]。研究表明,海马是创伤性脑损伤的选择性易损区,损伤后出现的神经细胞延迟性死亡长期影响学习记忆功能^[2]。本研究通过建立创伤性脑损伤模型,给予丰富环境及康复训练,探讨综合康复对创伤性脑损伤大鼠运动及学习记忆功能的影响,为临床康复提供理论基础。现将结果报道如下。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

液压颅脑损伤仪(美国, C197697):由压力传感器、示波器、圆形液柱和打击架组成,圆柱一端为活塞,另一端连接打击管和压力传感器。在致伤时管道系统内充满37℃生理盐水后封闭。打击锤通过对活塞的打击,使其相连的管道内液体传导至颅腔,并通过压力传感器在示波器上显示。

实验动物:二级SD雄性大鼠,8—10周龄,由军事医学科学院提供。

1.2 神经功能评估器材

运动功能评估:利用平衡实验及网屏实验进行评估。平衡实验用一个宽1.5cm的木条,一端悬空,另一端固定于一块40cm×40cm的平板中心。木条

下备有软垫防大鼠掉下后摔伤。网屏为一个50cm×40cm的网带,网眼为1cm×1cm,网板的四周用25cm高的木板框边,网屏距地面80cm,下方铺以12cm厚的海绵。

学习记忆评估器材:明暗箱:由大小均为35cm×25cm×30cm的两箱组成,一箱为明室,另一箱为暗室,两室间有一拱形门相通,室底均为铜栅。

1.3 实验方法

1.3.1 创伤性脑损伤大鼠制作方法:大鼠用1%戊巴比妥钠(50mg/kg体重)麻醉后固定于大鼠脑立体定位仪上,沿头颅正中切开头皮暴露颅骨,于前囟后4.8mm、中线向右旁开4mm处用牙科钻轻轻钻一个直径为4.8mm的骨窗,连接液压颅脑损伤仪的打击管,同时通过打击锤对活塞的打击,将管道内液体传导至颅腔,致伤压力≤1.7Atm,损伤后缝合大鼠头皮并正常喂养。

1.3.2 运动功能评定:采用平衡实验及网屏实验进行评估^[14-15],具体方法:平衡实验用一个宽1.5cm的木条,一端悬空,另一端固定于一块40cm×40cm的平板中心,木条下备有软垫防大鼠掉下后摔伤,将大鼠置于木条上60s,得分1—7分。评分标准:1分:能够保持平衡且四爪均置于木条表面;2分:动物将爪子握于木条的侧面或动物在木条上摇晃;3分:有一或两个肢体滑下木条;4分:三个肢体滑下木条;5分:动物在平衡木上试图保持平衡但滑下;6分:动物试图平衡失败悬吊在木条上然后跌落;7分:动物直接自木条跌落而无试图平衡的过程。

网屏实验先将网屏水平放置,将大鼠置于其上,缓慢将一端抬高,在2s内将网屏变成垂直位,保持5s,观察大鼠反应。0分:在网屏上达5s之久,不会掉下来;1分:暂时握住网屏,滑落一段距离,5s内没有掉下;2分:在5s内掉下来;3分:网屏抬高时大鼠即掉下来。

1.3.3 学习记忆功能评定:利用明暗箱采用避暗法测定大鼠潜伏期和错误反应次数。具体方法为:将大鼠放置于箱中适应3min,然后通电5min,并记录5min内的钻洞次数(即错误反应次数)。24h后进行测试,如大鼠进入暗室,因为暗室底有电流刺激大鼠,大鼠会逃出暗室,5min以内不进入暗室,就完成了学习,24h后测试的就是记忆能力,把大鼠放入明室开始至进入暗室的时间称为潜伏期,进入暗室的次数称为错误次数。

1.3.4 动物分组及处理:将造模成功且运动及学习记忆评定无明显差异的SD大鼠50只,随机分为单纯损伤组、丰富环境组、行为训练组、运动训练组及综合康复训练组,每组10只。另设正常对照组10只。单纯损伤组不予处理,置于标准笼饲养;丰富环境组置于丰富环境(enriched environment, EE)笼饲养;行为训练组于损伤后第1天给予水迷宫训练,每天上午训练3次,每次间隔10min,置于标准笼饲养;运动训练组于损伤后第1天给予滚筒式网状训练器、平衡木及转棒训练,每天训练3次,每次各项目训练3min,每次间隔10min,置于标准笼饲养;综合康复训练组置于EE笼饲养,于损伤后第1天给予水迷宫及行走、平衡、抓握训练,每天训练3次,间隔10min。正常对照组大鼠不予任何特殊处理。上述各组大鼠分别于损伤后第3天、第7天、第14天、第21天给予运动及学习记忆评定。

1.3.5 丰富环境制作:丰富环境笼^[3],为一个大小为820mm×610mm×450mm的金属网笼,内部距地面150mm处固定两块水平板,宽70mm,一块靠笼壁固定,另一块依角固定。另有一块升降板可上下调节高度。笼中还有:一个绳链、一个秋千、一些物品(不同形状、材料的积木)、一个塑料管隧道、一些不同颜色的玻璃球、一个高低杠、一个推棒。更换:每周1次,做清洁并用新形状、颜色、材料的物品替换旧的物品,重摆物品的位置,改变升降板距底面的高度。

1.3.6 水迷宫训练:Morris水迷宫为一盛有乳白色液体的圆形水池,高70cm,水深47cm,直径150cm。水温控制在21—24℃。池壁四周标注东、西、南、北共4个入水点,将水池分为四个象限。随机将高45cm、直径8cm的乳白色站台置于水池任一象限,固定后使站台没于水面下2cm处。行为训练组及综合康复组大鼠模型制作后第1天在水迷宫中自由游泳适应2min,从第2天上午开始,从水迷宫站台所占象限外的另3个象限随机选择一个入水点,将大鼠面向池壁放入水中,观察并记录大鼠寻找且爬上站台所需时间。如果大鼠2min内找不到站台,则将其引至站台上30s后放回笼中,此时潜伏期记为120s。训练时大鼠分别从3个不同象限的入水点入水,每次各亚组动物入水点均相同,训练顺序固定,训练期间周围参照物保持不变。每天上午训练3次,每次间隔10min。

1.3.7 运动训练:采用滚筒式网状训练器、平衡木及转棒训练。滚筒式网状训练器为长100cm,直径60cm的圆形网状仪器,中间被分为4个格,可同时训练4只大鼠,底座有一个固定架,一端有一个手摇柄,可手摇以5r/min进行转动训练,可训练大鼠的抓握、旋转、行走功能;平衡木训练采用长170cm,宽2cm的方木棒,平放在距地面7cm处,作为一个平衡木让大鼠在其上行走,以训练平衡功能;转棒训练:取长150cm,直径4.5cm的木棒1根,其中点固定在3r/min的转动器上,分别向左右交替转动,可训练动态平衡功能。

1.4 统计学分析

采用SPSS 13.0统计软件分析实验数据,用均数±标准差表示计量资料,多组间比较用单因素方差分析。两两比较用最小显著差法(least significant difference, LSD)。

2 结果

2.1 运动功能评定

脑损伤后第3天,各组大鼠的运动功能无显著性差异,均差于空白对照组($P < 0.05$)。综合康复训练组大鼠的运动功能在训练后第7天时明显改善,与空白对照组大鼠之间已无显著性差异;而运动训练组大鼠的运动功能也在第14天显著改善,与对照

组无明显差异;行为训练组与丰富环境组大鼠第21天开始也有明显好转,但均低于对照组($P < 0.05$);单纯脑损伤组大鼠的运动功能改善不明显,低于对照组($P < 0.05$)。见表1,表2。

2.2 学习记忆功能评定

2.2.1 明暗箱测试潜伏期:脑损伤后第3天,各组大鼠的潜伏期无显著性差异,均短于空白对照组($P < 0.05$)。综合康复训练组大鼠的潜伏期在训练第7天时明显延长,与空白对照组大鼠之间已无显著性差异;而行为学训练组大鼠的潜伏期也在第14天明显延长,与对照组无明显差异;运动训练组与丰富环境组大鼠第21天开始也有延长,但均低于对照组($P < 0.05$);单纯脑损伤组大鼠的潜伏期无明显变化,低于对照组($P < 0.05$)。见表3。

2.2.2 明暗箱测试错误次数:脑损伤后第3天,各组大鼠的错误次数无明显区别,均多于空白对照组($P < 0.05$)。综合康复训练组大鼠的错误次数在训练第7天时明显减少,与空白对照组无显著性差异;行为学训练组大鼠的错误次数也在第14天明显减少,与对照组无明显差异;运动训练组与丰富环境组大鼠第21天开始错误次数减少,但仍高于对照组($P < 0.05$);单纯脑损伤组大鼠的错误次数无明显变化,高于对照组($P < 0.05$)。见表4。

3 讨论

颅脑外伤常伴有相应的运动、认知及学习记忆

表1 各组大鼠不同时间的平衡功能评定 ($\bar{x} \pm s$,分)

组别	第3天	第7天	第14天	第21天
单纯损伤组	4.79 ± 0.52 ^①	5.21 ± 0.32 ^①	4.81 ± 0.22 ^①	3.37 ± 0.40 ^①
丰富环境组	5.28 ± 0.56 ^①	4.76 ± 0.32 ^①	2.85 ± 0.67 ^①	2.21 ± 0.34 ^①
行为训练组	5.09 ± 0.74 ^①	4.82 ± 0.50 ^①	3.09 ± 0.17 ^①	2.11 ± 0.43 ^①
运动训练组	4.92 ± 0.52 ^①	2.01 ± 0.33 ^①	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
综合康复训练组	5.32 ± 0.22 ^①	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
正常对照组	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00

与正常组比较:① $P < 0.05$

表2 各组大鼠不同时间的网屏评定 ($\bar{x} \pm s$,分)

组别	第3天	第7天	第14天	第21天
单纯损伤组	2.87 ± 0.52 ^①	2.83 ± 0.23 ^①	2.52 ± 0.62 ^①	1.87 ± 0.78 ^①
丰富环境组	2.90 ± 0.36 ^①	2.23 ± 0.42 ^①	1.35 ± 0.61 ^①	0.62 ± 0.57 ^①
行为训练组	2.82 ± 0.53 ^①	2.28 ± 0.50 ^①	1.26 ± 0.17 ^①	0.57 ± 0.31 ^①
运动训练组	2.92 ± 0.61 ^①	1.25 ± 0.12 ^①	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
综合康复训练组	2.83 ± 0.72 ^①	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
正常对照组	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00

与正常组比较:① $P < 0.05$

表3 各组大鼠不同时间的明暗箱测试潜伏期 ($\bar{x} \pm s$,s)

组别	第3天	第7天	第14天	第21天
单纯损伤组	161.7 ± 26.52 ^①	167.2 ± 19.34 ^①	168.8 ± 12.22 ^①	177.7 ± 19.80 ^①
丰富环境组	171.2 ± 30.36 ^①	176.0 ± 9.72 ^①	199.5 ± 28.61 ^①	213.2 ± 13.59 ^②
行为训练组	169.2 ± 16.51 ^①	216.0 ± 17.32 ^②	263.8 ± 13.20	269.2 ± 10.50
运动训练组	167.0 ± 31.79 ^①	194.8 ± 21.50 ^①	206.0 ± 21.17 ^①	211.7 ± 8.31 ^②
综合康复训练组	174.3 ± 17.12 ^①	261.0 ± 10.33	268.5 ± 34.82	276.8 ± 10.03
正常对照组	255.7 ± 39.69	268.5 ± 30.36	275.2 ± 15.69	277.7 ± 9.02

与正常组比较:① $P < 0.01$;② $P < 0.05$

表4 各组大鼠不同时间的明暗箱测试错误次数 ($\bar{x} \pm s$,次)

组别	第3天	第7天	第14天	第21天
单纯损伤组	1.10 ± 0.51 ^①	1.21 ± 0.44 ^①	1.00 ± 0.62 ^①	0.87 ± 0.18 ^①
丰富环境组	1.20 ± 0.36 ^①	1.13 ± 0.72 ^①	0.93 ± 0.56 ^①	0.72 ± 0.39 ^②
行为训练组	1.29 ± 0.54 ^①	0.66 ± 0.32 ^②	0.52 ± 0.49	0.48 ± 0.50
运动训练组	1.13 ± 0.73 ^①	1.00 ± 0.45 ^①	0.86 ± 0.34 ^①	0.69 ± 0.51 ^②
综合康复训练组	1.23 ± 0.91 ^①	0.47 ± 0.53	0.39 ± 0.63	0.53 ± 0.33
正常对照组	0.45 ± 0.69	0.49 ± 0.36	0.52 ± 0.49	0.47 ± 0.58

与正常组比较:① $P < 0.01$;② $P < 0.05$

等功能障碍,其个体差异较大,单一模式的康复已不能满足脑外伤多发的功能障碍,其治疗方案因人而异,目前临床上多采用多种感觉刺激、运动疗法、认知与言语训练及作业疗法等综合康复训练方式。本实验以创伤性脑损伤模型大鼠为对象,观察了丰富环境及康复训练对该模型大鼠运动及学习记忆等神经功能的影响。

实验发现丰富环境可促进运动及学习记忆功能的恢复,其原因可能为丰富环境本身作为一种外界刺激模式,可增加大鼠多感官刺激、运动和相互间交往的机会。研究表明,丰富环境可促进大脑神经生长因子(neural growth factor, NGF)、脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)、生长相关蛋白-43(growth associated protein, GAP-43)的表达^[4],而研究证实NGF、BDNF能够抑制脑创伤后神经细胞的延迟性坏死和凋亡,从而促进相应运动及学习记忆功能障碍的恢复^[5]。另有研究发现,丰富环境能促进脑组织及功能恢复^[6],改善缺血缺氧大鼠的学习记忆功能^[7]。但是,实验发现丰富环境组大鼠运动功能恢复较运动训练组差,而学习记忆功能恢复则不如行为训练组大鼠,表明单纯给予丰富环境饲养,而不予系统康复训练,其神经功能恢复所需时间较长。

行为学训练是康复训练方法之一,主要通过

学习、记忆、空间辨别、觅食等本能的训练,促进受损的神经功能恢复。本实验采用Morris水迷宫对创伤性脑损伤大鼠进行训练,Morris水迷宫是由英国心理学家Morris等^[8]设计,通过强迫试验动物游泳并寻找隐藏于水中的平台,训练大鼠对方向觉及空间位置觉的学习记忆能力。实验结果表明,行为训练组大鼠的学习记忆功能改善较为显著,明显优于运动训练及丰富环境组,可能原因为行为训练增加运动皮质和海马突触密度,活化海马和运动皮质的传入通路^[9],从而改善学习记忆功能。此外,我们既往的研究表明,行为学训练可促进N-甲基-D-天门冬氨酸受体2B亚单位(NR2B)的表达^[10],NR2B可以促进习得性长时程增强效应的形成,进而增加海马突触效应的可塑性,从而促进学习记忆功能恢复。

运动训练可通过改善脑组织的可塑性,从而改善运动功能。研究表明技巧性平衡训练(如转棒、横木行走等)可刺激突触增生^[11],而随意性运动则使大脑皮质血管生成增多^[12],亦有研究表明运动训练可促进GAP-43基因及其蛋白表达,从而促进神经功能恢复^[13]。本实验亦发现,运动训练在改善创伤性脑损伤大鼠的运动功能方面明显优于丰富环境及行为训练组。

实验表明,综合康复训练组创伤性脑损伤大鼠神经功能恢复优于其他组,表明综合康复训练不仅可以促进运动及学习记忆功能恢复,亦可缩短神经功能恢复的时间窗。研究发现,单纯损伤组无论在运动还是学习记忆方面均较其他组差,进一步表明丰富环境及康复训练在脑损伤后神经功能恢复中有着重要作用。此外,实验表明运动训练在提高创伤性脑损伤大鼠的运动功能方面优于行为训练组,但对大鼠学习记忆功能的恢复较行为训练组差,可能与单一训练着重点不同有关。综上所述,创伤性脑损伤大鼠置于丰富环境中,并给予运动及行为等综合康复训练更有利于神经功能的恢复,但其具体作用机制尚有待进一步研究。

参考文献

- [1] Da Silva WC, Bonini JS, Bevilacqua LR, et al. Inhibition of mRNA synthesis in the hippocampus impairs consolidation and reconsolidation of spatial memory[J]. *Hippocampus*, 2008, 18(1):29—39.
- [2] Hong J, Cui J, Zhou Y, et al. Study on cognition disorder and morphologic change of neurons in hippocampus area following traumatic brain injury in rats[J]. *Chin J Trauma*, 2002, 5(1):36—39.
- [3] Dahlqvist P, Rönnbäck A, Risedal A, et al. Effects of post-ischemic environment on transcription factor and serotonin receptor expression after permanent focal cortical ischemia in rats[J]. *Neuroscience*, 2003, 119(3):643—652.
- [4] Jin K, Mao XO, Sun Y, et al. Stem cell factor stimulates neurogenesis in vitro and in vivo[J]. *J Clin Invest*, 2002, 110(3):311—319.
- [5] Kim HJ, Lee JH, Kim SH. Therapeutic effects of human mesenchymal stem cells on traumatic brain injury in rats: secretion of neurotrophic factors and inhibition of apoptosis[J]. *J Neurotrauma*, 2010, 27(1):131—138.
- [6] Sozda CN, Hoffman AN, Olsen AS, et al. Empirical comparison of typical and atypical environmental enrichment paradigms on functional and histological outcome after experimental traumatic brain injury[J]. *J Neurotrauma*, 2010, 27(6):1047—1057.
- [7] 陆澄秋,钟乐,田英,等.早期环境刺激对缺氧缺血性脑损伤大鼠学习记忆的影响[J].*临床儿科杂志*,2012,4(30):372—376.
- [8] Morris RG, Garrud P, Rawlins JN, et al. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions[J]. *Nature*, 1982, 297(5868):681—683.
- [9] Rao BS, Raju TR, Meti BL. Increased numerical density of synapses in CA3 region of hippocampus and molecular layer of motor cortex after self-stimulation rewarding experience[J]. *Neuroscience*, 1999, 91(3):799—803.
- [10] 潘惠娟,李玲,杨华,等.行为训练对大鼠海马梗死灶周围及颞叶皮质NR2B表达的影响[J].*中国康复理论与实践*,2006,12(1):5—7.
- [11] Johansson BB. Functional outcome in rats transferred to an enriched environment 15 days after focal brain ischemia[J]. *Stroke*, 1996, 27(2):324—326.
- [12] Black JE, Isaacs KR, Anderson BJ, et al. Learning causes synaptogenesis, whereas motor activity causes angiogenesis, in cerebellar cortex of adult rats[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87(14):5568—5572.
- [13] 李红玲,葛艳萍,刘春辉,等.运动训练对出血性脑损伤GAP-43基因及蛋白表达的影响[J].*中国康复医学杂志*,2008,10(23):884—887.
- [14] Kawamata T, Alexis NE, Dietrich WD, et al. Intracisternal basic fibroblast growth factor(bFGF) enhances behavioral recovery following focal cerebral infarction in the rat[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1996, 16(4):542—547.
- [15] 徐莉,李玲,陈景藻,等.康复训练对大鼠脑梗死神经功能恢复的影响[J].*中华物理医学与康复杂志*,2000,22(2):86—88.