

丰富环境对颅脑外伤大鼠学习记忆及海马神经元凋亡的影响*

方杰¹ 罗爱华^{1,3} 潘翠环¹ 孙卫文² 石奕武² 陈盛强²

摘要

目的:研究丰富环境对颅脑外伤大鼠学习记忆能力及海马神经元凋亡的影响。

方法:32只SD大鼠采用自由落体法建立颅脑外伤模型,排除差异后纳入研究,分为丰富环境组和对照组。在造模后11天开始进行连续4天水迷宫检测大鼠学习记忆能力,之后取脑观察海马区神经元形态及使用TUNEL法检测海马区神经元凋亡水平。

结果:在水迷宫检测第4天丰富环境组大鼠学习记忆能力较对照组大鼠明显改善,差异有显著性意义($P<0.05$)。形态学检测发现丰富环境组大鼠海马区神经元凋亡水平较对照组明显减少,差异有显著性意义($P<0.05$)。

结论:丰富环境可明显改善颅脑外伤大鼠学习记忆能力,其机制可能与减少海马区神经元凋亡,提高神经元存活水平相关。

关键词 丰富环境;颅脑外伤;学习记忆;凋亡

中图分类号:R651.15 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2015)-02-0117-05

Effects of enriched environment on the function of learning, memory and apoptosis in hippocampus after traumatic brain injury in rats/FANG Jie, LUO Aihua, PAN Cuihuan, et al//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2015, 30(2):117—121

Abstract

Objective:To examine the effects of enriched environment on improving the function of learning and memory, and increase the survival of neuron after traumatic brain injury in adult rats.

Method:Thirty-two adult SD rats of traumatic brain injury model were randomly divided into standard environment group(SE, n=10), and enriched environment group(EE, n=22). After 11 days, all the rats received the Morris water maze test for consecutive 4d. The brain tissue will be extracted for immunohistochemical test(Nissle and TUNEL staining) when the Morris water maze tests finished.

Result:The result of Morris water maze test showed that in both the navigation and space exploration experiments, EE group performed significantly better than SE group($P<0.01$). The number of apoptotic cells declined markedly compared to SE group.

Conclusion:EE interventions can reduce pathological damages in hippocampus following TBI, promote brain injury recovery, and also can enhance abilities of learning and memory.

Author's address The Second Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, 510260

Key word enriched environment; traumatic brain injury; learning and memory; apoptosis

颅脑外伤(trumatic brain injury, TBI)是外界暴力直接或间接作用于头部所造成的损伤,轻度颅脑外伤患者有10%—15%存在长期的认知功能和行为障碍,中度颅脑外伤患者至少有50%存在长期的

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2015.02.003

*基金项目:广州医科大学科学研究项目青年基金(2011A1)

1 广州医科大学附属第二医院康复医学科,510260; 2 广州市神经科学研究所; 3 通讯作者

作者简介:方杰,男,硕士,讲师; 收稿日期:2014-04-01

认知、行为功能障碍。本研究采用自由落体法建立大鼠TBI模型,予丰富环境干预,通过水迷宫试验评估大鼠学习记忆功能,尼氏染色观察神经元形态及TUNEL染色检测凋亡细胞,研究丰富环境对TBI后海马神经元凋亡的影响及大鼠学习记忆行为的康复,阐述丰富环境对TBI后学习记忆功能康复的机制。

1 材料与方法

1.1 动物与分组

SPF级雄性成年SD大鼠32只,由广东省实验动物中心提供,[合格证号SCXK(粤)2008-0002],体重180—200g,2月龄。随机分为标准环境饲养组和丰富环境饲养组,标准环境饲养组(SE组)10只,丰富环境饲养组(EE组)22只。

1.2 颅脑外伤模型的制备

大鼠术前禁食12h,采用自由落体法建立颅脑外伤模型。大鼠以10%水合氯醛0.35ml/100g腹腔注射麻醉,俯卧于厚2cm的海绵垫上,头颅经门齿孔固定于脑立体定位(江湾I型C仪),头顶固定与水平面垂着的导杆打击装置,100g重的砝码自0.4m高处自由下落撞击大鼠头顶前凶部,制作重度闭合性颅脑外伤模型。所有动物造模后24h按大鼠神经功能评分标准(modified neurological severity scores, mNSS)进行检测评分,未发现明显运动、感觉功能受损。

1.3 标准环境设置

常规半透明有机玻璃标准笼(39cm×33cm×18cm),每笼饲养1只大鼠,提供充足食物和水,提供12h光/12h暗昼夜光变化。

1.4 丰富环境设置

不锈钢大笼(100cm×60cm×50cm),以楼梯相连分为3层,笼中置转轮、管道、小秋千、积木、塑料玩具,玩具每3d更换一次。笼底垫木屑垫料,提供充足食物和水,笼中大鼠可自由进食进水,11只/笼共同饲养。

大鼠在造模24h后,按照电脑确定随机数字表的方法将动物随机置于标准环境和丰富环境笼中饲养,饲养至第11天开始进行水迷宫行为学测试,连续4d,测试完成后取脑组织,进行组织学实验。

1.5 Morris水迷宫测试

①实验设备:成都泰盟科技有限公司生产的MT-200Morris水迷宫系统,包括大鼠实验水槽(直径150cm、高50cm的不锈钢圆形水池,含逃逸平台)、高清数码摄像头、摄像头固定支架、迷宫视频分析软件、深蓝色遮光帘等。

②Morris水迷宫(Morris water maze, MWM)检测方法:水深30cm,水温保持在(24±2)℃,在水池边缘确定东、南、西、北四个象限,平台直径9cm,高29cm,迷宫周围以深蓝色遮光帘遮蔽,保持局部环境安静稳定,水迷宫上方安置连接显示系统的摄像机,同步记录大鼠运动轨迹。训练及测试期间保持室内安静,迷宫外物品陈设位置相对固定(包括工作台、椅子、门、窗、书架及电灯等)。

定位航行测试(orientation navigation):用于测量大鼠对水迷宫学习和记忆的获取能力。平台固定置于“南”象限,距离池壁40cm,没于水下1cm。测试时大鼠每天分别从东、南、西、北四个象限面向池壁轻轻放入水中,记录大鼠自入水后至找到平台所需的时间(逃避潜伏期, escape latency period, ELP),及在池中游泳的轨迹。如大鼠在120s内找不到平台,则由实验者用木棍将其引向平台并停留10s,并记录其潜伏期为120s,每日的成绩以东、南、西、北四个象限的逃避潜伏期平均值作为当日的最终逃避潜伏期数据进入统计。连续4天,每日固定上午进行测试。

空间探索实验(spatial probe test):用于测量大鼠学会寻找平台后,对平台空间位置记忆的保持能力。最后一次定位航行测试结束后24h撤除平台,将大鼠从“北”象限(距离之前平台放置的“南”象限最远的象限)中点面向池壁放入水中,记录1min内大鼠在池中游泳的轨迹,并由计算机软件计算出大鼠在水池中跨越平台的次数、游泳总距离及大鼠在原平台所在象限游泳的距离,考察大鼠对原平台的记忆。

1.6 灌注取材与冰冻切片

各组大鼠分别在水迷宫检测后以3.5%水合氯醛按1ml/100g体重剂量腹腔注射麻醉,开胸暴露心脏,0.2ml肝素抗凝,用4℃生理盐水150ml及4%多聚甲醛溶液(0.1MPB配置, pH7.4)200—250ml心脏

灌注,断头取脑,4%多聚甲醛溶液后固定,梯度蔗糖脱水、包埋后采用Leica冰冻切片机连续冠状冰冻切片,厚20 μ m,裱于多聚赖氨酸处理后的载玻片上。

1.7 Nissl染色与凋亡检测

冰冻切片于PBS水化10min,0.1%焦油紫染色(37 $^{\circ}$ C)6—8min,双蒸水冲洗3min,盐酸酒精分色10s,常规梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树脂封片,烤干后阴凉处保存。采用Leica显微镜,观察大鼠脑梗死边缘区神经细胞形态和结构的变化。冰冻切片后根据TUNEL试剂盒处理后,进行染色,并在100倍光镜下记录阳性细胞数。

1.8 统计学分析

评分结果数据采用均数 \pm 标准差表示,使用SPSS 16.0版软件进行数据统计分析,数据采用*t*检验比较两组之间差异。

2 结果

2.1 两组大鼠Morris水迷宫学习记忆能力的比较

2.1.1 定位航行试验:在4d的训练过程中,各组大鼠寻找平台的潜伏期和总路程逐日缩短,第1—3天丰富环境组逃避潜伏期较标准环境组缩短,但统计学检验无显著性差异。第4天丰富环境组大鼠较标准环境组逃避潜伏期明显缩短($P<0.05$),见表1。

2.1.2 空间探索试验:丰富环境组大鼠较标准环境

组大鼠探索轨迹较多围绕原平台象限,标准环境组大鼠穿越平台次数明显少于丰富环境组(表2)。

2.2 Nissl染色结果

光学显微镜下观察海马区细胞的形态学变化,标准环境组:大鼠海马神经元排列稀疏散乱,细胞肿胀,胞核固缩,大量神经元出现尼氏体碎裂,可见细胞吸收后遗留的空泡等一系列死亡表现;丰富环境组:海马神经元出现肿胀,胞核固缩,尼氏体碎裂的细胞数相对较少,死亡细胞明显减少(图1)。

2.3 TUNEL染色结果

从海马不同区域TUNEL原位标记染色结果从凋亡细胞所占比例来看:在CA1区,丰富环境组为 0.77 ± 0.32 ,正常环境组为 6.02 ± 1.09 , $P<0.01$,表明丰富环境干预脑外伤大鼠后CA1区凋亡细胞所占比例明显减少;在CA3($P<0.01$)、DG($P<0.05$)区域结果类似(表3)。从凋亡细胞计数来看:在CA1区,丰富环境为 13.6 ± 2.7 ,正常环境组为 42.67 ± 15.26 , $P<0.05$,表明丰富环境干预后CA1区凋亡细胞个数明显减少。在CA1($P<0.05$)、CA3($P<0.05$)、DG($P<0.01$)区域结果类似(表4)。

3 讨论

“丰富环境”的概念是相对的标准环境,由国外学者提出,意味着增加生活空间,一组丰富的对象设

表1 两组Morris水迷宫逃避潜伏期比较 ($\bar{x}\pm s, s$)

组别	鼠数(只)	第1天	第2天	第3天	第4天
丰富环境饲养组(EE组)	22	52.398 \pm 20.287	46.286 \pm 25.211	31.716 \pm 13.048	28.90 \pm 12.80 ^①
标准环境饲养组(SE组)	10	58.700 \pm 28.258	52.200 \pm 31.740	43.175 \pm 20.990	41.30 \pm 19.87
<i>P</i>		>0.05	>0.05	>0.05	<0.05

①与标准组相比 $P<0.05$

表2 两组大鼠Morris水迷宫实验学习记忆能力的比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数(只)	逃避潜伏期(s)	跨越平台次数(次)	游泳总距离(cm)	原平台象限游泳距离(cm)
丰富环境饲养组(EE组)	22	17.01 \pm 5.94 ^①	6.12 \pm 1.23 ^①	21.77 \pm 1.96	22
标准环境饲养组(SE组)	10	38.16 \pm 4.83	2.96 \pm 10.81	22.55 \pm 2.54	10
<i>P</i>		<0.01	<0.05	>0.05	

①与标准组相比 $P<0.05$

表3 海马不同区域凋亡细胞所占切面面积的百分比 (Tunel染色, $\bar{x}\pm s$)

组别	CA1	CA3	DG
标准环境饲养组(SE组)	6.02 \pm 1.09	5.79 \pm 1.13	4.15 \pm 2.08
丰富环境饲养组(EE组)	0.77 \pm 0.32 ^①	0.47 \pm 0.21 ^①	0.41 \pm 0.29 ^①
<i>P</i>	<0.01	<0.01	<0.05

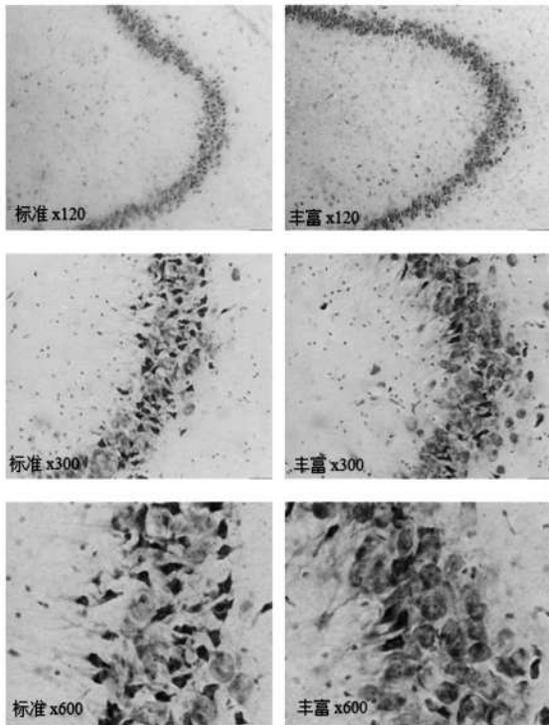
①对照组相比 $P<0.05$

表4 海马不同区域凋亡细胞计数 (Tunel染色, $\bar{x}\pm s$)

组别	CA1	CA3	DG
标准环境饲养组(SE组)	42.67 \pm 15.26	35.00 \pm 11.68	33.27 \pm 6.23
丰富环境饲养组(EE组)	13.60 \pm 2.7 ^①	12.40 \pm 2.3 ^①	9.2 \pm 2.59 ^①
<i>P</i>	<0.05	<0.05	<0.01

①对照组相比 $P<0.05$

图1 标准环境组与丰富环境组 Nissl 染色结果



置,群体成员增加,可以促进社会交流,促进感觉,运动、社会刺激和丰富的培训学习机会。本实验参照国外文献制作的EE模型包括不锈钢大笼(100cm×60cm×50cm)^[1-2],以楼梯相连分为3层,笼中置转轮、管道、小秋千、积木、塑料玩具,玩具每3d更换一次。笼底垫木屑垫料,提供充足食物和水,笼中大鼠可自由进食进水,11只/笼共同饲养。

本项研究中HE染色和尼氏染色神经元还发现,脑外伤后3d,对照组海马细胞数量减少,神经细胞间隙变大,排列分散、稀疏、细胞形态异常尼氏降低核仁不清楚,可见核固缩、核碎裂,神经胶质细胞和脊髓网状增生一样,海马CA1区的神经元的数量也有所下降,表明脑外伤引起的损伤并没有因为自身的发展而进行修复。

实验中还发现,与对照组相比,通过丰富的环境干预大鼠脑损伤明显减轻。EE组可见少量海马神经元丢失和胶质增生,但一般正常细胞形态,细胞排列更加有序,在细胞层无明显减少,尼氏结构清晰,海马损伤程度较轻;大鼠海马细胞排列紊乱,尼氏染色变淡,海马损伤较重。这些结果表明,对海马形成

丰富环境干预对脑损伤具有保护作用,在一定程度上,可以防止脑外伤继发性病理过程,其原因可能如下:①丰富的环境,可能会降低神经海马区脑外伤神经细胞凋亡。脑外伤后神经元损伤凋亡为主的缺血海马CA1区对缺氧最敏感,人身伤害24h后,凋亡细胞的数量显著增加,创伤后48h见顶高峰期将被激活吞噬细胞,凋亡细胞被清除,神经元的损失将导致永久性的损坏。TBI后持续的神经细胞凋亡导致进行性脑损伤面积增大,是慢性中枢神经系统并发症的一个重要因素^[4]。在这个实验中丰富环境组在造模后开始给EE的干预,可能使神经营养因子的表达增加,扭转枯萎细胞凋亡的作用^[5];转录因子cAMP反应元件结合蛋白(cyclic adenosine monophosphate response element-binding protein, CREB)磷酸腺苷反应元件磷酸化增加,CREB的磷酸化成为活性形式抑制神经的兴奋性,突触可塑性和协调发展,发挥神经保护作用^[6];也可能提高即早基因mRNA表达,逆转细胞凋亡的病理过程,减少神经细胞凋亡的数量,起到修复脑损伤,并提高学习和记忆的作用^[7-8]。②促进齿状回内源性神经干细胞神经发生。神经干细胞可以自我更新和多向分化^[9]。通过神经干细胞的增殖分化产生新的神经元,新生神经元迁移到受损区域和周围的神经元形成突触连接,替代死亡神经元^[10-11]。

大脑发育是同时受先天的基因和后天的环境因素共同作用^[12]。在发育过程中的未成熟脑突触通过细胞凋亡^[13],对神经系统的可塑性是最强时期的变异或修改最强的时期,被称为大脑发育的关键时期(critical period)。颅脑损伤后的神经功能尤其是认知功能的恢复主要依赖于神经的可塑性,如神经元功能的改变、化学成分和结果的改变等,都与外界丰富环境有着重要的联系。有证据表明,随着丰富环境的刺激,可出现脑皮质增厚,树突分支增加,大量的轴突和细胞体产生,有助于形成新的神经网络^[14]。

新生动物的研究表明,丰富环境可以提供这种早期适当的经验,促进脑发育和脑功能的进化,而实验证实,丰富环境可以有效地缓解老年人的认知功能障碍^[15-16],并促进大脑损伤后修复^[17]。在脑的结构和功能的不同阶段和丰富的环境中,可以产生显著的影响。脑外伤后引起的继发性脑损伤的病理生

理变化,包括钙离子内流,造成无氧环境乳酸堆积,氧自由基过量释放的兴奋性神经递质和钙稳态失衡等病理生理变化,导致了一系列脑缺血、组织损伤、坏死、凋亡、神经炎症等改变。

本研究动物实验提示,丰富环境可改善脑外伤大鼠的学习记忆功能,其机制可能与减少海马部位神经元凋亡,提高细胞存活水平相关。但人类的随机对照研究仍鲜见开展。相对于人类,动物实验中标准环境是一种剥夺性的环境。由于人类生活在复杂多样的环境中,界定丰富环境存在一定的困难,但随着现代科技的发展,一些交互技术、虚拟现实、3D技术的提高,参数逐渐可为掌控及标准化,并且可以通过临床常用量表,结合电诊断技术、影像学技术,如功能性磁共振等加以量化,具有良好的应用前景。临床上康复环境的设置应以促进身体和心理康复为准。大多数康复单元中,患者每天大部分时间都在独处病房或病床上,不利于康复的活动,说明目前的康复环境设置给予患者的刺激比较欠缺,不利于改善其认知、心理等功能,缺乏家庭、社会的共同参与。因此,我们在临床上开始摸索开展团体康复治疗的方式,邀请家人、陪护一起共同参与,结合一些益智游戏、竞争性游戏及团体合作项目等,让患者处于一个相对丰富的环境中,提高其训练的主动性和竞争性,发现患者的心理状态及认知功能均得到了不同程度的改善。因此,丰富环境在脑损伤患者的功能恢复中发挥着非常重要的作用,具有良好的应用前景。

参考文献

- [1] de Witt BW, Ehrenberg KM, McAloon RL, et al. Abbreviated environmental enrichment enhances neurobehavioral recovery comparably to continuous exposure after traumatic brain injury[J]. *Neurorehabil Neural Repair*, 2011, 25(4): 343—350.
- [2] Monaco CM, Mattioli VV, Folweiler KA, et al. Environmental enrichment promotes robust functional and histological benefits in female rats after controlled cortical impact injury[J]. *Experimental Neurology*, 2013: 410—418.
- [3] Johnson EM, Traver KL, Hoffman SW, et al. Environmental enrichment protects against functional deficits caused by traumatic brain injury[J]. *Front Behav Neurosci*, 2013, 7: 44.
- [4] Ay I, Sugimori H, Finklestein SP. Intravenous basic fibroblast growth factor (bFGF) decreases DNA fragmentation and prevents downregulation of bcl-2 expression in the ischemic brain following middle cerebral artery occlusion in rats [J]. *Brain Res Mol Brain Res*, 2001, 87(1): 171—180.
- [5] Shin SS, Bales JW, Yan HQ, et al. The effect of environmental enrichment on substantia nigra gene expression after traumatic brain injury in rats[J]. *J Neurotrauma*, 2013, 30: 259—270.
- [6] Williams BM, Luo Y, Ward C, et al. Environmental enrichment effects on spatial memory and hippocampal CREB immunoreactive[J]. *Physiol Behav*, 2001, 73(4): 649—658.
- [7] Pinaud R, Penner MR, Robertson HA, et al. Upregulation of the immediate early gene arc in the brains of rats exposed to environmental enrichment implications for molecular plasticity[J]. *Brain Res Mol Brain Res*, 2001, 91(1—2): 50—56.
- [8] Colton CA, Snell J, Chernyshev O, et al. Induction of superoxide anion and nitric oxide production in cultured microglia [J]. *Ann NY Acad Sci*, 1994, 738(17): 54—63.
- [9] Weissman IL. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution[J]. *Cell*, 2000, 100(7): 157—168.
- [10] Faverjon S, Silveira DC, Fu DD, et al. Beneficial effects of enriched environment following status epilepticus in immature rats[J]. *Neurology*, 2002, 59(9): 1356—1364.
- [11] Auvergne R, Léré C, El Bahh B, et al. Delayed kindling epileptogenesis and increased neurogenesis in adult rats housed in an enriched environment[J]. *Brain Res*, 2002, 954(2): 277—285.
- [12] Shin SS, Bales JW, Yan HQ, et al. The effect of environmental enrichment on substantia nigra gene expression after traumatic brain injury in rats[J]. *Journal of Neurotrauma*, 2013, 30(4): 259—270.
- [13] Frick KM, Fernandez SM. Enrichment enhances spatial memory and increases synaplophysin levels in aged female mice[J]. *Neurobiol of Aging*, 2003, 24(4): 615—626.
- [14] de Witt BW, Ehrenberg KM, McAloon RL, et al. Abbreviated environmental enrichment enhances neurobehavioral recovery comparably to continuous exposure after traumatic brain injury[J]. *Neurorehabil Neural Repair*, 2012, 26: 907—913.
- [15] Sander AM, Pappadis MR, Clark AN, et al. Perceptions of community integration in an ethnically diverse sample[J]. *J Head Trauma Rehabil*, 2011, 26: 158—169.
- [16] Keightley M, Kendall V, Jang SH, et al. From health care to home community: an aboriginal community-based ABI transition strategy[J]. *Brain Inj*, 2011, 25(2): 142—152.
- [17] Hayden ME, Plenger P, Bison K, et al. Treatment effect versus pretreatment recovery in persons with traumatic brain injury: a study regarding the effectiveness of postacute rehabilitation[J]. *PMR*, 2013, 5(4): 319—327.