

探索学习环境对脑梗死模型大鼠神经功能改善作用的实验研究

路芳¹ 莫林宏¹ 王奕¹

摘要

目的:研究探索学习环境对脑梗死模型大鼠神经功能的改善作用。

方法:取雄性成年SD大鼠并随机分为假手术对照组、脑梗死模型组、探索学习环境干预组,每组15只,采用线栓法建立脑梗死模型、进行探索学习环境的干预。干预后7d、14d、21d和28d时,进行Morris水迷宫测试以评价学习记忆功能;处死大鼠后,取梗死灶周围脑组织,检测神经细胞因子、血管新生因子、凋亡分子的mRNA含量。

结果:①学习记忆能力:与对照组比较,模型组大鼠的水迷宫成绩较差;探索学习环境后,干预组的逃避潜伏期和找到平台所经历的路程缩短、跨越平台次数增多;②神经细胞因子:干预组大鼠脑组织中神经生长因子、脑源性神经营养因子的mRNA含量分别为 62.21 ± 10.12 、 67.74 ± 8.47 ,高于模型组的 32.38 ± 5.63 、 24.48 ± 4.93 ($P < 0.05$);③血管新生因子:干预组大鼠脑组织中基质细胞衍生因子、血管内皮生长因子、fms-样酪氨酸激酶-1的mRNA含量分别为 245.52 ± 34.52 、 229.01 ± 15.94 、 313.45 ± 42.32 ,高于模型组的 125.62 ± 15.15 、 134.23 ± 17.45 、 234.56 ± 31.23 ($P < 0.05$);④凋亡分子:干预组大鼠脑组织中Bcl-2的mRNA含量 66.64 ± 9.97 、高于模型组的 21.39 ± 4.23 ($P < 0.05$),Bax、caspase-3的mRNA含量分别为 145.52 ± 18.89 、 169.53 ± 23.12 ,均低于模型组的 245.23 ± 35.63 、 284.59 ± 41.23 ($P < 0.05$)。

结论:探索学习环境能够改善大鼠学习记忆功能、增加神经细胞因子和血管新生因子表达、抑制细胞凋亡,对脑梗死模型大鼠的神经功能具有改善作用。

关键词 脑梗死;探索学习环境;学习记忆功能;血管新生;凋亡

中图分类号:R743,R493 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2016)-06-0637-04

An experimental study on the effect of exploring learning environment on neurofunction of cerebral infarction rats/LU Fang, MO Linhong, WANG Yi//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2016, 31(6): 637—640

Abstract

Objective: To study the improvement effect of exploration and learning environment on neuro function of cerebral infarction rats model.

Method: A total of 45 adult SD rats(male) were randomized into sham group(n=15), cerebral infarction model group(n=15) and intervention group(n=15). Cerebral infarction modal was established by suture method. Intervention group was raised in special maze cage. Rats were killed at day7, 14, 21, 28 separately after Morris water maze test, and mRNA contents of nerve cell factor, angiogenic factors, apoptosis molecules in brain tissue surrounding infarction were detected.

Result: ①Learning and memory ability: Comparing to control group, water maze performance of model group was poorer. Escape latency and distance to find the platform were shorter and cross-platform frequency were higher in intervention group than in model group, but longer and lower than in sham group. ②Nerve cell factor: mRNA of nerve growth factor(NGF) and brain derived neurotrophic factor (BDNF) in brain tissue of intervention group(62.21 ± 10.12 、 67.74 ± 8.47) were higher than those of model group(32.38 ± 5.63 、 24.48 ± 4.93)($P <$

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2016.06.005

1 首都医科大学附属北京康复医院,北京,100144

作者简介:路芳,女,主治医师;收稿日期:2015-06-10

0.05)。③Angiogenic factors: mRNA of stromal cell-derived factor-1 (SDF-1), vascular endothelial growth factor (VEGF) and fms-like tyrosine kinase-1 (Flt-1) in brain tissue of intervention group(245.52±34.52, 229.01±15.94, 313.45±42.32) were higher than model group(125.62±15.15, 134.23±17.45, 234.56±31.23)($P<0.05$)。④Apoptotic molecules: mRNA of Bcl-2 in brain tissue of intervention group (66.64±9.97) were higher than those of model group(21.39±4.23)($P<0.05$)。mRNA of Bax and caspase-3(145.52±18.89, 169.53±23.12) were lower than those of model group (245.23±35.63, 284.59±41.23)($P<0.05$)。

Conclusion: Exploring learning environment can improve learning and memory function, increase nerve cytokines and angiogenic factor expression, inhibit apoptosis of cerebral infarction model rats.

Author's address Beijing Rehabilitation Hospital Affiliated to Capital Medical University, 100144

Key word cerebral infarction; explore learning environment; learning and memory function; angiogenesis; apoptosis

脑梗死是临床常见的脑血管疾病,会造成神经功能严重受损;在疾病的康复过程中,利用中枢神经系统的可塑性进行学习记忆锻炼能够有效地促进神经功能重建。探索学习是指个体主动接受外界环境中的新信息并不断用新记忆取代旧记忆,进而改变自身行为、提高神经功能。在探索学习过程中,外界环境信息越丰富、越复杂,中枢神经系统受到的刺激越强烈,相应区域神经功能的恢复也越理想^[1]。本研究通过迷宫笼来模型探索学习环境,旨在增加脑梗死大鼠所接受到信息刺激的复杂程度,为神经功能的重建创造有利条件。为了明确探索学习对脑梗死后神经功能恢复的影响,我们分析了探索学习环境对脑梗死模型大鼠神经功能的改善作用。

1 材料与方法

1.1 研究材料

1.1.1 实验用动物:SPF级别的雄性SD大鼠购买于大学动物中心,体重180—220g。

1.1.2 试剂和耗材:造模手术用到的器械、麻醉药物由大学动物中心提供;mRNA提取以及PCR扩增试剂由北京天根公司购买。

1.2 研究方法

1.2.1 分组方法:45只雄性SD大鼠随机分为3组,每组15只,假手术对照组、脑梗死模型组、探索学习环境干预组,接受不同的手术操作和学习干预。

1.2.2 脑梗死模型建立方法:采用线栓法建立脑梗死模型,方法如下:大鼠腹腔麻醉后以仰卧位的方式摆放在手术台上,做颈正中切口后进行气管插管,而后分离左侧颈总动脉、颈内动脉和颈外动脉,在分叉处电凝并剪断颈外动脉,结扎颈外动脉远心端,经近

心端切口插入预先处理成圆锥形的4.0号外科线,伸入颈内动脉约2.0cm后达到大脑中动脉,可以感受到明显的阻力,停止插入外科线并进行结扎,完成脑梗死模型的建立。假手术对照组仅分离血管,但不进行切开、结扎和穿线的操作。

1.2.3 探索学习环境干预方法:干预组大鼠饲养在自制的迷宫饲养笼中,迷宫笼由直径50cm的圆形笼和长(64cm)×宽(48cm)×高(12cm)的方形笼组成,圆形笼和方形笼之间由两条通道连接。圆形笼用铁丝网进行分隔,一侧为进食区、一侧为饮水区;方形笼用铁丝网分隔为8cm×8cm的迷宫,迷宫由简到难、每周变化一次。假手术对照组和模型组大鼠饲养在标准饲养笼中。

1.2.4 Morris水迷宫测试方法:干预后7d、14d、21d和28d时进行测试,水迷宫为圆形水池,直径1.5m、深0.5m,连接运动轨迹摄像和分析系统;测试时,水深30cm、水温22—26℃。在水池中央设置透明平台、直径14cm、高度低于水面1cm,水池壁上设置东、南、西、北四个方向作为参考点并将水池等分为四个象限。首先进行定位航行实验,每日上下午各进行一轮、每轮4次,连续进行5d,测试时,大鼠从四个象限1/2弧度处以头朝水池壁的方式入水,60s内触碰到平台的时间为逃避潜伏期、若60s内未触碰到平台则逃避潜伏期记录为60s,同时记录找到平台所经历的路程;第5天下午撤出平台进行空间探索实验,大鼠采用与定位航行实验相同的方式入水,检测60s内穿越原平台的次数。

1.2.5 mRNA含量检测方法:第28天水迷宫测试完成后,处死大鼠(第7、14、21天水迷宫测试后继续饲养),取梗死病灶周围的脑组织,加入Trizol裂解

液提取总RNA,反转录为cDNA后进行PCR扩增,扩增基因包括神经生长因子(nerve growth factor, NGF)、脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)、基质细胞衍生因子(stromal cell-derived factor-1, SDF-1)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、fms-样酪氨酸激酶-1(fms-like tyrosine kinase-1, Flt-1)、Bcl-2、Bax、caspase-3,得到扩增曲线后读取起跳循环数(Ct),根据公式 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算mRNA含量。

1.3 统计学分析

采用SPSS19.0软件录入数据,计量资料的三组间比较采用方差分析、两两比较采用LSD-*t*检验。

2 结果

干预后7d、14d、21d和28d时,与假手术组比较,模型组大鼠的逃避潜伏期和找到平台所经历的路程较长,跨越平台次数较少;探索学习环境后,干预组的逃避潜伏期和找到平台所经历的路程缩短、跨越平台次数增多,见表1。

与假手术组(第28天)比较,模型组大鼠脑组织中NGF、BDNF的mRNA含量较低;探索学习环境后,干预组大鼠脑组织中NGF、BDNF的mRNA含量高于模型组,见表2。

与假手术组(第28天)比较,模型组大鼠脑组织中SDF-1、VEGF、Flt-1的mRNA含量较高;探索学习环境后,干预组大鼠脑组织中SDF-1、VEGF、Flt-1的mRNA含量高于模型组,见表3。

与假手术组(第28天)比较,模型组大鼠脑组织中Bcl-2的mRNA含量较低,Bax、caspase-3的

mRNA含量较高;探索学习环境后,干预组大鼠脑组织中Bcl-2的mRNA含量高于模型组,Bax、caspase-3的mRNA含量低于模型组,见表4。

表2 三组大鼠脑组织中神经细胞因子的mRNA含量比较 (n=15, $\bar{x}\pm s$)

| 组别 | NGF | BDNF |
|--------|--------------------------|-------------------------|
| 假手术对照组 | 100.00±16.68 | 100.00±18.14 |
| 模型组 | 32.38±5.63 ^① | 24.48±4.93 ^① |
| 干预组 | 62.21±10.12 ^② | 67.74±8.47 ^② |

①与假手术组比较 $P < 0.05$;②与模型组比较 $P < 0.05$

表3 三组大鼠脑组织中血管新生因子的mRNA含量 (n=15, $\bar{x}\pm s$)

| 组别 | SDF-1 | VEGF | Flt-1 |
|--------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 假手术对照组 | 100.00±18.45 | 100.00±15.14 | 100.00±17.05 |
| 模型组 | 125.62±15.15 ^① | 134.23±17.45 ^① | 234.56±31.23 ^① |
| 干预组 | 245.52±34.52 ^② | 229.01±15.94 ^② | 313.45±42.32 ^② |

①与假手术组比较 $P < 0.05$;②与模型组比较 $P < 0.05$

表4 三组大鼠脑组织中凋亡分子的mRNA含量(n=15, $\bar{x}\pm s$)

| 组别 | Bcl-2 | Bax | caspase-3 |
|--------|-------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 假手术对照组 | 100.00±17.14 | 100.00±15.08 | 100.00±19.10 |
| 模型组 | 21.39±4.23 ^① | 245.23±35.62 ^① | 284.59±41.23 ^② |
| 干预组 | 66.64±9.97 ^② | 145.52±18.89 ^① | 169.53±23.12 ^② |

①与假手术组比较 $P < 0.05$;②与模型组比较 $P < 0.05$

3 讨论

学习记忆功能是大脑的高级活动,涉及信息获取、传递与整合等复杂的过程,脑梗死发生后会造成神经功能损伤、学习记忆能力下降^[2]。神经功能具有极强的可塑性,丰富的环境信息能够促进大脑组织对信息处理和加工的过程、增强神经功能可塑性。脑梗死发生后神经功能的可塑性受到学习锻炼的影响,提高外界环境信息的质量和数量能够促进机体进行主动的探索学习,进而加强大脑对环境信息的处理能力、提高神经功能^[3]。不同环境所发出信息的质量和数量均存在明显差异,在常规饲养环境中,来自外界的信号刺激有限;在迷宫笼所模拟的探索学习环境中,来自外界信号的数量和质量均明显增加,能够刺激大脑对信息的加工和处理^[4]。本研究在建立脑梗死大鼠模型后,将模型大鼠饲养在迷宫笼所模拟的探索学习环境中,旨在增加大鼠所接收到环境信号的丰富程度,促进脑梗死后学习记忆能力的重建。Morris水迷宫是评价动物学习记忆能力的常用装置,本研究观察到模型组大鼠的水迷

表1 三组大鼠的学习记忆能力 (n=15, $\bar{x}\pm s$)

| | 干预后7d | 干预后14d | 干预后21d | 干预后28d |
|----------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 逃避潜伏期(s) | | | | |
| 假手术组 | 10.22±1.25 | 8.45±0.92 | 7.74±0.85 | 5.63±0.66 |
| 模型组 | 34.52±5.12 ^① | 32.03±4.87 ^① | 30.19±4.52 ^① | 28.49±4.25 ^① |
| 干预组 | 22.12±3.29 ^② | 18.29±2.08 ^② | 14.36±1.89 ^② | 9.41±1.04 ^② |
| 找到平台所经历的路程(cm) | | | | |
| 假手术组 | 212.3±31.2 | 142.3±18.9 | 125.2±15.8 | 109.3±12.8 |
| 模型组 | 587.5±67.4 ^① | 513.4±67.4 ^① | 445.2±54.9 ^① | 428.5±60.1 ^① |
| 干预组 | 412.3±56.6 ^② | 298.3±35.2 ^② | 241.2±31.9 ^② | 195.6±23.8 ^② |
| 跨越平台次数(次) | | | | |
| 假手术组 | 3.58±0.44 | 4.13±0.49 | 5.23±0.72 | 5.54±0.69 |
| 模型组 | 0.88±0.09 ^① | 1.14±0.15 ^① | 1.32±0.18 ^① | 1.79±0.20 ^① |
| 干预组 | 1.93±0.24 ^② | 2.38±0.30 ^② | 3.19±0.42 ^② | 3.92±0.55 ^② |

①与假手术组比较 $P < 0.05$;②与模型组比较 $P < 0.05$

宫成绩较差,说明脑梗死模型建立成功、大鼠出现了学习记忆能力减退;在进行探索学习环境干预后,干预组的逃避潜伏期和找到平台所经历的路程缩短、跨越平台次数增多。这就说明探索学习环境干预后能提高脑梗死大鼠的学习记忆能力。

梗死病灶周围新生血管代偿性生成是决定缺氧后神经元存活和再生的决定性因素,也是机体对局部缺血环境的代偿方式。梗死脑组织周围新生血管形成能够为局部神经元的能量代谢、功能重建提供充足的氧气以及营养成分,有助于神经功能的恢复。血管新生因子和神经细胞因子是促进脑梗死局部微循环形成以及神经元修复的关键分子^[5]。VEGF及其受体Flt-1是促进脑梗死病灶周围侧支循环血管新生最重要的血管新生因子,能够促进内皮细胞增殖并增加微血管密度;SDF-1 α 是新发现的一种促血管新生因子,能够动员内皮祖细胞并使其归巢至缺血部位^[6]。NGF与BDNF是参与神经功能重建十分重要的神经细胞因子,具有促进神经元细胞再生、轴突生长的功能^[7-8]。本研究的检测和分析结果显示,在进行探索学习环境后,干预组大鼠脑组织中NGF、BDNF、SDF-1、VEGF、Flt-1的mRNA含量增加。这就说明探索学习环境干预后能增加血管新生因子和神经细胞因子的含量,有助于增加新生血管形成、促进神经元细胞再生。

神经元细胞的凋亡程序在缺血缺氧条件下被激活,多种凋亡相关分子的表达发生明显异常。目前已知与神经元细胞凋亡密切相关的分子包括Bcl家族和Caspase家族。Bcl家族包括以Bcl-2为代表的抗凋亡分子、以Bax为代表的促凋亡分子,两者能够形成异源二聚体,调节细胞凋亡过程^[9]。Bcl-2位于线粒体膜的通透性转变孔处,能够抑制通透性转变孔的开放和活化过程、减少细胞色素C的释放,进而发挥抗凋亡作用^[10];Bax能够与Bcl-2形成异源二聚体并抑制其抗凋亡的作用,通过线粒体途径造成细胞色素C大量释放,进而激活下游Caspase分子来造成神经元凋亡^[11]。caspase-3是Caspase家族中的细胞凋亡程序的执行分子,该分子表达或激活增加能够直接造成细胞凋亡^[12]。本研究结果显示,脑梗死模型组大鼠脑组织中抗凋亡分子Bcl-2的mRNA含量较低,促凋亡分子Bax、caspase-3的mRNA含量较

高。这就证实了脑梗死会造成脑组织中凋亡分子表达异常。在进行探索学习环境后,干预组大鼠脑组织中Bcl-2的mRNA含量增加,Bax、caspase-3的mRNA含量降低。由此说明探索学习环境干预后能够调节凋亡分子的表达、抑制神经元的凋亡过程。

综上所述,探索学习环境能够改善大鼠学习记忆功能、增加神经细胞因子和血管新生因子表达、抑制细胞凋亡,对脑梗死模型大鼠的神经功能具有改善作用。

参考文献

- [1] Yu K, Wu Y, Zhang Q, et al. Enriched environment induces angiogenesis and improves neural function outcomes in rat stroke model[J]. *J Neurol Sci*, 2014, 347(1-2):275—280.
- [2] 马向阳,张丽萍,董静,等. 探索学习环境对脑梗死大鼠学习记忆能力及缺血侧海马区微血管密度的影响[J]. *中国康复理论与实践*, 2015, 21(1):42—44.
- [3] 槐雅萍,杨永轩,贾子善,等. 探索学习对局灶性脑梗死大鼠梗死灶周围皮质巢蛋白及突触素表达的影响[J]. *中国全科医学*, 2010, 13(2B):501—504.
- [4] 马向阳,王永新,张丽萍,等. 探索学习对脑梗死大鼠缺血侧海马区微血管密度及Flt-1表达的影响[J]. 2015, 32(2):130—132.
- [5] 韩巨,陈建新,朱梅佳,等. 缺血预处理对大鼠局灶性脑梗死后VEGF、GLUT1及BAII表达的影响[J]. *山东大学学报(医学版)*, 2012, 50(4):61—64.
- [6] 凌莉,张素平,吉章阁,等. 外源性基质细胞衍生因子-1 α 对大鼠脑梗死后远隔部位细胞增殖和血管再生的影响[J]. *中国神经精神疾病杂志*, 2013, 39(10):587—600.
- [7] Solev IN, Balabanyan VY, Volchek IA, et al. Involvement of BDNF and NGF in the mechanism of neuroprotective effect of human recombinant erythropoietin nanoforms[J]. *Bull Exp Biol Med*, 2013, 155(2):242—244.
- [8] Sakr HF, Khalil KI, Hussein AM, et al. Effect of dehydroepiandrosterone (DHEA) on memory and brain derived neurotrophic factor(BDNF) in a rat model of vascular dementia[J]. *J Physiol Pharmacol*, 2014, 65(1):41—53.
- [9] Sun ZK, Ma XR, Jia YJ, et al. Effects of resveratrol on apoptosis in a rat model of vascular dementia[J]. *Exp Ther Med*, 2014, 7(4):843—848.
- [10] Yang SD, Bai ZL, Zhang F, et al. Levofloxacin increases the effect of serum deprivation on anoikis of rat nucleus pulposus cells via Bax/Bcl-2/caspase-3 pathway[J]. *Toxicol Mech Methods*, 2014, 24(9):688—696.
- [11] Liang K, Ye Y, Wang Y, et al. Formononetin mediates neuroprotection against cerebral ischemia/reperfusion in rats via downregulation of the Bax/Bcl-2 ratio and upregulation PI3K/Akt signaling pathway[J]. *J Neurol Sci*, 2014, 344(1-2):100—104.
- [12] Wang X, Luo Y, Sun H, et al. Dynamic expression changes of Bcl-2, caspase-3 and Hsp70 in middle cerebral artery occlusion rats[J]. *Brain Inj*, 2015, 29(1):93—97.