

·基础研究·

丰富环境对缺血缺氧脑损伤新生大鼠海马脑源性神经营养因子表达及细胞凋亡的影响*

宋名杨¹ 朱路文¹ 叶涛² 姜云飞¹ 赵彬^{1,3}

摘要

目的:探讨丰富环境对缺血缺氧脑损伤(HIBD)新生大鼠海马脑源性神经营养因子(BDNF)表达及细胞凋亡的影响。

方法:采用随机数字表法将36只7日龄新生大鼠分为假手术组、模型组及丰富环境组,各组又分为术后7d、28d两个亚组(n=6)。采用Rice-Vannucci经典方法建立新生大鼠HIBD模型。模型组及假手术组不予任何干预,丰富环境组予以早期抚触及丰富环境刺激治疗。术后7d、28d采用水迷宫检测方法评估大鼠学习记忆能力,免疫组化法检测大鼠海马CA1区BDNF的表达,TUNEL法检测海马CA1区细胞凋亡。

结果:术后7d、28d,与模型组比较,丰富环境组逃避潜伏期均缩短($P < 0.05$),穿越平台次数增多($P < 0.05$),BDNF表达升高($P < 0.05$),TUNEL阳性细胞数降低($P < 0.05$)。

结论:丰富环境能改善HIBD新生大鼠学习记忆能力,其机制可能与上调海马区BDNF的表达及抑制细胞凋亡有关。

关键词 丰富环境;缺血缺氧性脑损伤;脑源性神经营养因子;凋亡

中图分类号:R742.3, R722, R493 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2017)-07-0750-06

Effects of enriched environment intervention on brain-derived neurotrophic factor expression and apoptosis in hippocampus of hypoxic ischemic brain damaged neonatal rats/SONG Mingyang, ZHU Luwen, YE Tao, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2017,32(7): 750—755

Abstract

Objective: To investigate the effect of enriched environment intervention on brain-derived neurotrophic factor expression and apoptosis in hippocampus of hypoxic-ischemic brain damaged(HIBO) neonatal rats.

Method: Thirty-six male 7-day-old rats were randomly divided into sham operation group, model group, enriched environment group, each group was further divided into 7 days and 28 days subgroups (n=6). HIBD model of neonatal rats was established according to Rice-Vannucci classical methods. The model group and the sham operation group accepted no treatment. Enriched enriched environment group was treated with early touch and enriched environment stimulation. 7 days and 28 days after operation, the learning and memory ability was evaluated with the water maze detection method, the expression levels of BDNF were detected by immuno-histochemical method. The apoptosis was detected by TUNEL method.

Result: Compared with the model group, the hidden platform escape latency period (EL) was significantly shortened ($P < 0.05$) in enriched environment group 7 days and 28 days after operation, the cross-platform number within 2 minutes was significantly increased($P < 0.05$),the expression of BDNF increased ($P < 0.05$),TUNEL positive cell number decreased ($P < 0.05$).

Conclusion: Enriched environment can improve the learning and memory ability in hypoxic-ischemic brain damage neonatal rat, which may be related to the up regulation of BDNF expression and anti-apoptosis in hippo-

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2017.07.004

*基金项目:黑龙江省高校科技创新团队建设计划项目(2013TD007);黑龙江中医药大学科研基金项目(201506)

1 黑龙江中医药大学附属第二医院,哈尔滨,150001; 2 黑龙江中医药大学; 3 通讯作者

作者简介:宋名杨,女,住院医师; 收稿日期:2016-03-27

campus.

Author's address The Second Affiliated Hospital of Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin, 150001

Key word enriched environment; hypoxic-ischemic brain damage; brain-derived neurotrophic factor; apoptosis

新生儿缺血缺氧性脑病(hypoxic-ischemic encephalopathy, HIE)是围生期新生儿因宫内缺氧或分娩时、出生后窒息所引起的神经功能障碍的脑部疾病,若不及时治疗,其死亡率及致残率较高^[1]。而丰富环境是一种非侵入性康复治疗方法,是基于标准环境所建立的特殊环境,具有增强感觉、运动、认知及提高行为能力的作用,临床研究表明^[2-3],其可改善HIE患儿预后,促进神经系统发育,并且易于被患者接受;动物实验研究证实其可引起缺血缺氧脑损伤(hypoxic-ischemic brain damage, HIBD)后神经系统的调控因子、细胞及行态学的变化,明显提高中枢神经系统能力^[4-6]。脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)是一种渗透于神经系统各种活动的生物活性蛋白,具有促进HIBD后脑组织的修复及再生的作用^[7]。细胞凋亡是一种自体选择的死亡过程,由许多调控因子介导,BDNF与细胞凋亡相关。研究表明,采取恰当方法逆转细胞凋亡,改变细胞凋亡的结局,可促进脑损伤后神经功能的恢复^[8]。本实验观察新生大鼠脑缺血缺氧后海马CA1区BDNF、细胞凋亡的变化及丰富环境干预作用,探讨丰富环境治疗HIBD的相关作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

7日龄健康的SD清洁大鼠36只,雌雄不限,平均体重13—15g[黑龙江中医药大学动物实验中心提供,许可证编号:SCXK(黑)2008001],采用随机数字表法将36只新生大鼠随机分成3个组别,即丰富环境组、模型组、假手术组,每组12只,并根据造模后7d、28d时间点再分为两个亚组(n=6)。各组大鼠均于25日龄时与母鼠分离,自行食水。

1.2 实验试剂及仪器

兔抗大鼠BDNF多克隆抗体(北京博奥森);PV-6001兔二步法检测试剂盒(北京中杉金桥);凋亡检测试剂盒(德国Roche);蛋白酶K(美国Sigma);4%多聚甲醛(武汉博士德);RM2265型全自动轮转式

切片机(德国Leica);CX31型生物显微镜(日本OLYMPUS);DHG-9030A型电热恒温鼓风干燥箱(上海一恒);8%O₂+92%N₂混合气体(哈尔滨黎明气体集团)。

1.3 动物模型的制作

参照Rice-Vannucci经典方法建立新生大鼠HIBD动物模型^[9]。大鼠乙醚吸入麻醉,常规消毒后,左侧颈总动脉处切口,分离左侧颈总动脉,结扎两端,将中间部分剪断以确保永久性阻断,缝合皮肤,放入装有母鼠粪便的垫料中。HIBD模型制作成功主要体现在大鼠体重增长缓慢、脑部发育迟缓、行为能力异常及结扎侧脑部病理生理学改变^[10]。缺氧结束后,大鼠出现夹尾尖叫合并自发或夹尾左旋者的情况是行为异常的表现,证明实验模型制作成功,回笼母乳喂养。假手术组仅分离出左颈总动脉,而后缝合皮肤回笼母乳喂养。

1.4 干预模型制备及干预方法

1.4.1 丰富环境的模型制作:参照Nithianantharajah等^[11]研究自制长70cm、宽60cm、高50cm的半透明有机玻璃丰富环境(enriched environment, EE),内放置不同质感的砂纸、玻璃、从4℃冰箱中取出的冰冷硬币和有特殊气味的风油精、鱼腥味的棉球及不同口味的磨牙棒及浴砂,另配以眺望台、转盘、斜坡、秋千、平衡木、悬吊钻筒、刨花及毛线铃铛小球等“玩具”,同时以明暗红色灯光照射笼内活动区,并播放舒缓音乐,每日干预后清理笼内卫生,每3天更换一次环境布置。

1.4.2 干预方法:假手术组:术后24h置于无特殊刺激的标准笼中饲养,予以同等条件抓取,自由进食、进水,保持环境清洁。模型组:术后24h置于无特殊刺激的标准笼中饲养,予以同等条件抓取,自由进食、进水,保持环境清洁。丰富环境组:造模后24h,予以早期抚触疗法治疗7d,而后行添加视觉刺激的丰富环境疗法。早期抚触疗法:此法是模拟无视觉刺激的丰富环境疗法,依靠软硬、材质及温度不同的触觉刺激合并气味、声音来进行治疗,采用不同材

质、大小及软硬程度的毛刷沾染特殊气味从头到尾刷毛,15min/次,期间更换毛刷,4次/天,同时播放舒缓音乐;丰富环境刺激法:每日将与母鼠分离的仔鼠放入EE笼内,每日4次(上下午各2次),每次持续30min。考虑到大鼠昼夜活动时间选取上午6:00—7:00,下午5:00—6:00,定时定点。

1.5 Morris水迷宫试验

本实验选用直径为150cm的Morris水迷宫^[12],计算机规划水迷宫面积并均分为四个象限,其中一象限内置一低于水面1cm的平台,设此象限为平台象限,并以外置摄像头同步跟踪定位大鼠游行轨迹,计算机记录并计时,水温加热至(25±1)℃,测试时避光、保持环境安静。

1.5.1 定位航行试验:试验历时5d,试验前1天让大鼠自由游泳2min得以适应环境,每天夜间6点开始,共进行4次。每次将大鼠头向上并面向池壁,随机选取四个象限的其中一点轻柔的放入水中,计算机开始记录、定位、计时,从进入水中至大鼠爬上平台所用时间即为逃避潜伏期,每次试验间隔30s,若2min内未找到并爬上平台,则引导大鼠游上平台,且以120s为其逃避潜伏期,取试验第5天的逃避潜伏期并计算各组平均值。

1.5.2 空间探索试验:与大鼠记忆保持能力密切相关。第5天定位航行试验结束后移开平台,四个象限随机选取一点将大鼠头向上面向池壁轻柔的置于水中,记录其60s内穿越原平台所在位置的次数,评估4次,取均值。

1.6 取材及指标检测

于造模后7d、28d,选取一个亚组(n=6),经10%水合氯醛麻醉后(0.3g/kg),常规消毒,剪开腹腔,经膈肌造成气胸,充分暴露心脏,将灌注针刺入左心室并推至主动脉口,剪开右心耳,依次灌注100ml的0.9%氯化钠注射液及4%多聚甲醛溶液,最终造成大鼠四肢僵直状态。灌注结束后,快速断头取脑,参照Paxi-nos-Watson图谱^[13]分离左侧海马,置于4%多聚甲醛溶液进行后固定。常规石蜡包埋,制作3—5μm切片备用。

1.6.1 免疫组化:石蜡切片烤干,常规脱蜡入水,以3%H₂O₂溶液阻断活内源性过氧化物酶活性,滴加一抗(BDNF),4℃过夜(阴性对照滴加PBS溶液);隔

日室温下复温,滴加生物素化二抗工作液,37℃孵育10—15min,而后滴加辣根酶标记10—15min;以DAB显色,苏木素复染,分化、返蓝、脱水、封片并拍照。光镜下观察BDNF阳性细胞呈现棕褐色或棕黄色,以胞浆着色为主。以Image proplus 5.1图像分析软件进行平均光密度(mean optical density, MOD)分析,随机选取每只大鼠5张海马切片,在400倍光学显微镜下,观察海马CA1区BDNF表达情况,每张选取5个不重复视野,记录MOD值,取平均值进行统计学分析。

1.6.2 细胞凋亡:原位末端标记法(TUNEL)检测神经细胞凋亡情况:切片烤干,常规脱蜡复水,加入蛋白酶K室温孵育30min,以0.3%H₂O₂阻断内源性过氧化物酶,PBS清洗后滴加TUNEL反应液37℃孵育60min(阴性对照滴加PBS溶液),而后使用辣根过氧化物酶标记30min;以DAB显色、苏木素复染、分化、返蓝、干燥封片并拍照。光镜下阳性细胞核呈棕褐色或棕黄色,阴性细胞核呈蓝色。随机选取每只大鼠5张海马切片,在显微镜(10×40)下观察细胞凋亡数量,取均值,所得数据用SPSS 16.0软件进行方差统计分析。

1.7 统计学分析

应用SPSS 16.0进行统计学分析,数据采用均数±标准差表示,组间比较选用单因素ANOVA方差分析,两两间差异选用LSD-*t*检验。

2 结果

2.1 各组大鼠Morris水迷宫测试结果

定位航行试验中,各组大鼠因游泳次数增多,游泳能力提高,且愈加熟悉水迷宫环境,其逃避潜伏期均缩短。各时间点(7d、28d),模型组及丰富环境组的逃避潜伏期均较假手术组明显延长($P < 0.05$),但丰富环境组各时间点逃避潜伏期较模型组明显缩短,差异具有显著性意义($P < 0.05$),见表1。

空间探索试验中,撤去平台60s内,各时间点(7d、28d),丰富环境组的大鼠跨越平台次数明显优于模型组($P < 0.05$),但低于假手术组($P < 0.05$),假手术组大鼠运动轨迹主要重合在原平台位置,而模型组则分散在外周,丰富环境组运动轨迹则居于两者之间,见表1。

2.2 各组大鼠不同时间点海马CA1区BDNF表达水平

造模后各时间点(7d、28d),假手术组 BDNF 表达不明显;与假手术组比较,模型组 BDNF 表达增高,差异显著($P < 0.05$);与模型组相比,丰富环境组 BDNF 表达增加更为明显,差异具有显著性意义($P < 0.05$),见表 2,图 1。

2.3 各组大鼠不同时间点海马 CA1 区细胞凋亡情况
 海马 CA1 区对缺血缺氧尤为敏感,是缺血缺氧

损伤的易发区,与大鼠的学习记忆能力密切相关。各时间点假手术组细胞凋亡征象无显著性差异,绝大部分神经细胞均为蓝色,极少见棕黄色凋亡细胞核。与假手术组比较,模型组及丰富环境组 TUNEL 阳性细胞数较多($P < 0.05$),丰富环境组 TUNEL 阳性细胞数较模型组明显减少,差异有显著性意义($P < 0.05$),见表 3,图 2。

表 1 各组大鼠不同时间点 Morris 水迷宫测试结果 (x±s)					
组别	例数	定位航行实验逃避潜伏期(s)		空间探索实验穿台次数(n)	
		7d	28d	7d	28d
假手术组	6	43.68±7.63	11.31±3.90	3.80±0.32	6.50±0.46
模型组	6	71.27±10.69 ^①	35.03±6.07 ^①	2.33±0.45 ^①	3.17±0.52 ^①
丰富环境组	6	55.61±8.80 ^{①②}	22.92±5.70 ^{①②}	2.88±0.56 ^{①②}	4.67±0.63 ^{①②}
<i>F</i>		13.79	29.93	22.852	56.961
<i>P</i>		< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01

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

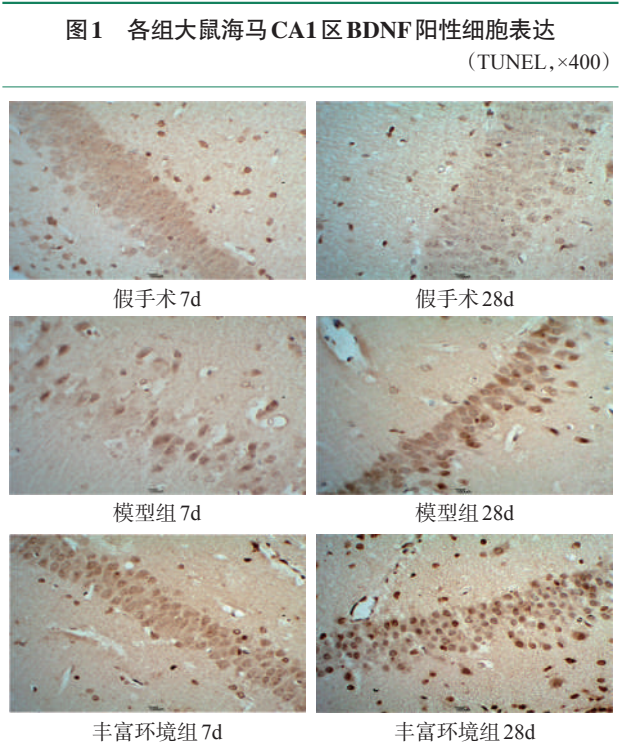


表 2 各组大鼠不同时间点海马 CA1 区 BDNF 的表达 (x±s, MOD)			
组别	例数	造模后 7d	造模后 28d
假手术组	6	0.09±0.01	0.11±0.01
缺氧缺血组	6	0.17±0.04 ^①	0.27±0.03 ^①
丰富环境组	6	0.23±0.06 ^{①②}	0.31±0.04 ^{①②}
<i>F</i>		16.755	72.923
<i>P</i>		< 0.01	< 0.01

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

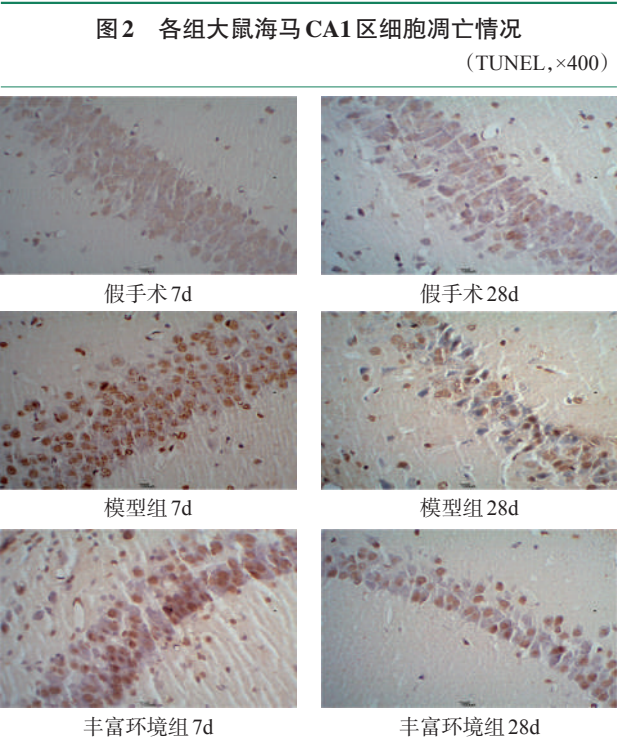


表 3 各组大鼠不同时间点海马 CA1 区 TUNEL 阳性细胞数 (个/400 倍)(x±s)			
组别	例数	造模后 7d	造模后 28d
假手术组	6	3.31±0.15	2.57±0.23
缺氧缺血组	6	178.39±5.22 ^①	101.28±10.31 ^①
丰富环境组	6	131.67±7.89 ^{①②}	75.34±8.62 ^{①②}
<i>F</i>		1652.493	260.920
<i>P</i>		< 0.01	< 0.01

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

3 讨论

丰富环境是生存环境与社交环境的有机结合,具有复杂性、新颖性、交流性等特点^[14]。在丰富环境治疗的核心内容中,丰富环境内各种视觉、听觉、触觉等刺激结合,活跃大脑皮质特定区域,并联合社交能力、探索能力、学习记忆能力,共同作用于受试生物,非侵入性刺激中枢神经系统。有学者发现,丰富环境可维持神经细胞存活,使突触可塑性延展,进而对发育脑塑形,并调控各种营养因子及再生因子的浓度,共同维持神经网络的完整性,促进缺血缺氧后脑组织的修复,进而影响学习记忆能力^[15-21]。

本实验各组新生大鼠于术后 24h 进行相应干预,选取 7d、28d 的大鼠进行水迷宫测试,检测各组大鼠学习记忆能力,分析丰富环境干预对 HIBD 新生大鼠学习记忆能力的影响。本实验结果显示各时间点,大鼠的定位航行及空间探索结果,丰富环境组优于模型组,提示丰富环境可改善 HIBD 大鼠学习记忆能力,进而弥补大鼠神经功能缺损。

BDNF 是一种广泛存在于神经系统中,对神经元的发生、发育、成熟及修复有重要作用的蛋白质^[22-23],在海马区含量较多,而大脑海马区与学习记忆能力密切相关。当脑组织缺血缺氧时,内源性 BDNF 蛋白在受损区域表达增高,不断结合其特异性受体 TrkB,激活特定信号传导通路,并影响转录因子结合 DNA 的活性来维持神经元的存活及修复,延缓脑损伤加重,并且 BDNF 还可诱导神经干细胞增殖、分化,以替代受损的神经细胞,这些作用相辅相成,共同抵御脑组织的缺血缺氧性损伤,改善大脑学习记忆能力,使神经系统功能得到最大限度的恢复^[24-26]。本实验中各时间点模型组 BDNF 表达均较假手术组增加,有显著性差异($P < 0.05$),说明脑缺血缺氧可启动内源性保护机制促进 BDNF 的表达,保护及修复受损的神经元细胞,而各时间点丰富环境组 BDNF 的表达较模型组显著增加,且有显著性差异($P < 0.05$),说明丰富环境可以在缺血缺氧的条件下更显著地调控神经系统中的 BDNF 表达,张国庆^[27]等发现脑缺血缺氧可增加海马受损区 BDNF 的表达,而丰富环境则在这一基础上提升了 BDNF 的比例,并改善 HIBD 大鼠学习记忆能力,这与本实验结果一致。

细胞凋亡是为了适应生存环境而由一系列基因介导、调控所展现的一种死亡过程^[28]。它的存在为损伤后治疗干预提供了“时间窗”,细胞是否死亡取决于促凋亡信号和抗凋亡信号之间的“博弈”^[29],在“时间窗”内实施有效的干预方法上调抗凋亡信号可保留神经系统的完整性,大大地改善神经功能预后,已有研究证实丰富环境可减轻 HIBD 后脑组织细胞凋亡程度^[30],进而保护脑组织,本实验结果表明,各时间点模型组细胞凋亡数量较假手术组及丰富环境显著增加,有显著性差异($P < 0.05$),说明丰富环境可有效下调 HIBD 新生大鼠细胞凋亡数量,从而减缓神经功能障碍进展。

综上所述,丰富环境能改善 HIBD 新生大鼠学习记忆能力,其机制可能与上调 BDNF 的表达、下调细胞凋亡数量有关。丰富环境可能通过上调 BDNF 的表达和抑制细胞凋亡,促使受损区域的神经细胞存活、修复及再生,减轻神经系统损伤,加快 HIBD 后受损脑组织的修复,从而改善其学习记忆能力。

参考文献

- [1] 娄玉霞.单唾液酸神经节苷脂注射液在新生儿缺氧缺血性脑病治疗中的临床价值[J].现代预防医学,2014,41(4):635—636.
- [2] 邵粉丽.早期干预对缺氧缺血性脑病新生儿神经行为发育的影响[J].吉林医学,2012,33(30):6519.
- [3] 吴桂华,邵银进,曾圆霞.早期干预对中重度新生儿缺氧缺血性脑病预后的影响[J].赣南医学院学报,2013,33(4):523—525.
- [4] Seo JH, Yu JH, Suh H, et al. Fibroblast growth factor-2 induced by enriched environment enhances angiogenesis and motor function in chronic hypoxic-ischemic brain injury[J]. PLoS One, 2013, 8(9):e74405.
- [5] Morgan C, Novak I, Badawi N. Enriched environments and motor outcomes in cerebral palsy: systematic review and meta-analysis[J]. Pediatrics, 2013, 132(3):e735—746.
- [6] Rojas JJ, Deniz BF, Miguel PM, et al. Effects of daily environmental enrichment on behavior and dendritic spine density in hippocampus following neonatal hypoxia-ischemia in the rat[J]. Exp Neurol, 2013, (241):25—33.
- [7] 付美红,李海涛.脑源性神经营养因子与脑缺血的研究进展[J].安徽医药,2012,16(6):717—720.
- [8] Young D, Lawlor PA, Leone P, et al. Environmental enrichment inhibits spontaneous apoptosis, prevents seizures and is neuroprotective[J]. Nat Med, 1999, 5(4):448—453.
- [9] Rice JE 3rd, Vannucci RC, Brierley JB. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat[J].

- Ann Neurol, 1981, 9(2):131—141.
- [10] Andiné P, Thordstein M, Kjellmer I, et al. Evaluation of brain damage in a rat model of neonatal hypoxic-ischemia [J]. J Neurosci Methods, 1990, 35(3):253—260.
- [11] Nithianantharajah J, Hannan AJ. Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system[J]. Nat Rev Neurosci, 2006, 7(9):697—709.
- [12] Morris RGM. Spatial localization does not require the presence of local cues[J]. Learning & Motivation, 1981, 12(2): 239—260.
- [13] 诸葛启钊.大鼠脑立体定位图谱[M].北京:人民卫生出版社, 2005.104.
- [14] 李娟,谢斌.丰富环境与脑卒中康复[J].中国康复理论与实践, 2012,18(1):47—52.
- [15] Hosseiny S, Pietri M, Petit-Paitel A, et al. Differential neuronal plasticity in mouse hippocampus associated with various periods of enriched environment during postnatal development[J]. Brain Struct Funct, 2015, 220(6):3435—3448.
- [16] 刘传军,郭延奎,李亚鲁,等.早期干预对缺氧缺血脑损伤新生鼠大脑皮质突触重塑的影响[J].中国妇幼保健,2011,26(11): 1702—1704.
- [17] Balduini W, Carloni S, Perrone S, et al. The use of melatonin in hypoxic-ischemic brain damage: an experimental study[J]. J Matern Fetal Neonatal Med, 2012, 25(Suppl 1): 119—124.
- [18] 辛庆刚,张丽华,张士岭.早期干预对HIBD大鼠神经干细胞分化的影响[J].中国伤残医学,2013,21(7):97—99.
- [19] 陈光福,张蕴芳,龙琦,等.丰富环境干预促进缺氧缺血性脑损伤新生大鼠神经元细胞增殖和功能修复[J].中国当代儿科杂志, 2012,14(2):139—143.
- [20] 于若谷,赵聪敏,王丽雁,等.丰富环境干预后HIBD大鼠脑超微结构改变[J].第三军医大学学报,2006,28(8):819—820.
- [21] Xu X, Ye L, Ruan Q. Environmental enrichment induces synaptic structural modification after transient focal cerebral ischemia in rats[J]. Exp Biol Med (Maywood), 2009, 234 (3):296—305.
- [22] Ma H, Yu B, Kong L, et al. Neural stem cells over-expressing brain-derived neurotrophic factor (BDNF) stimulate synaptic protein expression and promote functional recovery following transplantation in rat model of traumatic brain injury[J]. Neurochem Res, 2012, 37(1):69—83.
- [23] Pan M, Li Z, Yeung V, et al. Dietary supplementation of soy germ phytoestrogens or estradiol improves spatial memory performance and increases gene expression of BDNF, TrkB receptor and synaptic factors in ovariectomized rats [J]. Nutr Metab (Lond), 2010, (7):75.
- [24] 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.
- [25] 江东,于建云.脑源性神经营养因子临床研究进展[J].神经解剖学杂志,2011,27(2):221—225.
- [26] 胡泳菊,汤永红.脑源性神经营养因子对神经干细胞增殖分化的影响[J].现代医药卫生,2014,30(1):53—55.
- [27] 张国庆.丰富环境干预对新生大鼠的神经康复作用及其机制的研究[D].上海:复旦大学,2007.
- [28] 张勤丽,牛侨.细胞凋亡机制概述[J].环境与职业医学,2007,24 (1):102—107.
- [29] 俞丹.外源性BDNF在宫内缺氧环境中对胎盘及胚胎血脑屏障通透性和脑细胞凋亡的作用及信号传导的研究[D].成都:四川大学,2004.
- [30] 宋名杨,朱路文,叶涛,等.丰富环境促进缺血缺氧性脑损伤修复的研究进展[J].中国康复理论与实践,2016,22(1):61—64.