

丰富环境对脑缺血大鼠行为学恢复及神经丝蛋白、突触素表达的影响*

薛丽¹ 廖维靖^{1,3} 蔺俊斌² 章鑫² 陈修平² 徐换²

摘要

目的:研究“形神共养”对脑缺血大鼠行为学恢复及神经丝蛋白(NF)、突触素(SYN)表达的影响。

方法:制作线栓法大鼠脑缺血模型(MCAO),随机分为“形养”组、“神养”组、“形神共养”组、“标准养”组及假手术组。术后第3、10、17、24、30天进行平衡木行走试验及倾斜板试验,干预结束后进行免疫组织化学检测大鼠梗死周围皮质及海马区NF、SYN的表达。

结果:平衡木行走试验和倾斜板试验:三个治疗组大鼠评分均优于“标准养”组($P < 0.05$)。免疫组化检测:“形养”、“神养”、“形神共养”组大鼠梗死周围皮质及海马区NF、SYN表达均高于标准养组,“形神共养”组表达高于其他两组($P < 0.05$)。

结论:“形神共养”的丰富生存环境可促进脑缺血大鼠行为学恢复,其机制可能与促进NF及SYN的表达有关。

关键词 形神共养;丰富生存环境;脑缺血再灌注;神经丝蛋白;突触素

中图分类号:R743.3, R493 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2017)-07-0763-05

The influence of enriched environment on behavioral recovery and NF, SYN expression after focal ischemia in rats/XUE Li, LIAO Weijing, LIN Junbin, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2017, 32(7): 763—767

Abstract

Objective: To study the effect of “both physique and spirit” enriched environment on behavioral recovery and expression of NF and SYN.

Method: Established the rat model of MCAO, then divided the rats into “physique regimen” group, “spirit regimen” group, “physique and spirit regimen” group, standard group and sham-operated group. The beam-walking test and inclined plane test were used to evaluate the functional recovery at day 3, 10, 17, 24 and 30 after MCAO. NF and SYN were immunohistochemistry stained to detect the expression in peri-infarct and hippocampus area after intervention.

Result: Rats in three treated groups performed better than in standard group($P < 0.05$) in the beam-walking test and inclined plane test ($P < 0.05$). The expression of NF and SYN in peri-infarct and hippocampus area of rats in three treated groups were significantly higher than in standard group($P < 0.05$). Moreover, the rats in “physique and spirit” enriched environment group had the highest expression than the other two groups($P < 0.05$).

Conclusion: “Physique and spirit regimen” with enriched environment can promote the functional recovery, which may be associated with the enhanced expression of NF and SYN.

Author's address Dept. of Rehabilitation Medicine, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Hubei, 430071

Key word preservation from both physique and spirit; enriched environment; cerebral ischemia-reperfusion; neurofilament; synaptophysin

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2017.07.006

*基金项目:国家自然科学基金资助项目(303163421)

1 武汉大学中南医院康复医学科,武汉大学脑血管病研究中心,武汉,430071; 2 武汉大学中南医院康复医学科; 3 通讯作者

作者简介:薛丽,女,硕士研究生; 收稿日期:2015-10-16

脑卒中亦称脑血管意外,是指突然发生的、由脑血管病变引起的局限性或全脑功能障碍,持续时间超过24h或者引起死亡的症候群^[1]。近年来随着医疗水平的提高,脑卒中急性期的死亡率有所下降,使得脑卒中的总患病率和致残率明显提高,给患者及社会带来了沉重的负担^[2]。自Hebb^[3]提出“丰富生存环境”概念来,丰富环境得到了广泛研究,丰富环境可促进脑组织功能恢复^[4],增强神经系统的可塑性,促进实验大鼠感觉运动功能^[5]。《黄帝内经》强调静以养神,动以养形,动静结合,形神共养。形神共养是中医养生和康复的基本原则^[6],研究表明形神共养可促进实验大鼠的认知功能,降低高血压危险因素^[7]。本实验采用大鼠大脑中动脉阻塞模型,观察“形神共养”对脑缺血大鼠认知功能及神经丝蛋白(neurofilament protein, NF)、突触素(synaptophysin, SYN)表达的影响,为临床应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及分组:SPF级,雄性SD大鼠60只,购自武汉大学动物实验中心,体重220—240g,饲养于武汉大学生物安全三级动物实验室。计算机随机数字法分为假手术组、“形养”组、“神养”组、“形神共养”组、标准养组,每组12只。

1.1.2 主要试剂和仪器:NF小鼠抗单克隆抗体、SYN兔抗多克隆抗体(武汉博士德生物技术公司);抗鼠/兔通用型免疫组化试剂盒(Dako Denmark A/S);尼龙线栓(北京沙东生物技术有限公司);光学显微镜Olympus BX51(日本);冰冻切片机Leica CM1950(德国)。

1.2 实验方法

1.2.1 动物造模:参照廖维靖等^[8]线栓改良法建立大鼠大脑中动脉阻断及再灌注模型,手术组线栓插入(1.8±0.2)cm,假手术组线栓插入深度1cm,余操作同手术组,线栓插入2h后恢复供血。造模术后,参照Zea Longa法^[9]对已苏醒大鼠进行神经功能缺损评分,评分在1—3分认为造模成功,纳入实验。

1.2.2 丰富环境笼具及干预方法:术后3天开始给予丰富环境刺激。“形养”笼90cm×75cm×50cm,笼内除放置垫料、食物和水外,另放置跑轮、不同形状和

颜色的玩具、管道、楼梯、秋千等供动物攀爬玩耍,笼内物品每日更换位置。“神养”笼大小同“形养”笼,笼中仅放置垫料、饲料和水。“形养”、“神养”组大鼠分别居于相应笼内4h/d,“形神共养”组大鼠入住“形养”笼4h后转入“神养”笼4h,其余时间居于标准笼。标准养组及假手术组居于无特殊刺激的标准笼中44cm×32cm×20cm,干预时间从术后3天开始,持续4周。

1.2.3 行为学评分:术后第3、10、17、24、30天进行行为学评分。

平衡木行走实验:用于测试大鼠运动的协调能力^[10],平衡木长175cm,宽1.9cm,放在距离地面70cm处,让大鼠在其上行走。评分标准0分:大鼠在平衡木上掉下来;1分:大鼠在平衡木上无法行走,可坐在上面;2分:大鼠行走过程中掉下来;3分:大鼠能走过平衡木,但患侧后肢不能帮助其向前移动;4分:大鼠走过平衡木,但有50%的机会跌倒;5分:大鼠走过平衡木,较少跌倒;6分:大鼠走过平衡木,无跌倒,重复测量3次取平均值。

倾斜板实验^[11]:在于观察大鼠的平衡功能^[11],两块500mm×270mm的矩形木板通过合页连接,构成试验平板。可调节不同的倾斜角度,记录大鼠能坚持的最大角度,重复测量3次取平均值。

1.2.4 免疫组织化学染色:干预结束后,将大鼠用10%水合氯醛(350mg/kg)麻醉后,用生理盐水和多聚甲醛溶液进行内灌注,灌注成功后,根据Paxinos的大鼠脑立体定位图谱第三版^[12],切取包含有梗死灶的组织块,依次进行固定、脱水、浸蜡、包埋、切片后,采用免疫组织化学链霉菌抗生物素蛋白—过氧化物酶连结法(streptavidin-peroxidase, SP)染色,试剂选用NF小鼠抗单克隆抗体、SYN兔抗多克隆抗体和SP试剂盒。阴性对照切片采用磷酸盐缓冲液代替一抗,其余步骤相同。免疫组化结果采用Image-Pro Plus 6.0系统进行分析,每个标本随机选取5张切片,在200倍显微镜下每张切片选取3个不同视野,测定梗死灶周围皮质及海马区NF、SYN阳性产物的累积光密度值(integral optical density, IOD)。所有检测应在相同的条件下进行处理。

1.3 统计学分析

采用SPSS 18.0软件进行分析,符合正态分布的实验数据用均数±标准差表示,多个样本均数比

较采用单因素的方差分析。

2 结果

2.1 行为学评分

2.1.1 平衡木行走实验评分:术后第10天,“形养”组与“形神共养”组评分高于“神养”组、标准养组($P < 0.05$),“神养”组与标准养组无明显差异($P > 0.05$),术后第17天其他手术组评分均高于标准养组($P < 0.05$),术后第24天开始,“形神共养”组评分高于其他手术组,差异具有显著性意义($P < 0.05$),术后31天,“形神共养”组与假手术组无明显差异($P > 0.05$)。见表1。

2.1.2 倾斜板实验评分:术后第10天,“形神共养”组、“形养”组评分高于标准养组($P < 0.05$),术后第24天,“形神共养”组评分高于其他手术组($P < 0.05$),“形养”组评分高于“神养”组、标准养组($P < 0.05$),术后第17天、31天,“形养”组与“形神共养”组评分高于“神养”组、标准养组($P < 0.05$),“形养”组与“形神共养”组无明显差异,“形神共养”组与假

手术组无明显差异($P > 0.05$)。见表2。

2.2 免疫组织化学检测

2.2.1 “形神共养”对脑缺血大鼠梗死周边及海马区NF表达的影响:手术组大鼠NF免疫组化阳性细胞呈圆形或椭圆形,棕黄色或棕褐色,在大鼠梗死周围皮质及海马区均见表达。假手术组皮质及海马区也可见表达,但表达较少。图像分析显示:“形神共养”组NF表达高于其他各组($P < 0.05$),“形养”组高于“神养”组,“神养”组高于标准养组($P < 0.05$),标准养组表达高于假手术组($P < 0.05$)。见表3。

2.2.2 “形神共养”对脑缺血大鼠梗死周边及海马区SYN表达的影响:手术组大鼠SYN免疫反应产物主要在皮质、海马,可见弥散性表达。SYN免疫反应产物呈棕黄色,颗粒状散在分布,排列成环状、半弧形或者不规则团块,假手术组表达较少。图像分析显示:“形神共养”组SYN表达高于其他各组($P < 0.05$),“形养”高于“神养”组,但两者之间无显著性差异($P > 0.05$),标准养组高于假手术组,但与假手术组之间无显著性差异($P > 0.05$)。见表4。

表1 各组大鼠平衡木行走实验评分 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	第3天	第10天	第17天	第24天	第30天
形养组	12	1.82±0.87	3.18±1.08 ^①	3.82±0.60 ^①	4.36±0.67 ^{①③}	4.45±0.69 ^{①③}
神养组	12	1.64±0.67	2.36±0.92 ^{②③}	3.45±0.82 ^{①③}	4.00±1.00 ^{①③}	4.18±0.98 ^{①③}
形神共养组	12	1.73±0.90	3.36±0.92 ^①	4.18±0.60 ^{①②}	5.00±0.63 ^{①②}	5.18±0.98 ^{①②}
标准养组	12	1.55±0.82	2.18±0.75 ^{②③}	2.73±0.90 ^{②③}	3.09±0.83 ^{②③}	3.27±0.65 ^{②③}
假手术组	12	5.27±0.65 ^{①②③}	5.64±0.67 ^{①②③}	5.91±0.30 ^{①②③}	6.00±0.00 ^{①②③}	6.00±0.00 ^{①②}

同时间点与标准养组比较:① $P < 0.05$;同时间点与“形养”组比较:② $P < 0.05$;同时间点与“形神共养”组比较:③ $P < 0.05$

表2 各组大鼠倾斜板实验评分 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	倾斜板实验评分				
		第3天	第10天	第17天	第24天	第30天
形养组	12	38.27±2.97	43.27±2.83 ^①	49.18±3.49 ^①	51.55±4.16 ^{①③}	52.55±3.62 ^①
神养组	12	38.09±2.66	41.91±3.65	45.64±4.03 ^③	47.73±3.55 ^{①②③}	50.55±2.81 ^③
形神共养组	12	38.45±4.11	43.55±3.86 ^①	50.27±4.90 ^①	54.55±3.30 ^{①②}	54.64±4.11 ^①
标准养组	12	37.82±5.15	38.91±3.53 ^{②③}	41.91±6.76 ^{②③}	43.55±2.81 ^{②③}	45.64±3.35 ^{②③}
假手术组	12	52.55±6.59 ^{①②③}	54.55±6.23 ^{①②③}	57.27±2.28 ^{①②③}	57.55±2.88 ^{①②③}	57.64±2.91 ^{①②}

同时间点与标准养组比较:① $P < 0.05$;同时间点与“形养”组比较:② $P < 0.05$;同时间点与“形神共养”组比较:③ $P < 0.05$

表3 各组大鼠梗死周围皮质及海马区NF表达的累积光密度值 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	梗死周围皮质区	海马区
形养组	12	25405.78±2624.29 ^{①③}	16050.55±1243.07 ^{①③}
神养组	12	19634.07±2129.41 ^{①②③}	12476.41±1248.59 ^{①②③}
形神共养组	12	33487.08±4848.63 ^{①②}	20539.07±2271.98 ^{①②}
标准养组	12	13631.56±2135.59 ^{②③}	8764.11±476.17 ^{②③}
假手术组	12	9510.04±869.85 ^{②③}	6661.86±977.04 ^{②③}

与相同区域标准养组比较:① $P < 0.05$;与相同区域“形养”组比较:② $P < 0.05$;与相同区域“形神共养”组比较:③ $P < 0.05$

表4 各组大鼠梗死周围皮质及海马区SYN表达的累积光密度值 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	梗死周围皮质区	海马区
形养组	12	24952.20±1210.22 ^{①③}	12349.74±2540.04 ^{①③}
神养组	12	23117.81±1495.39 ^{①③}	11918.66±2347.68 ^{①③}
形神共养组	12	34380.14±6457.00 ^{①②}	14858.23±2887.65 ^{①②}
标准养组	12	9351.09±971.14 ^{②③}	6857.79±508.10 ^{②③}
假手术组	12	7220.78±974.96 ^{②③}	5523.13±660.49 ^{②③}

与相同区域标准养组比较:① $P < 0.05$;与相同区域“形养”组比较:② $P < 0.05$;与相同区域“形神共养”组比较:③ $P < 0.05$

3 讨论

形神共养是中医养生的基本原则,形宜动,神宜静,形与神相互依存,相互统一,是健康的象征^[6]。采用中医养生康复理论进行护理,可有效改善脑卒中患者肢体运动功能,提高康复效果^[13]。丰富环境^[14]是指能促进感觉、认知及行为能力的居住条件,这是与标准环境相对而言的,是指多只大鼠居于笼中,大鼠可在笼内进行各种探索和社会交往,近年来,丰富环境得到了广泛的研究,多项研究表明^[15-16]丰富环境可促进神经系统的可塑性,提高大鼠的感觉、运动及认知功能。

本实验在丰富环境基础上,以“形神共养”理论为指导,根据“动以养形”理论制作“形养”笼,笼内放置各种积木、玩具、木梯、台阶、秋千、管道、跑轮等供动物玩耍,大鼠在笼内可以进行交流,有利于大鼠增加身体活动、学习经历、躯体感觉及视觉输入,从而提高行为能力,根据“静以养神”理论制作出“神养”笼,大鼠可以在安静的环境下,拥有更大的活动空间,群居的生活更利于大鼠之间的交流。

本研究采用平衡木行走实验、倾斜板试实验评估大鼠的行为学恢复情况。研究结果显示,从术后第10天开始,进行丰富环境干预的“形养”、“神养”、“形神共养”组行为学结果明显优于标准养组,从术后24天开始,“形神共养”组的平衡木行走实验、倾斜板实验评分明显高于其他各组,“形养”组评分结果优于“神养组”。这些结果表明,将大鼠居于可进行探索学习和体力活动的“形养”笼内,可明显提高大鼠的运动协调功能和平衡功能,“形神共养”组大鼠与“形养”组大鼠相比,有更多的安静休息和群居交流的时间,更有利于改善其运动协调能力。

神经丝蛋白是神经元胞体及神经轴突细胞骨架的主要成分,由神经元胞体合成,主要分布于神经细胞的胞体和神经突起内,在维持神经元功能及轴浆运输方面发挥重要作用^[17-19],故NF的变化可用于反映神经元生理及病理改变。李娜等^[20]研究发现丰富环境、探索学习可促进脑梗死大鼠皮质NF的表达以及脑梗死后患侧肢体功能的恢复,Rolstad S等^[21]研究发现提高NF的浓度可降低认知障碍,减轻血管负担,Dubois等^[22]研究表明训练和学习的环境可减少非磷酸化NF的降低,对脑梗死起到明显的保

护作用。突触素是一种位于突触囊泡膜上的特异性蛋白,参与神经系统突触连接的形成与维持,是突触前传入神经纤维特异性标志物,反映突触的分布及密度^[23-24]。它在突触发生、轴突生长、神经递质释放及突触可塑性等生理活动中具有重要作用,SYN的变化可以作为损伤脑组织修复的重要观察指标^[25]。研究^[26]表明与标准环境相比,丰富环境训练可以提高SYN表达,江城等^[27]研究表明丰富环境可促进脑缺血大鼠SYN的表达,促进功能表现的改善和大脑可塑性的改变。

本实验免疫组化结果显示,在梗死周围皮质及海马区,“形神共养”组、“形养”组、“神养”组NF、SYN表达明显高于标准养组,“形神共养”组NF、SYN的表达高于其他手术各组。该结果提示在“形神共养”的丰富环境下,大鼠可进行探索学习和运动训练,这对大鼠梗死周围皮质及海马区NF、SYN的表达具有明显的保护作用,这一结果与大鼠的行为学评分结果相一致。NF及SYN免疫活动的变化,证明脑缺血后确实存在代偿性再生活动,可以形成新的突触联系,增加突触的可塑性,而且丰富康复训练可促进此重塑进程,在“形养”的丰富环境训练的基础上,加上有利于大鼠休息及群体间交流的“神养”训练,从而促进了受损神经元的修复及再生,可以更加有效地促进脑缺血大鼠神经功能的恢复。

4 结论

通过本研究可发现,“形神共养”的丰富环境对脑缺血大鼠行为学恢复的有利作用,以及对NF、SYN表达的促进作用,在本研究中我们并未选取多个时间点检测NF、SYN的表达,但是可证明4周“形神共养”的丰富环境训练,有利于受损神经元的恢复及再生,有利于脑缺血大鼠运动功能及认知功能的恢复,那么我们如何有效地将“形神共养”的丰富环境的实验结论用于指导临床治疗,通过什么手段来增强或者抑制相关的生长因子、通道蛋白、神经递质等,从而达到脑卒中患者功能恢复,这仍需我们进一步深入研究。相信随着神经生物学、分子生物学等基础学科以及康复医学的发展,在丰富环境促进神经元突触再生及功能重组的机制研究中必将有更大突破,从而更有效地指导临床治疗。

参考文献

- [1] 南登崑.康复医学[M].北京:人民卫生出版社,2008.158.
- [2] Koton S, Tsabari R, Molshazki N, et al. Burden and outcome of prevalent ischemic brain disease in a national acute stroke registry[J]. *Stroke*, 2013, 44(12):3293—3297.
- [3] Hebb DO. The effects of early experience on problem solving at maturity[J]. *Am Psychol*, 1947, 2: 306—307.
- [4] 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.
- [5] 张振铎,罗明祖.丰富环境对急性脑梗死大鼠感觉运动功能的影响[J].*脑与神经疾病杂志*,2009,17(6):458—461.
- [6] 宗文静,曹洪欣,刘寨华,等.形神合一话养生[J].*亚太传统医药*, 2015,11(12):1—2.
- [7] 曾贵刚,张申,李峻,等.养神与养形不同训练对SHR/SP大鼠血管性痴呆模型认知能力及血压的影响[J].*实验动物与比较医学*, 2014,34(2):89—92.
- [8] 廖维靖,刘淑红,范明,等.线栓阻断大鼠大脑中动脉制作缺血性脑损伤模型的改良[J].*中华物理医学与康复杂志*,2002,24(6): 345—348.
- [9] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. *Stroke*, 1989, 20(1):84—91.
- [10] Ohlsson AL, Johansson BB. Environment influences functional outcome of cerebral infarction in rats[J]. *Stroke*, 1995, 26(4):644—649.
- [11] Bing GU, Jin JB, Hua-Nan LI, et al. Motor function evaluation of animal models for spinal cord injury[J]. *Chinese Pharmacological Bulletin*, 2011, 27(7):893—897.
- [12] George Paxinos 主编.大鼠脑立体定位图谱:[M].诸葛启钊,译.第3版.北京:人民卫生出版社,2005.5—8.
- [13] 张翠娣,鲁剑萍,黄芳,等.中医养生理论对脑卒中恢复期患者康复效果的研究[J].*护士进修杂志*,2014,29(16):1445—1446.
- [14] Dahlqvist P, Rönneback 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.
- [15] Kuptsova K, Kvist E, Nitzsche F, et al. Combined enriched environment + atipamezole treatment transiently improves sensory functions in stroke rats independent from neurogenesis and angiogenesis[J]. *Rom J Morphol Embryol*, 2015, 56(1):41—47.
- [16] Greifzu F, Pielecka-Fortuna J, Kalogeraki E, et al. Environmental enrichment extends ocular dominance plasticity into adulthood and protects from stroke-induced impairments of plasticity[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(3):1150—1155.
- [17] Safinya CR, Deek J, Beck R, et al. Liquid crystal assemblies in biologically inspired systems[J]. *Liq Cryst*, 2013, 40(12):1748—1758.
- [18] Lee S, Shea TB. The high molecular weight neurofilament subunit plays an essential role in axonal outgrowth and stabilization[J]. *Biol Open*, 2014, 3(10):974—981.
- [19] Laser-Azogui A, Kornreich M, Malka-Gibor E, et al. Neurofilament assembly and function during neuronal development[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2015, (32):92—101.
- [20] 李娜,王天俊,高俊淑,等.不同环境设置对局灶性脑梗死大鼠梗死灶周围神经丝蛋白、胶质纤维酸性蛋白表达的影响[J].*临床荟萃*. 2011, 26(24): 2141—2144.
- [21] Rolstad S, Berg AI, Eckerström C, et al. Differential impact of neurofilament light subunit on cognition and functional outcome in memory clinic patients with and without vascular burden[J]. *J Alzheimers Dis*, 2015, 45(3):873—881.
- [22] Dubois M, Strazielle C, Julien JP, et al. Mice with the deleted neurofilament of low molecular weight (Nefl) gene: 2. Effects on motor functions and spatial orientation[J]. *J Neurosci Res*, 2005, 80(6):751—758.
- [23] Zhang W, Wang GM, Wang PJ, et al. Effects of neural stem cells on synaptic proteins and memory in a mouse model of Alzheimer's disease[J]. *J Neurosci Res*, 2014, 92(2):185—194.
- [24] Lohmann SM, Ueda T, Greengard P. Ontogeny of synaptic phosphoproteins in brain[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1978, 75(8):4037—4041.
- [25] Machado AG, Cooperrider J, Furmaga HT, et al. Chronic 30-Hz deep cerebellar stimulation coupled with training enhances post-ischemia motor recovery and peri-infarct synaptophysin expression in rodents[J]. *Neurosurgery*, 2013, 73(2): 344—353.
- [26] Sampedro-Piquero P, Arias JL, Begega A. Behavioral testing-related changes in the expression of Synapsin I and glucocorticoid receptors in standard and enriched aged Wistar rats[J]. *Exp Gerontol*, 2014, (58):292—302.
- [27] 江城,廖维靖,杨万同,等.丰富康复训练对脑缺血再灌注大鼠微管相关蛋白2和突触素表达的影响[J].*中华物理医学与康复杂志*,2008,30(11):750—755.