

·基础研究·

早期康复介入对脑损伤幼鼠的行为学及其体内降钙素基因相关肽表达的影响*

全莉娟¹ 陈晓¹ 王珺¹ 应德霞¹

摘要

目的:研究早期康复治疗对缺血缺氧性脑损伤幼鼠的行为学及其体内降钙素基因相关肽表达的影响。

方法:将40只15日龄SD大鼠平均分为4组,每组10只,分别为:脑损伤模型组:结扎大鼠左颈总动脉并置于含8%氧气和92%氮气的缺氧环境中,以此作为脑损伤模型;康复治疗组:造模后连续两周给予触摸(20 min/d)、丰富环境刺激(30 min/d)和平衡木训练(30min/d);假手术组:行左侧颈总动脉分离术后不作结扎及缺氧处理;对照组:不做处理。康复治疗两周后对各组大鼠进行平衡木实验、步伐失误实验和Morris水迷宫实验,并测定血浆、脑组织和脊髓中降钙素基因相关肽(CGRP)的含量。

结果:与对照组相比,康复治疗组大鼠的平衡木实验评分增加1.6($P<0.01$),步伐失误率增加8.07%($P<0.01$),Morris水迷宫实验中的逃避潜伏期增加18.1s($P<0.01$),2min内跨越原平台的次数减少6次($P<0.01$),血浆、脑组织和脊髓中CGRP含量分别增加18.94pg/ml、103.38pg/ml和197.26pg/ml($P<0.01$);与脑损伤模型组相比,康复治疗组大鼠的平衡木实验得分减少1.8($P<0.01$),步伐失误率减少15.59%($P<0.01$),Morris水迷宫实验中的逃避潜伏期减少10.5s($P<0.05$),2min内跨越原平台的次数增加4次($P<0.05$),血浆、脑组织和脊髓中CGRP含量分别减少13.91pg/ml、86.57pg/ml和120.16pg/ml($P<0.05$)。

结论:早期康复介入两周对脑损伤幼鼠的平衡能力、协调能力、学习记忆能力有明显改善,并能增加血浆、脑组织和脊髓中CGRP的含量,但未能恢复到正常水平。

关键词 康复;缺血缺氧性脑损伤;行为;降钙素基因相关肽

中图分类号:R743.3,R493 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2017)-10-1114-05

Effects of early rehabilitation on the behavior and expression of calcitonin gene-related peptide in neonatal rats with brain damage/QUAN Lijuan,CHEN Xiao,WANG Jun,et al//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2017, 32(10): 1114—1118

Abstract

Objective:To study the effects of early rehabilitation on the behavior and expression of calcitonin gene-related peptide(CGRP) in neonatal rats with hypoxic-ischemic brain damage.

Method:Totally 40 15d rats were divided into 4 groups, and 10 rats each, sex in half. The 4 groups were brain damage group: brain damage model was established by ligation the left common carotid artery followed by exposure to hypoxia environment (8% O₂ and 92% N₂) for 2 hours; rehabilitation group: brain damaged rats were stimulated by touch (20 minutes daily), enriched environment (30 minutes daily) and traversing a balance beam (30 minutes daily) for two weeks; sham-operated group: rats were only subjected to the separation of left carotid artery without carotid ligation and hypoxia; control group: neither model establishment nor rehabilitation was done. Beam balance test, foot fault test and Morris water maze test were performed and content

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2017.10.005

*基金项目:江西省教育厅科学技术研究项目(14013)

1 南昌大学第一附属医院,南昌,330000

作者简介:全莉娟,女,副主任医师;收稿日期:2016-06-26

of CGRP in plasma, brain tissue and spinal cord were determined after two weeks of rehabilitation.

Result: Compared with control group, there were 1.6 points increase in scores of traversing a balance beam ($P < 0.01$), 8.07% increase in rate of foot fault ($P < 0.01$), escape latent period increased 18.1 seconds in Morris water maze ($P < 0.01$), 6 times decrease in crossing the original platform within 2 minutes ($P < 0.01$), 18.94 pg/ml, 103.38 pg/ml and 197.26 pg/ml decrease in CGRP content of plasma, brain tissue and spinal cord, respectively ($P < 0.01$). Compared with model group, there were 1.8 points fall in scores of traversing a square bridge ($P < 0.01$), 15.59% decrease in rate of foot fault ($P < 0.01$), 10.5 seconds decrease in escape latent period ($P < 0.05$), 4 times increase in crossing the original platform within 2 minutes ($P < 0.05$), 13.91 pg/ml, 86.57 pg/ml and 120.16 pg/ml increase in CGRP content of plasma, brain tissue and spinal cord, respectively ($P < 0.05$).

Conclusion: The rats ability of balance, coordination, learning and memory failure to return to normal levels but ameliorated significantly after two weeks of rehabilitation, and the levels of CGRP in plasma, brain tissue and spinal cord were markedly increased.

Author's address The First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang, 330000

Key word rehabilitation; hypoxic-ischemic brain damage; behavior; calcitonin gene-related peptide

缺血缺氧性脑损伤 (hypoxic-ischemic brain damage, HIBD) 是导致小儿知觉障碍、智力障碍、脑性瘫痪、发育迟缓及癫痫的重要原因^[1-2]。目前用于缺血缺氧性脑损伤的治疗方法有药物治疗、高压氧治疗,以及多种方法联合治疗等^[3-5]。近年来,行为疗法(触摸、丰富环境刺激等)作为一种安全、有效、经济的康复手段,越来越多地出现在缺血缺氧性脑损伤的疗效及其机制研究中。本实验以缺血缺氧性脑损伤新生大鼠为模型,研究早期康复介入对脑损伤幼鼠行为学的改善情况,以及对幼鼠血浆、脑组织和脊髓中的降钙素基因相关肽(calcitonin gene-related peptide, CGRP)含量的影响。

1 材料与方 法

1.1 实验动物及分组

实验动物为 SPF 级 15 日龄新生 SD 大鼠, 40 只, 雌雄各半, 体重 21—30g, 由江西省实验动物中心提供。将 40 只 15 日龄大鼠按随机数字表法分成 4 组, 每组 10 只, 雌雄各半, 分别为对照组、假手术组、脑损伤模型组和康复治疗组, 实验室常规饲养。

1.2 主要仪器与试剂

Morris 水迷宫装置(安徽正华生物仪器设备有限公司); 大鼠降钙素基因相关肽 ELISA 试剂盒(Cayman 公司)。

1.3 缺氧缺血性脑损伤模型的建立

脑损伤模型组和康复治疗组大鼠仰卧位固定于手术板上, 乙醚麻醉后, 常规酒精消毒颈部皮肤, 取

颈部正中切口, 钝性分离并结扎左颈总动脉, 缝合切口。恢复 2h 后, 置于 37℃ 缺氧舱内, 持续输入 8% 氧气和 92% 氮气的混合气体, 2h 后取出大鼠, 维持 37℃ 环境, 观察大鼠行为 1h, 以翻身不能、平衡异常者初步视为成功模型, 3 天后各组大鼠进行平衡木和步伐失误测试, 造模后大鼠与对照组比较, 平衡木实验得分和步伐失误率增加, 差异有显著性意义 ($P < 0.05$), 视为造模成功^[6]。假手术组仅切开幼鼠颈部皮肤, 分离左颈总动脉后缝合皮肤伤口, 不结扎。

1.4 康复介入

每日上午 8 时, 用软毛刷对康复治疗组大鼠从头到尾匀速刷动, 持续 20min; 触摸结束后将大鼠暴露于含有转盘、阶梯、管道、秋千等物品的丰富环境中(每周改变环境 2 次), 持续 30min; 下午 14 时, 进行平衡木训练, 持续 30min^[7]。康复治疗持续 2 周。其余各组大鼠饲养于光照 12h, 黑暗 12h, 温度 20—26℃, 湿度 40%—70% 的环境中, 自由摄食和饮水。

1.5 运动评价

各组大鼠进行平衡木实验和步伐失误实验, 运动实验的选择及评价标准参照王拥军主编的《现代神经病学进展》^[8-9], 实验全程由两位南昌大学第一附属医院神经专科医师共同观察和评价。

1.5.1 平衡木实验: 用于检测大鼠的运动平衡性。平衡木长 100cm, 宽 2cm, 高 80cm, 两端各有一平台, 大鼠放置在平衡木上, 观察 120s, 根据大鼠在平衡木上的表现评分, 得分越高说明平衡能力越差。于大鼠 33 日龄进行测试评定, 每只大鼠测试 2 次, 每

次测试间隔5min,取两次测定的平均值作为实验结果,正式记录实验结果前测试3次,以适应测试环境。评分标准见表1。

表1 平衡木实验评分标准

实验表现	得分
能够到达平台或能维持正常平衡姿势	0
抓住平衡木的一侧	1
悬于平衡木并有一股体摔下平衡木	2
悬于平衡木并有两肢体摔下平衡木或在平衡木上旋转>60s	3
试图在平衡木上保持平衡>40s,但摔下	4
试图在平衡木上保持平衡>20s,但摔下	5
直接摔下:无保持平衡意图	6

1.5.2 步伐失误实验:由Hernande Z和Schallent建立发展的,用于检测大鼠的运动协调性^[9]。把大鼠放在网格上,每小格为3cm²,网格放置于离实验台一定高度,大鼠步伐失误时会从网格空档中滑脱,记录2min内大鼠前肢迈出的步伐总数及步伐失误数,用于计算步伐失误率。于大鼠33日龄进行测试评定,每只大鼠测试两次,取两次测定的平均值作为实验结果。

1.6 Morris 水迷宫实验

用Morris水迷宫实验测试大鼠学习记忆能力。平台放置第四象限,4个人水点随机择一将大鼠头朝池壁放入水中,记录大鼠找到水下平台的时间,以此作为逃避潜伏期,若120s仍未找到,则引导大鼠到平台,逃避潜伏期记为120s,每次让动物在平台上停留15s,如此将各组大鼠训练3天,每天4次。第4天(大鼠37日龄)开始测试,记录各组大鼠逃避潜伏期和撤除平台后2min内跨越原平台的次数,每只大鼠测试2次,取两次测定的平均值作为实验结果。

1.7 CGRP 的含量测定

将各组大鼠于37日龄用水合氯醛麻醉,腹主动脉取血,离心分离出血浆;取脑和脊髓,称重后,加入适量生理盐水匀浆,离心分离出上层清液。血浆与匀浆液用于ELISA测定。根据试剂盒说明书的步骤进行操作,分析数据计算CGRP含量。

1.8 统计学分析

应用SPSS18.0进行统计学分析,计量资料以均数±标准差表示,多样本间均数比较采用单因素方差分析,并进行方差齐性检验,方差齐采用LSD-t检

验、方差不齐采用Tamhane T2检验。以P<0.05为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 康复介入前后各组大鼠平衡木实验测试结果

见表2。由平衡木实验测试结果可以看出,康复介入前,假手术组与对照组相比,得分无差异(P=1),模型组和康复组与对照组相比得分明显较高(P<0.01);康复介入后,假手术组与对照组的得分仍无差异(P=1),模型组和康复组的得分较对照组高(P<0.01),康复组与模型组比较,得分明显减少(P<0.01)。

2.2 康复介入前后各组大鼠步伐失误实验测试结果

见表3。步伐失误实验结果显示,康复介入前,假手术组与对照组相比,前肢步伐总数、步伐失误数和失误率差异不具有显著性意义(P>0.05),模型组和康复组与对照组相比,步伐总数减少,步伐失误数及失误率增加(P<0.01);康复介入后,假手术组与对照组比较,前肢步伐总数、步伐失误数和失误率差异不具有显著性意义(P>0.05),模型组与对照组比较,步伐总数减少,步伐失误数增加和失误率增加(P<0.01),康复组与对照组相比,步伐总数差异不具有显著性意义(P>0.05),步伐失误数和失误率增加(P<0.01),康复组与模型组比较,步伐总数增加,步伐失误数和失误率减少(P<0.01)。

2.3 康复介入2周后各组大鼠记忆能力测试结果

见表4。Morris水迷宫实验结果显示,康复介入两周后,假手术组与对照组相比,逃避潜伏期和2min内跨越原平台的次数差异不具有显著性意义(P>0.05);模型组大鼠与对照组比较,逃避潜伏期显著增加,2min内跨越原平台的次数减少,差异有显著性意义(P<0.01);康复组与对照组比较,逃避潜伏期增加,2min内跨越原平台次数减少,差异有显著性意义(P<0.01);康复组与模型组比较,逃避潜伏期

表2 大鼠平衡木实验测试结果 (x±s)

组别	只数	康复介入前得分	康复介入后得分
对照组	10	0	0
假手术组	10	0	0
模型组	10	3.5±0.7 ^①	3.4±0.5 ^①
康复组	10	3.4±0.5 ^①	1.6±0.5 ^{①②}

①与对照组比较P<0.01;②与模型组比较P<0.01

减少,2min内跨越原平台的次数增加,差异有显著性意义($P<0.05$)。

2.4 康复介入2周后各组大鼠血浆、脑组织和脊髓中的CGRP含量测定结果

由表5中数据可看出,假手术组与对照组相比,

血浆、脑组织和脊髓中的CGRP含量差异不具有显著性意义($P>0.05$);模型组和康复组与对照组比较,血浆、脑组织和脊髓中的CGRP含量降低($P<0.01$);康复组与模型组比较,血浆、脑组织和脊髓中的CGRP含量增加($P<0.05$)。

表3 大鼠步伐失误实验测试结果

组别	只数	康复介入前			康复介入后		
		步伐总数	失误数	失误率(%)	步伐总数	失误数	失误率(%)
对照组	10	55.7±7.5	2.5±0.9	4.56±1.64	77.5±9.2	3.8±0.9	4.96±1.32
假手术组	10	56.0±9.4	2.7±0.9	4.87±1.43	74.4±10.0	4.0±0.8	5.49±1.39
模型组	10	46.4±7.3 ^①	13.7±3.7 ^①	30.04±8.10 ^①	56.8±8.6 ^①	16.1±4.9 ^①	28.62±9.17 ^①
康复组	10	45.8±6.4 ^①	14.4±4.7 ^①	32.24±11.78 ^①	69.6±10.7	8.8±2.7 ^②	13.03±4.70 ^②

①与对照组比较 $P<0.01$;②与模型组比较 $P<0.01$

表4 大鼠Morris水迷宫实验测试结果

组别	只数	逃避潜伏期(s)	2min内跨越原平台的次数
对照组	10	25.9±8.7	15.6±4.8
假手术组	10	28.1±7.6	13.8±4.5
模型组	10	54.5±7.1 ^①	5.80±1.6 ^①
康复组	10	44.0±11.4 ^②	9.70±3.0 ^②

①与对照组比较 $P<0.01$;②与模型组比较 $P<0.05$

表5 大鼠CGRP含量测定结果

组别	只数	血浆	脑组织	脊髓
对照组	10	76.58±9.62	680.53±86.11	842.80±72.86
假手术组	10	72.59±8.49	652.89±74.90	829.19±47.38
模型组	10	43.73±5.87 ^①	490.58±64.41 ^①	525.38±31.06 ^①
康复组	10	57.64±15.47 ^②	577.15±80.80 ^②	645.54±47.24 ^②

①与对照组比较 $P<0.01$;②与模型组比较 $P<0.05$

3 讨论

单侧颈总动脉结扎结合缺氧是制作幼鼠缺血缺氧性脑损伤模型的主要方法,缺血缺氧的严重度是决定脑损伤程度的关键因素^[10],可通过观察并测定其行为学的变化来判定是否发生脑损伤,还可通过神经电生理及脑组织病理变化进一步确认是否为脑性瘫痪。本次实验通过对模型大鼠与正常大鼠进行平衡木实验及步伐失误实验,模型大鼠较正常大鼠平衡木得分增加,步伐失误率降低,结果显示模型大鼠的行为学发生变化,从而判定脑损伤的发生。

本次实验选择触摸、丰富环境刺激以及平衡木训练作为康复治疗方法。根据文献报道,早期康复治疗有助于脑损伤的修复,触摸和丰富环境刺激可改善脑损伤大鼠的平衡协调能力,并能增加海马神经元兴奋性突触后电位,促进脑细胞增殖、神经网络重建以及神经丝蛋白的表达,从而促进学习记忆能力的恢复^[11-13],可减少脑组织的后继持续行为损伤,修复脑水肿^[14-15],平衡木训练可提高脑损伤大鼠的四肢肌力及平衡能力。行为学评定方法选择平衡木实验、步伐失误实验和Morris水迷宫实验。平衡木实验是对大鼠通过平衡木时的不同表现进行评分,用于检测大鼠的运动平衡能力;步伐失误实验是观

察并记录大鼠在网格中踩空的步伐数,计算步伐失误率,用于检测大鼠对运动的整合协调能力;Morris水迷宫实验是一种强迫实验动物游泳,学习寻找隐藏在水中平台的实验,主要用于测试实验动物对空间定位的学习记忆能力。通过以上三个实验评价早期康复介入对脑损伤大鼠行为学的改善情况。

CGRP是一种广泛分布于中枢和外周神经系统的血管扩张剂,有扩张脑血管、增加脑血流量及降低脑组织缺血损伤面积的作用,能感受伤害性信息、介导神经-免疫系统相互调节,对缺血缺氧神经细胞亦有保护和促进恢复的作用^[16]。本次实验通过对幼鼠血浆、脑组织和脊髓中的CGRP水平的检测,评价康复介入对脑损伤幼鼠体内CGRP水平的影响。

本次研究结果显示,对脑损伤幼鼠进行维持两周的触摸、丰富环境刺激以及平衡康复训练,康复治疗组的平衡木实验评分由平均3.4分降至平均1.6分,得分仅为模型组(3.4分)的一半,步伐失误率由平均32%减少至平均13%,失误率不到模型组(28.6%)的一半,Morris水迷宫中的逃避潜伏期与模型组相比,平均减少9.5s,2min内跨越原平台的次数平均增加4次,体内CGRP的含量较模型组提高了20%。早期康复介入能有效改善大鼠通过平衡木的

表现,降低在网格上行走的步伐失误率,减少在Morris水迷宫中的逃避潜伏期以及增加2min内跨越平台的次数,同时增加CGRP在幼鼠血浆、脊髓和脑组织中的表达。测试结果虽未完全达到正常组的水平,但与模型组相比,各项指标均有明显改善,说明早期康复介入能有效提升幼鼠的平衡能力、协调能力和学习记忆能力,同时,血浆、脑组织和脊髓中的CGRP含量明显升高,提示早期康复介入能够有效保护脑损伤幼鼠的缺血缺氧神经细胞,修复脑组织缺血损伤。

综上所述,早期康复介入作为一种安全、有效、经济的治疗手段,能有效控制缺血缺氧性脑损伤的病情发展,恢复部分功能,为今后的进一步治疗奠定良好基础。

参考文献

[1] 冯冠军,刘伟,吴红星,等.神经营养因子-3联合神经干细胞移植对乳鼠缺血缺氧性脑损伤神经修复作用[J].中华实用诊断与治疗杂志,2014,28(5): 444—446.

[2] 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.

[3] 杨丙龙,王继奕.神经节苷脂在新生儿缺血缺氧性脑病治疗中的应用效果分析[J].中国卫生标准管理,2015, 6(32): 116—117.

[4] 朱小燕,金爱平,陈雨.高压氧治疗缺血缺氧性脑病的价值[J].现代中西医结合杂志,2011,20(32): 4097—4098.

[5] 李艳霞,贺新萍,徐晓伟,等.高压氧辅助纳洛酮联合丹参注射液对缺血缺氧性脑病新生儿神经功能恢复的影响[J].临床合理用药,2015,8(7A): 112—113.

[6] 陈刚,李江,刘伟,等.构建新生乳鼠脑性瘫痪模型及其稳定性

[J].中国组织工程研究与临床康复,2008,12(37): 7326—7329.

[7] Rajesh K,Xiaojie L,Xiangying K. The Effect of early intervention and rehabilitation in the expression of aquaporin-4; and ultrastructure changes on rat's offspring's damaged brain caused by intrauterine infection[J].J Korean Neurosurg Soc, 2015, 58(1): 14—21.

[8] 王拥军.现代神经病学进展[M].北京:科学技术文献出版社, 2005.35—45.

[9] 胡兰.3日龄未成熟大鼠缺血缺氧脑损伤后近远期运动和认知发育评价[D].上海:复旦大学儿科医院,2007.

[10] 辛颖,孟淑珍.不同程度缺氧缺血对新生大鼠脑损伤的影响及机制探讨[J].中国当代儿科杂志,2010,12(6):468—473.

[11] Malik R, Chattarji S. Enhanced intrinsic excitability and EPSP- spike coupling accompany enriched environment-induced facilitation of LTP in hippocampal CA1 pyramidal neurons [J].J Neurophysiol, 2012, 107(5): 1366—1378.

[12] 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.

[13] 于若谷,赵聪敏,王丽雁,等.丰富环境刺激对缺氧缺血性脑损伤大鼠超微结构改变及神经丝蛋白表达的影响[J].中国组织工程研究与临床康复,2007,11(13): 2503—2506.

[14] 刘传军,郭延奎,李亚鲁.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—1705.

[15] 段娟,王雪琴,张建立,等.丰富环境对社会行为的影响及其生物学研究进展[J].现代生物医学进展, 2013, 13(1): 170—172, 156

[16] 李颜合.降钙素基因相关肽生物学效应及其运动对其的影响[J].科技资讯,2015,(18):5.