

· 论 著 ·

## 丰富环境干预对缺氧缺血性脑损伤新生大鼠海马神经元影响的研究

于若谷, 李刚, 钟晓云, 刘晓蓉

(重庆市妇幼保健院 400013)

**摘要:**目的 通过检测早期环境干预后缺氧缺血性脑损伤(HIBD)大鼠脑海马区存活神经元数目的改变,探讨早期环境干预对于促进缺血缺氧的脑组织恢复及神经网络重建的可能机制。方法 7日龄 Sprague-Dawley(SD)新生大鼠,采用 Rice 法建立 HIBD 模型,随机分为 3 组:干预组、非干预组及正常组,于建模后 24h 进行早期抚触和丰富环境干预,干预 28d 后,应用 Morris 水迷宫测试大鼠学习记忆能力,测量体质量,HE 染色观察海马病理形态学改变,尼氏染色计数海马区存活神经元数目。结果 HE 染色见干预组患侧海马轻度异常;非干预组左侧海马明显异常;正常组左侧海马无异常。神经元尼氏染色计数显示,干预组患侧海马神经元存活数目明显多于非干预组( $P < 0.001$ ),与正常组比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。结论 (1)丰富环境可减少海马区神经细胞的丢失,因此对 HIBD 新生鼠的神经元具有保护作用;(2)早期环境干预能显著改善 HIBD 大鼠的远期学习记忆功能,提示早期环境干预对保护远期学习记忆功能有重要意义。

**关键词:**丰富环境,缺氧缺血,神经元

中图分类号:R365.741

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2009)22-2804-02

### Study of effect of enriched environmental interference on neurons in hippocampus of HIBD neonatal rats

YU Ruo-gu, LI Gang, ZHONG Xiao-yun, et al.

(Chongqing Maternal and Child Health Institute, Chongqing 400013, China)

**Abstract: Objective** To explore the possible mechanism of the recovery of hypoxic-ischemic brain damage(HIBD) and the reconstruction of the brain nervous net with early environmental interference. **Methods** The Sprague-Dawley (SD) rat's models of HIBD were established by the method of Rice. Then the rats were divided into 3 groups at random: normal control group, hypoxic-ischemic(HI) group and enriched environment(EE) group. The early touch and enriched environment interference were administered to the rats since 2d after HIBD. On 28d, Morris water maze was used to evaluate the learning and memory ability, also the weight of rats were measured. The HE stain and the Nissl stain were respectively employed to observe the morphopathologic changes and the number of live neurons in the left-sided hippocampus of the rats. **Results** The water maze scores of EE group in place navigation test and spatial probe test were much higher than that of HI group ( $P < 0.001$ ), there was no significant difference compared EE group with the normal control group ( $P > 0.05$ ). The weight of EE group was much higher than that of HI group ( $P < 0.01$ ), there was no significant difference compared EE group with normal control group ( $P > 0.05$ ). HE stain displayed that the left-sided hippocampus of EE group was minimal abnormal with the slightly disorganized neurons and some cells lost; while the morphology of HI group was obviously abnormal with reduced cell layers; the morphology of normal control group was normal. The Nissl stain showed that the number of live neurons in the left-sided hippocampus of EE group was much more than that of HI group ( $P < 0.01$ ). There was no significant difference compared EE group with normal control group ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** (1) The decreased neuron damage in the injured side brain tissue of HIBD neonatal rats implies that the enriched environment could protect both the neuron and the axon. (2)The neonatal rats with HIBD have disturbance with the ability of long-term learning and memory, while the enriched environmental interference can markedly improve this ability, which indicates that early environmental interference has great benefit to the protection of long-term learning and memory.

**Key words:** enriched environment; hypoxic-ischemic; neuron

新生儿缺氧缺血性脑损伤(hypoxic-ischemic brain damage, HIBD)是严重威胁新生儿健康甚至致残的常见疾病。HIBD 的发病机制十分复杂<sup>[1-2]</sup>,环境刺激对脑损伤的修护作用机制没有完全阐明,但环境刺激、训练及康复治疗作为临床治疗脑损伤的一种手段,已经越来越受到人们的重视。因此,作者观察 HIBD 大鼠经过早期丰富环境干预后脑海马区存活神经元形态及数量、行为学测定,进一步探讨环境因素对发育期脑损伤的作用及可能机制,有助于临床应用环境刺激对新生儿 HIBD 进行早期干预,提高存活患儿的生存质量。

### 1 材料与方法

**1.1 实验动物及分组** 选择 7 日龄健康 SD 大鼠(清洁级)共 60 只,随机分为正常组 20 只,非干预组及干预组,每组 20 只。

### 1.2 实验过程与方法

**1.2.1 HIBD 模型** 参照 Rice 法建立。

**1.2.2 分组** 丰富环境参照 Fernandez 等的方法设计。干预组:缺血缺氧后 24h 予毛刷从头到尾刷毛,每次 15min,每日 2 次,至幼鼠睁眼后放置于丰富环境中,每次 2h,每日 1 次。干预过程中放莫扎特钢琴曲。干预时间共 28d。非干预组:缺血缺氧后饲养于 28cm×18cm×15cm 的标准笼内,不予早期抚触及丰富环境刺激。正常组:不做缺血缺氧处理,饲养于 28cm×18cm×15cm 的标准笼内,不予早期抚触及丰富环境刺激。各组均提供 12h 光和 12h 暗昼夜光变化,自由进食进水,定期换笼。

### 1.2.3 观测指标

**1.2.3.1 HE 染色** 胞核染成蓝色,呈指环样外观,胞浆染成红色。

**1.2.3.2 尼氏染色及神经元计数** 胞核染蓝色,尼氏小体呈深蓝色,背景为淡蓝色。每例动物取切片 3 张,每张切片断面相似,每例随机选取左侧海马 CA1、CA2、CA3、齿状回(DG)区各 3 个高倍视野(400 倍),每组共测 60 个高倍视野,计数每个视野下存活神经元数目,取其平均值。

**1.2.3.3 远期学习记忆功能检测** 各组新生鼠饲养至 35 日龄时用 Morris 水迷宫测试学习记忆功能。

**1.3 统计学方法** 所有数据经检验方差具有齐性,以  $\bar{x} \pm s$  表示,两组间比较采用独立样本 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析。所有数据以 SPSS11.0 统计软件分析处理。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结 果**

**2.1 HIBD 新生鼠一般情况和病理学改变** 大体上,缺氧缺血(hypoxic ischemic, HI)28d 后左脑萎缩,可见不同程度的组织病理改变,如出现萎缩、空洞。石蜡切片 HE 染色见正常组脑组织结构清晰,布局有序,细胞形态正常,海马区神经元排列规则,无细胞丢失。低倍镜(100 倍)下可见非干预组患侧脑组织病变,包括萎缩、梗死灶等,累及皮质、纹状体、海马,脑室扩张,部分有空洞形成。高倍镜(400 倍)下非干预组患侧脑组织可见大片坏死细胞,胞浆红染,核结构不清,甚至胞膜破裂,细胞解体消失;凋亡细胞呈弥散或小灶性分布,表现为细胞体积缩小,核固缩,核碎裂;海马锥体细胞间隙明显增大,细胞严重皱缩深染,核缩小,核仁不清楚,甚至细胞脱落。

3 组大鼠体质量增长也有明显变化,非干预组体质量增长缓慢,反应迟钝,较正常组及干预组有明显差异( $P < 0.05$ );而非干预组活泼好动,灵活敏捷,体质量增长较正常组无明显差异( $P > 0.05$ ),见表 1。

**表 1 早期干预 28d 后 3 组大鼠体质量比较**

组别	n	体质量(g)
正常组	20	114.75 ± 4.63
非干预组	20	94.90 ± 10.09 <sup>a</sup>
干预组	20	111.45 ± 7.04 <sup>bc</sup>

<sup>a</sup>:与正常组比较,  $P < 0.01$ ; <sup>b</sup>:与正常组比较,  $P > 0.05$ ; <sup>c</sup>:与非干预组比较,  $P < 0.05$ 。

**2.2 丰富环境干预后 HIBD 新生鼠海马神经元计数的变化** 正常组海马有 4~5 层锥体细胞,排列整齐紧密;神经元胞核染成蓝色,尼氏小体密集,染成深蓝色。非干预组神经元明显减少,失去正常结构,细胞排列散乱,神经元胞体缩小或脱落,胞核固缩或溶解,尼氏小体明显减少或缺失。干预组神经元细胞排列尚整齐,细胞层数多,尼氏小体密集,蓝色深染。HI 后 28d,非干预组左侧海马存活神经元数目明显少于正常组,干预组神经元数较非干预组明显增多( $P < 0.01$ ),较正常组减少但无统计学差异( $P > 0.05$ ),见表 2。

**表 2 早期干预 28d 后患侧海马神经元计数**

组别	n	存活神经元数(个/mm)
正常组	6	123.33 ± 7.23
非干预组	6	44.83 ± 15.78 <sup>a</sup>
干预组	6	108.17 ± 8.57 <sup>bc</sup>

<sup>a</sup>:与正常组比较,  $P < 0.001$ ; <sup>b</sup>:与正常组比较,  $P > 0.05$ ; <sup>c</sup>:与非干预组比较,  $P < 0.01$ 。

**2.3 丰富环境对 HIBD 新生鼠远期学习记忆功能的影响** 以 Morris 水迷宫检测大鼠空间学习记忆功能。在定位航行实验

中,各组大鼠隐匿平台逃避潜伏期(escape latency, EL)均随游泳次数增多而缩短。非干预组 EL 较正常组明显延长( $P < 0.001$ ),干预组 EL 值较非干预组缩短( $P < 0.001$ ),较正常组有延长,但差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。在空间探索实验中,正常组大鼠运动轨迹主要集中在原平台位置,而非干预组则多沿池壁游动,撤去平台后 120s 内,非干预组跨越平台次数明显低于正常组( $P < 0.001$ ),干预组大鼠运动轨迹也较集中在原平台象限,与正常组差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),见表 3。

**表 3 早期干预 28d 后 Morris 水迷宫实验结果**

组别	n	隐匿平台逃避潜伏期(s)	空间探索(次)
正常组	10	17.40 ± 9.18	5.80 ± 1.93
非干预组	10	38.20 ± 12.36 <sup>a</sup>	2.60 ± 1.90 <sup>a</sup>
干预组	10	19.00 ± 11.48 <sup>b</sup>	4.60 ± 2.12 <sup>bc</sup>

<sup>a</sup>:与正常组比较,  $P < 0.001$ ; <sup>b</sup>:与正常组比较,  $P > 0.05$ ; <sup>c</sup>:与非干预组比较,  $P < 0.001$ 。

**3 讨 论**

研究发现,体质量下降是 HIBD 模型制作成功的重要特点<sup>[3-4]</sup>。本实验干预组大鼠体质量均显著高于非干预组,提示丰富环境能促进 HIBD 新生鼠体格的发育,其原因可能是因为丰富环境的生活空间和运动场所较大,大鼠在其中得到运动锻炼及相互交流的机会较多,从而促进了骨骼、肌肉及正性情绪的发育,使体质量增长明显<sup>[5]</sup>。

由于海马区神经元对缺血性损伤的高度敏感,短暂脑缺血即可导致该区神经元的迟发性死亡,所以海马区已成为缺血性脑损伤研究的一个典型脑区。本实验发现,非干预组大鼠海马区神经元数目与正常组相比减少了 50% 以上,与以往的许多研究相吻合<sup>[6-7]</sup>。

Belayev 等<sup>[8]</sup>发现丰富环境对海马锥体细胞具有保护作用。尼氏体是神经元内合成蛋白质的主要部位,可以作为神经元机能状态的标志<sup>[9]</sup>。本实验结果显示,非干预组患侧海马神经元大量变性坏死,尼氏体大量脱落,而非干预组海马神经元变性坏死轻微,尼氏体分布仍较密集,神经元尼氏染色计数干预组也明显高于非干预组,提示丰富环境能恢复神经元内尼氏体结构,改善其合成蛋白的功能,从而保护神经元的完整性。

Michael 等<sup>[10]</sup>报道,非侵入性的环境刺激对减轻创伤性脑损伤(trumatic brain injury, TBI)模型的认知缺陷和维持组织完整是有效的,本实验干预组海马病理损害较非干预组明显减轻,证实丰富环境对 HIBD 新生鼠海马结构具有保护和修复作用。

本实验中 HIBD 新生鼠经丰富环境干预后,学习记忆能力得到显著改善,几乎恢复到正常水平,有效地降低了脑功能障碍的发生率。推测原因如下:神经元数目充足与神经网络结构完整是保证学习记忆活动得以正常形成的前提,干预组和非干预组大鼠在海马病理形态学以及存活神经元数目表达的差异正是其导致其学习记忆能力差异的重要原因<sup>[11]</sup>。尽管干预组大鼠脑病理损害未能完全恢复,但学习记忆能力却与正常组差异不明显,显示了脑的病理损害与功能恢复具有不一致性,也是神经网络可塑性在功能层面的具体体现。

丰富环境可能通过提高海马区神经元存活数,减轻轴突损伤,增强突触的可塑性,恢复神经网络的完整,从而明显改善 HIBD 大鼠空间学习记忆功能。

综上所述,环境因素影响 HIBD 的神经机制非常复杂,涉及视、听、触、嗅等多感觉通路、社会心理(下转第 2808 页)

的划分不够细致有关。因为婴儿的睡眠节律发展迅速,希望今后的研究进一步将该年龄段划分细致(争取按每个月一个年龄段),增加各年龄段样本含量进行统计,从而更能客观地反映问题。

睡眠在 1~2.5 岁幼儿的生活中同样扮演着重要的角色。本研究结果表明,长时间的睡眠紊乱会导致身体发生生理或病理变化,从而影响幼儿的生长发育,从表 1 可见,“1 岁~”和“2 岁~”年龄段,有睡眠问题的较无睡眠问题的幼儿当前体质量、身高、胸围低,但两组头围在 2 岁以上差异无统计学意义,可能因为发育过程头围在 2 岁后增长相对缓慢造成,故睡眠对头围的影响在 2 岁前意义大。随着时间的增长,“1 岁~”和“2 岁~”年龄段,BISQ 量表睡眠参数各指标能敏感地反映出幼儿的睡眠问题。无睡眠问题的幼儿可在睡眠时间来临后 30min 内入睡(入睡潜伏期小于 30min),有睡眠问题的入睡潜伏期明显延长。入睡起始时间对睡眠质量有很大影响,往往容易受家长干预。研究表明,大约在 23:00~24:00 进入深睡眠后生长激素分泌最旺盛<sup>[4]</sup>,要想幼儿体格发育好必须抓住这段睡眠黄金时间,所以孩子晚上玩耍或看电视等,家长最好让孩子在 22:00 前就应该进入睡眠。随着幼儿大脑皮层和脑桥网状结构的逐渐成熟,夜间觉醒次数逐渐减少。“1 岁~”正常幼儿夜间醒来 1 次左右,“2 岁~”后基本不醒。表 1 中“1 岁~”夜间觉醒次数、“2 岁~”夜间觉醒次数和时间组间比较,说明有睡眠问题的幼儿其夜间觉醒后哭闹吵人的次数及夜间觉醒时间较无睡眠问题幼儿明显增多。随着神经系统的逐渐成熟,睡眠昼夜节律的成功建立,幼儿夜间睡眠持续时间和夜间睡眠总量延长、白天睡眠总量缩短、睡眠总量缩短。“1 岁~”无睡眠问题的幼儿夜间睡眠持续时间为(8.53±2.87)h,夜间睡眠总量

为(9.69±0.85)h;“2 岁~”无睡眠问题的幼儿夜间睡眠持续时间延长至(9.30±2.93)h,夜间睡眠总量延长至(10.04±0.88)h。与夜间睡眠延长相反,白天睡眠时间及睡眠总量随着年龄增长而缩短,“1 岁~”年龄段无睡眠问题的幼儿白天睡眠总量为(1.80±0.50)h,“2 岁~”缩短至(1.41±0.46)h。有睡眠问题组与无问题组比较,部分上述睡眠指标有差异,部分无差异,可能与样本量有关,希望进一步扩大样本量以便客观地反映幼儿的睡眠问题。

总之,睡眠对婴幼儿的体格发育具有重要意义,儿保医生或父母应认真观察孩子体质量、身高等增长,并做好记录,如发现体质量不增甚至下降或身高增长缓慢,应及时寻找原因,制定个体化干预措施。

#### 参考文献:

- [1] Sadeh A. A brief screening questionnaire for infant sleep problems: validation and findings for an internet sample [J]. *Pediatrics*, 2004, 113: 6.
- [2] 江帆, 颜崇准, 吴胜虎, 等. 1~23 个月儿童睡眠问题的流行病学研究[J]. *中华预防医学杂志*, 2003, 37(6): 435.
- [3] France KG, Blampied NM. Infant sleep disturbance: description of a problem behaviour process [J]. *Sleep Med Rev*, 1999, 3: 265.
- [4] Chigo E, Boghen M, Casanueva F, et al. Growth hormone secretagogues [M]. Amsterdam, Elsevier, 1999: 325.

(收稿日期: 2009-06-05)

(上接第 2805 页)

激、离子通道、信号传导、神经递质传递及其相关基因的活化与表达等等。此外,由于缺氧缺血性脑病的发病机制尚未完全阐明,丰富环境因素的具体作用机制还有待于更深入的探讨,以便为 HIBD 的临床工作提供更多理论依据。

#### 参考文献:

- [1] Will B, Galani R, Kelche C, et al. Recovery from brain injury in animals: relative efficacy of environmental enrichment, physical exercise or formal training (1990-2002) [J]. *Prog Neurobiol*, 2004, 72: 167.
- [2] Li Y, Jiang N, Powers C, et al. Neuronal damage and plasticity identified by microtubule-associated protein 2, growth-associated protein 43, and cyclin D1 immunoreactivity after focal cerebral ischemia in rats [J]. *Stroke*, 1998, 29: 1972.
- [3] Li H, Dokas LA, Godfrey DA, et al. Remodeling of synaptic connections in the deafferented vestibular nuclear complex [J]. *J Vestib Res*, 2008, 12(4): 167.
- [4] Andine 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.
- [5] 刘晓蓉, 赵聪敏, 张雨平. 水疗对缺氧缺血新生鼠学习记

忆的干预效应 [J]. *重庆医学*, 2006, 35(20): 235.

- [6] Almlil CR, Levy TJ, Han BH, et al. BDNF protects against spatial memory deficits following neonatal hypoxia-ischemia [J]. *Exp Neurol*, 2000, 166: 99.
- [7] 董艳臣, 高革, 李晓娟, 等. 石杉碱甲对新生大鼠缺氧缺血性脑损伤的保护作用 [J]. *实用儿科临床杂志*, 2003, 18(6): 448.
- [8] Belayev A, Saul I, Liu YT, et al. Enriched environment delays the onset of hippocampal damage after global cerebral ischemia in rats [J]. *Brain Res*, 2003, 964(5): 121.
- [9] 韩太真, 吴馥梅. 学习与记忆的神经生物学 [M]. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1998: 107.
- [10] Michael J, Passineau Edward J, Green W, Dalton Dietrich. Therapeutic effects of environmental enrichment on cognitive function and tissue integrity following severe traumatic brain injury in rats [J]. *Exp Neurol*, 2001, 168(7): 373.
- [11] Briones TL, Woods J, Wadowska M, et al. Astrocytic changes in the hippocampus and functional recovery after cerebral ischemia are facilitated by rehabilitation training [J]. *Behav Brain Res*, 2008, 171: 17.

(收稿日期: 2009-06-05)