

·基础研究·

探索学习对局灶性脑梗死大鼠学习记忆和新生血管的影响

马向阳¹ 贾子善² 槐雅萍² 张东²

摘要 目的: 研究探索学习对局灶性脑梗死大鼠学习记忆及新生血管的影响。**方法:** 采用开颅电凝法制作 SD 大鼠右侧大脑中动脉闭塞(MCAO)模型,术后 24h 随机分为标准环境(SE)组、探索学习环境(LE)组;另设假手术对照组(Sham)组,不电凝大脑中动脉,其余步骤与手术组相同。分别于术后第 7 天、28 天进行 Morris 水迷宫测试大鼠学习记忆能力;以免疫组织化学法测定微血管密度。**结果:** 在学习记忆能力上,LE 组成绩明显优于 SE 组($P<0.01$),与 Sham 组相比无显著差异($P>0.05$);微血管密度显示 LE 组在术后第 14 天、28 天新生血管明显多于 SE 组($P<0.05$),与 Sham 组相比无显著差异($P>0.05$)。**结论:** 探索学习可促进局灶性脑梗死大鼠学习记忆能力的恢复与微血管新生,改善大鼠的预后。

关键词 探索学习;学习记忆能力;脑梗死;大鼠

中图分类号: R743 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-1242(2008)-12-1086-03

Influences of learning on learning and memory ability and blood vessel proliferation of rats after unilateral local cerebral infarction/MA Xiangyang, JIA Zishan, HUAI Yaping, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2008, 23(12): 1086—1088

Abstract Objective: To observe the influences of learning on learning and memory ability and blood vessel proliferation of rats with unilateral local cerebral infarction. **Method:** After the right middle cerebral artery occlusion (MCAO) with electric coagulation, the models of SD rats were randomly divided into learning environment stimulation group (LE) and standard environment stimulation group (SE). The sham-operation rats were served as control (sham) group. Different environment stimulation was administrated to the rats since day 1 after MCAO. On the day 7 and 28, Morris water maze was used to evaluate the learning and memory ability; angiogenesis was measured in the boundary zone to brain infarction at the 1std, 3rdd, 7thd, 14thd and 28thd. **Result:** The learning and memory ability in LE group was significantly higher than that in SE group ($P<0.01$) and there was no significant difference compared LE group with Sham group ($P>0.05$); Compared with SE group, in LE group the microvessel density (MVD) significantly increased at the 14thd and 28thd after MCAO ($P<0.05$). There was no significant difference in MVD compared LE group with sham group ($P>0.05$). **Conclusion:** The learning environment can enhance the ability of learning and memory and promote the blood vessel proliferation of rats with unilateral local cerebral infarction. The study suggests learning is good for recovery from brain damage in rats with MCAO.

Author's address Cangzhou Medical College, Cangzhou, 061001, China

Key words learning; learning and memory; cerebral infarction; rat

探索学习是指动物主动去接受新的信息而改变自身行为、适应新环境的过程,不断用新记忆取代旧记忆的过程。学习会增加突触的数量,改变突触的结构^[1],改变啮齿类动物脑内特定区域树突棘的密度^[2]。探索学习环境由社会交往、探索学习和体力活动等成分构成,探索学习对改善脑梗死大鼠功能结局的作用尚不清楚。本实验采用大鼠大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型,观察了探索学习环境、标准环境对脑梗死大鼠学习记忆和新生血管的影响,探讨环境对脑梗死后神经行为与微循环的影响。

1 材料与方法

1.1 试验材料

清洁级雄性 SD 大鼠,3—4 月龄,体重 230—260g,购自河南医科大学实验动物学部。VIII 因子免疫试剂盒购自北京中山公司;双极电凝笔购自上海众和天工医疗器械有限公司。

1.2 制备 MCAO 模型及分组

1 河北省沧州医学高等专科学校,河北沧州,061001

2 河北省人民医院康复中心,河北石家庄

作者简介:马向阳,女,副教授

收稿日期:2008-04-22

参照文献方法^[3],用 10%水合氯醛(0.35ml/100g 体重)腹腔内注射麻醉,以左侧侧卧位固定于手术台,剃去右侧颞顶部鼠毛。常规消毒后,在右眼与右耳之间切开皮肤,分离颞肌,暴露颞骨翼板,术中避免损伤面神经、面部主要动脉、静脉、眼外肌及泪腺和颧弓。在手术显微镜下,用牙钻经颞骨翼板钻至硬脑膜,暴露大脑中动脉后,用小咬骨钳向下咬去部分颅骨,暴露大脑中动脉近端,用电凝器凝闭嗅束近端至大脑下静脉之间的一段大脑中动脉,然后依次缝合颞肌及皮肤。腹腔内注射 0.2 万 IU 青霉素以预防感染。共用大鼠 114 只,有 80 只符合入选条件(苏醒后右眼出现 Horner 征及左侧肢体偏瘫)并存活到规定时间。术后 24h 将大鼠随机分为标准环境(SE)组、探索学习(LE)组各 40 只。随机取 10 只大鼠作为假手术组,假手术(Sham)组不电凝大脑中动脉,其余步骤与手术组相同。

1.3 造模后饲养环境

①Sham 组、SE 组:分别饲养于标准笼(290mm×178mm×160mm),每笼 5 只。②LE 组:饲养于参照文献^[4]设计的迷宫笼,一笼 20 只。迷宫笼由一个圆笼和一个方笼组成。直径 500mm 圆笼同 640mm×480mm×120mm 方笼中间通过两通道相连(圆笼:中间由丝网分隔,一侧为进食区,一侧为饮水区;方笼:由丝网分隔形成通道宽 80mm×80mm 的迷宫。迷宫由易到难,每周变换 1 次)。

1.4 Morris 水迷宫实验^[5]

分别于术后第 7 天、第 28 天进行 Morris 水迷宫测试,Sham 组随机取 5 只,其他组各随机取 15 只。Morris 水迷宫为一直径 150cm、高 50cm 的圆形水池,外接动态轨迹摄像和计算机分析系统。水深 30cm,水温保持在(24±2)℃,水中加全脂淡奶粉 160g 使水浑浊。在水池边缘确定东、南、西、北四个点,在水池中间设立一个直径 9cm、高 29cm 的透明有机玻璃平台,没于水下 1cm。测试时室内安静,物品陈设、照明度一致。

1.5 微血管密度测定

1.5.1 定位航行实验:共 5d。每天上、下午各 1 轮,每轮 4 次,2 次训练间隔 30s,每次分别从 4 个象限 1/2 弧度处头朝壁入水,在 60s 内触到平台的时间为逃避潜伏期。若大鼠在 60s 内未找到平台,则以 60s 计。以最后一天 4 次所用时间的总平均值作为观察指标,逃避潜伏期短说明实验成绩好。

1.5.2 空间探索实验:第 5 天下午撤除平台,大鼠于原平台对侧象限入水,观察其 60s 内穿越原平台所在位置的次数(穿台次数),测 4 次取其平均值,穿台

次数多说明实验成绩好。

1.6 微血管密度测定

1.6.1 标本的制备:除 Sham 组 5 只于造模后 1 周时处死外,各试验组再分别于术后第 1 天、第 3 天、第 7 天、第 14 天、第 28 天随机取 5 只处死。用 10%水合氯醛腹腔内注射麻醉后固定于手术台,剪开胸腔,暴露心脏,用 9 号针头插入左心室,灌注生理盐水,待右心耳膨起,剪开右心耳让血液流出,至右心耳流出液为无色透明时开始用 4%多聚甲醛灌注固定,先快后慢,每只大鼠约需 200ml,总量在 20—30min 内灌完后立即剖颅取脑在视交叉处切开后浸于 4%多聚甲醛中再固定 4h。经常规梯度酒精脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,做 5μm 厚连续切片备染。

1.6.2 微血管密度 (microvessel density, MVD)测定:MVD 计数参照文献方法^[6],凡 VIII 因子免疫组化染色成棕黄色的单个内皮细胞或内皮细胞簇作为一个血管计数,每张切片在同一皮质缺血区周边选择 4 个高倍(×400)视野进行微血管计数,计算出每立方毫米面积内微血管的数量,即微血管密度,然后求其均值,每个时间点每组有 15 张切片结果。

1.7 统计学分析

数据以均数±标准差表示,组间比较用方差分析,组间两两比较用 *q* 检验,应用 SPSS12.0 统计软件,*P*<0.05 为有显著性意义。

2 结果

2.1 环境刺激对局灶性脑梗死大鼠学习记忆能力的影响

游泳轨迹 Sham、LE 组以目标明确的趋向式为主,SE 组以随机式为主。3 组大鼠寻找水下平台潜伏期结果见表 1(方差齐性,*F*=104.529)。各组第 4 天起潜伏期渐趋平稳。比较第 6 天各组潜伏期变化:LE 组与 Sham 组相比无显著性差异(*P*>0.05),与 SE 组相比,潜伏期缩短,有显著性差异(*P*<0.05);穿过目标区域次数差异:LE 组与 Sham 组之间无显著性差异(*P*>0.05),与 SE 组相比,穿台次数多,有显著性差异(*P*<0.05),SE 组与 Sham 组相比,潜伏期缩短,穿台次数多,有显著性差异(*P*>0.05),见表 1。

2.2 微细血管密度比较

VIII 因子免疫组织化学染色结果显示,微血管形态不规则,管腔由染成棕黄色的内皮细胞围成。SE 组、LE 组动物缺血第 14 天和第 28 天时缺血周边区可见较多散在的单个内皮细胞,而 Sham 组动物相应部位仅见少见散在的单个内皮细胞。微血管计数:

缺血第 14 天和第 28 天时缺血周边区 SE、LE 组明显多于 Sham 组,差异有显著性意义($P<0.05$);而 LE 组第 28 天时缺血周边区微血管计数明显多于相应时间的 SE 组,差异有显著性意义($P<0.05$),见表 2。

表 1 环境刺激对局灶性脑梗死大鼠学习记忆的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	第 7 天测试		第 28 天测试	
	逃避潜伏期(s)	穿台次数	逃避潜伏期(s)	穿台次数
Sham 组	16.45±6.27	6.4±1.56	15.42±5.26	6.5±1.54
SE 组	32.16±8.06 ^①	4.1±1.29 ^①	31.15±8.01 ^①	4.2±1.34 ^①
LE 组	19.53±5.02 ^②	6.4±1.05 ^②	18.46±4.65 ^②	6.1±1.05 ^②

同 Sham 组比较:① $P<0.05$ 、② $P>0.05$;同 SE 组比较:② $P<0.05$;

表 2 各组动物缺血周边区微血管密度($\bar{x}\pm s$,血管数/mm²)

组别	缺血第 1 天		缺血第 3 天		缺血第 7 天		缺血第 14 天		缺血第 28 天	
	Sham 组	54.6±22.4								
SE 组	60.5±18.5	61.0±24.5	67.7±22.3	73.5±23.2 ^①	79.0±23.7 ^①					
LE 组	59.2±20.7	62.6±27.4	75.2±24.1	92.8±24.3 ^②	99.6±26.4 ^②					

同 Sham 组比较:① $P<0.05$ 、② $P<0.05$;同 SE 组比较:② $P<0.05$

3 讨论

有较多的证据表明,手术后环境能够影响实验性脑损伤的功能后果,包括创伤性脑损伤、海马切除和皮质剥离术后等。本实验 LE 组大鼠水迷宫实验成绩优于 SE 组,甚至与 Sham 组差异不明显,结合各组大鼠游泳轨迹的不同,均表明 LE 干预后大鼠学习记忆能力得到显著改善,几乎恢复到正常水平,与对成年脑损伤和脑退行性疾病动物模型的结果相似^[7-8]。环境对学习记忆影响的机制之一可能是与作为脑高级活动的学习记忆功能有关,其实质就是复杂的信息获取、传递与整合的过程。信息来自环境,不同环境发出信息的质和量也不同,来自 SE 的信息刺激非常有限,而来自 LE 的丰富刺激则使信息在整个神经环路来回传递与强化^[9-10],由此形成了复杂的学习与记忆过程。推测探索学习可使动物不断地主动学习、接受新的信息而改变自身行为、适应新的环境、不断用新的记忆取代旧的记忆,从而提高动物的行为能力。探索学习环境促进脑梗死大鼠记忆能力恢复可能与引起了明显的脑可塑性变化有关。说明脑功能可通过一定的神经代偿机制恢复到正常,与临床上部分缺氧缺血性脑损伤存活患儿脑 CT 改变异常而脑功能活动正常相吻合,也表明恢复脑功能是改善环境和应用探索学习环境刺激的主要目的^[11-12]。

对大鼠局灶性脑梗死后微血管密度的分析结果显示,标准环境组、探索学习组与假手术组相比,术后第 14 天和第 28 天时梗死灶周围微血管计数明显多于假手术组,而探索学习组术后第 14 天和第 28 天时梗死灶周围微血管计数又明显多于相应时间的标准环境组,说明在大脑中动脉梗死后梗死灶周围

微血管有代偿性增生,而探索学习环境对这种增生有促进作用。微血管新生的范围与程度直接关系到梗死灶周围血流的改善,影响神经元生理功能的恢复,从而决定了患者的预后,尤其是在梗死灶周围新生血管的数量与脑卒中患者的存活率直接相关^[13-14]。

大脑中动脉梗死后梗死灶周围微血管的增生对改善梗死周边区微循环、促进学习记忆能力的恢复具有重要意义,而探索学习环境对这一过程有明显的促进作用,这可能是探索学习环境促进脑缺血后功能恢复的一个重要机制。

参考文献

- [1] 李晓恒,刘能保,张敏海,等.慢性复合应激性学习记忆增强大鼠海马神经细胞增殖和突触后酪氨酸激酶表达的变化[J].解剖学报,2005,36(6):591—596.
- [2] O'Malley A, O'Connell C, Murphy KJ, et al. Transient spine density increases in the mid-molecular layer of hippocampal dentate gyrus accompany consolidation of a spatial learning task in the rodent[J]. Neuroscience, 2000, 99(2): 229.
- [3] 贾子善,李阔,槐雅萍,等.不同环境干预对局灶性脑梗死大鼠行为学恢复的影响[J].中国康复医学杂志,2007,22(7):578—580.
- [4] 高俊淑,李阔,李娜,等.探索学习对局灶性脑梗死大鼠梗死灶周围皮质 BDNF 表达的影响[J].中国康复医学杂志,2007,(7):584—586.
- [5] Zhan H, Tada T, Nakazato F, et al. Spatial learning transiently disturbed by intraventricular administration of ouabain[J]. Neurol Res, 2004, 26(1):35—40.
- [6] 金玉玲,吴盛华,朱晓峰.电刺激小脑顶核联合神经干细胞移植治疗大鼠局灶性脑缺血[J].中国组织工程研究与临床康复,2007,11(20):3956—3959.
- [7] 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(5): 167—182.
- [8] Da'mico ASL, Paglia N. Enriched environment, nitric oxide production and synaptic plasticity prevent the aging-dependent impairment of spatial cognition [J].Mol Aspects Med, 2004, 25 (1-2): 91—101.
- [9] Gobbo OL, Mara SM. Impact of enriched-environment housing on brain-derived neurotrophic factor and on cognitive performance after a transient global ischemia [J]. Behav Brain Res, 2004,152(2): 231—241.
- [10] Dahlqvist P, Ronnback A, Bergstrom SA, et al. Environmental enrichment reverses learning impairment in the Morris water maze after focal cerebral ischemia in rats [J]. Eur Neurosci, 2004, 19(8):2288—2298.
- [11] 张立新.高原地区新生儿缺血缺氧性脑病早期干预治疗与预后分析[J].临床儿科杂志,2005,23(4):233—235.
- [12] 李乔红,邹永蓉,龚放,等.新生儿缺血缺氧性脑病早期干预治疗与预后分析[J].检验医学与临床,2007,4(9):816—817.
- [13] Hai J, Li ST, Lin Q, et al. Vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis induced by chronic cerebral hypoperfusion in rat brain[J].Neurosurgery, 2003, 53(4):963—972.
- [14] Bellomo M, Adamo EB, Deodato B, et al. Enhancement of expression of vascular endothelial growth factor after adeno-associated virus gene transfer is associated with improvement of brain ischemia injury in the gerbil [J]. Pharmacol Res, 2003,48(3):309—317.