

麻黄碱对脑缺氧缺血后新生大鼠神经可塑性变化的影响*

李石志¹ 肖农^{1,3} 张晓萍² 周江堡¹

摘要 目的:研究麻黄碱对新生大鼠缺氧缺血性脑损伤(HIBD)后神经可塑性的影响。方法:体质量为12g—16g,7日龄SD大鼠(雌雄不拘)36只,随机分为麻黄碱治疗组、自然康复组和假手术组,采用经典Rice法制成HIBD模型。术后用免疫组织化学方法检测海马CA₃区生长相关蛋白-43(GAP-43)、突触素(SYP)表达的变化,进行Morris水迷宫实验评价神经行为学改变。结果:①术后1周时海马CA₃区各治疗组GAP-43和SYP表达水平高于自然康复组($P<0.05$),术后4周时SYP表达水平高于自然康复组($P<0.05$);②术后4周Morris水迷宫治疗组逃避潜伏期缩短明显快于自然康复组($P<0.05$),原平台穿过次数治疗组明显多于自然康复组($P<0.01$)。结论:麻黄碱能减轻新生大鼠缺氧缺血引起的脑组织损伤,提高新生HIBD大鼠年长后的学习记忆能力。这种保护作用和麻黄碱减少HIBD后神经元的丢失、促进参与神经元重塑的蛋白分子GAP-43和SYP的表达有关。

关键词 麻黄碱;缺氧缺血性脑损伤;神经可塑性

中图分类号:R743.3.R49 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2007)-08-0677-03

Effect of ephedrine on neural plasticity of hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats/LI Shizhi,XIAO Nong,ZHANG Xiaoping,et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2007,22(8):677—679

Abstract Objective: To investigate the effects of ephedrine on neuronal plasticity of hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats, and explore the molecular mechanism. **Method:** Thirty-six neonatal Sprague-Dawley rats were divided into three groups randomly: the ephedrine treatment group, natural recovery group and sham-operated group. The HIBD models were induced by using Rice's method. Immunohistochemical method was used to measure the expression of SYP and GAP-43 in the hippocampal CA₃ region. The spatial learning and memory functions of the rats were evaluated by using the Morris water maze at week 4 after operation. **Result:** The expression of SYP and GAP-43 in hippocampal CA₃ region in ephedrine treatment group was significantly higher than that in natural recovery group at week 1 after operation ($P<0.05$). The expression of SYP in treatment group was significantly higher than that in the natural recovery group at week 4 after operation. The deduction of the mean escape latency in ephedrine-treated group were significantly quicker than that of natural recovery group ($P<0.05$). The frequency of pass through the platform in ephedrine-treated group was higher than that in natural recovery group ($P<0.05$). **Conclusion:** Ephedrine can improve the learning and memory function following HIBD in neonatal rats. The mechanisms of improvement with ephedrine treatment is associated with the enhanced expression of molecules involved in neuronal plasticity.

Author's address Dept. of Neurology, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400014

Key words ephedrine; hypoxic-ischemic brain damage; neural plasticity

新生儿缺氧缺血性脑损伤(hypoxic-ischemic brain damage, HIBD)是严重威胁新生儿生命健康甚至致残的常见原因。已有研究表明促肾上腺素类药物麻黄碱可以显著促进脑卒中后运动功能的恢复^[1],但对HIBD的影响未见有报道。我们通过研究麻黄碱对新生大鼠HIBD后神经可塑性的影响,并检测海马生长相关蛋白(growth-associated protein-43,GAP-43)及突触素(synaptophysin,SYP)的表达,探讨其分子机制。

1 材料与方

1.1 HIBD模型制备及动物分组

7日龄Sprague-Dawley大鼠,体质量12—16g,雌雄不限,由重庆医科大学试验动物中心提供。按照经典Rice法^[2],24只HIBD模型采用右颈总动脉永久结扎并吸入低浓度氧(8%O₂,92%N₂)2h制成,

* 基金项目:重庆市卫生局科研资助项目(No.2003-B-38)

1 重庆医科大学附属儿童医院神经内科,400014

2 重庆医科大学儿科研究所

3 通讯作者:肖农(重庆医科大学附属儿童医院神经内科,400014)

作者简介:李石志,男,主治医师,硕士研究生

收稿日期:2006-09-26

随机分为麻黄碱治疗组和自然康复组,另取12只为假手术组。治疗组于缺氧后即刻及以后每24h分别腹腔注射麻黄碱1.5mg/kg,共7次,自然康复组注射等量生理盐水。于术后1周和4周各组分别取6只。

1.2 术后1周所做检查

1.2.1 取材称脑重与固定切片:10%水合氯醛腹腔麻醉,断头取脑,去除嗅脑和部分脑干,并矢状离断为左右半球,分别称半球重量(精确到1mg)。称重后将右半球放入10%甲醛中固定72h以上。在丘脑中部冠状切取2mm脑组织,经脱水、透明、浸蜡、包埋后,连续冠状切片(片厚5 μ m)。

1.2.2 HE染色:切片常规脱蜡至水,苏木素室温下染色10min,1%盐酸酒精分色3s,1%氨水返蓝10s,伊红室温下复染1min,脱水、透明,中性树胶封片。

1.2.3 免疫组化检测 GAP-43 及 SYP:按酶标记链霉亲和素-生物素技术(LSAB)操作。切片脱蜡至水,室温下3%过氧化氢孵育,枸橼酸缓冲液微波抗原修复,滴加正常山羊封闭血清,室内温孵育10min,甩干后滴加兔抗GAP-43抗体或小鼠抗SYP抗体,37 $^{\circ}$ C孵育2h,滴加相应的生物素标记的二抗,漂洗后滴加辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素工作液,孵育30min,PBS漂洗后DAB室温下显色,水洗,脱水,封片,光镜下观察。

1.3 术后4周所做检查

1.3.1 神经行为学检查:各组均于术后4周进行Morris水迷宫实验。①定向航行实验(place navigation test):测试动物学习能力,实验历时5天,每天上下午各4次。即每只大鼠每天从4个不同象

限入水进行训练各1次,取平均值作为其每天的逃避潜伏期。规定每次的实验时间为120s,如果大鼠在规定的120s内找不到平台,则由操作者帮助其上平台,让其在平台上站立10s后,将大鼠从平台上拿下来休息60s后,再按顺序由下一象限入水进行下一次实验。②空间探索实验:测量动物记忆能力。实验第5天下午进行空间探索实验,撤除平台,记录大鼠在2min中内穿过原平台所在位置的次数。

1.3.2 免疫组化检测 GAP-43 及 SYP。

1.4 图像分析和统计学分析

应用积分光密度值反映GAP-43及SYP免疫反应产物的面积及强度。每张切片在海马CA₃区随机选取2个400倍视野拍照,应用GD-8型病理影像分析系统测定每视野各阳性区光密度值及面积,求出平均光密度。每例标本测3张切片,取其均值。所有数据采用SAS9.0进行统计学处理,所得结果以均数 \pm 标准差表示,并通过方差分析进行组间的两两比较。

2 结果

2.1 左右半球脑重量的差别

正常情况下,大鼠左右半球对称,重量无差异。以两半球重量的差值示损伤引起的减轻量,以减轻量与左半球的比值示损伤程度。HIBD后1周时各组右半球重量均小于左半球,以自然康复组为明显($P<0.05$),治疗组右半球减轻量及损伤程度明显小于自然康复组($P<0.05$)。见表1。

2.2 病理形态改变

表1 14日龄左右脑重量的变化

($\bar{x}\pm s$,mg)

组别	例数	左半球	右半球	减轻量	损伤程度
自然康复组	6	440.1 \pm 24.0	415.5 \pm 30.7 ^①	35.5 \pm 8.7	0.071 \pm 0.018
麻黄碱治疗组	6	460.32 \pm 4.0	438.2 \pm 20.4	22.1 \pm 7.4 ^②	0.047 \pm 0.015 ^②

①与对侧相比 $P<0.05$;②与自然康复组相比 $P<0.05$

肉眼观察自然康复组4例右脑萎缩,2例出现软化灶,治疗组1例右脑萎缩,未见有软化灶。显微镜下见假手术组大脑组织结构层次清晰,细胞轮廓正常,核居中,核仁清楚。自然康复组可见右侧半球皮质分层不清晰及神经元损伤,包括神经元核固缩、神经元丢失,神经胶质细胞明显增生,呈网状及条索状;海马区细胞排列紊乱,可见细胞丢失。治疗组可见右侧大脑半球皮质神经元较密集,而胶质细胞增生不明显。见图1—4(见前置彩色插页8)。

2.3 GAP-43 及 SYP 的表达

GAP-43表达在神经毡位置,表现为小点状或细颗粒状沉积环绕锥体细胞,衬托出神经元胞体的轮廓。突触素免疫组织化学染色特征为突触前终末

特异性,在神经毡区呈颗粒状或点状免疫标记,神经元胞体、白质及血管不被染色。海马、齿状会出现明显免疫板层分布。海马本部的始层、辐射层染色较深。免疫反应越强,免疫产物表达越多,染色越深。定量分析结果显示,术后1周时,自然康复组和麻黄碱治疗组SYP和GAP-43的表达均低于假手术组,而麻黄碱治疗组在术后1周SYP和GAP-43的表达均明显高于自然康复组($P<0.05$),在术后4周SYP的表达仍高于自然康复组($P<0.05$)。见表2。

2.4 水迷宫实验结果

2.4.1 定位航行实验:大鼠接受了5天共10个时间段训练,第1—2天平均逃避潜伏期迅速下降,第4—5天降势趋缓。第1天治疗组与自然康复组间平均

表2 治疗组与自然康复 CA3 区 GAP-43 及 SYP 平均光密度的比较

($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	GAP-43		SYP	
		术后1周	术后4周	术后1周	术后4周
假手术组	6	0.2407±0.0341	0.2094±0.0194	0.3474±0.0251	0.2402±0.0154
自然康复组	6	0.1715±0.0161	0.1864±0.0138	0.2228±0.0239	0.1984±0.0178
麻黄碱治疗组	6	0.2102±0.0255 ^①	0.1961±0.0163	0.2864±0.0380 ^①	0.2254±0.0169 ^①

①与自然康复组相比 $P < 0.05$

逃避潜伏期无明显差异, 第2天治疗组逃避潜伏期较治疗组明显缩短 ($P < 0.05$), 第3—5天各治疗组逃避潜伏期较治疗组缩短更明显 ($P < 0.01$)。见图5。

2.4.2 空间探索实验:在空间探索实验中, 假手术组穿过原平台所在位置的次数 10.667 ± 1.211 , 麻黄碱治疗组穿过原平台所在位置的次数 (8.167 ± 1.472) 明显多于自然康复组 (5.667 ± 1.211) ($P < 0.01$)。

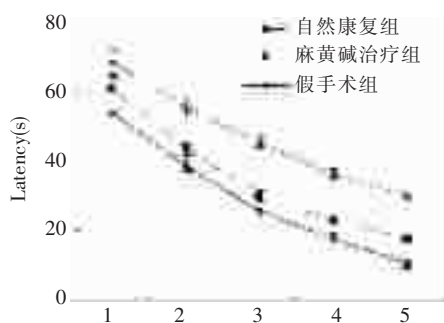


图5 各组平均逃避潜伏期

3 讨论

新生儿缺氧缺血性脑病 (hypoxic-ischemic encephalopathy, HIE) 的发病机制复杂, 特别是中、重度 HIE 常可造成永久性神经系统后遗症。虽然国内、外对本病的治疗研究很多, 但至今仍无突破性进展。麻黄是我国宝贵的药用植物, 早在《神农本草经》就有麻黄治脑卒中后遗症的记载, 有名的“小续命汤”即以麻黄为主药。研究证实, 麻黄的主要成分麻黄碱可促进大鼠中脑动脉闭塞 MCAO 后运动功能的恢复。本研究也说明麻黄碱对 HIBD 的神经康复有促进作用。

3.1 麻黄碱对新生 HIBD 大鼠神经元的影响

HIBD 主要是由围生期窒息所致, 缺氧缺血后的能量衰竭、离子稳态失衡、释放兴奋性神经介质及氧自由基大量产生等一系列病理生理改变致神经元丢失。而神经元是神经系统的结构和功能单位, 也是学习的结构基础。神经元胞膜内有离子通道、载体和受体蛋白, 在接受刺激、传递神经冲动和信息处理中具有重要作用。随着脑缺氧后神经元坏死、数目减少, 突触数量也随之减少, 与受累神经元有突触联系的神经纤维也必受影响, 神经元和突触的这种改变影响了神经元之间的信息传递, 导致学习记忆等脑功能受损。我们的研究发现缺氧缺血后1周时皮质

神经元丢失、海马区细胞排列紊乱并有细胞丢失, 麻黄碱治疗组大脑皮质分层清晰, 神经元较密集, 海马区细胞丢失不明显。麻黄碱通过减少神经元的丢失, 防止由 HIBD 所引起的脑功能障碍的发生。

3.2 麻黄碱对 HIBD 大鼠学习和记忆的影响

缺氧缺血导致脑组织损伤, 而海马对缺氧缺血具有选择性易损性, 因此缺氧缺血后海马结构将遭受破坏, 导致脑发育过程中功能和行为的异常, 而海马的功能与空间记忆和学习密切相关^[3]。Morris 水迷宫是一种测定大鼠空间定向与记忆力的经典方法, 常常用于测试大鼠的学习和记忆能力, 是一种评价大鼠神经功能的可靠方法^[4]。通过对 HIBD 后4周大鼠 Morris 水迷宫5天的定位航行实验, 显示在第一天时治疗组和自然康复组间平均逃避潜伏期无明显差异。随着试验的进行, 平均逃避潜伏期均有缩短, 治疗组明显短于自然康复组, 且差异逐渐加大。在空间探索实验中, 治疗组穿过原平台所在位置的次数多于自然康复组。自然康复组在 HIBD 后1周时海马区细胞排列紊乱, 可见细胞丢失, 并且 GAP-43 和 SYP 的表达少于麻黄碱治疗组, 这些均表明麻黄碱早期应用可提高新生 HIBD 大鼠年长后的空间定向能力和学习记忆能力, 有助于减少智力低下等神经后遗症的发生。

3.3 麻黄碱对 HIBD 大鼠 GAP-43 和 SYP 表达的影响

GAP-43 是与神经发育、轴突再生、突触重建密切相关的一种快速转运磷酸蛋白, 表达产物主要位于轴突生长锥质膜面, 通过加速生长锥基部胞浆膜的扩展而促进轴突生长。SYP 是特异性位于突触前囊泡膜上的钙结合蛋白, 是一种重要的囊泡膜标志蛋白^[5], 在钙依赖性神经递质释放过程中起重要作用, 参与神经突触结构的发育、调节突触的可塑性^[6]。突触可塑性是突触对内外环境变化作出反应的能力, 是学习记忆的神经生物学基础^[7]。由于囊泡重吸收机制的存在, 突触素的量在正常状态下保持相对恒定, 其数量和分布密度可间接反映突触的密度。GAP-43 和 SYP 可作为神经可塑性的检测指标以判定药物治疗的效果及机制。

学习记忆功能障碍是脑 HIBD 所致的神经系统

(下转 684 页)