

“形神共养”对 MCAO 大鼠学习记忆能力及 BDNF 表达的影响

王娟^{1a,2}, 郝赤子^{1a}, 廖维靖^{1a}, 张璇^{1a,2}, 万芪^{1b}

【摘要】 目的:探讨“形神共养”的丰富生存环境对大鼠脑中动脉阻塞(MCAO)大鼠学习记忆能力以及抗大鼠脑源性神经营养因子(BDNF)表达的影响。**方法:**将 50 只 SD 雄性大鼠随机分为缺血“形养”组(IE1)、缺血“神养”组(IE2)、缺血“形神共养”组(IE3)、缺血标准环境组(IS)、假手术标准环境组(SS),每组 10 只。缺血组进行右侧大脑中动脉阻断及再灌注手术。术后进行为期 4 周的“形神共养”干预,干预后进行水迷宫实验,实验结束后用免疫组织化学染色观察脑梗死周边皮质及海马齿状回区 BDNF 的表达。**结果:**在水迷宫空间探索实验中,大鼠的逃避潜伏期逐渐缩短,训练第 5 天时,IE1、IE3 组逃避潜伏期均比 IS 组短(均 $P<0.05$),且 IE1、IE3 组与 SS 组之间无显著性差异;IE1、IE2、IE3 组大鼠对原平台的记忆均比 IS 好。IE1、IE3 组梗死灶周围皮质 BDNF 蛋白的表达比 IS 组高;在缺血侧海马 DG 部位,IE1、IE2、IE3 组 BDNF 蛋白的表达均比 IS、SS 组高(均 $P<0.05$)。**结论:**“形神共养”的丰富生存环境有利于促进局灶性脑缺血再灌注大鼠学习记忆能力的恢复;有利于促进局灶性脑缺血再灌注大鼠梗死周边皮质和海马齿状回区 BDNF 的表达,从而促进脑缺血大鼠功能的恢复。

【关键词】 丰富生存环境;形神共养;脑缺血再灌注;脑源性神经营养因子

【中图分类号】 R49;R743.3 **【DOI】** 10.3870/zgkf.2017.02.001

Effect of "preservation from both physique and spirit" on learning and memory ability and expression of BDNF after focal ischemia in rats Wang Juan, Hao Chizi, Liao Weijing, et al. Department of Rehabilitation Medicine, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, China

【Abstract】 Objective: To investigate the impact of "preservation from both physique and spirit" on cognitive ability and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) after focal ischemia in rats. **Methods:** Fifty Sprague-Dawley rats were divided into five groups: ischemic rats housed in the enriched environment of "physique" (IE1), ischemic rats housed in the enriched environment of "spirit" (IE2), ischemic rats housed in the enriched environment of "preservation from both physique and spirit" (IE3), ischemic rats housed in standard cages (IS), and sham-ischemic rats in standard cages (SS) ($n=10$ in each group). Rats in the ischemia/reperfusion groups had their middle cerebral artery sutured for two h before reperfusion, and rats were placed in a "preservation from both physique and spirit" enriched-environment for 4 weeks. The water Maze test was used to assess spatial learning and memory after environmental intervention. Then the rats were sacrificed. BDNF immunoreactivity was quantified in peri-infarct area and hippocampus dentate gyrus. **Results:** The escape latency was significantly shorter in groups IE1 and IE3 than in group IS on the 5th days ($P<0.05$), but there was no significant difference among IE1, IE3 and SS groups. The time spent in the target quadrant was significantly longer in IE1, IE2 and IE3 groups than in IS group. The BDNF protein levels in the peri-lesional cortex in groups IE1 and IE3 were higher than in IS group, and those in hippocampus dentate gyrus in IE1, IE2 and IE3 groups were higher than in IS and SS groups ($P<0.05$). **Conclusions:** We conclude that "preservation from both physique and spirit" enriched-environment housing has positive effects on learning and memory ability, and increases BDNF levels in rats after focal ischemia.

【Key words】 enriched environment; preservation from both physique and spirit; cerebral ischemia reperfusion;

brain-derived neurotrophic factor

基金项目:国家自然科学基金项目(81173315)

收稿日期:2016-05-24

作者单位:1. 武汉大学 a. 中南医院康复医学科, b. 医学部神经科学研究所, 武汉 430071; 2. 湖北省中西医结合医院康复医学科, 武汉 430040

作者简介:王娟(1987-),女,硕士,住院医师,主要从事神经康复方面的研究。

通讯作者:廖维靖, 542761639@qq.com

“丰富生存环境”可以增强学习和记忆能力^[1],诱导脑结构和功能的改变,对脑损伤修复具有显著促进作用,《黄帝内经》中的养生学十分重视形体与精神的

整体调摄,强调动以养形,静以养神,动静结合,形神共养^[2],但养生缺乏科学合理的评价方法^[3]。本研究将中医养生理论,借助现代医学技术和手段,应用于局灶性脑缺血的研究,在“丰富生存环境”的实践基础上,根据中医养生“动以养形,静以养神”理论的指导,制作“形神共养”的丰富生存环境模型,探讨“形神共养”对局灶性脑缺血再灌注大鼠学习记忆能力的影响及其分子机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及造模 选取健康雄性 Sprague-Dawley 大鼠共 50 只(SPF 级),体质量(220 ± 20)g,饲养于武汉大学动物实验中心的屏障环境中,饲养环境保持室温 22°C ,湿度 72%,12h 昼夜交替。术前禁食 12h,不禁水。适应性饲养 5d 后,采用计算机随机数字法将 50 只 SD 大鼠随机分为假手术标准环境组(Sham Standard Environment,SS)10 只、缺血丰富环境组(Ischemia Enriched Environment,IE)30 只,缺血标准环境组(Ischemia Standard Environment,IS)10 只。50 只大鼠均参照廖维靖等^[4]的线栓改良法制作大脑中动脉阻塞(Middle Cerebral Artery Occlusion, MCAO)及再灌注模型,假手术组的线栓插入颈总动脉的深度为 1cm,随即拔出,结扎颈总动脉远端的备用丝线。造模后对已经苏醒的大鼠参照 Zea Longa 法进行神经功能缺损评分^[5],评分在 1~3 分为造模成功,纳入实验,否则弃之。对于造模失败的大鼠,通过致死量麻醉后颈椎脱臼的方法对其实施安乐死^[6]。

1.2 方法 ①“形神共养”的“丰富生存环境”模型的制作。a.“形养”笼尺寸长、宽、高分别为 90cm、75cm、50cm,笼内放置木梯、台阶、网格、秋千、绳索等物品供动物攀爬,放置塑料管道、跑轮等供动物自主运动及探索,各种大小和颜色的球、积木供动物玩耍^[1,7]。笼内物品每天一换,随机更换物品摆放的位置,保持新鲜感。食物和水可自由获取,偶尔给予葵花籽、馒头、红薯等,每笼可放置 8~12 只大鼠。b.“神养”笼尺寸同“形养”笼,笼内只放置垫料、食物、水,不放置诱发大鼠主动运动和探索的物品。每笼可放置 8~12 只大鼠。c. 标准笼尺寸长、宽、高分别为 44cm、32cm、20cm,每笼 3~4 只大鼠。笼内放置垫料、食物和水,笼内无其他设施。②大鼠术后休养 3d,缺血丰富环境组被随机分为 3 组:“形养”组(IE1)($n=8$)、“神养”组(IE2)($n=8$)和“形神共养”组(IE3)($n=8$)。IE1 组居于“形养”笼中,每天入住 4h(8:30~12:30),其余时间居于标准笼;IE2 组居于“神养”笼中,每天入住 4h(12:30~16:30),其余时间居于标准笼。IE3 组大鼠

先居于“形养”笼中 4h(8:30~12:30),后居于“神养”笼中 4h(12:30~16:30),其余时间居于标准笼^[8]。SS 组($n=9$)及 IS 组($n=8$)一直居住于标准笼中。

1.3 评定标准 ①Morris 水迷宫实验:干预 4 周后,进行为期 6d 的水迷宫实验。水迷宫直径 120cm,高 60cm,平台直径 9cm,高 30cm,水面高出平台 2cm,水温保持在(22 ± 1) $^{\circ}\text{C}$,实验时将适量墨汁倒入水池中搅匀,直至看不见水面下的平台^[7,9]。定位航行实验,水迷宫随机划分为 4 个象限,将平台放置于其中一个象限中央。分别选取 4 个象限之间的交点作为 A、B、C、D 4 个入水点。a. 第 1~5 天记录逃避潜伏期时,在实验开始时,将大鼠头部面向池壁,轻放入水池,直到大鼠找到平台并在平台上停留 3s。记录大鼠寻找平台的时间,即逃避潜伏期。每次寻找平台的时间定为 60s,如果大鼠在规定时间内找不到平台,用木棍引导大鼠找到平台,并学习 20s 后,将大鼠拿走。每只大鼠每天从 4 个不同象限入水训练各 1 次,两次训练间隔大于 20min,取 4 次训练时间的平均值作为每天定位航行实验的逃避潜伏期;b. 第 6 天测试空间探索实验,将平台移除,大鼠从原平台所在象限的对角线位置入水,记录 30s 内大鼠在原平台所在象限的时间。②免疫组织化学染色:水迷宫测试结束后大鼠称重,用 10%水合氯醛(350mg/kg)腹腔注射麻醉后,迅速打开胸腔,充分暴露心脏,用 50ml 注射器针头插入左心室,剪开右心耳,经心脏快速灌注生理盐水 100~150ml,再用 4%的多聚甲醛溶液 100~150ml 进行灌注,先快后慢。灌注成功后立即断头取脑组织,冠状切取视交叉前 2mm 到视交叉后 2mm 组织块,浸泡于 4%多聚甲醛固定液中,24h 后进行脱水、浸蜡、石蜡包埋,切成 4 μm 石蜡切片。采用 Envision 两步法进行免疫组化染色,免疫组化选用一抗为抗大鼠脑源性神经营养因子(Brain Derived Neurotrophic Factor, BDNF)兔多克隆抗体,二抗为辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG;染色标记的物质为脑源性神经生长因子发生抗原抗体反应后的阳性产物。染色完成后每个脑组织随机选取 5 张切片,在显微镜下($\times 200$)分别于梗死灶周边区及海马齿状回(Dentate gyrus, DG)区随机选取 3 个不重叠视野摄片。采用专业图片分析软件 Image-Pro Plus 6.0 系统进行图像分析,分别测定梗死灶周边皮质及海马 DG 区 BDNF 阳性反应产物的累积光密度值(Integrated Optical Density, IOD)。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 18.0 统计软件进行统计学分析,符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,免疫组化结果采用单因素方差分析,进一步分析采用 LSD 法;水迷宫定位航行实验结果采用重复测量数据

的方差分析,空间探索实验采用单因素方差分析,进一步分析采用 Bonferroni 法,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Morris 水迷宫结果 各组组内 5d 训练的潜伏期随时间变化差异有统计学意义 ($F_{4,36}=121.274, P<0.01$),每个时间点各组间水迷宫训练的潜伏期差异有统计学意义 ($F_{4,36}=4.877, P<0.01$)。第 1 天,SS、IE3 组大鼠在水迷宫中的逃避潜伏期比 IE1、IE2、IS 组大鼠短 (均 $P<0.05$);第 4 天,SS 和 IE3 组大鼠的逃避潜伏期均比 IS 短 ($P<0.05, 0.01$);第 5 天,SS、IE1、IE3 组逃避潜伏期均比 IS 组短 ($P<0.05, 0.01$),且 IE1、IE3 组与 SS 组之间无显著性差异。见表 1。

第 6 天的水迷宫空间探索实验中,IE1、IE2、IE3、IS 及 SS 组目标象限停留时间分别为 9.58 ± 2.96 、 8.97 ± 1.29 、 9.70 ± 2.24 、 5.94 ± 1.70 及 11.82 ± 2.19 s,各组大鼠在对原平台的记忆方面差异有统计学意义 ($F_{4,36}=5.131, P<0.05$);IE1、IE2、IE3 组大鼠均比 IS 组在目标象限停留的时间长 ($P<0.05, 0.01$);但是 IE1、IE3 组和 SS 组之间差异无显著性意义。

表 1 5 组大鼠不同时间点的逃避潜伏期比较 $s, \bar{x}\pm s$

组别	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天
IE1 组	48.82 ± 9.62	30.71 ± 10.94	21.36 ± 9.20	17.17 ± 9.27	14.59 ± 6.02^a
IE2 组	50.45 ± 6.69	32.76 ± 11.46	27.67 ± 12.68	22.06 ± 10.06	20.13 ± 14.26
IE3 组	39.85 ± 9.63^{abc}	27.57 ± 10.12	17.19 ± 7.08^{ab}	15.23 ± 4.46^a	14.30 ± 9.01^a
IS 组	54.70 ± 6.06	36.98 ± 10.84	28.67 ± 6.50	25.59 ± 7.70	25.89 ± 6.13
SS 组	38.09 ± 5.35^{abc}	24.71 ± 10.34^a	17.82 ± 8.61^{ab}	13.52 ± 7.18^{ab}	12.15 ± 6.31^a

与同时时间点 IS 组比较, $^a P<0.05$; 与同时时间点 IE2 组比较, $^b P<0.05$; 与同时时间点 IE1 组比较, $^c P<0.05$

2.2 免疫组织化学检测结果 在光学显微镜下观察,大鼠脑梗死周边皮质及海马 DG 区均可见 BDNF 免疫组化阳性细胞,阳性细胞胞体呈圆形或椭圆形,胞核较大,胞浆呈棕黄色或深棕黄色。假手术组皮质及 DG 区

也有表达,但表达相对较少。不同分组间 BDNF 蛋白的表达在梗死灶周围皮质及缺血侧海马 DG 部位差异均有统计学意义 ($F_{4,36}=10.919, P<0.01$; $F_{4,36}=21.349, P<0.01$)。在梗死灶周围皮质部位 IE1、IE2、IE3 组 BDNF 蛋白的表达均比 SS 组高,且 IE1、IE3 组 BDNF 蛋白的表达比 IS 组高,IE3 组 BDNF 蛋白的表达较 IE1、IE2 组高 (均 $P<0.05$)。在缺血侧海马 DG 部位,IE1、IE2、IE3 组 BDNF 蛋白的表达均比 IS、SS 组高 (均 $P<0.05$),且 IE1、IE3 组的蛋白表达较 IE2 高 (均 $P<0.05$)。见图 1,图 2,表 2。

表 2 5 组大鼠梗死周边皮质及海马 DG 区 BDNF 蛋白表达的 IOD 值比较 $\bar{x}\pm s$

组别	n	梗死周边皮质	海马 DG
IE1 组	8	7763.33 ± 803.12^{ab}	2745.39 ± 435.224^{abc}
IE2 组	8	7357.92 ± 642.89^a	2267.40 ± 414.07^{ab}
IE3 组	8	8724.95 ± 636.53^{abcd}	3162.89 ± 409.71^{abc}
IS 组	8	6597.07 ± 981.49	1770.86 ± 336.66
SS 组	9	6306.96 ± 603.97	1377.66 ± 290.86

与 SS 组比较, $^a P<0.05$; 与 IS 组比较, $^b P<0.05$; 与 IE2 组比较, $^c P<0.05$; 与 IE1 组比较, $^d P<0.05$

3 讨论

《黄帝内经》中的养生学十分重视形体与精神的整体调摄,“动以养形”是指运动可以促使人体气血充盈、使精气更加流通,能够增强人体生理的气化作用,提高人体抵抗疾病的能力。“静以养神”是指保持心情的宁静、舒畅、专一,能够使脏腑气机协调、通畅^[2]。事实上人体完成任何一项动作,都是动与静的有机结合,只不过是形式上看以哪一种方式为主。养形侧重于动,这里的“动”是指运动形体而言,顺应自然以利其形,调摄饮食养其形,运动锻炼强其形。“静”是相对的概念,不是绝对的静止,是指精神内敛而言。大鼠喜群居生活,有研究发现长期独居容易使动物产生焦虑感^[10],独居大鼠与群居大鼠相比,更加容易激惹。也有研究表明,

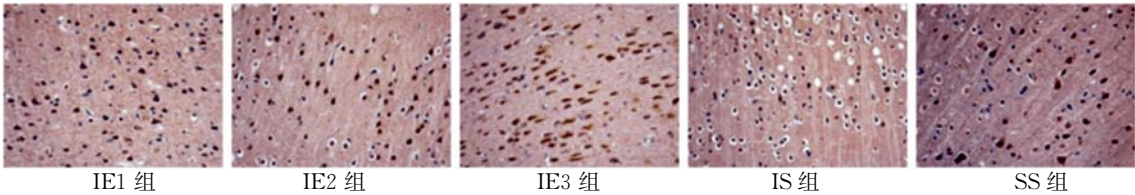


图 1 5 组大鼠脑梗死灶周围皮质 BDNF 的表达($\times 200$)

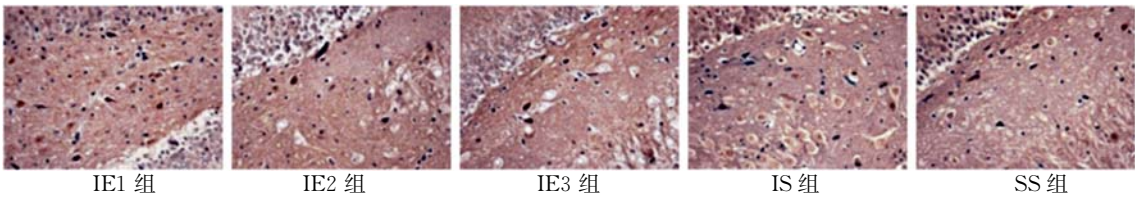


图 2 5 组大鼠海马 DG 区 BDNF 的表达($\times 200$)

社会孤立产生的压力可能会导致皮质酮水平增加,而皮质酮可能会导致海马区神经元的损伤^[11],从而加重缺血性脑损伤。实验中标准环境的特点是活动空间狭小、单调,各种刺激和活动训练很有限,再加上群体成员少,社会交往机会遭到剥夺。相反,丰富生存环境的活动空间较大,里面放置的物体丰富而新奇,群体成员较多,除了能够提供充分的多感官刺激、运动和社交刺激外,还能够为动物提供训练学习机会。

“形神共养”能够提高脑缺血大鼠空间学习能力及记忆能力,从而改善脑缺血大鼠的认知功能。实验中随着水迷宫的不断训练,大鼠可以通过周围环境中的空间线索形成对平台位置的记忆,寻找平台的逃避潜伏期逐渐缩短,这与 Birch^[12]的报道基本一致。在水迷宫实验的最后 IE1 组、IE3 组与 SS 组差异不显著,水迷宫成绩几乎恢复到正常大鼠水平,而 IS 组大鼠学习记忆能力也随着训练的加强,有一定程度的改善,可能是脑缺血后功能自发性恢复的结果。

丰富环境作为影响脑可塑性的外界因素其分子机制在一定程度上归功于神经营养因子 BDNF 的作用。有研究认为脑缺血缺氧损伤后,BDNF 及其受体 TrkB 基因表达增加,特别是在脑梗死灶周围皮质和海马区域更加突出^[13-14]。本研究发现“形神共养”能促进梗死灶周边皮质和海马 DG 区 BDNF 的表达,有利于脑缺血大鼠运动功能以及认知功能的恢复。这与 Gobbo 等^[15]的研究基本一致。大鼠脑缺血后缺血灶周围皮质、海马部位 BDNF 表达存在着一定的规律^[16-17],也有研究显示 BDNF 在脑缺血后 3d 开始增高,7d 后表达持续增强达高峰,30d 后表达下降^[18-19]。而 BDNF 在海马不同部位的表达也存在着一定差异:有研究发现脑缺血后 BDNF 在海马缺血耐受区域 CA3、CA4 以及 DG 区反而比缺血敏感区 CA1 表达高出很多^[20]。可能是在脑缺血发生后,海马 CA3、CA4 以及 DG 区通过自身代偿作用,调节内源性 BDNF 的表达,从而促进了受损神经元的修复和再生。

由此可见,“形神共养”的丰富生存环境有利于促进局灶性脑缺血再灌注大鼠学习记忆能力的恢复,促进局灶性脑缺血再灌注大鼠梗死周边皮质和海马齿状回区 BDNF 的表达,从而促进脑缺血大鼠功能的恢复。其可能机制是“形神共养”的丰富的生存环境中的多样化的刺激和训练促进了大脑可塑性的变化,使神经系统的功能重组和代偿,且“形养”与“神养”相结合的“形神共养”方式在某些方面更优于单纯“形养”与“神养”。

【参考文献】

- [1] Nithianantharajah J, Hannan AJ. Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system[J]. Nat Rev Neurosci, 2006, 7(9): 697-709.
- [2] 徐月英, 王喜涛. 《黄帝内经》中的运动养生思想及方法[J]. 沈阳体育学院学报, 2006, 25(2): 23-25.
- [3] 张雪亮. 中医养生理论随想[J]. 中国中医基础医学杂志, 2004, 10(12): 55-56.
- [4] 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.
- [5] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91.
- [6] 刘云波. 实验动物安乐死若干问题[J]. 中国比较医学杂志, 2008, 18(2): 76-78.
- [7] 孙慧敏. 丰富环境对慢性脑低灌注大鼠认知功能损害的影响[D]. 武汉: 武汉大学, 2010, 11-12.
- [8] 张璇, 蔺俊斌, 王娟, 等. “形神共养”对脑缺血再灌注大鼠功能恢复和突触形态结构参数的影响[J]. 中国康复医学杂志, 2015, 30(11): 1105-1111.
- [9] Zhu H, Zhang J, Sun H, et al. An enriched environment reverses the synaptic plasticity deficit induced by chronic cerebral hypoperfusion[J]. Neuroscience Letters, 2011, 50(2): 71-75.
- [10] 李阔. 丰富环境对局灶性脑梗死大鼠行为学恢复及 NF、GFAP、GAP-43 表达的影响[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2007, 155-157.
- [11] Shih PC, Yang YR, Wang RY. Effects of exercise intensity on spatial memory performance and hippocampal synaptic plasticity in transient brain ischemic rats[J]. PLoS One, 2013, 8(10): 78-83.
- [12] Birch AM, McGarry NB, Kelly AM. Short-term environmental enrichment, in the absence of exercise, improves memory, and increases NGF concentration, early neuronal survival, and synaptogenesis in the dentate gyrus in a time-dependent manner[J]. Hippocampus, 2013, 23(6): 437-450.
- [13] Lee TH, Yang JT, Kato H, et al. Expression of brain-derived neurotrophic factor immunoreactivity and mRNA in the hippocampal CA1 and cortical areas after chronic ischemia in rats[J]. J Neurosci Res, 2004, 76(5): 705-712.
- [14] 白蓉, 梁雪琴, 王魁花, 等. 康复训练对脑缺血大鼠行为学及 BDNF、CaBP-D28k 表达的影响[J]. 山东医药, 2012, 52(21): 33-35.
- [15] Gobbo OL, O'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.
- [16] Shono Y, Yokota C, Kuge Y, et al. Gene expression associated with an enriched environment after transient focal ischemia[J]. Brain Res, 2011, 137(1): 60-65.
- [17] Taliyan R, Ramagiri S. Delayed neuroprotection against cerebral ischemia reperfusion injury: putative role of BDNF and GSK-3 β [J]. J Recept Signal Transduct Res, 2015, 10(1): 1-9.
- [18] 张三明, 鲁翔. BDNF 在局部脑缺血大鼠的表达[J]. 江苏医药, 2008, 34(10): 1032-1033.
- [19] Neumann JT, Thompson JW, Raval AP, et al. Increased BDNF protein expression after ischemic or PKC epsilon preconditioning promotes electrophysiologic changes that lead to neuroprotection [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2015, 35(1): 121-130.
- [20] 李英平, 郭瑞芳, 李育臣, 等. 局灶性脑缺血大鼠海马区不同部位 BDNF 的表达及其意义[J]. 中国老年学杂志, 2004, 24(12): 1180-1182.