

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.003459

丰富环境促进缺氧缺血性脑损伤幼鼠髓鞘发育
并改善神经功能易烜宇¹, 贺雨¹, 艾青¹, 余卫红², 王计², 史源¹

(1.重庆医科大学附属儿童医院新生儿科、国家儿童健康与疾病临床医学研究中心、儿童发育疾病研究教育部重点实验室、儿童感染与免疫罕见病重庆市重点实验室, 重庆 400010; 2.云南省文山壮族苗族自治州人民医院新生儿科, 文山 663000)

【摘要】目的:探索丰富环境(environmental enrichment, EE)干预对缺氧缺血性脑损伤(hypoxic-ischemic brain damage, HIBD)幼鼠神经功能、脑室旁白质及海马髓鞘相关蛋白表达的影响。**方法:**取 7 d SD 大鼠随机分为假手术组(Sham 组)、模型组+标准环境组(HIBD+SE 组)及模型组+丰富环境组(HIBD+EE 组),采用 Rice-Vannucci 法制备 HIBD 模型。Sham 组及 HIBD+SE 组不予任何干预饲养于标准环境中, HIBD+EE 组于术后 8 d 至术后 18 d 予以丰富环境干预处理。术后 18 d 采用 Morris 水迷宫定位航行实验测定平台区穿梭次数,采用 Western blot 检测脑室旁白质及海马区髓鞘生成相关蛋白尿苷二磷酸糖基转移酶 8 (recombinant UDP glycosyltransferase 8, UGT8)、少突胶质细胞转录因子 2 (oligodendrocyte transcription factor 2, OLIG2) 的表达,采用 RT-qPCR 检测脑室旁白质及海马区 UGT8、OLIG2、糖脂转运蛋白(glycolipid transfer protein, GLTP)、髓鞘转录因子(myelin regulatory factor Gene, MYRF)的表达水平,采用免疫组化法检测神经元核(neuronal nuclei antigen, NeuN)表达水平,采用免疫荧光检测胼胝体髓鞘标志(myelin basic protein, MBP)表达水平。**结果:**术后 18 d,与 HIBD+SE 组比较, HIBD+EE 组穿越平台次数增多($P<0.01$), HIBD+EE 组较 HIBD+SE 组脑室旁白质及海马区 UGT8 mRNA 及蛋白表达升高($P<0.05$),脑室周围白质及海马区 OLIG2、GLTP、MYRF mRNA 表达升高($P<0.05$),海马 CA1 区 NeuN 表达水平高于 HIBD+SE 组($P<0.05$),胼胝体 MBP 平均荧光强度高于 HIBD+SE 组($P<0.05$)。**结论:**丰富环境能促进缺氧缺血性脑损伤新生大鼠少突胶质细胞谱系分化、髓鞘发育,改善学习记忆能力,可能与上调脑室周围白质及海马区 UGT8 蛋白表达,增加神经元分化成熟细胞数量有关。

【关键词】丰富环境;脑白质损伤;空间记忆能力**【中图分类号】**R72**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2024-01-08The role of environmental enrichment in promoting myelin formation
and neural function in hypoxic-ischemic brain injuryYi Xuanyu¹, He Yu¹, Ai Qing¹, Yu Weihong², Wang Ji², Shi Yuan¹

(1. Department of Neonatology, Children's Hospital of Chongqing Medical University; National Clinical Research Center for Child Health and Disorders; Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders; Chongqing Key Laboratory of Child Rare Diseases in Infection and Immunity; 2. Department of Neonatology, The People's Hospital of Wenshan Prefecture)

【Abstract】Objective: To explore the effects of environmental enrichment (EE) on neural function, myelin-related protein expression of periventricular white matter and hippocampus in rats with hypoxic-ischemic brain injury (HIBD). **Method:** Seven-day-old SD rats were randomly divided into sham surgery group, model+standard environment group (HIBD+SE group) and model + environmental enrichment group (HIBD+EE group), and the HIBD model was established with the Rice-Vannucci method. The sham surgery group and the standard environment group were raised in the standard environment without any intervention, and the environmental enrichment group was treated with enriched environment from 8 to 18 days after surgery. At day 18 after the surgery, Morris water maze was used to determine the escape latency of finding the hidden platform. Western blot was used to detect the expression of UGT8, a myelination-related protein, in periventricular white matter and hippocampus, and expression of oligodendrocyte differentiation gene OLIG2. RT-qPCR was used to detect the mRNA expression levels of OLIG2, GLTP, MYRF, UGT8 in periventricular white matter and hippocampus. Immunohistochemistry was used to detect the expression levels of NeuN, and immunofluorescence was used to detect the expression of myelin basic protein (MBP) in the corpus callosum. **Result:** At 18 days after surgery, compared with HIBD+SE group, platform cross-

作者介绍: 易烜宇, Email: yixuanyu1226@163.com,

研究方向: 新生儿脑损伤及神经发育的研究和治疗。

通信作者: 史源, Email: petshi530@163.com。**基金项目:** 国家重点研发计划资助项目(编号: 2022YFC2704802);

科技人才与平台计划(院士专家工作站)资助项目(编号:

202305AF150098)。

优先出版: <https://link.cnki.net/urlid/50.1046.R.20240402.1057.002>

(2024-04-02)

related protein, in periventricular white matter and hippocampus, and expression of oligodendrocyte differentiation gene OLIG2. RT-qPCR was used to detect the mRNA expression levels of OLIG2, GLTP, MYRF, UGT8 in periventricular white matter and hippocampus. Immunohistochemistry was used to detect the expression levels of NeuN, and immunofluorescence was used to detect the expression of myelin basic protein (MBP) in the corpus callosum. **Result:** At 18 days after surgery, compared with HIBD+SE group, platform cross-

ing times of the HIBD+EE group increased ($P<0.01$). The HIBD+EE group showed higher expression of UGT8 mRNA and protein in the periventricular white matter and hippocampus compared to HIBD+SE group ($P<0.05$). The expression of OLIG2, GLTP, MYRF mRNA in the periventricular white matter and hippocampus increased ($P<0.05$), and the expression of NeuN in CA1 region was higher than that of HIBD+SE group ($P<0.01$), the fluorescent intensity of MBP in corpus callosum region was higher than that in standard environment group ($P<0.05$). **Conclusion:** Environmental enrichment promotes the differentiation of oligodendrocyte lineages and myelin development in neonatal rats with HIBD, and improves learning and memory ability, which may be related to up-regulating UGT8 protein expression in periventricular white matter and hippocampus and increasing the number of neuronal mature cells.

[Key words] environmental enrichment; white matter injury; spatial memory capabilities

新生儿缺氧缺血性脑损伤(hypoxic-ischemic brain damage, HIBD)是围产期新生儿因宫内缺氧、分娩时(或)出生后缺氧和脑血流减少(或)暂停所引起的神经功能障碍的脑部疾病,进而对儿童神经发育造成不良远期结局^[1]。随着医疗技术的发展,患儿生存率升高,只有约60%的患儿能在新生儿期存活,约30%的患儿会出现长期神经功能障碍,对儿童自身、家庭、社会造成不良影响^[1-2]。在中枢神经系统中,少突胶质细胞生成髓鞘后包裹轴突,促进动作电位的快速传播和相关的中枢神经系统功能。髓鞘生成障碍会损伤神经传导和认知运动功能,将导致各种神经系统疾病,如脑室周围白质软化等^[3]。海马与白质是神经突触、髓鞘富集的部位,且易受缺氧缺血的影响,导致少突胶质细胞系分化、成熟障碍,髓鞘发育障碍,进而影响神经功能。丰富环境(environmental enrichment, EE)指将动物饲养在空间较大、动物数量较多的环境中,内置多种物体而创造新奇感,并每日更换以保持新奇感,能提供较多的感官刺激和运动机会^[4]。而标准环境的空间较小,动物数量相对较少,且不设任何物体。EE是一种结合体育活动、社会互动和持续探索学习的综合体,以非侵入性的方式丰富大脑中的运动、感觉和认知来刺激大脑,调节大脑可塑性,进而影响神经系统发育及功能,其在一定程度可以解释基因和环境之间的相互作用,这种影响甚至可以贯穿整个生命周期^[5]。研究已发现丰富环境能促进大脑的发育,增加大脑的大小和重量,且证实其可调节缺氧缺血脑损伤后神经系统的相关因子、细胞及认知行为学的变化,改善中枢神经系统功能^[5-6]。

因此,本研究通过制备幼鼠HIBD模型,检测丰富环境干预后大鼠神经功能、尿苷二磷酸糖基转移酶8(recombinant UDP glycosyltransferase 8, UGT8)蛋白及少突胶质细胞谱系分化生成少突胶质细胞转录因子2(oligodendrocyte transcription factor 2,

OLIG2)、糖脂转运蛋白(glycolipid transfer protein, GLTP)、髓鞘转录因子(myelin regulatory factor gene, MYRF)表达的变化,海马区成熟神经元相关神经元核(neuronal nuclei antigen, NeuN)表达水平,胼胝体髓鞘标志(myelin basic protein, MBP)表达水平,旨在探索丰富环境干预对髓鞘发育及神经功能的影响,为HIBD所致各种神经发育性残疾患儿早期丰富环境干预策略的制定提供可能的理论依据。

1 资料与方法

1.1 实验动物及分组

SPF级Sprague-Dawley孕鼠(孕21 d,由重庆恩斯维尔生物科技有限公司提供)饲养至分娩,幼鼠全部成活。于标准环境饲养至7 d龄后,进行数字编号,采用随机数字表法随机分为Sham组($n=24$)、模型组+标准环境组(HIBD+SE组)($n=24$)及模型组+丰富环境组(HIBD+EE组)($n=24$)。整个实验流程严格按照国际动物保护和使用指南的规定进行。

1.2 主要实验试剂及仪器

UGT8(武汉三鹰生物技术有限公司,17982-1-AP); OLIG2、GAPDH、 β -actin、山羊抗兔二抗(成都正能生物技术有限公司,R380740,R24404,700068,511203);GAPDH、UGT8、OLIG2、GLTP、MYRF microRNA引物(湖南艾科瑞生物工程有限公司);Evo M-MLV反转录预混型试剂盒、SYBR Green Pro Taq HS预混型qPCR试剂盒(湖南艾科瑞生物工程有限公司,货号:AG11728)、Au11702;NeuN(Abcam公司,货号:ab177487);MBP(Abcam公司,货号:ab209328)。

1.3 动物模型制备:HIBD模型制备

Sham组、HIBD+SE组及HIBD+EE组均采用Rice Vannucci法^[7]制备HIBD模型:将7 d龄SD大鼠吸入异氟烷麻醉后,固定于操作台上,常规酒精消毒颈部皮肤后,于颈部左侧颈总动脉处切口,游离左侧颈总动脉并行双层永久性结扎,缝合切口,回笼中休息1 h后置于37℃恒温加热垫上的密闭常压低氧舱内,给予8%氮氧混合气(8%氧气、92%氮气)2 h。幼鼠模型制备结束后放回母鼠笼中哺乳哺喂。缺氧后可以观察到明显运动障碍。根据Bederson标准评分^[8]判断模型建造成功,即幼鼠麻醉恢复后神经行为评分在1分及以上则视

为造模成功。Sham 组、HIBD+SE 组及 HIBD+EE 组均造模成功。Sham 组仅进行异氟烷麻醉后颈部切开、左侧颈动脉分离并缝合切口,不作结扎和缺氧处理,而后放回母鼠笼中母乳喂养。Sham 组、HIBD+SE 组及 HIBD+EE 组均造模成功。新生大鼠术后均未使用抗生素,所有组新生大鼠全部存活。

1.4 丰富环境的设计及干预

1.4.1 丰富环境的设计 参照 Ismail TR 等^[4]研究定制长 50 cm、宽 50 cm、高 25 cm 的半透明聚乙烯丰富环境笼盒,其中放置水、食物、垫料以及各种“玩具”,例如不同形状、颜色、大小的塑料球、滚轮、通道、木制或塑料旋转圆盘、秋千、桥、梯子、房子、毛球、铃铛、碗、杯子等,每天更换物品位置或形状,每 2 d 更换一次丰富环境干预物品并清理笼内卫生。

1.4.2 丰富环境干预方法 HIBD+SE 组:Sham 组和 HIBD+SE 组缺氧后置于无特殊刺激的标准笼中(长 40 cm×高 20 cm×宽 30 cm)饲养,仅放置垫料、食物和水,定期换笼。予以同等条件抓取,自由进食、进水,保持环境清洁。HIBD+EE 组:缺氧后置于无特殊刺激的标准笼中饲养,予以同等条件抓取,自由进食、进水,术后 8 d 开始予以丰富环境干预,全天置于定制丰富环境笼盒中饲养,予以同等条件抓取,自由进食、进水,保持环境清洁。每 2 d 更换丰富环境干预物品时,交换 HIBD+SE 组与 HIBD+EE 组母鼠,全程母乳喂养至 21 d 断奶,取出母鼠分笼饲养。两种饲养环境均提供相同的昼夜变化,室温(23 ± 2)℃。丰富环境干预从生后 15 d 持续至生后 25 d。

1.5 取材及冰冻切片制备

于造模后 18 d,将幼鼠经:0.2% 戊巴比妥钠(30 mg/kg),常规消毒,剪开胸腔,充分暴露心脏,将灌注针从左心室进入并推至主动脉口处,剪开右心耳,依次匀速灌注 100 mL PBS 溶液及 4% 多聚甲醛溶液。灌注结束后,快速断头取脑,分离脑组织,浸泡于 4% 多聚甲醛溶液中固定。常规用包埋剂包埋,制作 8~15 μm 厚度的冰冻切片备用。

1.6 Morris 水迷宫试验

Morris 水迷宫实验使用直径为 150 cm 的 Morris 水迷宫,由圆形水池、图像自动采集和处理系统组成。计算机将圆形水池均分为 4 个象限,平台放于第 4 象限,距水面 1~2 cm,此象限为平台象限,并用外置摄像头同步跟踪定位大鼠游行轨迹,计算机记录并计时,水温维持在(23 ± 1)℃,测试时避光,保持环境安静。利用 Morris 水迷宫设备及分析软件进行分析,检测各组大鼠的空间记忆能力。将幼鼠于 Morris 水迷宫入水点放入水中,系统即开始自动记录大鼠寻找隐藏平台的时间,即逃避潜伏期。每日按顺序依次在 4 个象限进行试验,每次试验间隔 30 min,连续 5 d,并计算每日的平均逃避潜伏期。若受试大鼠在 60 s 内未找到隐藏平台,则引导其登上平台停留 15 s 后放回,并将逃避潜伏期记为 60 s。第 6 d,去掉平台,分别在平台对侧象限及平台象限进行试验,自由游行 60 s,记录平台区域穿越次数。

1.7 Western blot 检测

于建模后 18 d,予以:0.2% 戊巴比妥钠(30 mg/kg),剪开

胸腔,充分暴露心脏,将灌注针从左心室进入并推至主动脉口处,剪开右心耳,匀速灌注 100 mL PBS 溶液。灌注结束后,快速断头取脑,参照 Paxi-nos-Watson 图谱,分离左侧海马及左侧脑室旁白质,冻存于 -80 ℃备用。每 10 mg 脑组织中加入 100 μL 强效裂解液,于冰上用超声匀浆机研磨后 4℃离心 10 min(12 000 r/min, $r=8$ cm),取上清,采用二喹啉甲酸法(bicinchoninic acid, BCA)测定蛋白浓度,调整上样量。剩余样品以样品量:上样缓冲液=4:1 比例混匀,金属浴 100℃煮沸 10 min,冷却后置于 -80 ℃冰箱保存。取 50 μg 样品蛋白,以常规方法完成十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳后(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE),转移至聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜上。室温下快速封闭液封闭 15 min,加入 UGT8 抗体(1:1 500)(武汉三鹰生物技术有限公司;规格:50 μL /瓶;货号:17982-1-AP)、OLIG2 抗体(1:1 000)(成都正能生物技术有限公司;规格:20 μL /瓶;货号:R380740)4℃摇床过夜孵育,加入对应二抗(1:10 000)(成都正能生物技术有限公司;规格:100 μL /瓶;货号:511203)室温摇床孵育 1.5 h。将 PVDF 膜置于图像扫描仪上,避光配制显影液并覆盖 PVDF 膜,曝光显影,显影图像以 Image J 分析系统处理并分析。将目的条带灰度值与内参基因条带灰度值比值代表目的蛋白的相对表达量。

1.8 RT-PCR

收集各组脑组织后使用 RNA 提取试剂盒提取各组细胞总 RNA,并测定浓度。使用逆转录试剂盒反转录获取 cDNA。UGT8 引物序列:上游引物:AGCAAACAATCCTAACA CCCTCA,下游引物:GGTTCACCTGCCAACTTTCTGC;OLIG2:上游引物:AAAGGTGTGGATGCTTAACAGAGAC,下游引物:CCGGAGACGATCTAGGCTTTC;GLTP:上游引物:ACACCTC ACCCAGCAAAGAA,下游引物:CGCCTCCATTGTCCTTCAA AC;MYRF:上游引物:TGGCACTCCCTTCTCTCTT,下游引物:ACGCTCTATGAACACGCAGG。GAPDH 引物序列:上游引物:GGCACAGTCAAGGCTGAGAATG,下游引物:ATGGTG GTGAAGACGCCAGTA。使用 SYBR Green Pro Taq HS 预混型 qPCR 试剂盒 II 进行检测。PCR 反应体系(10 μL):2X SYBR Green Pro Taq HS Premix II 25 μL ,上下游引物各 0.4 μL , ROX Reference Dye 0.4 μL , Total RNA 2 μL , RNase Free dH₂O 6 μL 。PCR 反应条件:95℃ 5 s, 60℃ 30 s,共 40 个循环。结果采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算 mRNA 的相对表达量。引物序列由湖南艾科瑞生物工程有限公司设计。

1.9 免疫组化检测

冰冻切片烘干,加入 3% H₂O₂ 溶液阻断活内源性过氧化物酶活性,滴加一抗(NeuN, 1:200),4℃过夜(阴性对照滴加 PBS 溶液);隔日室温下复温,滴加生物素化二抗工作液,37℃孵育 10~15 min,而后滴加辣根酶标记 10~15 min;以 DAB 显色,苏木素复染,分化、返蓝、脱水、封片后扫描。光镜下观察 NeuN 阳性细胞呈现棕褐色或棕黄色。通过 Image J 图像分析软件进行平均光密度(mean optical density, MOD)分析,随机选取每只大鼠 3 张海马切片,在 400 倍光学显微镜

下,观察海马CA1区 NeuN 表达情况,每张选取5个不重复视野,记录MOD值,取平均值进行统计学分析。

1.10 免疫荧光

获取脑组织,多聚甲醛低温固定,30%蔗糖沉降脱水,OCT包埋后冰冻切片机里切片;将切片放于EDTA抗原修复液中加热,随后置于PBS中洗涤3次,5 min/次;使用免化笔画圆圈包围组织,滴加牛血清白蛋白,室温下封闭35 min;甩掉封闭液,切片上滴加用PBS稀释的 Anti-MBP (Abcam, 1:200 稀释),放入湿盒内,冰箱中孵育12 h 以上;加二抗和细胞核染色,PBS洗涤3次,6 min/次;加对应的二抗和DAPI染液,室温下避光孵育60 min;PBS洗涤3次,6 min/次,滴加自发荧光淬灭剂,静置6 min,然后冲洗9 min;抗荧光淬灭后封片。共聚焦荧光显微镜下采集图像;导出图像后利用ImageJ 软件进行平均荧光强度统计分析。

1.11 统计学方法

应用Graphpad Prism 8.0软件对所得数据进行统计学分析,正态计量资料采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)形式表达,非正态计量资料用中位数(四分位数)即 $[M_d(P_{25}, P_{75})]$ 表示。多组间采用单因素方差分析,组间两两比较采用Tukey的多重比较检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

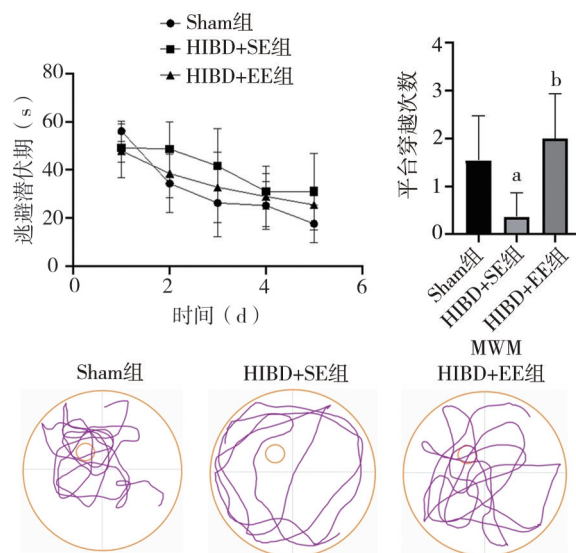
2.1 丰富环境干预后HIBD幼鼠的神经功能的影响

Morris 水迷宫定位航行实验发现,各组大鼠的逃避潜伏期总体随着训练天数的增加而缩短,且经过训练,第5 d HIBD+EE 组的逃避潜伏期较HIBD+SE 组有所缩短,但差异无统计学意义。各组第6 d 去掉平台后试验,结果显示HIBD+SE 组较Sham 组穿越平台次数减少($P=0.006$),HIBD+EE 组较HIBD+SE 组穿越平台次数增多($P=0.000$)(图1)。

2.2 丰富环境干预后HIBD幼鼠脑室旁白质及海马区 UGT8 蛋白及mRNA 的表达

Western blot 检测UGT8结果显示,在病灶侧(左侧)脑室旁白质及海马组织中,HIBD+SE 组明显低于Sham 组(海马

$P=0.015$,脑室旁白质 $P=0.041$),HIBD+EE 组明显高于HIBD+SE 组(海马 $P=0.024$,脑室旁白质 $P=0.016$),差异有统计学意义(图2)。



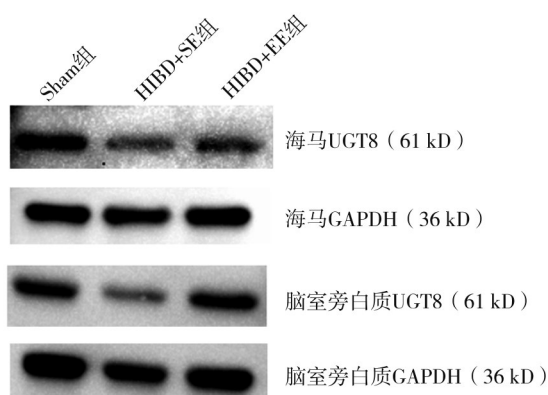
注:a,与Sham组比较, $P=0.006$;b,与HIBD+SE组比较, $P<0.001$

图1 各组幼鼠Morris水迷宫实验结果

检测UGT8在脑室旁白质及海马区UGT8基因表达水平,采用RT-qPCR检测UGT8 mRNA表达水平。结果显示HIBD+SE 组UGT8 mRNA表达水平低于Sham 组(海马 $P<0.001$,脑室旁白质 $P=0.001$),HIBD+EE 组高于HIBD+SE 组(海马 $P=0.048$,脑室旁白质 $P=0.049$),差异有统计学意义(图3)。

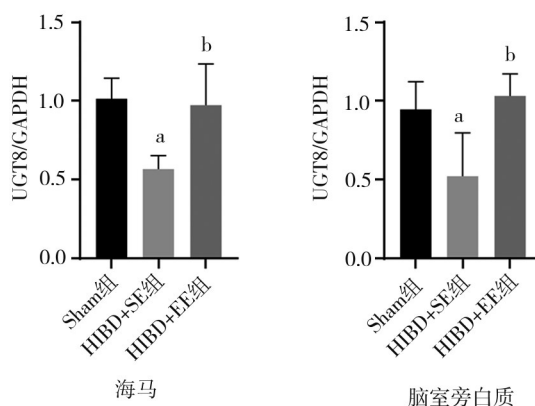
2.3 丰富环境干预后HIBD幼鼠海马CA1区 NeuN 的表达

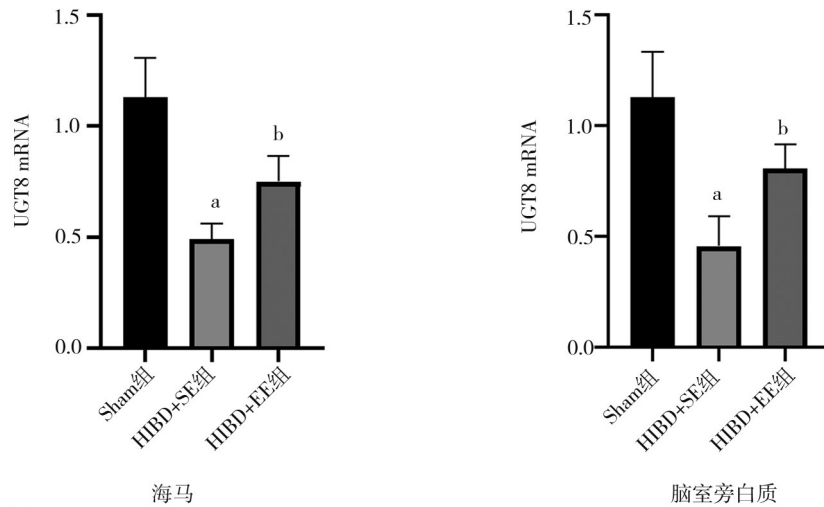
免疫组化检测海马CA1区 NeuN 的表达,结果显示,光镜下观察NeuN阳性细胞呈现棕褐色或棕黄色,红色方框为放大部分。与Sham 组比较,HIBD+SE 组海马CA1区 NeuN 表达降低($P=0.019$),HIBD+EE 组 NeuN 表达水平高于HIBD+SE 组($P=0.026$),差异有统计学意义(图4)。



注:a,与Sham组比较, $P<0.05$;b,与HIBD+SE组比较, $P<0.05$

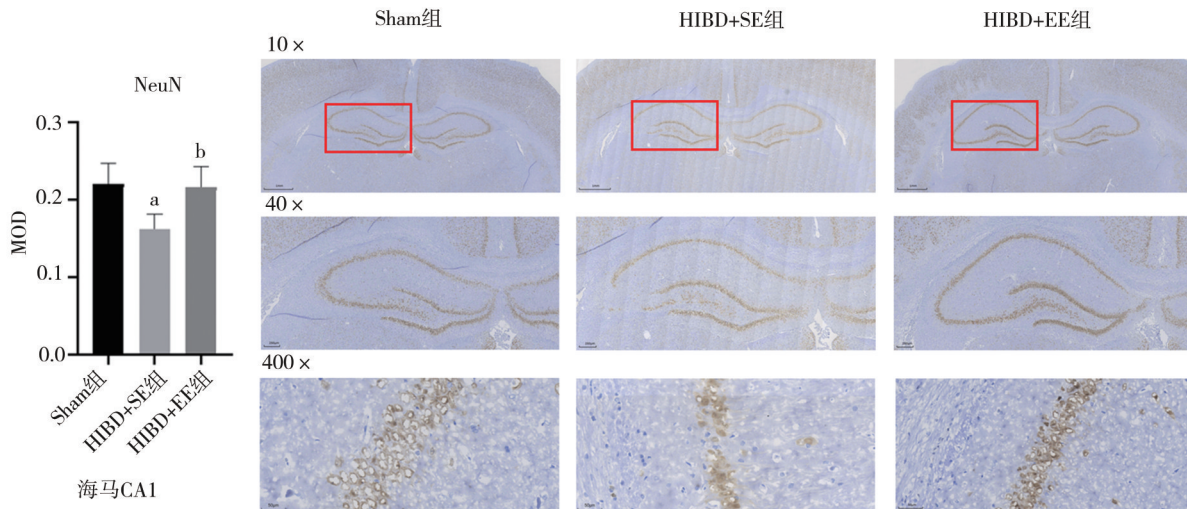
图2 Western blot检测各组幼鼠脑组织UGT8蛋白的表达





注:a,与Sham组比较,海马 $P<0.001$,脑室旁白质 $P=0.001$;b,与HIBD+SE组比较,海马 $P=0.048$,脑室旁白质 $P=0.049$

图3 RT-PCR检测各组幼鼠脑组织UGT8 mRNA的表达



注:a,与Sham组比较, $P<0.05$;b,与HIBD+SE组比较, $P<0.05$

图4 免疫组化检测各组幼鼠脑组织NeuN蛋白的表达

2.4 丰富环境干预后HIBD幼鼠脑室旁白质及海马区少突胶质细胞分化关键基因表达的变化

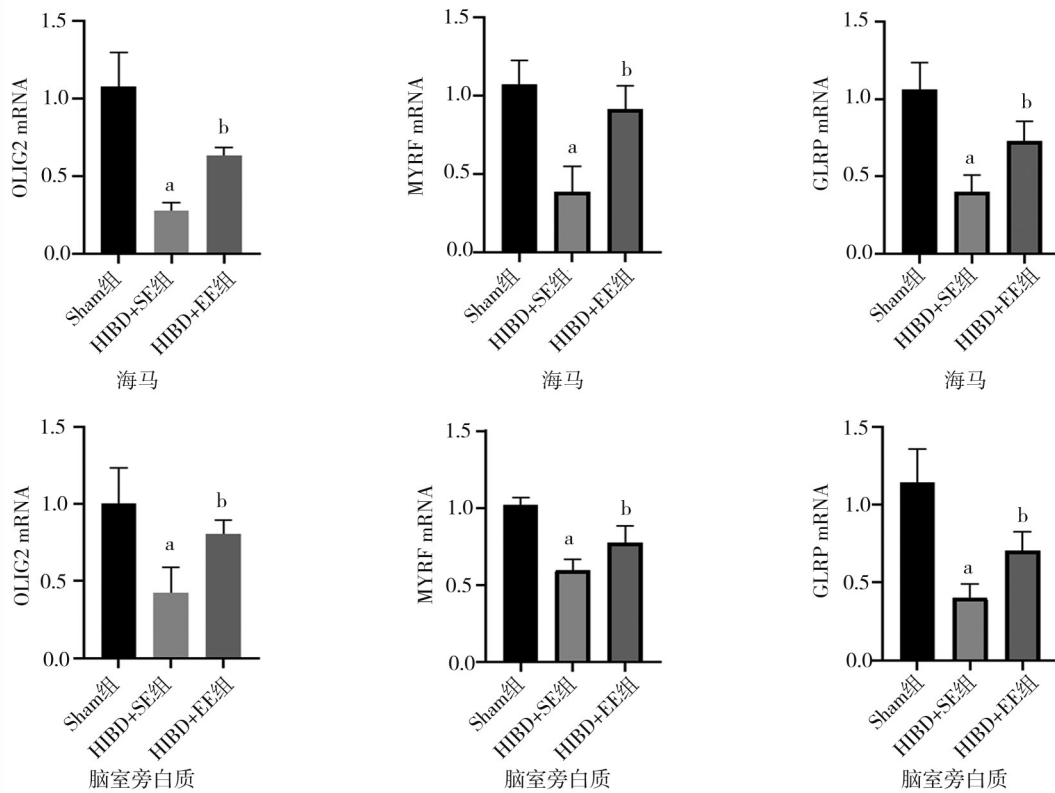
检测神经元细胞增加的具体细胞类型,采用RT-PCR检测髓鞘形成过程中的关键基因 $OLIG2$ 、 $MYRF$ 、 $GLTP$ mRNA的表达情况。结果显示,3组之间 $GLTP$ mRNA表达存在统计学差异($P<0.05$),HIBD+SE组脑室旁白质及海马区 $GLTP$ mRNA表达水平低于Sham组(海马 $P<0.001$,脑室旁白质 $P<0.001$),HIBD+EE组 $GLTP$ mRNA表达水平平均高于HIBD+SE组(海马 $P=0.038$,脑室旁白质 $P=0.047$)。HIBD+SE组脑室旁白质及海马区 $MYRF$ (海马 $P=0.002$,脑室旁白质 $P<0.001$)、 $OLIG2$ (海马 $P=0.000$,脑室旁白质 $P=0.004$) mRNA表达水平均低于Sham组,HIBD+EE组 $MYRF$ (海马 $P=0.010$,脑室旁白质 $P=0.036$)、 $OLIG2$ (海马 $P=0.027$,脑室旁白质 $P=0.026$) mRNA表达均高于HIBD+SE组,差异有统计学意义(图5)。

2.5 丰富环境干预后HIBD幼鼠脑室旁白质及海马区OLIG2蛋白表达的变化

Western blot检测 $OLIG2$ 结果显示,HIBD+SE组脑室旁白质及海马区 $OLIG2$ 表达水平低于Sham组(海马 $P=0.002$,脑室旁白质 $P=0.029$),HIBD+EE组 $OLIG2$ 蛋白表达水平高于HIBD+SE组(海马 $P=0.048$,脑室旁白质 $P=0.004$),差异有统计学意义(图6)。

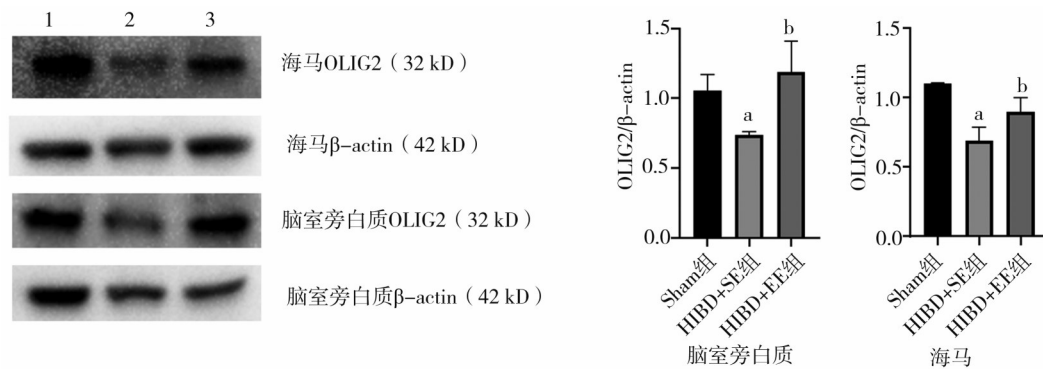
2.6 丰富环境干预后HIBD幼鼠胼胝体区MBP蛋白表达的变化

通过免疫荧光检测胼胝体区MBP蛋白的表达变化,结果显示,MBP蛋白呈红色荧光,与Sham组比较,HIBD+SE组胼胝体区MBP蛋白表达降低($P<0.001$),HIBD+EE组胼胝体区MBP蛋白表达水平高于HIBD+SE组($P=0.022$),差异有统计学意义(图7)。



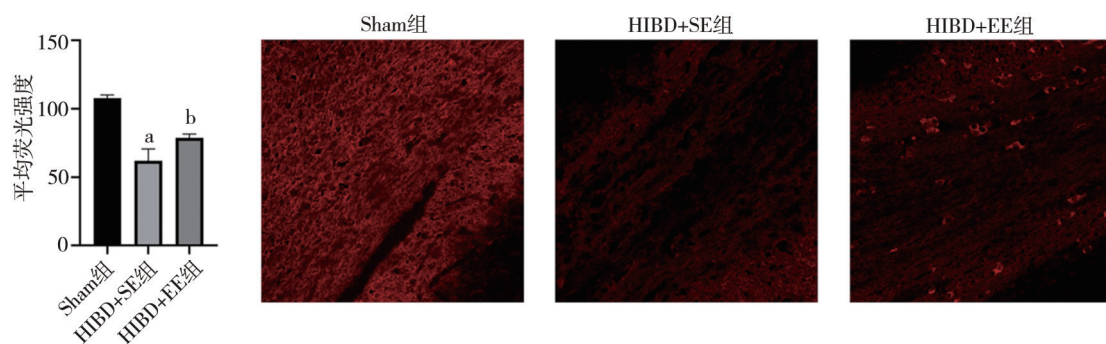
注: a, 与 Sham 组比较, $P < 0.05$; b, 与 HIBD+SE 组比较, $P < 0.05$

图5 RT-PCR检测各组幼鼠脑组织 OLIG2、MYRF、GLRP mRNA 的表达



注: 1, Sham 组; 2, HIBD+SE 组; 3, HIBD+EE 组; a, 与 Sham 组比较, $P < 0.05$; b, 与 HIBD+SE 组比较, $P < 0.05$

图6 Western blot检测各组幼鼠脑组织 OLIG2 蛋白的表达



注: a, 与 Sham 组比较, $P < 0.05$; b, 与 HIBD+SE 组比较, $P < 0.05$

图7 Western blot检测各组幼鼠脑组织 OLIG2 蛋白的表达

3 讨 论

对于缺氧缺血性脑损伤,目前没有统一规范的治疗方案,因此探究其发病机制为治疗途径提供更多理论依据是近年来的研究重点,是一个重要的儿童公共健康问题。缺氧缺血性脑损伤会导致脑白质及灰质缺血缺氧,少突胶质细胞与神经元轴突电传导密切相关,在神经突触传递密集的白质中及与学习记忆功能密切相关的海马的中枢神经系统中富集。而少突胶质前体细胞对缺氧缺血损伤的易感性高,是主要的损伤细胞,导致髓鞘脱失诱发神经轴索变性^[9],同时有星形胶质细胞增生,小胶质细胞活化,导致髓鞘化障碍、脑室扩大、神经功能发育障碍等,进而影响远期发育结局^[10]。丰富环境是一种重要的实验范式,它在一定程度上解释环境与基因的相互影响,进而改变大脑结构和功能,这种影响甚至可以贯穿整个生命,乃至遗传^[5]。它具有非侵入性、低风险的优点,具有一定临床可操作性。目前许多关于丰富环境的研究表明,丰富环境可以促进神经元的发生、缓解炎症、增加小胶质细胞的吞噬作用等^[11-12],但其对髓鞘发育及突触可塑性的作用机制研究尚不完全清楚。

本研究通过建立 HIBD 动物模型进行丰富环境干预,HIBD+EE 组在空间和内部设置上可以提供丰富的刺激来源,包括感官、运动和社交刺激。而 HIBD+SE 组空间狭小,各种感官刺激和活动非常有限,群体成员少,社交机会遭到剥夺。因此丰富环境干预会促使脑缺氧缺血幼鼠出现髓鞘的修复和记忆功能的改善。结合 Morris 水迷宫实验结果得出,HIBD 可损伤幼鼠与海马密切相关的空间记忆功能,而丰富环境确实改善了 HIBD 幼鼠所损害的空间记忆功能,促进神经功能的恢复^[12-13]。NeuN 是成熟神经元的标记物^[14],可以反映成熟神经元数量,NeuN 还参与神经发生和突触发生^[15],而学习记忆功能本质与突触可塑性的调节密切相关^[16]。本研究中免疫组化实验结果显示,HIBD+EE 组海马 CA1 区 NeuN 表达高于 HIBD+SE 组,该结果提示丰富环境可增加海马 CA1 区成熟神经元数量,提示 HIBD 幼鼠空间记忆功能的恢复可能与海马区成熟神经元数量的增加以及突触发生密切相关。

少突胶质细胞是中枢神经系统髓鞘形成的起源。髓鞘调节因子(myelin regulatory factor, MYRF)

是调控少突胶质细胞前体细胞向少突胶质细胞分化(oligodendrocyte precursor cells, OPCs)和髓鞘形成的关键转录因子^[17]。在本研究中,HIBD+SE 组 MYRF mRNA 以及 MBP 表达水平的下降。Duncan GJ 等^[18]同样在脱髓鞘动物模型中发现 MYRF 的表达降低,导致髓鞘形成减少。Emery B 等^[19]也证实,MYRF 基因敲除后,OPCs 可以分化到髓鞘形成前状态,但无法继续发育并发生凋亡。因此,MYRF 是中枢神经系统髓鞘形成的关键转录调控因子。在本研究中,发现 EE 可以通过提高 MYRF 的 mRNA 表达水平来减少 HIBD 对髓鞘形成的影响,从而确保 EE 可以触发 OPCs 分化,从而促进髓鞘的形成。

髓鞘中富含脂质,这些脂质对髓鞘的形成至关重要。任何导致脂质含量改变的干扰都会阻碍髓鞘的发育。包括 CERS 2、SPLTC 2、UGT8 和 GLTP 在内的酶对鞘脂代谢和髓鞘的维持至关重要^[20]。其中,GLTP 在运输髓鞘发育所必需的脂质中起着关键作用^[21]。GLTP 不仅介导脂质合成,还会促进少突胶质细胞形成髓鞘。在本研究中,HIBD+SE 组 UGT8、GLTP 以及 MBP 表达水平下降。之前的研究发现 UGT8 敲除的小鼠表现为低髓鞘化^[22],与本研究结果一致。相比之下,HIBD+EE 组显示 UGT8 和 GLTP 以及 MBP 表达水平的增加,这表明 EE 可以挽救 HIBD 造成的损伤,并通过促进这些基因的表达增强来维持髓鞘形成。

在其他各种脑损伤的模型的研究中,丰富环境可能通过某种调控因子促进神经祖细胞向少突胶质细胞分化,进而促进少突胶质细胞再生成熟,髓鞘发育及神经功能的恢复^[6,23];同时,可能通过某些途径减轻神经细胞的氧化损伤^[6],或调控某些神经调节因子,例如脑源性神经营养因子等,调节神经元细胞的凋亡与自噬^[5,24-25],促进少突胶质细胞的存活等多种途径提高了神经细胞的数量。然而,这些从体外到体内的具体调控机制及调控因子的研究目前尚不完善,还需要更多的实验研究。本课题组将以此继续深入研究。此外,本实验缺乏对动物脑组织大体的进一步分析,以及干预过程中脑血流量的监测。

综上所述,丰富环境可改善 HIBD 后的空间记忆功能,并通过某种或多种途径增加神经元细胞的数量,进一步促进 OLIG2、MYRF、GLTP、UGT8 的表达,增加髓磷脂膜可塑性所需的蛋白合成,促进髓鞘生成,改善神经功能。另外,发病机制复杂,本研

究仅处于初步探讨阶段,将在后续试验中将继续完善。

参 考 文 献

- [1] Min YJ, Ling EG, Li F. Immunomodulatory mechanism and potential therapies for perinatal hypoxic-ischemic brain damage[J]. Front Pharmacol, 2020, 11:580428.
- [2] Zhao J, He L, Yin LL. lncRNA NEAT1 binds to miR-339-5p to increase HOXA1 and alleviate ischemic brain damage in neonatal mice[J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2020, 20:117-127.
- [3] Liu ZX, Yan MB, Liang YJ, et al. Nucleoporin Seh1 interacts with Olig2/Brd7 to promote oligodendrocyte differentiation and myelination[J]. Neuron, 2019, 102(3):587-601.
- [4] Ismail TR, Yap CG, Naidu R, et al. Enrichment protocol for rat models[J]. Curr Protoc, 2021, 1(6):e152.
- [5] Kempermann G. Environmental enrichment, new neurons and the neurobiology of individuality[J]. Nat Rev Neurosci, 2019, 20(4):235-245.
- [6] Thamizhoviya G, Vanisree AJ. Enriched environment enhances the myelin regulatory factor by mTOR signaling and protects the myelin membrane against oxidative damage in rats exposed to chronic immobilization stress[J]. Neurochem Res, 2021, 46(12):3314-3324.
- [7] Rice JE 3rd, Vannucci RC, Brierley JB. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat[J]. Ann Neurol, 1981, 9(2):131-141.
- [8] Bieber M, Gronewold J, Scharf AC, et al. Validity and reliability of neurological scores in mice exposed to middle cerebral artery occlusion[J]. Stroke, 2019, 50(10):2875-2882.
- [9] Xie Y, Zhang XH, Xu PF, et al. Aberrant oligodendroglial LDL receptor orchestrates demyelination in chronic cerebral ischemia[J]. J Clin Invest, 2021, 131(1):e128114.
- [10] Schneider J, Miller SP. Preterm brain Injury: white matter injury[J]. Handb Clin Neurol, 2019, 162:155-172.
- [11] Harlow HF, Suomi SJ. Nature of love: simplified[J]. Am Psychol, 1970, 25(2):161-168.
- [12] Ohline SM, Abraham WC. Environmental enrichment effects on synaptic and cellular physiology of hippocampal neurons[J]. Neuropharmacology, 2019, 145:3-12.
- [13] Jin XH, Li T, Zhang LN, et al. Environmental enrichment improves spatial learning and memory in vascular dementia rats with activation of Wnt/ β -catenin signal pathway[J]. Med Sci Monit, 2017, 23:207-215.
- [14] Gusel'nikova VV, Korzhevskiy DE. NeuN As a neuronal nuclear antigen and neuron differentiation marker[J]. Acta Naturae, 2015, 7(2):42-47.
- [15] Wang HY, Hsieh PF, Huang DF, et al. RBFOX3/NeuN is Required for Hippocampal Circuit Balance and Function[J]. Sci Rep, 2015, 5:17383.
- [16] Poulos AM, Thompson RF. Localization and characterization of an essential associative memory trace in the mammalian brain[J]. Brain Res, 2015, 1621:252-259.
- [17] Cahoy JD, Emery B, Kaushal A, et al. A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function[J]. J Neurosci, 2008, 28(1):264-278.
- [18] Duncan GJ, Plemel JR, Assinck P, et al. Myelin regulatory factor drives remyelination in multiple sclerosis[J]. Acta Neuropathol, 2017, 134(3):403-422.
- [19] Emery B, Agalliu D, Cahoy JD, et al. Myelin gene regulatory factor is a critical transcriptional regulator required for CNS myelination[J]. Cell, 2009, 138(1):172-185.
- [20] Davis DL, Mahawar U, Pope VS, et al. Dynamics of sphingolipids and the serine palmitoyltransferase complex in rat oligodendrocytes during myelination[J]. J Lipid Res, 2020, 61(4):505-522.
- [21] Yang F, Guan YD, Feng X, et al. Proteomics of the corpus callosum to identify novel factors involved in hypomyelinated Niemann-Pick Type C disease mice[J]. Mol Brain, 2019, 12(1):17.
- [22] Dupree JL, Suzuki K, Popko B. Galactolipids in the formation and function of the myelin sheath[J]. Microsc Res Tech, 1998, 41(5):431-440.
- [23] Forbes TA, Goldstein EZ, Dupree JL, et al. Environmental enrichment ameliorates perinatal brain injury and promotes functional white matter recovery[J]. Nat Commun, 2020, 11(1):964.
- [24] 苑爱云,孙向峰,侯梅,等. 丰富环境对缺氧缺血脑损伤幼鼠空间记忆能力及海马区BDNF、自噬相关蛋白LC3表达的影响[J]. 中国康复医学杂志, 2020, 35(11):1296-1301.
- Yuan AY, Sun XF, Hou M, et al. Effects of environmental enrichment on the expressions of brain-derived neurotrophic factor and microtubule-associated protein 1 light chain 3 type in the hippocampus of immature rats with hypoxic-ischemic brain damage[J]. Chin J Rehabil Med, 2020, 35(11):1296-1301.
- [25] 宋名杨,朱路文,叶涛,等. 丰富环境对缺血缺氧脑损伤新生大鼠海马脑源性神经营养因子表达及细胞凋亡的影响[J]. 中国康复医学杂志, 2017, 32(7):750-755.
- Song MY, Zhu LW, Ye T, et al. Effects of enriched environment intervention on brain-derived neurotrophic factor expression and apoptosis in hippocampus of hypoxic ischemic brain damaged neonatal rats[J]. Chin J Rehabil Med, 2017, 32(7):750-755.

(责任编辑:周一青)