

神经生长因子对缺血缺氧性脑损伤大鼠学习记忆能力的影响

赵剑婷, 王慧敏, 陈 萍*

新乡市中心医院(新乡医学院第四临床学院) 神经内科, 河南 新乡 453000

摘 要: **目的** 研究神经生长因子(NGF)对缺血缺氧性脑损伤大鼠学习记忆能力的影响。**方法** 选取 30 只 21 d 龄的雄性 SD 大鼠, 随机分为假手术组、模型组和 NGF 干预组, 利用左侧颈动脉结扎结合低氧环境建立缺血缺氧性脑损伤模型, 以大鼠出现左旋、翻身和衡异常则为造模成功。NGF 干预组于造模成功后次日通过大鼠立体定位仪 icv NGF 溶液, 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 2 次/周, 共处理 4 周, 模型组和假手术组给予等量生理盐水注射。采用 BBB 评分、悬吊试验、斜坡试验评价大鼠四肢运动能力, 水迷宫实验评价大鼠定位航行和空间探索实验学习记忆能力, 并取脑组织皮质区进行 HE 染色观察其病理变化。**结果** NGF 干预后大鼠的 BBB 评分、悬吊试验时间提高, 而斜坡试验时间缩短, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); NGF 干预后大鼠找到平台时间和定位航行中潜伏期、游泳距离缩短, 在第 I 象限和中环停留的时间延长, 且差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。HE 染色结果显示, 与假手术组相比, 模型组大鼠皮质区神经细胞排列紊乱且数目明显减少, 并可见炎性细胞浸润, 部分出现变性和坏死, 而 NGF 干预后神经细胞排列紊乱及神经细胞数目减少明显改善, 变性及坏死细胞数目也明显较少。**结论** NGF 可能是通过改善缺血缺氧性脑损伤模型大鼠神经功能损伤, 使神经组织功能恢复, 从而提高了神经运动及学习记忆能力。

关键词: 缺氧缺血性脑损伤; 神经生长因子; 神经损伤; 学习记忆能力; 大鼠

中图分类号: R971 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2021)10-1999-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2021.10.002

Effects of nerve growth factor on learning and memory abilities of rats with hypoxic-ischemic brain damage

ZHAO Jian-ting, WANG Hui-min, CHEN Ping

Department of Neurology, Xinxiang Central Hospital (The Fourth Clinical College of Xinxiang Medical College), Xinxiang 453000, China

Abstract: Objective To study the effects of nerve growth factor (NGF) on learning and memory abilities of rats with hypoxic-ischemic brain damage. **Methods** Thirty male SD rats aged 21 d old were enrolled and randomly divided into sham operation group, model group, and NGF intervention group. Hypoxic-ischemic brain damage models were established by left carotid artery ligation combined with hypoxic environment. If there was levorotation, turning over and abnormal balance, the modeling was successful. NGF intervention group was injected with NGF solution 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ twice a week in the lateral ventricle for 4 weeks on the next day after the successful modeling. Model group and sham operation group were injected with normal saline. BBB score, suspension test, and slope test were applied to evaluate motor ability of rats. Water maze test was applied to evaluate learning and memory ability in place navigation and space exploration experiments. The cortical area of brain tissue was taken to observe pathological changes by HE staining. **Results** After NGF intervention, BBB score and time of suspension test were increased, while time of slope test was shortened ($P < 0.05$). After NGF intervention, time of rats finding out platform, latency and swimming distance in place navigation were shortened, staying time in the first quadrant and the middle ring was prolonged ($P < 0.05$). The results of HE staining showed that compared with sham operation group, arrangement of nerve cells in cortical area was disordered, and their number was significantly reduced in model group. There was inflammatory cell infiltration, and some were accompanied with degeneration and necrosis. After NGF intervention, disordered arrangement of nerve cells and decreased nerve cells number were significantly improved, and number of degeneration and necrosis cells was also significantly less. **Conclusion** NGF may recover nerve tissue function by improving

收稿日期: 2021-01-02

基金项目: 河南省卫生计生科技项目 (2018077)

作者简介: 赵剑婷 (1976—), 女, 硕士, 副主任医师, 研究方向为神经内科疾病、脑瘫。E-mail: kyo8637@163.com

*通信作者: 陈 萍 E-mail: kyo8637@163.com

nerve function damage in cerebral palsy rats, thus improve nerve motor, learning and memory ability.

Key words: hypoxic-ischemic brain damage; nerve growth factor; nerve injury; learning and memory ability; rat

缺氧缺血性脑损伤是新生儿脑损伤最常见的类型,主要由围产期窒息导致,严重者会出现脑瘫、智力低下和视力障碍等危害后遗症^[1-2]。缺氧缺血性脑损伤发病机制复杂,目前尚未有特殊治疗方式,因此寻找一种有效改善缺氧缺血性脑损伤患儿神经运动及学习记忆能力的药物显得尤为重要^[3]。神经生长因子(nerve growth factor, NGF)是目前研究的最为清楚的一类神经营养因子,在调节神经细胞的生长、发育、分化、存活及损伤后恢复过程中均发挥着重要作用^[4-5]。研究表明,多种神经系统疾病引起的神经损伤都与 NGF 及其受体关系密切^[6]。为了更好地研究临床药物治疗,本研究通过建立缺氧缺血性脑损伤大鼠模型,并通过 icv NGF 的给药方式,来观察 NGF 对缺氧缺血性脑损伤大鼠神经运动及学习记忆能力的影响,为 NGF 的临床用药提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 21 d 龄清洁级雄性 SD 大鼠 30 只,体质量(52.3±2.1) g,由河南省实验动物中心[许可证号:SCXK(豫)2017-0001]提供。培育室温度 20~25 °C,湿度保持在 65%~70%,按照大鼠习性给予 12 h 光照/12 h 黑暗的人工光照模式,全天自由饮食水。本研究经河南省实验动物中心实验动物伦理委员会批准;伦理审批号:20170045。

1.1.2 药品及试剂 NGF(北京奥博森生物技术有限公司,质量分数>95%,批号 180514); XTY5105653 型大鼠立体定位仪购自北京轩泰仪科技有限公司;Morris 水迷宫视频跟踪分析系统 WMT-100 购自成都泰盟软件有限公司。

1.2 方法

1.2.1 缺氧缺血性脑损伤模型建立及给药 将 30 只大鼠随机分为假手术组、模型组和 NGF 干预组,每组 10 只。参照文献方法^[7],用戊巴比妥钠(30 mg/kg) ip 麻醉大鼠,仰卧位固定在手术台,头顶备皮,碘伏消毒后 75%乙醇脱碘,铺无菌手术巾后,切开颈正中皮肤,分离左侧颈总动脉,用 4 号手术线结扎,缝合皮肤。大鼠苏醒后放置于低氧箱(8% O₂+92% N₂)内 2.5 h 后放回笼中饲养。假手术组仅切开皮肤不进行结扎操作和低氧处理。观察大鼠

行为,出现左旋、不能翻身和平衡异常则为造模成功。模型组和 NGF 干预组均成功建模 8 只大鼠,NGF 干预组于造模成功后次日通过 XTY5105653 型大鼠立体定位仪侧脑室 icv NGF 溶液(1 mg:200 mL 稀释),40 µg/kg,2 次/周,共处理 4 周。临床人用量为 0.28 µg/kg,换算成大鼠用量为 1.8 µg/kg,本研究用量为该剂量的 22.2 倍。模型组和假手术组注射等量生理盐水,NGF 干预组试验过程中 1 只大鼠死亡。

1.2.2 神经运动功能评分测定 用双盲法于造模后和末次处理后根据脊髓损伤行为学(Basso-Beattie-Bresnahan, BBB)评分^[8]对大鼠四肢运动功能进行评价:选择试验环境安静、光线好的宽大活动场地,将各组大鼠放入后,观察四肢各关节活动、后肢的步态及协调功能、运动时爪子的精细运动,根据 BBB 标准评分,以左、右两侧肢体评分的均值为最终评分。

1.2.3 悬吊实验及斜坡实验 用双盲法于造模后和末次处理后分别进行悬吊实验和斜坡实验^[9]。悬吊试验:让大鼠前腿抓住一直径为 0.5 cm 的玻璃棒,提起离开左面 45 cm,记录大鼠掉下的时间;斜坡试验:将大鼠头朝下倒置于 45° 斜坡上,记录大鼠转头向上角度>135° 的时间。

1.2.4 Morris 水迷宫试验 给予所有实验鼠 5 d 定位航行的实验^[10]:在开始试验前,将动物放入水中适应环境,若大鼠在入水游泳 60~90 s 以内仍未能找到水池中的站台或未能爬上站台时,可将大鼠引导置于站台上站立 10~30 s,让其体会站在站台上的感觉。动物爬上站台后,让动物在站台上站立 5~10 s,之后将大鼠从站台上拿下来,休息 30~60 s 以后再进行下一次训练;试验共历时 5 d,每天定于固定时间段训练 4 次,训练开始时,将平台置于任一固定象限,从池壁 4 个起始点的任一点将大鼠面向池壁放入水池,自由录像记录系统记录大鼠找到平台的时间和游泳路径,4 次训练即将大鼠分别从 4 个不同的起始点(不同象限)放入水中。大鼠找到平台后或 180 s 内找不到平台(潜伏期记 180 s),则由实验者将其引导到平台,在平台上休息 10 s,再进行下一次试验。每日以大鼠 4 次训练潜伏期的平均值作为大鼠当日的学习成绩。在完成定位航行

试验后截止进行空间探索试验：将水迷宫中的站台拆除，任意选择一个相同入水点将大鼠放入，记录大鼠在 180 s 内经过目标象限以及穿越目标象限的次数观察大鼠的空间定位能力。

1.2.5 组织学观察 末次处理后，10%水合氯醛麻醉大鼠，断头处死大鼠后，分离脑海马神经组织，10%多聚甲醛固定 48 h，石蜡包埋，在中心部分连续切成 5 μm 厚的切片，HE 染色后，倒置显微镜下观察海马神经元细胞的病理学改变。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析。符合正态分布的计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示，多组间比较采用单因素方差分析，两两比较采用 LSD-*t* 检验。

2 结果

2.1 NGF 干预前后对缺氧缺血性脑损伤大鼠 BBB 评分的影响

造模完成后，模型组和 NGF 干预组大鼠的 BBB 评分显著低于假手术组；干预完成后，NGF 干预组大鼠 BBB 评分明显高于模型组，且低于假手术组，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)，见表 1。

2.2 NGF 干预前后对缺氧缺血性脑损伤大鼠悬吊实验及斜坡实验的影响

造模完成后，模型组和 NGF 干预组大鼠的悬吊时间显著缩短，扭头时间明显延长；干预完成后，

表 1 各组干预前后大鼠的 BBB 评分比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of BBB scores among all groups before and after intervention ($\bar{x} \pm s$)

组别	n/只	BBB 评分	
		造模后	干预后
假手术	10	14.62 $\pm$ 1.28	20.79 $\pm$ 2.06
模型	8	3.18 $\pm$ 0.72*	11.31 $\pm$ 1.37*
NGF 干预	7	3.43 $\pm$ 0.79*	16.78 $\pm$ 2.13**

与假手术组比较：* $P < 0.05$ ；与模型组比较：# $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs sham operation group; # $P < 0.05$ vs model group

NGF 干预组大鼠悬吊时间明显长于模型组，扭头时间要短于模型组 ($P < 0.05$)，见表 2。

2.3 NGF 干预前后对缺氧缺血性脑损伤大鼠定位航行能力的影响

造模完成后，模型组和 NGF 干预组大鼠的平台潜伏期和游泳距离均显著延长；干预完成后，NGF 干预组大鼠平台潜伏期和游泳距离均小于模型组，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)，见表 3。

2.4 NGF 干预前后对缺氧缺血性脑损伤大鼠学习记忆能力的影响

造模完成后，模型组和 NGF 干预组大鼠的学习找平台次数均显著增多；干预完成后，NGF 干预组大鼠学习找平台次数小于模型组，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)，见表 4。

表 2 各组干预前后大鼠悬吊时间及扭头时间比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison on suspension test and slope test among all groups before and after intervention ($\bar{x} \pm s$)

组别	n/只	悬吊时间/min		扭头时间/s	
		造模后	干预后	造模后	干预后
假手术	10	3.29 $\pm$ 0.25	4.53 $\pm$ 0.31	3.26 $\pm$ 0.18	3.79 $\pm$ 0.16
模型	8	0.58 $\pm$ 0.12*	1.31 $\pm$ 0.17*	9.89 $\pm$ 0.37*	10.13 $\pm$ 0.43*
NGF 干预	7	0.54 $\pm$ 0.09*	3.68 $\pm$ 0.23**	9.74 $\pm$ 0.29*	6.17 $\pm$ 0.31**

与假手术组比较：* $P < 0.05$ ；与模型组比较：# $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs sham operation group; # $P < 0.05$ vs model group

表 3 各组干预前后大鼠定位航行能力比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of place navigation ability among all groups before and after intervention ($\bar{x} \pm s$)

组别	n/只	平台潜伏时间/s		游泳距离/m	
		造模后	干预后	造模后	干预后
假手术	10	53.24 $\pm$ 10.57	50.53 $\pm$ 9.58	6.21 $\pm$ 0.56	6.09 $\pm$ 0.60
模型	8	125.63 $\pm$ 15.28*	131.21 $\pm$ 18.42*	10.28 $\pm$ 0.93*	9.12 $\pm$ 0.91*
NGF 干预	7	120.54 $\pm$ 13.92*	63.18 $\pm$ 10.34**	10.37 $\pm$ 0.87*	7.24 $\pm$ 0.73**

与假手术组比较：* $P < 0.05$ ；与模型组比较：# $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs sham operation group; # $P < 0.05$ vs model group

表 4 各组大鼠学习找平台时间比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Comparison on the time of rats finding out platform among all groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n/只	学习找平台次数	
		造模后	干预后
假手术	10	4.02 ± 0.12	3.71 ± 0.11
模型	8	7.18 ± 0.40*	7.44 ± 0.37*
NGF 干预	7	7.23 ± 0.39*	5.29 ± 0.28*#

与假手术组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs sham operation group; # $P < 0.05$ vs model group

2.5 NGF 干预前后对缺氧缺血性脑损伤大鼠海马组织神经元病理变化的影响

HE 染色结果显示: 与假手术组相比, 模型组大鼠神经元胞质出现明显疏松, 空泡发生变性, 细胞核染色加深, 同时胞质染色不均匀, 结构模糊或者消失; NGF 干预后大鼠神经元形态及结构比较清晰, 细胞变性坏死情况明显改善, 核固缩明显减少, 见图 1。

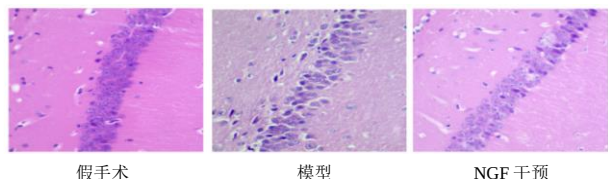


图 1 海马神经组织神经元组织 HE 染色结果 (×400)

Fig. 1 HE staining results of neuron tissues in hippocampal nerve tissue in each group (×400)

3 讨论

缺氧缺血性脑损伤是围生期中枢神经系统受损而导致的一种非进行性损伤综合征, 协调控制能力、平衡能力、姿势、肌张力和步态等表现不能达到正常水平是其主要的临床表现^[11]。有研究发现, 将早期缺氧缺血性脑损伤患儿暴露在丰富的外周环境下, 并充分的给予多种感觉刺激, 能够让皮质运动和视觉树突长度及密度提高, 并且还能够改善脑组织微循环情况进而有效的改善患儿的临床症状^[12]。研究认为早产/极低出生体质量、新生儿窒息、宫内感染及遗传因素是导致脑瘫的四大病因^[13], 而目前国内外已有大量构建缺氧缺血性脑损伤模型的方式, 其中啮齿类缺氧缺血性脑损伤模型因其易操作性和稳定性得到了广泛的认可^[14]。本研究通过左侧颈总动脉结扎联合低氧环境处理来构建了缺氧缺血性脑损伤大鼠模型, 结果显示大鼠均出现明显的稳定性差、反应迟钝、四肢自主活动减少的情

况发生, 可用于后续药物干预实验的进行。

NGF 是目前研究最为透彻的一类神经营养因子, 虽然其命名为生长因子, 但不是直接通过促进神经元细胞或前体细胞有丝分裂来促进神经细胞生长, 而是通过调控中枢神经细胞基底前脑胆碱能神经元发育、分化并保护神经损伤发挥作用^[15-16]。BBB 评分是国内外学者用于评定中枢神经系统损伤大鼠后肢运动功能的常用方式, 具有多实验室通用和误差小的特点, 能够对实验动物后肢各关节活动, 后肢的持重及协调功能, 运动过程中步态、尾的位置及爪的精细动作 3 部分进行评定^[17]。本研究结果发现, 对脑性瘫痪大鼠模型进行左侧脑室 NGF 注射干预后, 能够明显的提高大鼠的 BBB 评分, 表明 NGF 能够有效的改善脑性瘫痪大鼠后肢的运动能力, 可能是因为脑缺血缺氧会引起神经元损伤, 而 NGF 能够通过促进抗氧化相关蛋白及基因表达升高降低脑组织损伤^[18]。悬吊实验和斜坡实验也是一种较为常用的神经行为学检查方式, 前者通过定量的评分来反映出实验动物上肢和躯干的运动功能, 后者则主要反映实验动物的躯体运动能力。本研究结果显示, NGF 干预后能够有效提高脑性瘫痪大鼠的悬吊时间并缩短斜坡试验的扭头时间, 表明 NGF 改善了大鼠的躯体运动能力。水迷宫实验是用于大鼠大脑学习记忆能力的经典行为学检测方式, 在多种神经学科中应用广泛。本研究结果发现, NGF 干预后大鼠平台潜伏时间及游泳距离明显缩短, 找平台学习时间也显著缩短, 表明 NGF 改善了大鼠空间探索及学习记忆功能。脑组织的海马区是调控学习记忆能力的主要结构, 研究证实, 哺乳动物的海马区对于缺血缺氧的损伤非常敏感^[19], 本研究通过对各组大鼠脑组织病理观察发现, 脑瘫大鼠的海马区神经元胞质出现明显疏松, 空泡发生变性, 细胞核染色加深, 同时胞质染色不均匀, 而 NGF 干预后大鼠海马区神经元损伤情况明显减轻, 进一步证实了 NGF 可能是通过改善脑组织处的氧化损伤, 来改善大鼠的学习记忆功能。Zhang 等^[20]研究表明, 通过对亨廷顿舞蹈病小鼠脑室内注射 NGF 能够恢复海马神经发生并改善空间工作记忆, 与本研究结果一致。

综上所述, NGF 作为一种神经营养因子, 能够有效改善脑缺氧缺血性损伤大鼠的神经运动能力及学习记忆功能, 并且可能是通过改善脑组织的氧化应激损伤来完成的。本研究初步证实了 NGF 具

有治疗脑缺氧缺血性损伤的潜在应用潜力,但对于 NGF 的作用尚未清楚还需要继续深入研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Bashir R A, Vayaltrikkovil S, Espinoza L, et al. Prevalence and characteristics of intracranial hemorrhages in neonates with hypoxic ischemic encephalopathy [J]. *Am J Perinatol*, 2018, 35(7): 676-681.
- [2] 杨璐颖, 王灵芝, 陈 棉. 新生儿缺血缺氧性脑病 D-二聚体和脂蛋白 a 水平及其与病情严重程度和脑损伤的关系 [J]. *重庆医学*, 2020, 49(12): 1969-1972.
- [3] 叶 菁, 魏佳娜, 李云妹, 等. 芒果苷对脑性瘫痪模型大鼠神经运动功能及皮质区神经细胞凋亡的影响 [J]. *临床和实验医学杂志*, 2018, 17(1): 22-25.
- [4] Rocco M L, Soligo M, Manni L, et al. Nerve growth factor: early studies and recent clinical trials [J]. *Curr Neuroparmacol*, 2018, 16(10): 1455-1465.
- [5] Carleton L A, Chakravarthy R, van der Sloot A M, et al. Generation of rationally-designed nerve growth factor (NGF) variants with receptor specificity [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 495(1): 700-705.
- [6] Xu D, Wu D, Qin M, et al. Efficient delivery of nerve growth factors to the central nervous system for neural regeneration [J]. *Adv Mater*, 2019, 31(33): e1900727.
- [7] 贺媛媛, 栾 佐, 唐久来, 等. 改良型脑性瘫痪大鼠模型的建立与评估 [J]. *中华实用儿科临床杂志*, 2013, 28(4): 304-307.
- [8] Engesser-Cesar C, Anderson A J, Basso D M, et al. Voluntary wheel running improves recovery from a moderate spinal cord injury [J]. *J Neurotrauma*, 2005, 22(1): 157-171.
- [9] 陈光福, 张蕴芳, 龙 琦, 等. 丰富环境干预促进缺氧缺血性脑损伤新生大鼠神经元细胞增殖和功能修复 [J]. *中国当代儿科杂志*, 2012, 14(2): 139-143.
- [10] 罗 义, 王 林, 焦 勤, 等. Morris 水迷宫指导大鼠痉挛性脑瘫模型构建与评价的实验研究 [J]. *西部医学*, 2017, 29(6): 749-752.
- [11] 唐红梅, 刘力茹, 徐开寿. 强制性运动疗法在偏瘫型脑性瘫痪中的应用及机制研究进展 [J]. *中国康复医学杂志*, 2018, 33(10): 1250-1253.
- [12] Marques M R, Stigger F, Segabinazi E, et al. Beneficial effects of early environmental enrichment on motor development and spinal cord plasticity in a rat model of cerebral palsy [J]. *Behav Brain Res*, 2014, 263: 149-157.
- [13] Yuan J Y, Wang J, Ma J Q, et al. Paediatric cerebral palsy prevalence and high-risk factors in Henan Province, Central China [J]. *J Rehabil Med*, 2019, 51(1): 47-53.
- [14] 秦 明, 朱 虹, 魏云艳, 等. 脑瘫模型的制作与鉴定 [J]. *中国妇幼保健*, 2014, 29(26): 4328-4330.
- [15] 孙向峰, 侯 梅, 苑爱云, 等. 丰富环境对缺氧缺血性脑损伤新生大鼠学习记忆、海马区脑源性神经生长因子和突触素蛋白表达的影响 [J]. *中华实用儿科临床杂志*, 2017, 32(4): 296-299.
- [16] 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.
- [17] 李晓捷, 郭岚敏. 神经行为学检测和改良 BBB 运动功能评定在脑瘫大鼠运动功能评定中的应用 [J]. *中国康复医学杂志*, 2008, 23(12): 1067-1070.
- [18] Wei L X, Ren Q, Zhang Y J, et al. Effects of hyperbaric oxygen and nerve growth factor on the long-term neural behavior of neonatal rats with hypoxic ischemic brain damage [J]. *Acta Cir Bras*, 2017, 32(4): 270-279.
- [19] Buzsáki G, Moser E I. Memory, navigation and theta rhythm in the hippocampal-entorhinal system [J]. *Nat Neurosci*, 2013, 16(2): 130-138.
- [20] Zhang H Y, Petit G H, Gaughwin P M, et al. NGF rescues hippocampal cholinergic neuronal markers, restores neurogenesis, and improves the spatial working memory in a mouse model of Huntington's Disease [J]. *J Huntingtons Dis*, 2013, 2(1): 69-82.

[责任编辑 高 源]