

· 论 著 ·

依达拉奉对血管性痴呆大鼠认知功能损害的保护作用

全凤英, 谭家泽, 王咏龙

(重庆医科大学附属第一医院神经内科 400016)

摘要:目的 观察依达拉奉对血管性痴呆大鼠认知功能损伤的保护作用。方法 将 10 周龄 Wistar 大鼠 48 只随机分为正常组(N 组, 6 只)、假手术组(S 组, 6 只)、痴呆模型组(M 组 18 只)、依达拉奉治疗组(MT 组, 18 只), 然后再将 M 和 MT 组随机分成缺血 2、4、8 周组, 每组 6 只。在完成穿梭箱、水迷宫实验测试后, 断头取脑, 分别检测脑组织和血清中超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化脂质(LPO)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)和丙二醛(MDA)的变化。结果 M、MT 组大鼠的学习和记忆潜伏期、主动逃避次数与 S、N 组大鼠比较差异有统计学意义($P < 0.01$); MT 组大鼠的学习和记忆潜伏时间显著缩短, 主动逃避次数显著增多, 与 M 组间差异有统计学意义($P < 0.01$); M 组大鼠前后 2 次跳台实验结果比较差异无统计学意义。生化检测发现 MT 组 MDA、LPO 表达较 M 组降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$), MT 组 SOD、GSH-PX 表达较 M 组增高, 差异有统计学意义($P < 0.05$); MT 组 SOD、MDA、GSH-PX、LPO 表达较 N、S 组增高, 差异有统计学意义($P < 0.05$); M 组 SOD、MDA、GSH-PX、LPO 表达较 N、S 组增高, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。结论 依达拉奉能降低血管性痴呆大鼠脑组织和血清中 MDA、LPO 水平, 增强 SOD、GSH-PX 表达, 提示依达拉奉可能通过清除血管性痴呆大鼠自由基、抑制氧化应激效应发挥脑保护作用。

关键词:血管性痴呆; 依达拉奉; 自由基

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2010.21.017

中图分类号: R749.13; R749.5

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2010)21-2892-03

Edaravone enhances clearance of free radicals in vascular dementia rats and improves behavioral deficits

QUAN Feng-ying, TAN Jia-ze, WANG Yong-long

(Department of Neurology, First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To investigate the edaravone influences on behaviour and expression of superoxide dismutase(SOD), malondialdehyde(MDA), glutathione peroxidase(GSH-PX), lipid peroxidation(LPO), for in vascular dementia brain. **Methods** Wistar rats were randomly divided into: normal group(N), sham group(S), vascular dementia model group(M) and edaravone treatment groups(MT). Serum level and brain tissue expression of SOD, MDA, GSH-PX, LPO was measured by biochemistry. **Results** The memory and learn latent phase, activeavoidance response of M and MT group was statistics difference when compared with S and N group($P < 0.01$). The difference also existed in M and MT group($P < 0.01$). MT had shorten latent phase and more activeavoidance response. The results of M group HAD statistic difference before and after step down test. The serum level and expression of MDA, GSH-PX, LPO in MT group were lower than those in M group($P < 0.05$), the serum level and expression of SOD in MT group were higher than those in M group($P < 0.05$); the serum level and expression of SOD, MDA, GSH-PX, LPO in MT and M groups were higher than those in N, S groups($P < 0.01$). **Conclusion** Edaravone can restrain the expression of MDA and LPO, and increase the expression of SOD and GSH-PX in vascular dementia. Edaravone can enhance clearance of free radicals to protect neural function by restraining oxidative stress.

Key words: vascular dementia; edaravone; free radicals

依达拉奉是一种新型自由基清除剂, 具有神经保护作用^[1-4]。为了解依达拉奉对脑缺血的保护作用, 作者通过建立大鼠脑缺血血管性痴呆模型, 检测了依达拉奉对超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、丙二醛(matondialdehyde, MDA)、过氧化脂质(lipid peroxidation, LPO)和谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-PX)表达的影响, 探讨了依达拉奉对血管性痴呆脑的保护作用。

1 材料与与方法

1.1 材料 10 周龄 Wistar 大鼠 48 只(雌性, 体质量 200~250 mg, 第三军医大学野战医院动物研究所提供, 动物中心许可证号: 渝实动设施准第 260 号), 依达拉奉(每支 10 mg): 中国上海先声制药有限公司产品; SOD、LPO、GSH-PX 和 MDA 检测试剂盒购自福建迈新生物科技有限公司和北京博奥森生物科技有限公司; 大鼠跳台和大鼠穿梭箱程序自动控制仪均由重庆市神经病学重点实验室提供。

1.2 实验方法

1.2.1 血管性痴呆动物模型制备 (1)分组: 按随机原则分为 8 组: 正常组(N 组, 6 只, 等量生理盐水灌胃)、假手术组(S 组, 6 只, 只分离颈总动脉处理, 不对颈总动脉结扎处理, 等量生理盐水灌胃)、痴呆模型组(M 组, 18 只, 双侧颈总动脉结扎建立慢性脑缺血模型, 等量生理盐水灌胃, 完成后再随机分成 2、4、8 周组)、依达拉奉治疗组(MT 组, 18 只, 分为 2、4、8 周 3 组, 在 M 组基础上予以 3 mg/kg 依达拉奉静脉注射)。(2)痴呆模型制备: 按照文献[5-6]制作痴呆模型, 用 3.5%水合氯醛, 按 1 mL/100 g 体质量将大鼠腹腔麻醉后, 仰卧固定, 颈正中切口, 分离双侧颈总动脉, 行双侧颈总动脉永久结扎术, 术中大鼠体温保持在 36.5 °C。N 组大鼠除不结扎双侧颈总动脉外, 其余处理同模型组大鼠。各模型组于行双侧颈总动脉结扎术后的不同时间点断头取脑, 其中脑缺血 2、4、8 周组在进行学习记忆功能测试后断头取脑。

1.2.2 依达拉奉的给药方法 将依达拉奉用生理盐水稀释成 0.5 mg/mL,参照 Amemiya 等^[2]和 Wen 等^[7]的方法,在 MT 组缺血后给予依达拉奉 3 mg/kg,每日 2 次尾静脉注射。

1.2.3 行为学检测 制模成功以后,N、S、M 组分别进行行为学检测,MT 组在用药后开始进行检测。

1.2.3.1 穿梭箱实验 穿梭箱底部铺以不锈钢电栅,大小为 60 cm×16 cm×25 cm,箱顶部装有蜂鸣器。训练时,将大鼠放在箱内任一侧,20 s 后出现蜂鸣音,持续 15 s,蜂鸣 5 s 后由底部电栅给以电刺激(电流强度 1.5 mA),大鼠受到电刺激后逃到另一端,电击蜂鸣自动停止。记录动物在单独蜂鸣期间逃避的时间(主动逃避时间)和遭受电刺激的时间以及电击的次数。全部动物每天测试 1 次,每次 20 个循环,全程训练。

1.2.3.2 水迷宫实验 (1)定位航行实验用于测量大鼠获取经验(学习)的能力。实验前 1 d 下午将大鼠放入水中自由游泳 2 min,观察其游泳姿势并使其熟悉实验环境。完成后开始进行实验:每天上、下午 2 个时间段,每个时间段训练 4 次,每次训练随机选择一个入水点,将大鼠面向池壁放入水池,同一次训练所有大鼠入水点相同。记录大鼠找到平台的时间(学习潜伏期),连续 4 d。(2)空间探索实验:观测其在 120 s 内在各象限的游泳距离及其占总距离的百分比,以及 120 s 内穿越各象限平台相应位置(即平台在 D 象限所在的位置)的次数。记录大鼠找到平台的时间(学习潜伏期)和在 120 s 内穿越各象限平台相应位置的次数(记忆潜伏期),评价大鼠学习、记忆功能。

1.2.4 SOD、MDA、GSH-PX、LPO 检测 用水合氯醛麻醉大鼠,打开胸腔,右心室内取血,分离血清保存,待检备用。取血后立即经升主动脉快速灌注生理盐水,直至右心房流出液清亮为止。然后,断头取新鲜脑组织,制成匀浆,提取上清液。按检测说明书进行检测。

1.3 统计学方法 全部数据采用 SPSS11.0 统计软件进行统计学处理,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,同一组内不同时间点的比较采用方差分析,两组之间同一时间点的比较采用 *t* 检验,以 $P <$

0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 水迷宫、穿梭箱实验结果 M、MT 组大鼠的电击次数、潜伏期和主动逃避次数与 S、N 组大鼠比较差异有统计学意义($P < 0.01$),MT 组大鼠的电击次数、学习和记忆潜伏期时间显著缩短,主动逃避次数显著增多;与 M 组大鼠比较差异有统计学意义($P < 0.01$),M 组大鼠前、后 2 次跳台实验结果比较差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 1。提示模型组大鼠有明显的学习、记忆、行为障碍,依达拉奉治疗组血管性认知功能损伤大鼠的学习、记忆、行为功能明显改善。

表 1 实验和对照组水迷宫、穿梭箱实验结果($\bar{x} \pm s$)

分组	电击次数 (次/min)	主动逃避次数 (次/min)	学习潜伏时间 (次/s)	记忆潜伏时间 (次/s)
N 组	54.2±7.5	82.5±7.4	64.5±6.6	58.8±5.7
S 组	56.2±7.9	80.5±8.6	66.5±9.9	60.8±8.7
M 组	92.4±9.5	56.7±8.4	172.2±8.5	156.4±8.2
MT 组	72.3±7.6 ^a	68.1±8.3 ^a	144.3±8.6 ^a	121.6±8.4 ^a

^a:与 N、S 组比较, $P < 0.01$ 。

2.2 SOD 检测 与同时点 M 组比较,MT 组脑组织和血清中 SOD 明显增高($P < 0.05$);M 组、MT 组与 S 组比较,SOD 明显增高($P < 0.01$),见表 2。

2.3 MDA 检测 M 组、MT 组与 S 组比较 MDA 差异有统计学意义($P < 0.01$);MT 组与 M 组比较,MDA 明显降低($P < 0.01$),见表 3。

2.4 GSH-PX 检测 M 组、MT 组与 S 组比较,GSH-PX 明显增高($P < 0.01$);与同时点 M 组比较,MT 组脑组织和血清中的 GSH-PX 水平明显增高($P < 0.05$),见表 4。

2.5 LPO 检测 M 组、MT 组与 S 组比较,LPO 明显增高($P < 0.01$);MT 组与 M 组比较,LPO 明显降低($P < 0.01$),见表 5。

表 2 各组大鼠 SOD 检测结果($\bar{x} \pm s, U/mL$)

组别	脑组织			血清		
	2 周	4 周	6 周	2 周	4 周	6 周
N 组	72.4±4.1	72.1±5.3	72.3±3.2	86.0±5.7	86.6±4.8	85.8±4.2
S 组	72.9±2.4	73.0±2.8	73.6±8.6	86.3±3.6	85.6±4.4	85.3±5.7
MT 组	96.3±5.3 ^a	94.7±4.9 ^a	97.3±4.4 ^a	100.6±5.8 ^a	100.3±5.4 ^a	101.4±5.4 ^a
M 组	82.2±5.2	81.8±7.3	81.3±5.1	94.3±5.2	93.6±5.1	93.0±7.8

^a:与 N、S 组比较, $P < 0.01$ 。

表 3 各组大鼠 MDA 检测结果($\bar{x} \pm s, nmol/mL$)

组别	脑组织			血清		
	2 周	4 周	6 周	2 周	4 周	6 周
N 组	2.6±0.4	2.4±0.4	2.2±0.1	3.8±0.2	3.6±0.3	3.5±0.8
S 组	2.9±0.4	3.0±0.8	3.6±0.6	3.4±0.6	3.6±0.7	3.7±0.7
MT 组	4.3±0.1 ^a	4.7±0.1 ^a	4.3±0.4 ^a	5.6±0.6 ^a	5.3±0.4 ^a	5.3±0.4 ^a
M 组	5.2±0.7	5.8±0.3	5.3±0.9	6.3±0.4	6.6±0.8	6.7±0.6

^a:与 N、S 组比较, $P < 0.01$ 。

表 4 各组大鼠 GSH-PX 检测结果($\bar{x}\pm s, U/mL$)

组别	脑组织			血清		
	2 周	4 周	6 周	2 周	4 周	6 周
N 组	42.4±4.1	42.1±3.3	42.3±6.3	52.0±5.3	58.1±3.8	56.3±3.2
S 组	46.9±5.4	46.3±2.8	48.6±6.6	61.7±5.6	60.5±5.7	60.3±5.5
MT 组	205.3±5.5 ^a	204.5±5.1 ^a	205.5±5.4 ^a	235.6±5.6 ^a	225.5±5.5 ^a	225.3±4.4 ^a
M 组	124.2±2.7	124.8±4.3	121.4±4.9	163.3±3.4	164.6±3.4	163.3±5.1

^a: 与 N、S 组比较, $P<0.01$ 。

表 5 各组大鼠 LPO 检测结果($\bar{x}\pm s, \mu g/L$)

组别	脑组织			血清		
	2 周	4 周	6 周	2 周	4 周	6 周
N 组	13.4±4.1	13.1±3.3	13.3±6.3	19.0±5.3	19.1±3.8	18.3±3.2
S 组	15.9±5.4	15.3±2.8	15.6±6.6	21.7±5.6	20.5±5.7	19.3±4.5
MT 组	21.3±5.5 ^a	21.5±5.1 ^a	21.5±5.4 ^a	24.6±5.6 ^a	24.5±5.5 ^a	23.3±5.4 ^a
M 组	24.2±2.7	23.8±4.3 ^a	23.4±4.9	28.3±3.4	27.6±3.4	27.3±5.1

^a: 与 N、S 组比较, $P<0.01$ 。

3 讨 论

自由基是缺血性脑组织损伤的主要因子。近年来的研究表明自由基对脑组织的损伤与脑组织缺血缺氧程度及再灌注密切相关。一般认为,在完全性缺血缺氧时这种损伤程度较轻,在缺血再灌注时,由于自由基的急剧增多损伤更加严重^[8-14]。

自由基是生物体产生且有自身伤害作用的毒性产物,可引起脂质过氧化反应产生 LPO^[10],其中以 MDA 毒性作用最大。MDA 含量反应机体脂质过氧化的速率及强度,可间接反应组织受自由基损伤的程度;SOD 是歧化超氧阴离子的专一性酶,是一种重要的氧自由基清除剂,可以保护生物体免受自由基的攻击,其活性高低可反应体内抗自由基水平。SOD 和 MDA 可间接反应自由基代谢水平^[11]。增强自由基清除能力如增加 SOD 浓度可起到神经保护作用。

GSH-PX 是生物体内重要的抗氧化酶,它以硒代半胱氨酸(Sec)的形式,以谷胱甘肽(GSH)为还原剂分解体内的脂质过氧化物,防止细胞膜和其他生物组织免受过氧化损伤。它与体内的 SOD 和过氧化氢酶(CAT)一起构成了机体的抗氧化防御体系^[12]。药理实验表明,依达拉奉可抑制氧自由基的生成,是一种有效的氧自由基清除剂。

本实验通过对血管性痴呆大鼠行为学观察,发现依达拉奉能改善血管性痴呆大鼠的记忆、学习和行为能力,M 组大鼠的电击次数、潜伏期和主动逃避时间与 S、N 组有差异,MT 与 S、N 组大鼠前后两次水迷宫实验结果比较差异也有显著性;MT 组大鼠的前后两次水迷宫实验结果比较差异有显著性,而 MT 组的症状较 M 组明显改善,这些行为学改变表明依达拉奉有脑保护作用。

本实验还发现慢性脑缺血大鼠脑组织和血清中 SOD、MDA、GSH-PX、LPO 含量升高。与同时点 M 组比较,MT 组 SOD 和 GSH-PX 活性有不同程度升高,MDA、LPO 含量下降,表明依达拉奉能增强 GSH-PX、SOD 的生物活性,降低血管性痴呆大鼠脑组织和血清中 MDA 含量,提示该药可提高血管性痴呆大鼠抗氧化能力和清除自由基能力,抑制脂质过氧化反

应,改善自由基代谢。

依达拉奉的耐受性好,安全性高,目前临床上已开始应用于各种缺血性脑血管病,本实验结果支持其有清除血管性痴呆大鼠自由基、改善痴呆的作用,对于血管性痴呆可能是一种潜在的有效保护剂。但由于本实验观察时间短,对依达拉奉增高血清 SOD、GSH-PX 水平和降低 MDA、LPO 水平的机制也没有进行充分研究,因此,尚需进一步扩大样本量进行广泛验证。

参 考 文 献:

- [1] Niiya Y, Abumiya T, Shichinohe H, et al. Susceptibility of brain microvascular endothelial cells to advanced glycation end products-induced tissue factor upregulation is associated with intracellular reactive oxygen species[J]. Brain Res, 2006, 1108(1): 179.
- [2] Amemiya S, Kamiya T, Nito C, et al. Anti-apoptotic and neuroprotective effects of edaravone following transient focal ischemia in rats[J]. Eur J Pharmacol, 2005, 516(2): 125.
- [3] Kitagawa Y. Edaravone in acute ischemic stroke[J]. Intern Med, 2006, 45: 225.
- [4] Uno M, Kitazato KT, Suzue A, et al. Inhibition of brain damage by edaravone, a free radical scavenger, can be monitored by plasma biomarkers that detect oxidative and astrocyte damage in patients with acute cerebral infarction[J]. Free Radic Biol Med, 2005, 39: 1109.
- [5] Tayebati SK. Animal models of cognitive dysfunction[J]. Mech Ageing Dev, 2006, 127: 100.
- [6] Sarti C, Pantoni L, Bartolini L, et al. Cognitive impairment and chronic cerebral hypoperfusion: what can be learned from experimental models[J]. J Neurol Sci, 2002, 203-204: 263.
- [7] Wen J, Watanabe K, Ma M, et al. Edaravone inhibits JNK-c-Jun pathway and restores anti-oxidative (下转第 2916 页)

3 讨 论

最佳的泳疗环境应该包括婴儿的主动运动、本体觉、平衡觉和皮肤感觉等多感官刺激^[3]。作者创设的泳疗环境基本能满足以上需要。在水中婴儿运动流畅,加上水的浮力使四肢关节和脊椎舒展和活动自如,促进了原始反射的消失、条件反射的形成,及大肌肉运动功能的发展;同时水的涡流与湍流刺激本体觉和平衡觉感受器,促进了婴儿前庭器官及肌梭功能的发展^[4];水温与水压以及气泡破裂的抚触对皮肤全面的刺激,能较好地促进各种皮肤感受器的功能发育^[5-6]。

作者采用的 Gesell 发育量表涵盖了动作与智能发育两个方面,包括动作能、应人能、应物能、言语能 4 个能区,是评估婴幼儿体智能发育水平较客观的工具,用于比较泳疗环境对婴幼儿体智能发展的影响是恰当的。本组资料显示,泳疗组婴儿 Gesell 发育指数与对照组比较动作能、应人能增高显著,差异有统计学意义,再次表明适宜的泳疗环境对婴幼儿体智能发展的促进作用,而且对运动能力和社会交往能力的促进似乎较为明显,这是一个值得研究的问题。

有学者研究证实,对于皮肤温度、触觉刺激能增加迷走神经的紧张性,从而增加胃泌素和胰岛素等水平增高,使吸收食物的能力增强,奶量摄入增加,体质量随之上升^[7-8]。本组资料显示,泳疗组体质量增长稍快于对照组,但差异无统计学意义($P>0.05$),考虑泳疗虽通过对皮肤刺激促进了食物的吸收,但泳疗的锻炼使热能消耗增大,以致泳疗组婴儿体质量增长与普通婴儿无明显差异。这一结果提示,用沐浴方法降低肥胖小儿体质量,可取得较好的效果。

但是,在泳疗运用过程中仍然存在尚多问题或争议。婴儿期是生长发育的关键时期,泳疗作为一种主动运动无疑可使其全身血流加速、增加氧耗等,但由于婴儿对周围环境的适应性等,如无法进行良好的量效控制,可能会造成负面影,如导致婴儿体力消耗与体质量不增、睡眠剥夺、过度刺激、脑供血不足问题等^[10];此外,操作人员的专业程度也可影响泳疗质量^[11]。人员疏忽、不熟练所导致的呛水、耳朵进水、淹溺问题^[12]、不适

当颈圈应用导致颈椎脱臼等也倍受争议。作者认为如果进行规范化的岗前培训,严格按照标准操作,控制好各项因素,这些问题是可以避免的。

参考文献:

- [1] 毕永霞. 婴儿泳疗的发展[J]. 中国误诊学杂志, 2008, 8(29):7074.
- [2] 郭颖艳, 张爱华. 新生儿游泳对睡眠及体质量的影响[J]. 中国误诊学杂志, 2010, 10(5):1041.
- [3] 何孟贤. 对新生儿、婴儿游泳的探讨[J]. 科技资讯, 2008(14):167.
- [4] 高丽娟, 王桂香. 泳疗与早期教育对婴儿神经、心理发育效果的观察[J]. 中国妇幼保健, 2007, 22(4):165.
- [5] 黄雪梅. 游泳与抚触对新生儿睡眠的影响[J]. 广西医学, 2009, 31(10):1504.
- [6] 苏海珠. 新生儿游泳操加抚触对足月小样儿早期生长发育的临床观察[J]. 广西医学, 2008, 30(3):366.
- [7] 夏宇, 赵聪敏, 奚敏. 泡泡浴对婴儿体智能发育的促进作用[J]. 中国临床康复, 2006, 10(38):152.
- [8] 钱向明, 任静, 徐丽. 水疗促进婴儿体重增长的临床观察[J]. 实用医院临床杂志, 2006, 3(1):68.
- [9] 邵立平. 新生儿泳疗对婴儿生长发育影响的临床观察[J]. 中国妇幼保健, 2008, 12(23):1675.
- [10] 郭爱华, 彭文娇, 李琳. 婴儿泳疗致严重虚脱和一过性脑缺氧 1 例分析[J]. 中国误诊学杂志, 2007, 7(16):3826.
- [11] 宋宁. 新生儿游泳 30 例效果观察[J]. 齐鲁护理杂志, 2006, 12(6):1047.
- [12] 周春秀, 杨雪梅. 有关新生儿游泳的若干问题[J]. 中国误诊学杂志, 2009, 9(14):3352.

(收稿日期:2010-05-25)

(上接第 2894 页)

- defense after ischemia-reperfusion injury in aged rats[J]. Biol Pharm Bull, 2006, 29:713.
- [8] Potts MB, Koh SE, Whetstone WD, et al. Traumatic injury to the immature brain: inflammation, oxidative injury, and iron-mediated damage as potential therapeutic targets[J]. Neuro Rx, 2006, 3:143.
 - [9] Flora SJ. Role of free radicals and antioxidants in health and disease[J]. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 2007, 53:1.
 - [10] Zhan XA, Wang M, Xu ZR, et al. Effects of fluoride on hepatic antioxidant system and transcription of Cu/Zn SOD gene in young pigs[J]. J Trace Elem Med Biol, 2006, 20:83.
 - [11] Akturk O, Demirin H, Sutcu R, et al. The effects of diazi-

non on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in rat heart and ameliorating role of vitamin E and vitamin C [J]. Cell Biol Toxicol, 2006, 22:455.

- [12] Armagan A, Uz E, Yilmaz HR, et al. Effects of melatonin on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in streptozotocin-induced diabetic rat testis[J]. Asian J Androl, 2006, 8:595.
- [13] 胡常林. 重症脑梗死的治疗[J]. 重庆医学, 2004, 33(6):1.
- [14] 杨清武, 王景周, 王琳, 等. 急性脑血管病的代谢紊乱特点及相关因素的多元回归分析[J]. 重庆医学, 2004, 33(6) 807.

(收稿日期:2009-12-10 修回日期:2010-04-01)