

丁基苯酞对大鼠额叶损伤后学习记忆的影响

廖艳彪¹, 李江¹, 何骑伟², 汤华³, 胡鹏³, 彭立辉¹

(1.湖南师范大学第二附属医院暨解放军一六三医院神经外科,长沙 410003;

2.湖南师范大学第二附属医院心内科,长沙 410003;3.湖南城市学院,益阳 413049)

【摘要】 目的:研究丁基苯酞对于大鼠额叶损伤后学习记忆功能的影响。**方法:**选用40只雄性SD大鼠随机分成四组:丁基苯酞组、神经节苷脂组、损伤对照组和假手术组。分组后制作大鼠额叶损伤模型和假手术模型,并予以药物和生理盐水腹腔注射。腹腔注射后进行水迷宫检测,并对大鼠额叶皮层进行SOD(超氧化物歧化酶)、MDA(丙二醛)检测,分析丁基苯酞对额叶损伤后大鼠学习记忆功能的影响。**结果:**与损伤对照组比较,丁基苯酞能够提高额叶损伤后大鼠的水迷宫学习记忆成绩,能够提高损伤区的SOD活性,降低MDA含量,抑制AChE活性。**结论:**丁基苯酞能改善大鼠额叶损伤后学习记忆功能,其机制可能与抗氧化和抑制AChE(乙酰胆碱酯酶)活性有关。

【关键词】 额叶损伤;学习记忆功能;丁基苯酞

中图分类号: R395.1

DOI: 10.16128/j.cnki.1005-3611.2015.02.009

The Effects of Butylphthalide on Learning and Memory Function in Frontal Cortex Injury Rats

LIAO Yan-biao¹, LI Jiang¹, HE Qi-wei², TANG Hua³, HU Peng³, PENG Li-hui¹

¹Department of Neurosurgery, The Second Affiliated Hospital of Hunan Normal University, Changsha 410003, China; ²Department of Cardiology, The Second Affiliated Hospital of Hunan Normal University, Changsha 410003, China; ³Hunan City University, Yiyang 410003, China

【Abstract】 Objective: To study the effect of Butylphthalide on learning and memory function of rats after frontal cortex injury. **Methods:** Selection of Clean SD rats were divided into four groups were randomly divided into four groups: butylphthalide group, ganglioside group, damage control group and Sham operation group. After grouping to make rat frontal cortex injury model and sham operation model. And to give drugs and intraperitoneal injection of saline solution. Analysis of the effect of butylphthalide on learning and memory function of rats after frontal cortex injury through the water maze test, superoxida superoxide dismutase(SOD) examination, Malondialdehyde(MDA) examination. **Results:** Butylphthalide can improve the water maze test after frontal cortex injury in rats, can improve the damage zone SOD activity, decreased the content of MDA, inhibiting the activity of AChE. **Conclusion:** Butylphthalide can improve learning and memory function after frontal cortex injury in rats, its mechanism may be related with antioxidation and inhibit the activity of AChE.

【Key words】 Frontal cortex injury; Learning and memory function; Butylphthalide

额叶损伤是临床上常见的颅脑损伤疾病^[1]。额叶损伤患者存在着不同程度的学习记忆功能障碍。不仅额叶损伤患者存在学习记忆功能障碍,动物额叶损伤也可以产生学习记忆功能障碍^[2-5]。额叶损伤后学习记忆功能障碍严重影响患者的生活质量^[6-8],随着脑外伤病人不断增加这一问题显得更加突出^[9,10]。因此,探讨有效改善额叶损伤导致的学习记忆功能障碍的治疗方法显得十分必要。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 健康雄性SD大鼠40只,体重180~220 g。购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,动物许可证号SCK(湘)2013-0004,动物批号NO43004700005597。在动物实验室喂养,自由进

食,室温控制在24℃,自然光照,在实验前适应喂养一周。实验动物随机分成四组:丁基苯酞组10只、神经节苷脂组10只、损伤对照组10只和假手术组10只。

1.1.2 主要药物、试剂和仪器 丁基苯酞注射液:石药集团恩必普药业有限公司,生产批号618140103;神经节苷脂注射液:吉林英联生物制药股份有限公司,生产批号20131201。AChE、MDA、SOD试剂盒:南京建成生物工程研究所。Morris水迷宫系统:淮北正华生物仪器设备有限公司;可见光光度计:上海佑科仪器仪表有限公司。

1.2 方法

1.2.1 动物模型制备 根据吴佐泉、何志贤等^[11,12]人研究制作大鼠额叶损伤动物模型。实验大鼠麻醉消毒后,冠状位切开头皮。以冠状缝前1.0mm,矢状缝旁开2.0mm为中心,在颅骨左右各钻1个直径4.0mm圆孔,用机械抽吸法吸去孔内皮质,制成额叶

【基金项目】 湖南省2014年教育厅一般科研项目(14C0704)

通讯作者:彭立辉,plhprt@163.com

损伤动物模型。丁基苯酞组、神经节苷脂组、损伤对照组制作成额叶损伤模型。假手术组仅在额叶钻孔,不切割脑组织。

1.2.2 造模后实验干预 各组动物于造模完成后第1天开始连续腹腔注射14天。丁基苯酞组与神经节苷脂组分别予以5.1mg/kg和3.75mg/kg溶于4mL生理盐水腹腔注射,每日一次。损伤对照组和假手术组每日给予同等剂量4mL生理盐水腹腔注射,每日一次。

1.3 检测指标

1.3.1 学习记忆功能检测 本研究中大鼠学习记忆能力的检测采用Morris水迷宫(Morris water maze)检测,Morris水迷宫实验是目前国内外研究中广泛应用的检测学习记忆能最精确、最客观的一种方法^[13]。本实验采用的水迷宫系统为底色为黑色的圆形水池,直径为150cm,高60cm,将水池等分成4个象限,第三象限为目标象限,中央放置直径10cm,高23.5cm的一个圆形隐藏平台,实验期间保持其位置不变;水池中水面高于平台1.5cm。水温(21±2)℃;实验期间迷宫周围的参照物不变,迷宫上方摄像机同步记录大鼠的运动轨迹,并通过水迷宫系统自动分析结果。

定位航行:实验各组均进行Morris水迷宫定位航行实验检测。定位航行实验历时5天。每天10、15时两个训练时间段,每段训练4次,最大潜伏期时限取值为90秒。训练时随机从四个不同象限为入水点,将大鼠头部面向池壁放入水中,如果大鼠在90秒内未找到平台,将其引至平台,停留10秒左右。每次训练间隔约60秒。记录第4~6天其在90秒内寻找到并爬上平台的时间,即潜伏期(如果大鼠在90秒内未找到平台,则潜伏期记录为90秒)。

空间探索实验:定航实验结束第1天,撤除平台。然后以第一象限为入水点将大鼠放入水中记录90秒内的游泳路径,记录大鼠在第三象限路径比和穿越原来平台所在的次数。

水迷宫实验分别于连续腹腔注射后进行2次测试。

1.3.2 大脑皮层损伤区SOD,MDA,TchE检测 第2次水迷宫实验结束后,将大鼠麻醉后,取大鼠额叶损伤区皮层组织,按重量(g):体积(ml)=1:9的比例,匀浆离心后,制成10%待测样本,取上清液测量MDA、TchE、SOD。实验严格按照试剂盒中步骤和实验条件进行测量。

1.4 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS20.0软件进行统计学分析,数据多组间比较时先进行方差齐性检验,具有方差齐性的多组间数据比较采用随机区组设计方差分析(univariate two-way ANOVER),否则选用非参数检验,两两比较采用LSD-*t*检验, $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结 果

2.1 大鼠学习、记忆能力结果

定航实验中腹腔注射后第5d、6d、7d、12d、13d、14d,丁基苯酞组、神经节苷脂组与损伤对照组比较,潜伏期有差异($P < 0.05$),注射第12d、14d丁基苯酞组与神经节苷脂组有差异($P < 0.05$)。见表1。

空间探索实验中腹腔注射后第7d、14d,丁基苯酞组、神经节苷脂组与损伤对照组比较,平台路径所在比值和穿越平台次数均有统计学差异($P < 0.05$),第14d丁基苯酞组与神经节苷脂组相比,平台路径所在象限比值有统计学差异($P < 0.05$)。见表2。

表1 丁基苯酞对大鼠额叶损伤后的定航实验潜伏期的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	腹腔注射后					
	5d	6d	7d	12d	13d	14d
丁基苯酞组	39.53±8.20	30.49±7.31	26.84±3.37	34.47±10.35	29.65±10.37	20.32±4.05
神经节苷脂	40.03±8.46	32.49±5.75	26.73±2.64	39.49±7.40*	28.48±5.80	23.45±6.3*
损伤对照组	41.52±5.58* [△]	35.55±7.75* [△]	30.53±6.79* [△]	43.80±9.31* [△]	38.77±5.98* [△]	36.77±4.95* [△]
假手术组	35.14±7.89*	25.10±3.89*	20.80±4.93* [△]	29.47±8.63* [△]	24.83±7.27* [△]	15.82±5.23* [△]

注:*代表与丁基苯酞组比较,△代表与神经节苷脂组比较 $P < 0.05$,下同。

表2 丁基苯酞对大鼠额叶损伤后的空间探索实验的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	平台路径所在比值		穿越平台次数	
	腹腔注射第7天	腹腔注射14天	腹腔注射第7天	腹腔注射14天
丁基苯酞	35.61±4.08	32.75±1.49	3.12±1.80	3.50±1.93
神经节苷脂	33.46±2.45	29.24±3.55*	3.32±2.26	3.30±1.67
损伤对照组	30.73±4.28* [△]	26.64±2.36* [△]	2.75±1.83* [△]	1.88±1.64* [△]
假手术组	38.95±2.39*	39.18±3.12* [△]	3.63±1.77	3.75±1.89

2.2 额叶皮层损伤区脑组织匀浆 SOD 活性、MDA 和 AchE 含量

丁基苯酞组、神经节苷脂组与损伤对照组相比较, SOD 活性、MDA 含量和 AchE 含量有统计学差异, 丁基苯酞组和神经节苷脂组 SOD 活性有统计学差异。见表 3。

表 3 丁基苯酞对大鼠额叶损伤后皮质 SOD 活性、MDA 含量、AchE 含量的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	SOD/U mg ⁻¹	MDA/nmol·mg ⁻¹	AchE U mg ⁻¹
丁基苯酞组	75.01±2.29	2.86±1.75	0.51±0.41
神经节苷脂组	80.44±4.20*	2.73±1.50	0.60±0.59
损伤对照组	44.17±2.41* [△]	3.77±0.94* [△]	0.82±0.35* [△]
假手术组	49.24±1.39* [△]	2.53±1.10	0.71±0.34*

3 讨 论

目前常用于改善认知功能中学习记忆功能障碍的药物主要有:胆碱酯酶抑制药、兴奋性氨基酸受体拮抗药及钙拮抗药。尽管上述药物能用于改善学习记忆功能损伤的治疗,但由于药物临床作用有限,仅能在一定程度上改善症状,并不能从根本上改善学习记忆功能障碍症状^[14,15]。有学者发现神经节苷脂能促进神经细胞的分化、增殖和生长,抑制病理性脂质的过氧化反应,减少自由基对生物膜的损害。神经节苷脂已广泛应用于脑外伤后学习记忆功能障碍的治疗,早期应用能更好促进学习记忆功能的恢复。近年来发现丁基苯酞具有抗凋亡、抗氧化等多种神经保护作用^[16-18]并在改善脑缺血性后学习记忆功能障碍和脑外伤保护方面显示其有效性。

自由基与大脑损伤后引起的学习记忆功能障碍关系十分密切,自由基连锁反应可以使神经元死亡,特别可使损伤早期的轻中度损伤神经元发生坏死。人体体内正常状态下自由基的产生和自由基清除酶之间保持平衡状态^[19]。脑损伤后氧化还原失去平衡,大量的自由基产生超过机体的清除能力并造成脑组织损伤,导致学习记忆功能障碍。脑组织中乙酰胆碱神经元与记忆功能密切相关,测量脑组织中乙酰胆碱含量可以反映学习记忆功能的变化。在脑损伤过程中,由于乙酰胆碱酯酶活性明显升高,造成脑内乙酰胆碱含量不足,中枢胆碱能系统功能障碍,而出现学习记忆障碍。由于乙酰胆碱性质极不稳定,容易水解,难以测定其含量,而乙酰胆碱酯酶是 Ach(乙酰胆碱)的降解酶,测定脑组织中 AchE 的活性,可以判断脑内 Ach 含量的变化^[20]。

本研究采用大鼠双侧额叶损伤动物模型,大鼠

造模一周后,与假手术组比较学习记忆功能障碍开始下降,这与前人研究结果基本一致^[11],能够很好代表额叶损伤后学习记忆功能障碍模型。本研究结果表明:丁基苯酞和神经节苷脂均能改善额叶损伤后大鼠的学习记忆功能障碍,且丁基苯酞效果优于神经节苷脂。与损伤对照组比较,丁基苯酞能降低大鼠额叶损伤后皮层 AchE 活性提高 SOD 活性和 MDA 含量。丁基苯酞对额叶损伤后大鼠学习记忆功能障碍具有治疗作用,其中作用机制可能与抑制 AchE 活力,抗氧化作用有关。

参 考 文 献

- 1 Turken AU, Herron TJ, Kang X, et al. Multimodal surface-based morphometry reveals diffuse cortical atrophy in traumatic brain injury. BMC Med Imaging, 2009, 9: 20
- 2 赵卫良. 大鼠脑损伤后认知障碍的实验研究. 硕士学位论文. 福建:福建医科大学,2008
- 3 戴伟川. 额叶底部脑挫裂伤患者认知功能障碍特征及其机制的初步研究. 硕士学位论文. 福建:福建医科大学,2010
- 4 蓝健枫,李尧,陈灿鑫. 脑外伤患者认知障碍与损伤部位的相关性研究. 河北医学,2011,17(1):20-23
- 5 李敏,沈政,黎海蒂. 前额叶与执行控制. 中国行为医学科学,2002,11(3):356-357
- 6 张皓,张小年,山磊,等. 脑外伤患者认知障碍的特点及康复疗效分析. 中国康复,2010,25(2):90-92
- 7 彭立辉,周世杰. 前额叶皮层损伤的执行功能研究进展. 中国临床神经外科杂志,2007,12(7):441-442,445
- 8 朴海峰. 脑外伤损伤部位与患者认知障碍的相关性分析. 当代医学,2012,32:53-54
- 9 黄本长,薛艳荣. 1985 例脑外伤患者的流行病学调查分析. 中国实用神经疾病杂志,2007,10(7):39-40
- 10 李丽萍,王生. 广东省 1997~2001 年住院患者伤害发生与死亡特征分析. 中华流行病学杂志,2003,24(10):905-907
- 11 何志贤,倪衡建. 大鼠额叶损伤后细胞凋亡及氨基胍的神经保护作用. 硕士学位论文. 江苏:南通大学,2005
- 12 吴佐泉,李德忠,马廉亭,等. 胎脑组织移植对额叶皮层损伤大鼠辨别学习、记忆之影响. 中华器官移植杂志,1997,1:42-44
- 13 Morris RG, Garrud P, Rawlins JN, et al. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. Nature, 1982, 297(5868): 681-683
- 14 Tariot PN, Farlow MR, Grossberg GT, et al. Memantine treatment in patients with moderate to severe Alzheimer disease already receiving donepezil: a randomized controlled trial. JAMA, 2004, 291(3): 317-324

(下转第 200 页)