文章编号:1000-5404(2014)17-1813-04

论著

大黄素对缺氧性脑损伤大鼠学习记忆能力的影响

张艳超[1,2],张新颜[2],程敬民[2],马 原[2],余思逊[2],孙志勇[2],顾建文[2] (400038 重庆,第三军医大学研究生管理大队[1];610083 成都,成都军区总医院神经外科[2])

[摘要] **目的** 探讨大黄素对缺氧环境所致脑损伤后大鼠学习记忆功能的保护及对脑组织超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和丙二醛(malondialdehyde,MDA)的影响。**方法** 雄性Wistar大鼠80只,分为对照组(n=16)、缺氧组(n=16)及大黄素干预组(n=48),利用低氧动物实验舱模拟缺氧环境,舱内采用自制游泳箱强迫大鼠游泳运动,将缺氧组和各大黄素干预组大鼠置于舱内饲养,每3小时游泳50 min,持续24 h,对照组大鼠不进行缺氧处理。大黄素干预组分为15、30、60 mg/(kg·d)3个剂量组(n=16),于进舱前3 d按相应剂量行大黄素灌胃,对照组和缺氧组大鼠于相应时间点灌注生理盐水1 mL。利用Morris水迷宫图像自动采集处理系统对大鼠进行寻找隐藏平台的平均逃避潜伏期测试;采用干/湿质量法测定脑组织含水量的变化;观察大黄素对缺氧性脑损伤后大鼠脑组织SOD活性和MDA含量的影响。**结果** Morris水迷宫实验中,缺氧组与对照组比较,平均逃避潜伏期升高(P<0.01),各剂量大黄素干预组平均逃避潜伏期较缺氧组减少(P<0.05,P<0.01);干/湿质量法测定各组脑组织含水量变化,缺氧组大鼠脑组织含水量较对照组显著增加(P<0.01),各大黄素干预组与缺氧组相比,脑组织含水量减低(P<0.05,P<0.01),且呈剂量关系;脑组织SOD活性及MDA含量测定结果显示,缺氧组与对照组相比,SOD活性降低(P<0.01),MDA含量增高(P<0.01),各剂量大黄素干预组与缺氧组相比,SOD活性明显增高(P<0.05,P<0.01),MDA含量减少(P<0.05,P<0.01)。**结论** 大黄素可以提高缺氧环境下大鼠脑组织SOD活性,降低MDA含量,改善大鼠学习记忆能力。

[关键词] 大黄素;缺氧;脑损伤;学习;记忆
[中图法分类号] R282.71; R338.64; R743.31 [文献标志码] A

Emodin improves learning and memory abilities in rats after hypoxic brain injury

Zhang Yanchao[1,2], Zhang Xinyan[2], Cheng Jingmin[2], Ma Yuan[2], Yu Sixun[2], Sun Zhiyong[2], Gu Jianwen[2] ([1]Postgraduate Team, Third Military Medical University, Chongqing, 400038; [2]Department of Neurosurgery, Chengdu General Hospital of Chengdu Military Command, Chengdu, Sichuan Province, 610083, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effects of emodin on the protection of learning and memory abilities and on SOD activity and MDA content in the brain tissue of rats after hypoxic brain injury induced by hypobaric hypoxia environment. **Methods** A total of 80 male Wistar rats were randomly divided into control group (n=16), hypoxia group (n=16) and emodin intervention group (n=48). Hypoxia environment cabin was used to contain the rats of the 2 latter groups and force them to swim 50 min every 3 h for consecutive 24 hours. The rats of control group were feed in normal condition. The latter group was further assigned into 3 subgroups according to different doses of emodin [15, 30 and 60 mg/(kg·d), n=16], and was perfused with corresponding doses intragastrically for 3 consecutive days before entering the hypoxia cabin, while the rats of the other 2 groups were given with same volume of normal saline (1 mL). Morris water maze automatic image acquisition and processing system was used to find the mean escape latency (MEL) for hidden platform. Brain water content was measured by wet to dry mass ratio method. SOD activity and MDA content in the cerebral tissue were detected. **Results** In the Morris water maze test, MEL was significantly longer in the hypoxia group than the control (P<0.01), and was obviously shorter in the emodin intervention groups than the hypoxia group (P<0.05, P<0.01); Brain water content was significantly increased in the hypoxia than the control (P<0.01), but the emodin intervention group had lower water content than the hypoxia group (P<0.05, P<0.01) in a dose-dependent manner. In the determination of the activity of brain tissue SOD and the

[基金项目] 国家自然科学基金(81271395)
[通信作者] 顾建文,E-mail:2914081083@qq.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140621.0849.003.html (2014-06-21)

content of MDA, the activity of SOD was significantly lower ($P<0.01$) while MDA content was increased ($P<0.01$) in hypoxia group than the control. Emodin treatment resulted in increased SOD activity ($P<0.05$, $P<0.01$) and decreased MDA content ($P<0.05$, $P<0.01$) than in the hypoxia group. **Conclusion** Emodin can increase the activity of SOD in brain tissue of rats, decrease the content of MDA, and improve the ability of learning and memory in rats.

[**Key words**] emodin; hypoxia; cerebral injury; learning; memory

Supported by the National Nature Science of China(81271395). Corresponding author: Gu Jianwen, E-mail: 2914081083@qq.com

高原地势高,空气稀薄,当人们从平原进入高原地区时,伴随着机体摄氧不足和组织氧供的减少,大脑明显受损[1],严重时可导致高原性脑水肿。学习记忆功能是大脑最重要的高级神经功能之一,同时也是中枢神经系统功能的整合,与学习记忆的关系密切。长期暴露在缺氧状态下会导致氧化应激和神经退行性疾病,从而引起记忆障碍[2-4]。大黄素(emodin,1,3,8三羟基-6甲基蒽醌)是中药大黄的重要组成成分之一,具有消炎、抗菌、抗肿瘤等多种药理作用,广泛用于临床治疗颅脑损伤、消化道出血等,对中枢神经系统有一定保护作用。有研究表明,临床脑损伤的治疗中,大黄合剂对其具有显著疗效,降低颅内压作用显著[5]。本研究利用低氧动物实验舱模拟缺氧环境制作大鼠缺氧模型,观察其脑组织病理改变,并采用Morris水迷宫实验检测大鼠学习记忆功能,探讨大黄素对模拟高原缺氧脑损伤大鼠学习记忆功能的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物与分组 健康Wistar成年雄性大鼠80只[四川大学实验动物中心提供,使用许可证SYXK(川2009-045)],体质量(196.5±5.9)g。按大鼠体质量编号后,采用SPSS 16.0软件产生的完全随机数字分为:对照组($n=16$)、缺氧组($n=16$)以及大黄素干预组($n=48$),大黄素干预组分为15、30、60 mg/(kg·d)3个剂量组($n=16$)。

1.1.2 主要试剂及实验设备 Morris水迷宫图像自动采集处理系统(成都仪器厂,型号:XMT614),低氧动物实验舱(成都仪器厂),万分之一电子天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司,型号:BSA223S],大黄素标准品(DELTA天然有机化合物信息中心),SOD试剂盒、MDA试剂盒(南京建成生物工程研究所)。

1.2 方法

1.2.1 实验方式及程序 各大黄素干预组于进舱前按相应剂量对大鼠进行灌胃,连续3 d,对照组和缺氧组于相应时间点灌注生理盐水1 mL。在最后1次灌胃结束后30 min,将缺氧组和各大黄素干预组大鼠置于低氧动物实验舱内模拟缺氧环境,氧浓度控制在12%左右,舱内采用自制游泳箱强制大鼠游泳运动,每3小时游泳50 min,持续24 h。对照组不进行低压缺氧处理。

1.2.2 生存状态及生理行为学观察 在低氧动物实验舱饲养期间,对实验大鼠生存状态进行观察。于缺氧24 h后从舱内取出大鼠,各组按完全随机数字法抽取8只,利用Morris水迷宫图像自动采集处理系统进行行为学测试。水池分为4个象限,右上象限为第1象限,逆时针方向依次为第2、第3、第4象限。水池内放入清水,水深约30 cm。首先进行1 d适应性训练,将大鼠放入无隐匿平台的水池中游泳2 min,以便适应水温并熟悉水池环境,从第2天开始进行为期3 d的寻找水下隐匿平台训练。隐匿平台置于第1象限中部水下约1 cm处,依次从1~4象限将大鼠面向桶壁放入水池,观察并记录大鼠寻找并爬上隐匿平台的逃避潜伏期,每个象限每天只用1次,记录大鼠寻找隐匿平台的路线和时间。

1.2.3 脑组织含水量测定 缺氧饲养24 h后,从舱内取出余下的8只大鼠处死,快速断头取脑,取脑组织约0.7 g,采用万分之一电子天平精确称量后,放入恒温烘干箱,设置为100 ℃烘烤24 h,至恒量后称取干脑质量,按Elliott公式计算得出脑组织含水百分比:脑组织含水量=(湿质量-干质量)/湿质量×100%。

1.2.4 脑组织超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性和丙二醛(malondialdehyde, MDA)测定 取剩余脑组织,采用化学比色法测定SOD、MDA,严格按说明书操作。

1.3 统计学分析

采用SPSS 16.0统计软件,计数资料以频数和百分比表示,计量资料以$\bar{x}\pm s$表示。计数资料组间比较行Fisher精确概率检验,行为学指标比较行重复测量资料方差分析,计量资料比较行单因素方差分析,两两比较采用LSD-t检验。

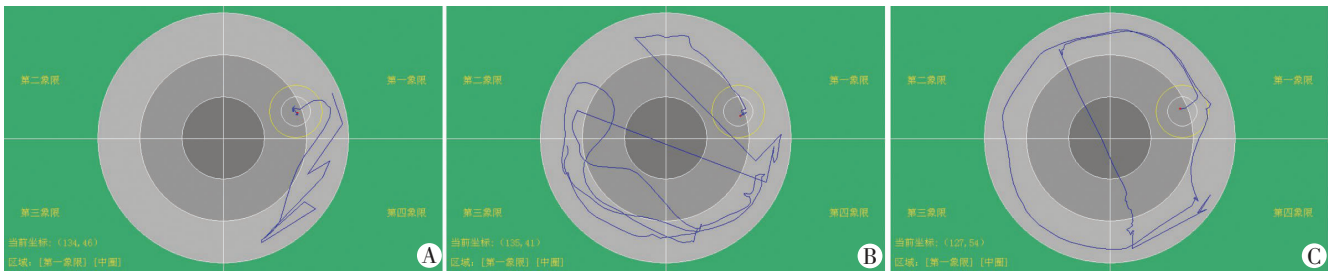
2 结果

2.1 大鼠生理及生存状态观察

缺氧组大鼠精神萎靡,行动迟缓,食欲差,出现呼吸节律变化。各剂量大黄素干预组与缺氧组相比,毛发光滑,精神状态较好,无呼吸骤停及大小便失禁,各剂量大黄素干预组整体状况明显好于缺氧组。

2.2 大黄素对大鼠学习记忆能力的影响及空间记忆功能的影响

Morris水迷宫测试中,随时间推移和训练次数的增多,各组大鼠寻找隐藏平台的平均逃避潜伏期均缩短($P<0.01$),说明学习和训练可以增强记忆能力;相同时间点,缺氧组和各剂量大黄素干预组较对照组平均逃避潜伏期均延长,行程增加,提示高原低压缺氧环境可导致大鼠学习记忆能力降低;各大黄素干预组逃避潜伏期与缺氧组相比均显著降低($P<0.05$,$P<0.01$),大鼠寻找逃逸平台的运动路线缩短,各大黄素干预组的平均逃避潜伏期的时间呈剂量依赖性,说明大黄素对于大鼠缺氧脑损伤后学习记忆能力有一定的保护作用(图1、表1)。



A:对照组;B:缺氧组;C:大黄素干预组

图 1　各组大鼠 Morris 水迷宫训练第 3 天运动轨迹

表 1　各组大鼠 Morris 水迷宫平均逃避潜伏期比较($s, n=8, \bar{x}\pm s$)

组别	第 1 天	第 2 天	第 3 天
对照组	32.12±3.78	9.52±2.07^{e}	7.68±3.15^{e}
缺氧组	39.70±3.56	25.32±4.38^{e}	18.43±3.57^{be}
大黄素干预组 15 mg/(kg·d)	35.28±3.67	18.61±3.89^{e}	15.13±2.64^{bce}
大黄素干预组 30 mg/(kg·d)	34.56±4.04	16.63±4.09^{e}	12.93±1.26^{bde}
大黄素干预组 60 mg/(kg·d)	33.63±3.71	14.28±2.66^{e}	11.02±3.04^{ade}

a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与对照组比较;c: $P<0.05$,d:$P<0.01$,与缺氧组比较;e:$P<0.01$,与第 1 天比较

2.3　各组大鼠脑含水量比较

缺氧组和各剂量大黄素干预组脑含水量较对照组显著增高($P<0.05$,$P<0.01$),各剂量大黄素干预组与缺氧组相比,脑组织含水量均有下降,且呈剂量依赖关系($P<0.05$,$P<0.01$,表 2)。

表 2　各组大鼠脑组织含水量比较[$n=8$,($\bar{x}\pm s$)%]

组别	脑组织含水量
对照组	76.37±2.26
缺氧组	87.34±3.72^{b}
大黄素干预组 15 mg/(kg·d)	83.17±3.84^{bc}
大黄素干预组 30 mg/(kg·d)	80.38±2.28^{bd}
大黄素干预组 60 mg/(kg·d)	78.83±1.79^{ad}

a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与对照组比较;c: $P<0.05$,d:$P<0.01$,与缺氧组比较

2.4　大黄素对大鼠脑组织 SOD 活性和 MDA 含量的影响

与对照组相比,缺氧组和各大黄素干预组 SOD 值均有降低,MDA 值增高($P<0.05$,$P<0.01$),表明高原低压缺氧环境导致大鼠脑损伤后组织 SOD 活性和 MDA 含量受到影响;与缺氧组相比,各大黄素干预组 SOD 值均有上升,MDA 值降低($P<0.05$,$P<0.01$),表明大黄素可保护 SOD 活性,降低 MDA 含量(表 3)。

表 3　各组大鼠脑组织 SOD 活性和 MDA 含量比较($n=8$, $\bar{x}\pm s$)

组别	SOD(U/mg)	MDA(nmol/mg)
对照组	84.65±6.56	2.76±0.26
缺氧组	54.37±6.82^{b}	5.63±0.62^{b}
大黄素干预组 15 mg/(kg·d)	61.72±6.15^{bc}	4.83±0.73^{bc}
大黄素干预组 30 mg/(kg·d)	68.18±5.72^{bd}	4.07±0.58^{bd}
大黄素干预组 60 mg/(kg·d)	76.23±8.57^{ad}	3.39±0.65^{ad}

a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与对照组比较;c: $P<0.05$,d:$P<0.01$,与缺氧组比较

3　讨论

学习记忆功能是大脑最重要的高级神经功能之一,同时也是中枢神经系统功能的整合。缺氧环境可导致不同程度的颅脑损伤,造成机体,尤其是神经系统的损伤,引起学习记忆功能下降[6],从而可引起脑水肿,造成颅内压增高甚至导致脑疝的形成,进而引起严重的病理损害,增加颅脑伤病死率和致残率[7]。研究表明,大脑损伤后,近期记忆中的情节、记忆的过程与空间位置的学习都受到影响,大脑损伤将造成顺行性遗忘症[8-9]。

SOD 是体内重要的自由基清除剂,通过清除氧自由基,保护机体免受自由基攻击;MDA 是体内脂质过氧化反应的最终产物,可反映机体受自由基损害程度[10]。SOD 活性和 MDA 含量的敏感度和特异性都非常高,可作为判断脑组织损伤程度的标志物[11-12]。本实验选用 Morris 水迷宫实验检测模拟缺氧环境对大鼠的空间学习记忆功能的影响,并测定大鼠脑组织中 SOD 活性、MDA 含量及脑组织含水量。结果显示,在缺氧环境下,大鼠脑组织中 SOD 活性降低,MDA 含量显著增高,脑组织干/湿质量明显增加,大鼠寻找隐藏平台的行程和时间明显增加。这提示模拟缺氧环境可导致大鼠脑组织损伤,缺氧环境对空间习得能力、防御条件反应的保持以及分辨学习均有破坏,从而导致动物的学习新技巧和新事物的能力受到影响,空间记忆能力下降[13-14]。大黄素是中药大黄的重要组成成分之一,具有多种药理作用,大黄素可通过血脑屏障进入大脑,广泛地应用于临床治疗,对脑细胞及其他组织和器官无毒副作用[15]。本课题组前期研究发现大黄合剂在临床脑损伤的治疗中,降低颅内压作用显著,疗效明显[16]。本实验中,经大黄素干预后,大鼠寻找隐藏平台的行程和时间明显降低,脑组织 SOD 活性明显增高,MDA 含量降低,脑含水量明显减少,提示大黄素可提高缺氧环境下大鼠脑组织 SOD 活性,降低 MDA 含量,减轻脑组织水肿,对大鼠学习记忆能力有保护作用。

综上所述,模拟缺氧环境可导致大鼠脑组织 SOD 活性降低,MDA 含量和含水量增加,大鼠的学习记忆功能减退。大黄素能提高机体自由基清除酶活性,清除脑组织过多的氧自由基,使大鼠脑组织 SOD 活性明显增高,MDA 含量和脑组织含水量降低,从而减轻脑组织损伤,大鼠学习记忆能力也有一定改善,说明大黄素对缺氧环境中的脑组织有保护作用,提示大黄素有可能成为缺氧性脑损伤临床治疗和预防的新药物。

参考文献:

[1] 高伊新, 李鹏, 蒋春华, 等. 久居高原青年官兵脑功能的变化特征

及其相关因素研究[J]. 第三军医大学学报, 2013, 35(10): 1001 - 1004.
[2] Baitharu I, Deep S N, Jain V, *et al*. Corticosterone synthesis inhibitor metyrapone ameliorates chronic hypobaric hypoxia induced memory impairment in rat[J]. Behav Brain Res, 2012, 228(1): 53 - 65.
[3] Kalpana Barhwal, Shashi Bala Singh, Sunil Kumar Hota, *et al*. Acetyl- L-carnitine ameliorates hypobaric hypoxic impairment and spatial memory deficits in rats[J]. Eur J Pharmacol, 2007, 570(1/3): 97 - 107.
[4] Maiti P, Singh S B, Muthuraju S, *et al*. Hypobaric hypoxia damages the hippocampal pyramidal neurons in the rat brain[J]. Brain Res, 2007, 1175: 1 - 9.
[5] 程敬民. 大鼠颅脑爆炸冲击伤模型的建立及大黄素干预的实验研究[D]. 重庆: 第三军医大学, 2009.
[6] 张峰, 姚红兵, 李兵, 等. 慢性间歇性缺氧对大鼠学习记忆及海马CA3区GFAP表达的影响[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(12): 1161 - 1163.
[7] 常玉坤, 王丽娜, 刘永亮, 等. 弥漫性脑损伤大鼠血脑屏障及损伤区皮质咬合蛋白表达的变化[J]. 疑难病杂志, 2013, 12(9): 702 - 705.
[8] Warner T A, Stafford N P, Rompala G R, *et al*. Intermittent swim stress causes Morris water maze performance deficits in a massed-learning trial procedure that are exacerbated by reboxetine[J]. Pharmacol Biochem Behav, 2013, 113: 12 - 19.
[9] Tosun C, Kurland D B, Mehta R, *et al*. Inhibition of the Sur1-Trpm4 channel reduces neuroinflammation and cognitive impairment in subarachnoid hemorrhage[J]. Stroke, 2013, 44(12): 3522 - 3528.
[10] 刘亚敏, 张赐安, 徐秋英, 等. 芳香开窍法对全脑缺血再灌注大鼠脑水肿及超氧化物歧化酶、丙二醛水平的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2002, 9(7): 22 - 24.
[11] 林少珠, 陈光斌, 吴铁, 等. 丹参素对新生大鼠缺氧缺血性脑损伤脑组织SOD、MDA的影响[J]. 中国实用医药, 2012, 7(24): 12 - 14.
[12] Lv Y, Liu P, Xiang C, *et al*. Oxidative stress and hypoxia observed in the kidneys of mice after a 13-week oral administration of melamine and cyanuric acid combination[J]. Res Vet Sci, 2013, 95(3): 1100 - 1106.
[13] Kamper J E, Pop V, Fukuda A M, *et al*. Juvenile traumatic brain injury evolves into a chronic brain disorder: behavioral and histological changes over 6months[J]. Exp Neurol, 2013, 250: 8 - 19.
[14] Wang Z J, Han W N, Yang G Z, *et al*. The neuroprotection of Rattin against amyloid β peptide in spatial memory and synaptic plasticity of rats[J]. Hippocampus, 2014, 24(1): 45 - 53.
[15] 顾建文, 朴永旭, 匡永勤, 等. 大黄素在制备抑制中枢兴奋性药物中的应用: 中国, CN1613443[P]. 2005 - 05 - 11.
[16] 马原, 顾建文, 程敬民, 等. 大黄素对大鼠颅脑爆震伤的影响及保护作用[J]. 中华创伤杂志, 2009, 25(9): 803 - 806.

(**收稿**:2014-02-19;**修回**:2014-03-20)
(编辑 王小寒)

(上接1799页)

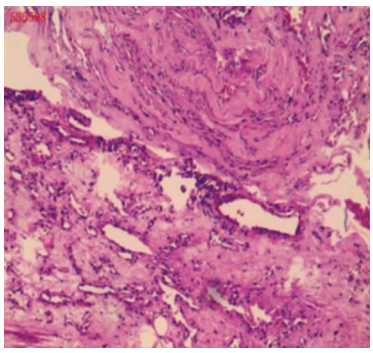


图3 纵隔毛细血管瘤的组织病理学观察 (HE ×40)

2 讨论

纵隔血管源性肿瘤罕见,按性质可分为良性及恶性[1-2],按结构分为:海绵状血管瘤[3]、毛细血管瘤、蔓状血管瘤。毛细血管瘤与海绵状血管瘤的区别除了血管腔的大小外,镜下形态及大体标本也有很大不同。该瘤由弥漫增生的小血管构成,无平滑肌层,肉眼肿瘤切面可见弥漫小血管腔,质实,不同于海绵状血管瘤的蜂窝状改变。毛细血管瘤多发生于皮下,肌肉、内脏、骨等部位也可发生。纵隔毛细血管瘤可发生于任何年龄,多发生在40岁之前,尤以10岁以下高发,无明显性别差异,好发于前纵隔。可呈浸润性生长,故形态可不规则,其中可有静脉石,外围有包膜,部分患者可出现纵隔结构的压迫症状,多数患者没有临床症状。本例无任何临床症状,于体检时发现。肿瘤如位于后纵隔脊柱旁,可引起临近肋骨的骨质缺损或骨质增生肥大,也可呈哑铃状生长,一端在后纵隔内形成肿块,另一端在椎管内可压迫脊髓引起症状。本例虽在脊柱旁,并未引起骨质缺损或骨质增生改变,可能与该瘤生长时间相对较短有关。X线表现多呈圆形,轮廓清楚、光滑,也可呈浸润性生长,肿块无清楚的边界,偶在肿块中发现静脉石[4],CT表现:大多数病灶呈境界清楚的肿块影,仅少部分与周围结构分界不清或呈弥漫浸润。平扫时肿块密度不均匀,部分患者肿块内可见小点状钙化或静脉石,偶尔可见脂肪密度影,增强后呈典型的多灶性或弥漫性不均匀性强化。本例即为典型多灶性不均匀强化。另外,该瘤也可呈中心型或外周型强化,肿块内也可见强化的血管腔,在动脉期即能显示与纵隔血管一样的强化。

根据本例发病部位及其不均匀强化的特点,术前被误诊为神经源性肿瘤。神经源性肿瘤在后纵隔肿瘤中最为常见,绝大多数发生于后纵隔脊柱旁沟的神经组织,可发生于任何年龄,增强扫描时通常也呈不均匀强化。少数患者可见肿块内散在的、针尖状的钙化。CT表现上与血管瘤鉴别有一定的困难。但毛细血管瘤的强化比神经源性肿瘤的强化应该更为明显。

纵隔毛细血管瘤定性诊断有一定的困难,但通过对该病例的分析及文献复习,对CT动态增强扫描显示渐进式强化特点及静脉石的无特异性临床表现的纵隔肿瘤,除了从常见病、多发病的角度出发外,还应考虑到该病的可能。

参考文献:

[1] Odaka M, Nakada T, Asano H, *et al*. Thoracoscopic resection of a mediastinal venous hemangioma: report of a case[J]. Surg Today, 2011, 41(10): 1455 - 1457.
[2] 袁君, 宗振峰, 杨博, 等. 后纵隔血管瘤1例[J]. 中华胸心血管外科杂志, 2012, 28(10): 635.
[3] 何其舟, 唐烨真, 涂永波, 等. 后纵隔海绵状血管瘤1例[J]. 中国临床医学影像杂志, 2011, 22(2): 149 - 150.
[4] 陈春新, 陈美燕, 胡寅进. X线诊断纵隔海绵状血管瘤1例[J]. 中国医学影像技术, 2011, 27(3): 461.

(**收稿**:2014-03-30;**修回**:2014-04-11)
(编辑 汪勤俭)