基础研究 文章编号:0253-3626(2009)12-1658-03

桂利嗪对喹啉酸致学习记忆障碍谷氨酸能神经元的影响

苏湲淇[1],董 志[2]

(1.重庆医药高等专科学校药理教研室,重庆 400030;2.重庆医科大学药理学教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究桂利嗪(Cinnarizine,Cin)对兴奋毒喹啉酸(Quinolinic acid,QA)损伤的谷氨酸(Glutaminergic,Glu)能神经系统是否有保护作用,并研究其相关机制。方法:应用微量注射方法,将喹啉酸注入大鼠双侧海马 CA1 区,建立大鼠学习记忆障碍模型,探讨 cin 对 QA 损伤海马神经元保护作用及其相关作用机制。结果:桂利嗪可降低 QA 损伤大鼠 Morris 水迷宫实验中其寻找平台平均潜伏期及穿梭箱实验中其回避潜伏期,与模型组比较有显著性差异;使大鼠学习记忆障碍模型脑神经元病理改变减轻,并明显减轻其脑组织病理损伤;能明显增加 QA 损伤大鼠海马中 Glu 阳性神经元的数量。结论:桂利嗪能通过减轻 Glu 能神经系统的损伤来改善模型大鼠学习记忆能力。

【关键词】学习记忆障碍;谷氨酸能神经元;喹啉酸;模型

【中国图书分类法分类号】R332 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-05-20

Effect of cinnarizine on glutaminergic neuron in the dysmnesia models induced by quinolinic acid

SU Yuan-qi, et al

(*Department of Pharmacology, Chongqing Medical and Pharmaceutical College*)

【Abstract】*Objective*: To study the protective effect of Cinnarizine induced by QA and its related mechanism. *Methods*: Rat models of dysmnesia were made by injecting QA into CA1 districts of hippocampuses with microinjector to explore the protective effect of Cin and its related factors on QA induced impairment of hippocampuses neuron. *Results*: Compared with control group, in Morris water maze test time of finding the platform under the water surface decreased, and in step-through test the latent period rose.Cin could also decrease the pathological alterations of brain nerve cells in dysmnesia models. The above results indicated that Cin could not only improve the dysmnesia in rat models ,but also decreased the pathologic damage in brain tissue. The number of glutaminergic neuron positive nerve cells was increased. *Conclusion*: Cin could improve the dysmnesia in rat models by mitigating damage in glutaminergic neuron.

【Key words】Dysmnesia; Glutaminergic neuron; Quinolinic acid; Models

近年来的研究表明,兴奋性毒性损伤是中枢神经系统疾病和损伤时神经元变性坏死的重要机制之一[1]。喹啉酸(Quinolinic acid,QA)为谷氨酸类似物,是一种潜在的内源性毒物。宋前流等[2]在海马 CA1 区注入 QA,通过其选择性的破坏谷氨酸能神经元(Glutaminergic neuron,Glu),制备成了 Glu 能毁损的学习记忆障碍模型。桂利嗪(Cinnarizine,Cin)为钙离子阻断剂,已有实验表明桂利嗪对脑缺血损伤具有显著的保护作用[3,4],但桂利嗪对喹啉酸所致的海马神经元的损伤是否有保护作用,尚不清楚。

本实验利用宋前流等人的造模方法建立大鼠学习记忆障碍模型,研究桂利嗪对兴奋毒喹啉酸损伤的 Glu 能神经元是否有保护作用,并探讨其可能的相关机制。

作者介绍:苏湲淇(1977-),女,讲师,硕士,研究方向:神经药理学。

通讯作者:董 志,男,教授,E-mail: zhidong073@hotmail.com。

1 材料与方法

1.1 动物与仪器

4 个月大的健康 Wistar 大鼠,雄性,清洁级,体质量(220 ± 23.35) g,60 只,由第三军医大学大坪医院实验动物中心提供,实验动物合格证号 SCXK (军)2002008。脑立体定位仪(西北光学仪器厂),Morris 水迷宫和大鼠穿梭箱(中国医学科学院药研所),微量注射器(上海保西玻璃仪器厂),3k30型低温超速离心机(美国 Sigma 公司),BH-2 型光学显微镜(Olympus,日本)。

1.2 药品与试剂

桂利嗪(美国 Sigma 公司,批号 20021206,含量 >99.4%),

喹啉酸(Aldrich 化学公司,批号 20010701,含量 > 99.6%),酪氨酸羟化酶测定试剂盒(Tyrosine hydroxylase,TH)、Glu 测定试剂盒、胆碱乙酰化酶(Choline acetylase,CHAT)测定试剂盒、色氨酸羟化酶(Tryptophan hydroxylase,TPH)均由武汉博士德公司提供。免疫组化试剂盒由北京中山公司提供。

1.3 动物分组

动物经行为学筛选后,按随机数字表法分为 5 个组:假手术组、模型组及 3 个桂利嗪治疗组(n = 8),其中治疗组包括桂利嗪 7、20、60 mg/kg(动物手术后立即分别灌胃桂利嗪 7、20、60 mg/kg),假手术组及模型组分别给予等量灭菌生理盐水灌胃。

1.4 模型的制作[5]

实验动物用水合氯醛以 350 mg/kg 经腹腔注射麻醉后,剪去颅顶切口区毛,固定在大鼠脑立体定位仪上。酒精消毒后,取颅顶正中切口,参照大鼠脑立体定位图谱[6](AP:3.5 mm, ML:2.0 mm,H:2.7 mm),对双侧海马 CA1 区立体定位后,钻开颅骨,用微量注射器垂直进针,将溶解的 QA 2 μl(含 150 nmol)缓慢注入到海马 CA1 区,假手术组注入等量的 PBS 缓冲液。每侧注入时间为 5 min,留针 5 min,局部消毒后缝合皮肤。

1.5 指标的检测

1.5.1 行为学检测 模型制备后 1 周,采用 Morris 水迷宫检测大鼠空间学习记忆能力[7,8]。前 4 d 进行定位航行实验,记录大鼠寻找平台潜伏期,用于测量大鼠对水迷宫学习和记忆的获取能力。第 5 d 进行空间搜索实验,记录大鼠在 120 s 内跨过平台相应位置的次数。

穿梭箱实验检测大鼠条件性学习记忆能力[9],设定好实验参数后,打开电源,观察大鼠躲避电击情况,同时计算机自动记录大鼠遭受电击次数、被动回避潜伏期和主动回避潜伏期(AARL)。

1.5.2 病理组织形态学观察 行为学实验结束后,每组取 1 或 2 只大鼠实施内固定脑组织。将大鼠断头,快速取出脑组织,放入 4%多聚甲醛中固定,石蜡包埋切片,HE 染色,光镜下观察大鼠双侧海马神经元改变。

谷氨酸免疫组化法染色:将组织切片粘贴于经多聚赖氨酸处理过的载玻片上,石蜡切片经二甲苯和梯度乙醇脱蜡处理后,作 SABC 免疫组化染色。免疫组化方法参照北京中山公司的试剂盒说明进行,每张切片滴加 50 μl 谷氨酸一抗(兔抗 Glu 稀释度为 1:200,Sigma 公司),4℃孵育过夜,滴加生物素化山羊抗兔 IgG(稀释度为 1:150,博士德生物制剂公司),37℃ 孵育,PBS 漂洗,滴加 SABC,37℃孵育,PBS 漂洗,DAB 显色,常规复染,二甲苯透明,中性树胶封片。

结果判定:阳性细胞为细胞质或细胞核呈棕黄色。

1.6 统计学方法

所有指标数据采用 EXCEL 录入,采用 SPSS11.5 统计软件进行方差分析,计量资料均用 $\bar{x} \pm s$ 描述,多组间比较采用单因素方差分析,重复检测的数据采用重复测定的方差分析。检验水准取 α =0.05 行双侧检验,$P \leq 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 桂利嗪对 QA 损伤大鼠空间学习记忆能力的影响(Morris 水迷宫实验)

训练 4 d 各组共 8 次的平均潜伏期,Cin(20、60 mg/kg)使损伤大鼠寻找平台平均潜伏期减少(图 1),并使其末次跨平台次数明显增加,与模型组相比有显著性差异(P<0.01 或 P< 0.05,图 2)。

2.2 桂利嗪对 QA 损伤大鼠条件性学习记忆能力的影响(穿梭箱实验)

由图 3、4 可见,训练 4 d 后,Cin(20、60 mg/kg 组)则可剂量依赖性地增加 QA 损伤大鼠的主动回避次数,并降低其主动回避潜伏期及被动回避潜伏期,与模型组相比,有显著性差异(P<0.01 或 P<0.05)。

2.3 HE 染色

HE 染色后,光镜下观察可见正常大鼠海马 CA1 区神经元数目多,呈多层,排列整齐紧密。核呈圆形,大而清晰,核仁明显。神经纤维密集,排列整齐。QA 损伤组海马神经元数目明显减少,脱失现象明显,层次少而不清,排列紊乱。核固缩为三角形或多角形,浓染。神经纤维稀疏,排列紊乱,间隙扩大,提示 Cin(20、60 mg/kg 组)能明显改善 QA 损伤大鼠海马神经元的损伤,使海马神经细胞数目明显增加,排列较整齐,核固缩现象明显改善,核仁较清晰,神经纤维也明显增加。但 7 mg/kg 剂量组的 Cin 改变不明显(图 5)。

2.4 Glu 阳性细胞数的变化

由图 6 可以看出,QA 急性损伤后,模型组海马 CA1 区 Glu 的阳性细胞的数目较假手术组均有明显减少(P < 0.01)。Cin(20、60 mg/kg 组)使 QA 损伤后的海马 CA1 区 Glu 的阳性细胞的数目剂量依赖性地增加(P < 0.01,P < 0.05)(图 7)。

3 讨 论

在本实验中,向大鼠海马 CA1 区微量注射 QA 后,其空间学习记忆能力和条件性学习记忆能力均明显降低,加之其脑组织神经元出现了明显病理改变,显示喹啉酸可导致大鼠脑组织的严重损伤,并造成其学习记忆障碍,表明动物模型建立成功。

Glu 是动物中枢神经系统中最重要的兴奋性神经递质,它负责脑内大多数兴奋性突触活动,广泛地参与学习记忆、神经内分泌和其他生命活动功能,但过量的兴奋性氨基酸持续刺激海马神经元上丰富的谷氨酸受体,导致谷氨酸受体门控通道的大量内流,使细胞内钙超载,并引发一系列的链式损伤,造成神经元的大量坏死,表现为学习记忆障碍。因此,1995 年,宋前流[2]等人通过在富含谷氨酸受体的海马区注入谷氨酸类似物喹啉酸,建立了谷氨酸能毁损的学习记忆障碍模型。该模型中由于海马 CA1 区大量的 Glu 能神经元肿胀坏死,谷氨酸能受体被破坏,故表现为学习记忆的障碍[10]。我们实验中用免疫组化的方法发现,模型组海马 CA1 区 Glu 能神经元的阳性细胞数明显低于假手术组(P<0.01),说明喹啉酸能够损伤 Glu 能神经元系统,从而造成学习记忆能力的下降。

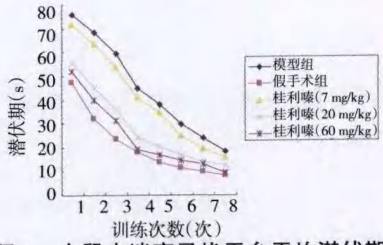
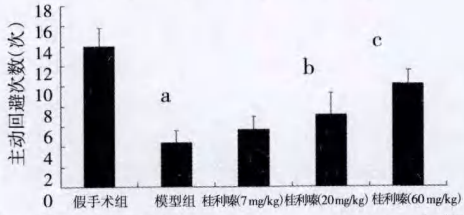
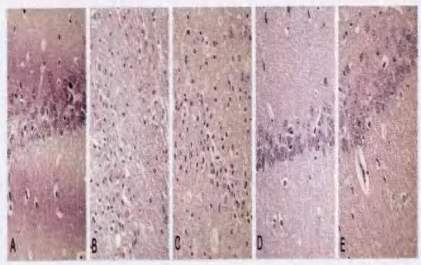


图 1 大鼠水迷宫寻找平台平均潜伏期



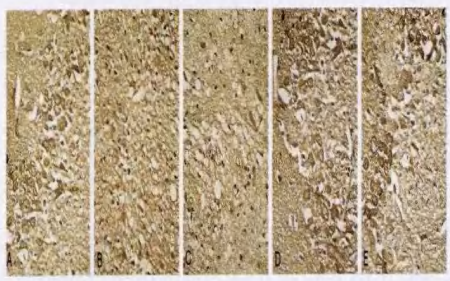
a. $P<0.01$，与假手术组比较；b. $P<0.05$，c. $P<0.01$，与模型组比较

图 3 桂利嗪对 QA 损伤大鼠模型主动回避次数的影响



A.假手术组大鼠；B.模型组；C.桂利嗪（7 mg/kg）组；D.桂利嗪（20 mg/kg）组；E.桂利嗪（60 mg/kg）组

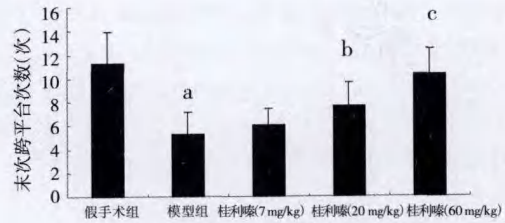
图 5 各组大鼠脑组织病理学改变（HE×400）



A.假手术组；B.模型组；C.桂利嗪 (7 mg/kg)组；D.桂利嗪(20 mg/kg)组；E.桂利嗪(60 mg/kg)组大鼠脑组织的 Glu 阳性细胞

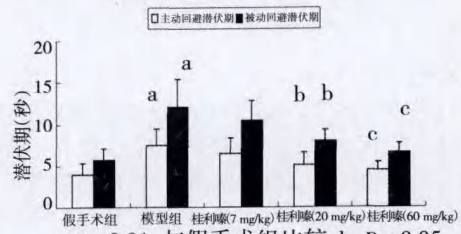
图 7 各组大鼠脑组织的 Glu 阳性细胞数变化（SABC 免疫组化染色×400）

实验结果也显示桂利嗪可改善大鼠学习记忆障碍模型的空间学习记忆和条件性学习记忆能力障碍，明显减轻其脑组织病理损伤及增加喹啉酸损伤大鼠海马中谷氨酸阳性神经元的数量（$P<0.01$ 或 $P<0.05$）。提示桂利嗪能够通过减轻谷氨酸能神经元的损伤来改善模型大鼠学习记忆能力的障碍。



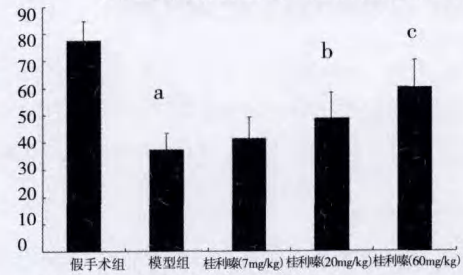
a. $P<0.01$，与假手术组比较；b. $P<0.05$，c. $P<0.01$，与模型组比较

图 2 大鼠水迷宫末次跨平台次数



a. $P<0.01$，与假手术组比较；b. $P<0.05$，c. $P<0.01$，与模型组比较

图 4 桂利嗪对 QA 损伤大鼠模型穿梭箱实验主动回避潜伏期和被动回避潜伏期的影响



a. $P<0.01$，与假手术组比较；b. $P<0.05$，c. $P<0.01$，与模型组比较

图 6 桂利嗪对 QA 损伤大鼠海马 CA1 区谷氨酸阳性细胞数的影响

参 考 文 献

[1] Goldberg R J.Alzheimer's disease[J].Comprehensive Therapy,2007,33(2):58-64.

[2] Yarwood J M,Sehlievert P M. Quorum sensing in staphylococcus infections[J].J Clin Invest,2003,112(11):1620-1625.

[3] 黄 文，陈曼娥，周华东，等.兴奋性氨基酸对体外培养大鼠皮质神经元的影响及氟桂利嗪对其干预的实验研究[J].中国老年学杂志，2003,23(1):53-55.

[4] 刘玉真，田 兰，戎欣玉，等.桂利嗪口腔崩解片的质量研究[J].药物分析杂志，2006,26(5):699-700.

[5] DellAcqua G,Giacometti A,Cirioni O.Suppression of drug-resistant staphylococcal infections by the quorum-sensing inhibitor RNA Ⅲ inhibi-ting peptide[J]. J Infect Dis,2004,190(2):318-320.

[6] Paxinos G,Watson C.大鼠脑立体定位图谱[M]. 第 3 版. 北京：人民卫 出版社，2005.321-325.

[7] Kumar A,Seghal N,Naidu P S,et al.Colchicines-induced neurotoxicity as an animal model of sporadic dementia of Alzheimer's type[J].Pharmacol Rep,2007,59(3):274-283.

[8] 王小林，王永红，罗 晶，等.电刺激小脑顶核对 AD 大鼠学习记忆能力及海马神经元凋亡的影响[J].重庆医科大学学报，2009,34(2):157-160.

[9] 赵邦云，黎海蒂，高恩泉，等.微机控制的大鼠四路穿梭箱主动回避反应实验系统[J].中国临床康复，2004,8(4):632-633.

[10] Barker R A.Continuing trials of GDNF in Parkinson's disease[J].Lancet Neurol,2006,5(4):285-286.

（责任编辑：冉明会）