

• 论著 •

MCI-186 对痴呆模型大鼠认知损害和脑内 DNA 氧化应激的影响

周珊珊¹, 王欣¹, 盛莉¹, 黄丹华², 迟立君¹, 张黎明¹

1. 哈尔滨医科大学附属第一医院神经内科 黑龙江省哈尔滨市 150001

2. 齐齐哈尔医学院附属第三医院神经内科 黑龙江省齐齐哈尔市 161000

摘要:目的 观察 MCI-186 对双侧脑室内注射链脲菌素 (STZ) 诱导的认知损害模型大鼠认知功能和脑内 DNA 氧化应激的影响。方法 64 只成年雄性 SD 大鼠随机分为 4 组:假手术组 (S)、MCI-186 + 假手术组 (M + S)、模型组 (L) 和 MCI-186 + 制模组 (M + L)。跳台试验和水迷宫试验测试大鼠认知功能;比色法和免疫荧光法分别检测大鼠脑内的 H_2O_2 、CAT 含量和 8OHdG 表达。结果 跳台试验中,与 S 组比较,L 组潜伏期 (179.1 ± 41.3) 显著缩短 ($P < 0.05$),错误次数 (3.88 ± 0.87) 显著增加 ($P < 0.05$);与 L 组比较,M + L 组潜伏期 (250.5 ± 27.1) 显著延长 ($P < 0.05$),错误次数 (2.83 ± 0.64) 显著减少 ($P < 0.05$)。Morris 水迷宫试验中,与 S 组比较,L 组大鼠潜伏期 (36.1 ± 3.59) 显著延长 ($P < 0.05$);与 L 组比较,M + L 组潜伏期 (18.63 ± 3.73) 显著缩短 ($P < 0.05$)。与 L 组比较,M + L 组脑内 H_2O_2 含量显著减少 ($P < 0.05$),CAT 活性显著提高 ($P < 0.05$),8OHdG 表达阳性率显著降低 ($P < 0.05$)。结论 MCI-186 能够改善 STZ 诱导的大鼠认知损害和脑内 DNA 氧化应激。

关键词: MCI-186; 痴呆; 认知损害; DNA; 氧化应激

Effects of MCI-186 on cognitive impairment and DNA oxidative stress in rat model of dementia

ZHOU Shan-Shan, WANG Xin, SHENG Li, HUANG Dan-Hua, CHI Li-Jun, ZHANG Li-Ming. Department of Neurology, The First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, 150001, China

Abstract: Objective To observe the effects of MCI-186 on the cognitive function and DNA oxidative stress in the rat model of cognitive impairment induced by bilateral intracerebroventricular (ICV) injection of streptozotocin (STZ). **Methods** Sixty-four adult male Sprague-Dawley rats were randomly divided into 4 groups: Sham (S), MCI-186 + Sham (M + S), ICV-STZ Lesion (L), and MCI-186 + Lesion (M + L). The step-down test was used to evaluate potential deficits in memory retention. Spatial learning and memory were tested using the Morris water maze (MWM). The content of hydrogen peroxide (H_2O_2) and activity of catalase (CAT) in the cerebral cortex and hippocampal neurons were determined by colorimetric method. Immunofluorescence staining was used to measure the expression of 8OHdG. **Results** In the step-down test, compared with the S group, the L group had a significantly reduced latency (179.1 ± 41.3) but a significantly increased number of errors (3.88 ± 0.87) ($P < 0.05$ for both); compared with the L group, the M + L group had a significantly increased latency (250.5 ± 27.1) but a significantly reduced number of errors (2.83 ± 0.64) ($P < 0.05$ for both). The MWM test showed that the L group had a significantly longer latency (36.1 ± 3.59) than the S group ($P < 0.05$), and the M + L group had a significantly shorter latency (18.63 ± 3.73) than the L group ($P < 0.05$). Compared with the L group, the M + L group had a significantly reduced content of H_2O_2 ($P < 0.05$), a significantly increased activity of CAT ($P < 0.05$), and a significantly decreased positive rate of 8OHdG expression ($P < 0.05$). **Conclusions** MCI-186 can reduce the STZ-induced cognitive impairment and DNA oxidative stress in rats.

Key words: MCI-186; dementia; cognitive impairment; DNA; oxidative stress

基金项目: 黑龙江省教育厅科学技术研究项目 (12531303)

收稿日期: 2013-11-01; 修回日期: 2014-01-19

作者简介: 周珊珊 (1980-), 女, 主治医师, 讲师, 博士学位, 主要从事老年痴呆的研究。

通讯作者: 张黎明 (1954-), 男, 主任医师, 教授, 博士学位, 博导, 主要从事癫痫、老年痴呆和脑血管病的研究。Email: zfx001@yahoo.com。

MCI-186(依达拉奉)是一种强力的自由基清除剂,它是安替比林的三种代谢产物之一。MCI-186对急性缺血性脑卒中的神经元具有保护作用^[1],并能够减轻缺血再灌注损伤产生的脑水肿^[2]。除此之外,有研究表明依达拉奉在肌萎缩侧索硬化症和帕金森病的细胞和动物模型中显示了神经保护作用^[3]。阿尔茨海默病(Alzheimer disease, AD)是常见的神经系统变性疾病,是老年期痴呆最常见的类型。其病因尚不清楚,而且缺乏有效的预防和治疗方案。以往的研究表明,自由基过度产生和氧化应激在AD发生发展中起着重要作用^[4]。本研究探讨了MCI-186对链脲菌素(streptozotocin, STZ)诱导的认知损害模型大鼠认知功能和脑内DNA氧化应激的影响,初步探讨MCI-186对痴呆模型大鼠认知损害的改善作用机制,为包含氧化损伤机制的神经系统变性疾病(如AD)的预防和治疗药物选择提供依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料及主要试剂

雄性成年SD大鼠64只,购于北京维通利华实验动物技术有限公司,体重300~350g。按每组16只(8只用于生化检测,8只用于免疫荧光检测)随机分成4组:假手术组(S)、MCI-186+假手术组(M+S)、ICV-STZ组(L)和MCI-186+ICV-STZ组(M+L)。

MCI-186(Edaravone,德国Calbiochem公司);STZ(美国Sigma公司);过氧化氢(hydrogen dioxide, H_2O_2)、过氧化氢酶(catalase, CAT)检测试剂盒(南京建成生物工程研究所);兔抗大鼠8-羟基脱氧鸟苷(8-hydroxydeoxy-guanosine, 8OHdG)多克隆抗体(一抗,美国Abcam公司);罗丹明标记的山羊抗兔IgG多克隆抗体(二抗,北京中杉金桥公司);4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI,美国Sigma公司)。

1.2 给药方法

M+S组和M+L组大鼠每日分两次腹腔注射MCI-186 9 mg/kg,自造模开始第1天给药,共14d。其余两组每日腹腔注射等量的生理盐水。

1.3 STZ诱导的认知损害模型的建立

依照文献^[5]的方法制模:10%水合氯醛3 ml/kg腹腔注射麻醉,将大鼠头部固定于立体定位仪上,沿头部正中中线做矢状切口,分离皮下组织暴露颅骨。取前囟后0.8 mm,左右旁开1.6 mm颅骨打孔,垂直深度4.0 mm微量加样器缓慢双侧脑室

内注射STZ 3 mg/kg。注入的STZ生理盐水溶液体积控制在10 μ l左右,假手术组脑室内注射相应体积的生理盐水。注射完毕用骨蜡封填颅骨缺损,缝合头皮。48 h后重复上述手术注药过程。

1.4 跳台试验评价认知功能

制模2周后行跳台试验评价各组大鼠的学习记忆能力。跳台试验箱大小为25 cm \times 25 cm \times 75 cm,箱底铺满金属方格网,在箱底一角放置一个高5 cm,直径8 cm的安全平台。第1天将大鼠放在安全平台上,当大鼠跳下平台,四肢会受到电击(3 Hz; 0.4 mA),经过反复的跳上跳下,大鼠最终会停留在平台上,实验时间为300 s。第2天重复相同的实验并记录大鼠第一次跳下平台的时间(潜伏期)和300 s内大鼠从平台跳下的次数(错误次数)。

1.5 Morris水迷宫试验评价认知功能

跳台试验后行Morris水迷宫测试评价各组大鼠的学习记忆能力^[4]。水迷宫是一个直径150 cm,高60 cm充满水的圆形不锈钢水池,水池分为4个象限。逃逸平台是一个透明的直径为10 cm的可移动圆柱形平台,其表面距水面2 cm。在测试中将平台放置在任一象限,选择某个象限将大鼠面朝池壁放入水中。大鼠到达平台后令其在平台停留30 s,然后继续下一次训练,每次寻找平台时间不超过60 s。每天训练4次,记录大鼠每次到达平台所用的时间(潜伏期),共训练5 d。

1.6 H_2O_2 和CAT检测

认知功能评价后处死动物,迅速取脑,冷盐水冲洗去除血液和杂质。分离海马和皮质组织称重,用生理盐水分别制成10%组织匀浆。4 $^{\circ}$ C,4000 g离心10 min,取上清,严格按照试剂盒说明的方法检测。

1.7 免疫荧光检测8OHdG

麻醉动物,经左心室插管,灌流生理盐水和4%多聚甲醛。取脑,取视交叉前后2 mm冠状冰冻切片,采用免疫荧光方法检测8OHdG表达。方法如下:切片用PBS冲洗,丙酮固定10 min,加0.5% Triton X-100置于室温30 min,1% BSA封闭,滴加羊抗大鼠8OHdG多克隆抗体(一抗),4 $^{\circ}$ C孵育过夜。次日滴加罗丹明标记兔抗山羊IgG(二抗),避光室温下孵育30 min。DAPI染细胞核,封片,荧光显微镜下观察。

1.8 统计学评价

跳台试验, Morris水迷宫试验和生化分析结果

用 $\bar{x} \pm s$ 表示。应用 SPSS 18.0 统计软件系统作数据处理分析,统计分析方法为单因素方差分析(ANOVA),以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 认知功能评价

跳台试验中,各组大鼠潜伏期(秒)结果为 S 组 270.2 ± 21.4 、M + S 组 276.3 ± 22.7 、L 组 179.1 ± 41.3 、M + L 组 250.5 ± 27.1 。L 组比 S 组潜伏期显著缩短($P < 0.05$);M + L 组比 L 组潜伏期显著延长($P < 0.05$);S 组与 M + S 组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图 1。

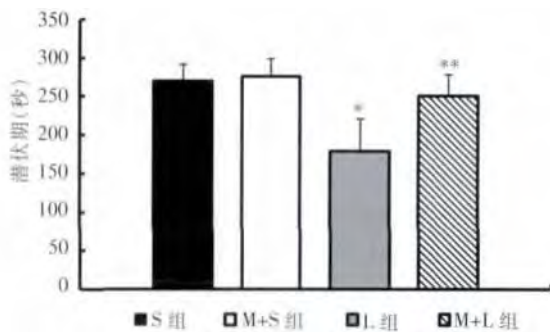


图 1 跳台试验各组大鼠潜伏期比较。* 与 S 组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);** 与 L 组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

各组大鼠错误次数(次)结果为 S 组 2.25 ± 0.44 、M + S 组 2.13 ± 0.65 、L 组 3.88 ± 0.87 、M + L 组 2.83 ± 0.64 。L 组比 S 组次数显著增加($P < 0.05$);M + L 组比 L 组次数显著减少($P < 0.05$);S 组与 M + S 组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图 2。

Morris 水迷宫试验中,各组大鼠第 1 天至第 5 天平均潜伏期均呈逐渐缩短趋势。第 5 天潜伏期(秒)结果为 S 组 8.31 ± 2.73 、M + S 组 9.41 ± 4.42 、L 组 36.1 ± 3.59 、M + L 组 18.63 ± 3.73 。L 组比 S 组潜伏期显著延长($P < 0.05$);M + L 组比 L 组潜伏期显著缩短($P < 0.05$);S 组与 M + S

组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图 3。

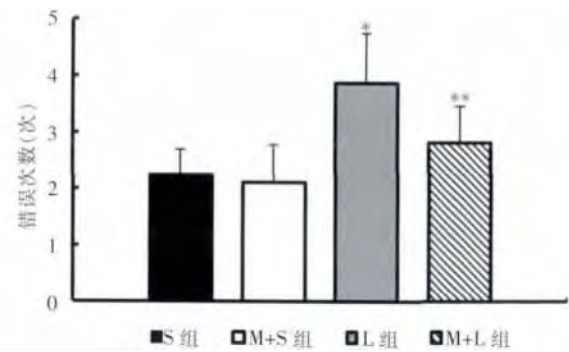


图 2 跳台试验各组大鼠错误次数比较。* 与 S 组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);** 与 L 组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

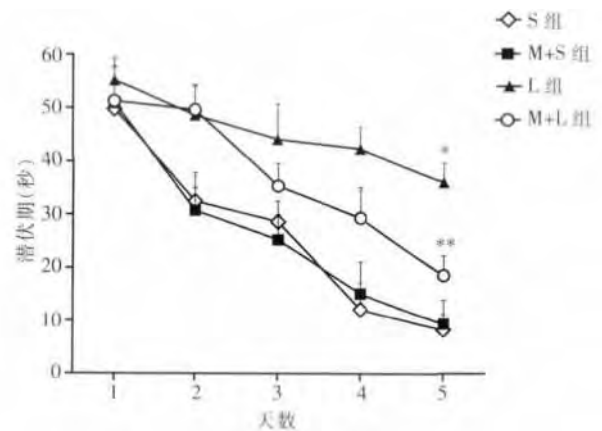


图 3 Morris 水迷宫试验各组大鼠潜伏期比较。* 与 S 组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);** 与 L 组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.2 H_2O_2 和 CAT 检测

L 组大鼠皮质和海马 H_2O_2 含量比 S 组显著增加($P < 0.05$);M + L 组 H_2O_2 含量比 L 组显著减少($P < 0.05$)。L 组大鼠皮质和海马 CAT 活性比 S 组显著减少($P < 0.05$);M + L 组 CAT 活性比 L 组显著增加($P < 0.05$)。S 组和 M + S 组的皮质和海马 H_2O_2 含量和 CAT 活性分别比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 各组大鼠海马和皮质 H_2O_2 含量和 CAT 活性比较

组别	例数	皮质		海马	
		H_2O_2 (mmol/gprot)	CAT(U/mgprot/min)	H_2O_2 (mmol/gprot)	CAT(U/mgprot/min)
S 组	8	48.75 ± 4.35	48.91 ± 4.53	41.73 ± 3.41	32.21 ± 3.45
M + S 组	8	50.96 ± 5.74	46.63 ± 5.28	43.31 ± 4.53	35.64 ± 4.17
L 组	8	$73.87 \pm 5.82^*$	$33.57 \pm 2.61^*$	$72.44 \pm 5.96^*$	$21.19 \pm 2.88^*$
M + L 组	8	$54.68 \pm 6.16^{**}$	$42.54 \pm 6.02^{**}$	$51.84 \pm 4.22^{**}$	$29.57 \pm 5.33^{**}$

注: * 与 S 组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);** 与 L 组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.3 8OHdG 免疫荧光检测结果

L 组与 S 组比较皮质和海马的阳性细胞数明

显增加 ($P < 0.05$)。M + L 组与 L 组比较皮质和海马的阳性细胞数明显减少 ($P < 0.05$)。见图 4。

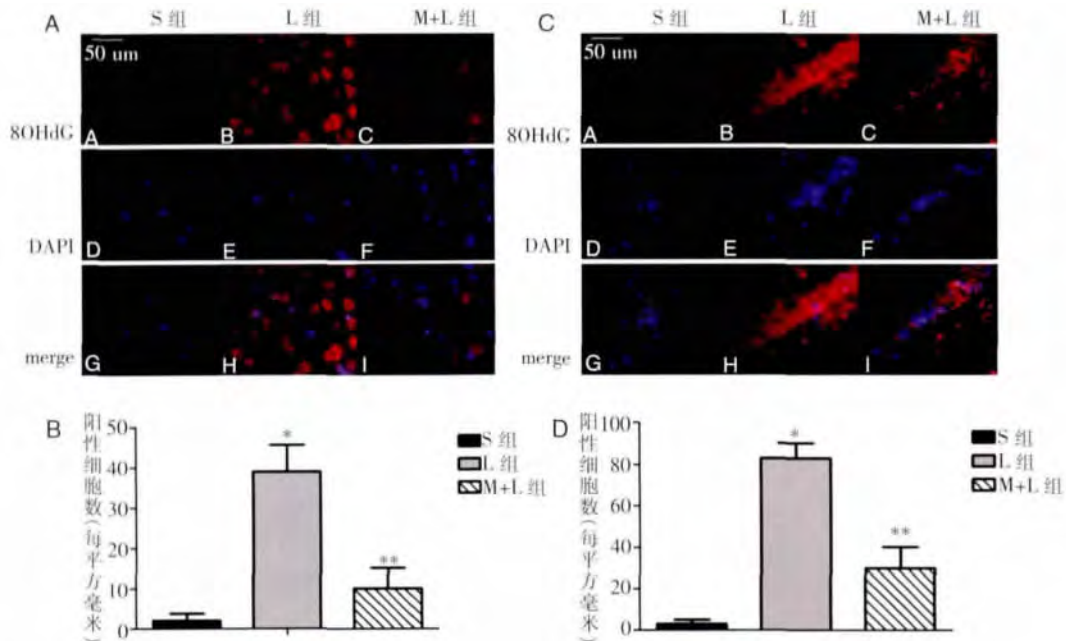


图 4 MCI-186 对 ICV-STZ 大鼠脑内 8OHdG 表达的影响。* 与 S 组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); ** 与 L 组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。A 和 B 为各组大鼠皮质 8OHdG 表达, C 和 D 为各组大鼠海马 8OHdG 表达。

3 讨论

氧化应激是由于活性氧产物和抗氧化防御之间的失衡产生的^[6]。越来越多的证据表明氧化应激在 AD 发生发展的早期就扮演了重要的角色。过度产生的自由基外层的不成对电子与生物大分子物质相互作用, 这些生物大分子物质(包括蛋白质、糖类、脂质和核酸)最终导致脑细胞结构和功能的改变^[4]。氧化应激还可以引起线粒体功能的紊乱和 A β 生成的增加^[7]。

跳台被动回避试验被用来评价非空间的长时程记忆。它是基于抑制模仿活动或学习习惯, 通过动物学会去掉某种特定的行为而逃避某种讨厌的事情^[8]。除了杏仁核和岛叶, 对恐惧的识别和对厌恶情绪的认知还依赖海马和皮质^[9, 10]。上述的脑组织结构在学习和记忆中起着重要作用并且更容易在氧化应激中受损。在本研究中, MCI-186 干预组大鼠较模型组大鼠显示了更长的潜伏期和更少的错误次数, 说明 MCI-186 的干预使大鼠该方面的记忆能力得到了改善。水迷宫试验是基于奖赏机制测试大鼠学习记忆能力, 本研究结果显示, MCI-186 干预后大鼠的潜伏期较模型组缩短, 学习记忆能力

改善。

活性氧是细胞损伤的重要介质, 能够导致氧化应激, 它们在多种疾病中发挥毒性作用, 其中包括神经系统退行性疾病, 如 AD^[11]。活性氧自由基含量最丰富的超氧阴离子能够诱导产生体内活性最强的氧化剂——羟自由基, 羟自由基能够氧化蛋白质和核酸, 使生物酶失活, 导致细胞失去原有的结构和功能。活性氧介导的氧化应激能够被细胞防御机制调节, 包括抗氧化酶如超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、CAT 和抗氧化物如谷胱甘肽等。羟自由基在 SOD 的作用下产生 H₂O₂, H₂O₂ 经 CAT 催化分解为水和氧气, 未分解的 H₂O₂ 在铁离子或铜离子存在的情况下会还原为羟自由基^[12]。羟自由基攻击 DNA 时可引起鸟嘌呤 8 位羟化而产生 8-OHdG^[13]。8-OHdG 将引起 DNA 复制中的错配, 引起 G 到 C 的转变, 因而出现 G:C→T:A 的突变的发生。在正常状态或轻度应激状态下, 氧化的 DNA 能够被核酸内切酶或碱基特异性修复糖基酶修复。在病理状态下, 如肿瘤、炎症、神经变性等, 组织中 8-OHdG 水平增加。因此, 8-OHdG 被认为是 DNA 氧化应激的标志物^[14, 15]。在 AD 发病

早期,神经元未形成 NFTs 时就可观察到 8-OHdG 含量增高^[16]。

MCI-186 是一种强力的自由基清除剂,许多研究发现其在缺血性脑卒中的患者中发挥抗氧化、抗炎、抗凋亡等多种作用^[17]。除此之外,最近的研究发现 MCI-186 在一些神经系统变性病的细胞和动物模型中发挥神经保护作用^[3]。之前的研究显示静脉给予大鼠 MCI-186 后,脑脊液和血浆 MCI-186 的浓度比例为 50% ~ 65% 之间^[18],证明 MCI-186 能够有效地透过血脑屏障在脑内发挥作用。本研究应用 MCI-186 腹腔注射干预 STZ 诱导的认知损害模型大鼠,结果表明 MCI-186 能够显著改善 STZ 引发的大鼠认知功能减退,脑内 CAT 减少和 H₂O₂ 增加,抑制了 STZ 诱导的 DNA 氧化应激。

目前,神经退行性疾病尚无有效的预防和治疗方法。许多研究发现依达拉奉作为一种强力自由基清除剂其对神经退行性疾病具有潜在的防治作用。本研究结果提示依达拉奉可能通过抑制 STZ 诱导的脑内 DNA 氧化应激改善了大鼠的认知功能。这一结果为自由基清除剂应用于 AD 等神经退行性疾病的防治提供了理论依据。

参 考 文 献

- [1] Wu S, Sena E, Egan K, et al. Edaravone improves functional and structural outcomes in animal models of focal cerebral ischemia: A systematic review. *Int J Stroke*, 2014, 9 (1): 101-106.
- [2] Nakamura T, Kuroda Y, Yamashita S. Edaravone Attenuates Brain Edema and Neurologic Deficits in a Rat Model of Acute Intracerebral Hemorrhage. *Stroke*, 2008, 39: 463-469.
- [3] Kikuchi K, Kawahara KI, Uchikado H, et al. Potential of edaravone for neuroprotection in neurologic diseases that do not involve cerebral infarction. *Exp Ther Med*, 2011, 2 (5): 771-775.
- [4] Vina J, Lloret A, Giraldo E, et al. Antioxidant pathways in Alzheimer's disease: possibilities of intervention. *Curr Pharm Des*, 2011, 17 (35): 3861-3864.
- [5] Sharma M, Gupta YK. Chronic treatment with trans resveratrol prevents intracerebroventricular streptozotocin induced cognitive impairment and oxidative stress in rats. *Life Sci*, 2002, 71 (21): 2489-2498.
- [6] Lin MT, Beal MF. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature*, 2006, 443 (7113): 787-795.
- [7] 李玉梅,付剑亮.阿尔茨海默病的线粒体功能紊乱机制. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2013, 40 (1): 70-74.
- [8] Zhao HF, Li Q, Li Y. Long-term ginsenoside administration prevents memory loss in aged female C57BL/6J mice by modulating the redox status and up-regulating the plasticity-related proteins in hippocampus. *Neuroscience*, 2011, 183: 189-202.
- [9] Arendt T. Alzheimer's disease as a disorder of mechanisms underlying structural brain self-organization. *Neuroscience*, 2001, 102 (4): 723-765.
- [10] Adolphs R. Neural systems for recognizing emotion. *Curr Opin Neurobiol*, 2002, 12 (2): 169-177.
- [11] Martinez A, Portero-Otin M, Pamplona R, et al. Protein targets of oxidative damage in human neurodegenerative diseases with abnormal protein aggregates. *Brain Pathol*, 2010, 20 (2): 281-297.
- [12] Pohanka M. Alzheimer's disease and oxidative stress: a review. *Curr Med Chem*, 2013, 21 (3): 356-364.
- [13] Donati A, Cavallini G, Bergamini E. Effects of aging, anti-aging calorie restriction and in vivo stimulation of autophagy on the urinary excretion of 8OHdG in male Sprague-Dawley rats. *Age (Dordr)*, 2013, 35 (2): 261-270.
- [14] 葛夏,徐晓云.2 型糖尿病与老年痴呆患者认知损害的相关生物学标记物研究进展. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2013, 39 (3): 274-278.
- [15] Pilger A, Rudiger HW. 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine as a marker of oxidative DNA damage related to occupational and environmental exposures. *Int Arch Occup Environ Health*, 2006, 80: 1-15.
- [16] Lin YK, Zeng YS, Qu ZQ, et al. Oxidative stress and Alzheimer's disease. *Anato Res*, 2009, 31 (1): 67-70.
- [17] Yoshida H, Yanai H, Namiki Y, et al. Neuroprotective effects of edaravone: a novel free radical scavenger in cerebrovascular injury. *CNS Drug Rev*, 2010, 12 (1): 9-20.
- [18] Tabrizchi R. Edaravone Mitsubishi-Tokyo. *Curr Opin Investig Drugs*, 2000, 1 (3): 347-354.