

维生素 E 对癫痫大鼠认知功能障碍的治疗作用及其可能机制

修彬华 魏 敏 李 华 杨江河 闫志强 刘绍明[△]

(兰州军区乌鲁木齐总医院神经外科 新疆 乌鲁木齐 830000)

摘要 目的 探讨维生素 E(VitE)对癫痫大鼠认知功能障碍的治疗作用及其可能机制。方法 将 30 只成年雄性 SD 大鼠随机分为健康对照组、单纯致痫组(SE 组)、VitE [按体重 100mg/(kg·d)]干预组(VitE 组)。采用 Morris 水迷宫实验方法检测致痫后大鼠学习记忆功能变化,同时检测脑组织匀浆中超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)、谷胱甘肽(GSH)、丙二醛(MDA)的水平。结果 (1) SE 组大鼠寻找平台的潜伏期明显长于对照组,具有统计学意义($P<0.05$),VitE 组寻找平台的潜伏期相对于 SE 组显著缩短($P<0.05$)。撤离平台后,SE 组大鼠在平台所在象限的停留时间明显短于对照组($P<0.05$),VitE 治疗后大鼠在平台所在象限的停留时间较 SE 组显著延长($P<0.05$)。(2) SE 组 SOD、GSH-PX、GSH 显著下降,MDA 明显增高,VitE 干预组 SOD、GSH-PX、GSH 显著增高,而 MDA 明显下降,具有统计学意义($P<0.05$)。结论:VitE 可改善癫痫持续状态后大鼠认知功能,其可能机制是通过减轻海马区的氧化应激反应减轻海马区的损伤,从而实现改善认知功能。

关键词 癫痫持续状态 维生素 E 认知功能障碍

中图分类号:Q95-3,R742.1 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2011)11-2094-04

Vitamin E for Cognitive Dysfunction of Rats with Epilepsy

XIU Bin-hua, WEI Min, LI Hua, YANG Jiang-he, YAN Zhi-qiang, LIU Shao-ming[△]

(Department of neurosurgery, Urumchi Hospital of Lanzhou Military region, Urumchi 830000, China)

ABSTRACT Objective: The purpose of the study was to investigate the effects of vitamin E (VitE) on cognitive deficits induced by status epilepticus (SE) and the possible mechanism in terms of oxidative stress in hippocampus. **Methods:** A total of 30 male Sprague-Dawley rats (200±20 g) were randomly assigned to one of the following groups: (n=10 in each group): Control group, SE group and Vit E group. Severe cognitive deficits in lithium-pilocarpine seizure model was tested by the water maze task. Glutathione (GSH) and Maleic Dialdehyde(MDA) content of the homogenate of Hippocampus were measured; The activity of Superoxide Dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-PX) in the homogenate of Hippocampus were detected. **Results:** Vitamin E could attenuate SE-induced cognitive deficits. Biochemical experiments revealed that SE can significantly increase content of MDA, decrease content of GSH and decreased the activities of SOD and GSH-PX in the homogenate of Hippocampus, which can be reversed by VitE. **Conclusions:** Vit E exhibits therapeutic potential for SE-induced cognitive deficits, which is most likely related, at least in part, to its anti-oxidative stress actions in hippocampus.

Key words: Status epilepticus; Vitamin E; Cognitive deficits

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3, R742.1 Document code: A

Article ID:1673-6273(2011)11-2094-04

前言

癫痫是最常见的神经系统疾病之一,发病机制极为复杂,至今尚未完全阐明,严重危害患者健康并影响生存质量。癫痫患者及动物可以出现记忆力下降等认知功能障碍,且发病率较高。目前癫痫所致的认知功能障碍越来越受到人们的重视。认知功能与边缘系统关系密切,而海马又是人体边缘系统的重要组成部分。目前已明确海马的破坏可导致实验动物学习记忆能力下降^[1-3]。氧化应激是指活性氧、脂质过氧化物造成机体氧化损伤^[4],大脑是脂质过氧化物敏感的器官,其中海马神经元氧化

应激损伤是癫痫大鼠认知功能障碍发生、发展的重要因素之一。而维生素 E(VitE)是一种体内强抗氧化剂^[5],具有潜在的预防和治疗癫痫所致认知功能障碍的作用。本实验拟利用癫痫持续状态(SE)动物模型研究维生素 E 对癫痫大鼠认知功能障碍的治疗作用及其可能机制。

1 材料方法

1.1 材料

VitE(购自西安蓝天生物工程有限责任公司),氯化锂及匹罗卡品(购自 Sigma 公司),超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)、还原型谷胱甘肽(GSH)、丙二醛(MDA)检测试剂盒(购自南京建成生物工程研究所),其余试剂为国产分析纯。

1.2 实验动物

健康雄性 SD 大鼠 (第四军医大学实验动物中心提供)30

作者简介 修彬华(1967-),男,硕士,副主任医师,主要从事神经外科常见疾病的临床治疗与基础研究,

联系电话 (0991)4991779 Email xiubinhua@sina.com

[△]通讯作者 刘绍明 Email xiubinhua@sina.com 电话 (0991)4991779

(收稿日期 2011-03-06 接受日期 2011-03-30)

只,体重 180~220 g,随机分为健康对照组、单纯致病组(SE 组)、VitE [按体重 100 mg/(kg·d)]干预组(VitE 组),建立致病模型前一天即用 VitE 干预,给药方式灌胃,1 次/日。致病后的第 2 天至第 7 日进行 Morris 水迷宫行为训练及测试,第 7 天水迷宫试验结束后断头处死并取双侧海马组织,-80℃低温保存。

1.3 大鼠癫痫模型的建立

大鼠腹腔注射氯化锂 3mmol/kg,24 h 后再腹腔注射新鲜配置的匹罗卡品 30 mg/kg^[6]。对照组大鼠给予等量生理盐水腹腔注射。给药后大鼠在 15~45 min 出现反复强直一阵挛发作,形成癫痫持续状态。按照经典的 Racine 癫痫发作行为标准进行癫痫的行为观察记录^[7] 0 级,无任何反应,正常行为状态; 级,面部阵挛,包括眨眼、动须、节奏性咀嚼等; 级, 级加节律性点头; 级, 级加前肢痉挛; 级, 级加后肢站立; 级, 级加摔倒。模型组动物发作级别均达到 级以上。于癫痫持续状态后 60 min 腹腔注射地西泮 4 mg/kg 以终止癫痫持续状态,降低死亡率。

1.4 Morris 水迷宫行为测试

参照文献所示方法进行^[8,9],略有改动。致病后的第二日上午 10 点开始行 Morris 水迷宫训练,大鼠连续训练 5d,每天分上、下午 2 个时段,每个时段训练 4 次,间隔为 60s。每次实验大鼠在 4 个不同象限中点头朝池壁放入水池,次序每天不同。任其游泳,直至找到平台。大鼠找到平台时间和轨迹由水池上方的摄像机记录。60s 内到达平台的时间即逃避潜伏期被记录下来,并允许大鼠在平台上停留 30s 以达到强化记忆效果,如果大鼠在 60s 内未到达平台,逃避潜伏期以 60s 记录,并由实验者将其引导至平台停留 30s。取每日 8 次训练平均值作为当日

的逃避潜伏期。②空间探索实验:致病后第 7 天上午进行空间探索实验,撤除平台,从平台对侧象限放入大鼠,持续 120 秒,记录大鼠在平台所在象限的停留时间。每次实验后将大鼠用毛巾擦干放入笼中。

1.5 脑组织匀浆的制备

取海马组织在电子天平上称重,低温条件下匀浆,在 4℃低温离心机中 4000r/min 离心 10 min,取上清液,按照试剂盒说明测定脑中 SOD、GSH-Px、GSH、MDA。

1.6 统计学处理

所得数据均用 spss 软件进行处理。结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析。

2 实验结果

2.1 模型情况

大鼠在注射匹罗卡品后 20-40min 出现烦躁、洗脸样动作、节律性咀嚼、点头运动,继之双前肢抬起阵挛或后肢伸展。随后出现四肢抽搐,进一步发展到全身强直阵挛发作,站立、摔倒反复发作,均达到 级发作,符合癫痫持续状态。

2.2 各组大鼠寻找平台潜伏期变化

如 Fig 1 所示,从第三天开始,SE 组大鼠寻找平台的潜伏期明显长于对照组,具有统计学意义($P < 0.05$),VitE 组寻找平台的潜伏期时间相对于 SE 组显著降低($P < 0.05$)。

2.3 空间探索实验

SE 组大鼠在平台所在象限的停留时间明显短于对照组 ($P < 0.05$),VitE 治疗后大鼠在平台所在象限的停留时间较 SE 组显著延长($P < 0.05$)(Fig 2)。

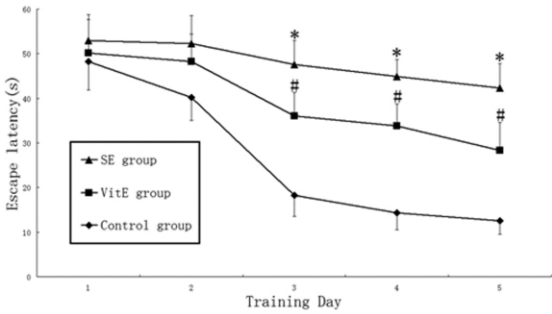


图 1 维生素 E 对 SE 大鼠寻找平台潜伏期的影响

Fig. 1 Effects of Vitamin E on escape latencies caused by status epilepticus
Note: * $P < 0.05$ SE group compared with control group # $P < 0.05$ Vit E group compared with SE group.

2.4 VitE 对癫痫大鼠海马组织中 SOD、GSH-Px、GSH、MDA 的影响

由 Table 1 可见,SE 组与正常对照组相比,大鼠脑组织 SOD、GSH-Px、GSH 降低 ($P < 0.05$),MDA 显著增高($P < 0.05$),VitE 组可显著提高癫痫大鼠海马组织 SOD、GSH-Px、GSH 水平($P < 0.05$),降低 MDA 水平($P < 0.05$)。

3 讨论

目前癫痫所致的认知功能障碍越来越受到人们的重视,严

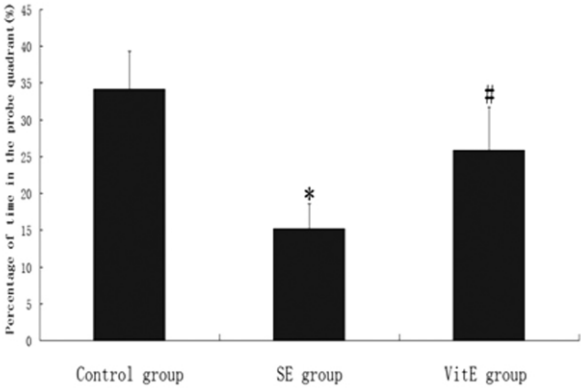


图 2 维生素 E 对 SE 大鼠寻找平台潜伏期的影响

Fig. 2 Effects of Vitamin E on Percentage of time in the probe quadrant caused by status epilepticus
Note: * $P < 0.05$ SE group compared with control group # $P < 0.05$ Vit E group compared with SE group.

重影响患者生活质量。1981 年心理学家 Morris 首次应用水迷宫方法研究大鼠学习记忆,此后该方法不断完善并被广泛认可,现已成为公认的研究学习记忆的最准确的方法之一^[10-12]。本实验通过 Morris 实验证实癫痫持续状态可使大鼠寻找平台潜伏期延长,空间探索试验中 SE 大鼠在平台所在象限的停留时间缩短,提示学习记忆能力下降,与文献报道一致^[13],VitE 治疗

表 1 VitE 对 SE 大鼠氧化应激的影响($\bar{x} \pm s$)
Table 1 Effects of Vitamin E on oxidative stress actions in hippocampus caused by status epilepticus($\bar{x} \pm s$)

Group	SOD(μ U/mg)	GSH-Px(U/mg)	GSH(nmol/mg)	MDA(nmol/mg)
Control group	67.23 $\pm$ 12.28	35.12 $\pm$ 6.78	14.46 $\pm$ 2.08	2.23 $\pm$ 0.74
SE group	32.68 $\pm$ 4.87*	16.63 $\pm$ 7.83*	8.95 $\pm$ 1.32*	4.87 $\pm$ 0.93*
VitE group	58.78 $\pm$ 7.36 [#]	27.45 $\pm$ 6.42 [#]	11.57 $\pm$ 3.86 [#]	3.07 $\pm$ 0.21 [#]

Note : *P<0.05 SE group compared with control group #P<0.05 Vit E group compared with SE group.

后可显著改善上述现象，从而证实了 VitE 可显著改善癫痫大鼠认知功能障碍。目前已明确，海马区与大脑学习记忆功能密切相关，其损伤会严重影响动物的学习记忆功能^[14]，癫痫持续状态所致的认知功能障碍亦与海马区损伤有关。VitE 是一种体内强抗氧化剂，可能通过其抗氧化作用保护海马组织，故本实验选取 SOD、GSH-Px、GSH、MDA 等氧化还原相关指标探索 VitE 改善 SE 大鼠认知功能障碍的可能机制。

SOD 是一种肽链大分子金属酶，能催化超氧化物阴离子自由基歧化为过氧化氢与氧气，其活力的高低可间接反应机体清除氧自由基的能力^[15]。GSH-Px 是体内广泛存在的一种过氧化物分解酶，它能特异的催化还原型谷胱甘肽变为氧化型谷胱甘肽，使有毒的过氧化物还原成无毒的羟基化合物，同时促进过氧化氢分解，保护细胞膜的结构及功能不受过氧化物损害^[16]。GSH 是 GSH-Px 的底物，是 GSH-Px 完成其功能的基础。这两种酶及 GSH 的作用都是减少自由基的产生，防止脂质过氧化及其代谢产物对机体的损害，其活性降低，可导致氧自由基的产生和消除失去平衡，表现为氧自由基产生增加和细胞自由基清除酶的活力下降，造成神经细胞脂质过氧化的发生。MDA 作为氧自由基与生物膜不饱和脂肪酸发生脂质过氧化反应的代谢产物^[17]，其含量的变化间接地反应了组织中氧化自由基含量的变化，通过测定 MDA 含量可以估计脑组织中氧自由基水平和脂质过氧化反应的强弱。本实验结果显示，癫痫持续状态后海马组织中 SOD、GSH-Px 活性降低、GSH 含量降低，MDA 含量显著增高，VitE 可显著逆转上述变化。故 VitE 可显著抑制海马组织的氧化应激反应，保护海马细胞，进而减轻大鼠认知功能损害。

综上所述，VitE 可改善癫痫持续状态后大鼠认知功能障碍，其可能机制是通过减轻海马区的氧化应激反应减轻海马区的损伤，从而实现改善认知功能。为癫痫后认知功能障碍的治疗提供了新思路。

参 考 文 献(References)

[1] 段瑞生,刘娜,王维平,等. 戊四氮诱导癫痫大鼠的认知功能测定与海马超微结构观察[J]. 江苏医药, 2009;35(3):332-334
Duan Ruisheng, LiuNa, Wang Weiping, et al. Cognitive ability and ultra-microstructure in rats hippocampus after pentetrazol induced seizure[J]. Jiangsu Medical Journal, 2009, 35(3): 332-334 (In Chinese)

[2] 叶冰,黄华品,车春晖,等. 癫痫复杂部分性发作患者认知功能与海马质子磁共振波谱改变相关性分析 [J]. 中华神经医学杂志,2010,9 (2):158-161
Ye Bing, Huang Hua-pin, Che Chun-hui, et al. Correlation analysis of

cognitive function and changes in proton magnetic resonance spectroscopy of the hippocampus in patients with complex partial seizures [J]. Chinese Journal of Neuromedicine, 2010,9(2):158-161 (In Chinese)

[3] 贾丽景,王维平,刘瑞春,等.慢性癫痫大鼠认知功能及海马胞外信号调节激酶 1 / 2 的变化[J]. 中国全科医学, 2009,12(24): 2216-2219
Jia Li -ring, Wang Wei-ping, Liu Rui-chun, et al. Impaired Spatial Learning Related with Seizures and Levels of ERK1/2 in Hippocampus of Pentylene-tetrazol - kindled Rats [J]. Chinese General Practice, 2009,12(24): 2216-2219 (In Chinese)]

[4] Ji X, Liu W, Xie K, et al. Beneficial effects of hydrogen gas in a rat model of traumatic brain injury via reducing oxidative stress[J]. Brain Res, 2010,135(4):196-205

[5] 刘成梅,冯妹元,刘伟等. 天然维生素 E 及其抗氧化机理[J]. 食品研究与开发, 2005,26(6):205-208
Liu Cheng-mei, Feng Mei-yuan, Liu Wei, et al. The natural vitamin E and Its antioxidant mechanism [J]. Food Research and Developent, 2005,26(6): 205-208 (In Chinese)

[6] Hu K,Zhang C, Long L, et al. Expression profile of microRNAs in rat hippocampus following lithium-pilocarpine-induced status epilepticus [J]. Neurosci Lett,2 011, 488(3):252-257

[7] Racine RJ. Modification of seizure activity by electrical activity : Motor seizure [J]. Electroenceph clin Neurophysiol, 1972,32: 281-294

[8] Li Ming Wang, Yi Fan Han, Xi Can Tang, et al. Huperzine A improves cognitive deficits caused by chronic cerebral hypoperfusion in rats[J]. European Journal of Pharmacology, 2000; 398(1):65-72

[9] Zheng G,Zhang W,Zhang Y,et al. Gamma-Aminobutyric acid (A) (GABA (A)) receptor regulates ERK1/2 phosphorylation in rat hippocampus in high doses of methyl tert-butyl ether (MTBE)-induced impairment of spatial memory[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2009, 236 (2):239-245

[10] Mulder GB, Pritchett K. The Morris water maze [J]. Contemp Top Lab Anim Sci, 2003,42(2):49-50

[11] D'Hooge R, De Deyn PP. Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory [J]. Brain Res Brain Res Rev , 2001,36(1):60-90

[12] Brandeis R, Brandys Y, Yehuda S. The use of the Morris Water Maze in the study of memory and learning [J]. Int J Neurosci ,1989 ,48 (1-2):29-69

[13] 李锐,杜芳,陈云春,等. 托吡酯对锂-匹罗卡品致痫幼鼠视觉空间学习记忆和海马 mGluR1 mRNA 表达的影响[J]. 卒中与神经疾病, 2003;10(6):352-355
Li Rui, Du Fang, Chen Yunchun, et al. Altered visual-spatial memory

- and mGluR1mRNA expression in lithium-pilocarpine induced seizure rat treated with topiramate[J]. Stroke and Nervous Diseases, 2003, 10 (6): 352-355 (In Chinese)
- [14] Redish AD, Touretzky DS. The role of the hippocampus in solving the Morris water maze [J]. Neural Comput, 1998,10(1):73-111
- [15] 毛海峰,陈嘉勤,梁宋平等. HWTX- 对全脑缺血大鼠脑组织自由基及海马神经元损伤的保护作用研究 [J]. 北京体育大学学报, 2007,30(3): 351-353
- Mao Hai-feng, Chen Jia-qin, Hang Song-ping, et al. Research on Protective Effects of HWTX- on the Damages of Free Radical and I-hippocampus Neurons in the Brain of Cerebral Ischemia Rats [J]. Journal of Beijing University of Physical Education, 2007,30 (3): 351-353 (In Chinese)
- [16] 卢斌,陈永,姜绪平. 消化道肿瘤患者血清中活性氧、超氧化物歧化酶和谷胱甘肽过氧化物酶的活性测定 [J]. 中国医学创新, 2010,7 (28): 9-10
- Lu Bin, Chen Yong, Jiang Xu -ping. The determination of plasma ROS, SOD and GSH - PX activity in gastrointestinal cancer patients [J]. Medical Innovation of China, 2010,7(28): 9-10 (In Chinese)
- [17] 闫志强,魏敏,李志超,等. 心房钠利尿肽对肺泡 型上皮细胞的保护作用[J]. 中国病理生理杂志, 2007(6):1111-1115
- Yan Zhi- qiang, Wei Min, Li Zhi -chao, et al. Protective effect of atrial natriuretic peptide on alveolar type cells [J]. Chinese Journal of Pathophysiology, 2007(6):1111-1115 (In Chinese)
-
- (上接第 2134 页)
- [15] 黄子婴,汪希鹏,狄文.分段诊刮诊断子宫内膜癌临床价值分析[J]. 中国实用妇科与产科杂志,2008,24(6):434-436
- Huang Zi-yin, Wang Xi-peng, Di-wen. Clinical value of the fractional dilatation & curettage in the diagnosis of endometrial cancer [J]. Chinese Journal of Practical Gynecology and Obstetrics, 2008,24 (6): 434-436
- [16] 杨淑玲,申爱荣,娄华,等.B 超联合宫腔镜诊断子宫内膜癌的临床价值[J].中国内镜杂志,2005,11(9):910-916
- Yang Shu-ling, Shen Ai-rong, Lou-hua, et al. Clinical value of b-ultrasonography combined with hysteroscopy in endometrial carcinoma [J]. China Journal of Endoscopy, 2005,11(9):910-916
- [17] 高婉丽,冯力民,王伟娟,等.宫腔镜辅助下分段诊刮术与单纯分段诊刮术诊断子宫内膜癌的比较[J].首都医科大学学报, 2004,25(4): 519-521
- Gao Wan-lin, Feng Li-min, Wang Wei-juan, et al. Comparative Analysis of Hysteroscopy and Dilatation and Curettage and Traditional D&C in Diagnosis of Endometrial Carcinoma [J]. Journal of Capital Medical University, 2004,25(4):519-521
- [18] Kung FT, Lin H, Hsu TY, Chang CY, et al. Differential diagnosis of suspected cervical pregnancy and conservative treatment with the combination of laparoscopy-assisted uterine artery ligation and hysteroscopic endocervical resection [J]. Fertil Steril, 2004,81 (6): 1642-1649
- [19] Comstock CH, Lee W, Vettraino IM, et al. The early sonographic appearance of placenta accreta [J]. J Ultrasound Med, 2003,22 (1): 19-23
- [20] Selvaggi L, Cormio G, Ceci O, et al. Hysteroscopy does not increase the risk of microscopic extrauterine spread in endometrial carcinoma [J]. Int J Gynecol Cancer, 2003,13(2):223-227